



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ILHA SOLTEIRA

MAIARA LUZIA GRIGOLI OLIVIO

**CINÉTICA DO DESENVOLVIMENTO OOCITÁRIO E CARACTERIZAÇÃO
OVARIANA DA PIRACANJUBA, *Brycon orbignyanus* (BRYCONIDAE) MANTIDAS
EM SISTEMA DE RECIRCULAÇÃO NOS TRÊS PRIMEIROS ANOS DE VIDA**

**Ilha Solteira
2022**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA ANIMAL -
CTA**

MAIARA LUZIA GRIGOLI OLIVIO

**CINÉTICA DO DESENVOLVIMENTO OOCITÁRIO E CARACTERIZAÇÃO
OVARIANA DA PIRACANJUBA, *Brycon orbignyanus* (BRYCONIDAE) MANTIDAS
EM SISTEMA DE RECIRCULAÇÃO NOS TRÊS PRIMEIROS ANOS DE VIDA**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Engenharia de Ilha Solteira - UNESP como
parte dos requisitos para obtenção do título
de Mestre em Ciência e Tecnologia Animal.

Profa. Dra. Rosicleire Veríssimo Silveira
Orientadora

**Ilha Solteira
2022**

FICHA CATALOGRÁFICA
Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

- O49c Olivio, Maiara Luzia Grigoli.
Cinética do desenvolvimento oocitário e caracterização ovariana da
piracanjuba, *Brycon orbignyanus* (Bryconidae) mantidas em sistema de
recirculação nos três primeiros anos de vida / Maiara Luzia Grigoli Olivio. -- Ilha
Solteira: [s.n.], 2022
51 f. : il.
- Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de
Engenharia de Ilha Solteira. Área de conhecimento: Produção Animal, 2022
- Orientador: Rosicleire Veríssimo Silveira
Inclui bibliografia
1. Diâmetro celular. 2. Fases reprodutivas. 3. Idade. 4. Oócitos primários . 5.
Peixes neotropicais . 6. Sistema de recirculação.


Raiane da Silva Santos

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Cinética do desenvolvimento oocitário e caracterização ovariana da piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Bryconidae) mantidas em sistema de recirculação nos três primeiros anos de vida.

AUTORA: MAIARA LUZIA GRIGOLI OLIVIO

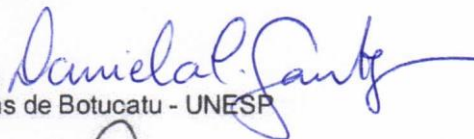
ORIENTADORA: ROSICLEIRE VERISSIMO SILVEIRA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIA E TECNOLOGIA ANIMAL, área: Produção Animal pela Comissão Examinadora:

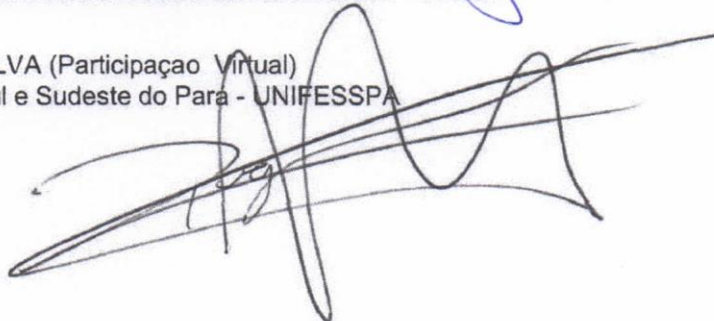
Profa. Dra. ROSICLEIRE VERISSIMO SILVEIRA (Participação Presencial)
Departamento de Biologia e Zootecnia / FEIS/Unesp, Ilha Solteira-SP



Profa. Dra. DANIELA CARVALHO DOS SANTOS (Participação Virtual)
Departamento de Biologia Estrutural e Funcional / Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP



Prof. Dr. DIÓGENES HENRIQUE DE SIQUEIRA SILVA (Participação Virtual)
Faculdade de Biologia / Universidade Federal do Sul e Sudeste do Para - UNIFESSPA



Ilha Solteira, 27 de junho de 2022

Dedico este trabalho, a minha mãe Rosa por sempre me incentivar aos estudos, mulher guerreira, que move montanhas para se dedicar a todos em sua volta; meu pai, João, homem de coração bondoso e o primeiro a me socorrer quando mais preciso; meus irmãos, Miriam e Eidi por me espelhar aos seus esforços e dedicação; às minhas sobrinhas Isis e Vitória por transbordar alegria, renovando minhas energias com seus espíritos angelicais; A minha namorada Laís por acreditar no meu potencial, ser meu apoio e permanecer ao meu lado. Família, o bem mais precioso que temos!

AGRADECIMENTOS

A Deus por permitir que eu tivesse saúde e determinação para não desanimar durante a realização desta pesquisa.

A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” pela oportunidade de aprendizado e desenvolvimento acadêmico.

A financiadora deste trabalho que foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento: 88887.480650/2020-00.

A minha orientadora Rosicleire Veríssimo Silveira por aceitar conduzir o trabalho de pesquisa, ter confiado na minha capacidade e pelos ensinamentos de excelência e qualidade técnica durante estes anos. Muito obrigada pela oportunidade que me foi dada, por toda dedicação e motivação para este processo, a fim de presar todo o meu conhecimento e crescimento.

Ao professor Alexandre Ninhaus Silveira, pois o pouco contato que tive foi o suficiente para conhecer o seu empenho e profissionalismo com os orientados.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Animal, Interunidades Ilha Solteira e Dracena, essencialmente a Édna Lorenzon pela disponibilidade de orientação ao regulamento. Assim como os funcionários e professores do Departamento de Biologia e Zootecnia - FEIS por todo o auxílio e suporte ao longo do Mestrado, especialmente ao Wilder, Sidival, Junior e Meiri.

Ao Laboratório de Ictiologia Neotropical - L.I.NEO por disponibilizar os materiais e equipamentos que contemplaram às análises e resultados da pesquisa.

A Patricia Postingel Quirino pela sua paciência, respeito, amizade e dedicação aos ensinamentos construtivos vindos de toda a sua experiência. Principalmente por auxiliar nas coletas biológicas e me disponibilizar parte de seu material de Doutorado. Obrigada por ser tão especial!

A Luciane Gomes da Silva por ser sempre minha companheira de laboratório e do manejo da estufa experimental de reprodução de peixes. Obrigada por apontar meus erros e acertos! Continue sempre esta mulher comprometida nas suas metas e cuidadosa com todos em sua volta!

A todos os companheiros de Laboratório, mas não menos importantes: Bárbara Bianchini, Bárbara Ribeiro, Bianca, Bruna, Cariby, Crystal, Evillyn, Jéssica, Jordana, Laícia, Laís Borges, Lorena Pacheco, Luana, Malbelys, Maria Luiza, Marina, Stella, Vitória, Yane, Yasmin Forni e Yasmin Reis. Gratidão pela convivência diária e disposição em auxiliarem nos momentos necessários. Este trabalho tem um pouco de cada pessoa da equipe, seja de um aprendiz ou um ombro amigo.

A minha turma de Mestrado, André, Bianca Luany, Jéssica e Rafaela, que mesmo com a maioria das aulas sendo à distância, vocês foram fundamentais para o percurso das disciplinas.

A professora Rosemeire Filardi por ser sempre querida e paciente! As suas disciplinas foram valorosas para o desenvolvimento da escrita deste projeto.

Aos membros da Banca Examinadora de Qualificação: Diógenes Henrique de Siqueira Silva, Flávia Cristina Rodrigues Lisoni e Giovana Souza Branco. Muito obrigada pelo interesse e disponibilidade em contribuírem no meu trabalho.

Aos membros da Banca Examinadora de Defesa: Daniela Carvalho dos Santos e Diógenes Henrique de Siqueira Silva. Muito obrigada por todas as considerações e contribuições promissoras que complementaram a dissertação.

Aos amigos de encontros que o Mestrado me presenteou, Bruna, Jéssica, Katherine, Lorena Moro, Stella, Valdomiro, Yane e Yasmim Forni. Em especial, Laícia e Luciane, por me acolherem no período que eu mais precisei. Muito obrigada pela amizade, carinho, risadas, choros, entre outros atributos que me fortaleceram para que permanecesse no foco do meu objetivo. Sozinhos não somos nada!

A minha mãe Rosa e pai João. Vocês são meus exemplos de simplicidade e honestidade, pois me ensinaram que podemos trilhar nosso caminho sempre com humildade. “Tudo o que é feito com muito amor e esforços, o universo conspira ao nosso favor para que nada seja em vão”. Aos meus irmãos Miriam e Eidi por todo apoio emocional e acreditarem na minha aptidão! Eu sou eternamente grata! Amo todos vocês!

A minha namorada Laís Bernini Agútoli por todo o amor e companheirismo! Você é minha motivação diária, sem a sua compreensão e paciência demonstrada durante o período deste trabalho, eu não chegaria até aqui. Muito obrigada por ser tão maravilhosa e sempre estar disposta para cuidar de nós! Te amo muito!

As minhas amigas de infância, adolescência e do resto da vida que muitas vezes não conseguimos nos reunir, mas continuamos torcendo uma pela à outra. *“As coisas mudam, todos crescemos, mas se a amizade é verdadeira ela permanece”* (Samuel Rocha).

Aos meus familiares e os familiares da minha namorada, amigos e professores de trabalho e da graduação, que mesmo estando longe ou perto de alguma maneira fizeram parte deste progresso. Meus sinceros agradecimentos!

Mas, também não posso esquecer de agradecer a mim mesma. Por não ter desistido de lutar dos meus sonhos e objetivos. Por ter aprendido a me valorizar, transformar e renovar meus pensamentos, pois, diante de todas as dificuldades encontradas do dia a dia, mantive firme, encorajada e responsável para que pudesse chegar até aqui.

**“O RESULTADO DO QUE FIZEMOS,
NOS ESPERA MAIS ADIANTE”**

Allan Kardec

RESUMO

Os peixes neotropicais migradores, quando mantidos em cativeiros nas pisciculturas, apresentam alterações no desenvolvimento ovariano no decorrer do processo da gametogênese, impedindo a maturação final dos oócitos. Assim, se faz necessário o entendimento das distintas particularidades das células germinativas da espécie para que não aconteça a supressão da reprodução. Deste modo, o objetivo deste estudo foi analisar o desenvolvimento de oócitos primários em estágio de diplóteno da piracanjuba, *Brycon orbignyanus* mantidas em sistema de recirculação até o terceiro ano de vida, em relação às mudanças no tecido ovariano, quando associados às fases reprodutivas e valores do índice gonadossomático (IGS) e hepatossomático (IHS). Para tal, foram utilizadas dezoito fêmeas de *B. orbignyanus* com idades de quatro meses, um ano, dois anos ($n = 5$ por idade) e três anos ($n = 3$), mantidas em sistema controlado de recirculação. Os ovários e fígados foram removidos para cálculos dos índices somáticos e os ovários processados para microscopia de luz. Para a análise morfométrica e quantitativa dos oócitos foram definidos três estágios celulares presentes nas ($n = 18$) fêmeas, denominados por: diplóteno precoce pelo grau da basofilia nuclear, diplóteno intermediário pelo início da basofilia citoplasmática e, o perinucleolar com os nucléolos rentes ao córtex nuclear. As fêmeas de *B. orbignyanus* permanecem imaturas até os dois anos, apresentando no epitélio germinativo apenas oócitos pré-vitelogênicos e aos três anos de idade inicia o desenvolvimento ovariano inicial, com a presença de oócitos em vitelogênese inicial, além dos pré-vitelogênicos. Os diplótenos precoces e intermediários não diferiram significativamente quando comparados às médias do diâmetro (μm) celular e nuclear entre os espécimes, entretanto, o mesmo não ocorreu com os perinucleolares, apresentando diferenças significativas ($p < 0,05$) entre todas as idades. Estatisticamente ocorre a maior presença dos diplótenos precoces e intermediários nas fêmeas com quatro meses e um ano de idade. Já os perinucleolares, apresentam maior número aos dois e três anos. Houve o aumento nos valores de IGS, com maior pico nas fêmeas com três anos, porém, o maior pico de IHS ocorreu nas fêmeas com quatro meses, cujo, estes fatores não são correlacionados. Conclui-se que em *B. orbignyanus* com diferentes idades, os diplótenos precoces e intermediários apresentam os mesmos padrões morfométricos. Por outro lado, os perinucleolares aumentam de tamanho juntamente com o desenvolvimento ovariano, conforme o avanço da idade. O aumento no volume celular coincide com o aumento do IGS, mas quando associados às fases do ciclo reprodutivo, as fêmeas de quatro meses a dois anos encontram-se imaturas e somente aos três anos alcançam à fase adulta. Este estudo forneceu informações que contribuirão no entendimento da cinética do desenvolvimento do oócito de crescimento primário em estágio de diplóteno em relação as alterações no ovário de *B. orbignyanus*, que serviram de base em conjunto com os dados de IGS e IHS como parâmetros indicativos da fase reprodutiva que a espécie se encontra em sistema de cultivo ao longo do tempo.

Palavras-chave: diâmetro celular; fases reprodutivas; idade; oócitos primários; peixes neotropicais; sistema de recirculação.

ABSTRACT

Neotropical migratory fish, when kept in captivity in fish farms, present alterations in the ovarian development during the gametogenesis process, preventing the final maturation of oocytes. Thus, it is necessary to understand the different characteristics of the germ cells of the species so that reproduction is not suppressed. Thus, the objective of this study was to analyze the development of primary oocytes at the diplotene stage of piracanjuba, *Brycon orbignyanus* kept in a recirculation system until the third year of life, in relation to changes in the ovarian tissue, when associated with reproductive stages and values of the gonadosomatic index (GSI) and hepatosomatic index (HSI). For this purpose, eighteen females of *B. orbignyanus* with ages of four months, one year, two years ($n = 5$ per age) and three years ($n = 3$) were used, kept in a controlled recirculation system. The ovaries and livers were removed for somatic index calculations and the ovaries processed for light microscopy. For the morphometric and quantitative analysis of the oocytes, three cellular stages were defined in the ($n = 18$) females, designated as: early diplotene by the degree of nuclear basophilia, intermediate diplotene by the onset of cytoplasmic basophilia, and perinucleolar with nucleoli flush with the nuclear cortex. The females of *B. orbignyanus* remain immature until two years of age, presenting in the germinative epithelium only pre-vitellogenic oocytes and at three years of age the initial ovarian development begins, with the presence of oocytes in initial vitellogenesis, besides the pre-vitellogenic ones. Early and intermediate diplotene did not differ significantly when comparing the mean cell and nuclear diameters (μm) between specimens, however, the same did not occur with the perinucleolar ones, showing significant differences ($p < 0.05$) between all ages. Statistically, there was a greater presence of early and intermediate diplotene in females four months and one year old. The perinucleolar ones, on the other hand, present a higher number at two and three years of age. There was an increase in GSI values, with a higher peak in females at three years of age; however, the highest HSI peak occurred in females at four months of age, and these factors are not correlated. It is concluded that in *B. orbignyanus* at different ages, early and intermediate diplotene show the same morphometric patterns. On the other hand, perinucleolar increase in size along with ovarian development as age advances. The increase in cell volume coincides with the increase in GSI, but when associated with the phases of the reproductive cycle, females from four months to two years are immature and only at three years reach adulthood. This study provided information that will contribute to the understanding of the kinetics of primary growth oocyte development at the diplotene stage in relation to changes in the ovary of *B. orbignyanus*, which served as a basis in conjunction with the GSI and HSI data as parameters indicative of the reproductive phase that the species is in the culture system over time.

Keywords: cell diameter; reproductive phases; age; primary oocytes; neotropical fishes; recirculation system.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Exemplar adulto de <i>Brycon orbignyanus</i>	14
Figura 2. Acondicionamento dos animais	25
Figura 3. Exemplares fêmeas de <i>B. orbignyanus</i> coletadas em diferentes idades.....	25
Figura 4. Quadrorama ilustrativo dos oócitos de crescimento primário em estágio de diplóteno definidos para as análises.	27
Figura 5. Quadrorama ilustrativo da análise quantitativa dos oócitos de crescimento primário em estágio de diplóteno.	27
Tabela 1. Valores médios da massa ovariana (g) e do diâmetro ovariano (mm) de <i>B. orbignyanus</i> em diferentes idades.	29
Figura 6. Descrição macroscópica e microscópica dos ovários de <i>B. orbignyanus</i> em diferentes idades.	30
Figura 7. Morfologia dos oócitos de crescimento primário em estágio de diplóteno precoce e intermediário de <i>B. orbignyanus</i> em diferentes idades.....	33
Figura 8. Morfologia do oócito perinucleolar de <i>B. orbignyanus</i> em diferentes idades.	35
Tabela 2. Médias comparativas da análise morfométrica dos oócitos de crescimento primário em estágio de diplóteno de <i>B. orbignyanus</i> em diferentes idades.....	36
Figura 9. Correlação positiva entre o diâmetro (µm) nuclear e celular dos oócitos de crescimento primário em estágio de diplóteno de <i>B. orbignyanus</i> em diferentes idades.....	37
Figura 10. Representação gráfica das médias comparativas da análise quantitativa dos oócitos de crescimento primário em estágio de diplóteno de <i>B. orbignyanus</i> em diferentes idades.....	37
Figura 11. Representação gráfica dos valores médios do índice gonadossomático e índice hepatossomático de <i>B. orbignyanus</i> em diferentes idades.....	38
Figura 12. Correlação negativa entre os valores de IGS e IHS de <i>B. orbignyanus</i> em diferentes idades.....	39

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	12
1.1	Aspectos reprodutivos de fêmeas de peixes com ênfase na oogênese e foliculogênese	12
1.2	Espécie do estudo e caracterização da problemática	14
2	OBJETIVO GERAL	17
2.1	Objetivos específicos.....	17
	REFERÊNCIAS	18
3	CAPÍTULO I: Caracteres do desenvolvimento oocitário e ovariano da piracanjuba, <i>Brycon orbignyanus</i> (Bryconidae) em sistema de recirculação nos três primeiros anos de vida	22
3.1	INTRODUÇÃO	22
3.2	MATERIAL E MÉTODOS	24
3.2.1	<i>Manejo dos animais.....</i>	<i>24</i>
3.2.2	<i>Coleta do material biológico e procedimentos histológicos</i>	<i>25</i>
3.2.3	<i>Análises dos aspectos macro e microscópicos dos ovários.....</i>	<i>26</i>
3.2.4	<i>Análise do Índice Gonadossomático (IGS) e Índice Hepatossomático (IHS) ..</i> <i>.....</i>	<i>28</i>
3.2.5	<i>Análise Estatística</i>	<i>28</i>
3.2	RESULTADOS.....	28
3.2.1	<i>Ovários de <i>Brycon orbignyanus</i> em diferentes idades</i>	<i>28</i>
3.2.1.1	<i>Aspectos Macroscópicos.....</i>	<i>28</i>
3.2.1.2	<i>Aspectos Microscópicos.....</i>	<i>31</i>
3.2.3	<i>Características morfológicas dos oócitos de crescimento primário em estágio de diplóteno de <i>Brycon orbignyanus</i> em diferentes idades</i>	<i>32</i>
3.2.4	<i>Relação morfométrica dos oócitos de crescimento primário em estágio de diplóteno de <i>Brycon orbignyanus</i> em diferentes idades.....</i>	<i>36</i>
3.2.5	<i>Relação quantitativa dos oócitos de crescimento primário em estágio de diplóteno de <i>Brycon orbignyanus</i> em diferentes idades.....</i>	<i>37</i>
3.2.6	<i>Análise dos Índices Gonadossomático (IGS) e Hepatossomático (IHS).....</i>	<i>38</i>
3.3	DISCUSSÃO	39
	REFERÊNCIAS	45
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	49

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Aspectos reprodutivos de fêmeas de peixes com ênfase na oogênese e foliculogênese

Espécies de peixes reofílicas nativas das bacias hidrográficas brasileiras com potencial comercial e econômico têm ganhado atenção especial na aquicultura, devido à rápida adaptação e crescimento em ambientes controlados (NUNES *et al.*, 2018; ZANIBONI-FILHO; WEINGARTNER, 2007), bem como, na redução da pressão de populações nos estoques naturais (ZARDO *et al.*, 2021; SGNAULIN *et al.*, 2018).

Entretanto, o cultivo controlado de peixes exige um conjunto de protocolos específicos que contemplem a sincronia entre os fatores endógenos e exógenos, otimizando no sucesso de indução a desova (NUNES *et al.*, 2018; ZANIBONI-FILHO; WEINGARTNER, 2007), pois a falha desta atividade influencia diretamente no desenvolvimento oocitário e, conseqüentemente, na qualidade, integridade e viabilidade do oócito (ZARSKI *et al.*, 2011).

As etapas do desenvolvimento oocitário envolvem uma série de eventos morfológicos celular, que constituem na formação completa do complexo folicular e alterações no tecido ovariano (GRIER, 2012; MAZZONI; GRIER; QUAGIO-GRASSIOTTO, 2010; GUIMARÃES; QUAGIO-GRASSIOTTO, 2005). Este processo, denominado por oôgenese, compreende o crescimento primário (pré-vitelogênese), envolvendo a foliculogênese e o crescimento secundário (vitelogênese) (GRIER; NEIDIG; QUAGIO-GRASSIOTTO, 2017; QUAGIO-GRASSIOTTO *et al.*, 2011; GRIER; URIBE; PARENTI, 2007).

Deste modo, o epitélio germinativo feminino é composto por dois tipos celulares: as células somáticas epiteliais que estão unidas por desmossomos e junções de oclusão, apoiadas sobre uma membrana basal, cujas passam por diferenciação em células pré-foliculares e foliculares quando associadas às células germinativas primordiais (PGC's), outro tipo celular (QUAGIO-GRASSIOTTO *et al.*, 2011; GRIER, 2000).

Por divisões mitóticas as PGC's diferenciam-se em oogônias A-indiferenciadas, A-diferenciadas e oogônias-B (QUIRINO *et al.*, 2021; QUAGIO-GRASSIOTTO; WILDNER; ISHIBA, 2013), que por sua vez são as precursoras da oogênese. As oogônias indiferenciadas permanecem sempre isoladas em ninhos, já as diferenciadas são circundadas pelas células pré-foliculares e organizadas em cisto dentro do ninho que

margeiam as lamelas ovígeras (MAZZONI; BOMBARDELLI; QUAGIO-GRASSIOTTO, 2020; JESUS-SILVA *et al.*, 2018).

As oogônias-B se diferenciam em oócitos que entram em meiose e permanecem nos cistos como oócitos profásicos (foliculogênese) (MAZZONI; BOMBARDELLI; QUAGIO-GRASSIOTTO, 2020). A foliculogênese é caracterizada pela presença de oócitos de crescimento primário em prófase da primeira divisão, progredindo aos distintos estágios celulares: leptóteno, zigóteno, paquíteno e diplóteno, sendo distinguidos de acordo com a organização da cromatina para a recombinação gênica (SANTOS-SILVA *et al.*, 2015; MAZZONI; GRIER; QUAGIO-GRASSIOTTO, 2010).

Os oócitos em diplóteno, são individualizados pelas células pré-foliculares, que passam a ser denominadas por foliculares, e estas sintetizam uma nova membrana-basal contínua à membrana do epitélio lamelar (GRIER; NEIDIG; QUAGIO-GRASSIOTTO, 2017; QUAGIO-GRASSIOTTO *et al.*, 2011), formando-se o folículo ovariano e a finalização da foliculogênese (JESUS-SILVA *et al.*, 2018; GRIER; URIBE; PARENTI, 2007). Agora, na fase pré-vitelogênica, os oócitos em diplóteno passam por aumento do volume celular e o aparecimento de substâncias citoplasmáticas lipídicas e proteicas, entre outras estruturas respectivas ao crescimento folicular (GUIMARÃES; QUAGIO-GRASSIOTTO, 2005; WALLACE, SELMAN, 1990).

De maneira geral, o diplóteno é caracterizado pela origem do nucléolo no núcleo que gradativamente aumentam em quantidade e tamanho, migrando para a periferia nuclear, passando a ser classificado como oócito perinucleolar (QUAGIO-GRASSIOTTO; WILDER; ISHIBA, 2013; MAZZONI *et al.*, 2010). Neste, o citoplasma apresenta forte basofilia, podendo ser observadas estruturas chamadas de corpúsculos de Balbiani em torno do núcleo (SANTOS-SILVA *et al.*, 2015; GUIMARÃES; QUAGIO-GRASSIOTTO, 2005). Os corpúsculos de Balbiani representam um aglomerado de organelas membranosas relacionadas às atividades ribossômicas, associadas ao nucléolo (SELMAN; WALLACE, 1989).

Na fase final da pré-vitelogênese ocorre o aparecimento dos alvéolos corticais, rentes à periferia citoplasmática (GRIER, 2012; LOWERRE-BARBIERI *et al.*, 2011), apresentados como vesículas proteicas que serão liberadas no espaço perivitelínico no momento da fertilização (RIZZO *et al.*, 2002).

O surgimento dos alvéolos corticais é uma característica intermédia entre o crescimento primário e secundário dos oócitos, indicando o avanço da oogênese (GRIER; NEIDIG; QUAGIO-GRASSIOTTO, 2017; BROWN-PETERSON *et al.*, 2011).

Simultaneamente, pode ocorrer a origem da zona radiata e indícios da formação das tecas interna e externa, originárias das células mesenquimais do estroma ovariano (GRIER; URIBE; PARENTI, 2007).

No decorrer da formação folicular, inicia-se a deposição de vitelo que conduz no crescimento secundário (vitelogênicos) (GRIER, 2012). A vitelogenina é uma glicofosfolipoproteína responsável pela maturação e ovulação, que servirá de reserva energética ao embrião em desenvolvimento (QUAGIO-GRASSIOTTO *et al.*, 2013; MAZZONI; GRIER; QUAGIO-GRASSIOTTO, 2010).

A meiose I é somente retomada no final da maturação do folículo, caracterizado pela migração do núcleo para a região da micrópila (GANECO; NAKAGHI, 2003), ocorrendo a finalização da primeira divisão (QUAGIO-GRASSIOTTO *et al.*, 2013). A segunda divisão meiótica só irá ocorrer após a penetração do espermatozoide na micrópila, no momento da fecundação (JESUS-SILVA *et al.*, 2018; QUAGIO-GRASSIOTTO *et al.*, 2013).

O conhecimento das características morfológicas celulares é de grande importância na classificação das fases do ciclo reprodutivo e no entendimento das alterações no ovário. Estes aspectos agregam informações primordiais na adoção de estratégias de manejo em condições de cultivo e na conservação da espécie.

A exemplo da piracanjuba, *Brycon orbignyanus*, cujo interesse econômico é voltado para a produção comercial de alevinos por programas de repovoamento (ZARDO *et al.*, 2021) considerada uma espécie com status “criticamente em perigo” no Livro Vermelho da Fauna Ameaçada de Extinção, sendo classificada na categoria (CR), com base no declínio estimado de aproximadamente 97% da área de ocupação original nas Bacias Brasileiras dos rios Paraná e Uruguai (ICMBIO, 2022).

1.2. Espécie do estudo e caracterização da problemática

Figura 1. Exemplar adulto de *Brycon orbignyanus*.



Fonte: Próprio autor.

Brycon orbignyanus (VALENCIENNES, 1850), pertence à família Briconidae, subfamília Bryconinae e gênero *Brycon* (ABE *et al.*, 2014). Popularmente conhecida como piracanjuba, com ocorrência natural na Bacia do Prata, formada pelos rios Paraná, Uruguai e Paraguai (LIMA, 2017).

Espécie que desperta interesse comercial em razão de seu rápido crescimento e carne saborosa (CECCARELLI *et al.*, 2010), com destaque na pesca esportiva pelo seu comportamento agressivo que favorece a atividade (OLIVEIRA *et al.*, 2017; CASTAGNOLLI, 1992).

Apresenta a cabeça pequena, com boca em posição terminal, o corpo fusiforme e prateado, dorso castanho escuro com uma mancha negra na base do pedúnculo caudal, estendendo-se até os raios caudais medianos (CECCARELLI *et al.*, 2005; VAZ; TORQUATO; BARBOSA, 2000).

Possui hábito alimentar onívoro e devido as alterações ao longo do desenvolvimento ontogenético, durante a fase larval preferem alimentos de origem animal e zooplâncton, já na fase juvenil e adulta se alimentam de frutas e sementes (BORBA; FRACALOSSO; PEZZATO, 2006; CECCARELLI *et al.*, 2005). 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 *et al.*, 2010).

A piracanjuba possui desova total e sazonal, com primeira maturação tardia (CECCARELLI *et al.*, 2010). A fêmea alcança a maturidade sexual por volta dos três anos de idade (QUIRINO *et al.*, 2021), já o macho, por volta dos dois anos (ZARDO *et al.*, 2021). Migra longas distâncias para se reproduzir, subindo o rio entre setembro e outubro, e desovando entre novembro e janeiro (LIMA, 2017), período comumente conhecido por piracema que se estende à época de chuvas, com maiores índices pluviométricos, altas temperaturas e maior disponibilidade de alimentos (VAZ; TORQUATO; BARBOSA, 2000; VAZZOLER; MENEZES, 1992).

Trata-se de uma espécie com grande importância ecológica devido a sua visível sensibilidade e intolerância às mudanças da dinâmica da água (TONELLA *et al.*, 2019; LOPERA-BARRERO, 2009). Desta maneira, o aumento das populações nos rios onde se encontra sinaliza o bom estado de conservação ambiental, por outro lado, a não habitação da população, considera-se indícios de problemas no local (LOPERA-BARRERO, 2009).

Para tanto, por motivo de inúmeras intervenções antrópicas, tais como a construção de barragens que impede o processo de migração reprodutiva, a pesca irregular, a poluição das águas e a introdução de espécies exóticas, contribuem na

destruição do habitat e das áreas de desovas (CECCARELLI *et al.*, 2010; VAZ; TORQUATO; BARBOSA, 2000). Conforme pontuado por Tonella e colaboradores (2019), na qual a degradação da vegetação ribeirinha afeta diretamente na dieta alimentar natural da piracanjuba, refletindo-se no seu declínio populacional.

Consequentemente, a espécie está enfrentando um risco muito alto de extinção na natureza (ICMBIO, 2022), com registros unicamente nas bacias do Rio Grande e Paranapanema e, considerada frequente no trecho não represado do Rio Paraná entre o reservatório de Itaipu e Porto Primavera (TONELLA *et al.*, 2019; OLIVEIRA *et al.*, 2017).

Todavia programas de desovas, criação em cativeiros e armazenamentos de reservatórios induzidos, promovidos por concessionárias hidrelétricas para o repovoamento têm sido implementados com o propósito de mitigar os efeitos extrínsecos negativos, mas, para que isso seja possível é fundamental o conhecimento da biologia reprodutiva da espécie, principalmente entender como a organização do desenvolvimento das células gaméticas é definida (OLIVEIRA *et al.*, 2017; LOPERA-BARRERO, 2009).

Neste intuito, procedimentos adequados para a sua manipulação em criadouros vêm sendo estudados a fim de estabelecer protocolos para o sucesso reprodutivo (ZARDO *et al.*, 2021; QUIRINO *et al.*, 2021; BORBA *et al.*, 2003; GANECO *et al.*, 2001).

Por um lado, o condicionamento da piracanjuba se torna propício a sua boa aceitação a ração artificial que se curvam sob domesticação, fazendo deste peixe um ótimo modelo para o desenvolvimento de programas de melhoramento e de conservação em ambientes aquícolas, no que poderia assegurar a sua preservação (NOGUEIRA; GODINHO; GODINHO, 2012; BORBA; FRACALOSSO; PEZZATO, 2006) e de outro modo, a adaptação reprodutiva nesse sistema ainda encontra-se em grandes dificuldades por serem animais migratórios e consequentemente, sofrerem com o estresse do manejo (LOPERA-BARRERO *et al.*, 2009).

Considerando a importância ecológica e econômica de *B. orbignyanus* em razão de sua interação sincrônica com o meio ambiente e, devido as dificuldades que ainda se deparam na conservação da espécie, podendo agravar progressivamente seu risco de total extinção. Se faz necessário, estudos histológicos do desenvolvimento oocitário de espécimes em condições de sistema de recirculação que permitem contribuir no entendimento das alterações ovariana e no ciclo reprodutivo. Agregando conhecimentos ao planejamento do manejo biotecnológico de conservação e cultivo para que atendam as peculiaridades específicas da espécie sob sistema controlado.

2. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi caracterizar e analisar a cinética do desenvolvimento de oócitos de crescimento primário e ovariano da piracanjuba, *Brycon orbignyanus* em sistema de recirculação nos três primeiros anos de vida, contribuindo para a compreensão da fase reprodutiva que a espécie se encontra em ambiente controlado.

2.1. Objetivos específicos

- Analisar e descrever os caracteres macro e microscópicos dos ovários de *B. orbignyanus*, determinando as fases reprodutivas nas diferentes idades;
- Analisar os parâmetros morfométricos e quantitativos dos oócitos em estágio de diplóteno para conciliar no entendimento do desenvolvimento celular e nas mudanças no tecido ovariano;
- Determinar a correlação dos valores de IGS e IHS com a idade.

REFERÊNCIAS

- ABE, K. T.; MARIGUELA, T. C.; AVELINO, G. S.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Systematic and historical biogeography of the Bryconidae (Ostariophysi: Characiformes) suggesting a new rearrangement of its genera and an old origin of Mesoamerican Ichthyofauna. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 14, n. 152, p. 1-15, 2014.
- BORBA, M. R.; FRACALOSSI, D. M.; PEZZATO, L. E.; MENOYO, D.; BAUTISTA, J. M. Growth, lipogenesis and body composition of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) fingerlings fed different dietary protein and lipid concentrations. **Aquatic Living Resources**, Les Ulis, v. 16, p. 362-369, 2003.
- BORBA, M. R.; FRACALOSSI, D. M.; PEZZATO, L. E. Dietary energy requirement of piracanjuba fingerlings, *Brycon orbignyanus*, and relative utilization of dietary carbohydrate and lipid. **Aquaculture Nutrition**, Chichester, v. 12, p. 183-191, 2006.
- 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**, Chichester, v. 3, p. 52-70, 2011.
- 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. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: UFSM, 2005. p. 121-147.
- 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.
- GANECO, L. N.; NAKAGHI, L. S. O. Morfologia da micrópila e da superfície dos ovócitos de piracanjuba, *Brycon orbignyanus* (Osteichthyes, Characidae), sob microscopia eletrônica de varredura. **Acta Scientiarum - Biological Sciences**, Maringá, v. 25, n. 1, p. 227-231, 2003.
- GANECO, L. N.; NAKAGHI, L. S. O.; URBINATI, E. C.; DUMONT-NETO, R. & VASQUES, L. H. Análise morfológica do desenvolvimento ovocitário de piracanjuba, *Brycon orbignyanus*, durante o ciclo reprodutivo. **Bolm. Instit. Pesca**, São Paulo, v. 27(2), p. 131-138, 2001.
- GUIMARÃES, A. C. D.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I. Cytochemical characterization of the endomembranous system during the oocyte primary growth in *Serrasalmus spilopleura* (Teleostei: Characiformes, Characidae). **Tissue & Cell**, Amsterdam, v. 37, p. 413-422, 2005.

GRIER, H. J. Ovarian germinal epithelium and folliculogenesis in the Common Snook, *Centropomus undecimalis* (Teleostei: Centropomidae). **Journal of Morphology**, Hoboken, v. 243, p. 265-281, 2002.

GRIER, H. J. Development of the Follicle Complex and Oocyte Staging in Red Drum, *Sciaenops ocellatus* Linnaeus, 1776 (Perciformes, Sciaenidae). **Journal of Morphology**, Hoboken, v. 273, p. 801-829, 2012.

GRIER, H. J.; NEIDIG, C. L.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I. Development and fate of the postovulatory follicle complex, postovulatory follicle, and observations on folliculogenesis and oocyte atresia in ovulated common snook, *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1792). **Journal of Morphology**, Hoboken, p. 1-16, 2017.

GRIER, H. J.; URIBE, M. C.; PARENTI, L. R. Germinal epithelium, folliculogenesis, and postovulatory follicles in ovaries of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792), (Teleostei, Protacanthopterygii, Salmoniformes). **Journal of Morphology**, Hoboken, v. 268: p. 293-310, 2007.

INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE - ICMBio. **Portaria MMA Nº 148, de 7 de junho de 2022**. Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Peixes - *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1850) - Piracanjuba. Disponível em: https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Portaria/2020/P_mma_148_2022_altera_anexos_P_mma_443_444_445_2014_atualiza_especies_ameacadas_extincao.pdf. Acesso em: 25 jul. 2022.

JESUS-SILVA, L. M.; OLIVEIRA, V. P.; RIBEIRO, C. S.; NINHAUS-SILVEIRA, A.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R. **Ovarian cycle in *Devario aequipinnatus* with emphasis on oogenesis**. Cambridge: Cambridge University Press, 2018. v. 26, p. 168-176.

LIMA, F. C. T. A revision of the cis-andean species of the genus *Brycon* Müller & Troschel (Characiformes: Characidae). **Zootaxa**, Auckland, v. 1, p. 001-189, 2017.

LOPERA-BARRERO, N. M. Conservation of *Brycon orbignyanus* natural populations and stocks for their reproductive, genetic, environmental sustainability: A model for species threatened with extinction. **Ciência e Investigación Agraria**, Asuncion, v. 36, p. 191208, 2009.

LOWERRE-BARBIERI, S. K.; BROWN-PETERSON, N. J.; MURUA, H.; TOMKIEWICZ, J.; WYANSKI, D.; SABORIDO-REY, F. Emerging issues and methodological advances in fisheries reproductive biology. **Marine and Coastal Fisheries**, Chichester, v. 3, p. 32-51, 2011.

MAZZONI, T. S., BOMBARDELLI, R. A.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I. Reproductive biology of neotropical fishes: A guide to identification to the gonadal morphology during the reproductive cycle of catfish *Rhamdia quelen* (Siluriformes: Heptapteridae). **Aquatic Science and Technology**, Beaver Creek, v. 8, p. 1535, 2020.

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). **The Anatomical Record**, Hoboken, v. 293, n. 9, 2010.

MAZZONI, T. S.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I. Ovary differentiation and activity in Teleostei fish. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 7, p. 129-156, 2017.

NOGUEIRA, L. B.; GODINHO, A. L.; GODINHO, H. P. Early development and allometric growth in hatcheryreared characin *Brycon orbignyanus*. **Aquaculture Research**, Chichester, v. 45, p. 1004-1011, 2012.

NUNES, L. T.; SALMITO-VANDERLEY, C. S. B.; REIS, F. Y. T.; NERES, R. W. P.; DA SILVA, S. Q. Reprodução de peixes reofílicos nativos do Brasil: fertilização artificial e qualidade da água. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 42, n. 1, p. 15-21, 2018.

OLIVEIRA, D. J.; ASHIKAGA, F. Y.; FORESTI, F.; SENHORINI, J. A. Conservation Status of the “Piracanjuba” *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1850) (Characiformes, Bryconidae): Basis for Management Programs. **Biodiversidade Brasileira**, Brasília, DF, v. 7, p. 18-33, 2017.

QUAGIO-GRASSIOTTO, I.; GRIER, H.; MAZZONI, T. S.; NÓBREGA, R. H.; AMORIM, J. P. A. Activity of the ovarian germinal epithelium in the freshwater catfish, *Pimelodus maculatus* (Teleostei: Ostariophysi: Siluriformes): germline cysts, follicle formation and oocyte development. **Journal of Morphology**, Hoboken, v. 272, n. 11, p. 1290-306, 2011.

QUAGIO-GRASSIOTTO, I.; WILDER, D. D.; ISHIBA, R. Gametogênese de peixes: aspectos relevantes para o manejo reprodutivo. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 2, p. 181-91, 2013.

QUIRINO, P. P.; DELAGADO, M. 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**, Chichester, v. 53, n. 5, 2021.

RIZZO, E.; SATO, Y.; BARRETO, B. P.; GODINHO, H. P. Adhesiveness and surface patterns of eggs in neotropical freshwater teleosts. **Journal of Fish Biology**, Chichester, v. 61, n. 3, p. 615-632, 2002.

SANTOS-SILVA, A.; SIQUEIRA-SILVA, D.; NINHAUS-SILVEIRA, A.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R. Oogênese em *Laetacara araguaiae* (Ottoni e Costa, 2009) (Labriformes: Cichlidae). **Zigote**, Shaftesbury, v. 24, n. 4, p. 502-510, 2015.

SELMAN, K.; WALLACE, R. A. Aspectos celulares do crescimento oocitário em teleósteos. **Zoological Science**, Tokyo, v. 6, p. 211-31, 1989.

SGNAULIN, T.; MELLO, G. L.; THOMAS, M. C.; GARCIA, J. R. E.; OCA, G. A. R. M.; EMERENCIANO, M. G. C. Biofloc technology (BFT): An alternative aquaculture system for piracanjuba *Brycon orbignyanus*? **Aquaculture**, Amsterdam, v. 485, p. 119-123, 2018.

TONELLA, L. H.; DIAS, R. M.; VITORINO, O. B. V.; FUGI, R.; AGOSTINHO, A. A. Conservation status and bioecology of *Brycon orbignyanus* (Characiformes: Bryconidae), an endemic fish species from the Paraná River basin (Brazil) threatened with extinction. **Neotropical Ichthyology**, São Paulo, v. 17, 2019.

VAZ, M. M.; TORQUATO, V. C.; BARBOSA, N. D. C. **Guia ilustrado de peixes da bacia do Rio Grande**. Companhia Energética de Minas Gerais. Belo Horizonte: CEMIG/CETEC, 2000. 144 p.

VAZZOLER, A. E. A. de M.; MENEZES, N. A. Síntese de conhecimentos sobre o comportamento reprodutivo dos Characiformes da América do Sul (Teleostei, Ostariophysi). **Revista Brasileira de Biologia**, São Carlos, v. 52, n. 4, p. 627- 640, 1992.

WALLACE, R. A.; SELMAN, K. Ultrastructural aspect of oogenesis and oocyte growth in fish and amphibians. **Journal of Electron Microscopy Technique**, [s. l.], v. 16, p. 175-201, 1990.

ZANIBONI-FILHO, E.; WEINGARTNER, M. Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 31, n. 3, p. 367-373, 2007.

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

ZARSKI, D.; PALINKA, K.; TARGONSKA, K.; BOKOR, Z.; KITRIK, L.; KREJSZEFF, S.; KUPREN, K.; HORVATH, A.; URBANYI, B.; KUCHARCZYK, D.; Oocyte quality indicators in Eurasian perch, *Perca fluviatilis* L., during reproduction under controlled conditions. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 313, n. 1-4, p. 84-91, 2011.

3 CAPÍTULO I: Caracteres do desenvolvimento oocitário e ovariano da piracanjuba, *Brycon orbignyanus* (Bryconidae) em sistema de recirculação nos três primeiros anos de vida

RESUMO

O estudo do desenvolvimento oocitário de peixes reofílicos em condições de cultivo é primordial para compreensão do ciclo reprodutivo. O trabalho teve por objetivo analisar se a cinética do desenvolvimento de oócitos de crescimento primário em estágio de diplóteno influenciam nas mudanças do tecido ovariano da piracanjuba, *Brycon orbignyanus* em sistema de recirculação ao longo dos três primeiros anos de vida, associando-se estes parâmetros às fases reprodutivas e valores dos índices gonadosomático (IGS) e hepatossomático (IHS). Por meio da histologia foram identificadas e selecionadas fêmeas nas idades: (n = 5) quatro meses de vida, (n = 5) um ano, (n = 5) dois anos, (n = 3) três anos, e mensurados os dados biométricos. Para as análises dos oócitos foram estabelecidos três estágios celulares presentes nas (n = 18) fêmeas, denominados por: diplóteno precoce pelo grau da basofilia nuclear, diplóteno intermediário pelo início da basofilia citoplasmática e, o perinucleolar com os nucléolos rentes ao córtex nuclear. Fêmeas de quatro meses a dois anos foram caracterizadas imaturas, e em desenvolvimento inicial às fêmeas de três anos. Diplótenos precoces e intermediários não diferiram estatisticamente o diâmetro celular e nuclear entre os espécimes. Já os perinucleolares foram diferentes em todas as idades. Ocorre maior presença de diplótenos precoces e intermediários nas fêmeas mais jovens. Entretanto, os perinucleolares apresentam maior número aos dois e três anos, que condizem com o aumento do ovário, conforme o avanço da idade. O valor máximo de IGS foi apresentado nas fêmeas com três anos, enquanto, o maior IHS ocorreu aos quatro meses de vida. Conclui-se que em *B. orbignyanus* o aumento do volume e da quantidade dos oócitos primários elucidam as alterações no ovário, que de fato coincidem com o aumento do IGS, mas quando associados às fases reprodutivas, as fêmeas de quatro meses a dois anos encontram-se imaturas e somente aos três anos alcançam à fase adulta.

Palavras-chave: Condições de cultivo. Diâmetro celular. Fases reprodutivas. Idade. Oócitos primários. Peixes reofílicos.

3.1 INTRODUÇÃO

O conhecimento das alterações morfológicas das células germinativas de fêmeas de peixes no ambiente controlado é de grande importância para a compreensão da atividade reprodutiva (MAZZONI; BOMBARDELLI; QUAGIO-GRASSIOTTO, 2020; GRIER; URIBE; PARENTI, 2007), principalmente às espécies reofílicas que têm se destacado no interesse comercial e econômico (NUNES *et al.*, 2018; ZANIBONI-FILHO; WEINGARTNER, 2007) e, na restauração de estoques naturais (ZARDO *et al.*, 2021; SGNAULIN *et al.*, 2018). Uma vez que a reprodução não ocorre naturalmente em cativeiro (ARIAS *et al.*, 2004; ZAIDEN, 2000) pela privação do comportamento

migratório sincrônico com o preparo fisiológico de maturação e desova (DEVLIN; NAGAHAMA, 2002).

O processo de oogênese compreende os estágios das células germinativas de crescimento primário (pré-vitelogênico) e secundário (vitelogênico) (SANTOS-SILVA *et al.*, 2015; QUAGIO-GRASSIOTTO; WILDNER; ISHIBA, 2013; BROWN-PETERSON *et al.*, 2011), que podem ser identificados em diferentes aspectos, como morfologia nuclear, presença de substâncias citoplasmáticas (GRIER; NEIDIG; QUAGIO-GRASSIOTTO, 2017; REECE *et al.*, 2015), estruturas proteicas e polissacarídeos (RIZZO *et al.*, 2002) e diâmetro do oócito (VAZZOLER, 1996; SELMAN; WALLACE, 1989).

Um método alternativo para o entendimento do desenvolvimento oocitário é por meio de monitoramento da frequência do diâmetro do oócito ao longo do seu crescimento, permitindo estabelecer parâmetros morfométricos dos diferentes estágios celulares da espécie (JESUS-SILVA *et al.*, 2018; GRIER, 2012; ARIAS; ZANIBONI-FILHO; AYA, 2006; SPADELLA *et al.*, 2005; GANECO *et al.*, 2001; ROMAGOSA; PAIVA; GODINHO, 1990; MAYER; SHACKLEY; RYLAND, 1988; WALLACE; SELMAN, 1981), pois, o tamanho do oócito influencia positivamente na sua qualidade, integridade, viabilidade e fertilização (ZARSKI *et al.*, 2011).

Neste contexto, na tentativa de compreender como ocorre o desenvolvimento do folículo ovariano no estágio pré-vitelogênico em espécie reofílica sob sistema de cultivo, foi selecionada a piracanjuba, *Brycon orbignyanus*, um peixe neotropical, pertencente à família Bryconidae (ABE *et al.*, 2014) e natural da bacia do Prata, formada pelos rios Paraná, Uruguai e Paraguai (LIMA, 2017), sendo mais avistados no alto rio Paraná brasileiro e seus afluentes (TONELLA *et al.*, 2019).

Brycon orbignyanus têm importante valor ecológico em razão de sua visível sensibilidade nas alterações do meio aquático (TONELLA *et al.*, 2019; ZANIBONI-FILHO; SCHULZ, 2003) e, devido a essa intolerância está atualmente categorizada no “Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção” em perigo crítico (CR) de extinção na natureza (ICMBIO, 2022). Ações voltadas para a proteção e conservação natural da espécie foram estabelecidas por programas de reprodução e desovas (LOPERA-BARRERO, 2009), embora o manejo para seu repovoamento nem sempre é eficaz, sendo assim, fundamental o entendimento da gametogênese do indivíduo em cativeiro (ZARDO *et al.*, 2021; QUIRINO *et al.*, 2021).

Este estudo teve por objetivo analisar a cinética do desenvolvimento de oócitos de crescimento primário da piracanjuba, *Brycon orbignyanus* mantidas em sistema de recirculação durante os três primeiros anos de vida, avaliando o volume e quantidade celular com as mudanças no tecido ovariano nas diferentes idades, associados às fases reprodutivas e às variações dos índices gonadossomático (IGS) e hepatossomático (IHS). Tais informações servem de subsídios na compreensão da fase reprodutiva da espécie ao longo do tempo, como também auxiliar no planejamento biotecnológico integrado a conservação de população natural e reprodução em ambientes aquícolas.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

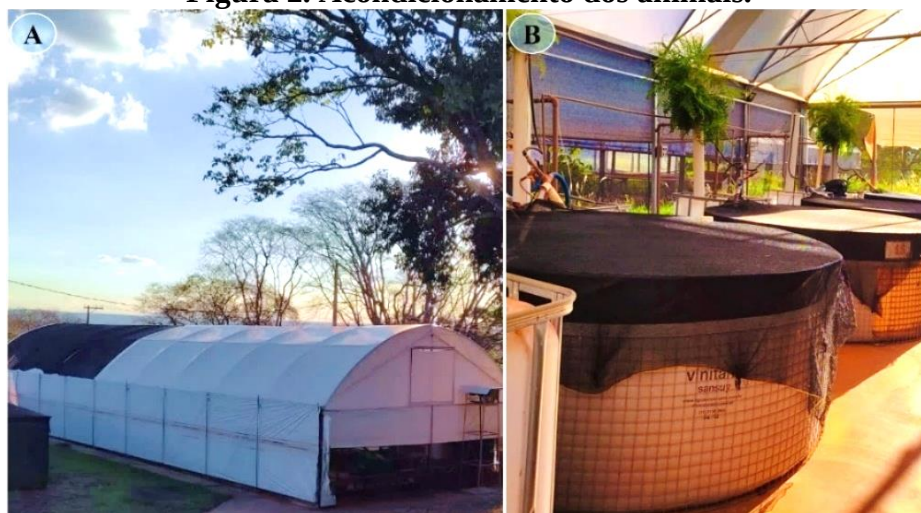
Todos os procedimentos de manejo e eutanásia dos animais foram conduzidos de acordo com o protocolo para cuidados e uso de animais em laboratório da Universidade Estadual Paulista (UNESP/FEIS - Ilha Solteira), aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (12/2017-CEUA).

3.2.1 Manejo dos animais

Os animais foram obtidos da Estação de Aquicultura da U.H.E. de Promissão/SP - AES - BRASIL (21°17'52"S e 49°47'1"W), a partir de reprodução induzida de *B. orbignyanus* (dezembro de 2017).

Ao completarem um mês de vida, em torno de seiscentos juvenis de *B. orbignyanus* foram encaminhados para a estufa de experimentação do Laboratório de Ictiologia Neotropical - L.I.NEO, UNESP/FEIS - Ilha Solteira e acondicionados em tanque de recirculação (4.500 L) (Fig. 2 A - B) sob fotoperíodo e temperatura naturais controlada a $27 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por resfriadores (Chiller) e aquecedores automáticos acionados por termostato em $\text{pH } 6,5 \pm 0,6$ e amônia $0,25 \pm 0,10$ ppm.

Os animais foram alimentados diariamente, no período da manhã e período da tarde, com ração comercial extrusada Tetramim®, que apresenta em sua composição 47% de proteína bruta, 8,8% de lipídeos e 2% de fibras. No primeiro ano de vida, foram fornecidos a taxa de arraçoamento de 3% de biomassa (peso vivo) e, posteriormente, com taxa de 1%. O procedimento ocorreu entre os anos 2018 e 2020.

Figura 2. Acondicionamento dos animais.

Legenda: (A) Estufa de experimentação do Laboratório de Ictiologia Neotropical - L.I.NEO, UNESP/FEIS, Ilha Solteira/SP. (B) Sistema de recirculação com capacidade de 4.500 L. **Fonte:** Próprio autor.

3.2.2 Coleta do material biológico e procedimentos histológicos

Para este estudo foram selecionadas por meio de análises histológicas, 18 fêmeas de *B. orbignyanus*, sendo encontradas cinco animais com idade de quatro meses de vida ($14,4 \pm 1,1$ cm e $41,55 \pm 9,10$ g) coletados no mês de abril/2018, um ano ($22,2 \pm 1,1$ cm e $175,97 \pm 36,61$ g) em dezembro/2018, dois anos ($28,4 \pm 1,0$ cm e $886,91 \pm 72,78$ g) em dezembro/2019, e apenas três animais com três anos ($34,5 \pm 2,1$ cm e $937,49 \pm 130,14$ g) em dezembro/2020, seguindo-se a sequência anual do período reprodutivo da espécie (Fig. 3).

Figura 3. Exemplares fêmeas de *B. orbignyanus* coletadas em diferentes idades.

Coleta	Idade	<i>Brycon orbignyanus</i>
Abril 2018	Quatro meses (n = 5)	
Dezembro 2018	Um ano (n = 5)	
Dezembro 2019	Dois anos (n = 5)	
Dezembro 2020	Três anos (n = 3)	
		15 cm

Fonte: Próprio autor / Patricia Postingel Quirino.

Desta forma, os espécimes foram eutanasiados com solução de benzocaína em concentração de (0,01%) e mensurados o comprimento total (cm) e a massa corporal (g). Em sequência, foram removidas as gônadas, o fígado e aferido suas massas. O material biológico foi fotografado e imediatamente fixados em solução de paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 2% em tampão fosfato Sorensen (0,1M a pH 7,2).

Os ovários foram fragmentados transversalmente, desidratados em soluções de etanol (70% e 95%), incluídos em Histoiresina Leica, e seccionados em 3,0 μ m de espessura por Micrótomo Leica RM 2145 para a confecção das lâminas histológicas.

Para melhor detalhamento de algumas estruturas morfológicas do material biológico, os cortes foram corados em Metanil Yellow associado à Hematoxilina Férrica, Ácido Periódico e Reativo de Schiff (PAS) para destacar polissacarídeos (glicoproteínas neutras) e distinguir compartimentos teciduais, Azul de Toluidina pH 3,5 para detectar presença de DNA e RNA de acordo com a intensidade da região corada e, o Método da Reticulina para a coloração das fibras de colágeno que constitui a membrana basal que envolve o oócito, compartilhada ao epitélio germinativo, sendo demarcado na cor preta pela impregnação da prata.

As análises e fotodocumentação dos ovários foram realizadas pelo microscópio óptico (ZEISS - Scope. A1) acoplado com câmera (AXIOCAM-MRc5), concedidas no Laboratório de Ictiologia Neotropical, Departamento de Biologia e Zootecnia - UNESP/FEIS.

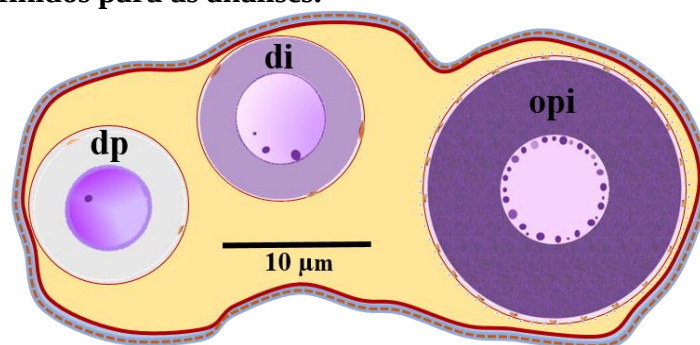
3.2.3 *Análises dos aspectos macro e microscópicos dos ovários*

Foram realizadas as médias comparativas da massa ovariana entre as fêmeas com diferentes idades, posteriormente, selecionado um fragmento mediano do ovário de cada animal e mensurado o diâmetro. A morfometria ovariana das fêmeas com quatro meses de vida ocorreu pela técnica de fotodocumentação de microscopia de luz por um corte transversal em micrômetros (μ m), e os ovários das demais idades, foram mensurados pelo paquímetro (mm). Embora, todas as medidas foram convertidas em milímetros (mm) e expressadas por meio das médias.

Com base na morfologia ovariana, para as análises morfométricas e quantitativas foram selecionados oócitos de crescimento primário em estágio de diplóteno individualizados pelas células foliculares. Sendo definidos três tipos celulares presentes nas (n = 18) fêmeas, denominados por: oócito diplóteno precoce (dp) pelo grau da

basofilia nuclear, oócito diplóteno intermediário (di) pelo início da basofilia citoplasmática e o oócito perinucleolar (opi) com os nucléolos rentes ao córtex nuclear (Fig. 4).

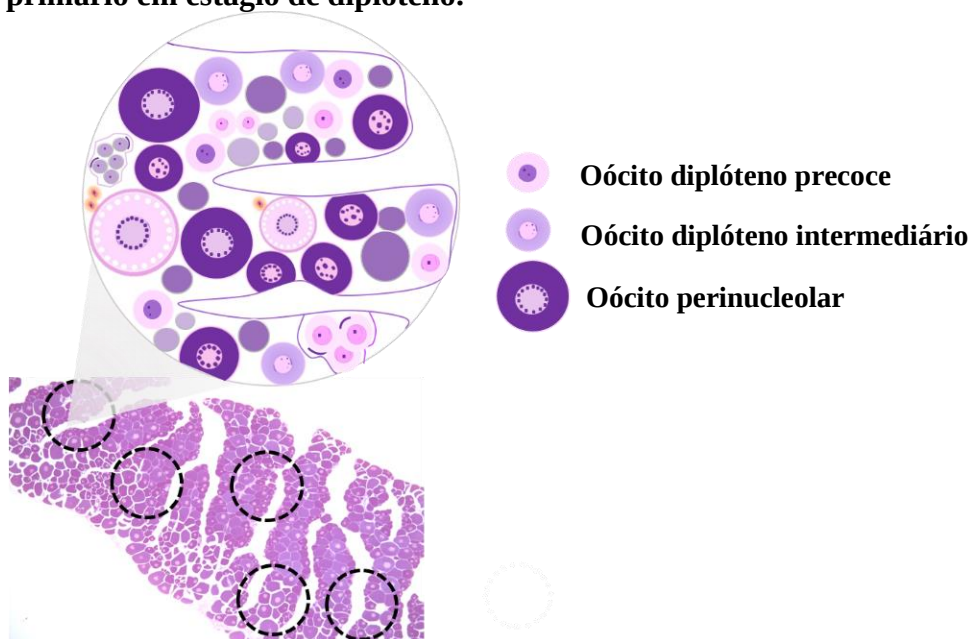
Figura 4. Quadrorama ilustrativo dos oócitos de crescimento primário em estágio de diplóteno definidos para as análises.



Legenda: Oócito diplóteno precoce (dp), oócito diplóteno intermediário (di) e oócito perinucleolar (opi).
Fonte: Próprio autor.

Em um corte histológico por animal, cinco células de cada tipo celular estabelecido foram mensuradas o diâmetro (μm) nuclear e celular, sendo os oócitos íntegros, os mais esféricos possíveis com as secções passando pelo núcleo. Em sequência, em lente objetiva (20x) foram fotografados aleatoriamente cinco campos distintos de mesmo corte e contabilizados os três tipos celulares presentes (Fig. 5). Foi realizado a somatória das medidas volumétricas e quantitativas de cada tipo celular apresentado por fêmea (= n) nas diferentes idades e estabelecidas as médias comparativas.

Figura 5. Quadrorama ilustrativo da análise quantitativa dos oócitos de crescimento primário em estágio de diplóteno.



Legenda: Os círculos pontilhados dentro do corte histológico ovariano representam os cinco campos distintos a serem contabilizados os oócitos primários definidos em lente objetiva 20x. **Fonte:** Próprio autor.

As fases do desenvolvimento ovariano foram classificadas de acordo com a terminologia histológica dos estágios celulares do ciclo reprodutivo de Brown-Peterson e colaboradores (2011), e seguiram as descrições de Quagio-Grassiotto; Wildner; Ishiba (2013) adaptadas para teleósteos com migrações sazonais.

3.2.4 *Análise do Índice Gonadossomático (IGS) e Índice Hepatossomático (IHS)*

Foram determinadas as médias dos índices gonadossomáticos (IGS) e hepatossomático (IHS) dos animais em diferentes idades, segundo VAZZOLER (1996).

O IGS foi calculado pela relação em porcentagem (%) entre a massa da gônada (Wg) e a massa corpórea (Wt), expressada pela fórmula: $IGS = (Wg / Wt) \times 100$. O IHS foi calculado pela relação em porcentagem (%) entre a massa do fígado (Wf) e a massa corpórea (Wt), expressada pela fórmula: $IHS = (Wf / Wt) \times 100$.

3.2.5 *Análise Estatística*

Todos os dados foram submetidos ao Software Bioestat para a análise estatística. Inicialmente foram aplicados a teste de homogeneidade de Bartlett e a teste de normalidade de Shapiro-Wilk com nível de significância de 5%, além de análise de identificação de outliers por meio do programa GraphPad. Como nenhuma distribuição normal foi mostrada ($P < 0,05$) foram comparados entre os grupos de amostras independentes pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Foi realizada a correlação linear de Pearson para comparar a relação entre as variáveis.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 *Ovários de *Brycon orbignyianus* em diferentes idades*

3.3.1.1 *Aspectos Macroscópicos*

Os ovários de *B. orbignyianus* são órgãos pares e alongados, se unem na extremidade caudal e irrigados por vasos sanguíneos, localizados na cavidade celomática abdominal. São revestidos por uma cápsula de tecido conjuntivo denso (túnica albugínea), a qual emite projeções (lamelas). Conforme o crescimento animal, a gônada se desenvolve e ocorrem algumas alterações, de tonalidade translúcidas passam para

alaranjado-rósea, assim como o aumento do tecido ovariano com forma abaulada na extremidade cranial e delgada na caudal (Fig. 6 A - D).

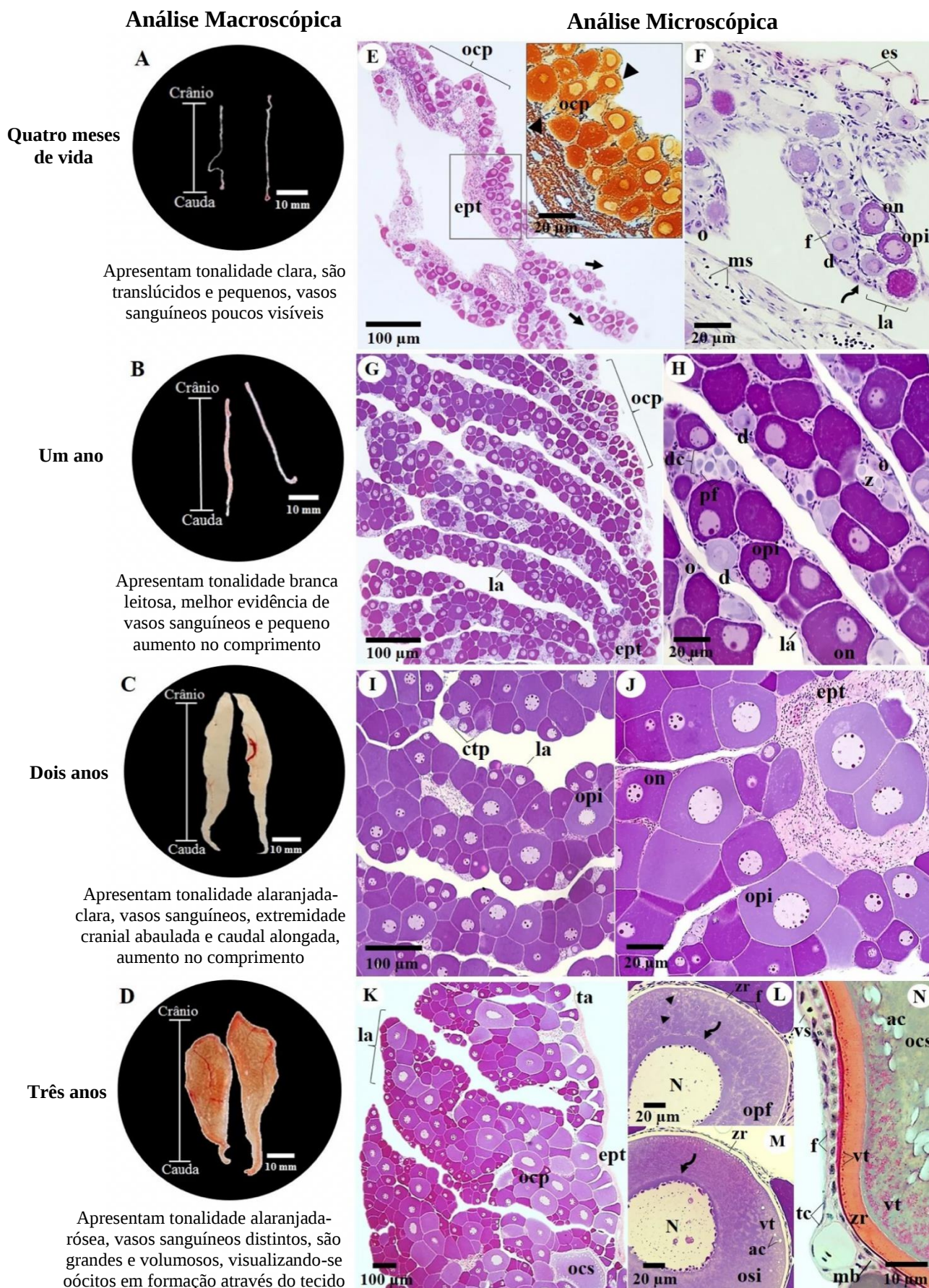
Foram encontradas diferenças significativas entre as médias comparativas da massa ovariana e do diâmetro dos ovários das fêmeas de quatro meses a dois anos de idade, entretanto, fêmeas de dois e três anos, não apresentaram diferenças estatísticas nesses parâmetros, possivelmente pelo alto desvio padrão nessas variáveis, apresentando valores relativos ao peso e morfometria nos ovários das fêmeas entre as duas idades (Tab. 1).

Tabela 1. Valores médios da massa ovariana (g) e do diâmetro ovariano (mm) de *B. orbignyana* em diferentes idades.

Idade	4 meses	1 ano	2 anos	3 anos
Número amostral	5	5	5	3
Massa (g)	$0,002 \pm 0,001^c$	$0,093 \pm 0,053^b$	$0,864 \pm 0,296^a$	$3,336 \pm 2,517^a$
Diâmetro (mm)	$0,143 \pm 0,022^c$	$3,6 \pm 1,0^b$	$7,5 \pm 1,2^a$	$9,8 \pm 6,2^a$

Legenda: Letras distintas minúsculas em linhas indicam diferenças estatísticas entre a massa (g) ovariana e o diâmetro ovariano (mm) nas diferentes idades. Teste: Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). **Fonte:** Próprio autor.

Figura 6. Descrição macroscópica e microscópica dos ovários de *B. orbignyana* em diferentes idades.



Legenda: Quatro meses: Fase Imatura - Formação do epitélio germinativo: (E) Organização dos oócitos de crescimento primário (ocp) sobre o epitélio germinativo (ept) e projeções ovarianas (seta). Detalhamento dos oócitos de crescimento primário envolvidos por uma membrana basal (cabeça da seta) compartilhada a membrana (cabeça da seta) do epitélio. (F) Formação das lamelas ovígeras (la) pelas células somáticas epiteliais (seta torta) e a formação do estroma ovariano (es) pelas células mesenquimais (ms), presença de oogônias (o), oócitos em diplótenos iniciais (d) individualizados pelas células foliculares (f), oócitos com múltiplos nucléolos (on) e oócitos perinucleolares (opi). **Um ano - Fase Imatura:** (G - H) Epitélio germinativo (ept) com lamelas ovígeras (la) justapostas, presença de oogônias, inúmeros oócitos de crescimento primário, muitos cistos profásicos em zigótenos (z) e diplótenos (dc) circundados pelas células pré-foliculares (pf), oócitos em diplótenos iniciais (d), oócitos com múltiplos nucléolos (on) e oócitos perinucleolares (opi). **Dois anos - Fase Imatura:** (I - J) Epitélio germinativo (ept) com lamelas ovígeras (la) desenvolvidas, oócitos de crescimento primário (ocp) mais agrupados, alguns cistos de oócitos profásicos (ctp) e muitos oócitos com múltiplos nucléolos (on) e oócitos perinucleolares (opi). **Três anos - Fase de Desenvolvimento Inicial:** (K) Destaque da túnica albugínea (ta) margeada ao epitélio germinativo (ept), lamelas ovígeras (la) muito desenvolvidas, presença de oócitos de crescimento primário (ocp) e oócitos de crescimento secundário (ocs). (L) Oócito de crescimento primário final (opf) com zona radiata (zr) distinta, células foliculares (f) menos escassas, presença de ranhuras (cabeça da seta) claras e espessas no citoplasma, realçando um contorno (seta torta) em volta do núcleo (N). (M) Oócito de crescimento secundário inicial (osi), melhor visualização da zona radiata (zr), início do aparecimento de alvéolos corticais (ac) e de grânulos de vitelo (vt) sobre o córtex do citoplasma. (N) Oócito de crescimento secundário (ocs) com mais presença de alvéolos corticais (ac) e vitelo (vt), circundados pelas células foliculares (f) sobre a membrana basal (mb), formação da teca (tc), zona radiata (zr) espessa e visibilidade da passagem da vitelogenina (vt). Cortes transversais. Coloração: E - M: Hematoxilina e Eosina, Método de Reticulina. N: Metanil Yellow. **Fonte:** Próprio autor / Patrícia Postingel Quirino.

3.3.1.2 Aspectos Microscópicos

A morfologia ovariana foi definida de acordo com a estrutura do epitélio germinativo e as características celulares encontradas. De modo geral, nos ovários de *B. orbignyianus* o compartimento germinativo é organizado em lamelas ovígeras e se projetam em direção à luz do órgão que ocorre pela movimentação das células somáticas epiteliais e posteriormente, tornam-se células pré-foliculares. Estas, atuam na síntese da membrana basal compartilhada ao epitélio que sustentam as células germinativas primordiais, nas quais proliferam e diferenciam em oogônias que logo, diferenciam-se em oócitos profásicos por diferentes estágios (Fig. 6 E - H).

Consequentemente, permanecem em crescimento primário no estágio de diplóteno e são individualizados pelas células foliculares que repousam sobre uma membrana basal recém-sintetizada em junção àquela do epitélio, podendo ser visualizada na cor preta pelo método de reticulina, impregnando a prata nas fibras reticulares constituintes da lâmina basal (Fig. 6 - E). Juntamente desta organização celular, ocorre a formação do tecido estromal pelas células mesenquimais que atuam na síntese da teca do folículo ovariano (Fig. 6 - F).

Neste sentido, o epitélio germinativo das fêmeas com quatro meses de vida apresenta projeções delimitadas pelas células somáticas para a formação das lamelas

ovígeras. Evidenciando-se oogônias e oócitos de crescimento primário, com presença de oócitos em diplótenos iniciais já individualizados pelas células foliculares, oócitos com múltiplos nucléolos espalhados sobre o núcleo e oócitos perinucleolares com os nucléolos rentes ao córtex nuclear. Simultaneamente, inicia-se a formação do estroma ovariano que aloca as células mesenquimais (Fig. 6 E, F).

O epitélio germinativo das fêmeas com um ano de idade apresenta lamelas ovígeras justaspostas e organizadas. Possuem as mesmas características celulares dos animais de quatro meses, mas, com o espaçamento reduzido do lúmen entre as células, destacando-se a presença de oogônias, muitos cistos de oócitos profásicos circundados pelas pré-foliculares e, essencialmente oócitos em diplótenos iniciais, oócitos com múltiplos nucléolos e oócitos perinucleolares (Fig. 6 G, H).

O epitélio germinativo das fêmeas com dois anos de idade apresenta lamelas ovígeras desenvolvidas e pouco espaçamento entre as células. Observando-se alguns cistos de oócitos profásicos, muitos oócitos com múltiplos nucléolos e oócitos perinucleolares (Fig. 6 I, J).

Em relação ao epitélio germinativo das fêmeas com três anos de idade, apresenta lamelas ovígeras muito desenvolvidas e preenchidas por oócitos de crescimento primário e oócitos de crescimento secundário. Destacando-se a presença de oócitos perinucleolares e alguns oócitos com o aparecimento de alvéolos corticais simultaneamente com a incorporação inicial de vitelo ao córtex do citoplasma. Evidenciando-se uma zona radiata espessa em rosa pela técnica da coloração de Metanil Yellow, as células foliculares granulares e a teca, demonstrando a formação completa do complexo folicular (Fig. 6 K - N).

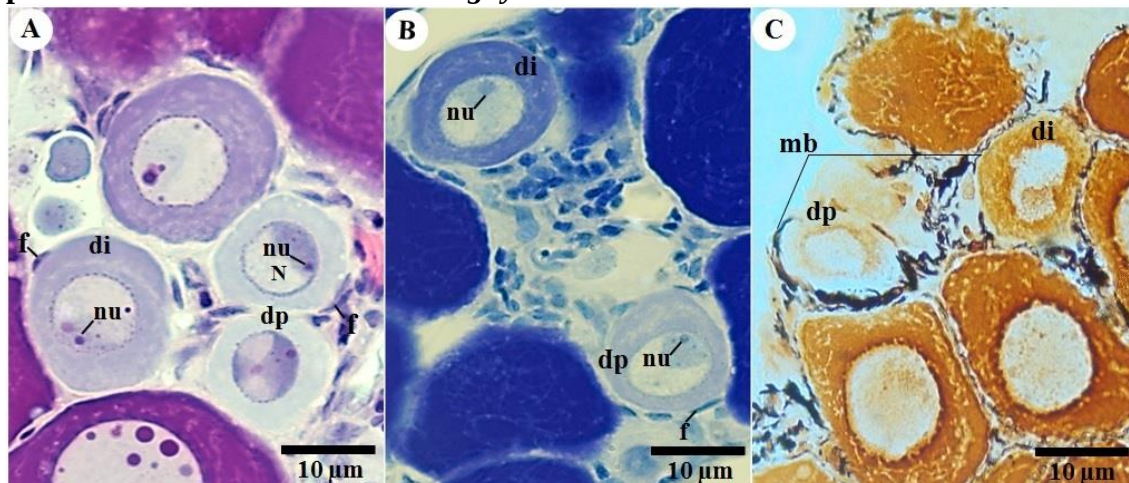
3.3.2 Características morfológicas dos oócitos de crescimento primário em estágio de diplóteno de *Brycon orbignyanus* em diferentes idades

Os oócitos em diplótenos precoces e os intermediários apresentam as mesmas características morfológicas para as fêmeas em diferentes idades, sendo identificados da seguinte forma:

Oócito diplóteno precoce (dp) apresenta o núcleo volumoso, com cromatina dispersa de forma irregular, sendo evidenciada por regiões mais basófilas no qual estão presentes de um a dois nucléolos bem evidentes. O citoplasma mostra-se pouco basófilo, quase transparente, corado suavemente pelo azul de toluidina e com o contorno regular

(Fig. 7 A, B). Neste estágio de desenvolvimento encontra-se individualizado pelas células foliculares pavimentosas que são escassas e espaçadas, e estas sintetizam a membrana basal do oócito (Fig. 7 A, C). A partir deste evento é dado a origem do folículo ovariano.

Figura 7. Morfologia dos oócitos de crescimento primário em estágio de diplóteno precoce e intermediário de *B. orbignyana* em diferentes idades.



Legenda: (A - B) Oócito diplóteno precoce (dp) apresenta regiões basófilas no núcleo (N) pela coloração em hematoxilina e o azul de toluidina, presença de um a dois nucléolos (nu) e o citoplasma acidófilo. Oócito diplóteno intermediário (di) apresenta basofilia nuclear reduzida, presença de três a quatro nucléolos (nu) e o citoplasma inicia-se a basofilia. Ambos estão individualizados pelas células foliculares (f). (C) Membrana basal (mb) do diplóteno precoce (dp) e do diplóteno intermediário (di). Cortes transversais. Coloração: A: Hematoxilina e Eosina; B: Azul de Toluidina; C: Método de Reticulina. **Fonte:** Próprio autor / Patrícia Postingel Quirino.

Oócito diplóteno intermediário (di) apresenta o núcleo esférico, pouco basófilo em relação ao oócito anterior (dp). Estão presentes de três a quatro nucléolos bem evidentes e próximos a membrana nuclear. No entanto, o citoplasma possui o contorno regular, é moderadamente basófilo tanto para a coloração em hematoxilina, quanto ao azul de toluidina. As células foliculares permanecem pavimentosas e escassas (Fig. 7 A, B).

Diferentes dos oócitos anteriores, os oócitos perinucleolares passam por algumas alterações morfológicas com o avanço da idade do animal. Desta maneira, nas fêmeas com quatro meses de vida, os oócitos perinucleolares (opi) apresentam o núcleo esférico, amplo e excêntrico, pouco basófilo, com inúmeros nucléolos poucos volumosos e agrupados, próximos a membrana nuclear. Citoplasma basófilo com o contorno irregular, sendo evidentes fissuras claras em volta do núcleo, denominadas por corpúsculos de Balbiani. As células foliculares são pavimentosas e escassas (Fig. 8 A, B).

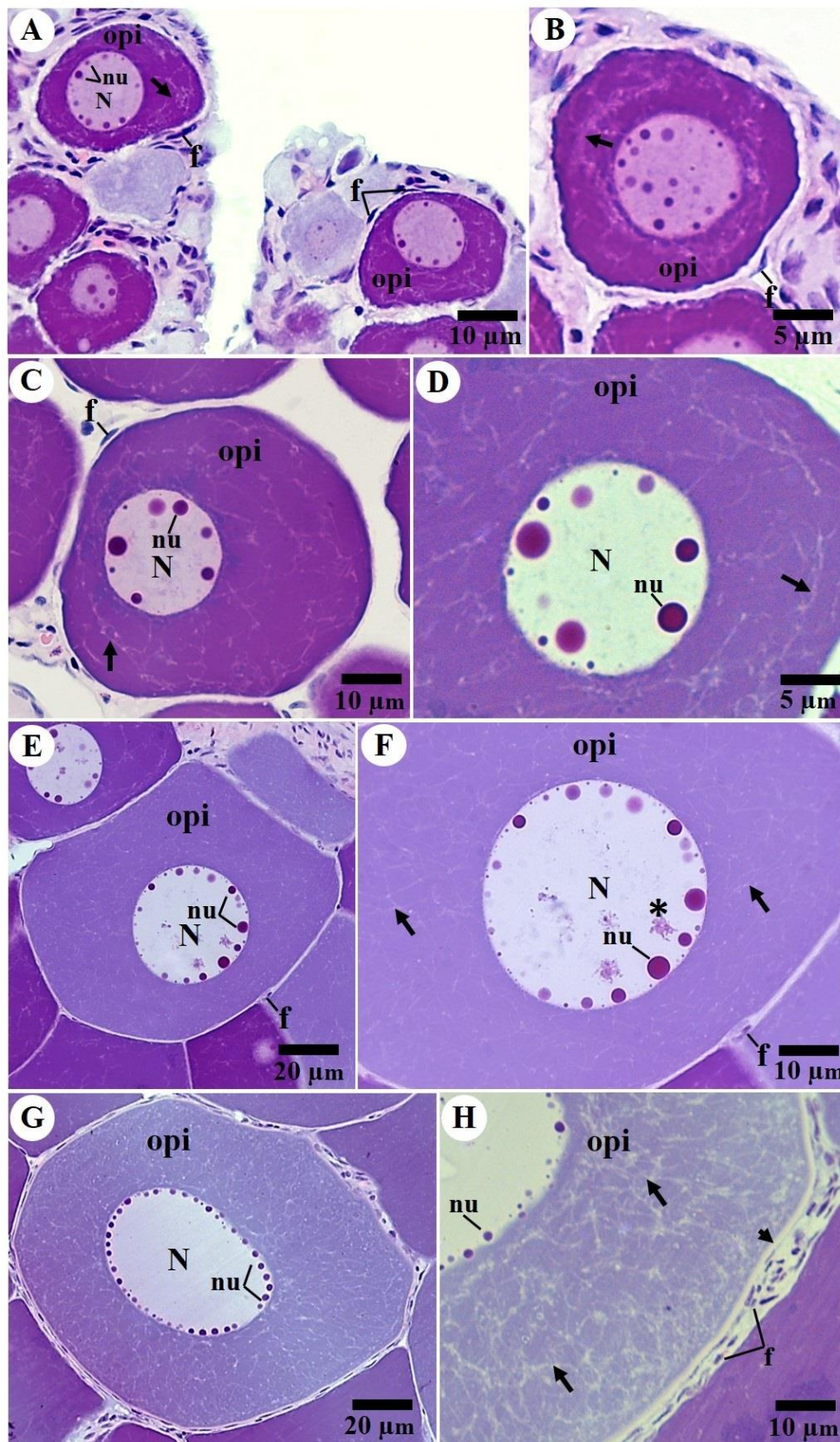
Os oócitos perinucleolares (opi) nas fêmeas com um ano de idade apresentam o núcleo esférico e pouco excêntrico ao citoplasma, com nucléolos bem volumosos,

próximos a periferia nuclear. Citoplasma com contorno mais regular, muito basófilo e melhor visibilidade de corpúsculos de Balbiani. As células foliculares são pavimentosas e escassas (Fig. 8 C, D).

Os oócitos perinucleolares (opi) nas fêmeas com dois anos de idade apresentam o núcleo central e muito esférico, com envoltório regular, os nucléolos de volumes variáveis e agrupados, mais próximos a periferia nuclear. Citoplasma com contorno regular e maior em relação ao núcleo, com basofilia reduzida e corpúsculos de Balbiani evidentes por toda região. As células foliculares são pavimentosas e escassas (Fig. 8 E, F).

Nas fêmeas com três anos de idade foi observado o oócito perinucleolar (opi) na fase mais avançada de desenvolvimento, demonstrando o complexo folicular em formação. Apresenta o núcleo grande, central e pouco esférico, os nucléolos são numerosos e poucos volumosos, agrupados e rentes a membrana nuclear. Citoplasma amplo com contorno regular, pouco basófilo e corpúsculos de Balbiani em grande intensidade e extensão. Ocorre o aparecimento de uma estreita zona radiata e as células foliculares são pavimentosas e numerosas (Fig. 8 G, H).

Figura 8. Morfologia do oócito perinucleolar de *B. orbignyana* em diferentes idades.



Legenda: Quatro meses: (A - B) Oócito perinucleolar (opi) individualizados pelas células foliculares (f), apresentando núcleo (N) esférico com inúmeros nucléolos (nu) poucos volumosos. Citoplasma com contorno irregular e basófilo com início do aparecimento de corpúsculos de Balbiani (seta). **Um ano:** (C - D) Oócito perinucleolar (opi) apresentando o núcleo (N) esférico, pouco centralizado, com número reduzido de nucléolos (nu) e volumosos. Citoplasma com contorno regular e muito basófilo, melhor

visualização de corpúsculos de Balbiani (seta). Células foliculares (f) pavimentosas e escassas. **Dois anos:** (E - F) Oócito perinucleolar (opi) apresentando o núcleo (N) muito esférico, centralizado, com nucléolos (nu) de volumes variáveis e agrupados, rentes a periferia nuclear, destacando-se a presença de cromossomos plumosos (*). Citoplasma com contorno regular e pouco basófilo e corpúsculos de Balbiani evidentes (seta). Células foliculares (f) pavimentosas e escassas. **Três anos:** (G - H) Oócito perinucleolar (opi) apresentando o núcleo (N) grande, central e pouco esférico com nucléolos (nu) poucos volumosos e bem agrupados, muito rentes ao córtex nuclear. Citoplasma com contorno regular e basofilia totalmente reduzida. Corpúsculos de Balbiani em grande intensidade e extensão (seta). Surgimento de uma estreita zona radiata (cabeça da seta). Células foliculares (f) pavimentosas numerosas. Cortes transversais. Coloração: A - H: Hematoxilina e Eosina. **Fonte:** Próprio autor.

3.3.3 Relação morfométrica dos oócitos de crescimento primário em estágio de diplóteno de *Brycon orbignyanus* em diferentes idades

Com base na análise morfométrica dos oócitos de crescimento primário de *B. orbignyanus* foi observado que os oócitos diplótenos precoces e os intermediários não apresentam diferenças significativas quando comparadas às médias do diâmetro nuclear e celular nas fêmeas com quatro meses, um ano, dois e três anos de idade. Entretanto, os oócitos perinucleolares diferiram estatisticamente nas quatro idades, com um aumento gradativo dos diâmetros nucleares e celulares de quase duas vezes à mais para cada idade (Tab. 2).

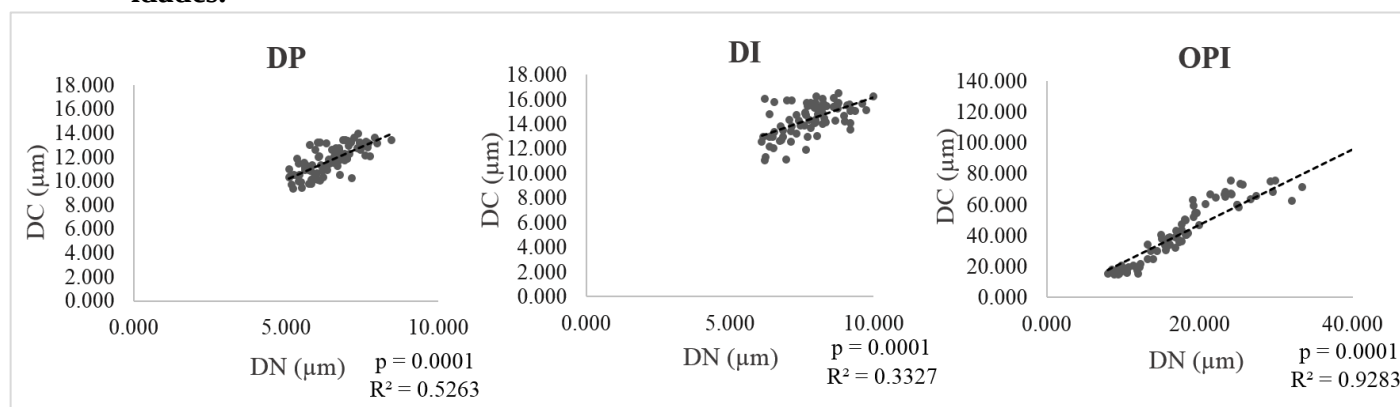
Tabela 2. Médias comparativas da análise morfométrica dos oócitos de crescimento primário em estágio de diplóteno de *B. orbignyanus* em diferentes idades.

Idade		4 meses	1 ano	2 anos	3 anos
Número amostral		5	5	5	3
DP (µm)	DN	6.109 ± 0.619	6.501 ± 0.801	6.570 ± 0.873	6.518 ± 0.813
	DC	11.231 ± 1.168	11.867 ± 1.187	11.815 ± 1.152	11.882 ± 1.329
DI (µm)	DN	7.423 ± 0.991	7.988 ± 0.992	7.928 ± 0.746	8.017 ± 0.981
	DC	13.808 ± 1.559	14.566 ± 0.954	14.733 ± 1.416	14.788 ± 0.906
OPI (µm)	DN	10.188 ± 1.232 ^d	16.069 ± 1.569 ^c	23.531 ± 4.640 ^b	39.859 ± 11.764 ^a
	DC	17.425 ± 2.031 ^d	36.005 ± 5.268 ^c	61.937 ± 8.711 ^b	96.277 ± 21.995 ^a

Legenda: Letras distintas minúsculas indicam diferenças estatísticas entre o diâmetro nuclear (DN) e diâmetro celular (DC) do oócito diplóteno precoce (DP), oócito diplóteno intermediário (DI) e oócito perinucleolar (OPI) nas diferentes idades. Teste: Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). **Fonte:** Próprio autor.

Conquanto, observou-se uma forte correlação linear do tamanho do diâmetro nuclear com o diâmetro celular dos oócitos diplótenos precoces, intermediários e perinucleolares entre as diferentes idades, sendo compreendido que ambos são completamente influenciados (Fig. 9).

Figura 9. Correlação positiva entre o diâmetro (μm) nuclear e celular dos oócitos de crescimento primário em estágio de diplóteno de *B. orbignyanus* em diferentes idades.

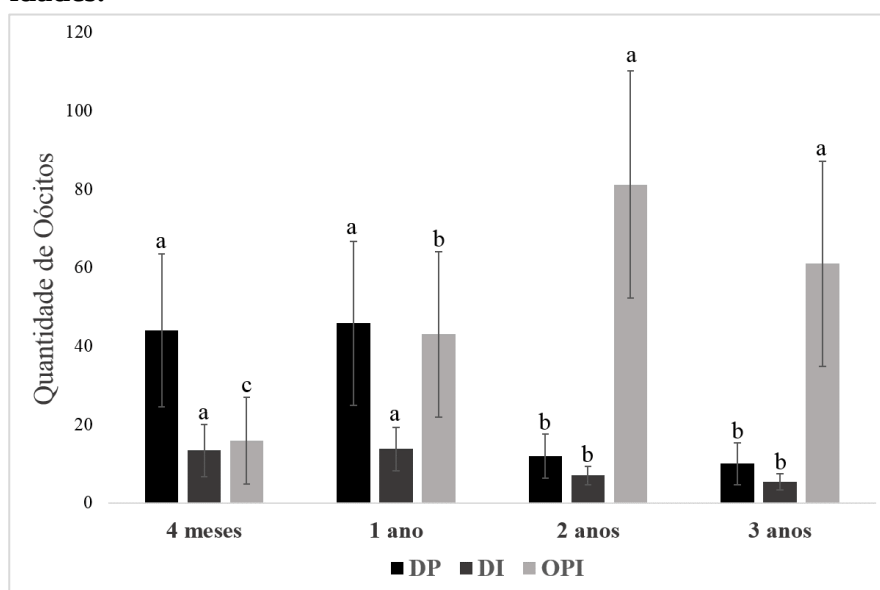


Legenda: Correlação Linear de Pearson positiva entre o diâmetro nuclear (DN) e o diâmetro celular (DC) dos oócitos em diplóteno precoce (DP), diplóteno intermediário (DI) e o perinucleolar (OPI) nas diferentes idades. **Fonte:** Próprio autor.

3.3.4 Relação quantitativa dos oócitos de crescimento primário em estágio de diplóteno de *Brycon orbignyanus* em diferentes idades

De acordo com a análise estatística entre as médias dos oócitos contabilizados ocorreu maior presença de diplótenos precoces e intermediários nas fêmeas imaturas com quatro meses e um ano de idade, reduzindo estes tipos celulares aos dois e três anos. O número de oócitos perinucleolares aumentou conforme o avanço da idade do espécime, sendo mais numerosos nas fêmeas com dois e três anos de idade (Fig. 10).

Figura 10. Representação gráfica das médias comparativas da análise quantitativa dos oócitos de crescimento primário em estágio de diplóteno de *B. orbignyanus* em diferentes idades.



Legenda: Letras distintas minúsculas indicam diferenças estatísticas entre a quantidade dos oócitos em diplóteno precoce (DP), diplóteno intermediário (DI) e o perinucleolar (OPI) nas diferentes idades. Teste: Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). **Fonte:** Próprio autor.

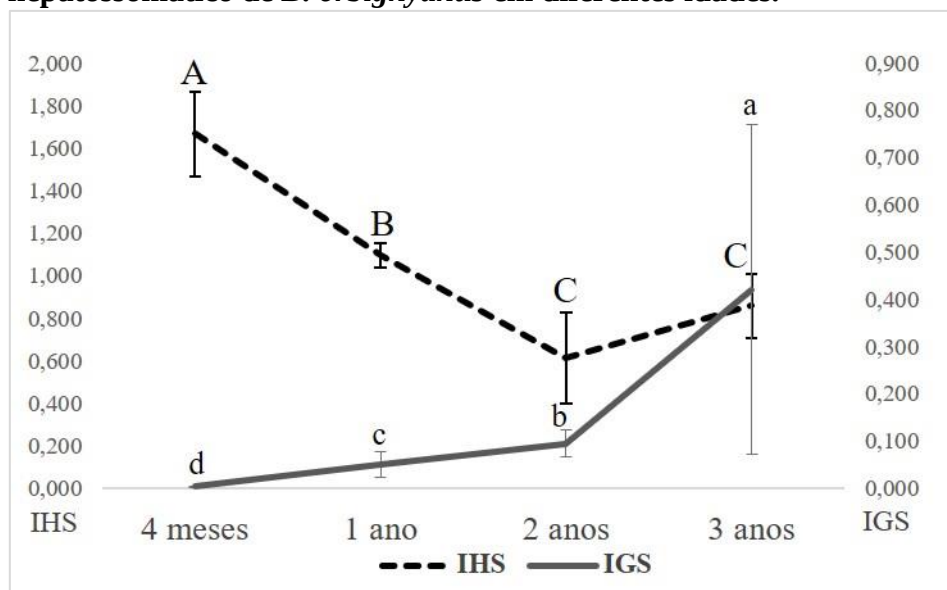
Uma vez que, ao relacionar a presença dos três tipos celulares com o diâmetro (μm) do fragmento ovariano das fêmeas em diferentes idades, os ovários dos animais com até um ano são finos e menos desenvolvidos (Fig. 6 A - B) e, das demais idades são espessos (Fig. 6 C - D), relativamente ao maior índice de oócitos perinucleolares presentes no epitélio germinativo (Fig. 6 I - K).

Podemos considerar que a quantidade de oócitos perinucleolares nas fêmeas com três anos não apresentou diferenças significativas das fêmeas com dois anos, por estarem na fase de desenvolvimento inicial em ocorrência de outros estágios celulares (Fig. 6 K – N).

3.3.5 Análise dos Índices Gonadossomático (IGS) e Hepatossomático (IHS)

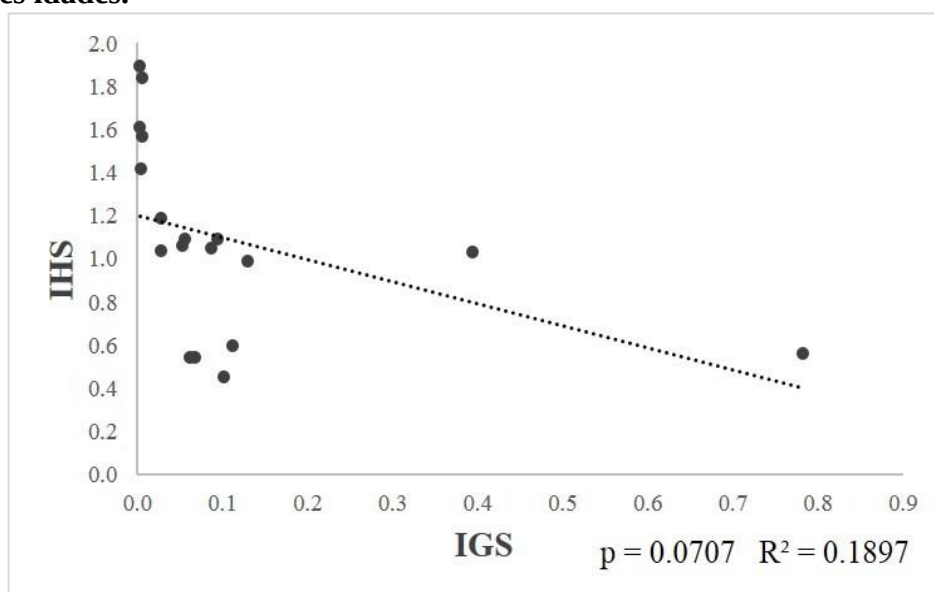
Foram apresentadas diferenças estatísticas significativas nos índices gonadossomático e hepatossomático de *B. orbygnianus* em diferentes idades. Sendo demonstrado valores crescentes no IGS das fêmeas com até dois anos, com maior pico aos três anos de idade, em animais adultos que se encontram na fase de desenvolvimento inicial. Posto que o inverso ocorreu no IHS, com pico máximo nas fêmeas de quatro meses de vida que estão na fase imatura (Fig. 11). Embora, os valores de IGS e IHS não possuem correlação ($p = 0.0707$) (Fig. 12).

Figura 11. Representação gráfica dos valores médios do índice gonadossomático e índice hepatossomático de *B. orbygnianus* em diferentes idades.



Legenda: Letras distintas minúsculas indicam diferenças estatísticas entre os valores de IGS nas diferentes idades. Letras distintas maiúsculas indicam diferenças estatísticas entre os valores de IHS nas diferentes idades. Teste: Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). **Fonte:** Próprio autor / Patricia Postingel Quirino.

Figura 12. Correlação negativa entre os valores de IGS e IHS de *B. orbignyana* em diferentes idades.



Fonte: Próprio autor / Patricia Postingel Quirino.

3.4 DISCUSSÃO

O estudo do desenvolvimento dos oócitos de crescimento primário em estágio de diplóteno de *B. orbignyana* em ambiente controlado durante os três primeiros anos de vida, abrange o conhecimento de eventos morfológicos decorrentes do período inicial da oogênese e final da foliculogênese, permitindo a compreensão mais detalhada do princípio de síntese proteica, respectivamente ao entendimento da cinética de crescimento celular para a maturação do folículo ovariano em conformidade com as alterações no ovário e as fases do ciclo reprodutivo.

Com base nas características microscópica dos ovários de *B. orbignyana* são classificados como do tipo cistovariano, apresentam o compartimento germinativo em forma de lamelas em que o lúmen se projeta em direção à luz do órgão, onde a cavidade ovariana é contínua ao oviduto, unindo-se de forma caudal à papila urogenital (GANECO *et al.*, 2001).

As fases reprodutivas das fêmeas em diferentes idades foram estabelecidas de acordo com Brown-Peterson e colaboradores (2011). Para tanto, a terminologia de Perciformes marinhos pode ser totalmente adotada aos de água doce, sendo considerada a fase imatura às fêmeas com quatro meses a dois anos de idade com presença de oócitos pré-vitelogênicos, e a fase de desenvolvimento inicial às fêmeas com três anos, pela presença de oócitos vitelogênicos iniciais.

Zaiden (2000) faz uma revisão classificatória da nomenclatura dos estágios celulares da piraputanga, *B. hilarii* e padronizou em seis fases: cromatina-nucléolo (fase 1), perinucleolar (fase 2), alvéolo-cortical (fase 3), vitelogênico (fase 4), pós-vitelogênico, maturação final (fase 5) e atrésico (fase 6), corroborado por Ganeco *et al.*, (2001) para *B. orbignyanus*. Entretanto, no presente estudo, a piracanjuba em condição de sistema de recirculação em temperatura constante, apresenta o aparecimento de alvéolos corticais simultâneos aos grânulos iniciais de vitelos localizados no córtex do citoplasma nas fêmeas com três anos de idade, sendo este classificado como oócito de crescimento secundário precoce, apresentado na fase de desenvolvimento inicial (adulto), o que de fato, Quagio-Grassiotto; Wildner; Ishiba (2013) também evidencia vacúolos corticais concomitantemente com os primeiros glóbulos vitelínicos no Characiformes, *Hoplias malabaricus*, conhecido como traíra ou peixe-gato.

Tal como, as mesmas características morfológicas foram presenciadas durante a oogênese no robalo marinho, *Dicentrarchus labrax*, um Perciforme mediterrâneo com registros tão ao Norte quanto à Costa Sul da Noruega, e facilmente encontrado em águas costeiras e rios (MAYER; SHACKLEY; RYLAND, 1988).

Embora, o desempenho reprodutivo dos teleósteos depende muito das condições externas que se encontram (DEVLIN; NAGAHAMA, 2002), portanto, não podemos desconsiderar que esta caracterização do desenvolvimento oocitário da piracanjuba pode ser ou não um aspecto influenciado pelo ambiente controlado, já que é um peixe altamente sensível as alterações extrínsecas (LOPERA-BARRERO, 2009; ZANIBONI-FILHO; SCHULZ, 2003).

De acordo com Grier (2012) os alvéolos corticais são carboidratos neutros que auxiliam no aumento do volume celular para receber os estímulos da incorporação de vitelo, e também atuam no endurecimento da zona radiata impedindo a polispermia (JESUS-SILVA *et al.*, 2018; SANTOS-SILVA *et al.*, 2015). Portanto, representam a transição entre o crescimento primário e secundário dos oócitos (GRIER; NEIDIG; QUAGIO-GRASSIOTTO, 2017; BROWN-PETERSON *et al.*, 2011).

Para *B. orbignyanus* a formação de uma estreita zona radiata ocorre no final do crescimento primário dos oócitos, como descritos em outros gêneros de peixes (GRIER; NEIDIG; QUAGIO-GRASSIOTTO, 2017; SANTOS-SILVA *et al.*, 2015; QUAGIO-GRASSIOTTO; WILDNER; ISHIBA, 2013). Este revestimento é composto por glicoproteínas, pequenos polissacarídeos, e foi estudado em grupos de Characiformes por microscopia eletrônica, verificando a presença de microvilos em forma de canais

semicirculares que comunicam com o citoplasma (RIZZO *et al.*, 2002), corroborado por Santos-Silva *et al.*, (2015) ao evidenciar a vitelogenina nesta camada que passam por canais porosos para chegar ao citoplasma celular, conforme presenciada na zona radiata do oócito de crescimento secundário das fêmeas da piracanjuba com três anos de idade.

Assim como em outras espécies, a mudança da tonalidade, a forma e tamanho dos ovários de *B. orbignyanus* é modulado mediante o desenvolvimento oocitário (MAZZONI; BOMBARDELLI; QUAGIO-GRASSIOTTO, 2020; JESUS-SILVA *et al.*, 2018), na qual a organização das células germinativas entre as fases reprodutivas reflete em diferentes morfologias das lamelas ovígeras (SANTOS-SILVA *et al.*, 2015).

É comum que a gametogênese de alguns grupos de peixes seja um processo vagoroso, principalmente a piracanjuba que necessita de estímulos extrínsecos que servem de gatilhos para contemplar a produção de gametas (LOPERA-BARRERO, 2009). Uma vez que no período da foliculogênese os oócitos profásicos permanecem em estágio de diplóteno e ocorrem fenômenos subsequentes para o avanço da oogênese, conduzindo a maturação folicular (GRIER; URIBE; PARENTI, 2007).

Com isso, o epitélio germinativo de *B. orbignyanus* apresentam diplótenos iniciais precoces com padrões volumétricos e morfológicos proporcionais nas diferentes idades, diminuindo sua presença no decorrer da fase adulta do animal, sendo então caracterizado pela organização irregular da cromatina nuclear no que incrementa a concepção de Grier; Neidig; Quagio-Grassiotto (2017) no Robalo-branco comum, *Centropomus undecimalis*, e de Grier; Uribe; Parenti (2007) em *Oncorhynchus mykiss* (truta-arco-íris) ao classificarem em diplóteno precoce os oócitos que são sinalizados pela basofilía do núcleo quando o citoplasma ainda é acidófilo e envolvido pelas foliculares pavimentosas sob uma membrana basal recém-sintetizada.

Segundo Reece *et al.*, (2015), no final do estágio de paquíteno da primeira divisão meiótica, os cromossomos homólogos formados por cadeias de DNA (ácido desoxirribonucleico) associadas às proteínas histonas são pareados e se descondensam, porém, continuam próximos ocorrendo a recombinação gênica (crossing-over), sendo que neste momento os oócitos entram em estágio de diplóteno e realizam a transcrição do material genético para a produção das moléculas de RNA (ácido ribonucleico) transportador, mensageiro e ribossômico, e posteriormente, os cromossomos voltam a se condensar. O que se torna explicativo à característica nuclear dos oócitos diplótenos precoces presentes na piracanjuba, devido a dois aspectos diferentes da cromatina nuclear onde a região com tonalidade mais clara representa filamentos descondensados,

caracterizada como eucromatina e, a região com tonalidade mais intensa, representa filamentos condensados, ou seja, contém o acúmulo de cromatinas agrupadas, caracterizada como heterocromatina que geralmente está localizada na periferia nuclear.

De acordo com Grier; Uribe; Parenti (2007) esta atividade no diplóteno precoce é considerada como a transcrição ativa dos genes. Assimilando-se ao momento que procede a síntese de RNAr que constituem o nucléolo, um corpúsculo nuclear denso e amembranar com função de associar a fita de RNA ribossômica às proteínas importadas ao núcleo, produzindo os ribossomos em subunidades para serem exportados no citoplasma celular (REECE *et al.*, 2015).

Contudo, essa organela está diretamente relacionada com a síntese proteica para o desenvolvimento do oócito (GRIER, 2012), segundo ocorrido em *B. orbigyanus* o aparecimento de um nucléolo no diplóteno precoce, sinalizando a produção ribossômica que ocasiona alterações morfológicas retratadas pela basofilia moderada do citoplasma e a acidofilia nuclear, podendo este ser compreendido como diplóteno intermediário, visto que essa organização celular também foram evidenciados por Grier; Neidig; Quagio-Grassiotto (2017) e Guagio-Grassiotto; Wildner; Ishiba (2013), apresentando a partir deste comportamento o crescimento gradativo do oócito primário.

Conforme o surgimento de múltiplos nucléolos no oócito, progressivamente se agrupam e migram para a periferia nuclear, sendo denominado de perinucleolar. Desta maneira, a quantidade e o volume dessas estruturas indicam a intensidade da proliferação ribossomal (REECE *et al.*, 2015; WALLACE; SELMAN, 1981).

Embora, na espécie analisada, uma série de acontecimentos foram encontrados. Inicialmente nas fêmeas com quatro meses e um ano de idade os nucléolos periféricos são volumosos e apresentam o citoplasma celular muito basófilo com o aparecimento de corpúsculos de Balbiani, mostrando a propagação de ribossomos e mitocôndrias, tanto que estes parâmetros também foram vistos na piracanjuba por Quirino *et al.*, (2021), e no yamú, *B. siebenthalae* (ARIAS *et al.*, 2004).

Eventualmente, os nucléolos passam a ser poucos volumosos e mais rentes a periferia nuclear nas fêmeas com dois e três anos de idade, ocorrendo a redução da basofilia citoplasmática, e a extensão de intensas fissuras decorrentes da multiplicação e dispersão das organelas membranosas. Sendo estas modificações morfológicas já descritas (SANTOS-SILVA *et al.*, 2015; GUIMARÃES; QUAGIO-GRASSIOTTO, 2005).

A redução da basofilia no citoplasma celular é relativo a finalização da atividade de síntese proteica, estimulando o oócito para a recepção de outras estruturas atribuídas na formação do complexo folicular (REECE *et al.*, 2015). Por sequência, ainda no estágio perinucleolar ocorre o aparecimento de uma estreita zona radiata, melhor distinção das foliculares e indícios da síntese da teca, segundo mencionados estas peculiaridades em outros trabalhos (QUAGIO-GRASSIOTTO; WILDNER; ISHIBA, 2013; GRIER, 2012), determinando-se a finalização da foliculogênese (GRIER; NEIDIG; QUAGIO-GRASSIOTTO, 2017).

Considerando-se que os perinucleolares são as maiores células da fase pré-vitelogênica, em *B. orbignyanus* o crescimento do oócito é constante até alcançar a sua fase adulta, e atingem o tamanho do diâmetro nuclear de $40 \pm 12 \mu\text{m}$ e celular de $96 \pm 22 \mu\text{m}$, no qual os volumes entre ambos estão totalmente correlacionados, demonstrado sua maior presença nas fêmeas com dois anos de idade. Dado que aos três anos encontram-se na fase reprodutiva de desenvolvimento inicial, efetivamente, estes resultados coincidem com Mayer; Shackley; Ryland (1988) ao analisar que o estágio perinucleolar do Perciforme pode chegar no volume celular de $120 \pm 60 \mu\text{m}$, obtendo valores aproximados em relação aos desvios-padrão proporcionados entre essas espécies de ambientes completamente distintos.

Conquanto, Arias *et al.*, (2004) também identificou na espécie yamú de mesmo gênero do presente estudo que o oócito perinucleolar alcança o diâmetro de $144 \pm 10 \mu\text{m}$. Tornando-se possível, adequar na histologia um parâmetro morfométrico do oócito de crescimento primário da piracanjuba.

Outros fatores relevantes analisados em *B. orbignyanus* foram em questão dos índices gonadossomáticos e hepatossomáticos. O valor máximo de IGS ocorreu nas fêmeas com três anos de idade, na fase de desenvolvimento inicial, a princípio da fase vitelogênese, enquanto ao maior IHS nas fêmeas com quatro meses, na fase imatura, não sendo evidenciado correlação significativa entre os dois. Para tal, estes índices costumam ser inversamente proporcionais devido a produção de vitelogenina no fígado que é levada ao ovário pela corrente sanguínea em função da maturação folicular, influenciando diretamente no aumento ou déficit da massa do fígado e ovários durante o ciclo reprodutivo (ARIAS; ZANIBONI-FILHO; AYA, 2006).

Por sua vez o aumento do diâmetro celular dos oócitos perinucleolares correspondem com o aumento dos valores de IGS, mas nem sempre condizem às fases do ciclo reprodutivo. Neste contexto, ainda que a piracanjuba tenha apresentado elevação do

IGS aos primeiros anos de vida, as fêmeas permanecem imaturas, progredindo para desenvolvimento inicial somente aos três anos. A semelhança entre esses dois indicadores refletiu ao desenvolvimento da gônada e reafirmam a proposta de Arias; Zaniboni-Filho; Aya (2006), destacando-se a importância dos estudos histológicos para determinar o período de reprodução da espécie.

Desta forma, o desenvolvimento das células germinativas acontece em aspectos diferentes entre os diversos gêneros de peixes, assim as alterações morfológicas nucleares e citoplasmáticas dos oócitos analisados proporcionam o entendimento do aumento do volume celular e sobressaem como resultados significativos para a compreensão biológica da maturação ovariana do espécime (JESUS-SILVA *et al.*, 2018; SELMAN; WALLACE, 1989).

REFERÊNCIAS

- ABE, K. T.; MARIGUELA, T. C.; AVELINO, G. S.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Systematic and historical biogeography of the Bryconidae (Ostariophysi: Characiformes) suggesting a new rearrangement of its genera and an old origin of Mesoamerican Ichthyofauna. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 14, n. 152, p. 1-15, 2014.
- ARIAS, J. A.; ZANIBONI-FILHO, E.; PARDO-CARRASCO, S. C.; VÁSQUEZ-TORRES, W. Ovogénesis del yamú, *Brycon siebenthalae* (Teleostei: Characidae), en cautiverio. **Actualidades Biológicas**, Medellín, v. 26, n. 81, p. 117-183, 2004.
- ARIAS, C. J. A.; ZANIBONI-FILHO, E.; AYA, B. E. Indicadores do ciclo reprodutivo do yamú, *Brycon amazonicus*, em cativeiro. Criação de Matrinhã em cativeiro. **Revista Orinoquia**, Villavicencio, v. 10, n. 2, p. 24-34, 2006.
- 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**, Chichester, v. 3, p. 52-70, 2011.
- DEVLIN, R. H.; NAGAHAMA, Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 208, p. 191-364, 2002.
- GANECO, L. N.; NAKAGHI, L. S. O.; URBINATI, E. C.; DUMONT-NETO, R. & VASQUES, L. H. Análise morfológica do desenvolvimento ovocitário de piracanjuba, *Brycon orbignyanus*, durante o ciclo reprodutivo. **Bolm Instit. Pesca**, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 131-138, 2001.
- GUIMARÃES, A. C. D.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I. Cytochemical characterization of the endomembranous system during the oocyte primary growth in *Serrasalmus spilopleura* (Teleostei: Characiformes, Characidae). **Tissue & Cell**, Amsterdam, v. 37, p. 413-422, 2005.
- GRIER, H. J. Development of the Follicle Complex and Oocyte Staging in Red Drum, *Sciaenops ocellatus* Linnaeus, 1776 (Perciformes, Sciaenidae). **Journal of Morphology**, Hoboken, v. 273, p. 801-829, 2012.
- GRIER, H. J.; NEIDIG, C. L.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I. Development and fate of the postovulatory follicle complex, postovulatory follicle, and observations on folliculogenesis and oocyte atresia in ovulated common snook, *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1792). **Journal of Morphology**, Hoboken, p. 1-16, 2017.
- GRIER, H. J.; URIBE, M. C.; PARENTI, L. R. Germinal epithelium, folliculogenesis, and postovulatory follicles in ovaries of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792), (Teleostei, Protacanthopterygii, Salmoniformes). **Journal of Morphology**, Hoboken, v. 268: p. 293-310, 2007.

INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE - ICMBio. **Portaria MMA Nº 148, de 7 de junho de 2022.** Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Peixes - *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1850) - Piracanjuba. Disponível em:

https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Portaria/2020/P_mma_148_2022_altera_anexos_P_mma_443_444_445_2014_atualiza_especies_ameacadas_extincao.pdf. Acesso em: 25/07/2022.

JESUS-SILVA, L. M.; OLIVEIRA, V. P.; RIBEIRO, C. S.; NINHAUS-SILVEIRA, A.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R. **Ovarian cycle in *Devário aequipinnatus* with emphasis on oogenesis.** Cambridge: Cambridge University, 2018. v. 26, p. 168-176.

LIMA, F. C. T. A revision of the cis-andean species of the genus *Brycon* Müller & Troschel (Characiformes: Characidae). **Zootaxa**, Auckland, v.1, p.001-189, 2017.

LOPERA-BARRERO, N. M. Conservation of *Brycon orbignyanus* natural populations and stocks for their reproductive, genetic, environmental sustainability: A model for species threatened with extinction. **Ciência e Investigación Agraria**, Asuncion, v. 36, 191208, 2009.

MAYER, I.; SHACKLEY, S. E.; RYLAND, J. S. Aspects of the reproductive biology of the bass, *Dicentrarchus labrax*. Oocyte fecundity and pattern of development. **J. Fish Biol.**, v. 33, p. 609-622, 1988.

MAZZONI, T. S., BOMBARDELLI, R. A.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I. Reproductive biology of neotropical fishes: A guide to identification to the gonadal morphology during the reproductive cycle of catfish *Rhamdia quelen* (Siluriformes: Heptapteridae). **Aquatic Science and Technology**, Beaver Creek, v. 8, p. 15-35, 2020.

NUNES, L. T.; SALMITO-VANDERLEY, C. S. B.; REIS, F. Y. T.; NERES, R. W. P.; DA SILVA, S. Q. Reprodução de peixes reofílicos nativos do Brasil: fertilização artificial e qualidade da água. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 42, n. 1, p. 15-21, 2018.

QUAGIO-GRASSIOTTO, I.; WILDER, D. D.; ISHIBA, R. Gametogênese de peixes: aspectos relevantes para o manejo reprodutivo. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 2, p. 181-91, 2013.

QUIRINO, P. P.; DELAGADO, M. 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**, Chichester, 2021.

REECE, J. B.; URRY, L. A.; CAIN, M. L.; WASSERMAN, S. A.; MINORSKY, P. V.; JACKSON, R. B. **Biologia de Campbell**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2015.

RIZZO, E.; SATO, Y.; BARRETO, B. P.; GODINHO, H. P. Adhesiveness and surface patterns of eggs in neotropical freshwater teleosts. **Journal of Fish Biology**, Chichester, v. 61, n. 3, p. 615-632, 2002.

ROMAGOSA, E.; PAIVA, P.; GODINHO, H. M. Pattern of oocyte diameter frequency distribution in females of the pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg 1887) (= *Colossoma mitrei* Berg 1895), induced to spawn. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 86, n. 1, p. 105-110, 1990.

SANTOS-SILVA, A.; SIQUEIRA-SILVA, D.; NINHAUS-SILVEIRA, A.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R. Oogênese em *Laetacara araguaiae* (Ottoni e Costa, 2009) (Labriformes: Cichlidae). **Zigote**, Shaftesbury, v. 24, n. 4, p. 502-510, 2015.

SELMAN, K.; WALLACE, R. A. Aspectos celulares do crescimento oocitário em teleósteos. **Zoological Science**, Tokyo, v. 6, p. 211-231, 1989.

SGNAULIN, T.; MELLO, G. L.; THOMAS, M. C.; GARCIA, J. R. E.; OCA, G. A. R. M.; EMERENCIANO, M. G. C. Biofloc technology (BFT): An alternative aquaculture system for piracanjuba *Brycon orbignyanus*? **Aquaculture**, Amsterdam, v. 485, p. 119-123, 2018.

SPADELLA, M. A.; CASTILHO-ALMEIDA, R. B.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I.; CESARIO, M. D. Follicular Diameter Range Based on Morphological Features in *Synbranchus Marmoratus* (Bloch, 1795) (Teleostei, Synbranchiformes, Synbranchidae) from the South-Central Region of Brazil.” **Tissue and Cell**, [s. l.], v. 37, n. 2, p. 91–100, 2005.

TONELLA, L. H.; DIAS, R. M.; VITORINO, O. B. V.; FUGI, R.; AGOSTINHO, A. A. Conservation status and bioecology of *Brycon orbignyanus* (Characiformes: Bryconidae), an endemic fish species from the Paraná River basin (Brazil) threatened with extinction. **Neotropical Ichthyology**, São Paulo, v. 17, 2019.

VAZZOLER, A. E. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática**. Maringá: EDUEM, 1996. v. 1, p. 146.

WALLACE, R. A.; SELMAN, K. Aspectos celulares e dinâmicos do crescimento oocitário em teleósteos e anfíbios. **Sou. Zool**, [s. l.], v. 21, p. 325-343, 1981.

ZAIDEN, S. F. **Morfologia gonadal e Metabolismo energético da Piraputanga *Brycon hilarii* (Cuvier e Valenciennes, 1849) (Pisces, Characidae), em cativeiro, durante ciclo reprodutivo anual**. 2000. 152 f. Tese (Doutorado em aquicultura) - Centro de Aquicultura (CAUNESP). Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2000.

ZANIBONI-FILHO, E.; SCHULZ, U. H. Uruguay River. In J. Carolsfeld, B. Harvey, C. Ross, & A. Baer. **Migratory fishes of South America**. Biology, fisheries and conservation status. World Fisheries Trust, 2003.

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

ZARSKI, D.; PALINKA, K.; TARGONSKA, K.; BOKOR, Z.; KITRIK, L.;
KREJSZEFF, S.; KUPREN, K.; HORVATH, A.; URBANYI, B.; KUCHARCZYK, D.;
Oocyte quality indicators in Eurasian perch, *Perca fluviatilis* L, during reproduction
under controlled conditions. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 313, p. 1-4, p. 84-91, 2011.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Em fêmeas de *Brycon orbignyanus* mantidas em sistema de recirculação nos três primeiros anos de vida, os oócitos de crescimento primário em estágio de diplótenos precoces e intermediários apresentam tanto o diâmetro nuclear, quanto o celular os mesmos parâmetros morfométricos, independentemente da idade do animal.

- Os oócitos perinucleolares aumentam o diâmetro nuclear e celular, conforme o avanço da idade.

- Ocorre maior presença de oócitos diplótenos precoces e intermediários nas fêmeas com quatro meses de vida e um ano de idade, enquanto os oócitos perinucleolares estão em maior quantidade nas fêmeas com dois e três anos, simultaneamente ao desenvolvimento do tecido ovariano.

- O aumento do volume celular coincide positivamente com o aumento dos valores de IGS.

- As fêmeas permanecem imaturas até dois anos de idade e após, procedem para desenvolvimento inicial (adulto).

- Esses dados só foram conclusivos com base no estudo histológico que foi significativo na compreensão da fase reprodutiva que a espécie se encontra em condições de cultivo ao longo do tempo.