



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
IBB - INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

PATRICIA POSTINGEL QUIRINO

A presença de intersexo em *Brycon orbignyanus* (Teleostei: Bryconidae): da
diferenciação sexual, fisiologia a características sexuais secundárias

Botucatu
2022

PATRICIA POSTINGEL QUIRINO

A presença de intersexo em *Brycon orbignyanus* (Teleostei: Bryconidae): da diferenciação sexual, fisiologia a características sexuais secundárias

Tese apresentada ao Programa de Pós -
Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia)
– Instituto de Biociências, UNESP, Campus
de Botucatu, como parte das exigências para a
obtenção do título de Doutora.

Orientadora: Prof^a Dr^a Rosicleire Veríssimo Silveira

Botucatu
2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Quirino, Patricia Postingel.

A presença de intersexo em *Brycon orbignyanus* (Teleostei: Bryconidae) : da diferenciação sexual, fisiologia a características sexuais secundárias / Patricia Postingel Quirino. - Botucatu, 2022

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Rosicleire Veríssimo Silveira
Capes: 20400004

1. Peixes - Reprodução. 2. Piracanjuba. 3. Diferenciação sexual. 4. Hermafroditismo.

Palavras-chave: Epitélio germinativo; Espículas; Inversão sexual; Piracanjuba; Remodelamento gonadal.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE PATRICIA POSTINGEL QUIRINO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ZOOLOGIA), DO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 01 dias do mês de fevereiro do ano de 2022, às 08:00 horas, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de TESE DE DOUTORADO de PATRICIA POSTINGEL QUIRINO, intitulada **A presença de intersexo em *Brycon orbignyanus* (Teleostei: Bryconidae): da diferenciação sexual, fisiologia a características sexuais secundárias**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. ROSICLEIRE VERISSIMO SILVEIRA (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Departamento de Biologia e Zootecnia / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira - UNESP, Profa. Dra. TALITA SARAH MAZZONI (Participação Virtual) do(a) Instituto de Ciências Biomédicas / Universidade Federal de Alfenas, Prof. Dr. LÁZARO WENDER OLIVEIRA DE JESUS (Participação Virtual) do(a) Universidade Federal de Alagoas - UFAL, Prof. Dr. SERGIO RICARDO BATLOUNI (Participação Virtual) do(a) Centro de Aquicultura - Unesp, Prof. Dr. GUSTAVO MANUEL SOMOZA (Participação Virtual) do(a) Instituto Tecnológico de Chascomús (CONICET- UNSAM). Após a exposição pela doutoranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: **APROVADA**. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.



Profa. Dra. ROSICLEIRE VERISSIMO SILVEIRA

Dedico este trabalho as pessoas que são as razões pelas quais estou aqui: meu pai, Luiz Antônio; minha mãe, Rozângela; meu irmão, Luiz Fernando. A vocês, dedico todo o meu amor.

*[...] E foi bom. Apenas bom. Profundamente bom.
Antes, durante e depois da loucura.*

Miguel de Cervantes em
Dom Quixote de La Mancha

[...] Creio que não dormirei esta noite... nunca durmo na primeira noite em uma casa estranha, e esta é a cama mais estranha que já vi. Mas isso não tem importância. Sempre amei a noite, e vou gostar de ficar acordada na cama, pensando em tudo na vida, no passado, no presente e no que está por vir. Especialmente no que está por vir.

Lucy M. Montgomery em
Anne de Windy Poplars

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida e aos bons espíritos que me acompanham em minha vivência terrena.

A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho - UNESP, que um dia foi meu sonho, hoje é minha casa e sei que será sempre local de acolhimento quando eu precisar voltar.

A Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior - CAPES pela bolsa concedida.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pela bolsa de iniciação científica concedida à minha co-orientada Bárbara C. Bianchini (nº Processo: 2019/27406-3) e aos demais processos com projetos vinculados a esta tese (nº Processo: 2013/24527-8; 2014/23379-8).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pelo financiamento de projetos vinculados a esta tese (CNPq: 302108/2015 -7; CNPq: 305673/2018-1).

A minha orientadora, Rosicleire Veríssimo Silveira, que um dia foi minha professora de Vertebrados e Fisiologia, depois passou a ser também minha mãe científica orientando minha Iniciação Científica, Mestrado e agora o Doutorado. Acredito que a senhora já saiba, mas muito além de me ensinar ciência e a ter um pensamento crítico, me ensinou a ter postura, a ter curiosidade, a ter independência, a saber lidar com escolhas certas ou erradas e todas as frustrações que poderiam vir delas, a ter postura de líder quando a situação exigir de mim. Eu já fui a Patricia que entrava saltitante e cantante na sua sala, hoje sou a Patricia, ainda cantante, mas que entra de forma mais ponderada e serena, muito mais confiante sobre tudo nessa vida. Não há palavras que eu possa expressar para agradecer por tudo isso, obrigada de todo o coração.

Ao meu professor, Alexandre Ninhaus Silveira, meu pai científico também, que assim como a Rosi, me ensinou tanto sobre ciência como sobre a vida. Acredito que o senhor não perceba isso, mas também me ensinou a lidar com as situações do cotidiano de forma tranquila e equilibrada. Como quando um tanque de experimento pega fogo, quando um equipamento

quebra, quando os peixes morrem, vai tudo ser resolvido com calma, da melhor maneira que tiver de ser. Obrigada por tudo!

Aos membros desta banca, agradeço imensamente por terem aceitado o convite e por contribuírem efetivamente com a minha pesquisa.

A AES Tietê e a Estação de Piscicultura de Promissão, por nos fornecerem os animais utilizados nesta pesquisa.

Aos funcionários da pós graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) do Instituto de Ciências de Botucatu, em especial a Davi Müller por todo trabalho, organização e educação impecáveis. E aos funcionários do Departamento de Biologia e Zootecnia da UNESP/FEIS, Meiri, Júnior, Wilder, Sidival e Luzinete. Este trabalho foi desenvolvido com participação especial de vocês. Agradeço por toda a ajuda e colaboração ao longo de tantos anos!

Aos meus pais, Luiz Antônio e Rozângela, e ao meu irmão, Luiz Fernando, saibam que todas as vezes que recebo um elogio, seja por qualquer motivo, agradeço mentalmente a vocês. Não há uma ação, conquista ou luta que eu não faça pensando em deixá-los orgulhosos. Cada passo da minha caminhada eu devo a vocês. Amo-os profundamente.

A todos os meus companheiros do Laboratório de Ictiologia Neotropical, que não listarei absolutamente todos aqui pois ao longo de 8 anos tantas pessoas me ajudaram e me ensinaram que eu poderia correr o risco de falhar com alguém, mas saibam, cada um de vocês contribuiu para que este trabalho fosse desenvolvido. Em especial, agradeço imensamente a Amanda, Cristiane Bashiyó, Geovanna, Elis, Renata, Ricardo (*in memoriam*), Maria Luiza, Laís e Cristal, vocês tornaram-se parte da minha família e sei que sempre encontrarei morada onde estiverem.

A Prof. Dra. Renata G. Moreira e a minha amiga Dra. Giovana de Souza Branco, por terem contribuído com grande parte desta pesquisa, por terem me recebido em meio a uma pandemia e terem me ajudado da melhor forma em tudo quando estive no Laboratório de Metabolismo e Reprodução de Organismos Aquáticos/USP. Muito obrigada por tudo.

A todos os meus amigos que souberam lidar com o meu afastamento e meu sumiço enquanto desenvolvia esta pesquisa e escrevia esta tese, além de saberem lidar com todos os

meus leves surtos e desabafos. Em especial, agradeço AZAMIGAS que diariamente demonstram lealdade, hombridade, força e me dão esperanças de um futuro melhor, pois um grupo com doze pessoas tão distintas e tão únicas me permite ver que o detalhe das diferenças é justamente o que mantém todo mundo unido.

Tenho a impressão que hoje em dia a vida está sendo tratada de forma tão trivial que em busca de likes alguns sentimentos até chegaram a perder o sentido. Este não é o caso aqui! Agradeço a cada um que passou pela minha vida e deixou em mim uma marca para mudança, para o meu aprendizado e crescimento. Gratidão a absolutamente tudo, até mesmo a tudo que deu errado para que pudesse dar certo no fim.

Obrigada!

RESUMO

A piracanjuba, *Brycon orbignyanus* (Bryconidae), é uma espécie reofílica de grande interesse comercial na aquicultura, porém está criticamente ameaçada na natureza devido as ações antrópicas. Assim, este trabalho teve como objetivo estudar a diferenciação sexual até a maturidade reprodutiva em *B. orbignyanus* cultivados em sistemas de recirculação de água, a fim de promover conhecimentos para produção e conservação da espécie. Deste modo, foi realizada uma reprodução induzida através de reprodutores previamente selecionados de *B. orbignyanus* na Estação de Aquicultura da U.H.E. de Promissão – AES – Tietê, Promissão/SP. Com um mês de idade foram transferidos para o Laboratório de Ictiologia Neotropical (UNESP/FEIS), onde foram mantidos em condições controladas de cativeiro ($27 \pm 0,5$ °C, pH $6,5 \pm 0,6$ e amônia $0,25 \pm 0,10$ ppm.). Assim que atingiram dois meses de idade, foram realizadas coletas mensais das gônadas, fígado e sangue dos espécimes ($n=15$) até que atingissem um ano, seguidas por coletas posteriores com dois e três anos de idade. Aos três meses de idade, as gônadas até então indiferenciadas, dão origem a fêmeas (15.88 ± 1.31 cm comprimento total), enquanto que em machos a diferenciação ocorre apenas aos cinco meses de idade (18.01 ± 0.10 cm comprimento total). No entanto, parte das fêmeas diferenciadas sofrem um processo de inversão sexual, passando por um período de remodelamento gonadal, dando origem a espécimes intersexos (22.5 ± 1.06 cm comprimento total), pois possuem características gonadais femininas e masculinas ao mesmo tempo. Com a finalização do remodelamento gonadal, espécimes intersexo tem as características femininas nas gônadas regredidas, formando epitélio germinativo testicular e dando origem ao que foi denominado machos secundários. Ademais, a diferenciação sexual em *B. orbignyanus*, embora quantificada temporalmente, também é influenciada pelo crescimento dos espécimes e pela interação de fatores fisiológicos. Os níveis plasmáticos de testosterona (T) ao longo da ontogênese gonadal no primeiro ano de vida destes espécimes são maiores do que de 11-cetotestosterona (11KT), com exceção de machos com maturidade sexual atingida. Dentro dos hormônios esteroides quantificados neste trabalho, 11KT é o provavelmente o hormônio diretamente envolvido na inversão sexual ocorrida nas fêmeas. Ademais, machos primários e machos secundários desenvolvem características sexuais secundárias igualmente, sendo que machos que apresentam nadadeira anal com seis raios ou mais com espículas estão Aptos a Espermiar.

Palavras-chave: Epitélio germinativo. Espículas. Inversão sexual. Piracanjuba. Remodelamento gonadal.

ABSTRACT

Piracanjuba, *Brycon orbignyanus* (Bryconidae), is a rheophilic species of great commercial interest in aquaculture, but it is critically endangered in nature due to anthropic actions. Considering this, the present work aims to study the morphophysiology of sexual differentiation until reproductive maturity in *B. orbignyanus* cultivated in water recirculation systems to provide knowledge for the production and conservation of this species. To do so, an induced reproduction was carried out using previously selected breeders of *B. orbignyanus* at the Aquaculture Station of the Hydroelectric Power Plant of Promissão – AES – Tietê, Promissão/SP. At one month of age, the fish were transferred to the Neotropical Ichthyology Laboratory (UNESP/FEIS), where they were kept in captivity under controlled conditions (27 ± 0.5 °C, pH 6.5 ± 0.6 and ammonia 0.25 ± 0.10 ppm). As soon as they reached two months of age, samples began being collected from their gonads, liver and blood ($n=15$), until they reached one year of age, followed by further collections at two and three years of age. At three months of age, the undifferentiated gonads give rise to females (15.88 ± 1.31 total length), whereas in males the differentiation only occurs at five months of age (18.01 ± 0.10 total length). However, part of the differentiated females undergo a process of sexual inversion, going through a period of gonadal remodeling, and then giving rise to intersex specimens (22.5 ± 1.06 total length), as they have female and male gonadal characteristics at the same time. At the end of this process, intersex specimens have the female characteristics in the regressed gonads, forming testicular germinal epithelium and giving rise to the so-called secondary males. Furthermore, the sexual differentiation in *B. orbignyanus*, although quantified over time, is also influenced by the growth (total length) of the specimens and by the interaction of physiological factors. Plasma testosterone (T) levels throughout gonadal ontogenesis in the first year of life of these specimens are higher than that of 11-ketotestosterone (11KT), except for males that reached sexual maturity. Among the steroid hormones quantified in this work, 11KT is probably the hormone directly involved in the sex inversion that occurred in the females. Furthermore, primary males and secondary males develop secondary sexual characteristics equally, males that present an anal fin with six rays or more with hooks are Spawning Capable.

Keywords: Bony hooks. Germinal epithelium. Gonadal remodeling. Sex inversion. Piracanjuba.

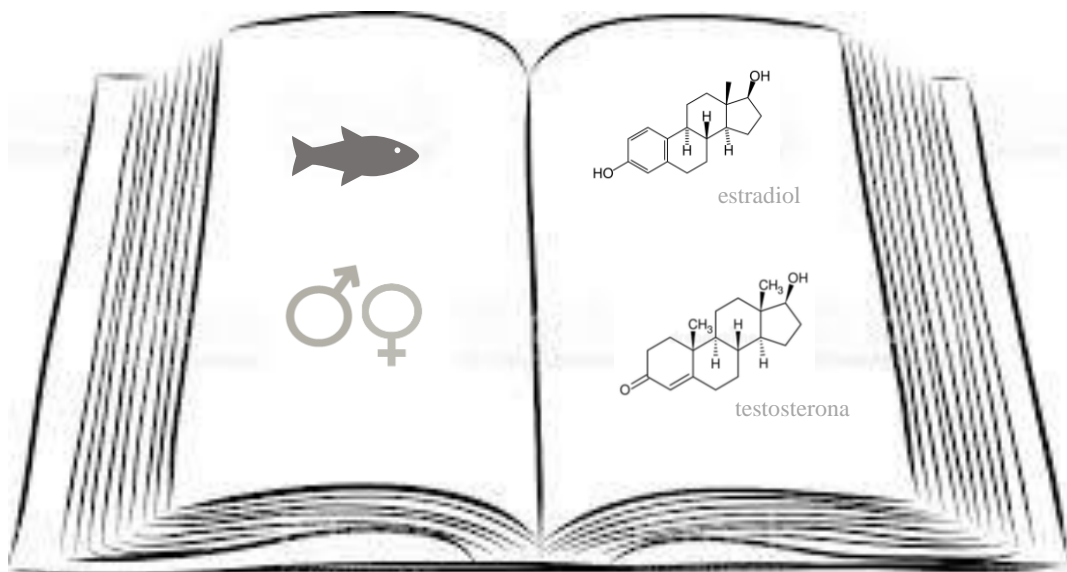
SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	14
REVISÃO DE LITERATURA.....	15
Reprodução dos peixes e a aquicultura no Brasil.....	15
Determinação e Diferenciação sexual em peixes.....	18
Eixo hipotálamo, hipófise e gônadas.....	22
A espécie modelo	25
OBJETIVOS	27
Objetivos específicos.....	27
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
CAPÍTULO 2	37
Female sex inversion as a reason for an unbalanced sex ratio in the neotropical species <i>Brycon orbignyanus</i>	38
ABSTRACT.....	38
INTRODUCTION	39
MATERIALS AND METHODS.....	40
RESULTS	42
DISCUSSION.....	67
ACKNOWLEDGMENTS	69
REFERENCES	70
CAPÍTULO 3	74
Esteroides androgênicos são os agentes da inversão sexual em	75
<i>Brycon orbignyanus</i> ?	75
INTRODUÇÃO	76
MATERIAL E MÉTODOS	77
RESULTADOS	79

DISCUSSÃO	84
CAPÍTULO 4	91
Dispersão de espículas na nadadeira anal de machos primários e secundários em <i>Brycon orbignyana</i> : característica sexual secundária para seleção de reprodutores	92
RESUMO.....	92
INTRODUÇÃO	93
MATERIAIS E MÉTODOS	94
RESULTADOS	97
DISCUSSÃO	106
REFERÊNCIAS.....	108
CONSIDERAÇÕES GERAIS	112

CAPÍTULO 1

Revisão de Literatura



REVISÃO DE LITERATURA

Reprodução dos peixes e a aquicultura no Brasil

Os teleósteos formam o maior grupo de animais dentre os vertebrados, com cerca de 35.729 espécies já descritas e, constantemente, possuindo atualizações de novas descrições. A exemplo disto, nos últimos dez anos, 4.148 espécies foram descritas e validadas (FRICKE; ESCHMEYER; VAN DER LAAN, 2020). Este grande número de espécies é resultado da diversidade biológica apresentada por estes animais em relação à morfologia, fisiologia, ocupação de habitats, modos de forrageamento, dentre outros (ZAGO; PAIVA, 2016).

A ampla diversidade biológica e, conseqüentemente, as adaptações que habilitam estes organismos a viverem nos mais distintos ambientes, refletem diretamente nas suas estratégias reprodutivas, tanto em relação a eventos comportamentais, como modos de acasalamento, corte, presença ou ausência de migração reprodutiva (ALMEIDA, 2013), quanto em relação a eventos sexuais, como reprodução interna ou externa (HILSDORF; MOREIRA; MARINS, 2014), e até mesmo na determinação e diferenciação sexual (NAKAMURA *et al.*, 1998, DEVLIN; NAGAHAMA, 2002; FERNANDINO; HATORRI, 2019).

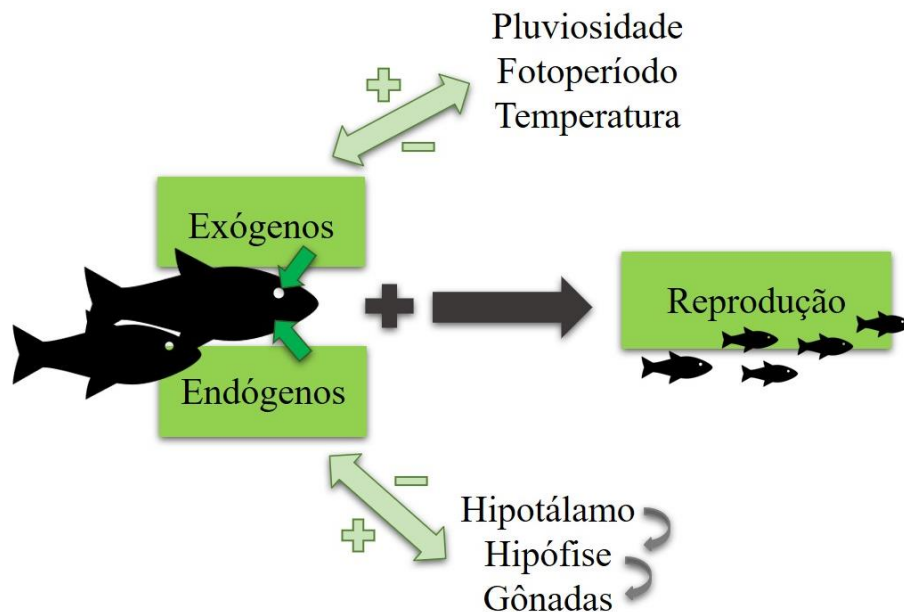
Deste modo, a reprodução de peixes é modulada por fatores endógenos (hormonais) e exógenos (fotoperíodo, chuvas, temperatura, condutividade da água) e a estabilidade desses gatilhos ambientais em relação às estações do ano são fundamentais para o sucesso reprodutivo das espécies (VAZZOLER, 1996; RIBEIRO; MOREIRA, 2012; RIZZO; BAZZOLI, 2014). Estes estímulos ambientais atuam no hipotálamo induzindo a produção de hormônios e, conseqüentemente, desencadeando uma cascata hormonal que modula a reprodução como um todo (Fig. 1) (RIBEIRO; MOREIRA, 2012; HONJI; ARAÚJO; MOREIRA, 2020).

Contudo, as alterações ambientais, como aumento de fotoperíodo, períodos prolongados de seca, aumento da temperatura das águas, modificações em habitats devido à construção de barragens (SATO *et al.*, 2005), alterações químicas ou poluições nos rios resultantes de esgoto doméstico podem levar a alterações na percepção do meio pelos animais, gerando problemas na reprodução ou até mesmo impedindo-a de acontecer (TETREAULT *et al.*, 2011; KIDA; ABDALLA; MOREIRA, 2016; TOLUSSI *et al.*, 2018).

Nas regiões tropicais, por exemplo, a reprodução das espécies anuais tem início na primavera e prolonga-se até o final do verão, devido ao efeito do início das estações chuvosas e fotoperíodo prolongado (VAZZOLER, 1996; RIZZO; BAZZOLI, 2014). Esse é o período conhecido como defeso, estabelecido por lei para proteção dos animais migradores durante a piracema (ICMBIO, 2018), contudo a construção de barragens interrompe a rota migratória de

muitas espécies, modificando habitats além de funcionar como uma barreira física aos animais que estão a jusante, contribuindo negativamente para a reprodução destas espécies (AGOSTINHO *et al.*, 1993; SATO *et al.*, 2005).

Figura 1: Fatores que influenciam positiva ou negativamente a reprodução de peixes.



Fonte da imagem: própria autora.

O caraciforme curimatá-pacu, *Prochilodus argenteus*, nativo do Rio São Francisco é um exemplo de espécie que enfrenta problemas migratórios, pois por serem impedidos de subirem para as cabeceiras, devido à construção da barragem de Três Marias, não atingem a maturidade sexual devido aos níveis quase nulos de esteroides sexuais produzidos (ARANTES *et al.*, 2010). Como consequência disso ocorrem reduções de estoques naturais das populações, a exemplo da piracanjuba, *Brycon orbignyanus*, se tornaram escassos devido ao grande barramento na sua bacia de origem impedindo a reprodução de modo natural (ASHIKAGA *et al.*, 2015).

Nesse contexto, e como forma de mitigação os efeitos negativos dessas modificações de habitats, a reprodução induzida promovida em cativeiro vem sendo utilizada por órgãos governamentais em programas de repovoamento de espécies nativas (ICMBIO, 2018). Entretanto, falhas nestes processos podem ocorrer, como a perda da variabilidade genética

(ASHIKAGA *et al.*, 2015), estresse (GNEIDING *et al.* 2019), restrição alimentar (NASCIMENTO *et al.*, 2021) e principalmente devido à falta de conhecimento básicos a respeito da biologia reprodutiva e do desenvolvimento inicial das espécies nativas, necessitando de aprimoramento das técnicas de criação (BALDISSEROTTO; GOMES, 2005; RIZZO; BAZZOLI, 2014). Por isso, o conhecimento das características morfológicas das gônadas constitui uma etapa básica e fundamental para o entendimento da biologia reprodutiva das espécies e constitui etapa primordial para estabelecimento de medidas de conservação da ictiofauna nativa (CREPALDI, 2006; QUAGIO-GRASSIOTTO; WILDNER; ISHIBA, 2013) além de ser essencial para o desenvolvimento de técnicas para a utilização nas reproduções induzidas para produção aquícola.

O cultivo de peixes para fins comerciais no Brasil teve início, provavelmente, no século 17 (VALENTI *et al.*, 2021). Contudo, mesmo sendo um país com um território continental com cerca de 12% de toda água doce do planeta, apenas no final do século 20 e início do século 21, o Brasil passou a demonstrar desenvolvimento de tecnologias e o potencial para se tornar um dos grandes produtores mundiais de pescado (OSTRENSKY; BORGHETTI; SOTO, 2007; SCHULTER, VIEIRA-FILHO, 2017). Além de disponibilidade de ambientes e clima favorável, o Brasil ainda possui imensa biodiversidade de espécies com grande potencial zootécnico, como o tambaqui (*Colossoma macropomum*), o pacu (*Piaractus mesopotamicus*), o pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*), o cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum*), a piracanjuba (*B. orbignyanus*), além do cultivo de híbridos resultantes dessas espécies (BALDISSEROTTO; GOMES, 2005; VALENTI *et al.*, 2021).

Considerando o cultivo de peixes marinhos, peixes dulcícolas, crustáceos e anfíbios, a produção aquícola brasileira em 2019 bateu o recorde de 800 mil toneladas, o que significa um ganho de cerca de 1 bilhão de reais na receita bruta do país (FAO, 2020). O cultivo de peixes de água doce representa cerca de 90% de toda essa produção, sendo a tilápia (*Oreochromis niloticus*) o peixe de maior interesse comercial, seguido por tambaqui e pacu (SCHULTER, VIEIRA-FILHO, 2017; FAO, 2020).

Por mais que estes números pareçam impressionantes, atualmente o Brasil ainda ocupa a décima segunda colocação no ranking global de maiores produtores de peixes de água doce (FAO, 2020). Tal dado reforça a concepção da necessidade de investimento sobre estudos que esclareçam a biologia reprodutiva das espécies nativas de interesse comercial, para que possam ser, além de preservadas em meio natural, cultivadas em sistemas de produção com eficácia (BALDISSEROTTO; GOMES, 2005; DE SIQUEIRA-SILVA; RODRIGUES; NÓBREGA 2019). Assim, estudos que descrevam ciclos reprodutivos, desenvolvimentos embrionários,

variações no modo de determinação sexual e variações temporais de diferenciação sexual das espécies alvo são fundamentais para o futuro desenvolvimento de biotecnologias focadas na produção de espécies nativas (VALENTI *et al.*, 2021).

Determinação e Diferenciação sexual em peixes

Em peixes a determinação sexual pode ser mediada por fatores genéticos, fisiológicos ou comportamentais, sendo determinada a partir da influência de fatores exógenos, como temperatura, densidade, entre outros (DEVLIN; NAGAHAMA, 2002; FERNANDINO; HATTORI, 2019). Nas espécies em que ocorre determinação sexual genética, há também uma ampla variação de fatores, pois peixes podem ter determinação sexual a partir de cromossomos sexuais específicos com sistemas XX-XY como o medaka *Oryzias latipes* (KONDO *et al.*, 2003), *Oreochromis niloticus* (LEE; PENMAN; KOCHER, 2003; LI *et al.*, 2015) ou os peixes neotropicais *Poecilia reticulata* e *Hoplias malabaricus* (ALMEIRA-TOLEDO; FORESTI, 2001), além de sistemas ZZ-ZW como *Characidium* sp. (UTSUNOMIA *et al.*, 2017) *Leporinus* sp. (VENERE *et al.*, 2004) e *Hypostomus* sp. (ARTONI *et al.*, 1998).

Por outro lado, algumas espécies não apresentam cromossomos sexuais específicos, tendo genes determinantes sexuais espalhados pelos cromossomos autossômicos, como é o caso dos peixes neotropicais *Brycon orbignyanus* (MARGARIDO; GALETTI-JUNIOR, 1999), *Rhamdia quelen* (GARCIA; OLIVEIRA; ALMEIDA-TOLEDO, 2010) e *Arapaima gigas* (MARQUES; VENERE, GALETTI-JÚNIOR, 2006).

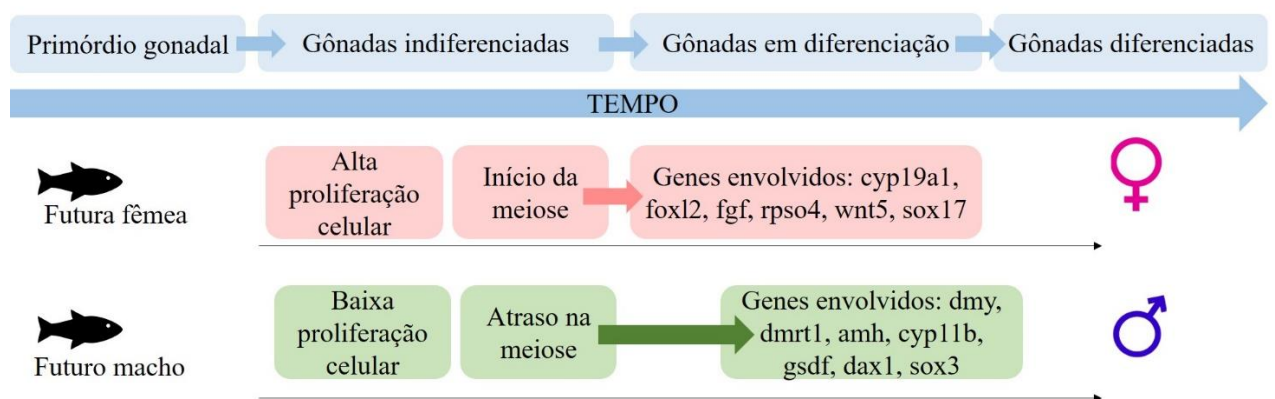
Os estudos genéticos em peixes tomaram grandes proporções com a utilização de *Oryzias latipes* e *Danio rerio* (medaka e zebrafish, respectivamente) como modelos biológicos para o desenvolvimento de pesquisas devido às suas características de fácil manejo e acondicionamento em laboratório (STREISINGER *et al.*, 1981; ISHIKAWA *et al.*, 2000). Assim, a determinação sexual em peixes vem sendo elucidada desde a década de 90 com o auge dos estudos envolvendo biologia molecular para vertebrados basais ao final deste período. O gene SRY, por exemplo, localizado no cromossomo Y, foi o primeiro gene descrito a ser ligado a determinação sexual em função dos estudos desenvolvidos em humanos (SINCLAIR *et al.*, 1990).

A partir disso, vários outros genes foram relacionados a diferenciação sexual em mamíferos, como *Dmrt1*, *Dax1*, *Wt-1*, *Sf-1*, *Foxl2*, *Rspo1*, *Sox9* e *Wnt4* (MANSEN *et al.*, 2018). Entretanto, genes que são considerados principais atuantes na diferenciação sexual em mamíferos, podem não estar presentes ou não desempenhar funções diretas no mesmo evento

em peixes (Fig. 2), por exemplo, em medaka, com determinação sexual heterogamética masculina (XX-XY), foi identificado o gene DMY como análogo ao SRY (MATSUDA *et al.*, 2002; MATSUDA; SAKAIZUMI, 2009), enquanto que em *O. dancena* os genes Sox3 e Gsdf são os responsáveis pela diferenciação masculina (TAKEHANA *et al.*, 2014) (Fig. 2). Em tilápia, sabe-se que nos primeiros dias de desenvolvimento das larvas os perfis de expressão gênica quase não diferem entre os sexos, contudo, a medida que a diferenciação sexual é iniciada em fêmeas, ao redor de 30 dias pós fertilização, os perfis de expressão gênica entre ambos os sexos tornam-se distintos, sendo transcritos os genes Hsp11, Svep1 e Foxl2 apenas em fêmeas diferenciadas e, ao redor de 90 dias pós fertilização, com o início da diferenciação sexual masculina, são transcritos Amh, Cyp11b, Dmrt1, Sox9b, Gsdf e 3 β Hsd apenas em machos (Fig. 2)(TAO *et al.*, 2018).

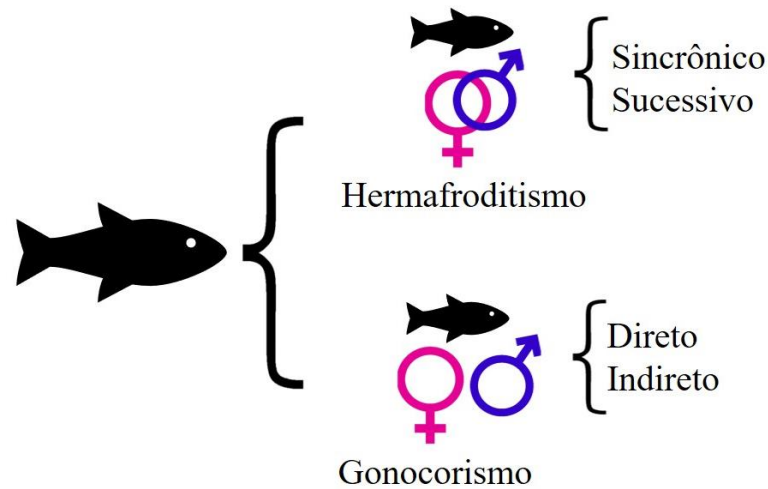
Diferentemente da determinação sexual, a diferenciação sexual refere-se a uma série de eventos modulados por cascatas de expressões gênicas em que as gônadas, até então indiferenciadas, podem se diferenciar em testículos ou ovários funcionais (BAROILLER; GUIGUEN; FOSTIER, 1999; KITANO, 2018). Peixes podem apresentar dois tipos de comportamento reprodutivo quando adultos (Fig. 3), sendo classificados em gonocóricos (indivíduos que apresentam sexos separados) ou hermafroditas (indivíduos que apresentam concomitantemente os órgãos reprodutores dos dois sexos) (YAMAMOTO, 1969; DEVLIN; NAGAHAMA, 2002; ADOLFI *et al.*, 2019).

Figura 2: Eventos ocorridos durante a diferenciação sexual em peixes.



Fonte da imagem: adaptado de Martinez *et al.*, 2014.

Figura 3: Gonocorismo e hermafroditismo em peixes.



Fonte da imagem: própria autora.

Apesar de ser considerado raro entre peixes, espécies hermafroditas com desenvolvimento gonadal simultâneo desenvolvem testículos e ovários funcionais ao mesmo tempo, como é o caso de espécies da família Gobiidae (COLE; HOESE, 2001; KUWAMURA *et al.*, 2020). Por outro lado, em espécies hermafroditas com desenvolvimento gonadal sucessivo (ou sequenciais), os animais desenvolvem testículos ou ovários funcionais em um período e desenvolvem o sexo oposto em outro período da vida, sendo protogínios ou protrândricos (proto = primeiro, gynos = fêmea, androus = masculino) (MITCHESON; MIN LIU, 2008; KUWAMURA *et al.*, 2020). Em espécies da família Amphiprioninae, os peixes-palhaços, são protrândricos, tendo a reversão sexual ocorrida de forma gradual (CASADEVALL *et al.*, 2009) e amplamente investigada na biologia molecular devido ao conhecimento escasso e complexo das transcrições gênicas ocorridas durante o período de reversão macho-fêmea (CASAS *et al.*, 2016).

Em espécies gonocóricas com desenvolvimento gonadal indireto, a gônada indiferenciada inicia o seu desenvolvimento como um ovário e, posteriormente, parte dos indivíduos se torna macho e parte se mantém como fêmea (DEVLIN; NAGAHAMA, 2002). Este é o caso do cipriniforme *Danio rerio* (Zebra Fish) (TAKAHASHI, 1977; ORTEGA-RECALDE *et al.*, 2019) e do caraciforme *Gymnocorymbus ternetzi* (Tetra Negro) (MAZZONI *et al.*, 2015). Por outro lado, animais que possuem desenvolvimento gonadal direto, a gônada indiferenciada inicia o desenvolvimento diretamente em um ovário ou um testículo, como no caso do cipriniforme *Cyprinus carpio* (carpa comum) (MAZZONI *et al.*, 2010) e do siluriforme *Pseudoplatystoma fasciatum* (Surubim) (VALENTIN *et al.*, 2016; VALENTIN *et al.*, 2019).

Cada espécie apresenta características particulares no que se refere a diferenciação sexual, contudo, alguns padrões são conservativos, de forma que inicialmente os animais apresentam o que se chama de primórdio gonadal, formado a partir de células germinativas primordiais (originadas a partir de células do epiblasto) e células somáticas (DEVLIN; NAGAHAMA, 2002; MAZZONI; QUAGIO-GRASSIOTTO, 2021). À medida que a morfogênese ocorre, a proliferação mitótica aumenta e o órgão passa a ser internamente vascularizado, originando uma gônada indiferenciada (DEVLIN; NAGAHAMA, 2002; MAZZONI *et al.*, 2010; MAZZONI *et al.*, 2014).

Os principais indícios de início da diferenciação gonadal são percebidos quando há um aumento da mitose, tanto em células germinativas primordiais, quanto de células somáticas (STRÜSSMANN, TAKASHIMA; TODA, 1996; DEVLIN; NAGAHAMA, 2002; MEIJIDE *et al.*, 2005). A partir deste momento, uma série de modificações e eventos biológicos ocorrem nos órgãos que futuramente serão ovários ou testículos funcionais, de forma que machos e fêmeas possuem distinções tanto temporais quanto morfológicas e genéticas ao longo deste processo (Fig. 2) (VALENTIN *et al.*, 2016; VALENTIN *et al.*, 2019).

O início da meiose na diferenciação é percebido por meio das claras diferenças morfológicas ocorridas nos núcleos de oogônias ou espermatogônias, contudo, machos e fêmeas passam a ter organizações integralmente diferentes (MAZZONI *et al.*, 2015). Fêmeas iniciam a diferenciação sexual antes dos machos, onde nota-se a intensa proliferação mitótica e posteriormente meiótica dando início a formação de cistos de oócitos dispostos na porção dorsal das gônadas, enquanto que em machos, nota-se a organização de espermatogônias alinhadas lado a lado, formando cordões espermatogoniais, que com o início da meiose darão início a formação de futuros lóbulos ou túbulos testiculares (MAZZONI *et al.*, 2010; MAZZONI *et al.*, 2014; VALENTIN *et al.*, 2016; VALENTIN *et al.*, 2019).

Em zebrafish, um conhecido exemplo de espécie gonocorista com desenvolvimento indireto, os animais que iniciam o processo de reversão, denominados intersexo (futuros machos) (TAKAHASHI, 1977; CHEN; GE 2013) possuem uma notável proliferação mitótica muito mais numerosa que fêmeas verdadeiras, de modo que quando as oogônias passam a ser individualizadas pelas células somáticas, tem-se o “start” para futura diferenciação testicular e remodelamento gonadal (TAKAHASHI, 1977). O período de intersexo, para estes animais, ainda é considerado quando em meio a túbulos imaturos (ainda em formação), porém repletos de espermatogônias e espermátócitos, ocorrem oócitos íntegros ou oócitos em degeneração (TAKAHASHI, 1977; UCHIDA *et al.*, 2002).

Assim, o período de diferenciação sexual tem sido amplamente estudado por ser temporalmente espécie específico, além disso, dentro de uma mesma espécie ainda pode haver alteração de tempo, já que a diferenciação sexual pode ser influenciada por fatores exógenos (ZALUSKI, 2018). Desta forma, a caracterização e o conhecimento a cerca deste período de alta plasticidade das gônadas é fundamental para o desenvolvimento de biotecnologias para reversão sexual (FERNANDINO; HATTORI, 2019; DUSSENNE *et al.*, 2020), técnica utilizada na aquicultura visando a obtenção de populações monosexo, em espécies no qual um sexo cresce mais rápido ou atinge a maturidade sexual anteriormente ao outro, favorecendo o seu cultivo na aquicultura, como é o caso de *Oreochromis niloticus* (MARTINEZ *et al.*, 2014; NIVELLE *et al.*, 2019).

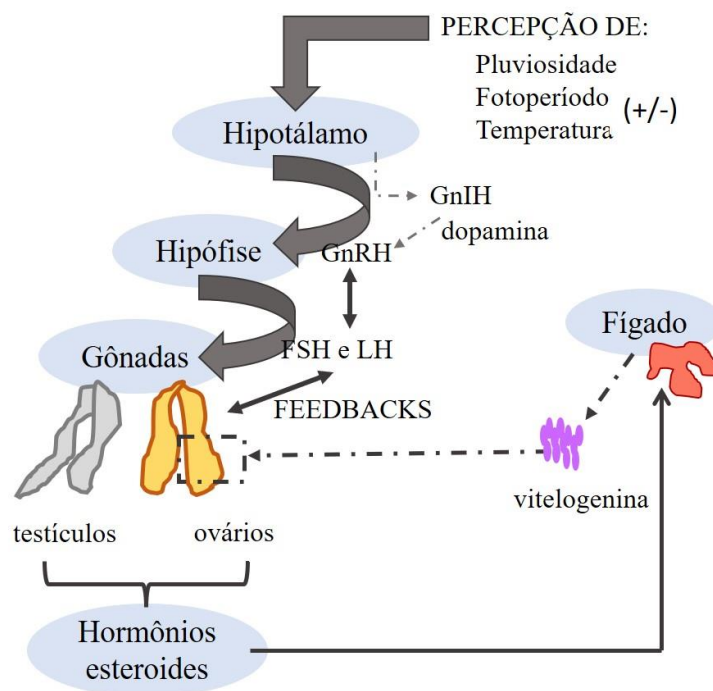
Eixo hipotálamo, hipófise e gônadas

A reprodução de vertebrados é modulada pelo eixo hipotálamo-hipófise-gônadas através de síntese de hormônios específicos ao eixo (MOYES; SCHULTE, 2010). O hormônio liberador de gonadotropinas (Gnrh) é sintetizado no hipotálamo e atua na região anterior da hipófise (adenohipófise), onde irá estimular a síntese e liberação das gonadotropinas Fsh (hormônio folículo estimulante) e Lh (hormônio luteinizante), que via corrente sanguínea, atuarão nos ovários e testículos estimulando a síntese de esteroides gonadais (Fig. 4) (HISDORF; MOREIRA; MARINS, 2014; KITANO, 2018). De forma geral, o Fsh é responsável pelo desenvolvimento das gônadas em relação ao ciclo reprodutivo, enquanto que o Lh atua principalmente na maturação final dos gametas, permitindo liberação de oócitos e espermatozoides funcionais no momento da reprodução (DEVLIN; NAGAHAMA, 2002).

Enquanto o Gnrh é um hormônio de estimulação, o hormônio inibidor de gonadotropinas (Gnih) é o seu antagonista e age inibindo a ação do Gnrh (TSUTSUI, 2009; MUÑOZ-CUETO *et al.*, 2017). Além do Gnih outros neuromoduladores podem inibir a ação de Gnrh impedindo que a reprodução aconteça em animais que não estão em condições ideais (HONJI; MOREIRA, 2017). Normalmente, animais que estão sob estresse prolongado possuem altos níveis de dopamina circulante, um neurotransmissor que acaba afetando a maturação dos gametas, uma vez que inibe a liberação de Gnrh pelo hipotálamo (ALMEIDA, 2013; GANESH, 2021). Além disso, níveis elevados de dopamina podem ser responsáveis por reversão sexual em peixes com determinação e diferenciação sexual relacionados a comportamentos sociais (DUFOUR *et al.*, 2005; ZOHAR *et al.*; 2010).

A síntese de Fsh e Lh é primordial para o desenvolvimento das gônadas já no início da vida do animal, uma vez que a diferenciação sexual em gônadas bipotentes é regulada primariamente por hormônios esteroides (Fig. 5) como 17- β -Estradiol (E_2), principal atuante no desenvolvimento ovariano, e 11-cetotestosterona (11KT), como hormônio principal da diferenciação em machos de teleósteos (DEVLIN; NAGAHAMA, 2002; KITANO, 2018; HONJI; ARAÚJO; MOREIRA, 2020). Assim, os hormônios esteroides tem efeitos diretos nas células germinativas, bem como atuam em células somáticas das gônadas envolvidas regulando o seu desenvolvimento (DEVLIN; NAGAHAMA, 2002).

Figura 4: A regulação hormonal em peixes.



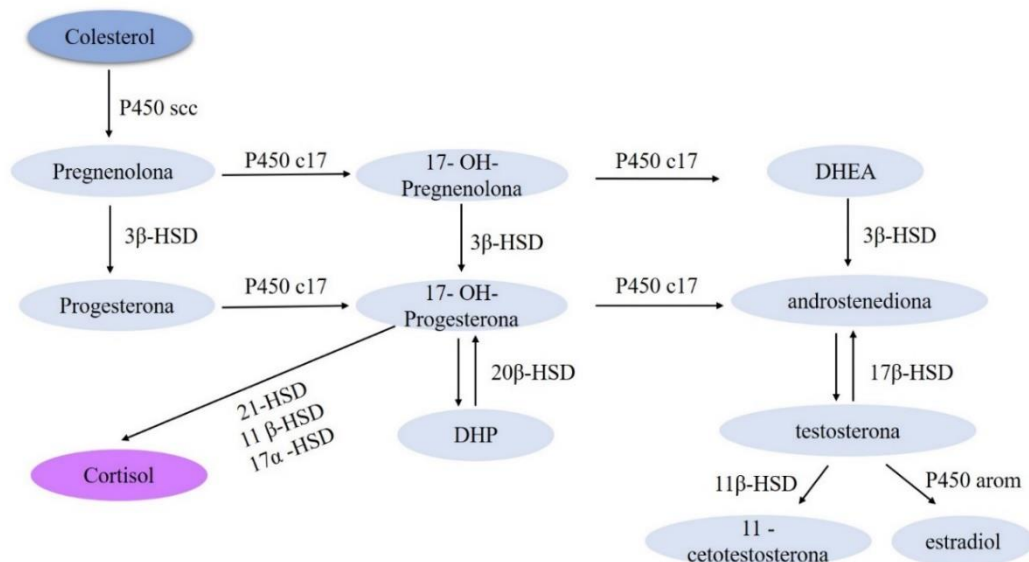
Fonte da imagem: adaptado de Schneider e Poehland, 2009.

Todos os hormônios esteroides são derivados de colesterol que a partir de clivagem da cadeia lateral por meio de P450_{scc} origina pregnenolona (TOKARZ *et al.* 2015). A partir disso, uma série dinâmica de enzimas (complexo P450, 3- β HSD, 17- β HSD) são responsáveis pela produção de progesterona, testosterona e estradiol (Fig. 5) (DEVLIN; NAGAHAMA, 2002; TOKARZ *et al.* 2015). A complexidade da biossíntese de hormônios esteroides sexuais é ainda mais evidenciada quando se observa que a via de síntese pode sofrer alterações caso seja bloqueada, o que resultará na interrupção de produção de hormônios essenciais à diferenciação ou desenvolvimento sexual da espécie em questão (FERNANDINO; HATTORI, 2013).

Com os adventos da biologia molecular, atualmente já são conhecidos alguns dos genes responsáveis pelas transcrições de enzimas cruciais na regulação hormonal durante a diferenciação sexual em peixes, como por exemplo o gene *cyp19a1a*, responsável pela transcrição de aromatase gonadal, a enzima que é responsável pela conversão de testosterona em 17 β -estradiol (PIFERRER; BLAZQUEZ, 2005; FERNANDINO; HATTORI, 2019). Por outro lado, a expressão do gene *dmrt1* inibe a transcrição de gonadal aromatase, impedindo a conversão dos estrogênios e culminando na diferenciação de gônadas masculinas (KITANO, 2018).

Além da ação de hormônios no controle da reprodução, os animais percebem o meio externo através de órgãos do sentido específicos e recebem estímulos exógenos (ambientais), que por sua vez modulam o controle endógeno (hormonal) (MOYES; SCHULTE, 2010). Deste modo, ter conhecimento sobre os perfis hormonais das espécies é essencial no que diz respeito à produção visando repovoamento ou atividades econômicas na piscicultura, de modo que o estudo da fisiologia reprodutiva das espécies, necessariamente deve estar atrelado ao conhecimento dos hábitos, do ambiente e da genética das espécies (HISDORF; MOREIRA; MARINS, 2014).

Figura 5: Principais vias de biossíntese de hormônios esteroides. DHEA: Dehidroepiandrosterona. DHP: Dihidroprogesterona.



Fonte da imagem: adaptado de Schneider e Poehland, 2009.

A espécie modelo

A subfamília Bryconinae abriga, dentro do gênero *Brycon*, algumas espécies com potencial para piscicultura e pesca esportiva (CASTAGNOLLI, 1992). É o caso de *Brycon orbignyanus* (VALENCIENNES, 1849), conhecida popularmente como piracanjuba, bracanjuva, ou até mesmo, salmão-crioulo, devido à apreciação de sua carne (CECCARELLI, 2010). A piracanjuba é uma espécie nativa, encontrada em toda a Bacia do Paraná-Uruguai, sendo mais abundante nos rios Grande e Paraná (CASTAGNOLLI, 1992; LIMA, 2017).

A espécie possui corpo em formato fusiforme, cabeça pequena, com boca em posição terminal, nadadeira anal longa e a caudal bifurcada. A característica que mais lhe representa e a distingue de outros briconídeos é a coloração da nadadeira caudal, que varia de tons de carmim a vermelho. É encontrada em águas claras de ambientes lóticos e possuem hábito alimentar onívoro (MACIEL, 2006). A fêmea atinge cerca de 80 cm de comprimento total e até 8,2 kg de peso vivo, enquanto o macho alcança 68 cm e 3,6 kg (CECCARELLI, 2010). O macho chega à maturidade sexual por volta dos dois anos, com cerca de 20 cm de comprimento. Já a fêmea atinge a maturidade sexual por volta dos 3 anos de idade, e cerca de 25 cm de comprimento. Possuem período reprodutivo sazonal, de modo que a piracema se estende durante os meses mais chuvosos, sendo de setembro a janeiro (VAZ; TORQUATO; BARBOSA, 2000).

A piracanjuba desperta grande interesse comercial, sendo considerado um dos peixes de água doce de carne mais saborosa e apreciada. Além disso, outro fator de grande interesse econômico que a espécie desperta está relacionado à pesca esportiva, pois é um peixe que demonstra comportamento muito agressivo quando é fisgado (VAZ; TORQUATO; BARBOSA, 2000; BORBA, 2003).

Por ser uma espécie reofilica, àquelas que precisam migrar para que a reprodução aconteça, a piracanjuba vem sofrendo problemas com a reprodução de modo natural (BORBA, 2003), além de despertar grande interesse social, econômico e à influência antrópica em seu ambiente natural, desde 1996, *Brycon orbignyanus* encontra-se no “Livro Vermelho da Fauna Brasileira” (ICMBIO, 2018), classificada como espécie “em perigo” (criticamente ameaçada), de acordo com a classificação estabelecida internacionalmente pela União Internacional para Conservação da Natureza (UICN). Tal situação torna-se preocupante, e os esforços para criação da espécie em cativeiro vindo sendo estudados (BALDISSEROTTO; GOMES, 2005). Contudo, a reprodução da piracanjuba em cativeiro ainda apresenta dificuldades, pois além de serem animais reofilicos, é uma espécie altamente sensível ao estresse do manejo e, normalmente, perde-se muitos reprodutores (SOUTO *et al.*, 2017). Aliadas a estas dificuldades

para reprodução da espécie, a produção de piracanjuba em cativeiro ainda desperta interesse devido ao fato de que foi recentemente descrita com desenvolvimento gonocorista direto de modo que é comum que as populações apresentem proporções sexuais de 2:1 (macho:fêmea) (ZARDO *et al.*, 2021), fato curioso, pois foge da normalidade para espécie com desenvolvimento deste tipo (PLA *et al.*, 2021).

Comparada com outras espécies, a piracanjuba é avaliada como um peixe com bom desempenho na aquicultura e pode produzir altos rendimentos em filés de peixe (FREATO, 2005). Contudo, ainda é muito mais produzida para fins de repovoamento do que para o consumo humano (ZANIBONI-FILHO *et al.*, 2006), fato controverso, visto seu grande potencial já descrito na aquicultura. O matrinxã, *B. amazonicus*, é uma espécie de mesmo gênero e desponta como segunda espécie mais produzida na aquicultura da região norte do país, fato que pode ser atribuído ao grande conhecimento científico já descrito sobre a reprodução e a produção em cativeiro desta espécie (BRANDÃO *et al.*, 2005; PONTES *et al.*, 2017). Assim, nota-se a necessidade de explanação sobre a biologia reprodutiva da piracanjuba, *B. orbignyanus*, a fim de estabelecer conhecimentos aplicáveis para o melhoramento da sua produção aquícola.

Diante do que foi abordado, as hipóteses deste trabalho são: 1- a proporção sexual desbalanceada em *Brycon orbignyanus* (2:1) é reflexo de alterações morfológicas ocorridas durante o processo de diferenciação sexual; 2- a inversão sexual ocorrida em fêmeas de *Brycon orbignyanus* é modulada por andrógenos; 3- as características sexuais secundárias presentes em machos de *Brycon orbignyanus* ocorrem no período reprodutivo, tanto em machos primários, quanto em machos secundários.

OBJETIVOS

Considerando a situação atual da produção aquícola brasileira e seus notórios benefícios econômicos, além de considerar a importância biológica desta espécie e os riscos ecológicos iminentes nos quais a espécie está submetida, esta pesquisa tem por objetivo estudar a diferenciação sexual de *Brycon orbignyanus* (Bryconidae) em detalhes, a fim de elucidar a morfologia e fisiologia reprodutiva da espécie, estendendo-se desde o desenvolvimento gonadal inicial, a diferenciação até a maturidade sexual da espécie.

Objetivos específicos

- Categorizar temporalmente os eventos ocorridos durante a diferenciação sexual de machos e fêmeas de *B. orbignyanus*;
- Descrever morfologicamente o remodelamento gonadal ocorrido durante a inversão sexual de fêmeas de *B. orbignyanus* e descrever a formação do epitélio germinativo de machos e fêmeas *B. orbignyanus* após os eventos de diferenciação sexual;
- Avaliar a concentração plasmática de andrógenos durante a diferenciação sexual em *B. orbignyanus*;
- Avaliar o desenvolvimento das características sexuais secundárias em machos de *B. orbignyanus*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADOLFI, M. C.; NAKAJIMA, R. T.; NÓBREGA, R. H.; SCHARTL, M. Intersex, Hermaphodirism, and Gonadal Plasticity in Vertebrates: Evolution of the Mullerian Duct and Amh/Amhr2 Signaling. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 7, 2019.
- AGOSTINHO, A. A.; MENDES, V. P.; SUZUKI, H. I.; CANZI, C. Avaliação da atividade reprodutiva da comunidade de peixes dos primeiros quilômetros a jusante do reservatório de Itaipu. **Revista UNIMAR**, v. 1, 175-189, 1993.
- ALMEIDA, F. L. Endocrinologia aplicada na reprodução de peixes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal.**, v. 37, n.2, 2013.
- ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; FORESTI, F. Morphologically differentiated sex chromosomes in neotropical freshwater fish. **Genetica**, v. 111, n. 1, 91-100, 2001.
- ARANTES, F. P.; SANTOS, H. B.; RIZZO, E.; SATO, Y.; BAZZOLI, N. Profiles of sex steroids, fecundity and spawning of the curimatã-pacu *Prochilodus argenteus* in the São Francisco River, downstream from the Trêm Marias dam, Southeasternn Brazil. **Animal Reproduction Science**, v. 118, 2010.
- ARTONI, R.F.; VENERE, P.C.; BERTOLLO, L.A.C. A heteromorphic ZZ/ZW sex chromosome system in fish, genus *Hypostomus* (Loricariidae). **Cytologia**, v.63, n.04, 1998.
- ASHIKAGA, F. Y.; ORSI, M. L.; OLIVEIRA, C.; SENHORINI, J. A.; FORESTI, F. The endangered species *Brycon orbignyianus*: genetic analysis and definition of priority areas for conservation. **Environmental Biology Fishes**, v. 98, 1845-1855, 2015.
- BALDISSEROTTO. B.; GOMES, L. C. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: EditoraUFSM, 2005, 468 p.
- BAROILLER, J. F.; GUIGUEN, Y.; FOSTIER, A. Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 55, n. 6-7, 910-931, 1999.
- BORBA, M. R. **Exigência energética e relação carboidrato: lipídio para alevinos de piracanjuba (*Brycon orbignyianus*)**. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, 2003.
- BRANDÃO, F. R.; GOMES, L. C.; CHAGAS, E. C.; ARAÚJO, L. D.; SILVA, A. L. F. Densidade de estocagem de matrinxã (*Brycon amazonicus*) na recria em tanque-rede. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n.3, 299-303, 2005.
- CASADEVALL, M.; DELGADO SUREDA, E.; COLLEYE, O.; BER MONSERRAT, S.; PARMENTIER, E. Histological study of the sex-change in the skunk clownfish Amphiprion akallopisos. **The Open Fish Science Journal**, v. 2, 55-58, 2009.

CASAS, L.; SABORIDO-REY, F.; RYU, T.; MICHELL, C.; RAVASI, T.; IRIGOIEN, X. Sex change in clownfish: molecular insights from transcriptome analysis. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, 1-19., 2016.

CASTAGNOLLI, N. **Criação de peixes de água doce**. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista, 1992. 189 p.

CECCARELLI, P. S.; SENHORINI, J. A.; CANTELMO, O. A.; REGO, R. F. Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*, Valenciennes, 1849). In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. (org.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. 2. Ed. Santa Maria: UFMS, 2010, p. 117-148.

CHEN, W.; GE, W. Gonad differentiation and puberty onset in the zebrafish: evidence for the dependence of puberty onset on body growth but not age in females. **Molecular reproduction and development**, v. 80, n. 5, 384-392, 2013.

COLE, K. S.; HOESE, D. F. Gonad Morphology, colony demography and evidence for hermaphroditism in *Gobiodon okinawae* (Teleostei, Gobiidae). **Environmental Biology of Fishes**, v. 61, 161–173, 2001.

CREPALDI, D. V. *et al.* Biologia reprodutiva do surubim (*Pseudoplatystoma coruscans*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 30, p.159-167, dez, 2006.

DE SIQUEIRA-SILVA, D. H.; RODRIGUES, M. S.; NÓBREGA, R. H. Testis structure, spermatogonial niche and Sertoli cell efficiency in Neotropical fish. **General and Comparative Endocrinology**, v. 273, 218-226, 2019.

DEVLIN, R. H.; NAGAHAMA, Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. **Aquaculture**, v. 208, n. 3-4, p. 191-364, 2002.

DUFOUR, S.; WELTZIEN, F. A.; SEBERT, M. E.; LE BELLE, N.; VIDAL, B.; VERNIER, P.; PASQUALINI, C. Dopaminergic inhibition of reproduction in teleost fishes: ecophysiological and evolutionary implications. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1040, n. 1, 9-21, 2005.

DUSSENNE, M.; GENNOTTE, V.; ROUGEOT, C.; MÉLARD, C.; CORNIL, C. A. Consequences of temperature-induced sex reversal on hormones and brain in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Hormones and Behavior**, v. 121, 2020.

FERNANDINO, J. I.; HATTORI, R. S. Sex determination in Neotropical fish: Implications ranging from aquaculture technology to ecological assessment. **General and Comparative Endocrinology**, v. 273, p. 172-183, 2019.

FERNANDINO, J. I.; HATTORI, R. S.; ACOSTA, O. D. M.; STRUSSMANN, C. A.; SOMOZA, G. M. Environmental stress-induced testis differentiation: androgen as a by-product of cortisol inactivation. **General and Comparative Endocrinology**, v. 192, 36-44, 2013.

FRETO, T. A. FREITAS, R. T. F.; SANTOS, V. B.; LOGATO, P. V. R.; VIVEIROS, A. T. M. Efeito do peso de abate nos redimentos do processamento da piracanjuba (*Brycon orbignyanus*, VALENCIENNES, 1849). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 3, 2005.

FRICKE, R.; ESCHMEYER, W. N.; VAN DER LAAN, R. **Catalog fishes, genera, species references**. California Academy of Sciences, Institute for Biodiversity Science and Sustainability, California. 2019. Disponível em: <<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>>. Acesso em: 15 jan 2021.

GARCIA, C.; OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. Karyotypic evolution trends in *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) with considerations about the origin and differentiation of its supernumerary chromosomes. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, n. 1, 365-384, 2010.

GANESH, C. B. The stress–Reproductive axis in fish: The involvement of functional neuroanatomical systems in the brain. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v, 112, 2021.

GNEIDING, B.; BONOTTO, D. R.; GNEIDING, J. E. B. O.; LUCIOLI, J.; MADEIRA, H. M. F.; BALDAN, A. P. Bases neuroendócrinas do estresse e bem-estar em peixes teleósteos. **Revista Acadêmica Ciência Animal**, v. 17, n. 1-8, 2019.

HILSDORF, A. W. S.; MOREIRA, R. G.; MARINS, LUIS F. Genética dos processos fisiológicos. In: BALDISSEROTTO, B.; CYRINO, J.; URBINATI, E. C. (Org.). **Biologia e fisiologia de peixes neotropicais de água doce**. 1 ed, Jaboticabal, SP: Fundação de Apoio à Pesquisa, Ensino e Extensão (FUNEP), 2014, p. 39-57.

HONJI, R. M.; MOREIRA, R. G. Controle neuroendócrino da ovogênese em peixes teleósteos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 41, n. 1, p. 86-93, 2017.

HONJI, R. M.; ARAÚJO, B. C.; MOREIRA, R. G. Fisiologia reprodutiva aplicada ao cultivo de peixes neotropicais. **Ciência animal**, v. 30, n. 4, 123-137, 2020.

INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE – ICMBIO. Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Volume VI - Peixes. In: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, org. **Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção**. 1a ed. Brasília: ICMBio, 2018.

ISHIKAWA, Y. Medakafish as a model system for vertebrate developmental genetics. **Bioessays**, v. 22, 487-495, 2000.

KIDA, B. M. S.; ABDALLA, R. P.; MOREIRA, R. G. Effects of acidic water, aluminum, and manganese on testicular steroidogenesis in *Astyanax altiparanae*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 42, n. 5, 1347-1356, 2016.

KITANO, T. Endocrine and environmental control of sex differentiation in gonochoristic fish. In: **Reproductive and Developmental Strategies**. Tokyo: Springer, 2018. p. 307-319.

KONDO, M.; NANDA, I.; HORNUNG, U.; ASAKAWA, S.; SHIMIZU, N.; MITANI, SCHMID, M.; SHIMA, A.; SCHARTL, M. Absence of the candidate male sex-determining gene *dmrt1b* (Y) of medaka from other fish species. **Current Biology**, v. 13, n. 5, 416-420, 2003.

KUWAMURA, T.; SUNOBE, T.; SAKAI, Y.; KADOTA, T.; SAWADA, K. Hermaphroditism in fishes: an annotated list of species, phylogeny, and mating system. **Ichthyological Research**, v. 67, 341-360, 2020.

LEE, B. Y.; PENMAN, D. J.; KOCHER, T. D. Identification of a sex-determining region in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using bulked segregant analysis. **Animal Genetics**, v. 34, n. 5, 379-383, 2003.

LI, M.; SUN, Y.; ZHAO, J.; SHI, H.; ZENG, S.; YE, K.; JIANG, D.; ZHOU, L.; SUN, L.; TAO, W.; NAGAHAMA, Y.; KOCHER, T. D.; WANG, D. A Tandem Duplicate of Anti-Mullerian Hormone with a Missense SNP on the Y Chromosome Is Essential for Male Sex Determination in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Plos Genet**, v. 11, n. 11, 1-15, 2015.

LIMA, F. C. T. A revision of the cis-andean species of the genus *Brycon* (Müller & Troschel) (Characiformes: Characidae). **Zootaxa**, v.1, 1-189, 2017.

MACIEL, C. M. R. R. **Ontogenia de larvas de piracanjuba, *Brycon orbignyanus* Valenciennes (1849) (Characiformes, Characidae, Bryconinae)**. 229 p. Tese de Doutorado – Univ. Federal de Viçosa, Brasil, 2006.

MANSEN, L. S.; ERNST, E. H.; BORUP, R.; LARSEN, A.; OLESEN, R. H.; ERNST, E.; ANDERSON, R. A.; KRISTENSEN, S. G.; ANDERSEN, C. Y. Temporal expression pattern of genes during the period of sex differentiation in human embryonic gonads. **Scientific Reports**, v. 7, 1-16, 2017.

MARGARIDO, V. P.; GALETTI-JUNIOR, P. M. Heterocromatin patterns and karyotype relationships within and between the genera *Brycon* and *Salminus* (Pisces, Characidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 22, n. 3, 1999.

MARQUES, D. K.; VENERE, P. C.; GALETTI-JUNIOR, P. M. Chromosomal characterization of the bonytongue *Arapaima gigas* (Osteoglossiformes: Arapaimidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 4, n. 2, 215-218, 2006.

MARTINEZ, P.; VIÑAS, A. M.; SÁNCHEZ, L.; DÍAZ, N. RIBAS, L.; PIFERRER, F. Genetic architecture of sex determination in fish: applications to sex ratio control in aquaculture. **Frontiers in Genetics**, v.5, n. 340, 1-14, 2014.

MATSUDA, M.; NAGAHAMA, Y.; SHINOMIYA, A.; SATO, T.; MATSUDA, C.; KOBAYASHI, T.; MORREY, C.E.; SHIBATA, N.; ASAKAWA, S.; SHIMIZU, N.; HORI, H.; HAMAGUCHI, S.; SAKAIZUMI, M. A Y-specific, DM-domain gene, DMY, is required for male development in the medaka (*Oryzias latipes*). London: **Nature**, v. 417, 559–563, 2002.

MATSUDA, M.; SAKAIZUMI, M. Sex determination. In: JAMIESON, B. G. M. (org). **Reproductive biology and phylogeny of fishes (Agnathans and Bony Fishes)**. 1 ed. New Hampshire: Science Publishers, 2009, p. 331-350.

MAZZONI, T. S.; GRIER, H. J.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I. Germline cysts and the formation of the germinal epithelium during the female gonadal morphogenesis in *Cyprinus carpio* (Teleostei: Ostariophysi: Cypriniformes). **The Anatomical Record**, v. 293, n. 9, p. 1581-1606, 2010.

MAZZONI, T. S.; GRIER, H. J.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I. Male gonadal differentiation and the Paedomorphic evolution of the testis in Teleostei. **The Anatomical Record**, v. 291, 1137-1162, 2014.

MAZZONI, T. S.; GRIER, H. J.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I. Establishment in the Juvenile Hermaphroditism during gonadal differentiation of the *Gymnocorymbus ternetzi* (Teleostei: Characiformes: Characidae). **The Anatomical Record**, v. 298, 1984-2010, 2015.

MAZZONI, T. S.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I. Presence of the matrix metalloproteinases during the migration of the primordial germ cells in zebrafish gonadal ridge. **Cell and Tissue Research**, v. 383, n. 2, 707-722, 2021.

MEIJIDE, F. J.; LO NOSTRO, F.; GUERRERO, G. A. Gonadal development and sex differentiation in the cichlid fish *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes): a light and electron-microscopic study. **Journal of Morphology**, v. 264, 191-210, 2005.

MITCHESON, Y. S.; LIU, M. Functional hermaphroditism in teleosts. **Fish and Fisheries**, v. 9, 1-43, 2008.

MOYES, C. D.; SCHULTE, P. M. **Principios de fisiología animal**, Porto Alegre: Artmed, 2ªed., 2010, 792 p.

MUÑOZ-CUETO, J. A.; PAULLADA-SALMERÓN, J. A.; ALIAGA-GUERRERO, M.; COWAN, M. E.; PARHAR, I. S.; UBUKA, T. A journey through the gonadotropin-inhibitory hormone system of fish. **Frontiers in endocrinology**, v. 8, p. 285, 2017.

NAKAMURA, M. KOBAYASHI, T.; CHANG, T.; NAGAHAMA, Y. Gonadal sex differentiation in teleost fish. **Journal of Experimental Zoology**, v. 281, n. 5, p. 362-372, 1998.

NASCIMENTO, R. V.; PINHEIRO, J. U.; SALMITO-VANDERLEY, C. S. B. Alimentação de pós-larvas de teleosteos e sua importância na produção em cativeiro. **Ciência Animal**, v. 31, n. 1, 80-91, 2021.

NIVELLE, R.; GENNOTTE, V.; KALALA, E. J. K.; NGOC, N.B.; MULLER, M.; ME'LARD, C.; ROUGEOT, C. Temperature preference of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) juveniles induces spontaneous sex reversal. **Plos One**, v. 14, n. 3, 1-19, 2019.

ORTEGA-RECALDE, O.; DAY, R. C.; GEMMELL, N. J.; HORE, T. A. Zebrafish preserve global germline DNA methylation while sex-linked rDNA is amplified and demethylated during feminization. **Nature communications**, v. 10, n. 1, p. 1-10, 2019.

OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. R.; SOTO, D. **Estudo setorial para consolidação de uma aquicultura sustentável no Brasil**. Curitiba: Gr. Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais, 2007. 313p.

PLA, S.; BENVENUTO, C.; CAPELLINI, I.; PIFERRER, F. Switches, stability and reversals: the evolutionary history of sexual systems in fish. **BioRxiv**, 2021. Disponível: <https://doi.org/10.1101/2021.01.25.428070>.

PONTES, M. F.; SOBRAL, V. R.; RAPOZO, B. R.; SOUZA, R. A.; XIRIANA, F. Avaliação do desempenho produtivo e econômico do cultivo de matrinxã (*Brycon amazonicus*) em sistema intensivo. **Anais do VI Fórum de Integração Ensino, Pesquisa, Extensão e Inovação Tecnológica do IFRR**, v. 4, n. 4, 2017.

QUAGIO-GRASSIOTTO, I.; WILDNER, D. D.; ISHIBA, R. Gametogênese em peixes: aspectos relevantes para o manejo reprodutivo. **Revista brasileira de reprodução animal**, p. 181-191, 2013.

RIBEIRO, C. S.; MOREIRA, R. G. Fatores ambientais e reprodução dos peixes. **Revista da Biologia**, 2012.

RIZZO, E.; BAZZOLI, N. Reprodução e embriogênese. In: BALDISSEROTTO, B.; CYRINO, J.; URBINATI, E. C. (Org.). **Biologia e fisiologia de peixes neotropicais de água doce**. 1ed, Jaboticabal, SP: Fundação de Apoio à Pesquisa, Ensino e Extensão (FUNEP), 2014, p. 265-284.

SATO, Y.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E.; BOSCHI, M. B.; MIRANDA, M. O. T. Influence of Abaete River on the reproduction success of the neotropical migratory teleost *Prochilodus argenteus* in the São Francisco River, downstream of the Três Marias dam, Southeastern Brazil. **River Research and Application**, v. 21, 2005.

SCHNEIDER, F.; POEHLAND, R. Endocrinology of reproduction. In: JAMIESON, B. G. M. (org). **Reproductive biology and phylogeny of fishes (Agnathans and Bony Fishes)**. 1 ed. New Hampshire: Science Publishers, 2009. p 54-93.

SCHULTER, E. P.; VIEIRA-FILHO, J. E. R. **Evolução da piscicultura no Brasil: diagnóstico e desenvolvimento da cadeia produtiva de tilápia**. Brasília: Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada, 2017, 32p.

SINCLAIR, A. H.; BERTA, P.; PALMER, M. S.; HAWKINS, J. R.; GRIFFITHS, B. L.; SMITH, M. J.; FOSTER, J. W.; FRISCHAUF, A. M.; LOVELL, B. R.; GOODFELLOW, P. N. A gene from human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. London: **Nature**, v. 346, 240-244, 1990.

SOUTO, C. N.; FARIA, T. M.; OLIVEIRA, H. F.; ROSA, R. M.; SILVA, L. A. S.; CAMPOS, M. A. F. Visão geral sobre reprodução de peixes teleósteos: da anatomia à sinalização molecular. **Pubvet – Medicina veterinária e Zootecnia**, v. 11, n. 11, p. 1175-1187, 2017.

STREISINGER, G.; WALKER, C.; DOWER, N.; KNAUBER, D.; SINGER, F. Production of clones of homozygous diploid zebrafish (*Brachydanio rerio*). London: **Nature**, v. 291, 293–296, 1981.

STRÜSSMANN, C. A.; TAKASHIMA, F.; TODA, K. Sex differentiation and hormonal feminization in pejerrey *Odontesthes bonariensis*. **Aquaculture**, v. 139, 31-45, 1996.

TAKAHASHI, H. Juvenile hermaphroditism in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. **Hokkaido University**, v. 28, n. 2, p. 57-65, 1977.

TAKEHANA, Y.; MATSUDA.; MYOSHO, T.; SUSTER, M. L.; KAWAKAMI, K.; SHIN-I, T.; KOHARA, Y.; KUROKI, Y.; TOYODA, A.; FUJIYAMA, A.; HAMAGUCHI, S.; SAKAIZUMI, M.; NARUSE, K. Co-option of Sox3 as the male-determining factor on the Y chromosome in the fish *Oryzias dancena*. London: **Nature Communications**, v. 5, 1-10, 2014.

TAO, W.; CHEN, J.; TAN, D.; YANG, J.; SUN, L.; WEI, J.; CONTE, M. A.; KOCHER, T. D.; WANG, D. Transcriptome display during tilapia sex determination and differentiation as revealed by RNA-Seq analysis. **BMC Genomics**, v. 19, n. 363, 1-12, 2018.

TETREAULT, G. R.; BENNETT, C. J.; SHIRES, K.; KNIGHT, B.; SERVOS, M. R.; MCMASTER, M. E. Intersex and reproductive impairment of wild fish exposed to multiple municipal wastewater discharges. **Aquatic Toxicology**, v. 104, n. 5, 278–290, 2011.

TOKARZ, J.; MÖLLER, G.; DE ANGELIS, M. H.; ADAMSKI, J. Steroids in teleost fishes: a functional point of view. **Steroids**, v. 103, 123-144, 2015.

- TOLUSSI, C. E.; GOMES, A. D. O.; KUMAR, A.; RIBEIRO, C. S.; NOSTRO, F. L. L.; BAIN, P. A.; DE SOUZA, G. B.; CUÑA, R.; HONJI, R. M.; MOREIRA, R. G. Environmental pollution affects molecular and biochemical responses during gonadal maturation of *Astyanax fasciatus* (Teleostei: Characiformes: Characidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 147, 926-934, 2018.
- TSUTSUI, K. A new key neurohormone controlling reproduction, gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH): Biosynthesis, mode of action and functional significance. **Progress in Neurobiology**, v. 88, n. 1, p. 76-88, 2009.
- UCHIDA, D.; YAMASHITA, M.; KITANO, T.; IGUCHI, T. Apoptosis during the transition from ovary-like tissue to testes during sex differentiation of juvenile zebrafish. **The Journal of Experimental Biology**, v. 205, 711–718, 2002.
- UTSUNOMIA, R.; SCACCHETTI, P. C.; HERMIDA, M.; FERNÁNDEZ-CEBRIÁN, R.; TABOADA, X.; FERNÁNDEZ, C.; BEKAERT, M.; MENDES, N.J.; ROBLEDO, D.; MANK, J.E.; TAGGART, J.B.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.; MARTÍNEZ, P. Evolution and conservation of *Characidium* sex chromosomes. **Heredity**, v.119, 2017.
- VALENTIN, F. N.; BATLOUNI, S. R.; NASCIMENTO, N. F.; SILVA, R. C.; MANZINI, B.; HILBIG, C. C.; PEREIRA-SANTOS, M.; NAKAGHI, L. S. Ovarian differentiation and development in cachara *Pseudoplatystoma fasciatum*. **Journal of Fish Biology**, v.89, 2016.
- VALENTIN, F.; NAKAGHI, L. S. O.; BATLOUNI, S. R.; NASCIMENTO, N.F.; PAES, M. C. F.; SILVA, R. C.; MANZINI, B.; CHAVARRO, S. Y. C.; ASSUNÇÃO, M. H. C. Testicular differentiation and development in South American catfish, surubim, *Pseudoplatystoma fasciatum*. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 35, n. 2, p. 529-540, 2019.
- VAZ, M. M.; TORQUATO, V. C.; BARBOSA, N. D. C. 2000. **Guia ilustrado de peixes da bacia do Rio Grande**. Belo Horizonte: CEMIG/CETEC, 2000. 144p.
- VAZZOLER, A. E. A. M. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática**. Maringá: Ed da UEM, 1996.
- VENERE, P.C.; FERREIRA, I.A.; MARTINS, C.; GALETTI JUNIOR, P.M. A novel ZZ/ZW sex chromosome system for the genus *Leporinus* (Pisces, Anostomidae, Characiformes). **Genetica**, v.121, 2004.
- YAMAMOTO, T. O. Sex differentiation. **Fish Physiology**, v. 3, 117-175, 1969.
- ZAGO, S.; PAIVA, D. P. **Rio do Peixe: atlas da bacia hidrográfica**. Joaçaba: Unoesc; 2016. 136 p.
- ZALUSKI, A. B. **Investigação de mecanismos da determinação e da diferenciação sexual dependente de temperatura em zebrafish (*Danio rerio*) e em duas espécies de tartarugas marinhas (*Caretta caretta* e *Eretmochelys imbricata*)**. Dissertação. Programa de Pós-

graduação em Ecologia e Evolução da biodiversidade. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brasil, 2019.

ZANIBONI-FILHO, E.; REYNALTE-TATAJE, D.; WEINGARTNER, M. Potencialidad del género *Brycon* en la piscicultura brasileña. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v. 19, n. 2, 2006.

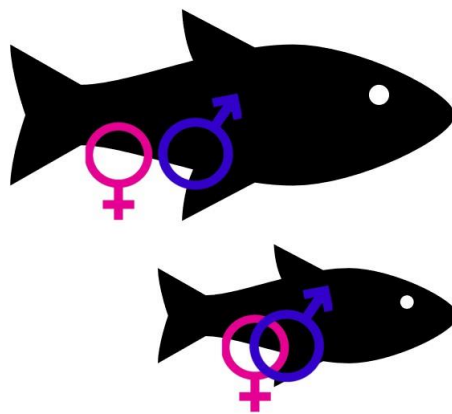
ZOHAR, Y.; MUÑOZ-CUETO, J. A.; ELIZUR, A.; KAH, O. Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. **General and comparative endocrinology**, v. 165, n. 3, 438-455, 2010.

CAPÍTULO 2

Female sex inversion as a reason for an unbalanced sex ratio in
the neotropical species *Brycon orbignyana*

Artigo publicado na revista **Aquaculture Research** em 6 de dezembro de 2021 sob

DOI: [10.1111/are.15701](https://doi.org/10.1111/are.15701)



Female sex inversion as a reason for an unbalanced sex ratio in the neotropical species *Brycon orbignyanus*

Patricia Postingel Quirino^{1,2}; Maria Luiza Ribeiro Delgado^{1,2}; Luciane Gomes-Silva^{1,2}; Cristiane Fernanda Benevente^{1,2}; Maiara Luzia Grigoli-Olivio^{1,3}, Bárbara Correa Bianchini¹, Alexandre Ninhaus-Silveira^{1,2,3}; Rosicleire Veríssimo-Silveira^{1,2,3}

Artigo publicado na revista **Aquaculture Research** em 6 de dezembro de 2021 sob DOI:
10.1111/are.15701

Funding Information: This work was supported by the Foundation for Research Support of the State of São Paulo (FAPESP, Process 2013/24527-8 and 2014/23379-8), National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Process 302108/2015 -7 and 305673/2018-1) and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) by the grant awarded.

ABSTRACT

The objective of this study was to temporally identify sex differentiation to morphologically characterize the formation of female and male germinal epithelium and verify the occurrence of the sex disproportion reported for this species in aquaculture. Specimens of *Brycon orbignyanus* cultivated in water recirculation systems with a constant temperature of 27 ± 0.5 °C were used. Monthly samplings of *B. orbignyanus* (n = 15) were performed from two months of age until 1 year of age, and posteriorly isolated sampling was performed on specimens of two and three years of age. The gonads of the specimens were removed and processed for light microscopy. In the beginning, the undifferentiated gonads develop into ovaries (females; at three months of age) and functional testicles (primary males; at five months of age); however, some of the females go through a sex inversion process creating intersex individuals and posteriorly secondary males (at five months of age). Due to the processes of sex inversion and gonadal remodelling, the population sex proportion fluctuates until it is finally established at 1♀: 2♂. Females above 15 cm are differentiated, while in males (primary and secondary), differentiation will only occur after the animal reaches 20 cm. At the end of the

first year of age, primary males and secondary males reach sexual maturity, while female sexual maturity is only observed at three years of age.

Keywords: germline epithelium, gonadal differentiation, histology, oogenesis, sex inversion, spermatogenesis.

INTRODUCTION

Among vertebrates, fish are the group with the greatest diversity of reproductive strategies and tactics (VAZZOLER, 1996; JAKOBSEN *et al.*, 2016). Among these strategies, the determination and sex differentiation in teleosts can be controlled by genetic mechanisms or may be due to exogenous cues such as temperature, density or even pH (DEVLIN; NAGAHAMA, 2002). The dynamics of sex differentiation are complex, and species can have direct or indirect gonochoristic development, in addition to the possibility of hermaphroditic development (DEVLIN; NAGAHAMA, 2002; KUWAMURA *et al.*, 2020).

In gonochorist species with direct development, undifferentiated bipotential gonads develop directly into the ovary or testis, as is the case in *Cyprinus carpio* (MAZZONI; GRIER; QUAGIO-GRASSIOTTO, 2010; MAZZONI; GRIER; QUAGIO-GRASSIOTTO, 2014), *Pseudoplatystoma fasciatum* (VALENTIN *et al.*, 2016; VALENTIN *et al.*, 2019) and *Oreochromis niloticus* (NAKAMURA *et al.*, 1998). In species with indirect gonochorist development, the undifferentiated gonads initially develop into ovaries in all individuals and, later, part of the population continues to develop as females, while in the others, the ovary undergoes sex inversion, creating intersex individuals who will later develop as males, such as in *Danio rerio* (TAKAHASHI, 1977; ORTEGA-RECALDE *et al.*, 2019) and *Gymnocorymbus ternetzi* (MAZZONI; GRIER; QUAGIO-GRASSIOTTO, 2015).

There are cases of species originally described as direct gonochorists that, under some exogenous stress, develop intersex specimens, individuals who simultaneously present male and female gonadal tissue (BAHAMONDE; MUNKITTRICK; MARTYNIUK, 2013). The occurrence of intersex individuals within a population can interfere with the sex ratio of 1♀:1♂, considered essential for the maintenance of the species (HAMILTON, 1967; OSPINA-ÁLVAREZ; PIFERRER, 2008). In the Characiformes of the *Astyanax scabripinnis* species complex, the occurrence of intersex individuals in wild populations is considered common due

to sex inversion of the gonads (DE SÁ *et al.*, 2008). In this case, the intersex specimens possibly work as a balancing mechanism for the sex ratio of these populations, which may have been unbalanced due to genetic or environmental cues acting in the period of sex differentiation of the species (CORNÉLIO *et al.*, 2017).

In Characiformes of commercial interest, *Brycon orbignyanus* is a very popular species in aquaculture and sport fishing, distributed throughout the second major Brazilian river Basin: La Plata Basin (Brazil, Paraguay, Uruguay and Argentina) (VAZ; TORQUATO; BARBOSA, 2000). Last year, the Brazilian aquaculture production reached 551.9 thousand tons, of which 3.590 thousand tons produced were species of the genus *Brycon* (IBGE, 2021). Despite this, *Brycon orbignyanus* is a rheophilic species and has a worrying conservation status as it has been classified as Endangered (A2c) (ICMBIO, 2018). This species has a seasonal reproductive period, with reproduction occurring during the wettest months (September-January) and normally, males reach sexual maturity around two years old, while females reach three years old. (VAZ; TORQUATO; BARBOSA, 2000; BALDISSEROTTO; GOMES, 2005).

Brycon orbignyanus was originally described as a species that presents with sex differentiation with direct gonochoristic development, with a sex ratio of 1♀: 2♂ (ZARDO *et al.*, 2021). However, the details of the morphological and temporal characteristics of the species' sex differentiation remain unclear, requiring detailed clarification of the events of sex differentiation that explain these proportions. The objective of this work was to describe and identify the sex differentiation in *B. orbignyanus* cultivated in water recirculation systems, temporally characterizing the first signs of cell proliferation of germinative and somatic cells, the formation of the germinal epithelium, the establishment of functional ovaries and testes, and investigating the presence of intersex individuals due to sex inversion of females.

MATERIALS AND METHODS

Ethical considerations for the use of animals

All animal handling and euthanasia procedures were performed in accordance with the standards established and approved by the Ethics Committee on Animal Use (UNESP, 12/2017 – CEUA/FEIS).

Animals

The specimens were obtained from an induced reproduction of *Brycon orbignyanus* performed at the U.H.E. Aquaculture Station of Promissão – AES Tietê, Promissão/SP. In female (n = 1, 41 cm total length and 1500 kg body weight), two doses of carp pituitary extract (first dose: 0.5 mg of pituitary/kg body weight; seven hours later, second dose: 5 mg of pituitary/kg body weight) were used, and in male (n = 1, 38 cm total length and 749,1 kg body weight), one application was performed (3 mg of pituitary/kg body weight). After extrusion of oocytes and sperm, fertilization was performed adding water (December 2017). Soon after fertilization, embryonic development occurred in conical incubators (capacity: 200 l), and three days later, the larvae were transferred to tanks with constant water circulation (capacity: 5000 l).

At the age of one month, the juveniles of *B. orbignyanus* were transferred to the Experimentation Greenhouse of the Neotropical Ichthyology Laboratory of the Universidade Estadual Paulista, “Júlio de Mesquita Filho” - Ilha Solteira (UNESP/FEIS). During the entire sampling period, the specimens were kept in water recirculation tanks (4500 L) (n=600), fed daily with commercial feed (composition: moisture 120 g/kg; crude protein 320 g/kg; ether extract 60 g/kg; fibers 55 g/kg; mineral supplement 120 g/kg), maintained at a natural photoperiod and temperature controlled at 27 ± 0.5 °C in automatic coolers and heaters, pH 6.5 ± 0.6 and ammonia 0.25 ± 0.10 ppm.

Sampling and analysis

As soon as the animals reached two months of age, monthly collections (n = 15) were performed until they reached one year of age. From that, annual collections were carried out when the specimens reached two and three years of age. All specimens were euthanized with a 0.01% concentration of benzocaine solution. After euthanasia, the total length (TL) and body weight (BW) were measured. Afterwards, the gonads were removed, photographed and immediately fixed in a 2% glutaraldehyde solution and 4% paraformaldehyde in Sorensen's phosphate buffer pH 7.2.

Light microscopy and histological analysis

The gonads were sectioned in longitudinal and transverse sections (cranial, medial and caudal regions) embedded in Leica® historesin or paraffin and then sectioned in 3 μ m using a

semiautomatic Leica® RM 2244 microtome. Histological slides were stained with toluidine blue, Harris haematoxylin and eosin, and Metanil yellow, associated with ferric haematoxylin and periodic acid Schiff (P.A.S.) and the Reticulin Method (staining of reticulin fibres by silver impregnation).

For the analysis of the relationship between the growth (TL) and the sex differentiation of the specimens, four categories of classification were established according to the gonadal development of the specimens analyzed: 1 - undifferentiated gonads; 2 - gonads in early differentiation; 3 - differentiated developing gonads; 4 - sexually active gonads.

Statistical analysis

A Shapiro–Wilk normality test and Bartlett’s test for homogeneity of variances were performed with the level of significance set at 5%. The data did not have a normal distribution so they were analysed by Spearman’s rank correlation and the Mann–Whitney test (biometric data) and simple linear regression (relationship between the total length and sex differentiation). For the statistical analysis, the sexes were considered, and the animals were separated into two groups: females (including females that initiate sex inversion) and males (including primary males, secondary males and intersex). Data are expressed as the mean \pm standard deviation (SD).

RESULTS

Temporal variation in sex differentiation in *Brycon orbignyanus*: females, males and intersex

In *Brycon orbignyanus* cultivated in captivity, at constant water temperature, the sexually undifferentiated gonads give rise to functional ovaries (female) and testes (primary males). However, some of the individuals who originally develop as females go through a period of sex inversion and gonadal remodelling, giving rise to intersex animals that later develop functional testes (secondary males). Thus, there is temporal variation in the main cellular events and tissue organization that occur during the sex differentiation of *B. orbignyanus* to females, males and intersex individuals (Figure 1).

The first signs of sex differentiation in females occur at three months of age and in males at five months of age, in the same period that sex inversion begins in some females, producing intersex individuals at eight months (future secondary males) (Figure 1). The formation of the

germinal epithelium (GE) initially occurs in females at four months of age, in primary males at six months of age and in intersex only at ten months of age, what we are calling secondary males. Sexual maturity was reached for primary and secondary males at one year of age; however, the same was observed for females at three years of age.

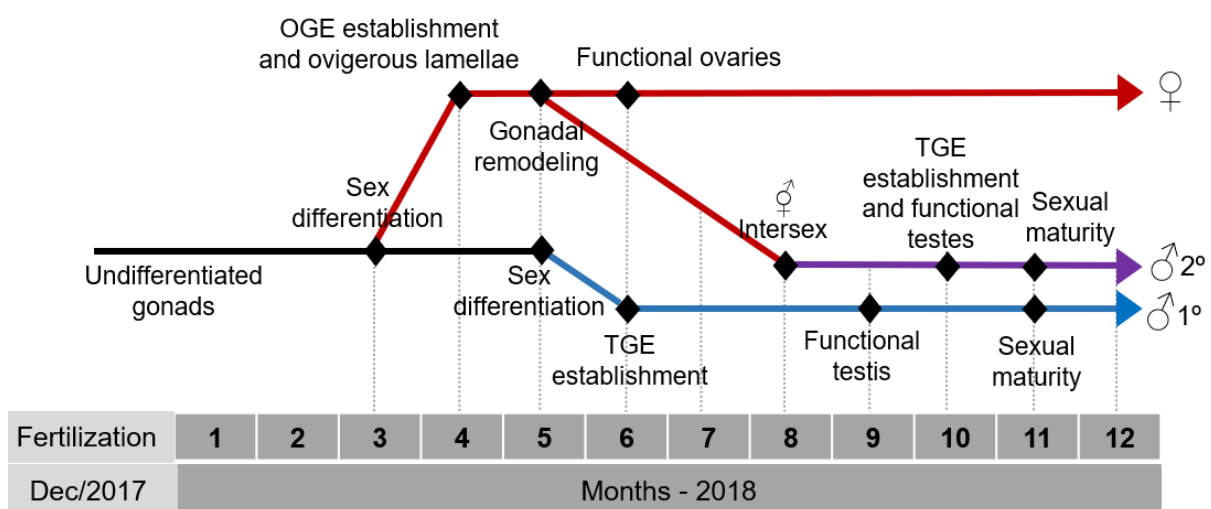
Biometry, sex ratio and relation of sex differentiation and growth in *B. orbignyanus*

In the first year of life, specimens of *B. orbignyanus* show linear growth and body weight gain (Tables 1 and 2). There were no significant differences between the growth and weight gain between the sexes.

The sex ratio of the animals was collected in the sixth month, when there were no more undifferentiated individuals, at $2♀:1♂$ (Figure 1 and Table 2). At eight months of age, the sex ratio was 1:1:1 (female: intersex: primary males). With the completion of sex inversion and the formation of secondary males, the sex ratio was established at $1♀:2♂$ (Figure 1 and Table 2).

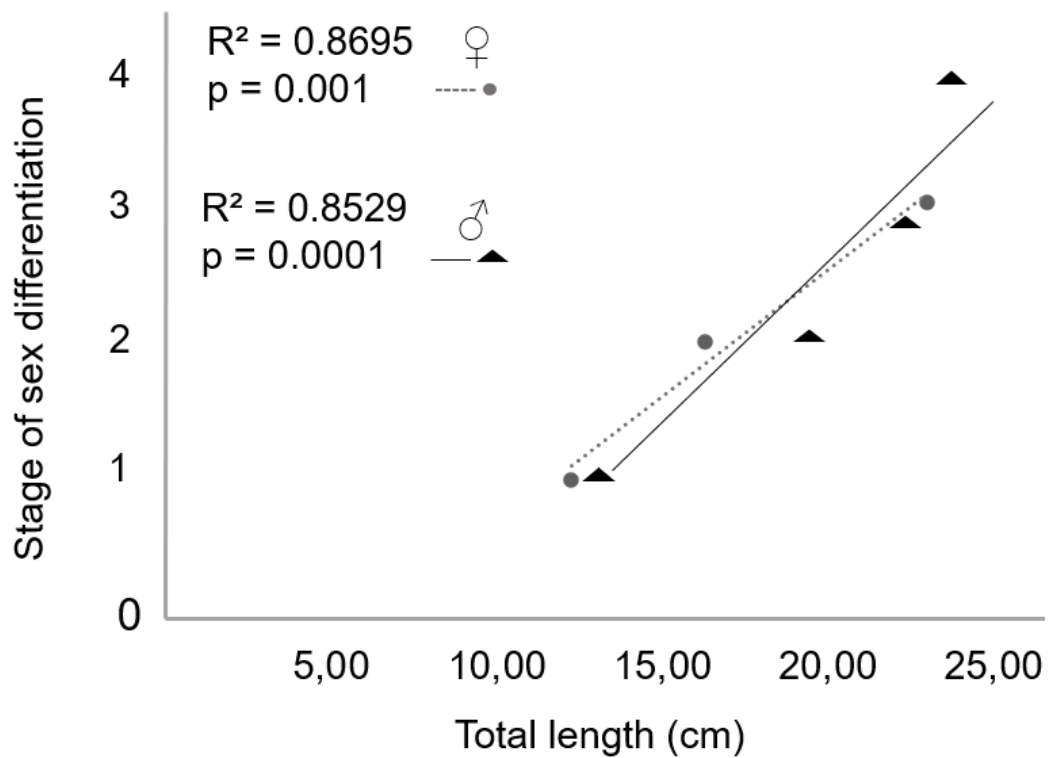
There was a strong positive correlation ($R^2 = 0.8695$, $p = 0.001$ in females and $R^2 = 0.8529$, $p = 0.0001$ in males) between the age of the specimens and the development of the ovaries and testes in *B. orbignyanus*, indicating that the sexual differentiation in this species is also directly related to the growth of the individuals (Figure 2). Females above 15 cm are differentiated, while in males (primary and secondary), differentiation will only occur after the animal reaches 20 cm (Figure 2).

Figure 1: Main events of sex differentiation in *Brycon orbignyanus*. **OGE:** ovarian germinal epithelium. **TGE:** testicular germinal epithelium.



Fonte da imagem: QUIRINO *et al.*, 2021.

Figure 2: Correlation between specimens length and gonadal development in *Brycon orbignyanus*. **X axis:** Total length of specimens in centimeters. **Y axis:** Classification of gonadal development: (1) undifferentiated gonads; (2) gonads in early sex differentiation; (3) developing sex differentiated gonads; (4) sexually active gonads. ♀: Female. ♂: Male.



Fonte da imagem: QUIRINO *et al.*, 2021.

Table 1: Total length and sex ratio in *Brycon orbignyanus*. **cm:** centimeters. **Undi:** undifferentiated gonads. ♀: Female. ♂: Male. Data were expressed as mean ± standard deviation (SD). Females and females in the beginning of sex inversion were grouped together, while the same was done for intersex, primary males and secondary males. Simple linear regression (relationship between the total length and sex differentiation) and Mann–Whitney test (female x male). **Fonte:** QUIRINO *et al.*, 2021.

Age (months)	Total Length (cm)			
	Undi.	Female	Male	Sex ratio
2	10.51 ± 0.93	-	-	
3	11.22 ± 0.90	13.25 ± 1.52	-	01:00:00
5	16.25 ± 0.35	18.03 ± 1.77	-	01:00:01
6	-	19.36 ± 1.26	18.80 ± 1.29	02:00:01
8	-	22.5 ± 1.06	21.33 ± 0.82	01:01:01
10	-	24.70 ± 1.78	23.45 ± 1.03	01:00:02
12	-	24.75 ± 1.71	24.05 ± 2.26	01:00:02
		$R^2 = 0.88$	$R^2 = 0.88$	
Linear regression: age x total length				
		$y = 8.63 + 1.58x$	$y = 8.76 + 1.41x$	

Table 2: Total weight in *Brycon orbignyanus*. **g:** gram. **Undi:** undifferentiated gonads. Data were expressed as mean ± standard deviation (SD). Females and females in the beginning of sex inversion were grouped together, while the same was done for intersex, primary males and secondary males. Simple linear regression (relationship between the total length and sex differentiation) and Mann–Whitney test (female x male). **Fonte:** QUIRINO *et al.*, 2021.

Age (months)	Total Weight (g)		
	Undi.	Female	Male
2	13,47 ± 04,08	-	-
3	13,81 ± 3,95	26,37 ± 10,07	-
5	41,12 ± 3,35	56,75 ± 15,80	-
6	-	73,6 ± 14,11	62,89 ± 12,9
8	-	118,56 ± 19,24	97,46 ± 15,99
10	-	164,24 ± 42,77	140,45 ± 18
12	-	177.69 ± 42.04	172.27 ± 45.12
		$R^2 = 0.89$	$R^2 = 0.80$
Linear regression: age x total weight			
		$y = (-29.06) + 17.51x$	$y = (-28.35) + 16.47x$

Morphology of undifferentiated gonads

The undifferentiated gonads of *B. orbignyana* are formed by somatic cells and primordial germ cells (PGCs), with an oval and little basophilic nucleus, with a very evident nucleolus and deformed cytoplasm (Figure 3A, C and D), in addition to blood vessels dispersed throughout the tissue (Figure 3A-C).

The distribution of PGCs differs in gonad regions, with PGCs being more frequent in the central region of the undifferentiated gonad and concentrated in the dorsal region, while PGCs are less frequent in the cranial and caudal regions (Figure 3B and F). As mitosis occurs, the PGCs organize themselves into a continuous cord supported by connective tissue (Figure 3B). When present, melanomacrophage centres are often found near blood vessels (Figure 3C and E).

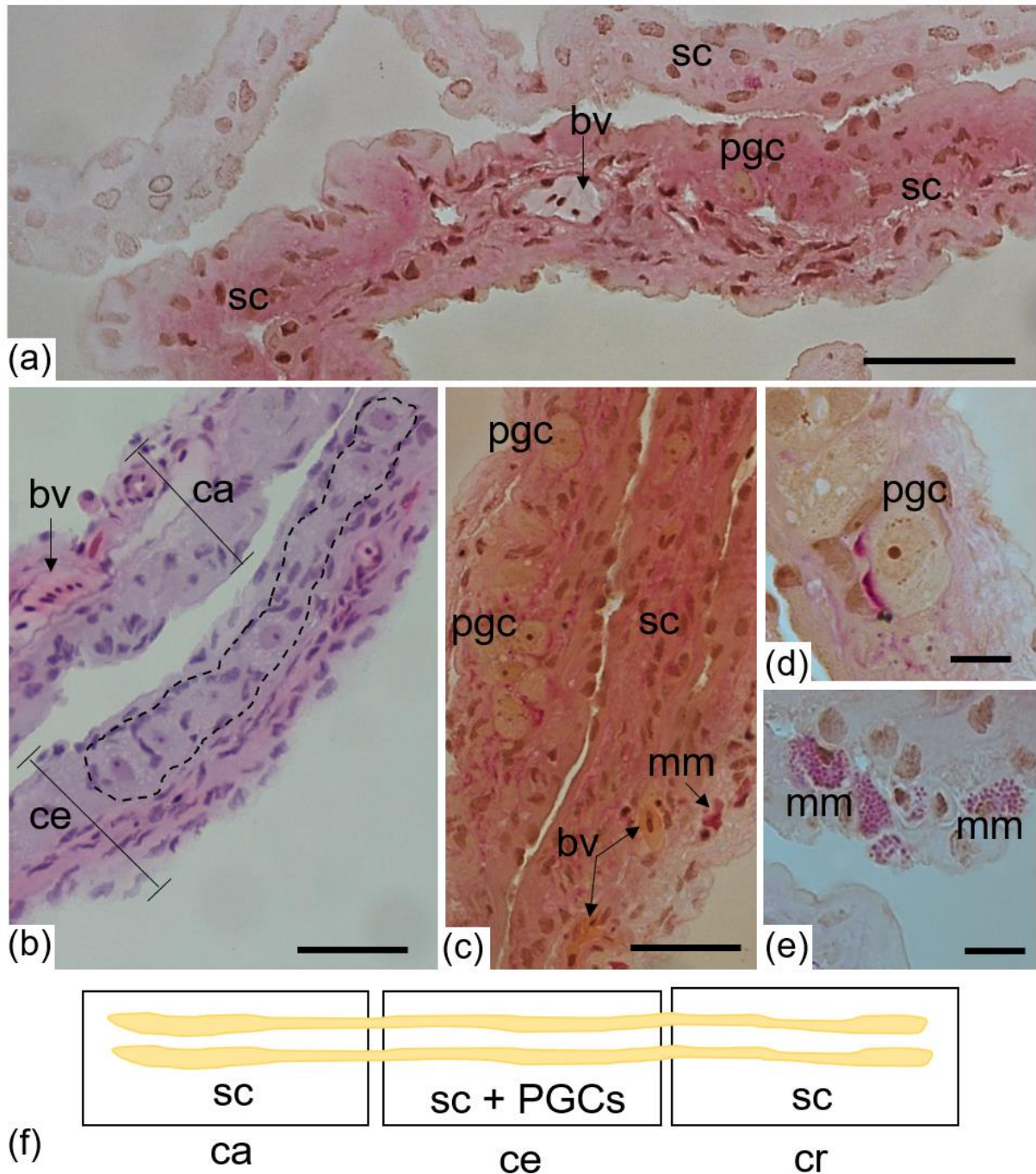
Sex differentiation in females

Three months of age: beginning of ovarian differentiation

At this time, some specimens of *B. orbignyana* show considerable modifications in the gonads, such as the increase in the mitotic proliferation of PGCs. Primordial germ cells differ in oogonia, in the ventral region of the organ with a random distribution and no longer in the form of cords (Figure 4A and B). At the same time, meiosis begins, with the presence of prophasic oocytes throughout the tissue (Figure 4B-D and H). Primary growing oocytes (PGs) with many vacuoles in the cytoplasm can be found (Figure 4E and F), and melanomacrophage centres are regularly found near oogonia and oocytes with vacuoles (Figure 4F and G).

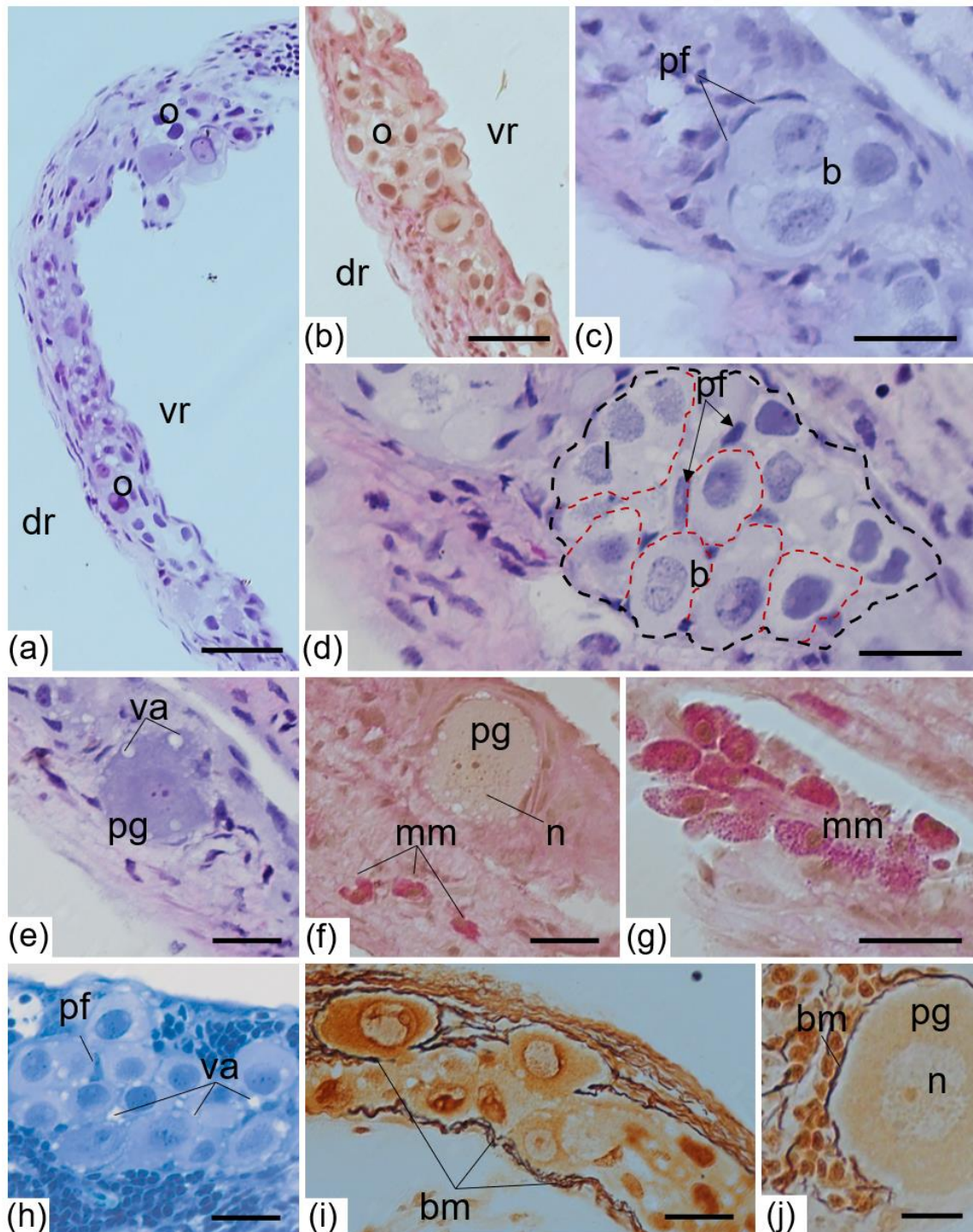
As in undifferentiated gonads, gametogenesis is more intense in the central region of the ovarian tissue than in other regions, characterized by the presence of cysts and PG supported by a basement membrane (Figure 4I and J).

Figure 3: Morphology of undifferentiated gonads in *Brycon orbignyanus*. **A-C:** Location of primordial germ cells (**pgc**). **D:** Details Primordial germ cell. **E:** Melanocrophage center (**mm**). **F:** Graphic representation of the distribution of somatic cells (**sc**) and primordial germ cells according to the gonad regions. **bv:** blood vessels. **ca:** caudal region. **ce:** central region. **cr:** cranial region. **Scale bar:** **A, B** and **C** = 20 μ m, **D** and **E** = 5 μ m. **Stain:** haematoxylin and eosin; metanil yellow, ferric haematoxylin and periodic acid-Schiff.



Fonte da imagem: QUIRINO *et al.*, 2021.

Figure 4: Ovarian differentiation in females - three months old. **A and B:** Ventral (**vr**) and dorsal region of the gonads (**dr**). **C and D:** Germ cell nest (**black dashed line**) and germ cell cyst (**red dashed line**). **E and F:** primary growth oocytes (**pg**). **G:** melanocrophage center (**mm**). **H:** B-oogonia (**b**) nest with cytoplasm vacuole (**va**). **I and J:** germ cells and primary growth oocyte supported by basement membrane (**bm**). **n:** nucleus. **o:** oogonia. **pf:** pre-follicle cell. **Scale bar:** A and B = 20 μ m; C, D and G = 10 μ m; E, F, H and I = 10 μ m; J = 5 μ m. **Stain:** haematoxylin and eosin; metanil yellow, ferric haematoxylin and periodic acid-Schiff and toluidine blue.



Fonte da imagem: QUIRINO *et al.*, 2021.

Four months of age: beginning of ovarian germinal epithelium (OGE) formation and ovigerous lamellae

In females of *B. orbignyana* at four months of age, numerous undifferentiated and differentiated oogonia and B oogonia were found, indicating intense mitotic proliferation of the population and growth of the ovary. Undifferentiated oogonias (UOs) are always isolated, with oval and basophilic nuclei and very evident nucleoli, in addition to a large and oval cytoplasm (Figure 5A). Differentiated oogonia (DO) are smaller than UO, have a basophilic nucleus and considerable reduction in cytoplasm (Figure 5B), and are always found in cysts of two or more cells (Figure 5B). DO is divided by mitosis and gives rise to B oogonia (B), with a small basophilic nucleus and numerous dispersed nucleoli. B oogonia differentiate into oocytes during meiosis prophase I (Figure 5C-E).

Folliculogenesis is considered completed when the ovarian follicle is established, being formed by an oocyte in diplotene and individualized by follicular cells, which secrete a basement membrane surrounding them, creating a follicle (oocyte in primary growth). PGs are dispersed throughout the ovary (Figure 5F); however, they are concentrated in greater amounts in the central regions of the organ (Figure 5G). They have a small basophilic nucleus but are full of nucleoli of different sizes, initially randomly dispersed and later positioned in the periphery of the nucleus. The cytoplasm of these cells is basophilic and filled with lighter grooves called Balbiani's Corpuscles (Figure 5K). Somatic epithelial cells organize around the PG, forming small invaginations that will give rise to the ovigerous lamellae (Figure 5F and G). Areas with remnant spaces amidst the forming epithelium are often seen, possibly due to PG reabsorption that has gone into atresia (Figure 5H).

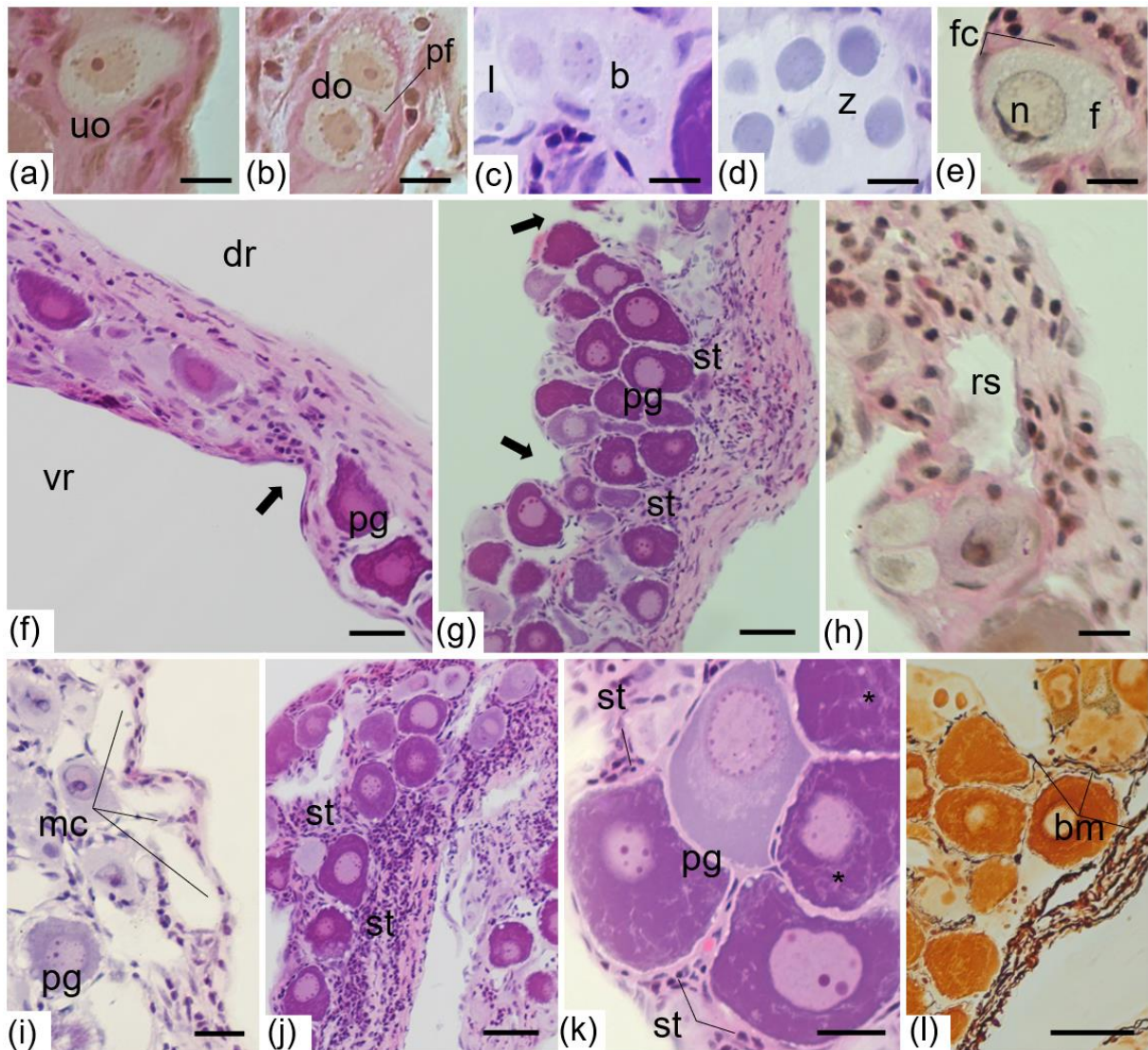
As the organization of the OGE occurs and the first signs of the formation of ovigerous lamellae begin (Figure 5G), the organization of connective tissue cells is observed, extending through the cells of the germinative epithelium and initiating the formation of the ovarian stroma (Figure 5G, I, J and K). Although PG appears to be dispersed amidst the ovarian stroma, it remains attached to the germinal epithelium through the junction of the oocyte basement membrane to the germinal epithelial basement membrane (Figure 5L).

Six months of age: developing functional ovary

At six months of age, ovigerous lamellae are formed, and OGE is established, so that it is possible to observe a progressive increase in the size of the lamellae due to cell proliferation

and the formation of PG. In the germinal epithelium, there are few prophase oocyte cysts and PG (Figure 6A and D).

Figure 5: Ovarian germinal epithelium formation and ovigerous lamellae - four months old. **A:** undifferentiated oogonia (**uo**). **B:** differentiated oogonia (**do**) and pre-follicle cell (**pf**). **C:** B-oogonia (**b**) and leptotene oocyte (**l**). **D:** zygotene oocyte (**z**). **E:** Follicle (**f**) individualized by follicle cells (**fc**). **F and G:** first signs of formation of the lamellae (**bold arrows**). **H:** Remaining spaces in tissue due to absorption of atretic cells (**rs**). **I and J:** first signs of ovarian stroma (**st**) formation by mesenchymal cells (**mc**). **K:** oocytes in primary growth (**pg**) and ovarian stroma. **L:** Junction of the basement membrane (**bm**) of primary growth oocytes to the basement membrane of the germinal epithelium. Asterisk: Balbiani's corpuscles. **Scale bar:** A - E and H = 5µm; F, G, and J = 20µm; I = 10µm; K = 10µm; L = 20µm. **Stain:** haematoxylin and eosin; metanil yellow, ferric haematoxylin and periodic acid-Schiff and reticulin method.



Fonte da imagem: QUIRINO *et al.*, 2021.

Six months of age: developing functional ovary

At six months of age, ovigerous lamellae are formed, and OGE is established, so that it is possible to observe a progressive increase in the size of the lamellae due to cell proliferation and the formation of PG. In the germinal epithelium, there are few prophasic oocyte cysts and PG (Figure 6A and D).

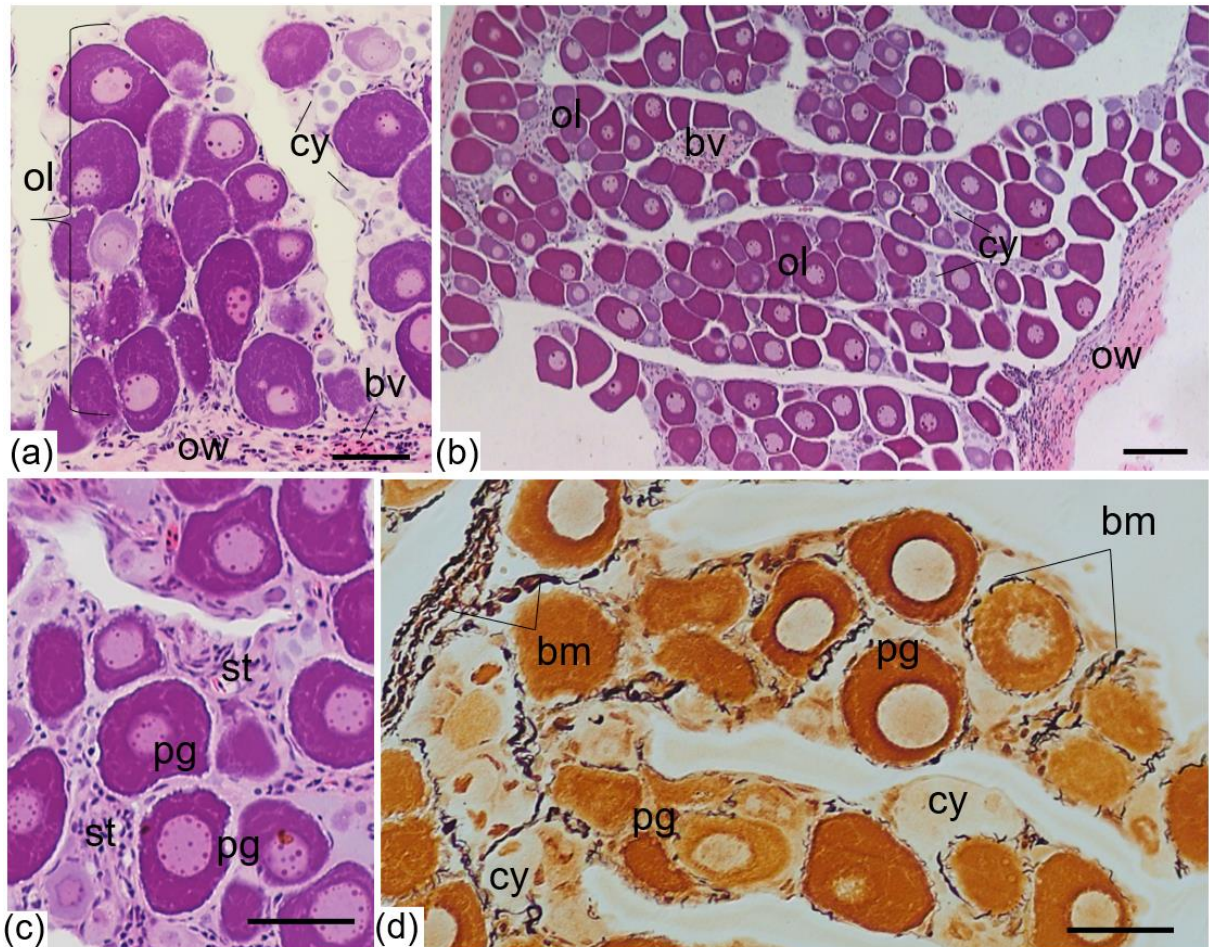
One year old

At the age of one year, the females are still immature and not able to reproduce, but they have characteristics very similar to the females mentioned above (with 6 months of age); in this period, the ovary only increases in size (Figure 6B and D). Thus, at this age, the ovaries of *B. orbignyana* are robust, with highly developed lamellae and full oogonial cysts, prophasic oocytes and PG (Figure 6D).

Two and three years old

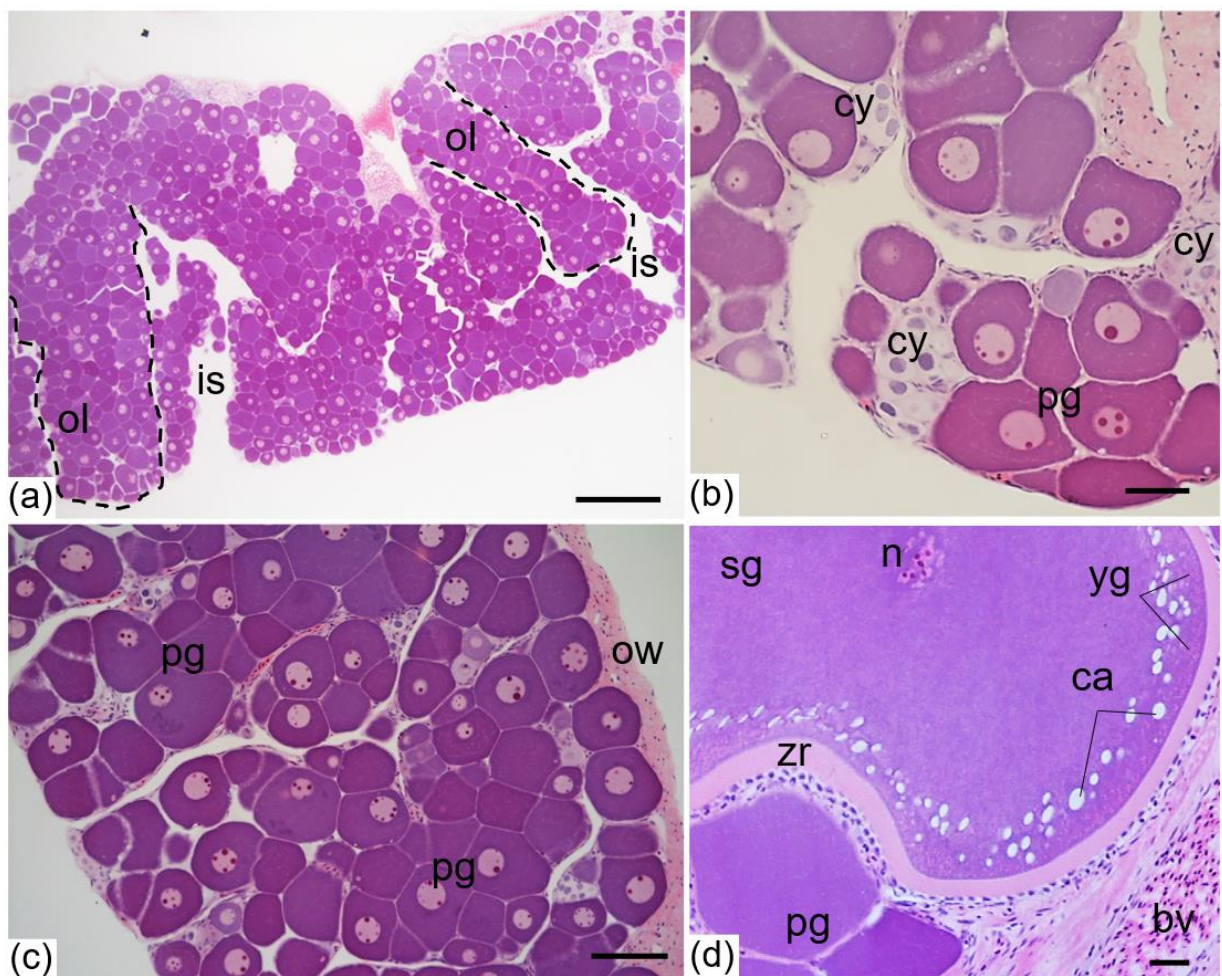
Females of these ages showed small morphological changes in ovary development at two and three years. Macroscopically, the ovaries are orange in colour, are more robust and occupy the dorsal region of the abdominal cavity. Microscopically, it is noted that the ovigerous lamellae are larger and wider than those of 1-year-old animals (Figure 7). Rare secondary growth oocytes (SGs) are dispersed throughout the tissue, with cortical alveoli and yolk granule accumulation (Figure 7D).

Figure 6: Developing functional ovary - six months old. **A - C:** Ovigerous lamellae (**ol**) filled with primary growth oocytes (**pg**) and prophasic oocyte cysts (**cy**) amidst stroma (**st**). **D:** Projection of the ovigerous lamellae towards the ovary light and basement membrane (**bm**) of primary growing oocytes attached to germinal epithelium. **bv:** blood vessels. **ow:** ovarian wall. **Scale bar:** A, C and D = 50 μm , B = E = 100 μm . **Stain:** haematoxylin and eosin and reticulin method.



Fonte da imagem: QUIRINO *et al.*, 2021.

Figure 7: *Brycon orbignyanus* ovaries - three years old. **A and C:** ovigerous lamellae (**ol**) very developed and full of primary growth oocytes (**pg**). **B:** cysts of leptotene (**l**) cells arranged at the ends of the ovigerous lamellae (**ol**). **D:** Secondary growth oocyte (**sg**) with yolk globules (**yg**) progressively accumulates in the cytoplasm. **bv:** blood vessels. **ca:** cortical alveoli. **is:** interlamellar space. **n:** nucleus. **zr:** zona radiata. **ow:** ovarian wall. **Scale bar:** A = 200 μm ; B and C = 20 μm ; D = 50 μm . **Stain:** haematoxylin and eosin.



Fonte da imagem: QUIRINO *et al.*, 2021.

Sex inversion from females to males

Five to eight months of age: gonadal remodelling and sex inversion

At the same time as the sex differentiation of males, it was observed that some specimens of *B. orbignyana* showed sex inversion from females to males, creating an intersex individual and, later, a secondary male (Figure 1).

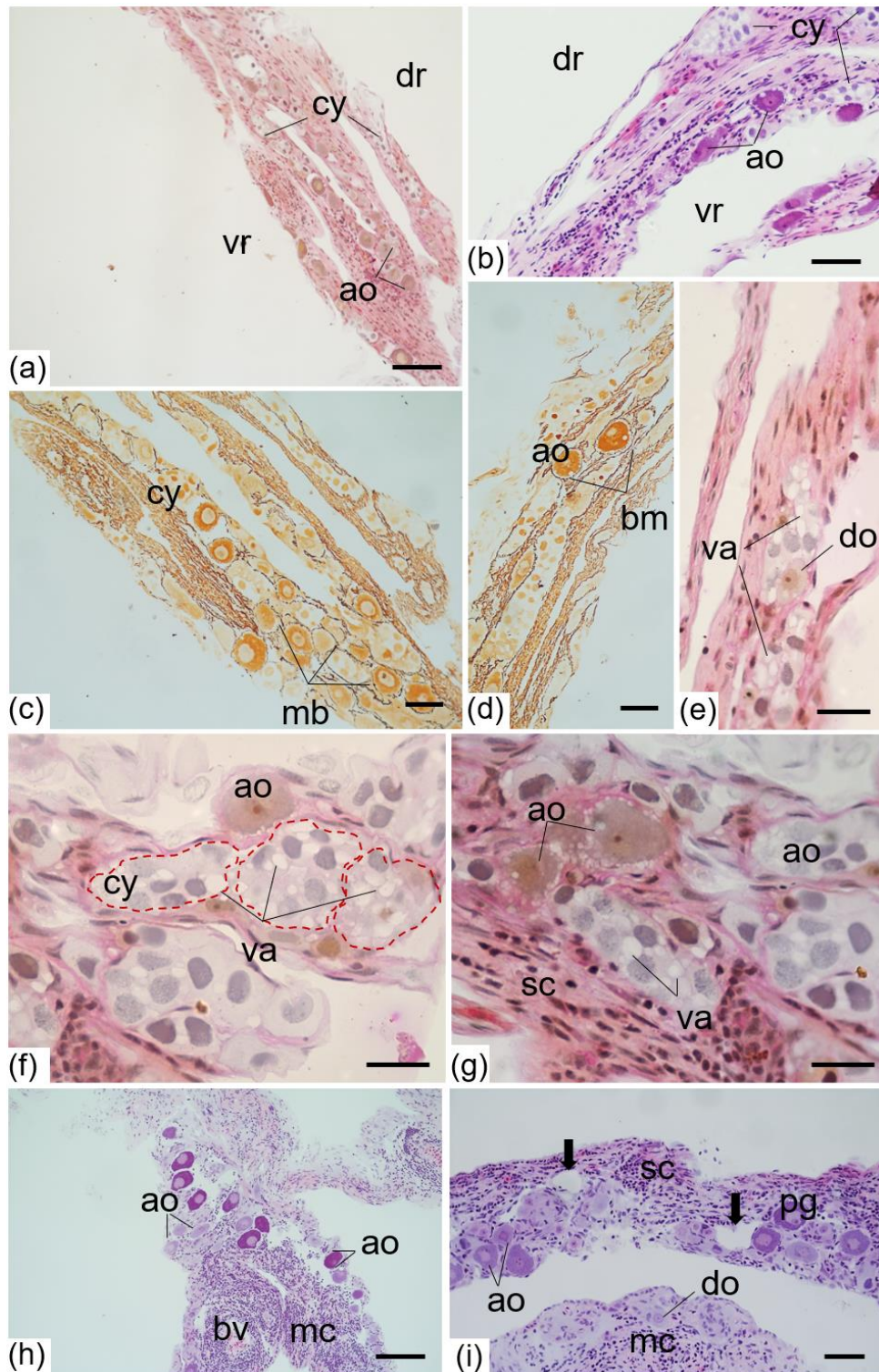
Initially, there is a reorganization in the distribution and positioning of PG that are dispersed in the tissue, so there is no difference between the dorsal or ventral region of the gonad (Figure 8A-D). Many of the oocytes are individualized, supported by a basement membrane (Figure 8C and D), and dispersed in the middle of the stroma, and they all present characteristics of atretic oocytes, such as irregular shape, disfigured nucleus, and a cytoplasm full of vacuoles (Figure 8F and G). The same cell death features are found in oocyte cysts at different times in prophase I (Figure 8E-G). The only intact germ cells found are oogonia (Figure 8E).

The sex inversion ovary becomes more voluminous due to the invasion of mesenchymal somatic cells scattered throughout the organ (Figure 8H and I). Atretic oocytes are still found amid the tissue that is undergoing reorganization; in addition, the organ has spaces remaining from where oocytes were reabsorbed (Figure 8H and I).

Eight - nine months of age: intersex

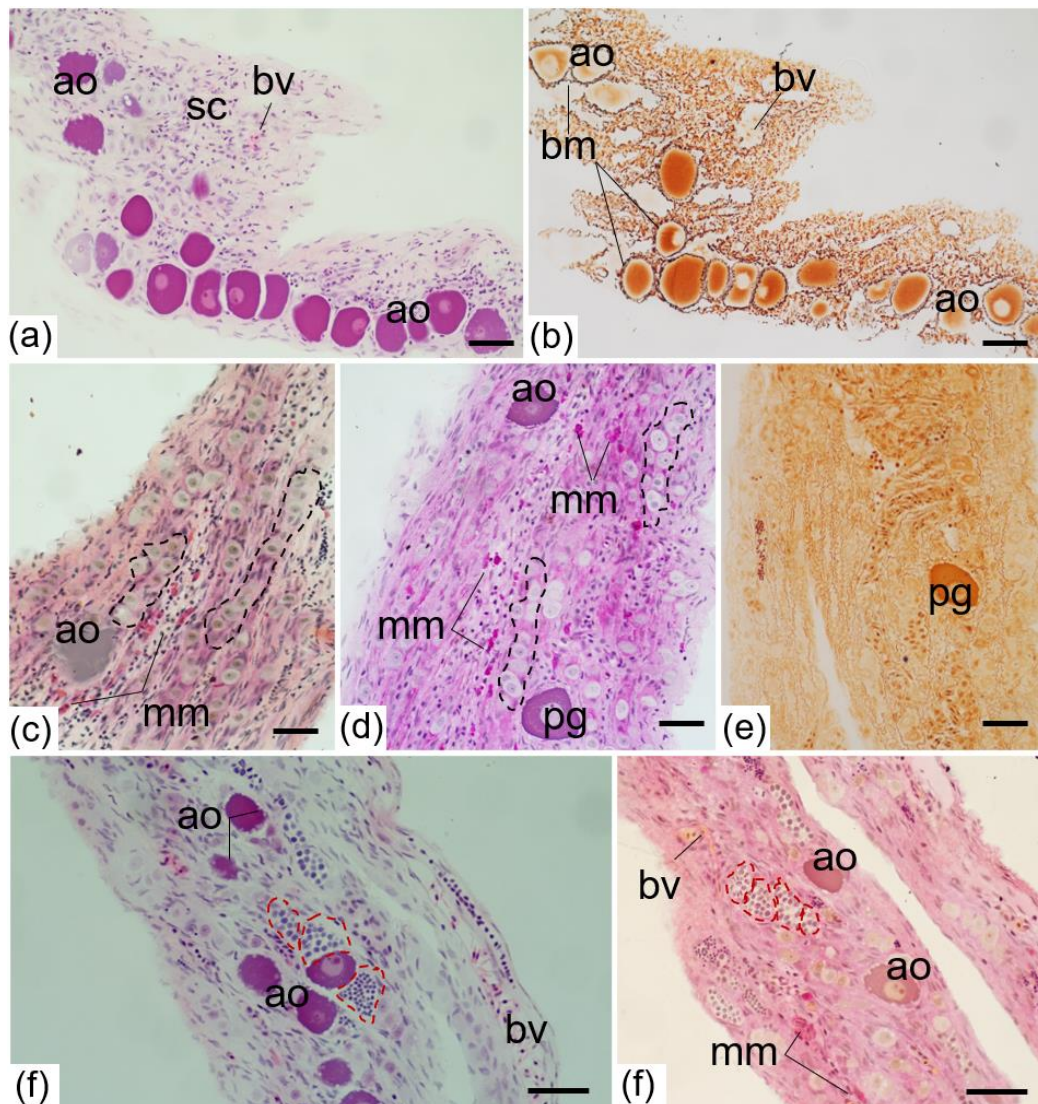
At eight months of age, some specimens show characteristics similar to those described above, with gonads formed only by atretic oocytes and mesenchymal cells forming disorganized tissue (Figure 9A and B). However, some more advanced specimens show characteristics of an organizing testis (Figure 9C-E). Amidst atretic oocytes surrounded by macrophages, numerous undifferentiated (US) or differentiated spermatogonia (DS) are found, organized side by side, starting the formation of cords (Figures 9C and D). In intersex gonads with these characteristics, there is no basement membrane to support the spermatogonia or residual primary growing oocytes, indicating tissue remodelling for the formation of the future testicular germinal epithelium (TGE) (Figure 9E).

Figure 8: Sex inversion in females - five months old. **A and B:** atretic oocytes (**oa**) and germ cell cysts (**cy**) dispersed in the ovary undergoing sex inversion. **C and D:** atretic oocytes surrounded by basement membrane (**bm**). **E:** Integrate differentiated oogonia (**do**) and prophase oocyte cysts with vacuoles (**va**). **G and F:** germ cell cysts in atresia (**red dashed line**), with cytoplasm filled with vacuoles, close to atretic oocytes. **H and I:** Remodeling of ovarian tissue, promoted by somatic cells (**sc**), mesenchymal cells (**mc**) amid atresic primary oocytes (**oa**) and void spaces of already absorbed oocytes (**bold arrow**). **bv:** blood vessels. **dr:** dorsal region. **vr:** ventral region. Scale bar: A and B = 50 μm ; C and D = 20 μm ; E = 10 μm ; F and G = 10 μm ; H = 50 μm ; I = 20 μm . **Stain:** haematoxylin and eosin; metanil yellow, ferric haematoxylin and periodic acid-Schiff and reticulin method.



At nine months of age, the first signs of active spermatogenesis are found for the intersex specimens of *Brycon orbignyanus* (Figure 9F and G). Amid the residual primary growing oocytes, US and DS, spermatocyte cysts, spermatids and, in rare areas, some spermatozoa in the lumens, are observed (Figure 9F and G). In addition, the intersex gonad starts to have external morphological characteristics similar to the testes, with the cranial region of the gonad divided into two equally functional portions (Figure 9F and G).

Figure 9: Intersex gonads in *Brycon orbignyanus* – eight/nine months old. **A and B:** Atretic oocytes (ao) being reabsorbed, all oocytes are surrounded by basement membrane (bm). **C and D:** Beginning of formation of spermatogonial cords (dashed black line) close to atretic oocytes. **E:** basement membrane absent. **F and G:** Intersex gonad with atretic oocytes dispersed among germ cell cysts of the spermatogenic lineage (dashed red line). **bv:** blood vessels. **Scale bar:** A and B = 20 μm ; C – E = 20 μm ; F and G = 20 μm . **Stain:** haematoxylin and eosin; metanil yellow, ferric haematoxylin and periodic acid-Schiff and reticulin method.



Ten months - one year of age: establishment of testicular germinal epithelium (TGE) giving rise to secondary males

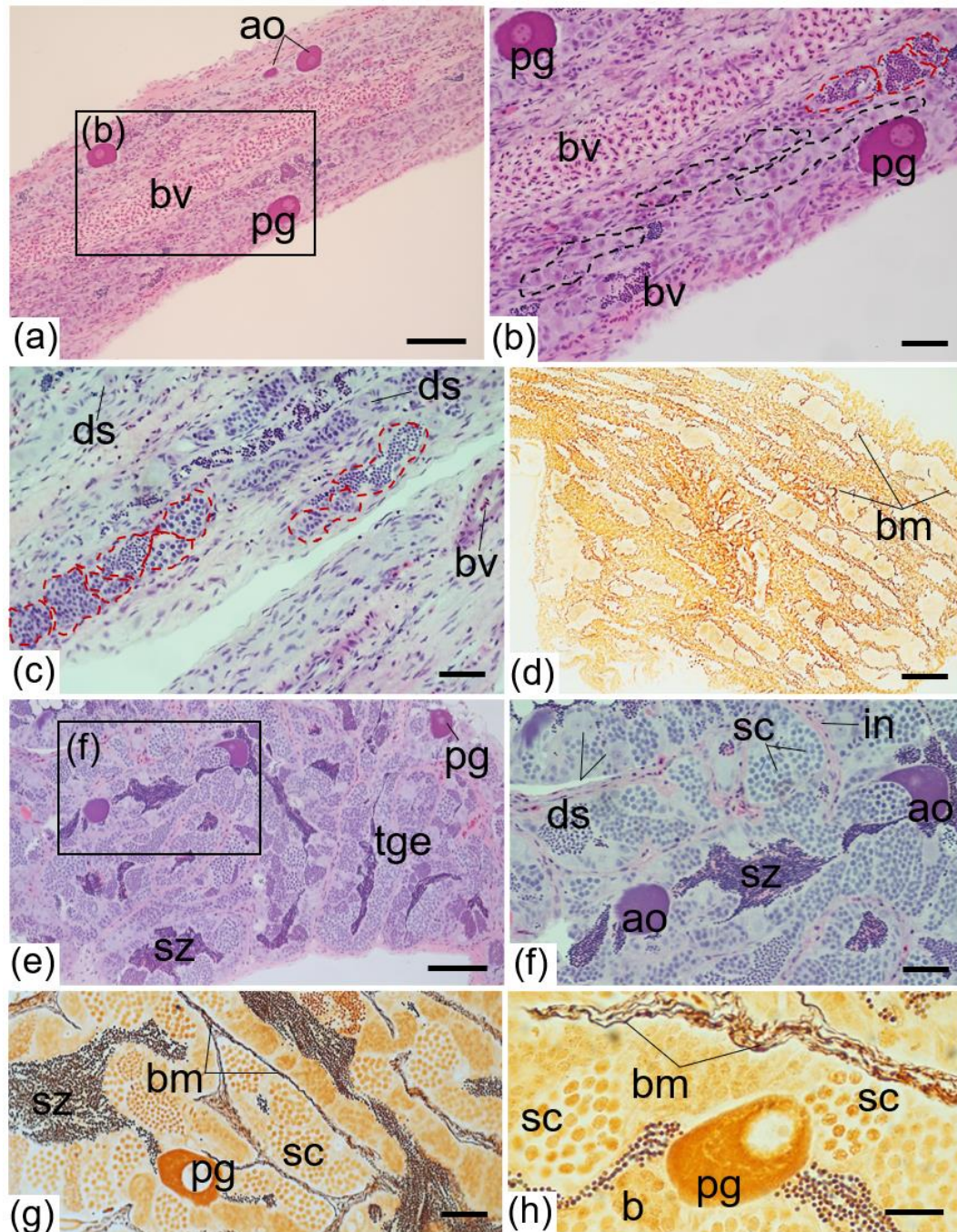
Ten-month-old intersex specimens maintained the presence of residual PG (Figure 10) and had highly vascularized gonads, with the formation of more extensive cords dispersed throughout the gonad (Figure 10A-D). The formation of a new germinal epithelium begins with the secretion of the basement membrane supporting Sertoli cells, forming cysts or cords of germ cells, indicating the separation of the germinal epithelium and interstitium (Figure 10D). The frequency of spermatocytes, spermatids and small lumens with spermatozoa is higher, indicating an increase in mitotic and meiotic cell proliferation (Figure 10C).

At one year of age, all specimens of *B. orbignyana* considered intersex have functional testis due to the establishment of TGE supported by a basement membrane and interstitial compartment, giving rise to secondary male individuals (Figure 10E-H). Intact or atresic PG can be found regularly, are never involved in the basement membrane and are not directly linked to the germinal epithelium (Figure 10G and H).

Two and three years old

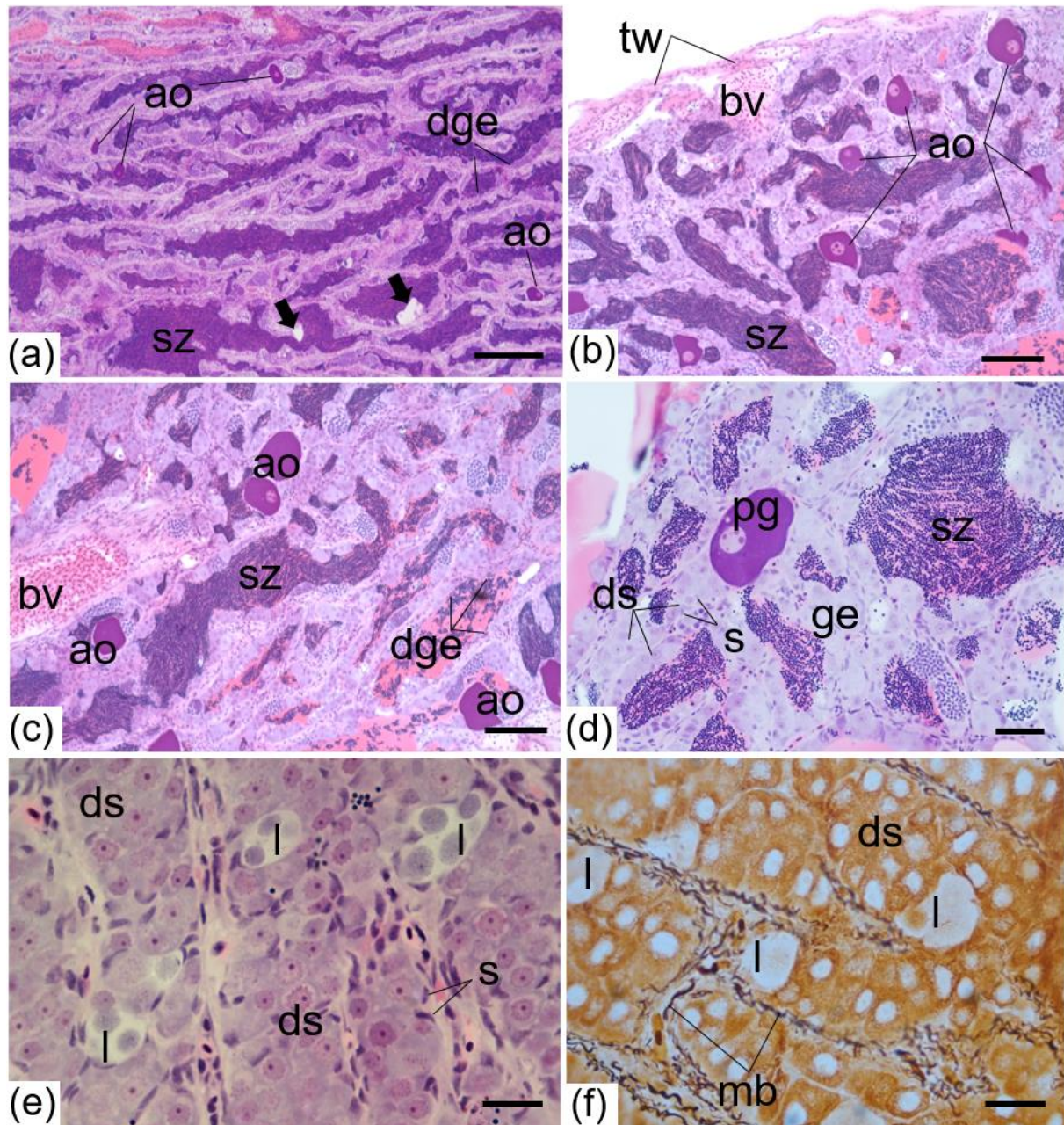
Despite having already gone through a reproductive cycle, the secondary males in *B. orbignyana* still have PG dispersed throughout the tissue and are easily identified in relation to the primary males (Figure 11). Due to their age, they have more robust testes, with discontinuous germinal epithelium, providing tubules lightly filled with spermatozoa (Figure 11A-D). There were some specimens with testes in the regeneration phase with germinal epithelium consisting only of US, DS and rare areas with residual spermatozoa (Figure 11E). Even with remodelling of the testis structure due to the phase of the reproductive cycle, prophasic oocyte cysts proliferate in the middle of the TGE (Figure 11E and F). Prophasic oocyte cysts are not supported by the basement membrane (Figure 11F).

Figure 10: Establishment of testicular germinal epithelium in secondary males - ten months to one year old. **A-C:** highly vascularized intersex gonad (**bv**) with increased spermatogonial cords (**black dashed line**) close to germinal cysts (**red dashed line**) and primary growth (**pg**) and atretic (**ao**) oocytes. **D:** first signs of basement membrane (**bm**) involving spermatogonial cords. **E and F:** active spermatogenesis, germinal epithelium composed of spermatocyte cysts (**sc**) differentiated spermatogonia (**ds**) and sperm (**sz**) in the lumen. **G and H:** testicular germinal epithelium (**tge**) supported on basement membrane, showing primary growth oocytes without basement membrane. **b:** B-spermatogonia. **in:** interstitium. **Scale bar:** A and E = 50 μm ; B-D, F and G = 20 μm ; H = 10 μm . **Stain:** haematoxylin and eosin; metanil yellow, ferric haematoxylin and periodic acid-Schiff and reticulin method.



Fonte da imagem: QUIRINO *et al.*, 2021.

Figure 11: Testes of secondary males in *Brycon orbignyana* – two and three years old. **A-D:** Spawning Capable phase: secondary males are very vascularized (**bv**) there are a lumen full of sperm (**sz**), discontinuous germinal epithelium (**dge**) with a predominance of spermatogonia (**ed**), primary growth oocyte (**pg**) and atretic oocytes (**ao**). **E and F:** Regenerating phase: characterized by the presence of differentiated spermatogonia (**ds**) and Sertoli cells (**s**) arranged in the germinal epithelium (**ge**) and the presence of leptotene (**l**) oocyte cysts, indicating that the female germ cells are also renewed at each cycle. **bm:** basement membrane. **tw:** testis wall. **Scale bar:** A = 100 μ m; B and C = 50 μ m; D = 20 μ m; E and F = 10 μ m. **Stain:** haematoxylin and eosin and reticulin method.



Fonte da imagem: QUIRINO *et al.*, 2021.

Sex differentiation in primary males

Five months of age: beginning of testicular differentiation

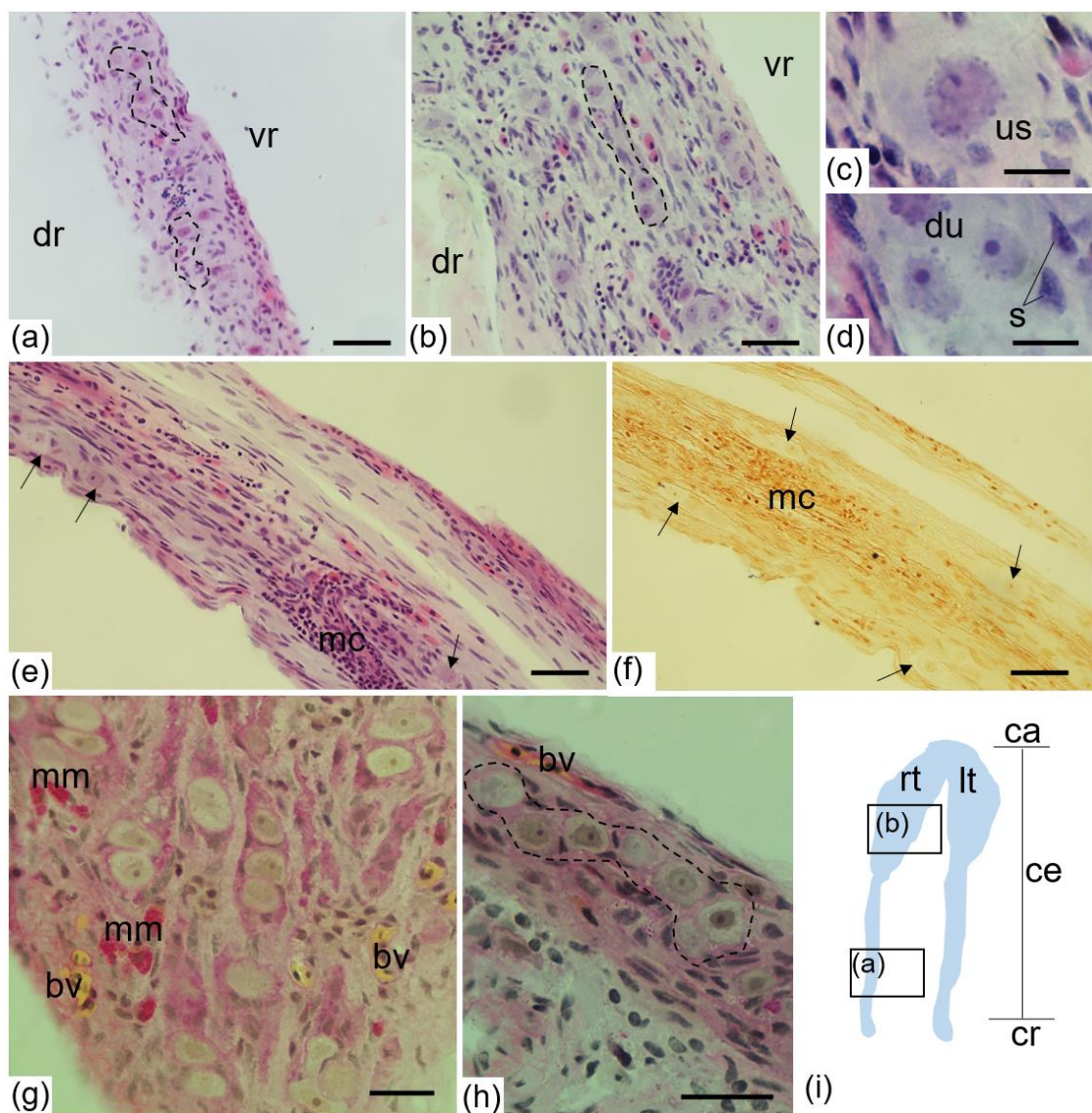
At the age of five months, some of the individuals collected from *B. orbignyana* began to show changes in their gonads that were previously undifferentiated (Figures 1 and 12). PGCs increase in quantity through successive mitoses, forming the structure of cords in the gonad. In contrast to females, in which these cells are positioned in relationship to the tissue (dorsal or ventral region), the cords are distributed continuously throughout the differentiating gonads (Figure 12A and B).

In addition to the difference in the positioning of the PGCs in the tissue, now called undifferentiated spermatogonia (US), the development of the organ is more advanced in the caudal region (Figure 12B and G) than in the cranial region (Figure 12A and H), both in relation to the volume of the organ (Figure 12I) and in relation to the amount of germ cells and cord formation in these areas. In the caudal regions, US cells are always isolated, with voluminous cytoplasm, basophilic nuclei with peripheral nucleoli (Figure 12C) and differentiated spermatogonia (DS), forming cysts supported by Sertoli cells, with two or more cells, that are considerably smaller than US cells, with reduced cytoplasm, basophilic and oval nuclei, and still peripheral nucleoli, but more evident and demarcated (Figure 12D). There are clusters of mesenchymal somatic cells forming the interstitial compartment throughout the testis. There is no basement membrane separating the germinal epithelium.

Six - eight months of age: beginning of TGE formation

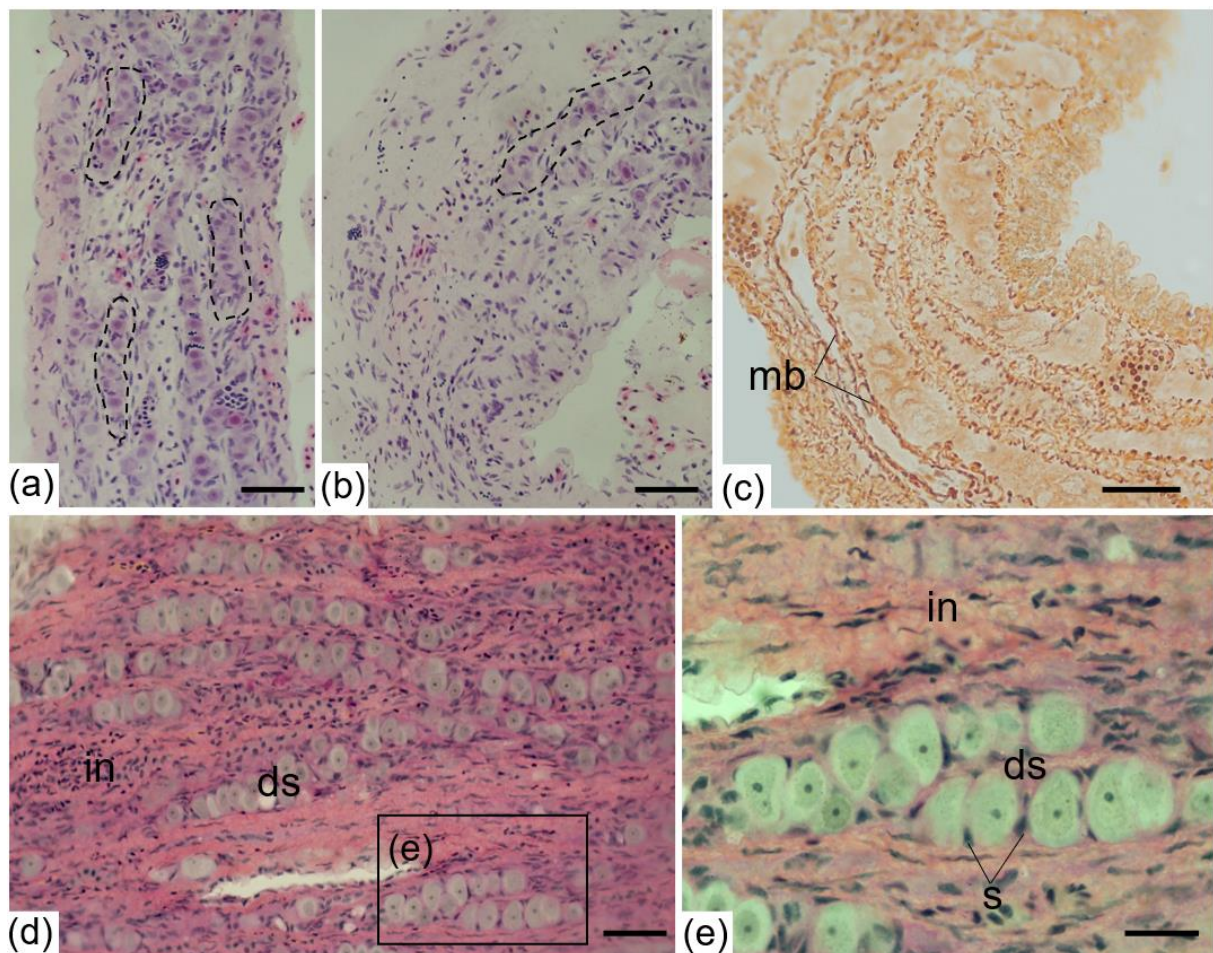
During this period, the testes are thicker due to intense mitotic proliferation, and the formation of cords becomes more evident, forming continuous cords scattered across the testes. The difference in the development of the regions is still clear, so the caudal region has long cords formed by DS (Figure 13A), while the cranial region has a few cords being formed (Figure 13B). During this period, basement membrane secretion involving the cords begins (Figure 13C), forming epithelioid tissue comprised only of Sertoli cells and germline cells (Figure 13C-E).

Figure 12: Sex differentiation of testes in primary males of *Brycon orbignyanus* – five months old. **A:** Cranial region of the testes. **B:** Caudal region of the testes. **C:** undifferentiated spermatogonia (**us**). **D:** differentiated spermatogonia (**ds**). **E and F:** central region of the testes with differentiated spermatogonia dispersed throughout the tissue (**arrows**), close to areas with a high concentration of mesenchymal cells (**mc**), absent basement membrane. **G:** melanocrophage centers (**mm**) near blood vessels (**bv**). **H:** spermatogonial cords (**black dashed line**). **I:** Graphic representation of the caudal (**ca**), central (**ce**) and cranial (**cr**) region of the testes according to development. **rt:** right testis. **lt:** left testis. **Scale bar:** A, B, E and F = 20 μm ; C and D = 5 μm ; G and H = 10 μm . **Stain:** haematoxylin and eosin; metanil yellow, ferric haematoxylin and periodic acid-Schiff and reticulin method.



Fonte da imagem: QUIRINO *et al.*, 2021.

Figure 13: Establishment of testicular germinal epithelium in primary males of *Brycon orbignyanus* – six to eight months old. **A:** caudal region of the testes. **B:** cranial region of the testes. **C:** Early evidence of basement membrane (**bm**) synthesized by Sertoli cells (**s**). **D and E:** continuous spermatogonial cords. **black dashed line:** spermatogonial cords. **ds:** differentiated spermatogonia. **in:** interstitium. **Scale bar:** A- D = 20 μm ; E = 10 μm . **Stain:** haematoxylin and eosin; metanil yellow, ferric haematoxylin and periodic acid-Schiff and reticulin method.



Fonte da imagem: QUIRINO *et al.*, 2021.

Nine - ten months of age: functional testes

At nine months of age, the testes show active spermatogenesis, with all cell types dispersed throughout the continuous germinal epithelium: US, DS, B spermatogonia (B), spermatocytes, spermatids and few spermatozoa in newly formed lumens (Figure 14A). In the cranial region, which is less developed than the caudal region, there are no spermatozoa in the lumen (Figure 14B). When present, centres of melanomacrophages are found near blood vessels or around cells with a pyknotic nucleus (Figure 14E). During this period, the testes begin to develop a secondary extension of the organ, forming another insertion point for the testes in the coelomic cavity (Figure 14D). At ten months of age, the testes of *B. orbignyana* contain all types of germline cells, but there is a clear predominance of B cysts and prophasic spermatocytes (Figure 14F). During this period, the secondary extension of the testes increases in length and volume, becoming equally organized and functional (Figure 14E, G and H). The germinal epithelium is supported by the basement membrane, which delimits the entire interstitial compartment (Figure 14F).

Eleven months - one year of age: sexual maturity

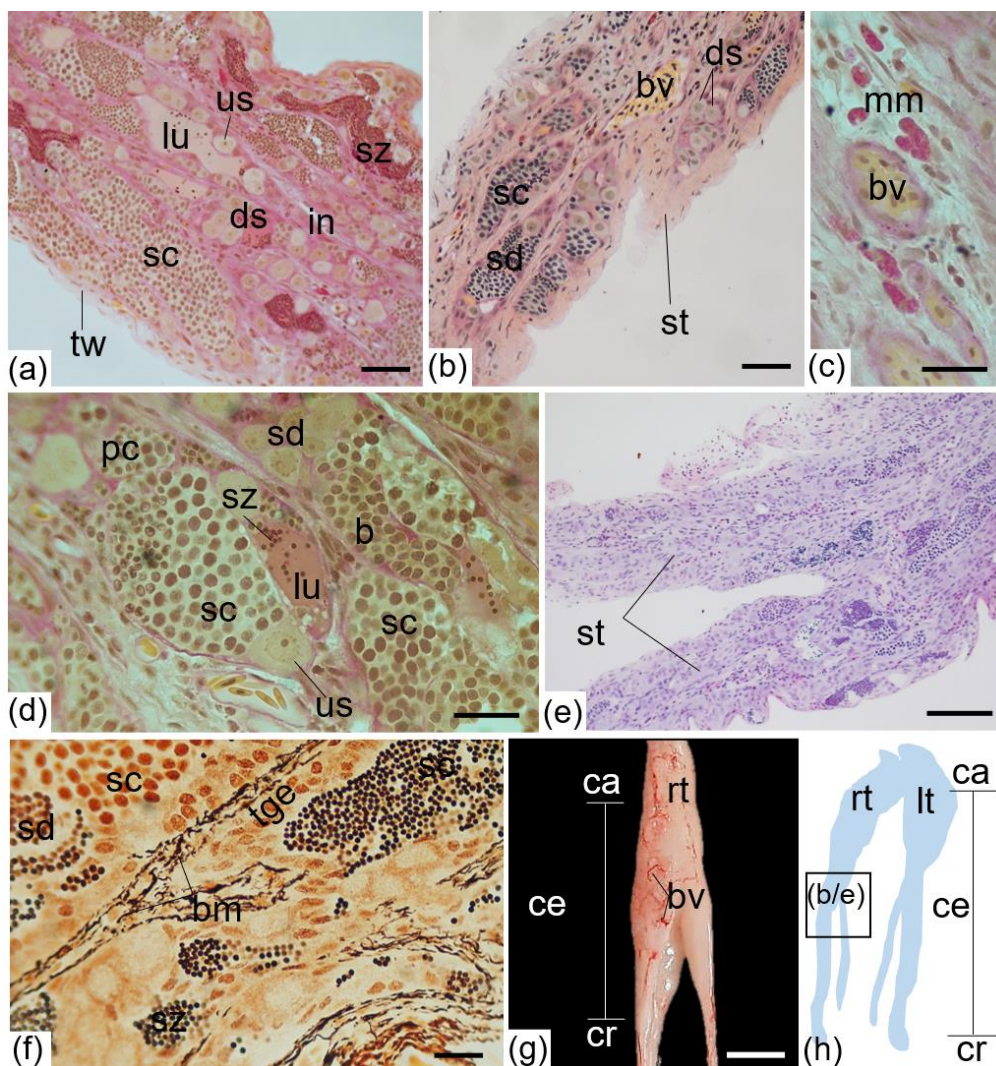
From eleven months of age, primary males of *B. orbignyana* are sexually active and ready for their first reproductive cycle. Macroscopically, the testes are more robust in the caudal region than in the cranial region, which is divided into two ends, has a milky-white colour and is very vascularized (Figure 14G). Microscopically, there is synchrony in testicular development, such that both the cranial region and the caudal region have discontinuous germinal epithelium, large tubules and a lumen filled with spermatozoa (Figure 15A-F). There is a predominance of spermatocytes and spermatids in the TGE (Figure 15C, D and F).

Two and three years old

Similar to one-year-old specimens, two- and three-year-old primary males are spawning capable, having discontinuous germinal epithelium throughout the length of the testis, with few residual germinal cysts of spermatocytes and spermatids, in addition to spermatozoa stored in the lumen (Figure 16A and C). Some specimens presented testes in the regressing phase (Figure 16C and D), characterized by discontinuous germinal epithelium with rare residual cysts, and areas of interstitium were resorbed, indicating testis remodelling (Figure 16C and D). Animals

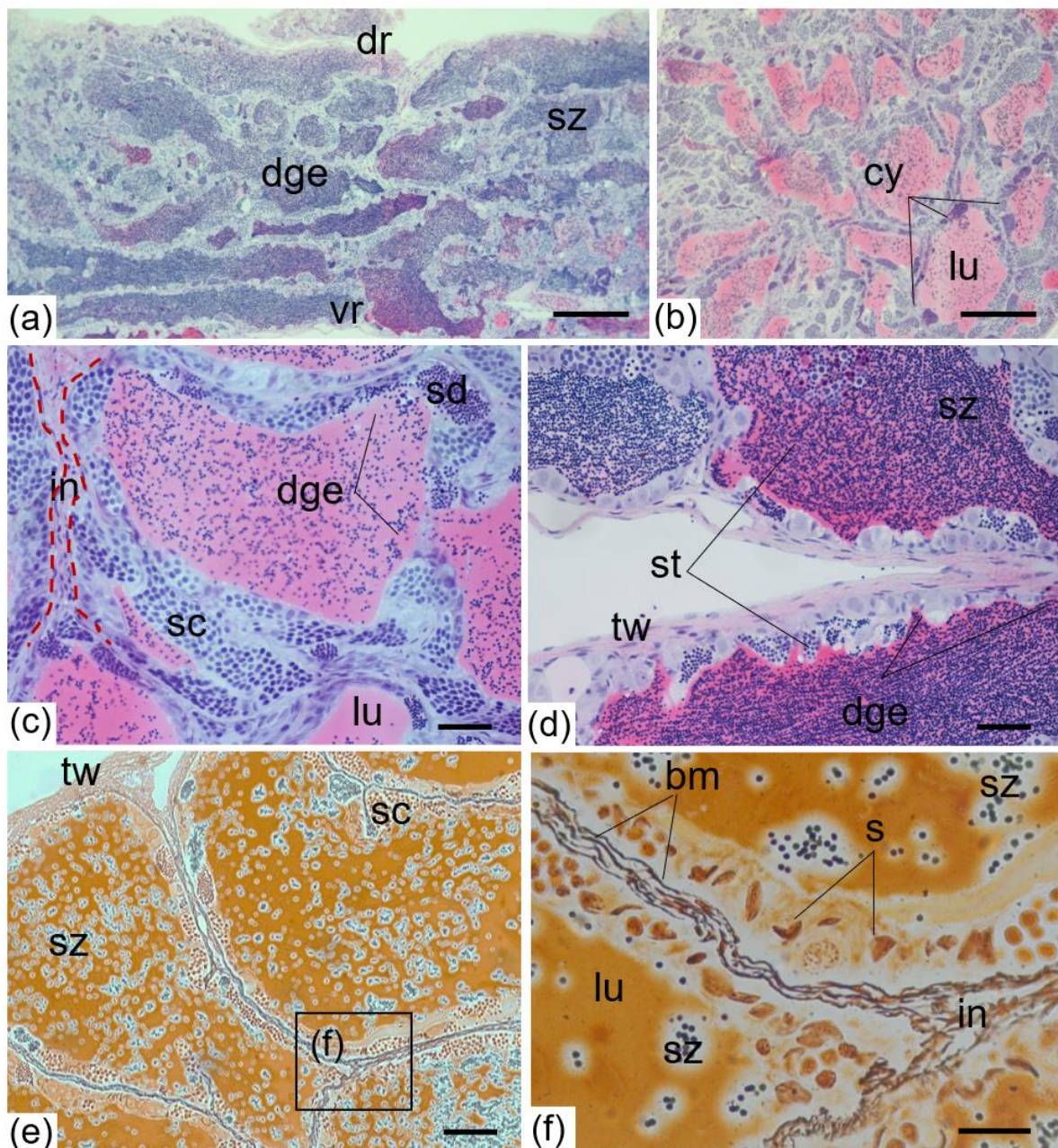
with testis in regenerating phase were also found, with very evident blood vessels and flaccidity in the testis wall (Figure 16E). Throughout the TGE, there is a predominance of DS, reduced and irregular contours of the lumen and rare residual spermatozoa (Figure 16E and F). The interstitial compartment is very evident and disorganized (Figure 16E and F).

Figure 14: Testes in primary males of *Brycon orbignyanus* - nine to ten months old. **A and D:** Presence of all cells of the spermatogenic lineage: undifferentiated spermatogonia (**us**), differentiated spermatogonia (**ds**), B - spermatogonia (**b**), spermatocytes (**sc**), spermatids (**st**) and sperm (**sz**) in the lumen (**lu**). **B:** beginning of cranial bipartition of the testis. **C:** melanocrophage centers (**mm**) near blood vessels (**bv**). **E:** cranial region of the testis bipartite in equally functional portions. **F:** testicular germinal epithelium supported by basement membrane (**bm**). **G:** central região of the gonad that starts the bipartition of the organ. **H:** Graphic representation of the caudal (**ca**), central (**ce**) and cranial (**cr**) region of the testes according to development and bipartition. **lt:** left testis. **pc:** pycnotic cell centers. **rt:** right testis. **st:** split testis. **Scale bar:** A, B and F = 20 μm ; C and D = 10 μm ; E = 50 μm ; G = 1 cm. **Stain:** haematoxylin and eosin; metanil yellow, ferric haematoxylin and periodic acid-Schiff and reticulin method.



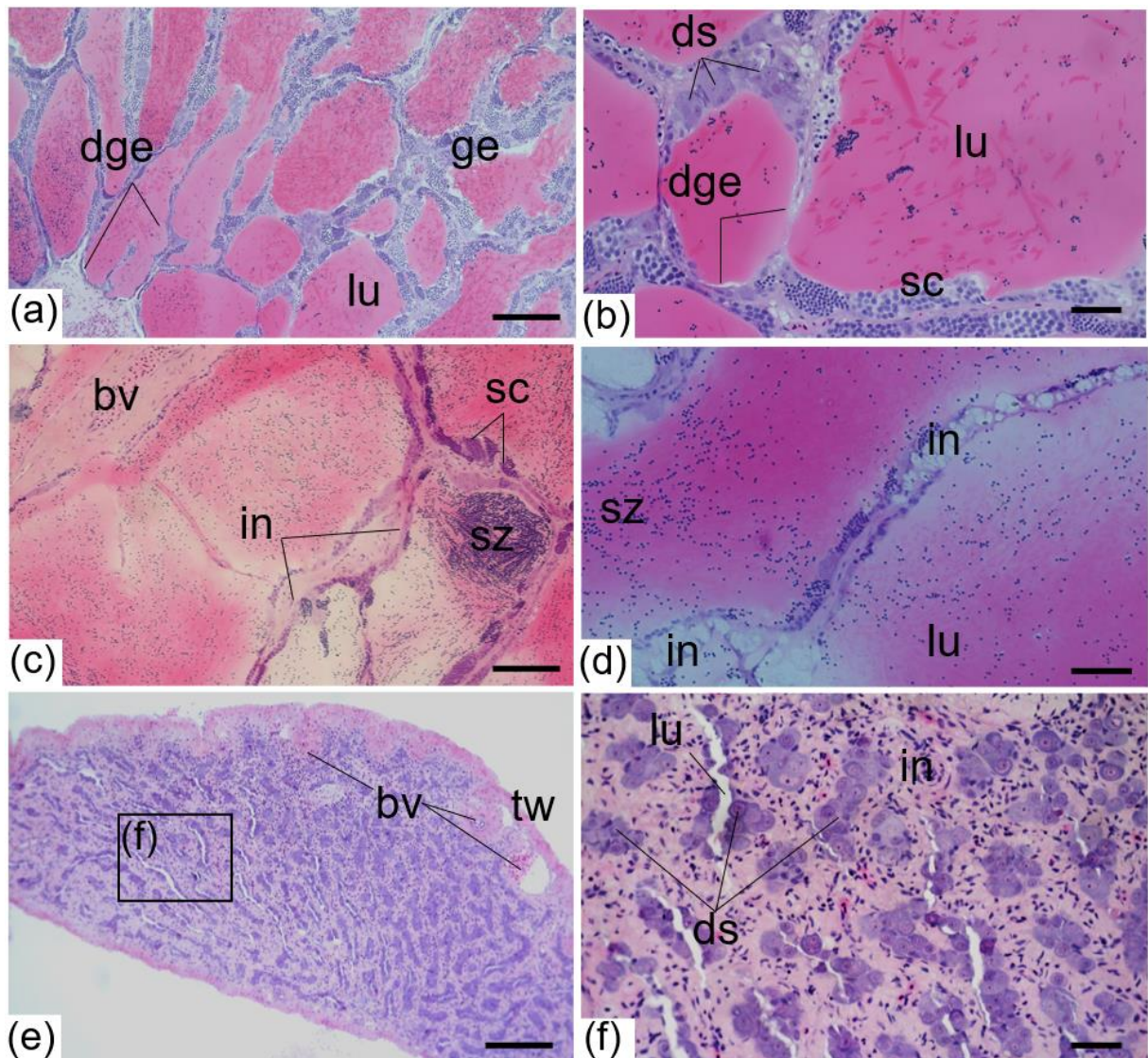
Fonte da imagem: QUIRINO *et al.*, 2021.

Figure 15: Testes of primary males in *Brycon orbignyanus* - eleven months to one year old. **A-C:** Spawning capable: discontinuous germinal epithelium (**dge**) with lumen (**lu**) full of sperm (**sz**). **D:** bipartition cranial region with testis wall (**tw**) involving the two equally functional regions. **E and F:** discontinuous germinal epithelium composed only of residual spermatocyte cysts (**sc**) and Sertoli cells (**s**), supported by the basement membrane (**bm**) and a lumen filled with sperm (**sz**). **cy:** cysts. **in:** interstitium. **st:** split testis. **Scale bar:** A and B = 100 μ m; C = 20 μ m; D = 10 μ m; E = 1 cm; F = 200 μ m. **Stain:** haematoxylin and eosin and reticulín method.



Fonte da imagem: QUIRINO *et al.*, 2021.

Figure 16: Testes of primary males in *Brycon orbignyanus* – two and three years old. **A and B:** Spawning capable phase: discontinuous germinal epithelium (**dge**), lumen (**lu**) with sperm (**sz**) and few residual cysts (**cy**) arranged in the epithelium. **C and D:** Regressing phase: interstitium (**in**) full of vacuoles indicating degradation, highly vascularized (**bv**), residual spermatocyte cysts (**sc**) and spermatozoa (**sz**). **E and F:** Regenerating phase: interstitium (**in**) very evident and vascularized (**bv**), germinal epithelium with proliferation of spermatogonia (**ds**) and very small or non-existent lumen (**lu**). **tw:** testis wall. **Scale bar:** **A and E:** 100 μ m; **B e F:** 20 μ m; **C e D:** 50 μ m. **Stain:** haematoxylin and eosin.



Fonte da imagem: QUIRINO *et al.*, 2021.

DISCUSSION

Sex differentiation in *Brycon orbignyanus* showed temporal characteristics that are species-specific, allowing the possibility of identifying ovaries and testes since the first indications of their development from undifferentiated gonads. This study demonstrates, for the first time, the existence of intersexes (secondary males) in populations of *B. orbignyanus* originating from the sex inversion of females.

Sex determination in fish is a highly complex process that depends on the interaction between genetic and environmental factors (DELVLIN; NAGAHAMA, 2002; FERNANDINO *et al.*, 2013). Due to this, the period of sex differentiation is considered crucial for these fish because these animals can develop a phenotypic sex distinct from the genotypic sex due to the stressful conditions to which the animals are subjected (FERNANDINO *et al.*, 2013). It is common that teleosts do not have differentiated sex chromosomes, so the genes responsible for sex determination are dispersed throughout the autosomal chromosomes (DELVLIN; NAGAHAMA, 2002), as is the case for the species described in the genus *Brycon* (MARGARIDO; GALERRI-JUNIOR, 1999; SILVA *et al.*, 2012). The fact that *B. orbignyanus* does not have specific sex chromosomes makes the species more susceptible to influences from exogenous cues related to sex differentiation events, including stressors linked to cultivation (FERNANDINO; HATTORI, 2019).

Piracanjuba (*B. orbignyanus*) has been described as a species with sex differentiation with direct gonochoristic development (ZARDO *et al.*, 2021), and both in aquaculture (BALDISSEROTTO; GOMES, 2005, ZARDO *et al.*, 2021) and in natural environments (VAZ; TORQUATO; BARBOSA, 2000), the sex ratio identified for the species was 1♀: 2♂. In this study, we corroborate that the final sex ratio in *B. orbignyanus* is 1♀: 2♂; however, we found that the sex ratio fluctuates over the period of sex differentiation due to the existence of secondary males within the population.

There is temporal variation in the period of sex differentiation between fish species; however, this temporal variation can also occur in different populations of the same species according to the cultivation conditions (FERNANDINO; HATTORI, 2019). In a study using fish farm animals, Zardo *et al.* (2021) analysed the first year of life of *B. orbignyanus* with monthly collections and only identified the first signs of sex differentiation at nine months of age, while in this study, at six months of age, all individuals in the population were differentiated. The studies differ in relation to fluctuations in water temperature and population density in which the fish were kept, which demonstrates that the distinctions in animal

management alter the labile period for sex differentiation during aquaculture. However, when not intentionally performed for aquaculture, sex reversal and the presence of intersex in gonochorist species is indeed worrying, as it promotes an imbalance between male:female sex ratios; for gonochorist species, it is natural for it to be 1:1, and variations may have harmful effects on the genetic variability of these species (PLA *et al.*, 2021).

Age is not the only factor to be considered to understand sex differentiation in *B. orbignyanus*, as the growth of animals is also a determining factor. As an example of Neotropical species, in muçum, *Synbranchus marmoratus*, sex differentiation occurs dynamically, initially with primary males and females, but in this species, there is sex inversion of all females, creating secondary males dependent on the length of the females (BARROS *et al.*, 2017). In cachara, *Pseudoplatystoma fasciatum*, the time of sex differentiation is more correlated with the length of males and females than the age of the specimens (VALENTIN *et al.*, 2016; VALENTIN *et al.*, 2019).

In addition to genetic factors, physiological disturbances may explain the presence of intersex or sex inversion in fish (BAROILLER; GUIGUEN; FOSTIER, 1999). In the wild population of *Astyanax fasciatus* exposed to environments contaminated with domestic effluents, the presence of adult males with oocytes dispersed throughout the germinal epithelium is very frequent, suggesting that oestrogen-contaminated water causes intersexes in this species (PRADO *et al.*, 2011). However, endocrine disruption in fish can be caused not only by human waste contained in the water but also by stress-causing factors that interfere with metabolic pathways (FERNANDINO *et al.*, 2013; GOIKOETXEA; TODD; GEMMELL, 2017). Fish cultivated in water recirculation systems, such as this study with *B. orbignyanus* are subjected to management stress that may be responsible for this sex inversion; however, this fact by itself does not seem to affect other Neotropical fish with aquaculture potential (BAHAMONDE; MUNKITTRICK; MARTYNIUK, 2013).

In species that have indirect gonochoristic development, the presence of an intersex period is common and even difficult to identify (TAKAHASHI, 1977; MAZZONI; GRIER; QUAGIO-GRASSIOTTO, 2015). For *Gymnocorymbus ternetzi*, black tetra, the identification of sexes as the sex differentiation of individuals begins can be made from the appearance of the basement membrane, a structure that establishes the germinal epithelium in true females and is absent in intersex individuals (MAZZONI; GRIER; QUAGIO-GRASSIOTTO, 2015). On the other hand, one of the main events during sex inversion in females of *S. marmoratus* that give rise to secondary males is the permanence of the basement membrane involving prophasic oocytes, whereas the male germinal epithelium is under development (MAZZONI *et al.*, 2018).

Although *S. marmoratus* is a sequential dyandric hermaphrodite (LO NOSTRO; GUERRERO, 1996) and *B. orbignyana* is considered a direct gonochorist (ZARDO *et al.*, 2021), both species present the same pattern of sex differentiation in females, primary males and secondary males, even in the characteristics of remodelling of the gonadal tissue during sexual inversion involving the basement membrane.

In conclusion, the sex differentiation of *B. orbignyana* bred in captivity with controlled water temperature shows a pattern of direct gonochorist species (early females and males), but some individuals undergo sex inversion, giving rise to intersex specimens and later to secondary males, establishing a sex ratio of 1♀: 2♂. The investigation of the sex differentiation of *B. orbignyana* in natural populations would allow for establishing whether the intersex is considered natural or is a reflection of stressors in captivity.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank AES Tiête for the animals involved in the present work; UNESP/FEIS and LINEO (Laboratory of Neotropical Ichthyology) for providing the physical structure.

REFERENCES

- BAHAMONDE, P. A.; MUNKITTRICK, K. R.; MARTYNIUK, C. J. Intersex in teleost fish: are we distinguishing endocrine disruption from natural phenomena? **General and Comparative Endocrinology**, v. 192, 25-35, 2013.
- BALDISSEROTTO. B.; GOMES, L. C. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: EditoraUFSM, 2005.
- BAROILLER, J. F.; GUIGUEN, Y.; FOSTIER, A. Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 55, n. 6-7, 910-931, 1999.
- BARROS, N. H. C.; DE SOUZA, A. A.; PEEBLES, E. B.; CHELLAPPA, S. Dynamics of sex reversal in the marbled swamp eel (*Synbranchus marmoratus* Bloch, 1795), a diandric hermaphrodite from Marechal Dutra Reservoir, northeastern Brazil. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 33, n. 3, 443-449, 2017.
- Cornélio, D.; Castro, J. P.; Santos, M. H.; Vicari, M. R.; Almeida, M. C.; Moreira-Filho, O.; Camacho, J. P. M.; Artoni, R. F. Hermaphroditism can compensate for the sex ratio in the *Astyanax scabripinnis* species complex (Teleostei: Characidae): expanding the B chromosome study model. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 27, 681-689, 2017.
- DE SÁ, M. F. P.; FRAGOSO-MOURA, E. N.; FENERICH-VERANI, N.; FERRO, D. A. M. Occurrence of intersexuality in “Lambaris”, *Astyanax scabripinnis* (Jenyns, 1842), small characids from the Brazilian Streams. **Brazilian Archives of Biology and Technology: Internacional Journal**, v. 51, n. 2, 315-322, 2008.
- DEVLIN, R. H.; NAGAHAMA, Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. **Aquaculture**, v. 208, 3-4, 191-364, 2002.
- FERNANDINO, J. I.; HATTORI, R. S. Sex determination in Neotropical fish: Implications ranging from aquaculture technology to ecological assessment. **General and Comparative Endocrinology**, v. 273, 172-183, 2019.
- FERNANDINO, J. I.; HATTORI, R. S.; ACOSTA, O. D. M.; STRUSSMANN, C. A.; SOMOZA, G. M. Environmental stress-induced testis differentiation: androgen as a by-product of cortisol inactivation. **General and Comparative Endocrinology**, v. 192, 36-44, 2013.
- GOIKOETXEA, A.; TODD, E. V.; GEMMELL, N. J. Stress and sex: does cortisol mediate sex change in fish? **Reproduction**, v. 154, n. 6, 149-160, 2017.
- HAMILTON, W. D. Extraordinary sex ratios. **Science**, v. 156, 477- 488, 1967.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2020). **Pesquisa da Pecuária**. <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/> Acesso em 15 de Novembro de 2021.

ICMBIO – Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (2018). **Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção**. Brasília, DF: ICMBio/MMA. 492 p. https://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/comunicacao/publicacoes/publicacoes-diversas/livro_vermelho_2018_vol1.pdf Acesso em 15 de Novembro de 2021.

JAKOBSEN, T.; FOGARTY, M. J.; MEGREY, B. A.; MOKNESS, E. **Fish Reproductive Biology: implications for Assessment and Management**. New Jersey: Wiley Blackwell, 2016.

KUWAMURA, T.; SUNOBE, T.; SAKAI, Y.; KADOTA, T.; SAWADA, K. Hermaphroditism in fishes: an annotated list of species, phylogeny, and mating system. **Ichthyological Research**, v. 67, 341-360, 2020.

LO NOSTRO, F. L.; GUERRERO, G. A. Presence of primary and secondary males in a population of the protogynous *Synbranchus marmoratus*. **Journal of Fish Biology**, v. 49, 788-800, 1996.

MARGARIDO, V. P.; GALETTI-JUNIOR, P. M. Heterocromatin patterns and karyotype relationships within and between the genera *Brycon* and *Salminus* (Pisces, Characidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 22, 1-3, 1999.

MAZZONI, T. S.; GRIER, H. J.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I. Germline cysts and the formation of the germinal epithelium during the female gonadal morphogenesis in *Cyprinus carpio* (Teleostei: Ostariophysi: Cypriniformes). **The Anatomical Record**, v. 293, n. 9, 1581-1606, 2010.

MAZZONI, T. S.; GRIER, H. J.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I. Establishment in the Juvenile Hermaphroditism during gonadal differentiation of the *Gymnocorymbus ternetzi* (Teleostei: Characiformes: Characidae). **The Anatomical Record**, v. 298, 1984-2010, 2015.

MAZZONI, T. S.; GRIER, H. J.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I. Male gonadal differentiation and the Paedomorphic evolution of the testis in Teleostei. **The Anatomical Record**, v. 291, 1137-1162, 2014.

MAZZONI, T. S.; LO NOSTRO, F. L.; ANTONELI, F. N.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I. Action of the metalloproteinases in gonadal remodeling during sex reversal in the sequential hermaphroditism of the teleostei fish *Synbranchus marmoratus* (Synbranchiformes: Synbranchidae). **Cells**, v. 7, n. 5, 2-26, 2018.

NAKAMURA, M.; KOBAYASHI, T.; CHANG, X.; NAGAHAMA, Y. Gonadal sex differentiation in teleost fish. **The Journal of Experimental Zoology**, v. 281, 362-372, 1998.

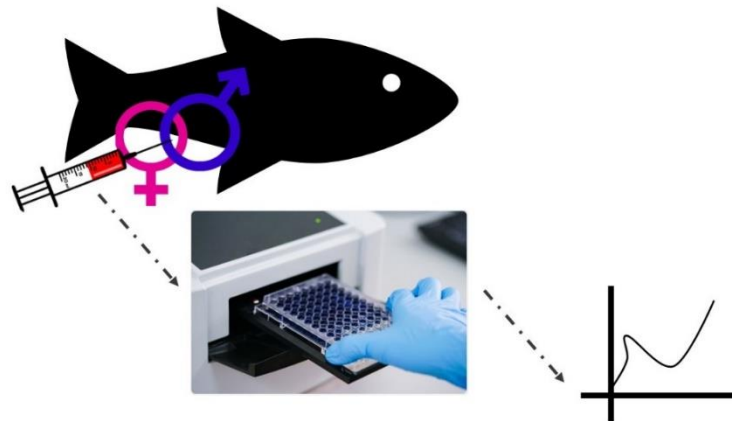
- ORTEGA-RECALDE, O.; DAY, R. C.; GEMMELL, N. J.; HORE, T. A. Zebrafish preserve global germline DNA methylation while sex-linked rDNA is amplified and demethylated during feminization. **Nature communications**, v. 10, n. 1, 1-10, 2019.
- OSPINA-ÁLVAREZ, N.; PIFERRER, F. Temperature-dependent sex determination in fish revisited: prevalence, a single sex ratio response pattern, and possible effects of climate change. **Plos One**, v. 3, n. 7, 1-11, 2008.
- PLA, S.; BENVENUTO, C.; CAPELLINI, I.; PIFERRER, F. Switches, stability and reversals: the evolutionary history of sexual systems in fish. **BioRxiv** <https://doi.org/10.1101/2021.01.25.428070>, 2021.
- PRADO, P. S.; SOUZA, C. C.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E. Reproductive disruption in lambari *Astyanax fasciatus* from a Southeastern Brazilian reservoir. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, 1879-1887, 2011.
- QUIRINO, P. P.; DELGADO, M. L. R.; GOMES-SILVA, L.; BENEVENTE, C. F.; GRIGOLI-OLIVIO, M. L.; BIANCHINI, B. C.; NINHAUS-SILVEIRA, A.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R. Female sex inversion as a reason for an unbalanced sex ratio in the neotropical species *Brycon orbignyanus*. **Aquaculture Research**, 1-21, 2021.
- SILVA, E. M.; WONG, M. S. L.; MARTINS, C.; WASKO, A. P. Screening and characterization of sex-specific DNA fragments in the freshwater fish matrinhã, *Brycon amazonicus* (Teleostei: Characiformes: Characidae). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 38, 1487–1496, 2012.
- TAKAHASHI, H. Juvenile hermaphroditism in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. **Hokkaido University**, v. 28, n. 2, 57-65, 1977.
- VALENTIN, F. N.; BATLOUNI, S. R.; NASCIMENTO, N. F.; SILVA, R. C.; MANZINI, B.; HILBIG, C. C.; PEREIRA-SANTOS, M.; NAKAGHI, L. S. Ovarian differentiation and development in cachara *Pseudoplatystoma fasciatum*. **Journal of Fish Biology**, v. 89, 445-466, 2016.
- VALENTIN, F.; NAKAGHI, L. S. O.; BATLOUNI, S. R.; NASCIMENTO, N.F.; PAES, M. C. F.; SILVA, R. C.; MANZINI, B.; CHAVARRO, S. Y. C.; ASSUNÇÃO, M. H. C. Testicular differentiation and development in South American catfish, surubim, *Pseudoplatystoma fasciatum*. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 35, n. 2, 529-540, 2019.
- VAZ, M. M.; TORQUATO, V. C.; BARBOSA, N. D. C. **Guia ilustrado de peixes da bacia do Rio Grande**. CEMIG/CETEC, 2000.
- VAZZOLER, A. E. A. M. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática**. Ed da UEM, 1996.

ZANIBONI-FILHO, E.; WEINGARTNER, M. Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 31, pp. 367-373, 2007.

ZARDO, E. L.; FORNARI, D. C.; GIORIA, J.; ROTILI, D. A.; GOMES, I. C.; ESQUIVEL-MUELBERT, J. R.; STREIT JR, D. P. Gonadal development period and sexual differentiation through histological analysis in *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1850) (Characiformes: Bryconidae). **Aquaculture**, v. 539, 1-8, 2021.

CAPÍTULO 3

Esteroides androgênicos são os agentes da inversão sexual em
Brycon orbignyanus?



Esteroides androgênicos são os agentes da inversão sexual em *Brycon orbignyanus*?

RESUMO

A piracanjuba, *Brycon orbignyanus*, é uma espécie neotropical gonocorista de grande interesse ecológico e comercial, que quando cultivada em cativeiro possui diferenciação sexual de fêmeas, machos primários e machos secundários que são originados a partir de fêmeas que passam por inversão sexual. Em razão disto, objetivou-se verificar o perfil plasmático dos andrógenos testosterona (T) e 11-cetotestosterona (11-KT) ao longo da diferenciação sexual em *B. orbignyanus* mantidas em cativeiros. Para isto, foram realizadas coletas mensais (n=15) de fevereiro a dezembro/2018, em espécimes de dois meses até que atingissem um ano de idade. Os espécimes foram eutanasiados e tiveram coletados 1ml de sangue, gônadas e fígado, que posteriormente tiveram massa total mensurada. As amostras sanguíneas foram centrifugadas a 1.006g/10min, o plasma retirado e submetido a quantificação de testosterona e 11-cetotestosterona pelo método Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay – ELISA. As gônadas foram submetidas a técnicas usuais de microscopia de luz. Dentre todos animais analisados, foram identificados espécimes indiferenciados, fêmeas em início de diferenciação, intersexos, machos em início de diferenciação e fêmeas com ovários funcionais (totalmente desenvolvidos), todos considerados Imaturos, além de machos com testículos funcionais considerados Aptos a Espermiar. Não foram encontradas diferenças estatísticas no perfil plasmático para T, enquanto que para 11-KT os machos aptos a espermiar e indivíduos intersexo apresentaram maior concentração plasmática do andrógeno em relação aos outros grupos analisados. Deste modo, a inversão sexual em fêmeas em *Brycon orbignyanus* é direcionada pela atuação do andrógeno 11-cetotestosterona.

Palavras-chave: 11-cetotestosterona. Bryconidae. Diferenciação sexual. Intersexo. Testosterona. Piracanjuba.

INTRODUÇÃO

Em peixes, a formação das gônadas é um complexo evento durante a organogênese e tem início nos primeiros sinais de migração de células germinativas primordiais que, associadas a células somáticas, formam um primórdio gonadal (DEVLIN; NAGAHAMA, 2002; GUIGUEN, FOSTIER; HERPIN, 2018). À medida que este primórdio gonadal desenvolve-se e passa a ser um órgão vascularizado, é então formada uma gônada indiferenciada bipotencial, pois dependendo dos estímulos hormonais que receber, durante a diferenciação sexual dará origem a um ovário ou testículo (BAROILLER; GUIGUEN, 2001; PANDIAN, 2013; WANG *et al.*, 2019).

Os peixes também surpreendem com a complexidade dos processos de diferenciação sexual ocorridas nas estratégias reprodutivas que apresentam, pois podem ser gonocoristas diretos, gonocoristas indiretos, hermafroditas simultâneos e hermafroditas sequenciais (BAROILLER; GUIGUEN; FOSTIER, 1999; KOBAYASHI; NAGAHAMA; NAKAMURA, 2013; NAGAHAMA *et al.*, 2021; KUWAMURA *et al.*, 2020). Dentre estes tipos de estratégias reprodutivas, os gonocoristas diretos são considerados os mais comuns, pois referem-se aos indivíduos que desde os primeiros instantes da diferenciação sexual possuem os sexos separados, sendo exclusivamente macho ou fêmea (DEVLIN; NAGAHAMA, 2002). Contudo, até mesmo em espécies gonocoristas o sexo pode ser invertido através de interferências genéticas ou ambientais, mesmo não fazendo parte do ciclo de vida natural daquela espécie (BAHAMONDE; MUNKITTRICK; MARTYNIUK, 2013; BAROILLER; D’COTTA, 2016).

Este é o caso, por exemplo, do surubim, *Steindachneridion parahybae* espécie ameaçada de extinção que, apesar de ser gonocorista, quando cultivada em cativeiro apresenta desenvolvimento de indivíduos intersexos, possivelmente devido ao estresse do manejo (HONJI *et al.*, 2016). Em medakas, *Oryzias latipes*, a masculinização de fêmeas na aquicultura é facilmente alcançada por meio da elevação temperatura da água enquanto a população está no período lábil da diferenciação sexual (HAYASHI *et al.*, 2010). Esta masculinização ocorre devido aos elevados níveis de cortisol alcançados com o estresse da alta temperatura, pois é um glucocorticoide precursor de andrógenos como testosterona e 11-cetotestosterona (GOIKOETXEA; TODD; GEMMELL, 2017).

Em meio as espécies de interesse comercial, a piracanjuba, *Brycon orbignyanus*, destaca-se por despertar o interesse na aquicultura devido ao crescimento exponencial nos primeiros anos vida, além do apreciado sabor da carne (BALDISSEROTTO; GOMES, 2005). Contudo, é também uma espécie que desperta preocupação ecológica, pois está catalogada, há

mais de 20 anos, com status de “Em Perigo” (A2c) no Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção (ICMBIO, 2018). Recentemente a piracanjuba foi descrita como uma espécie gonocorista (ZARDO *et al.*, 2021), que quando cultivada em cativeiro possui diferenciação sexual de fêmeas e machos primários, com parte da população de fêmeas passando por um período de inversão e remodelamento gonadal, dando origem indivíduos intersexos e posteriormente a machos secundários (QUIRINO *et al.*, 2021). Em razão do exposto acima, o objetivo deste estudo é analisar o perfil plasmático dos andrógenos testosterona e 11-cetotestosterona ao longo da diferenciação sexual em *Brycon orbignyanus*.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção dos animais

Os espécimes de *Brycon orbignyanus* utilizados neste trabalho foram obtidos por meio de reprodução induzida. Após a escolha dos reprodutores, foram utilizadas duas doses de extrato bruto hipofisário de carpa em fêmeas, sendo a primeira dosagem de 0,5 mg de hipófise/kg de peso vivo, e após um intervalo de sete horas, foi aplicada a segunda dosagem de 5mg de hipófise/kg de peso vivo, enquanto que em machos foi realizada apenas uma aplicação de 3mg de extrato de hipófise/kg de peso vivo. Após a extrusão, foi realizada a fertilização e o desenvolvimento embrionário ocorreu em incubadoras. Todo o processo de reprodução induzida foi conduzido nas dependências da Estação de Aquicultura da U.H.E. de Promissão – AES – Tietê, Promissão/SP em dezembro/2017.

Após atingirem um mês de idade foram transferidos para a Estufa de experimentação do Laboratório de Ictiologia Neotropical da Universidade Estadual Paulista, “Júlio de Mesquita Filho”, Ilha Solteira, SP (UNESP/FEIS), em tanques de recirculação de água de 4500L (n=600), diariamente alimentados com ração comercial (composição: umidade 120 g/kg; proteína bruta 320 g/kg; extrato etéreo 60 g/kg; fibras 55 g/kg; suplemento mineral 120 g/kg) e permanentemente mantidos a temperatura controlada de $27 \pm 0,5$ °C, com pH $6,5 \pm 0,6$, amônia $0,25 \pm 0,10$ ppm e fotoperíodo natural. Todos os procedimentos para manutenção, cuidados diários, manuseio e eutanásia dos animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UNESP (12/2017 – CEUA/FEIS) e SISGEN A069C6E.

Biometria e coleta biológica

Foram realizadas coletas mensais (n=15) de fevereiro a dezembro/2018, dos dois meses até que os animais atingissem um ano de idade. Os espécimes foram anestesiados com solução de benzocaína com concentração de 0,001% até que atingissem um estado de anestesia leve. Conforme era observada a perda de equilíbrio do espécime, era coletado cerca de 1 ml de sangue, por punção da artéria caudal, com seringas de 1 ml previamente heparinizadas (Hepamax-S® - 5.000 U.I/mL). Cada amostra foi identificada e transferida para tubos de ensaio de coleta sanguínea, preparados com EDTA e acondicionados resfriados por cerca de 1h a 7 °C. Após estes procedimentos, todas as amostras foram centrifugadas a 1.006g/10min (CentrífugaQuimis®). Finalizada a centrifugação, houve a retirada da porção plasmática do sangue com pipetas automáticas e fracionadas em criotubos de 1 mL e armazenadas em Biofreezer (So-low® Premier) a -80°C no Departamento de Biologia e Zootecnia, Campus da UNESP/FEIS.

Após a coleta sanguínea os espécimes foram eutanasiados e mensurados (massa corpórea e comprimento total) em solução de benzocaína com concentração de 0,01%. Posteriormente a coleta sanguínea os indivíduos foram eutanasiados em solução de benzocaína com concentração de 0,01% e mensurados o comprimento total, comprimento padrão e massa corpórea. Após a biometria, foi realizada uma incisão ventral para retirada de gônadas e fígado que imediatamente tiveram massa aferida. As gônadas foram fixadas em solução de glutaraldeído 2%, paraformaldeído 4% e tampão fosfato de Sorensen pH 7.2 imediatamente após a remoção. Foram fragmentadas, incluídas em historesina Leica® e seccionadas em 3µm de espessura por meio de micrótomo semi-automático Leica® RM 2244. As lâminas histológicas foram coradas com Hematoxilina/Eosina. As fases do ciclo reprodutivo foram classificadas de acordo com Brown-Peterson *et al.*, 2011.

Para determinação do índice gonadossomático (IGS) foi utilizada a fórmula: $IGS = (\text{massa das gônadas}/\text{massa corpórea}) \times 100$, enquanto que para índice hepatossomático (IHS) foi utilizada a fórmula $IHS = (\text{massa do fígado}/\text{massa corpórea}) \times 100$, conforme estabelecido por Vazzoler, 1996.

Os grupos amostrais submetidos as análises de esteroides (imunoensaios), foram selecionados previamente, com base nas características gonadais e seguindo a cronologia da diferenciação sexual para *Brycon orbignyanus* proposta por Quirino *et al.* (2021).

Análise de esteroides: níveis plasmáticos de Testosterona e 11-cetotestosterona

Os andrógenos testosterona (T) e 11 cetotestosterona (11KT) foram quantificados no plasma pelo método de (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay – ELISA), com o uso de kits comerciais de acordo com as especificações técnicas do fabricante (Cayman Chemical Company, Michigan, USA). O limite de detecção do teste é de 100 pg/ml.

Devido ao limite de detecção imposto pelo teste, as amostras foram testadas para acerto da diluição, e como as concentrações ficaram acima da curva padrão foi necessária a diluição na relação de 1:3, utilizando-se como diluidor o tampão EIA buffer (Cayman Chemical®).

Todas as amostras foram dosadas em duplicata de acordo com instruções do fabricante. A absorbância foi medida utilizando um leitor de microplacas (Spectra Max 250 Molecular Devices) em 420 e 415 nm, para T e 11KT, respectivamente. Todos os processamentos do imuno-ensaio e posterior análises foram realizadas no Laboratório de Metabolismo e Reprodução de Organismos Aquáticos, Instituto de Biociências, USP – São Paulo.

Análise estatística

Todos os dados foram previamente submetidos ao teste de homogeneidade de Bartlett e teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Por não apresentarem uma distribuição normal, as médias entre todos os grupos foram comparadas utilizando Kruskal-Wallis *test* seguido de Student-Newman-Keuls *post-hoc test* para análises multivariadas, a nível de significância $p \leq 0.05$. Todos os testes foram realizados com o software livre BioEstat 5.3. Todos os dados foram expressos como média \pm desvio padrão.

RESULTADOS

Histologia, IGS e IHS

Foram selecionados seis grupos principais ao longo da diferenciação sexual em *Brycon orbignyanus*, de acordo com as características das gônadas, sendo: espécimes indiferenciados (3 meses de idade) (Fig. 1A), fêmeas em início de diferenciação sexual (3-4 meses de idade) (Fig. 1B), machos em início de diferenciação sexual (5-6 meses de idade) (Fig. 1C), intersexos

(8-9 meses de idade) (Fig. 1D), fêmeas com ovários funcionais (11-12 meses de idade) (Fig. 1E) e machos com testículos funcionais (11-12 meses de idade) (Fig. 1F). Com exceção de machos com testículos funcionais, que foram considerados adultos, sexualmente ativos e na fase de Aptos a Espermiar, em todos os grupos os indivíduos são Imaturos.

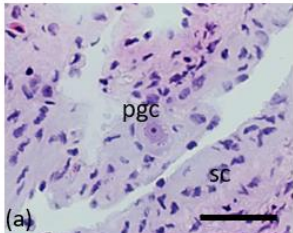
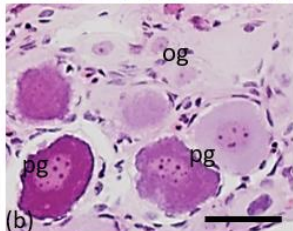
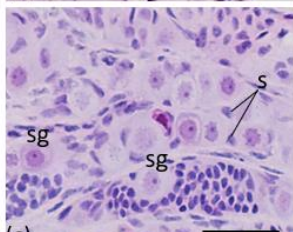
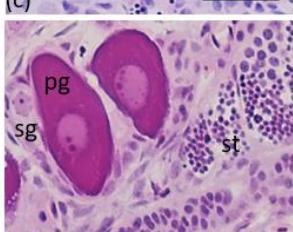
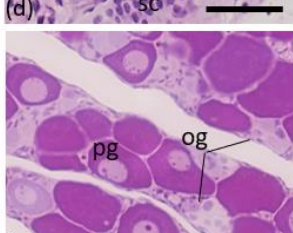
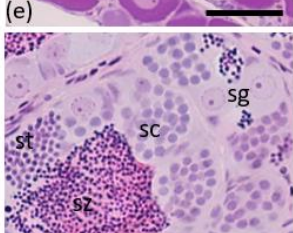
Dentre os grupos analisados o maior valor de IGS foi encontrado nos machos com um ano de idade, seguido das fêmeas com um ano e por fim espécimes indiferenciados, fêmeas iniciais e machos iniciais não diferem estatisticamente entre si (Fig. 1). Não há diferença significativa entre o IHS dos grupos selecionados (Fig. 1).

Níveis plasmáticos de Testosterona (T) e 11-Cetotestosterona (11KT)

Embora exista uma diferença numérica nos níveis plasmáticos de T entre todos os grupos analisados, não há diferença estatística significativa entre eles ($p = 0.07$), embora os machos em início de diferenciação possuem um pico de T de 108.1 ± 19.4 pg/mL, que decai em machos com testículos funcionais 72.7 ± 24.5 pg/mL, e é menor em fêmeas com ovários funcionais 57.9 ± 15.1 pg/mL, fêmeas iniciais 50.9 ± 31.6 pg/mL, intersexos 47.6 ± 22.4 pg/mL e, por fim, indivíduos com gônadas indiferenciadas 38.9 ± 26.9 pg/mL,

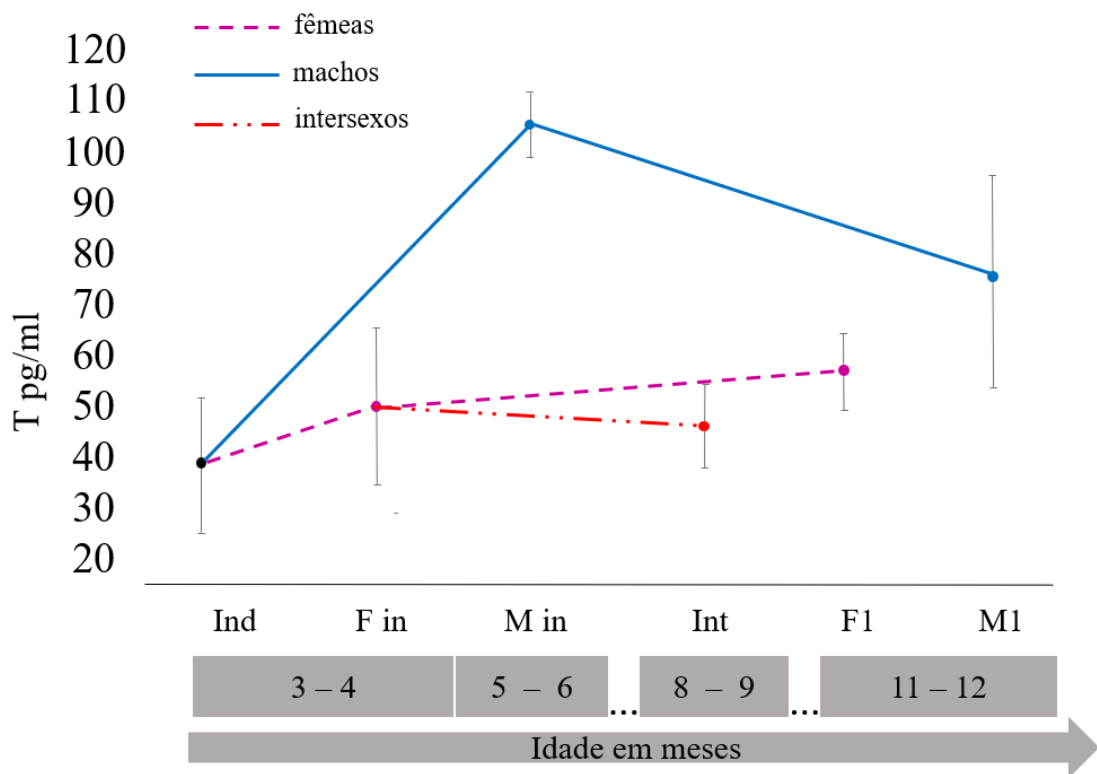
No entanto, entre os níveis plasmáticos de 11KT, observamos que machos com testículos funcionais, que estão Aptos a Espermiar, apresentam a maior concentração plasmática de 11KT entre todos os grupos quantificados (75.3 ± 36^a pg/mL), porém, não diferem de indivíduos intersexos (25.3 ± 5.3^{ab} pg/mL) que estão Imaturos. Por outro lado, os níveis plasmáticos de 11 KT em espécimes intersexos assemelham-se aos níveis quantificados em machos em início de diferenciação (12.5 ± 4.7^b pg/mL) e fêmeas funcionais (11.3 ± 7.8^b pg/mL), que diferem significativamente de indivíduos indiferenciados (10.1 ± 3.9^c pg/mL) e fêmeas em início de diferenciação (4.42 ± 0.4^c), embora todos estes últimos grupos estejam imaturos ($p = 0.001$) (Fig.3).

Figura 1: Gônadas de *Brycon orbignyana* durante os principais eventos da diferenciação sexual. **A:** Gônada indiferenciada. **B:** Ovário em início de diferenciação sexual. **C:** Testículo em início de diferenciação sexual. **D:** Gônadas intersexo. **E:** Ovários funcionais. **F:** Testículos funcionais. **og:** oogônia. **pg:** oócito em crescimento primário. **pgc:** célula germinativa primordial. **s:** célula de sertoli. **sc:** célula somática. **sc:** espermátocitos. **sd:** espermátides. **sg:** espermatogônia. **sz:** espermatozoides. **Coloração:** Hematoxilina/Eosina. **Barras de escala:** 50 μ m.

Morfologia e desenvolvimento das gônadas	IGS	IHS
 <p>(a) Gônadas formadas por células somáticas e células germinativas primordiais individualizadas, além de vasos sanguíneos dispersos pelo tecido: Imaturos.</p>	0.007 ± 0.003^c	1.26 ± 0.28
 <p>(b) Ovários em início de organização, sendo encontrados cistos de oogônias, oócitos profásicos e presença de oócitos em crescimento primário. Não há organização de estroma e nem de lamelas: Imaturos.</p>	0.005 ± 0.003^c	1.45 ± 0.31
 <p>(c) Testículos em início de organização, formado por cordões de espermatogônias em meio a células somáticas. Raros cistos de espermátocitos podem ser observados dispersos em meio aos cordões. Não há organização do interstício e epitélio germinativo: Imaturos.</p>	0.004 ± 0.003^c	1.65 ± 0.39
 <p>(d) Gônadas intersexo, formadas por um tecido repleto de oócitos atresicos ou oócitos em crescimento primário remanescentes, em meio a cistos de espermatogônias, espermátocitos, espermátides: Imaturos.</p>	0.005 ± 0.002^c	1.00 ± 0.19
 <p>(e) Ovários estroma e epitélio germinativo estabelecido: lamelas muito desenvolvidas, repletas de cistos de oogônias, oócitos profásicos e oócitos em crescimento primário: Imaturos.</p>	0.04 ± 0.01^b	1.09 ± 0.06
 <p>(f) Testículos com interstício e epitélio germinativo estabelecido: presença todas as células da linhagem germinativa masculina, com uma certa predominância de cistos de espermátocitos e espermatozoides na luz: Aptos a espermiar.</p>	0.16 ± 0.2^a	1.08 ± 0.09

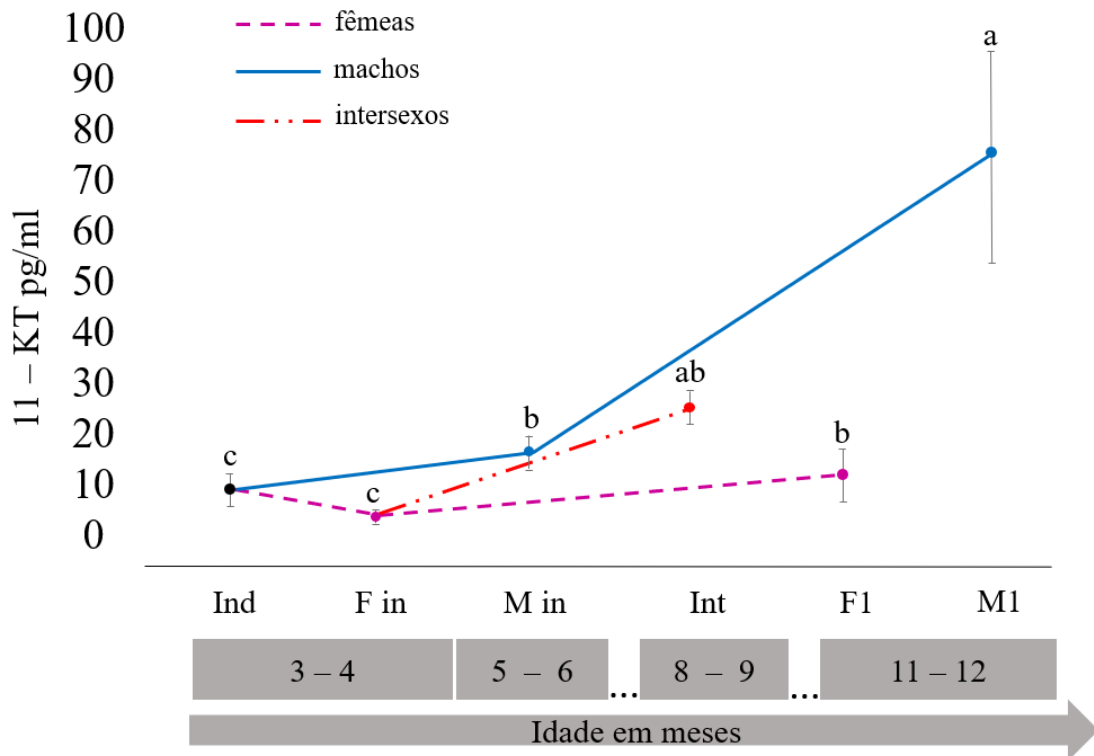
Fonte da imagem: própria autora.

Figura 2: Perfil plasmático de testosterona (T) em *B. orbignyana*. **Eixo X:** Grupos analisados. **Eixo Y:** Concentração do andrógeno T dado em pg/ml. Estatística: Kruskal-Wallis ($p = 0.07$). Espécimes indiferenciados (**Ind**). Fêmeas em início de diferenciação sexual (**F in**). Machos em início de diferenciação sexual (**M in**). Intersexos (**Int**). Fêmeas com ovários funcionais (**F1**). Machos com testículos funcionais (**M1**).



Fonte da imagem: própria autora.

Figura 3: Perfil plasmático de 11 - cetotestosterona (11KT) em *B. orbignyana*. **Eixo X:** Grupos analisados. **Eixo Y:** Concentração do andrógeno 11KT dado em pg/ml. Estatística: Kruskal-Wallis, seguido de Student-Newman-Keuls *post-hoc test* ($p = 0.001$). **Letras minúsculas:** representam diferenças estatísticas entre os grupos. Espécimes indiferenciados (**Ind**). Fêmeas em início de diferenciação sexual (**F in**). Machos em início de diferenciação sexual (**M in**). Intersexos (**Int**). Fêmeas com ovários funcionais (**F1**). Machos com testículos funcionais (**M1**).



Fonte da imagem: própria autora.

DISCUSSÃO

Ao longo da ontogênese gonadal em *B. orbignyana* exemplares indiferenciados passam por diferenciação sexual no qual as fêmeas se diferenciam primeiro que os machos (machos primários), entretanto uma parcela das fêmeas passa inversão sexual originando indivíduos intersexos que posteriormente tornam-se machos secundários (QUIRINO *et al.*, 2021). *Brycon orbignyana* é uma espécie conhecida por atingir a maturidade sexual tardiamente e apresentar proporção sexual incomum para peixes gonocoristas 1♀: 2♂ (ZARDO *et al.*, 2021; QUIRINO *et al.*, 2021), em função disso, entender a dinâmica dos processos morfofisiológicos envolvidos no primeiro ano de vida de *B. orbignyana* é fundamental para o futuro desenvolvimento de pacote biotecnológico para aperfeiçoamento da reprodução desta espécie em cativeiro.

O IGS tem sido amplamente utilizado para avaliação dos estágios reprodutivos dos peixes (VAZZOLER, 1996; CARDOSO *et al.*, 2013; CHAGAS; NINHAUS-SILVEIRA; VERÍSSIMO-SILVEIRA, 2018). Porém, por mais que apresente resultados satisfatórios indicando os períodos reprodutivos dos animais, é natural que ocorra uma faixa de sobreposição entre valores devido as fases do ciclo reprodutivo dos animais (SIQUEIRA-SILVA *et al.*, 2013; DOS SANTOS SILVA *et al.*, 2016). Normalmente esses valores de IGS que se sobrepõem estão em fases que se assemelham morfológicamente, como é o caso em *Astyanax bimaculatus* e *A. rivularis* quando os animais estão imaturos ou em Regeneração, mas diferem progressivamente quando os espécimes estão Aptos a Desovar ou Espermiar (CORDEIRO *et al.* 2020; QUIRINO *et al.*, 2021). Nos grupos analisados neste trabalho, somente foram encontradas diferenças significativas em machos Aptos a Espermiar, espécimes que já estavam aptos a reproduzir no primeiro ano de vida. Tais resultados indicam que as alterações morfológicas ocorridas durante a diferenciação sexual em *B. orbignyana*, inclusive a presença de indivíduos intersexo, não podem ser avaliadas somente por este índice.

A maturação das gônadas em função da reprodução demanda utilização de reservas energéticas contidas no fígado, devido a incorporação de vitelo ocorrida nos oócitos durante a fase de Desenvolvimento (QUEROL; QUEROL; GOMES, 2002). Em função disso, espera-se que o IHS, quando associado ao IGS, seja um índice que ajude a esclarecer a dinâmica do ciclo reprodutivo (AGOSTINHO *et al.*, 1990). Observamos que as alterações morfológicas associadas aos espécimes de *B. orbignyana* utilizados neste estudo não refletem modificações no IHS no período de diferenciação sexual, inversão ou maturação nos machos e possivelmente somente serão observadas em fêmeas mais desenvolvidas.

Por outro lado, as alterações morfológicas que desencadeiam a diferenciação sexual em peixes são diretamente dependentes do equilíbrio entre hormônios esteroides, principalmente testosterona, 11-cetotestosterona e estradiol (E2) (DEVLIN; NAGAHAMA, 2002; ROUGEOT *et al.*, 2007; HONJI; ARAÚJO; MOREIRA, 2020). Normalmente o predomínio de 11KT em animais indiferenciados promove a diferenciação masculina, enquanto o excesso de E2 promove justamente o oposto, a diferenciação sexual feminina (DEVLIN; NAGAHAMA, 2002; FERNANDINO; HATTORI, 2019). Os espécimes intersexos de *B. orbignyanus*, por estarem passando por uma transição ovário-testículo, apresentam níveis plasmáticos de 11KT similares aos machos primários em início de diferenciação sexual, enquanto que ambos (machos primários e intersexos) diferem das fêmeas em início de diferenciação sexual, indicando que possivelmente a elevação nos níveis plasmáticos deste andrógeno promove a inversão sexual nesta parcela de indivíduos.

Resultados similares a este são observados em Synbranchiformes, em fêmeas de *S. marmoratus*, pois os níveis plasmáticos de 11-KT aumentam progressivamente desde os primeiros indícios de remodelamento gonadal e permanecem em crescimento à medida que o processo finaliza e dá origem a machos secundários ativos (MAZZONI *et al.*, 2018). Esta é uma característica fisiológica de hermafroditas protogínicos, pois é normal que durante todo o processo de inversão de ovário-testículo os níveis de 17 β -estradiol (E2) sejam reduzidos, e a inversão é impulsionada por um pico de 11KT (FRISCH, 2004; GODWIN, 2010; CASAS; SABORIDO-REY, 2021). Em contrapartida, em *S. marmoratus*, durante o período de reversão e remodelamento gonadal, os níveis plasmáticos de T diferem entre as fêmeas (1.04 ± 0.16 ng/mL) e os animais intersexo que estão em transição (2.44 ± 0.30 ng/mL), mas os níveis diminuem significativamente quando o processo de inversão sexual é finalizado nestes animais (aproximadamente 1 ng/mL) (MAZZONI *et al.*, 2018). No Characiforme *B. orbignyanus* apesar de não haver diferenças significativas nos níveis plasmáticos de T, é possível notar uma diferença numérica entre os níveis em fêmeas, machos e intersexo, fato que possivelmente indique que alterações mínimas nos níveis plasmáticos de T são suficientes para promover respostas fisiológicas.

De modo geral, a atuação dos hormônios esteroides em peixes é fundamental para a reprodução, desde o início de desenvolvimento das gônadas até a concretização da reprodução em si (ALMEIDA, 2013; HONJI; MOREIRA, 2017). Nos machos, nas fases iniciais de desenvolvimento e início de espermatogênese a testosterona é o principal andrógeno produzido, porém próximo a maturação final das células germinativas, 11KT torna-se o andrógeno atuante em maiores níveis plasmáticos, responsável pela finalização da espermiogênese (SCOTT, 1987;

SCHULZ *et al.*, 2010). Embora não tenhamos encontrado diferenças estatísticas nos níveis de T nos grupos testados, observamos que 11KT tem um pico em machos que estão aptos a espermiar, que foram classificados assim pela grande disponibilidade de espermatozoides na luz, de acordo com Brown-Peterson *et al.* (2011). Contudo, os níveis plasmáticos de ambos os andrógenos quantificados para *B. orbignyana* neste estudo diferem em grandezas consideráveis do que foi observado para juvenis da mesma espécie por Rotili *et al.* (2022).

Por fim, concluímos que a inversão sexual que ocorre em fêmeas de *B. orbignyana* e origina indivíduos intersexos e, posteriormente, machos secundários, é direcionada pela atuação do andrógeno 11-cetotestosterona.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOSTINHO, A. A.; BARBIERI, G.; VERANI, J. R.; HAHN, N. S. Variação do fator de condição e do índice hepatossomático e suas relações com o ciclo reprodutivo em *Rhinelepis aspera* (Agassiz, 1829) (Osteichthyes, Loricariidae) no rio Paranapanema, Porecatu, PR. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.42, n.9, p.711-714, 1990.
- ALMEIDA, F. L. Endocrinologia aplicada na reprodução de peixes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 37, n. 2, 174-180, 2013.
- BAHAMONDE, P. A.; MUNKITTRICK, K. R.; MARTYNIUK, C. J. Intersex in teleost fish: are we distinguishing endocrine disruption from natural phenomena? **General and comparative endocrinology**, v. 192, 25-35, 2013.
- BAHAMONDE, P. A.; MUNKITTRICK, K. R.; MARTYNIUK, C. J. Intersex in teleost fish: are we distinguishing endocrine disruption from natural phenomena? **General and comparative endocrinology**, v. 192, 25-35, 2013.
- BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: EditoraUFSM, 2005, 468 p.
- BAROILLER, J. F.; D’COTTA, H. The Reversible Sex of Gonochoristic Fish: Insights and Consequences. **Sexual development**, v. 10, n. 2, 242-266, 2016.
- BAROILLER, J. F.; GUIGUEN, Y. Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in gonochoristic fish. **Genes and mechanisms in vertebrate sex determination**, v. 91, p. 177-201, 2001.
- BAROILLER, J. F.; GUIGUEN, Y.; FOSTIER, A. Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 55, n. 6-7, 910-931, 1999.
- BROWN-PETERSON, N. J.; WYANSKI, D. M.; SABORIDO-REY, F.; MACEWICZ, B. J.; LOWERRE-BARBIERI, S. K. A standardized terminology for describing reproductive development in fishes. **Marine and Coastal Fisheries**, v. 3, n. 1, 52-70, 2011.
- CARDOSO, A. R.; TAVARES, R. A.; POUHEY, J. L. O. F.; PIEDRAS, S. R. N. Crescimento alométrico em período pré-reprodutivo da viola *Loricariichthys anus* (Loricariidae) na Lagoa Mangueira, RS. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 37, n. 3, 298-300, 2013.
- CASAS, L.; SABORIDO-REY, F. Environmental Cues and Mechanisms Underpinning Sex Change in Fish. **Sexual Development**, p. 1-14, 2021.
- CHAGAS, J. M. A.; NINHAUS-SILVEIRA, A.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R. Ciclo testicular de *Devario aequipinnatus* (Teleostei, Cyprinidae): Um potencial modelo biológico em experimentação animal. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 42, n. 4, 765-779, 2018.

- CORDEIRO, J. G.; RODRIGUES, J.; DA SILVA RODRIGUES, M.; BERTOLINI, R. M.; NÓBREGA, R. H.; YASUI, G. S.; MAXIMINO, C.; DE SIQUEIRA-SILVA, D. H. Reproductive cycle of the tetra *Astyanax bimaculatus* (Characiformes: Characidae) collected in Amazonian streams. **Zygote**, v. 28, n. 1, 37-44.
- DEVLIN, R. H.; NAGAHAMA, Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. **Aquaculture**, v. 208, n. 3-4, p. 191-364, 2002.
- DOS SANTOS-SILVA, A. P.; SIQUEIRA-SILVA, D. H.; NINHAUS-SILVEIRA, A.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R. Oogenesis in *Laetacara araguaiae* (Ottoni and Costa, 2009) (Labriformes:Cichlidae). **Zygote**, v. 24, n. 4, 502-510, 2016.
- FERNANDINO, J. I.; HATTORI, R. S. Sex determination in Neotropical fish: Implications ranging from aquaculture technology to ecological assessment. **General and comparative endocrinology**, v. 273, p. 172-183, 2019.
- FRISCH, A. Sex-change and gonadal steroids in sequentially-hermaphroditic teleost fish. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 14, n. 4, 484 - 499, 2004.
- GODWIN, J. Neuroendocrinology of sexual plasticity in teleost fishes. **Frontiers in neuroendocrinology**, v. 31, n. 2, 203-216, 2010.
- GOIKOETXEA, A.; TODD, E. V.; GEMMELL, N. J. Stress and sex: does cortisol mediate sex change in fish. **Reproduction**, v. 154, 149-160, 2017.
- GUIGUEN, Y.; FOSTIER, A.; HERPIN, A. Sex determination and differentiation in fish: genetic, genomic and Endocrine aspects. *In*: WANG, H.P.; PIFERRER, F.; CHEN, S.L.; SHEN, Z. G. **Sex control in Aquaculture**. West Sussex: Wiley, 2019. 875 p.
- HAYASHI, Y.; KOBIRA, H.; YAMAGUCHI, T.; SHIRAISHI, E.; YAZAMA, T.; HIRAI, T.; KAMEI, Y.; KITANO, T. High temperature causes masculinization of genetically female medaka by elevation of cortisol. **Molecular Reproduction and Development**, v. 77, 679-686, 2010.
- HONJI, R. M.; ARAÚJO, B. C.; MOREIRA, R. G. Fisiologia reprodutiva aplicada ao cultivo de peixes neotropicais. **Ciência animal**, v. 30, n. 4, 123-137, 2020.
- HONJI, R. M.; CANEPPELE, D.; PANDOLFI, M.; NOSTRO, F. L. L.; MOREIRA, R. G. A case of intersex occurrence in *Steindachneridion parahybae* (Steindachner, 1877) (Siluriformes: Pimelodidae) under captivity condition: a cytogenetic and morphological study. **Neotropical Ichthyology**, v. 14, 2016.
- HONJI, R. M.; MOREIRA, R. G. Controle neuroendócrino da ovogênese em peixes teleósteos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 41, n. 1, p. 86-93, 2017.

INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE – ICMBIO. Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Volume VI - Peixes. In: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, org. **Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção**. 1a ed. Brasília: ICMBio, 2018.

KOBAYASHI, Y.; NAGAHAMA, Y.; NAKAMURA, M. Diversity and plasticity of sex determination and differentiation in fishes. **Sexual Development**, v. 7, n. 3, 115-125, 2013.

KUWAMURA, T.; SUNOBE, T.; SAKAI, Y.; KADOTA, T.; SAWADA, K. Hermaphroditism in fishes: an annotated list of species, phylogeny, and mating system. **Ichthyological Research**, v. 67, 341-360, 2020.

MAZZONI, T. S.; LO NOSTRO, F. L.; ANTONELI, F. N.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I. Action of the metalloproteinases in gonadal remodeling during sex reversal in the sequential hermaphroditism of the teleostei fish *Synbranchus marmoratus* (Synbranchiformes: Synbranchidae). **Cells**, v. 7, n. 5, 2-26, 2018.

NAGAHAMA, Y.; CHAKRABORTY, T.; PAUL-PRASANTH, B.; OHTA, K.; NAKAMURA, M. Sex determination, gonadal sex differentiation, and plasticity in vertebrate species. **Physiological Reviews**, v. 101, n. 3, 1237-1308, 2021.

PANDIAN, T. J. **Endocrine sex differentiation in fish**. CRC Press, 2013.

QUEROL, M. V. M.; QUEROL, E.; GOMES, N. N. A. Fator de condição gonadal, índice hepatossomático e recrutamento como indicadores do período de reprodução de *Loricariichthys platymetopon* (Osteichthyes, Loricariidae), bacia do rio Uruguai médio, sul do Brasil. **Iheringia. Série Zoologia**, v. 92, 79-84, 2002.

QUIRINO, P. P.; DE SIQUEIRA-SILVA, D. H.; DA SILVA RODRIGUES, M.; DOS SANTOS-SILVA, A. P.; DELGADO, M. L. R.; SENHORINI, J. A.; NINHAUS-SILVEIRA, A.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R. Gonadal morphology and difference in reproductive development of two isolated populations of *Astyanax rivularis* (Teleostei, Characidae). **Journal of Fish Biology**, v. 99, n. 5, 1719-1728, 2021.

QUIRINO, P. P.; DELGADO, M. L. R.; GOMES-SILVA, L.; BENEVENTE, C. F.; GRIGOLI-OLIVIO, M. L.; BIANCHINI, B. C.; NINHAUS-SILVEIRA, A.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R. Female sex inversion as a reason for an unbalanced sex ratio in the neotropical species *Brycon orbignyanus*. **Aquaculture Research**, 1-21, 2021.

ROTILI, D. A.; FORNARI, D. C.; ZARDO, E. L.; ESQUIVEL-MUELBERT, J. R.; BERNARDI, M.; SIQUEIRA-SILVA, D. H.; STREIT JR, D. P. Sex steroid levels in females and males of *Brycon orbignyanus* throughout different juvenile and adult ages and during induction hormone in the mature females. **Aquaculture**, v. 548, 2022.

ROUGEOT, C.; KRIM, A.; MANDIKI, S. N.; KESTEMONT, P.; MÉLARD, C. Sex steroid dynamics during embryogenesis and sexual differentiation in Eurasian perch, *Perca fluviatilis*. **Theriogenology**, v. 67, n. 5, 1046-1052, 2007.

SCHULZ, R. W.; DE FRANÇA, L. R.; LAREYRE, J. J.; LEGAC, F.; CHIARINI-GARCIA, H.; NOBREGA, R. H.; MIURA, T. Spermatogenesis in fish. **General and Comparative Endocrinology**, v.165, n. 3, 390-411, 2010.

SCOTT, A. P. Reproductive endocrinology of fish. In: **Fundamentals of comparative vertebrate endocrinology**. Boston, MA: Springer, 1987. p. 223-256.

SIQUEIRA-SILVA, D. H.; VICENTINI, C. A.; NINHAUS-SILVEIRA, A.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R. Reproductive cycle of the Neotropical cichlid yellow peacock bass *Cichla kelberi*: a novel pattern of testicular development. **Neotropical Ichthyology**, v. 11, n. 3, 587-596, 2013.

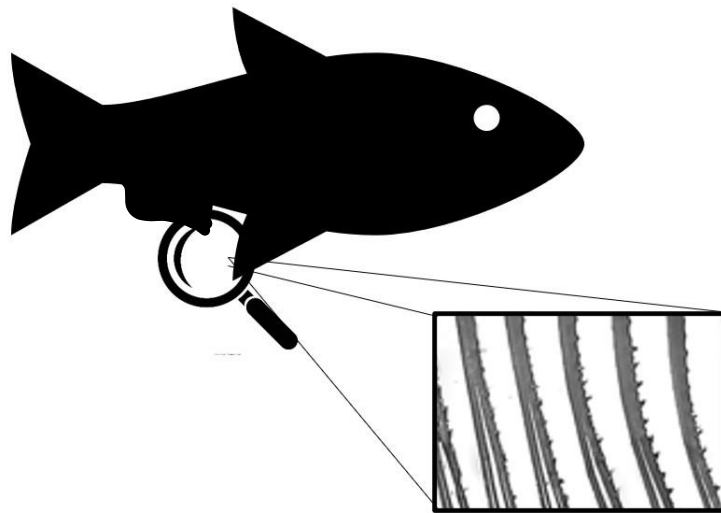
VAZZOLER, A. E. A. M. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática**. Maringá: Ed da UEM, 1996.

WANG, H.P.; PIFERRER, F.; CHEN, S.L.; SHEN, Z. G. **Sex control in Aquaculture**. West Sussex: Wiley, 2019. 875 p.

ZARDO, E. L.; FORNARI, D. C.; GIORIA, J.; ROTILI, D. A.; GOMES, I. C.; ESQUIVEL-MUELBERT, J. R.; STREIT JR, D. P. Gonadal development period and sexual differentiation through histological analysis in *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1850) (Characiformes: Bryconidae). **Aquaculture**, v. 539, 1-8, 2021.

CAPÍTULO 4

Dispersão de espículas nas nadadeiras anais de machos primários e secundários em *Brycon orbignynus*: característica sexual secundária para seleção de reprodutores



Dispersão de espículas na nadadeira anal de machos primários e secundários em *Brycon orbignyanus*: característica sexual secundária para seleção de reprodutores

RESUMO

Brycon orbignyanus é uma caraciforme da região neotropical com reprodução sazonal, período no qual os machos podem ser discernidos das fêmeas por meio de uma aspereza encontrada na nadadeira anal dos espécimes, uma característica sexual secundária conhecida como espículas. Entretanto, apesar de presente no período reprodutivo, pouco se conhece sobre a sinergia entre o surgimento de espículas e o desenvolvimento testicular nesta espécie. Devido a isto, este trabalho teve como objetivo descrever o surgimento e morfologia das espículas na nadadeira anal em *B. orbignyanus*, relacionando-as com as fases do ciclo reprodutivo destes animais, para a determinação de um parâmetro a ser utilizado na seleção de machos aptos a reprodução induzida. Foram coletados mensalmente, entre os meses de setembro e janeiro (2020-2021), espécimes machos de *Brycon orbignyanus* ($n = 50$ total / $n = 10$ /mês) de diferentes idades (1 a 3 anos) oriundos do plantel da Estufa de Experimentação do Laboratório de Ictiologia Neotropical (LINEO) - UNESP/FEIS. Os espécimes foram anestesiados, biometricamente mensurados e, posteriormente, tiveram os testículos e a nadadeira anal coletados. Os testículos foram processados segundo técnicas usuais para microscopia de luz, enquanto as nadadeiras foram analisadas em esteromicroscópio e posteriormente processadas para técnicas de diafanização e microscopia eletrônica de varredura. A nadadeira anal em *B. orbignyanus* possui 25 ± 3 raios, com coloração vermelho escuro nos raios e preto nas membranas inter-radiais. Cada raio dividido em pequenos segmentos nos quais, nas regiões centrais, emergem espículas em formato cônico. Com exceção de espécimes em fase testicular de Regeneração, em todas as outras fases do ciclo reprodutivo em *B. orbignyanus* foram encontrados machos com espículas, contudo, espécimes que apresentam seis raios ou mais com espículas são considerados Aptos a Espermiar e podem ser selecionados para reproduções induzidas. Não foram encontradas diferenças nos padrões de desenvolvimento de espículas como características sexuais secundárias em indivíduos intersexo, machos primários ou machos secundários.

Palavras chaves: Characiformes. Desenvolvimento testicular. Dimorfismo sexual. Espermato gênese. Piracanjuba. Reprodução de peixes.

INTRODUÇÃO

Em teleósteos, distingue-se as fêmeas e machos por apresentarem características sexuais primárias e/ou secundárias (WOOTTON; SMITH, 2014). As características primárias são referentes somente a presença de órgãos sexuais, os ovários e testículos, já as características sexuais secundárias são associadas as demais características físicas, sendo uma forma de dimorfismo sexual pois são diferenciações entre machos e fêmeas que não estão diretamente relacionadas aos órgãos reprodutores, mas estão associadas a diferenças morfológicas durante o período reprodutivo dos peixes (REIS; MALABARBA, 1988; PY-DANIEL; FERNANDES, 2005).

Estas características morfológicas podem ser facilmente visíveis, como tamanho, coloração, gibosidades (THEIS *et al.*, 2017; SCHÖNHOFEN-LONGONI; GIORA; BERNHARDT-FIALHO) ou mesmo discretas a ponto de somente serem percebidas devido ao toque, como o desenvolvimento de espículas nas nadadeiras anais ou glândulas brânquiais (MALABARBA; WEITZMAN, 2003; GONÇALVES *et al.*, 2005; VIEIRA, BARTOLETTE; BRITO, 2016).

O desenvolvimento destas características está envolvido na fisiologia reprodutiva da espécie e é dependente da cascata hormonal que desencadeia o desenvolvimento das gônadas, de forma que mesmo em peixes que passam por inversão ou reversão sexual as características sexuais secundárias acompanham o fenótipo apresentado nas gônadas (PAPOULIAS; NOLTIE; TILLITT, 2000). No caraciforme *Astyanax lacustris* (= *A. altiparanae*), por exemplo, os machos apresentam espículas nas nadadeiras anais independente da estação do ano, devido aos vários picos reprodutivos que a espécie tem ao longo do ano, porém as espículas tornam-se muito mais acentuadas a medida que os testículos atingem a fase reprodutiva Apto a Espermiar, provavelmente em função da liberação dos andrógenos neste momento do ciclo reprodutivo (SIQUEIRA-SILVA *et al.*, 2020).

Em ciclídeos é comum que os machos apresentem uma protuberância pós-occipital (gibosidade) durante todo o período reprodutivo, mas esta protuberância é absorvida em poucos dias pós desova, desaparecendo totalmente (CHELLAPA *et al.*, 2003; RONCO; ROESTI; SALZBURGER, 2019). Em Siluriformes o dimorfismo é evidente pelo tamanho, pois na maioria da espécies desta ordem os machos são menores que as fêmeas e somente este fato já possibilita a identificação dos sexos dos espécimes, mas além disto, em espécies da família Doradidae, durante o período reprodutivo os machos desenvolvam espículas na nadadeira dorsal, acompanhado de um prolongamento do primeiro raio desta nadadeira ou mesmo o

desenvolvimento de odontódeos nas laterais da cabeça, tornando-se um adorno para os reprodutores (PY-DANIEL; FERNANDES, 2005; OLIVEIRA; OYAKAWA, 2019).

A região neotropical abrange a maior diversidade de espécies de peixes do mundo e entender as diferenças e semelhanças entre as características morfológicas, comportamentais e fisiológicas da reprodução destas espécies é fundamental para promover planos de produção de espécies de interesse comercial em cativeiro (VARI; MALABARBA, 1999; REIS *et al.*, 2016). *Brycon orbignyanus*, popularmente conhecido como piracanjuba, é um caraciforme de maturação sexual relativamente tardia (GANECO *et al.*, 2001; ZARDO *et al.*, 2021) e possui diferenciação sexual como uma espécie gonocorista, embora apresente o desenvolvimento de machos secundários dentro da população, originados a partir da inversão sexual de fêmeas (QUIRINO *et al.*, 2021).

A piracanjuba é uma espécie de reprodução sazonal, com período reprodutivo estabelecido entre setembro/janeiro e durante este período os machos podem ser discernidos das fêmeas por meio de uma aspereza encontrada nas nadadeiras anais, denominada por espículas (BALDISSEROTTO; GOMES, 2005; CECCARELLI *et al.*, 2010). Entretanto, apesar de presente no período reprodutivo, pouco se conhece sobre a sinergia entre o surgimento de espículas e o desenvolvimento testicular nesta espécie. Assim, este trabalho tem como objetivo analisar a dinâmica do surgimento das espículas, característica sexual secundária em machos de *B. orbignyanus*, relacionando-as com as fases do ciclo reprodutivo destes animais, para a determinação de um parâmetro a ser utilizado na seleção de machos aptos a reprodução para os procedimentos de reprodução induzida na piscicultura, além de verificar se há diferenças entre as características sexuais secundárias em machos primários e machos secundários.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção dos animais

Foram utilizados espécimes machos de *Brycon orbignyanus* (n = 50) de diferentes idades (1 a 3 anos) oriundos do plantel da Estufa de Experimentação do Laboratório de Ictiologia Neotropical (LINEO) - UNESP/FEIS. Os processos de manutenção dos tanques, manejo e coleta dos animais foram realizados seguindo o protocolo CEUA 0012/2017 e SISGEN A069C6E.

Amostragem de nadadeiras e testículos

Entre os meses de setembro e janeiro (2020-2021), período reprodutivo de *B. orbignyanus* (CECCARELLI *et al.*, 2010) foram realizadas coletas mensais (n = 10/mês) de testículos e nadadeira anal. Os animais foram eutanasiados em solução de benzocaína (0,05%) e posteriormente realizada biometria, sendo aferidos massas corpóreas (g), comprimento total e padrão (cm) e da nadadeira foram aferidos o comprimento total (cm), altura do primeiro, segundo e último raio (cm), além da contagem do número de raios totais e dos com presença de espículas, assim como a quantidade de espículas por raio. Por fim, a nadadeira anal e os testículos foram removidos por incisão cirúrgica a partir de uma incisão ventral dos espécimes. Todo o material biológico amostrado foi fixado em solução de paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 2% em tampão fosfato Sorensen (0,1M a pH 7,2).

Os testículos foram processados para microscopia de luz, enquanto as nadadeiras foram analisadas em esteromicroscópio e posteriormente processadas para técnicas de diafanização e microscopia eletrônica de varredura.

Microscopia de luz e estereomicroscopia

Após a fixação (24h) os testículos foram seccionados transversalmente e submetidos a desidratação em série crescente de álcool etílico (70%-95%), posteriormente incluídos em Historesina (glicolmetalcrilato) Leica Biosystems®. Posteriormente os testículos emblocados foram submetidos a cortes de 3µm de espessura em um micrótomo semi-automático Leica® RM 2245. As lâminas foram coradas seguindo os protocolos usuais de Hematoxilina/Eosina (H.E.). Posteriormente foram analisados e fotografados em microscopia de luz Zeiss® AxioScope-A1. As fases do ciclo reprodutivo na espécie foram classificadas de acordo com as características macroscópicas e microscópicas dos testículos, seguindo o já proposto por Brown-Peterson e colaboradores (2011).

As nadadeiras anais foram mantidas em solução de paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 2% em tampão fosfato Sorensen (0,1M a pH 7,2) por sete dias e em seguida transferidas para solução de álcool etílico 70%. Posteriormente, foram fotografadas e analisadas em estereomicroscópio Motic® SMZ168. Todas as nadadeiras tiveram seus raios analisados um a um, de forma que, quando presentes, todas as espículas foram quantificadas.

Diafanização

Foi utilizado o protocolo proposto por Potthoff (1984) e adaptado para o tamanho das amostras de nadadeiras anais. Inicialmente acondicionadas em solução de fixação, as nadadeiras foram transferidas para solução de álcool etílico 70% por, no mínimo, dois dias. Em seguida passaram por desidratação em série crescente de álcool etílico álcool (80%, 90% e 100%) por 3h cada e finalizado com xilol 24h. Deste modo, foram coradas em solução de azul de alcian (30%), banhadas em solução de branqueamento e posteriormente acondicionadas em tripsina para dissolução da musculatura. Em seguida, foram coradas com solução de vermelho alizarina (30%) e posterior acondicionamento em solução de clareamento. As nadadeiras diafanizadas foram preservadas em soluções crescentes de glicerina (25%, 50% e 75%) e estão armazenadas em solução de glicerina 100% + timol. Os tempos estabelecidos para cada solução foram realizados de acordo com o tamanho das amostras, podendo sofrer variação de uma para outra.

Microscopia eletrônica de varredura

Após fixação (sete dias) as nadadeiras anais foram fragmentadas individualizando raio por raio. Em seguida os raios foram submetidos a desidratação em série crescente de álcool etílico (70, 80, 90, 95 e 100%) em ciclos de 15 minutos em cada concentração, posteriormente a desidratação completa foi realizada em aparelho de ponto crítico com CO₂ líquido (Ponto Crítico Leica® CPD300). Após estes processos, os raios foram metalizados com íons ouro-paládio em Metalizador MED 010 da Leica®. Todo o material biológico foi examinado e elétron-micrografado em Microscópio Eletrônico de Varredura EVO LS15 - Carl Zeiss®.

Análises estatísticas

Para determinação do índice gonadosomático (IGS) foi utilizada a fórmula $IGS = (\text{massa das gônadas}/\text{massa corpórea}) \times 100$, conforme estabelecido por Vazzoler (1996). Para análise de correlação entre variáveis foram utilizadas correlação de Pearson. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão.

RESULTADOS

Morfologia da nadadeira anal e das espículas

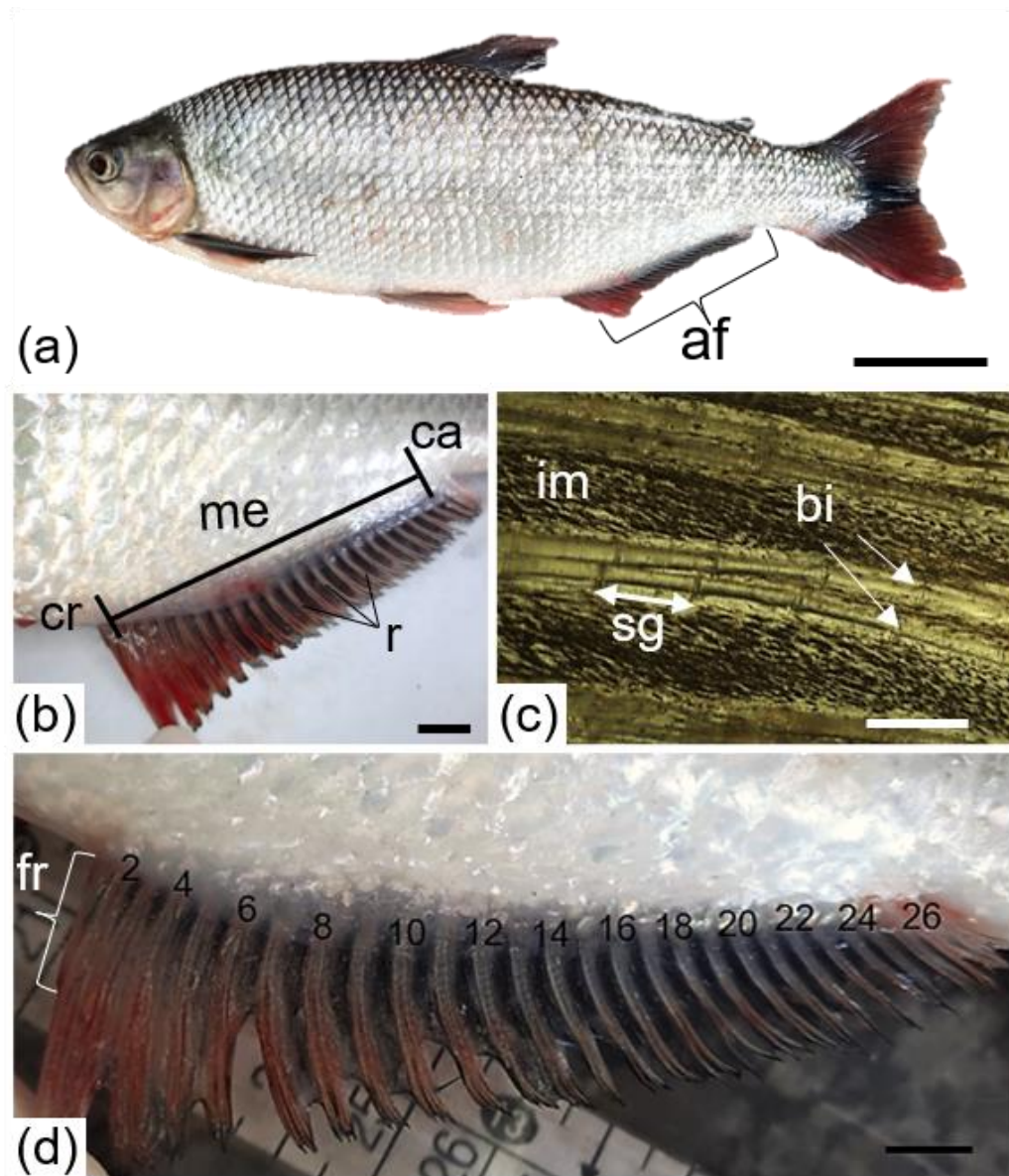
As nadadeiras anais podem ser divididas em região cranial, medial e caudal e possuem $6,4 \pm 3,1$ cm de comprimento com 25 ± 3 raios (Fig. 1A, B e D). Na região cranial há o desenvolvimento de um primeiro raio mole com $0,73 \pm 0,4$ cm de altura, enquanto que o segundo raio, que é o primeiro raio duro, possui $1,5 \pm 0,3$ cm de altura e os últimos raios possuem média de $0,8 \pm 0,2$ cm (Fig. B e D).

A nadadeira anal de *B. orbignyana* apresenta coloração vermelho escuro nos raios e preto nas membranas inter-radiais. (Fig. 1A-D e 2A). Cada raio é formado por segmentos unidos por pequenas articulações, que podem ou não conter espículas (Fig. 1C e 2A e B). Todos os raios estão recobertos por uma extensão das membranas inter-radiais (Fig. 1C). Cada raio sofre uma bifurcação inicial e à medida que se aproxima da porção final há uma nova bifurcação terminal (Fig. 1C e 2A).

Em machos fora do período reprodutivo, os segmentos de raios são lisos e não apresentam qualquer vestígio de desenvolvimento de espículas (Fig. 2C e E, 3A-C). Contudo, estes animais podem apresentar a formação de uma calosidade na região de articulação entre um segmento e outro (Fig. 3B-C), dando a falsa impressão de que o animal possui espículas quando, na verdade, não há. As calosidades são sentidas como elevações esporádicas e diferem das espículas pois não há sensação de aspereza ao toque.

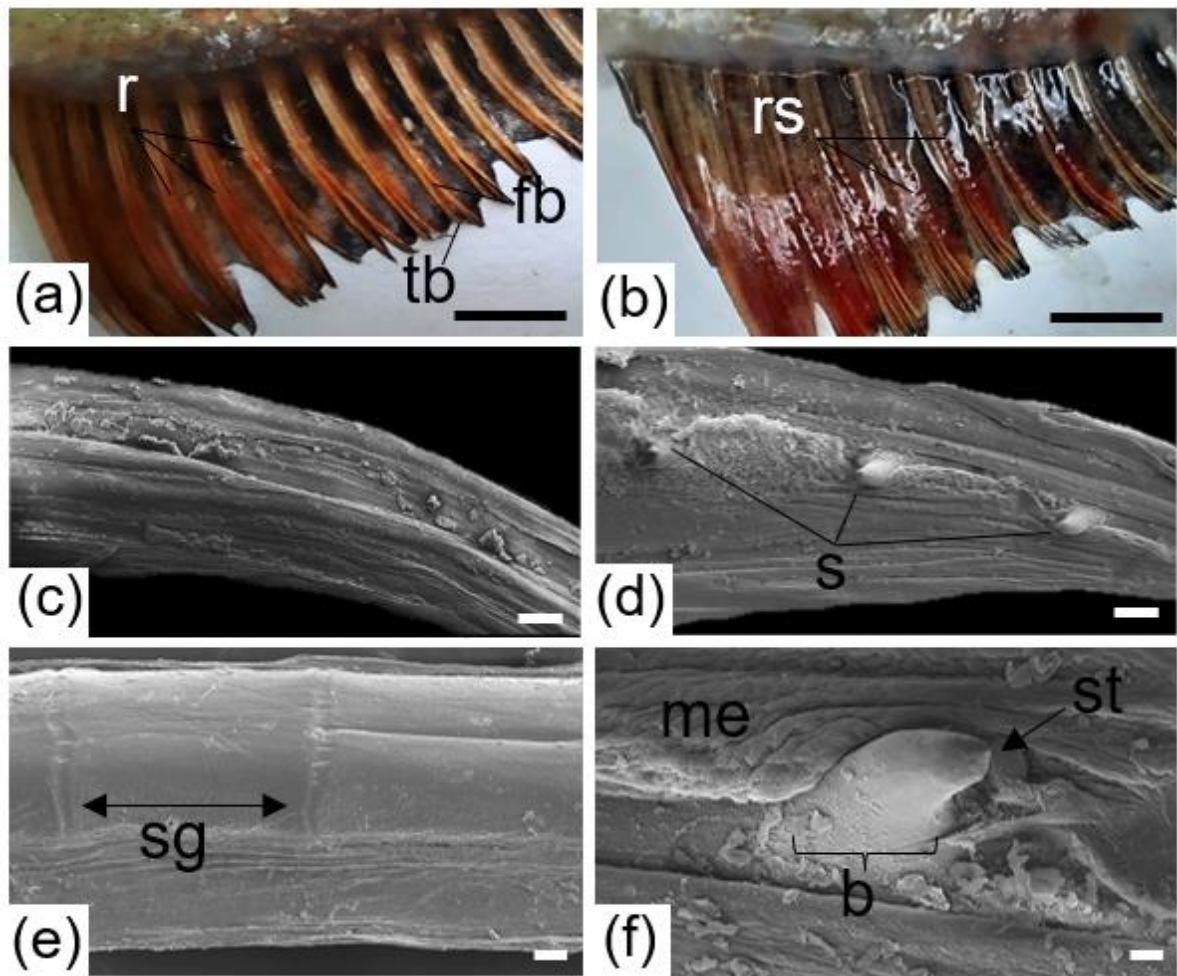
A olho nu as espículas podem ser observadas como pequenas elevações ao longo dos raios, de forma que é melhor visualizado na região central da nadadeira, pois os raios com espículas diminuem em quantidade à medida que se aproximam da região caudal do animal (Fig. 2B). Além disso, as espículas localizam-se da porção medial em direção a porção terminal dos raios, chegando até as bifurcações terminais, e estão ausentes na região mais próxima ao ventre do animal (Fig. 2B; 4A e B). Devido a isto, a sensação de sentir a aspereza com o toque nas nadadeiras é intensa nessas regiões.

Figura 1: Nadadeiras anais em *Brycon orbignyanus*. **A:** Espécime de *B. orbignyanus*. **B:** Regiões da nadadeira anal. **C:** Raios. **af:** nadadeira anal. **bi:** bifurcação do raio. **ca:** região caudal. **cr:** região cranial. **fr:** primeiro raio. **im:** membrana inter-radial. **me:** região medial. **sg:** segmento de raio. **Escala:** A: 5 cm; B e D: 1 cm; C: 200 μ m.



Fonte da imagem: própria autora.

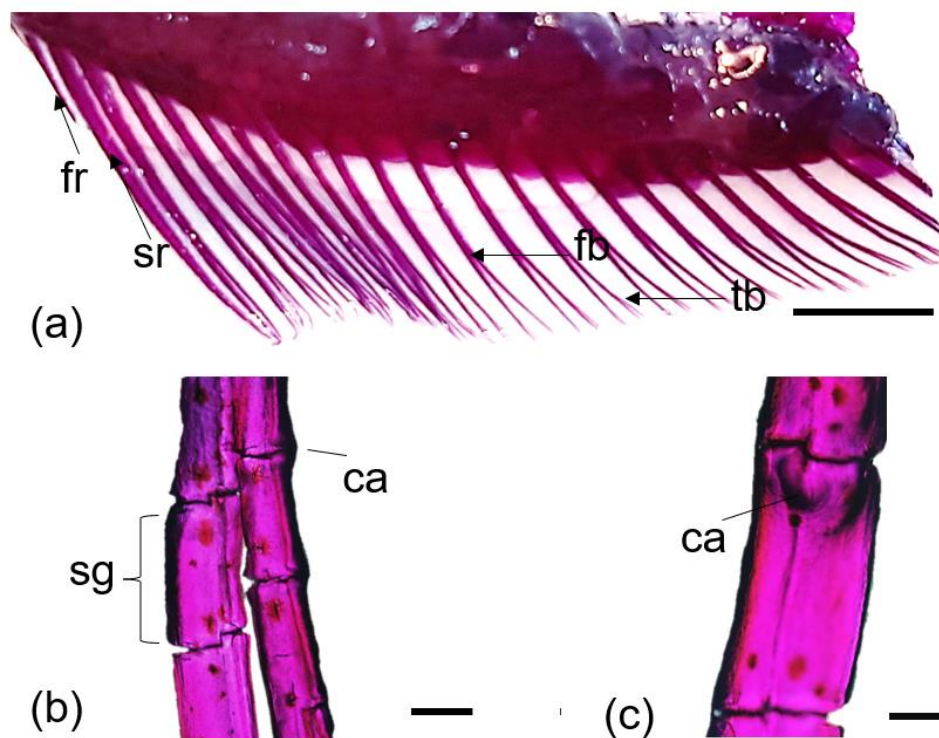
Figura 2: Detalhes das nadadeiras de *Brycon orbignyianus*. **A, C e E:** Raios sem espículas. **B, D e F:** Raios com espículas. **b:** base. **fb:** primeira bifurcação. **r:** raio. **rs:** raio com espículas. **s:** espículas. **sg:** segmento de raio. **st:** cúspide da espícula. **tb:** bifurcação terminal. **Escala:** A e B: 1 cm; C e D: 200 μ m; E: 100 μ m; F: 50 μ m.



Fonte da imagem: própria autora.

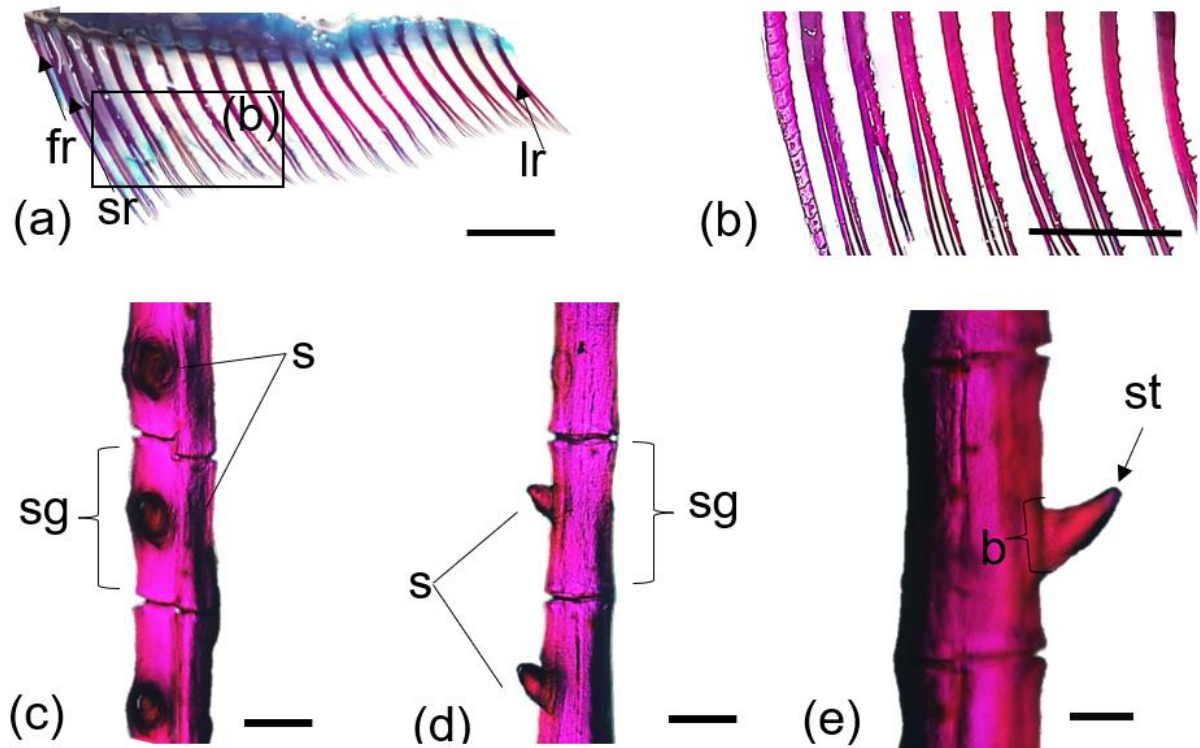
Além disso, as espículas localizam-se da porção medial em direção a porção terminal dos raios, chegando até as bifurcações terminais, e estão ausentes na região mais próxima ao ventre do animal (Fig. 2B; 4A e B). As espículas emergem sempre na região central do segmento de raio, de modo que podem ser sentidas desde os primeiros indícios de crescimento (Fig. 4C). À medida que se desenvolvem, caracterizam-se por pequenas projeções que possuem formato de quilhas, com base cilíndrica larga e porção terminal fina, como uma ponta em forma de gancho voltada para o ventre do animal (Fig. 2D e F; 4D e E). Estão dispostas do segundo ao décimo-sexto raio, contendo apenas uma espícula por segmento (Fig. 4D e E), mesmo após a bifurcação sofrida. Devido ao fato dos raios serem cilíndricos e cada segmento apresentar somente uma espícula, a espícula somente será observada ou sentida de um lado da nadadeira, de modo que o lado esquerdo ou direito das nadadeiras irão apresentar visualizações ou sensações ao toque de modo diferente (Fig. 4B).

Figura 3: Nadadeira anal de *Brycon orbignyanus* sem espículas. **ca:** calosidade. **fb:** primeira bifurcação. **fr:** primeiro raio. **sg:** segmento de raio. **sr:** segundo raio. **tb:** bifurcação terminal. **Escala:** A: 0,5 cm; B: 200 μ m; C: 100 μ m.



Fonte da imagem: própria autora.

Figura 4: Nadadeira anal de *Brycon orbignyianus* com espículas. **b:** base da espícula. **fb:** primeira bifurcação. **fr:** primeiro raio. **lr:** último raio. **s:** espículas. **sg:** segmento de raio. **sr:** segundo raio. **st:** cúspide da espícula. **tb:** bifurcação terminal. **Escalas:** A e B: 1,0 cm; C e D: 200 μ m; E: 100 μ m.



Fonte da imagem: própria autora.

Relação do desenvolvimento testicular e a presença de espículas na nadadeira anal

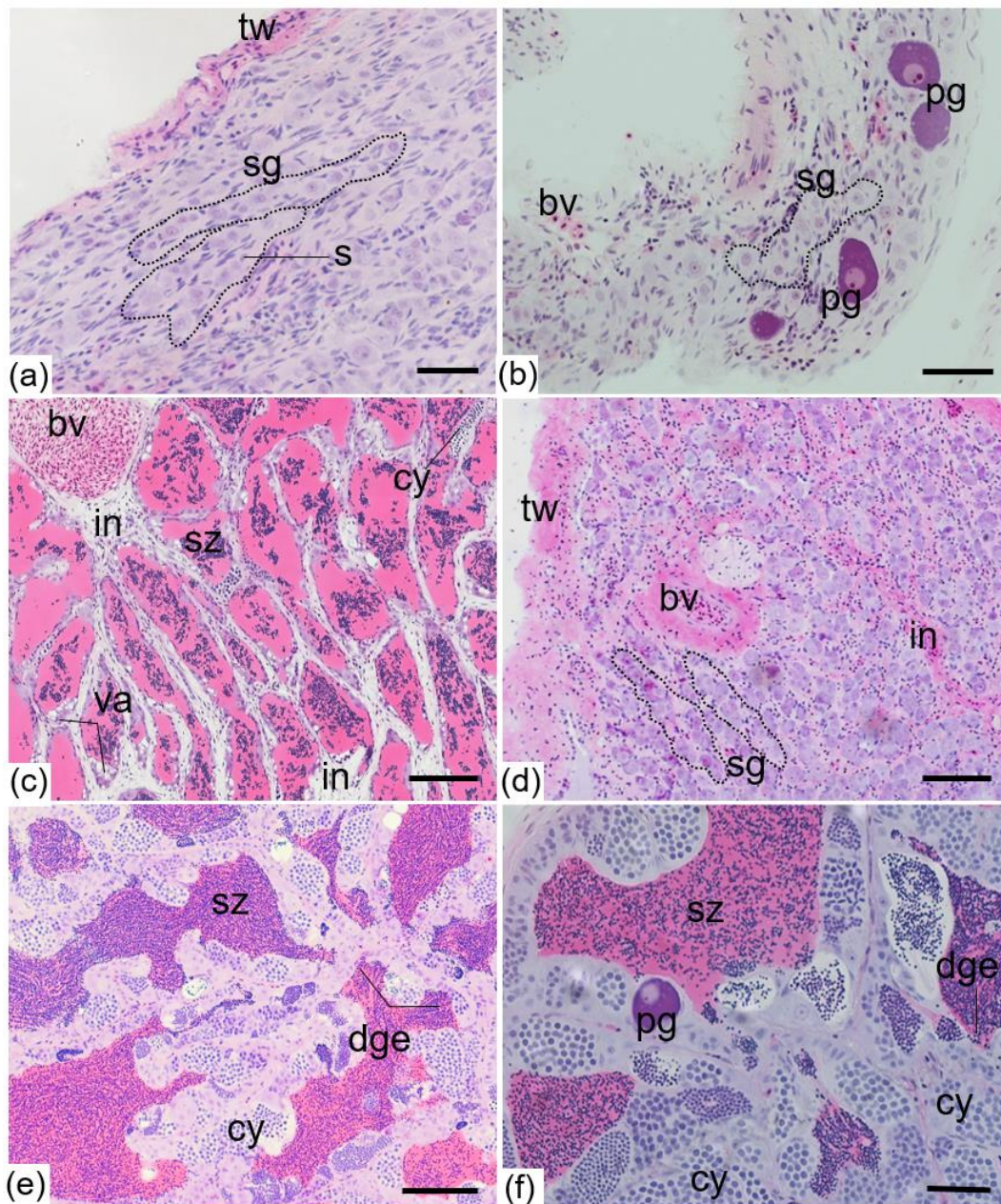
De acordo com a classificação das fases do ciclo reprodutivo propostos por Brown-Peterson *et al.* (2011), os espécimes de *B. orbignyanus* analisados foram classificados em Imaturos (Fig. 5 A e B), em Regressão (Fig. 5C), em Regeneração (Fig. 5D) e Aptos a Espermiar (Fig. 5 E e F) (Tab. 1). Com exceção de espécimes em Regeneração, em todas as outras fases do ciclo reprodutivo em *B. orbignyanus* foram encontrados machos com espículas, contudo, espécimes Aptos a Espermiar possuem maior quantidade de raios que desenvolvem espículas (Tab. 1). Foram encontrados dois indivíduos considerados intersexos (Imaturos) (Fig. 5B) e dois machos secundários (Aptos a Espermiar) (Fig. 5F), os quatro espécimes apresentaram o mesmo padrão de desenvolvimento de espículas que machos primários (Tab. 1).

Há uma correlação positiva ($p = 0.00$; $R^2 0.58$) entre o desenvolvimento do ciclo reprodutivo e a quantidade de raios que apresentam espículas em machos primários e secundários em *Brycon orbignyanus* (Fig. 6). Assim, os animais que possuem acima de 6 raios com desenvolvimento de espículas estão todos considerados Aptos a Espermiar (Fig. 6). Não há relação entre a quantidade de raios com espículas e o comprimento total dos espécimes analisados (Fig. 7).

Tabela 1: Associação do desenvolvimento de espículas nas nadadeiras anais com a fase do ciclo reprodutivo em machos de *B. orbignyanus*. CT = comprimento total. DRE = disposição dos raios com espícula. IGS = índice gonadossomático. N = número de espécimes.

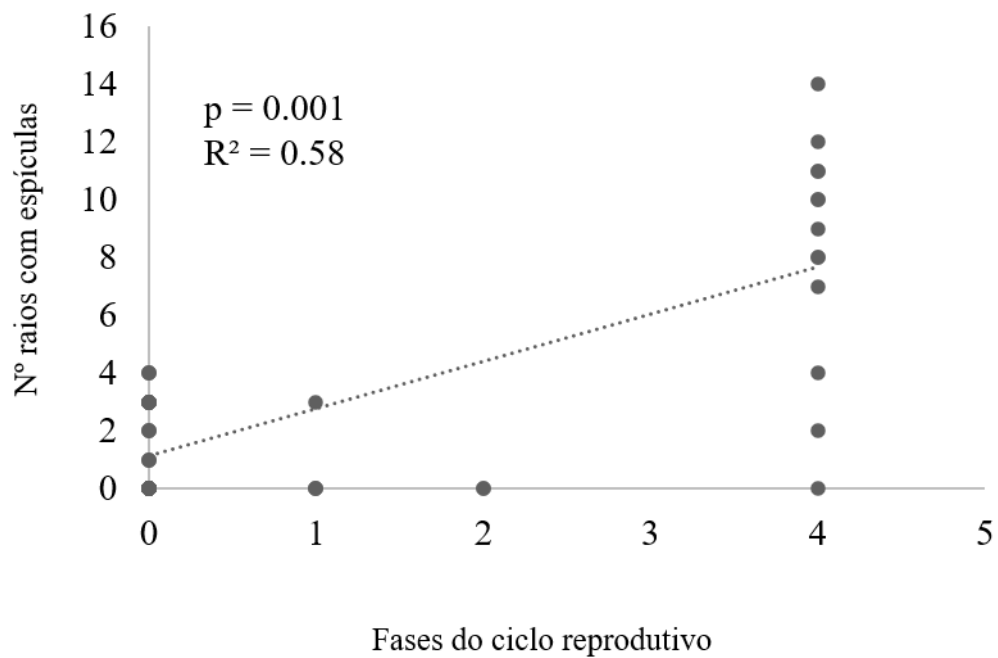
N TOTAL	N COM ESPÍCULA	DRE	CT (CM)	FASE DO CICLO REPRODUTIVO	IGS
27	15	2 ao 4° raio	22,14 ± 3,4	Imaturo	0,046 ± 0,22
2	2	2 ao 4° raio	22,50 ± 1,6	Imaturo (Intersexo)	0,019 ± 0,02
4	1	2 ao 3° raio	36,16 ± 0,5	Regressão	0,005 ± 0,001
2	0	-	37 ± 1,4	Regeneração	0,019 ± 0,012
13	12	2 ao 14° raio	33,54 ± 6,03	Apto a espermiar (♂ primário)	0,808 ± 0,729
2	2	2 ao 10° raio	21,5 ± 0,7	Apto a espermiar (♂ secundário)	0,015 ± 0,01

Figura 5: Fases do ciclo testicular em *B. orbignyana*. **A:** Imaturo. **B:** Intersexo imaturo. **C:** Regressão. **D:** Regeneração. **E:** Apto a espermiar (macho primário). **F:** Apto a Espermiar (macho secundário). **bv:** vasos sanguíneos. **cy:** cistos de células germinativas. **dge:** epitélio germinativo descontínuo. **in:** interstício. **pg:** oócito em crescimento primário. **sg:** espermatogônia. **s:** célula de sertoli. **sz:** espermatozoide. **tw:** parede do testículo. **va:** vacúolos. **Escalas:** A, C, D, E: 20 µm; B, F: 50 µm. **Coloração:** Hematoxilina e Eosina.



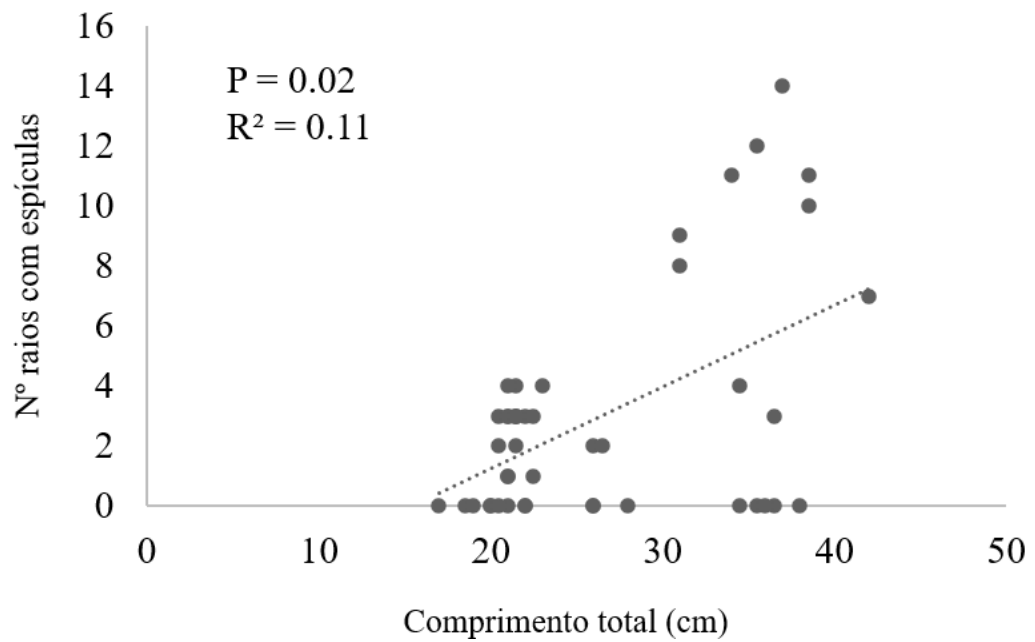
Fonte da imagem: própria autora.

Figura 6: Correlação entre as fases do ciclo reprodutivo e número de raios com espículas em machos de *Brycon orbignyanus*. **Eixo X:** Fases do ciclo reprodutivo, sendo, **0** – espécimes Imaturos, **1** – Regressão, **2** – espécimes em Regeneração, **3** – espécimes em Desenvolvimento, **4** – espécimes Aptos a Espermiar. **Eixo Y:** número (nº) de raios da nadadeira anal que desenvolveram espículas.



Fonte da imagem: própria autora.

Figura 7: Correlação entre o comprimento total e número de raios com espículas em machos de *Brycon orbignyanus*. **Eixo X:** comprimento total em cm. **Eixo Y:** número (n°) de raios da nadadeira anal que desenvolveram espículas.



Fonte da imagem: própria autora.

DISCUSSÃO

A seleção de bons reprodutores é primordial para a reprodução induzida em sistemas de produção e normalmente a seleção dos machos ocorre devido a observação de liberação de sêmen pós pressão abdominal ou por características sexuais secundárias desenvolvidas nos períodos de reprodução (BALDISSEROTTO; GOMES, 2005; SIQUEIRA-SILVA *et al.*, 2020). Neste estudo, evidenciamos que a presença de espículas nas nadadeiras anais em *Brycon orbignyianus* é uma característica sexual secundária, presente em machos, e pode ser utilizada de forma efetiva para a escolha de machos sexualmente ativos.

O gênero *Brycon* compreende espécies que despertam grande interesse comercial na aquicultura devido ao crescimento exponencial apresentado nos primeiros meses de vida, como *B. amazonicus* (CARVALHO; URBINATI, 2005; SANTOS *et al.*, 2015), *B. opalinus* (GOMIERO; CARMASSI; BRAGA, 2007) e *B. orbignyianus* (GOMIERO *et al.*, 2009). Além disso, as espécies deste gênero são morfologicamente muito próximas causando até mesmo dificuldade de identificação entre elas, até mesmo apresentando características próximas a comprimento das nadadeiras anais e números de raios (LIMA *et al.*, 2017). Embora o número de raios para *B. orbignyianus* seja estimado e com baixa variação, observamos que o comprimento da nadadeira anal possui relação direta com o comprimento do animal, indicando que o que se altera é o espaçamento entre os raios.

A presença de espículas em nadadeiras anais é uma característica sexual secundária comum para espécies da ordem Characiformes, e as características de dispersão das espículas nos raios possuem padrões diferentes independentemente da família a qual pertencem nesta ordem (TEIXEIRA, 2016). Em *Prionobrama paraguayensis* e *Microschemobrycon casiquiare*, membros de Characidae, um único segmento de raio pode apresentar de duas a três espículas (TEIXEIRA, 2016) e em espécies do gênero *Characidium*, família Crenuchidae, as espículas emergem na articulação entre segmentos (TEIXEIRA; MELO, 2021). Para as espécies do gênero *Astyanax* (MALABARBA; WEITZMAN, 2003; SIQUEIRA-SILVA *et al.*, 2020), *Moenkhausia* (ZANATA; BIRINDELI; MOREIRA, 2009; BENINE; MARIGUELA; OLIVEIRA, 2009) e *Hyphessobrycon* (TEIXEIRA *et al.*, 2019; GARCIA-ALZATE *et al.*, 2020), que também são membros da família Characidae, a formação dos processos ósseos que originam as espículas ocorre no centro do segmento de raio, de onde emerge apenas uma espícula por segmento, assim como foi descrito para *Brycon orbignyianus* neste estudo, espécie que foi retirada de Characidae e realocada em Bryconidae.

Os padrões de caracteres sexuais secundários ou de dimorfismo sexual são variáveis entre os táxons e, na maioria das espécies, a ocorrência das características que permitem a identificação dos sexos é normalmente encontrada em machos (PARKER, 1992; MEI; GUI, 2015). Recentemente o caraciforme *Moenkhausia andrica* foi descrito como uma nova espécie, e observou-se que ambos os sexos desenvolvem espículas nas nadadeiras anais durante o período reprodutivo, mas diferem na frequência de raios que apresentam espículas (REIA; OLIVEIRA; BENINE, 2021). Neste estudo, identificamos que machos de *Brycon orbignyanus* possuem espículas como caráter sexual secundário enquanto que em fêmeas não, porém, cabe ressaltar que fêmeas que passam por inversão sexual e dão origem a machos secundários podem apresentar espículas desde os primeiros indícios de remodelamento gonadal.

Normalmente, espécies com hábitos reofílicos ou reprodução sazonal desenvolvem as características sexuais secundárias apenas nos períodos reprodutivos (MALABARBA; WEITZMAN, 2003; OHARA *et al.*, 2019). Em espécies da ordem Cichlidae a ocorrência de acúmulo de gordura formando uma protuberância cefálica (gibosidade) ocorre em machos que estão aptos a reproduzir e é rapidamente absorvida após a reprodução (CHELLAPPA *et al.*, 2003; MUÑOZ; VAN DAMME; DUPONCHELLE, 2006). Por outro lado, em Characiformes como *Astyanax lacustris* (= *A. altiparanae*) a presença de espículas nas nadadeiras anais dos machos ocorre independente da época do ano devido a reprodução contínua da espécie e torna-se mais acentuada quando os machos estão aptos a liberar esperma (SIQUEIRA-SILVA *et al.*, 2020). A piracanjuba difere do lambari pois reproduz sazonalmente (CASSEL *et al.*, 2017; ZARDO *et al.*, 2021), porém, mantém em comum com *A. lacustris* a ocorrência de espículas em machos em diferentes momentos do ciclo reprodutivo, de modo que somente a presença de espículas não é um indicativo de maturação gonadal, mas sim a frequência (quantidade) de raios com espículas.

Por fim, este estudo demonstrou que a ocorrência de espículas nas nadadeiras anais em *Brycon orbignyanus* é uma característica sexual secundária presente tanto em machos primários quanto em machos secundários. Embora a ocorrência de espículas não seja um indicativo de maturidade sexual, pois podem emergir a qualquer momento do ciclo reprodutivo, a quantidade de raios que apresentam espículas é, de modo que machos com oito raios ou mais com espículas estão aptos e espermiar e, possivelmente, podem apresentar melhores resultados de fecundação quando escolhidos como reprodutores em cativeiro.

REFERÊNCIAS

- BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: EditoraUFSM, 2005, 468 p.
- BENINE, R. C.; MARIGUELA, T. C.; OLIVEIRA, C. New species of *Moenkhausia* Eigenmann, 1903 (Characiformes: Characidae) with comments on the *Moenkhausia oligolepis* species complex. **Neotropical Ichthyology**, v. 7, p. 161-168, 2009.
- BROWN-PETERSON, N. J.; WYANSKI, D. M.; SABORIDO-REY, F.; MACEWICZ, B. J.; LOWERRE-BARBIERI, S. K. A standardized terminology for describing reproductive development in fishes. **Marine and Coastal Fisheries**, v. 3, n. 1, 52-70, 2011.
- CARVALHO, E. G.; URBINATI, E. C. Crescimento, desenvolvimento gonadal e composição muscular de matrinxãs (*Brycon cephalus*) submetidos à restrição alimentar e realimentação durante um ano. **Ciência Rural**, v. 35, 897-908, 2005.
- CASSEL, M.; CHEHADE, C.; BRANCO, G. S.; CANEPPELE, D.; ROMAGOSA, E.; BORELLA, M. I. Ovarian development and the reproductive profile of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) over one year: applications in fish farming. **Theriogenology**, 98, 1-15, 2017.
- CECCARELLI, P. S.; SENHORINI, J. A.; CANTELMO, O. A.; REGO, R. F.. Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*, Valenciennes, 1849). In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. (org.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. 2. Ed. Santa Maria: UFMS, 2010. p. 117-148.
- CHELLAPPA, S., CÂMARA, M. R., CHELLAPPA, N. T., BEVERIDGE, M. C. M., HUNTINGFORD, F. A. Reproductive ecology of a neotropical cichlid fish, *Cichla monoculus* (Osteichthyes: Cichlidae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 63, 17-26, 2003.
- GANECO, L.; NAKAGHI, L.; URBINATI, E.; NETO, R. D.; VASQUES, L. Análise morfológica do desenvolvimento ovocitário de piracanjuba, *Brycon orbignyanus*, durante o ciclo reprodutivo. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 27, n. 2, p. 131-138, 2001.
- GARCÍA-ALZATE, C. A.; LIMA, F.; TAPHORN, D. C.; MOJICA, J. I.; URBANO-BONILLA, A.; TEIXEIRA, T. F. A new species of *Hyphessobrycon* Durbin (Characiformes: Characidae) from the western Amazon basin in Colombia and Peru. **Journal of Fish Biology**, v. 96, n. 6, 1444-1453, 2020.
- GOMIERO, J. S. G.; FREITAS, R. T. F. D.; SANTOS, V. B. D.; SILVA, F. F. D.; RODRIGUES, P. B.; LOGATO, P. V. R. Curvas de crescimento morfométrico de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, 882-889, 2009.

- GOMIERO, L. M.; CARMASSI, A. L.; BRAGA, F. M. D. S. Crescimento e mortalidade de *Brycon opalinus* (Characiformes, Characidae) no Parque Estadual da Serra do Mar, Mata Atlântica, Estado de São Paulo. **Biota Neotropica**, v. 7, n. 1, 1-6, 2007.
- GONÇALVES, T. K.; AZEVEDO, M. A.; MALABARBA, L. R.; FIALHO, C. B. Reproductive biology and development of sexually dimorphic structures in *Aphyocharax anisitsi* (Ostariophysi: Characidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 3, 433-438, 2005.
- LIMA, F. C. T. A revision of the cis-andean species of the genus *Brycon* Müller & Troschel (Characiformes: Characidae). **Zootaxa**, v. 4222, n. 1, p. 1-189, 2017.
- MALABARBA, L. R.; WEITZMAN, S. H. Descriptions of a new genus from southern Brazil, Uruguay and Argentina, with a discussion of a putative characid clade (Teleostei: Characiformes: Characidae). **Comunicacoes do Museu de Ciencias e Tecnologia da PUCRS**. v. 16, n. 1, 67-151, v. 67, p. 151, 2003.
- MEI, J.; GUI, J. F. Genetic basis and biotechnological manipulation of sexual dimorphism and sex determination in fish. **Science China Life Sciences**, v. 58, n. 2, 124-136, 2015.
- MUÑOZ, H.; VAN DAMME, P. A.; DUPONCHELLE, Fabrice. Breeding behaviour and distribution of the tucunaré *Cichla* aff. *monoculus* in a clear water river of the Bolivian Amazon. **Journal of Fish Biology**, v. 69, n. 4, p. 1018-1030, 2006.
- OHARA, W. M.; TEIXEIRA, T. F.; ALBORNOZ-GARZÓN, J. G.; MIRANDE, J. M.; LIMA, F. C. *Hyphessobrycon rheophilus*, a new species from rapids of the Amazon and Orinoco river basins (Characiformes: Characidae: Stethaprioninae). **Zootaxa**, v. 4712, n. 4, 561-575, 2019
- OLIVEIRA, J. C.; OYAKAWA, O. T. New loricariid fishes from headwaters on serra da mantiqueira and complexo do espinhaço, Minas Gerais state, Brazil (Teleostei: Siluriformes: Loricariidae). **Zootaxa**, v. 4586, n. 3, 401-424, 2019.
- PAPOULIAS, D. M.; NOLTIE, D. B.; TILLITT, D. E. An in vivo model fish system to test chemical effects on sexual differentiation and development: exposure to ethinyl estradiol. **Aquatic Toxicology**, v. 48, n. 1, p. 37-50, 2000.
- PARKER, G. A. The evolution of sexual size dimorphism in fish. **Journal of Fish Biology**, v. 41, 1-20, 1992.
- POTTHOFF, T. Clearing and staining techniques. In: MOSER, H. G. (Ed.). **Ontogeny and Systematics of Fishes**. Lawrence, KS, USA: Allen Press, p.35-37, 1984.
- PY-DANIEL, L. H. R.; FERNANDES, C. C. Dimorfismo sexual em Siluriformes e Gymnotiformes (Ostariophysi) da Amazônia. **Acta Amazonica**, v. 35, p. 97-110, 2005.
- QUIRINO, P. P.; DELGADO, M. L. R.; GOMES-SILVA, L.; BENEVENTE, C. F.; GRIGOLI-OLIVIO, M. L.; BIANCHINI, B. C.; NINHAUS-SILVEIRA, A.; VERÍSSIMO-

SILVEIRA, R. Female sex inversion as a reason for an unbalanced sex ratio in the neotropical species *Brycon orbignyianus*. **Aquaculture Research**, 1-21, 2021.

REIA, L.; OLIVEIRA, C.; BENINE, R. C. *Moenkhausia andrica* (Characiformes: Characidae): a new species from the rio Tapajós basin, Brazil, with minute fin hooklets in females. **Journal of Fish Biology**, v. 99, n. 4, p. 1380-1392, 2021.

REIS, R. E.; ALBERT, J. S.; DI DARIO, F.; MINCARONE, M. M.; PETRY, P.; ROCHA, L. A. Fish biodiversity and conservation in South America. **Journal of Fish Biology**, v. 89, n. 1, p. 12-47, 2016.

REIS, R. E.; MALABARBA, L. R. Revision of the neotropical cichlid genus *Gymnogeophagus* Ribeiro, 1918, with descriptions of two new species (Pisces, Perciformes). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 4, 259-305, 1988.

RONCO, F.; ROESTI, M.; SALZBURGER, W. A functional trade-off between trophic adaptation and parental care predicts sexual dimorphism in cichlid fish. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 286, n. 1909, 1-8, 2019.

SANTOS, M. S. DOS; D.; VILLACORTA-CORREA, M. A.; OLIVEIRA, C. P. F. D.; CASTRO-PÉREZ, C. A.; SAMPAIO, L. A. Crescimento compensatório de juvenis de matrinxã (*Brycon amazonicus*) submetidos a jejum e realimentação. **Revista Igapó-Revista de Educação Ciência e Tecnologia do IFAM**, v. 9, n. 1, p. 43-58, 2015.

SCHÖNHOFEN-LONGONI, L.; GIORA, J.; BERNHARDT-FIALHO, C. Development of secondary sexual characters and their relationship to ontogeny and seasonal reproductive period in *Hyphessobrycon igneus* (Ostariophysi: Characiformes). **Journal of Fish Biology**, v. 92, n. 1, p. 131-149, 2018.

SIQUEIRA-SILVA, D. H.; BERTOLINI, R. M.; LEVY-PEREIRA, N.; NASCIMENTO, N. F.; SENHORINI, J. A.; PIVA, L. H.; FERRAZ, J. B. S.; YASUI, G. S. Factors affecting secondary sex characteristics in the yellowtail tetra, *Astyanax altiparanae*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 47, n. 3, p. 737-746, 2021.

TEIXEIRA, T. F. **Evolução dos caracteres sexuais secundários em Characidae (Teleostei: Characiformes)**. 2016. 725p. Tese: Pós-graduação em Sistemática, Taxonomia e Biodiversidade – USP, Museu de Zoologia, 2016.

TEIXEIRA, T. F.; DUTRA, G. M.; PENIDO, I. S.; DOS SANTOS, S. A.; PESSALI, T. C. A new species of *Hyphessobrycon* (Characiformes, Characidae) from the upper Rio Jequitinhonha basin, Minas Gerais, Brazil, with comments on morphological similarities with Stethaprioninae species from headwater environments. **Journal of Fish Biology**, v. 96, n. 1, 140-153, 2019.

TEIXEIRA, T. F.; MELO, M. R. A new species of *Characidium* Reinhardt (Characiformes: Crenuchidae) from the Río Huallaga, central Peruvian Amazon, with a review of secondary sexual characters in the genus. **Journal of Fish Biology**, v. 98, n. 1, 178-188, 2021.

THEIS, A.; ROTH, O.; CORTESI, F.; RONCO, F.; SALZBURGER, W.; EGGER, B. Variation of anal fin egg-spots along an environmental gradient in a haplochromine cichlid fish. **Evolution**, v. 71, n. 3, 766-777, 2017.

VARI, R. P.; MALABARBA, L. R. Neotropical ichthyology: an overview. **Phylogeny and classification of neotropical fishes**, v. 1, 1-12, 1998.

VAZZOLER, A. E. A. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática**. Maringá: Ed. UEM, 1996. 169 p.

VIEIRA, C. S.; BARTOLETTE, R.; BRITO, M. F. Comparative morphology of bony hooks of the anal and pelvic fin in six neotropical characid fishes (Ostariophysi: Characiformes). **Zoologischer Anzeiger-A Journal of Comparative Zoology**, v. 260, 57-62, 2016.

WOOTTON, R. J.; SMITH, C. **Reproductive Biology of Teleost Fishes**. John Wiley & Sons, 2014, 471p.

ZANATA, A. M.; BIRINDELLI, J. L. O.; MOREIRA, C. R. New species of *Moenkhausia Eigenmann* (Characiformes: Characidae) from Rio Xingu and Rio Tapajós basins, Brazil, with comments on a putative case of polymorphic Batesian mimicry. **Journal of Fish Biology**, v. 75, n. 10, p. 2615-2628, 2009.

ZARDO, E. L.; FORNARI, D. C.; GIORIA, J.; ROTILI, D. A.; GOMES, I. C.; ESQUIVEL-MUELBERT, J. R.; STREIT JR, D. P. Gonadal development period and sexual differentiation through histological analysis in *Brycon orbignyianus* (Valenciennes, 1850) (Characiformes: Bryconidae). **Aquaculture**, v. 539, 1-8, 2021.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

A piracanjuba, *Brycon orbignyanus*, é uma espécie gonocorista, onde a diferenciação sexual ocorre inicialmente em fêmeas aos três meses de idade e em machos aos cinco meses de idade. Entretanto, parte das fêmeas, aos cinco meses de idade, iniciam um processo de inversão sexual, passam por um remodelamento gonadal originando indivíduos intersexos e, posteriormente, machos secundários, caracterizados por serem machos sexualmente ativos, contudo, ainda apresentarem oócitos primários residuais dispersos pelo epitélio germinativo masculino.

Embora a diferenciação sexual em *Brycon orbignyanus* possa ser quantificada temporalmente, esta característica não é mediada somente pela idade dos animais, mas também influenciada pelo crescimento e pela interação dos fatores fisiológicos dos espécimes. Assim, o andrógeno 11-cetotestosterona foi considerado o hormônio esteroide diretamente envolvida na inversão sexual ocorrida em fêmeas.

Além disso, machos primários e machos secundários de *Brycon orbignyanus* atingem maturidade sexual ao mesmo tempo, com um ano de idade, enquanto que as fêmeas somente atingiram maturidade sexual aos três anos de idade. Por fim, machos (primários e secundários) podem ser distinguidos das fêmeas por apresentarem como forma de característica sexual secundária o desenvolvimento de espículas na nadadeira anal.