

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
PESQUEIRAS NOS TRÓPICOS

ASPECTOS ESTRUTURAIS DA DIFERENCIAÇÃO SEXUAL  
DO PIRARUCU *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) E DO JUNDIÁ  
*Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824)

ALDESSANDRO DA COSTA AMARAL

MANAUS

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
PESQUEIRAS NOS TRÓPICOS

ALDESSANDRO DA COSTA AMARAL

ASPECTOS ESTRUTURAIS DA DIFERENCIAÇÃO SEXUAL  
DO PIRARUCU *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) E DO JUNDIÁ  
*Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824)

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Pesqueiras nos Trópicos, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Pesqueiras, área de concentração Uso Sustentável de Recursos Pesqueiros Tropicais

**Orientadora:** Fernanda Loureiro de Almeida O'Sullivan

**Co-orientadora:** Talita Sarah Mazzoni - UNIFAL

**Financiamento:** Embrapa (SEG: 02.16.05.018.00.00)

MANAUS

2019

## FICHA CATALOGRÁFICA

A485a Amaral, Aldessandro da Costa  
Aspectos estruturais da diferenciação sexual do pirarucu  
Arapaima gigas (Schinz, 1822) e do jundiá Rhamdia quelen (Quoy  
& Gaimard, 1824) / Aldessandro da Costa Amaral. 2019  
64 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Fernanda Loureiro de Almeida O'Sullivan  
Coorientadora: Talita Sarah Mazzoni  
Dissertação (Mestrado em Ciências Pesqueiras nos Trópicos) -  
Universidade Federal do Amazonas.

1. Bacia Amazônica. 2. Diferenciação de gônadas. 3. Ovário. 4.  
Célula germinativa primordial. 5. Célula somática. I. O'Sullivan,  
Fernanda Loureiro de Almeida II. Universidade Federal do  
Amazonas III. Título

ALDESSANDRO DA COSTA AMARAL

Aspectos estruturais da diferenciação sexual do pirarucu *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) e do jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824).

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Pesqueiras nos Trópicos da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Pesqueiras nos Trópicos, área de concentração em Uso Sustentável de Recursos Pesqueiros Tropicais.

Aprovado em 13 de Junho de 2019

BANCA EXAMINADORA



Dra. Fernanda Loureiro de Almeida O'Sullivan - Presidente  
EMBRAPA



Dr. Wallice Luiz Paxiúba Duncan - Membro  
UFAM



Dr. Lucas Simon Torati - Membro  
EMBRAPA

## DEDICATÓRIA

Está é a parte mais difícil de escrever, a parte em que mais temo cometer falhas ou de esquecer de algo. Dedicar este trabalho as pessoas que amo sem dúvidas me deixa impotente. Controlar as emoções não será fácil e nem poderia, se torna até mesmo impossível. Foram tantos gestos de amor e sacrifícios durante estes anos, que agradecer se torna pouco, deixando essa dedicatória pequena diante de tudo o que fizeram e fazem por mim.

Mencionar tudo o que fizeram seria injusto, aliás, foram tantas coisas, que em uma lista não caberia. Desta forma, dedicar este trabalho a vocês, é apenas uma forma singela que encontrei para agradecer a tudo que fizeram por mim, sem vocês nada seria possível.

O ato de dedicar é um gesto que demonstra afeição, portanto dedico a minha família - ASAS. Pertencer a esta família é um privilégio, nada mais justo do que dedicar este trabalho ao meu PAI *Aldenor Andrade do Amaral*, a minha MÃE *Sandra Helena Reis da Costa* e minhas irmãs *Ana Gabrielly da Costa Amaral* e *Sandrelly da Costa Amaral*. Pode parecer clichê "mais de dez vidas, onze daria por vocês".

"Que a família comece e termine sabendo onde vai  
E que o homem carregue nos ombros a graça de um pai  
Que a mulher seja um céu de ternura, aconchego e calor  
E que os filhos conheçam a força que brota do amor!"

Pe. Zezinho

Aldessandro da Costa Amaral

## **AGRADECIMENTO**

À Universidade Federal do Amazonas - UFAM, em especial ao Programa de Pós-graduação em Ciências Pesqueiras nos Trópicos e a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA Amazônia Ocidental por toda sua estrutura disponível para a realização desta pesquisa.

A minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fernanda Loureiro de Almeida O'Sullivan pela oportunidade e pronta disposição a me orientar nessa jornada, além dos ensinamentos e enriquecimento profissional.

A minha co-orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Talita Sarah Mazzoni que me acolheu durante os dias que passei em Alfenas-MG e não mediu esforços para me ajudar na parte acadêmica, me ensinando que todo esforço é válido.

Aos técnicos de laboratórios, aos amigos do mestrado e a todos que me ajudaram durante o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos meus amigos do Curso de Engenharia de Pesca, que sempre estão dispostos a me ajudar em assuntos da área.

Aos amigos do município Parintins e de Manaus, que me proporcionaram momentos memoráveis ao longo destes anos.

A minha irmã Sandrelly da Costa Amaral, por toda paciência e zelo que teve com nossos pais durante esse período. Sempre suportando, relevando e entendendo que as dificuldades enfrentadas em casa, era devido a difícil missão de me manter em outra cidade e dentro de uma Universidade Pública, privando-a e retirando-a muitas vezes do seu conforto e adiando até mesmo alguns de seus sonhos.

Aos meus pais que sempre confiaram e acreditaram em mim, incentivando e dando força nos momentos mais difíceis da vida acadêmica e pessoal. Agradeço desde já e sempre o seu amor incondicional, sem vocês, nada seria possível.

Gostaria também de agradecer a Deus, pelo dom da vida, pelas oportunidades e por seu amor incondicional, que mesmo nos momentos em que perdi a fé, sempre me deu a mão para erguer a cabeça e continuar.

## EPÍGRAFE - AMAZÔNIA SANTUÁRIO DE ESMERALDA

Amazônia santuário de esmeralda

Pôr-do-sol beija tuas águas

Pátria verde florescida

Pelas lágrimas divinas

A grinalda do luar vem te abençoar

Templos de rios, florestas,

Lagos e cachoeiras

Encontro das águas das cores da natureza

Anavilhanas, Jaú, Janauari,

Macuricanã, Mamirauá

Teus santuários ecológicos

Teus sublimes mananciais

Murmuram uma triste oração

A nossa fauna corre o risco extinção

Onça pintada, cutia, preguiça,

Tamanduá bandeira, ariranha,

Peixe-boi, tartaruga, sauim de coleira,

Na revoada dos pássaros

A dança da liberdade

Não tire as penas da vida

Preserve a biodiversidade

No ermo da Amazônia

Bicho folharal cantará

Preservar a natureza

É preservar o próprio homem

Mãe, mãe natureza

Compositor: Geandro Pantoja e Demetrios Haidos

## RESUMO

Com a estagnação da pesca extrativista, produzir proteína de pescado tornou-se um grande desafio para aquicultura. Este fato, aliado à explosão demográfica e à busca por alimentos saudáveis foram os principais fatores que impulsionaram o crescimento e o avanço da aquicultura mundial. Com base no exposto acima e considerando a importância ecológica e social do pirarucu *Arapaima gigas* e do jundiá *Rhamdia quelen*, seus potenciais produtivos e econômicos para as regiões Norte e Sul do Brasil, respectivamente, e o quadro atual de desconhecimento a respeito de suas fisiologias reprodutivas, o presente trabalho visou caracterizar o processo de formação do primórdio gonadal e da gônada em diferenciação destas duas espécies nativas, através de secções histológicas seriadas, como subsídio para o desenvolvimento de tecnologias para o cultivo das espécies em pisciculturas comerciais, em programas de conservação e ainda em estudos evolutivos e de mudanças climáticas. Como na maioria dos teleósteos, o pirarucu e o jundiá apresentam diferenciação sexual direta, com a gônada indiferenciada originando diretamente um ovário ou um testículo. Entretanto, no pirarucu a diferenciação ovariana foi um pouco mais precoce que a testicular e no jundiá o início da diferenciação de ovários e testículos ocorreu em peixes de mesma idade. No pirarucu, marco da diferenciação ovariana (fêmea) é a concentração das células germinativas na face lateral da gônada, cercada por células somáticas pré-foliculares, ao mesmo tempo em que o epitélio passa de escamoso para cúbico em peixes de aproximadamente 9 cm de comprimento total. Com o desenvolvimento destas estruturas, inicia-se a formação de pequenas lamelas ovígeras, que posteriormente formam as franjas ovarianas, que são características desta espécie. Os supostos machos permanecem com a gônada com aspecto indiferenciado por mais tempo, até que as células germinativas se reorganizam espacialmente no órgão (concentrando-se em seu interior) para dar origem aos cordões testiculares. Esses cordões posteriormente se fragmentam originando os cistos espermatogênicos. No jundiá, a formação do ovário se inicia com o desenvolvimento da cavidade ovariana em exemplares de quatro semanas após a eclosão. Essa estrutura é formada por uma pequena projeção do epitélio gonadal, que eventualmente se curva e se fecha, deixando uma cavidade no interior do órgão. Essa cavidade, inicialmente fechada, se abre para a formação e desenvolvimento das lamelas ovarianas dentro dela. Nos machos de mesma idade, a gônada indiferenciada começa a apresentar sulcos que são a origem das franjas testiculares características de algumas espécies de bagres.

**Palavra-chave:** Bacia Amazônica, diferenciação de gônadas, ovário, célula germinativa primordial, célula somática.



## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

- Figura 1.** Pirarucu *Arapaima gigas*..... 13  
**Figura 2.** Jundiá *Rhamdia quelen*..... 16

### CAPÍTULO 2

- Figure 1.** Sampling of *A. gigas* for histological studies..... 35  
**Figure 2.** Gonadal primordium of *A. gigas*..... 36  
**Figure 3.** Differentiating ovary and testes of *A. gigas*..... 38  
**Figure 4.** Growing ovary of *A. gigas*..... 40  
**Figure 5.** Growing testis of *A. gigas*..... 41

### CAPÍTULO 3

- Figura 1.** Localização das gônadas em cortes histológicos seriados transversais de jundiá *R. quelen* com quatro semanas pós-eclosão..... 51  
**Figura 2.** Gônada indiferenciada de jundiá *R. quelen* com quatro semanas pós-eclosão..... 52  
**Figura 3.** Diferenciação ovariana de jundiá *R. quelen*..... 53  
**Figura 4.** Diferenciação testicular de jundiá *R. quelen*..... 54

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

<b>Tabela 1.</b> Classificação taxonômica do pirarucu <i>Arapaima gigas</i> .....	14
<b>Tabela 02.</b> Classificação taxonômica do Jundiá <i>Rhamdia quelen</i> .....	17
<b>Tabela 03:</b> Teleósteos com o tipo de diferenciação sexual conhecido.....	20

## SUMÁRIO

<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>120</b>
<b>1. AQUICULTURA NO BRASIL .....</b>	<b>13</b>
<b>2. CONSUMO DO PESCADO NO BRASIL E NO MUNDO .....</b>	<b>12</b>
<b>3. PIRARUCU: TAXONOMIA E CARACTERÍSTICAS GERAIS .....</b>	<b>15</b>
3.1. BIOLOGIA REPRODUTIVA DO PIRARUCU .....	175
<b>4. JUNDIÁ: TAXONOMIA E CARACTERÍSTICAS GERAIS .....</b>	<b>186</b>
4.1 BIOLOGIA REPRODUTIVA DO JUNDIÁ .....	208
<b>5. DETERMINAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO SEXUAL .....</b>	<b>21</b>
5.1. MORFOGÊNESE E DIFERENCIAÇÃO GONADAL .....	231
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>25</b>
<b>7. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>253</b>
<b>MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF PIRARUCU <i>Arapaima gigas</i></b> <b>(SCHINZ, 1822) GONADAL DIFFERENTIATION .....</b>	<b>331</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>342</b>
<b>1. INTRODUCTION .....</b>	<b>353</b>
<b>2. MATERIAL AND METHOD .....</b>	<b>364</b>
<b>3. RESULTS .....</b>	<b>375</b>
3.1. GONADAL PRIMORDIUM AND UNDIFFERENTIATED GONAD .....	386
3.2 OVARIAN DIFFERENTIATION .....	386
3.3 PRIMARY GROWTH AND PRE-VITELOGENESIS .....	38
3.4 TESTICULAR DIFFERENTIATION .....	420
<b>4. DISCUSSION .....</b>	<b>431</b>
<b>REFERENCES .....</b>	<b>475</b>
<b>ASPECTOS MORFOLÓGICOS DA DIFERENCIAÇÃO SEXUAL DO JUNDIÁ</b> <b><i>Rhamdia quelen</i> (Quoy &amp; Gaimard, 1824) .....</b>	<b>497</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>48</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>49</b>
<b>3. RESULTADOS .....</b>	<b>520</b>
3.1. LOCALIZAÇÃO DA GÔNADA .....	520
3.2. DIFERENCIAÇÃO GONADAL .....	54
<b>4. DISCUSSÃO .....</b>	<b>575</b>
<b>5. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>596</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>6159</b>



## **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## 1. AQUICULTURA NO BRASIL

Com a estagnação da pesca extrativista nas últimas décadas, produzir proteína de pescado tem se tornado uma grande desafio para aquicultura, uma vez que o consumo tem aumentado em decorrência do crescimento populacional e por ser um alimento saudável. Em 2016, a produção advinda da aquicultura mundial foi de 171 milhões de toneladas de pescado, sendo 88% destinado ao consumo humano (FAO, 2018). Isso corrobora o grande desafio da aquicultura e dos países com potencial de produção, como o Brasil, na oferta de proteína oriunda do pescado.

Apesar de apresentar potenciais hidrológico e biológico (rica ictiofauna) riquíssimos para ser um dos maiores produtores de pescado do mundo, o Brasil ainda está muito aquém de sua capacidade produtiva. O setor produtivo pesqueiro brasileiro ainda é muito instável devido a fatores específicos de cada região, e também por empecilhos comuns a todo o país, como: a falta investimento, falta de políticas públicas eficazes, legislações ambientais rígidas, falta de pacotes tecnológicos para espécies que possuem potencial zootécnico e climas instáveis (Peixe BR, 2018).

Fazendo um paralelo da produção de pescado por região entre os anos de 2014 e 2017 no Brasil, podemos verificar a oscilação e conseqüente vulnerabilidade da produção da aquicultura no país. Segundo o IBGE (2016), em 2014, a produção nacional do pescado foi de aproximadamente 561 mil toneladas, sendo a região Nordeste a líder com 26,8% (e o Ceará o principal destaque), seguida das regiões Norte, com 25,7% (com Rondônia sendo o maior produtor naquele ano), Sul, com 24,2% (concentrando a produção no Paraná e em Santa Catarina), Centro-Oeste, com 12,6% (principalmente por Mato Grosso) e Sudeste, com 10,7% (com relevância na produção de São Paulo e de Minas Gerais). Quando analisamos os dados de produção de 2017, apesar do crescimento da produção nacional, que saltou para quase 700 mil t., verificamos mudanças na produção por região: o Sul tornou-se o líder com 178.500 toneladas, devido o aumento de investimento na região, seguido das regiões Norte (164.500 t), Centro-Oeste (122 mil t.), Sudeste (115.300 t) e, em último, a região Nordeste (111.400 t) que sofreu drasticamente com interferências climáticas em alguns estados (Peixe BR, 2018).

As diferentes condições geográficas de cada região do país abrigam uma alta diversidade de espécies com potencial econômico e zootécnico. Em termos de espécies com potencial de produção em cativeiro, o Brasil é um país com grande diversidade de espécies de peixes nativas que possuem potencial para aquicultura, além das adaptadas, como a tilápia nilótica principalmente. De acordo com a Embrapa (2017), as espécies mais produzidas no país por

região, são: *i*) tambaqui, pirarucu e pirapitinga na região Norte; *ii*) tilápia e camarão marinho no Nordeste; *iii*) tambaqui, pacu e pintado no Centro-Oeste; *iv*) tilápia, pacu e pintado no Sudeste; e *v*) carpa, tilápia, jundiá, ostra e mexilhão na região Sul. Apesar do elevado número de espécies de relevância para a produção de pescado, ainda faltam pacotes tecnológicos que permitam o aumento da produção e fortaleçam a aquicultura brasileira para finalmente se tornar uma atividade pecuária consolidada.

## 2. CONSUMO DO PESCADO NO BRASIL E NO MUNDO

O consumo mundial de proteína animal vem crescendo de forma acelerada em decorrência do aumento populacional, e cabe ao agronegócio a missão de aumentar a oferta de proteína animal, principalmente o pescado por ser um alimento saudável. De 1961 a 2016, houve um aumento anual médio do consumo do pescado de 3,2%, excedendo o crescimento populacional (1,6%) e o consumo de todos os outros animais terrestres (2,8%), segundo os dados da FAO (2018). Assim, o pescado é atualmente o item alimentar mais consumido do mundo. Este fato demonstra a importância do pescado no combate a fome e para geração de emprego e renda no mundo.

Em 2016, o consumo médio de peixe foi de aproximadamente 20,3 kg por habitante/ano FAO (2018), ultrapassando a média de consumo recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) de 12 kg/hab/ano. Apesar do consumo mundial *per capita* de pescado estar acima da média recomendada pela OMS, existem países como o Brasil, cujo consumo de peixe ainda está abaixo do recomendado, mesmo apresentando um potencial único para a aquicultura. Entretanto, embora o consumo do pescado no Brasil seja ainda considerado baixo, ele vem crescendo nas últimas duas décadas. Em 2003, o consumo de pescado era inferior a 6,5 kg *per capita* e em 2011 chegou aproximadamente a 11,17 kg *per capita*, segundo o Ministério da Pesca e Aquicultura (2009). A média de consumo *per capita* de pescado do brasileiro não está atualizada, pois não foram transmitidos os dados oficiais para FAO desde 2014. Uma das estratégias para se alcançar os patamares recomendados pela OMS é aumentar a produção e, conseqüentemente, a oferta de pescado.

O Brasil apresenta um quadro de consumo de proteína inverso do restante do mundo, sendo sua maior produção e consumo são das carnes de frango e bovina, enquanto que, no contexto mundial, os pescados e a carne suína são as proteínas mais produzidas e consumidas (FAO, 2009; MPA, 2009). Provavelmente esse cenário irá se alterar nos próximos anos, devido

o aumento do consumo de carne de peixe pela população. Isso porque a demanda por proteína do pescado tem aumentado constantemente.

### 3. PIRARUCU: TAXONOMIA E CARACTERÍSTICAS GERAIS

O pirarucu pertence ao mais primitivo grupo dos teleósteos, sendo o maior peixe de água doce da América do Sul (Figura 1). Sua taxonomia não é bem definida e provavelmente exista mais espécies. O pirarucu pertence à classe Actinopterygii, ordem Osteoglossiformes e família Osteoglossidae, na qual ocorrem dois gêneros: *Osteoglossum* (aruanã) e *Arapaima* (pirarucu). Ambos gêneros são nativos da Amazônia e estão relacionados com o gênero *Scleropages*, da Austrália, e *Heterotis*, da África (Nelson, 1994). Atualmente são mencionadas cinco espécies de pirarucu: *Arapaima gigas* descrita por Schinz, (1822); *A. agassizii*, *A. mapae* e *A. arapaima*, listadas por Gunther (1868) na sinonímia de *A. gigas* sem apresentar análise ou razão; e a mais recente, descrita por Stewart (2013 b) *Arapaima leptossoma*. Das espécies listadas por Gunther, somente a espécie *A. agassizii* foi validada em estudos realizados por Stewart (2013 a), as demais, ainda necessitam estudos para validação como uma nova espécie. Existem, portanto, três espécies de pirarucu registradas e duas que necessitam serem validadas, e é provável que exista um número ainda maior (tabela 01).



**Figura 1.** Pirarucu *Arapaima gigas*.

**Tabela 1.** Classificação taxonômica do pirarucu *Arapaima gigas*.

<b>Reino</b>	Animalia
<b>Filo</b>	Chordata
<b>Classe</b>	Actinopterygii
<b>Ordem</b>	Osteoglossiformes
<b>Família</b>	Osteoglossidae
<b>Gênero</b>	Arapaima (pirarucu)
<b>Espécie</b>	<i>Arapaima gigas</i> , Schinz (1822) <i>A. agassizii</i> , Gunther (1868) <i>A. mapae</i> , Gunther (1868) <i>A. arapaima</i> , Gunther (1868) <i>Arapaima leptossoma</i> , Stewart (2013 b)
<b>Nomes populares</b>	Pirarucu, Bodeco (Brasil), piroasca (Colômbia); paiche (Peru)

O pirarucu apresenta uma ampla distribuição geográfica dentro da bacia Amazônica, podendo ser encontrado no rio Amazonas, nos seus lagos e afluentes, e no rio Araguaia (Pereira, 1954), bem como na Amazônia peruana, na Colômbia e Guiana. Seu nome popular varia de acordo com a localidade, no Brasil, na fase juvenil é conhecido por bodeco (em função de saltar na água), na Colômbia, piroasca e no Peru paiche.

O pirarucu apresenta uma coloração predominantemente escura na fase juvenil, modificando-se na fase adulta, particularmente na época da reprodução. Na estação reprodutiva, as escamas passam a apresentar uma coloração avermelhada principalmente nas regiões caudal e inferior do corpo. Acredita-se que nos machos essa coloração seja ainda mais acentuada podendo chegar até a região do opérculo (Ferraris, 2003; Ono et al., 2004; Monteiro et al., 2005). No entanto, essa característica é relativa, pois nem todos os espécimes apresentam esse dimorfismo durante o período reprodutivo (Leão, 2009).

As características anatômicas, fisiológicas e comportamentais de *Arapaima gigas* são o resultado de uma série de adaptações para a sobrevivência ao ambiente em que vive, o que certamente permitiu a sobrevivência dessa espécie até os dias atuais. O pirarucu possui bexiga natatória modificada que é responsável por 90% de sua respiração (respiração aérea) sendo que



os 10% restantes ocorrem pelas brânquias (respiração aquática complementar) (Brauner; Val 1996), as quais também possuem papel na excreção de CO<sub>2</sub> e regulação iônica.

### 3.1. BIOLOGIA REPRODUTIVA DO PIRARUCU

Os primeiros relatos a respeito da biologia reprodutiva do pirarucu foram os de Fontenele (1948 e 1952), analisando o comportamento reprodutivo em regime de cativeiro em açudes na região nordeste do Brasil. Posteriormente, outros estudos envolvendo aspectos reprodutivos foram desenvolvidos, principalmente a partir da observação de animais em vida livre (Cebrelli, 1972; Flores 1980). No entanto, são poucas as informações existentes sobre a fisiologia reprodutiva da espécie.

Ambos os sexos da espécie apresentam uma única gônada funcional, localizada no lado esquerdo da cavidade abdominal (Godinho et al., 2005). O pirarucu atinge a maturidade sexual em seu habitat natural entre o terceiro e quinto anos de idade, quando alcançam tamanhos de aproximadamente 150 cm e pesam de 40 a 50 kg (Fontenele, 1948; Leão, 2009).

Seu comportamento reprodutivo é bastante complexo, envolvendo a construção de ninhos, desova parcelada e cuidado parental com o ninho e a prole (Fontenele, 1948). O pirarucu é uma espécie que vive em ambiente de águas calmas, e, segundo Hoar (1969), esta espécie não realiza migrações reprodutivas, construindo os ninhos em locais com pouca movimentação de água. Este mesmo autor também relatou que os ovos são maiores e em menor número do que nas espécies reofílicas. Os pirarucus aparentemente formam casais monogâmicos para a reprodução, embora estudos recentes tenham apontado uma possível contribuição de mais de dois animais em uma única desova (Farias et al., 2015).

Para que o cultivo do pirarucu se fortaleça e se consolide como uma espécie de relevância comercial na aquicultura do Brasil, é necessário que sejam desenvolvidos estudos básicos sobre a biologia reprodutiva, visando o estabelecimento de protocolos eficientes de indução hormonal para a espécie. A reprodução em cativeiro ainda ocorre de forma natural e o manejo mais eficiente de plantel é a identificação visual e separação de casais, e espera pelo aparecimento dos juvenis nos tanques. Entretanto, o procedimento de sexagem visual do pirarucu não é eficiente, é difícil e errôneo (Lima et al., 2015), pois a coloração pode ser influenciada por vários fatores, entre eles: a) diferença de padrões hormonais da espécie em período reprodutivo; b) idade do animal, tendendo a se estabilizar após a idade da primeira maturação; c) variação de padrão de coloração vermelha entre indivíduos de uma mesma idade (Queiroz, 2000); e d) variação de coloração vermelha entre os indivíduos de diferentes regiões ou piscigranjas.

Existem outros métodos utilizados para identificar o sexo do pirarucu. No entanto, nenhum é capaz de identificar o sexo do peixe em fase pré-púbere. A metodologia mais eficiente encontrada no mercado atualmente é o kit de determinação do sexo de *Arapaima gigas* (SKULDTECH, método proteína-matriz) que se baseia na presença da vitelogenina no sangue de fêmeas em maturação. O ensaio permite a detecção de baixas concentrações (100 ng/ml) de vitelogenina diluídas nas amostras de sangue. Isto é equivalente a 0,04 mg/ml no sangue de peixe. Este valor é compatível com as concentrações registrados no sangue do sexo feminino, mesmo em o início da maturação (0,5 a 50 mg/ml de sangue). Contudo, esta metodologia ainda apresenta algumas desvantagens, como: a) a necessidade que os indivíduos já tenham alcançado a primeira maturação sexual; b) o curto prazo de validade do kit (três meses); c) a necessidade de importação do kit e seu alto custo; d) a necessidade de pessoas capacitadas para o manejo de pirarucus adultos, coleta de sangue e realização do ensaio.

#### 4. JUNDIÁ: TAXONOMIA E CARACTERÍSTICAS GERAIS

A taxonomia do gênero *Rhamdia* ainda não está bem elucidada e novas espécies ainda podem ser incluídas neste gênero. Silfvergrip (1996), realizou uma ampla revisão taxonômica do gênero, baseada em características da morfologia interna, e concluiu que o gênero *Rhamdia* é formado por 11 espécies. No entanto, atualmente já foram descritas 17 espécies no total e existem 49 espécies em sinonímia à *Rhnadia quelen*, o que pode elevar ainda mais a quantidade de espécies deste gênero em estudos futuros. Segundo o mesmo autor, *Rhamdia quelen* (Figura 02) pertence à seguinte divisão taxonômica: Classe: Osteichthyes, Série: Teleostei, Ordem: Siluriformes, Família: heptapteridae, Gênero: *Rhamdia*, Espécie: *Rhamdia quelen* (Tabela 02).



**Figura 2.** Jundiá *Rhamdia quelen*.

**Tabela 02.** Classificação taxonômica do Jundiá *Rhamdia quelen*.

<b>Reino</b>	Animalia
<b>Filo</b>	Chordata
<b>Classe</b>	Actinopterygii
<b>Ordem</b>	Siluriformes
<b>Família</b>	heptapteridae
<b>Gênero</b>	<i>Rhamdia</i>
<b>Espécie</b>	<i>Rhamdia quelen</i> (Quoy & Gaimard, 1824)

Diversas características morfológicas externas distinguem o jundiá das outras espécies do mesmo gênero e de suas espécies sinônimas, como: coloração variando de marrom avermelhado claro a cinza, barbilhões maxilares no mínimo 28,8% do comprimento padrão e com crescimento alométrico negativo (esta relação é provavelmente aumentada devido à grande possibilidade de danos nos barbilhões dos exemplares grandes), espinho da nadadeira peitoral serrilhado em ambos os lados, nadadeira caudal com lóbulos desiguais, véu da narina posterior aberta postero-lateralmente, e possui entre 5 a 16 arcos branquiais (Silfvergrip, 1996).

O jundiá *Rhamdia quelen* é uma espécie de ampla distribuição geográfica na região neotropical, que abrange do norte do México ao centro-sul da Argentina (Gomes, 2000). É uma espécie que se destaca no cultivo na região sul do Brasil, por ser um bagre onívoro de excelente desempenho zootécnico (Epagri, 2016). Pode atingir de 600 g a 800 g de massa corporal em apenas oito meses (Borges, 2005), apresenta fácil adaptação à criação intensiva, rusticidade, facilidade para indução durante a reprodução, alta taxa de fecundação, e possui carne saborosa com baixo teor de gordura e poucos espinhos (Luchini; Avendano, 1985; Carneiro et al., 2002; Fracalossi et al., 2002).

A rusticidade do jundiá é constatada quando observamos a capacidade da espécie em se adaptar a diferentes ambientes e situações. O jundiá pode ser encontrado em lagos, poços, no fundo dos rios e próximo às margens juntamente com a vegetação. Porém, os ambientes preferenciais são os de águas calmas e com fundo de areia e lama, onde se escondem entre pedras e troncos apodrecidos, de onde saem à noite, à procura de alimentos (Guedes, 1980; Baldisserotto, 2004). Além disso, essa espécie suporta uma ampla variação de temperatura e são considerados euritérmicos. Os alevinos são aclimatados a 31°C e suportam uma variação de

temperaturas de 15 a 34°C. Piaia et al., (1999) observaram que as larvas e alevinos de jundiá apresentam uma acentuada aversão à luz, buscando assim locais mais escuros.

#### 4.1 BIOLOGIA REPRODUTIVA DO JUNDIÁ

O jundiá é uma espécie que atinge sua maturidade sexual com aproximadamente um ano de idade em ambos os sexos, sendo que os machos iniciam o processo de maturação gonadal ao comprimento de 13,4cm e as fêmeas com 16,5cm. Entretanto, machos e fêmeas só estão aptos para reprodução a partir de 16,5cm e 17,5cm, respectivamente (Narahara et al., 1985).

O comportamento reprodutivo de *R. quelen* assemelha-se ao de muitas espécies de água doce (Mardini et al., 1981). Quando prontos para desova, os cardumes procuram lugares de água rasa, limpa, pouco corrente e com fundo pedregoso. A fecundação da espécie é externa (ovulípara) no habitat natural e os ovos são demersais e não aderentes. Há um bom sincronismo entre machos e fêmeas na hora da desova, que ocorre logo ao amanhecer (Godinho et al., 1978; Andreatta, 1979).

Durante período reprodutivo, a sexagem de machos e fêmeas é fácil. Os machos liberam com facilidade o sêmen sob leve pressão abdominal e o orifício genital é então protraído. Em contrapartida, as fêmeas maduras apresentam o orifício genital hiperêmico, avermelhado e com dilatação ventral (Mardini et al., 1981). Essas características visuais ajudam a identificação de indivíduos que estão aptos para reprodução, facilitando o manejo durante a reprodução induzida nas criações.

As fêmeas de *R. quelen* respondem bem em relação à indução artificial (Radunz Neto, 1981). O tempo de eclosão dos ovos varia conforme a temperatura da água. Na temperatura de 16°C, a eclosão ocorre em torno de 3 dias, e com 24°C a eclosão demora aproximadamente 24h.

Em cultivo de engorda, as fêmeas de jundiá apresentam um melhor desempenho zootécnico, crescendo aproximadamente 30% a mais que os machos até a fase da primeira maturação sexual. Isso ocorre porque os machos ficam precocemente maduros e as fêmeas atrasam um pouco mais a sua maturidade sexual (Graeff et al., 2008). Assim, Amaral Junior et al. (2008) utilizaram dosagens do hormônio 17 $\beta$ -estradiol na ração para definir um protocolo de feminização do jundiá e constataram que foi efetivo o aumento do número de fêmeas nos lotes tratados. Com tudo, melhores resultados seriam obtidos se fosse conhecido o momento exato de diferenciação sexual.

## 5. DETERMINAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO SEXUAL

Para entender melhor o processos fisiológicos reprodutivos é necessário que os conceitos de determinação sexual e diferenciação sexual sejam bem esclarecidos, pois são processos que ocorrem de forma e tempos diferentes e ambos são extremamente importantes para qualquer espécie de vertebrado. Determinação sexual é o mecanismo que estabelece o sexo (gênero) de um organismo ainda em desenvolvimento e pode durar minutos ou até mesmo segundos. E diferenciação sexual é o processo morfológico pelo qual uma gônada indiferenciada passa ao se transformar em ovário ou testículo, sendo um processo mais longo que o anterior. Ambos processos estão intimamente relacionados nos peixes, apesar de apresentarem diferenças importantes em suas definições (Pandian, 2012; Morais, 2016).

Para os mamíferos, a determinação sexual já está bem estabelecida e ocorre no momento da fertilização, com a presença dos cromossomos sexuais de ambos parentais. Os genes presentes nestes cromossomos definem o sexo do zigoto através da expressão de receptores hormonais, hormônios e fatores de transcrição, que são determinantes para definir o gênero das gônadas ainda indiferenciadas e o sexo fenotípico do indivíduo (Domenice et al., 2002; Mello et al., 2005). Assim, a determinação sexual em mamíferos ocorre no momento da fertilização e permanece para o resto da vida, sem alterações posteriores. Já nos os teleósteos, a determinação e diferenciação das gônadas ocorrem em tempos diferentes e variam grandemente de espécie para espécie.

Muitos estudos já foram realizados sobre determinação e diferenciação sexual em peixes, e pouco foi esclarecido até o momento devido à grande variedade de mecanismos que influenciam a formação e identidade sexual em teleósteos (Devlin & Nagahama, 2002; Penman; Piferrer, 2008). Em geral, a maioria dos teleósteos apresentam indivíduos com sexos separados, ou seja, são dióicos (gonocóricos/gonocóricos). Entretanto, diferente dos mamíferos, ao início da embriogênese, os peixes não possuem sexo definido, uma vez que as gônadas não estão diferenciadas em testículos ou ovários. Existem apenas precursores embriológicos que darão início ao processo de diferenciação como: as células germinativas primordiais e as células somáticas. Neste estágio de desenvolvimento, estas células são pluripotentes, podendo dar origem a ambos os sexos. Na época/tamanho da diferenciação, que é espécie-específica, os peixes gonocóricos podem apresentar dois tipos de desenvolvimento gonadal: indiferenciado (desenvolvimento indireto) ou diferenciado (desenvolvimento direto). Na diferenciação indireta, as gônadas de todos os indivíduos iniciam seu desenvolvimento com características semelhantes a um ovário e, posteriormente, em parte dos indivíduos essa

estrutura regride dando vez ao desenvolvimento testicular, enquanto a outra parte dos indivíduos continua o desenvolvimento ovariano. Já na diferenciação direta, as gônadas diferenciam-se diretamente em testículos ou ovários (Yamamoto, 1969). Não é raro encontrarmos espécies de peixes com altos índices de indivíduos intersexo. As espécies gonocóricas que apresentam intersexo são, na maior parte, espécies de desenvolvimento gonadal indireto, enquanto que, dentre os gonocóricos diferenciados, a taxa de intersexo é quase nula (Yamamoto, 1969; Sadovy de Mitcheson; Liu, 2008). A tabela 3 lista as espécies de peixe cujo tipo de diferenciação sexual já foi identificado e descrito, servindo de base para o desenvolvimento de manejos reprodutivos e implantação de novas tecnologias.

**Tabela 03.** Teleósteos com o tipo de diferenciação sexual conhecido.

<b>Espécie</b>	<b>Diferenciação sexual</b>	<b>Referências</b>
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Direta	Takashima et al., 1980
<i>Barbus tetrazona</i>	Indireta	Takahashi; Shimizu, 1983
<i>Oncorhynchus kisutch</i>	Direta	Piferrer; Donaldson, 1989
<i>Cyprinus carpio</i>	Direta	Komen et al., 1992
<i>Abramis brama</i>	Direta	Talikina, 1995
<i>Sebastes schlegeli</i>	Direta	Lee et al., 1996
<i>Esox masquinongy</i>	Direta	Lin et al., 1997
<i>Dicentrarchus labrax</i>	Direta	Blázquez et al., 1998
<i>Siganus guttatus</i>	Direta	Komatsu et al., 2006
<i>Gadus morhua</i>	Direta	Chiasson et al., 2008
<i>Solea senegalensis</i>	Direta	Vinãs et al., 2013
<i>Anguilla anguilla</i>	Direta	Geffroy et al., 2013
<i>Danio rerio</i>	Indireta	Chen; Ge, 2013 Carroll; North, 2014 Vliegenthart et al., 2014 Wager et al., 2014

<i>Cyprinus carpio</i>	Direta	Mazzoni, 2014
<i>Gymnocorymbus ternetzi</i>	Indireta	Mazzoni, 2015
<i>Pseudoplastystoma fasciatum</i>	Direta	Valentin, 2016
<i>Tanichthys albonubes</i>	Direta	Mazzoni, 2017
<i>Corydoras schwartzi</i>	Direta	Mazzoni, 2017
<i>Amatitlania nigrofasciata</i>	Direta	Mazzoni, 2017
<i>Poecilia reticulata</i>	Direta	Mazzoni, 2017

É importante lembrar que o processo de desenvolvimento gonadal dos teleósteos pode ser influenciado por uma série de fatores, como fatores abióticos, ambientais, hormônios e disruptores endócrinos em qualquer fase da diferenciação. Portanto, somente quando o processo de diferenciação estiver completo, é que o indivíduo pode ser considerado fisiologicamente macho ou fêmea (Cesar et al., 2004).

Esta relativa labilidade da diferenciação sexual de peixes foi a condição fundamental para o desenvolvimento de populações monossexuadas de peixe. Na piscicultura, a criação do gênero superior zootecnicamente (em ganho de peso, crescimento, coloração nos ornamentais, produção de caviar, dentre outros) tem trazido grandes vantagens econômicas para piscicultores nos USA, Europa, Ásia e até Brasil.

Partindo desse pressuposto, determinar e identificar o momento que ocorre a diferenciação sexual das espécies pode também favorecer a aplicação de manejos reprodutivos adequados, beneficiando diretamente a cadeia produtiva das espécies, um vez que um gênero pode apresentar um melhor desempenho zootécnico que o outro.

### 5.1. MORFOGÊNESE E DIFERENCIAÇÃO GONADAL

Nos teleósteos, as células do saco vitelino dão origem às células germinativas primordiais. Ao início da embriogênese, essas células migram pelo intestino anterior para povoarem a crista genital (Nakamura et al., 1974; Foyle, 1993; Braat et al., 1999a; Molyneaux; Wylie, 2004; Otani et al., 2005). Em seguida, as células germinativas primordiais dispõem-se entre as células somáticas da crista genital e proliferam por mitose constituindo o primórdio gonadal (Patiño; Takashima, 1995; Braat et al., 1999a; Kobayashi et al., 2000). O primórdio gonadal é formado no período de morfogênese, quando ocorre a proliferação das células a partir

de sucessivas divisões celulares (mitose), originando uma gônada indiferenciada (Strüssmann et al., 1996; Lin et al., 1997; Meijide et al., 2005; Mazzoni et al., 2014). Esta gônada por sua vez, passa por uma série de modificações estruturais, determinando a formação de uma gônada feminina ou masculina. Assim, a diferenciação gonadal nos peixes inclui mudanças tanto nas células somáticas, quanto nas células germinativas (Strüssmann & Nakamura, 2002), como divisões mitóticas de oogônias ou espermatogônias a partir das células germinativas primordiais (García-Alonso et al., 2009), até mudanças estruturais, incluindo proliferação mitótica das células somáticas. Quanto às alterações morfológico-estruturais que ocorrem nas gônadas ao início da diferenciação, não está claro se o desenvolvimento é determinado em nível bioquímico ou celular e nem mesmo se é iniciada nas células germinativas ou nas células somáticas presentes nas gônadas, ou ainda se acontece nas duas ao mesmo tempo (Devlin e Nagahama, 2002).

Na maioria dos teleósteos, as sucessivas divisões celulares das células germinativas primordiais indicam o princípio da diferenciação gonadal, seja ela ovariana ou testicular, e mais especificamente quando se inicia o processo de meiose nas fêmeas (Nakamura e Takahashi, 1973; Strüssmann et al., 1996; Nakamura et al. 1998; Maack e Segner, 2003; Meijide et al., 2005; Mazzoni et al., 2014). No entanto, existem algumas espécies que não seguem essa ordem de desenvolvimento e a diferenciação inicia-se com a formação da cavidade ovariana precedendo o início da atividade meiótica das oogônias, como no bagre-americano *Ictalurus punctatus* (Patiño et al., 1996), bacalhau do Atlântico *Gadus morhua* (Haugen et al., 2012) e tilápia nilótica *Sarotherodon niloticus* (Nakamura e Nagahama, 1985), ou ainda com ambas ocorrendo de forma concomitante, como na tilápia Mozambique *Oreochromis mossambicus* (Nakamura e Takahashi, 1973) e na eelpout vivíparo *Zoarces viviparus* (Rasmussen et al., 2006). Isso ocorre quando as células somáticas começam a penetrar os cordões contínuos de CGP's e reorganizam a estrutura espacial antes do início da meiose.

Em estágios mais avançados da diferenciação ovariana, e início da meiose, as oogônias originam os oócitos e células somáticas presentes nas gônadas diferenciam-se em células foliculares (Nakamura et al., 2006; Saito et al., 2007; Nakamura et al., 2008). A partir da formação das células primordiais, diferentes processos no desenvolvimento gonadal ocorrem de acordo com o gênero que irá se desenvolver. No estroma ovariano feminino, células mesenquimais diferenciam-se em células tecais (Wallace; Selman 1990; Grier, 2000, 2007, 2009; Mazzoni et al., 2014) e nos testículos, as células somáticas que envolvem as espermatogônias diferenciam-se em células de Sertoli (Grier et al., 2005; Meijide et al., 2005,



Grier; Uribe, 2009; Mazzoni et al., 2014). No interstício notam-se fibroblastos, células mióides, fibrilas de colágeno, granulócitos e capilares sanguíneos (Meijide et al., 2005).

## 6. CONCLUSÃO

Com base no exposto acima e se considerando: i) a importância ecológica e social do jundiá e do pirarucu, ii) seus potenciais produtivos e econômicos para as regiões Norte e Sul do Brasil respectivamente e iii) o quadro atual de desconhecimento a respeito de suas fisiologias reprodutivas, o presente trabalho visa caracterizar processo de formação do primórdio gonadal e da gônada em diferenciação destas duas espécies nativas, através de secções histológicas seriadas, como subsídio para o desenvolvimento de tecnologias para o cultivo da espécie em pisciculturas comerciais, em programas de conservação e ainda em estudos evolutivos e de mudanças climáticas.

## 7. REFERÊNCIAS

- AMARAL JUNIOR, H.; SILVA, N.M.F.; GARCIA, S. Análise de diferentes dosagens de hormônio na ração, para definição de um protocolo de feminilização do jundiá *Rhamdia quelen*. Revista Eletrônica de Veterinária, v. 9, n.12, p. 1-7, 2008.
- ANDREATTA, E.R. Influência de diferentes dosagens e intervalos entre aplicações de gonodotrofinas coriônica humana (HCG) sobre a reprodução do jundiá *Rhamdia sapo* (Valenciennes, 1840). 1979. 51p. Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria – RS.
- BALDISSEROTTO, B. Biologia do jundiá. In: BALDISSEROTTO, B.; RADÚNZ NETO, J. Criação de Jundiá. Santa Maria, 2004. v. 3, p. 67-71.
- BARBOSA, R.P. Diferenciação gonadal em *Piaractus mesopotamicus*. 2015. 52p. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Programa de Pós-Graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP – CAUNESP, Jaboticabal, São Paulo.
- BLÁZQUEZ, M.; ZANUY, S.; CARRILLO, M.; PIFERRER, F. Structural and functional effects of early exposure to estradiol-17 $\beta$  and 17 $\alpha$ -ethynylestradiol on the gonads of the gonochoristic teleost *Dicentrarchus labrax*. Fish Physiology and Biochemistry, v.18, n. 1, p.37-47, 1998.
- BORGES, A. Valores hematológicos e bioquímicos séricos, efeitos de doses subletais da cipermetrina e características físico-químicas do sêmem do Jundiá *Rhamdia quelen*. Porto Alegre, 2005. 175f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- BRAAT, A.K.; SPEKSNIJDER, J.E.; ZIVKOVIC, D. Germ line development in fishes. Int. J. Dev. Biol., v. 43, n. 7, p. 45-760, 1999a.

- BRAUNER, C. J.; VAL, A. L. The interaction between O<sub>2</sub> and C<sub>2</sub> exchange in the obligate air breather, *Arapaima gigas*, and the facultative air breather, *Lipossarcus pardalis*. In VAL, A.L.; ALMEIDA-VAL, V.M.F.; RANDALL, D.J. (Ed.). Physiology and biochemistry of the fishes of the Amazon. Manaus: INPA. 1996. p. 101-110.
- CARNEIRO, P.C.F. Jundiá: um grande peixe para a Região Sul. Panorama da Aquicultura, São Paulo, v. 12, n.69, p. 41-46, 2002.
- CARROLL, K.J; NORTH, T.E. Oceans of Opportunity: Exploring Vertebrate Hematopoiesis in Zebrafish. Experimental Hematology, v. 42, n. 8, p. 684-696, 2014.
- CEBRELLI, C. B. Estudio del factor de condición del “paiche” *Arapaima gigas* (Cuvier) em la zona reservada del Rio Pacaya entre los anos 1959 a 1969. 1972. Universidade Nacional Mayor de San Marcos, Lima.
- CESAR, M.P.; MURGAS, L.D.S.; ARAÚJO, R.V.; DRUMMOND, C.D. Métodos para obtenção de população monossexo na piscicultura. Bol. Agropec. Universidade Federal de Lavras- MG, n. 69, p. 1-27, 2004.
- CHEN, W.; GE, W. Gonad differentiation and puberty onset in the zebrafish: evidence for the dependence of puberty onset on body growth but not age in females. Molecular reproduction & Development, v. 80, n. 5, p. 384-392, 2013.
- CHIASSON, M.; BENFEY, T.J.; MARTIN-ROBICHAUD, D.J. Gonadal differentiation in Atlantic cod, *Gadus morhua* L., and haddock, *Melanogrammus aeglefinus* [L.]. Acta Ichthyologica et Piscatoria, v. 2, n. 38, p. 127-133, 2008.
- DEVLIN, R.H.; NAGAHAMA, Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. Aquaculture, v. 208, n. 3-4, p. 191–364, 2002.
- DOMENICE, S.; COSTA, E.M.F.; CORRÊA, R.V.; MENDONÇA, B.B. Aspectos Moleculares da Determinação e Diferenciação Sexual. Brasileira Endocrinologia Metabolismo, v. 46 n. 4, p. 433-443, 2002.
- EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Pesca e aquicultura. Palmas: Embrapa, 2017. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/tema-pesca-e-aquicultura/>>. Acesso em: abr. 2017.
- EPAGRI, Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina, 2016. Disponível em: [http://www.epagri.sc.gov.br/?page\\_id=676](http://www.epagri.sc.gov.br/?page_id=676). Acesso em: 18/08/2016.
- FAO. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible. Roma. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 2009. The state of world fisheries and aquaculture. ISSN 1020-5489.
- FARIAS, I.P; LEÃO, A.; ALMEIDA, Y.S.; VERBA, J.T.; CROSSA M.M.; HONCZARYK, A.; HRBERK, T. Evidende of polygamy in the socially monogamous Amazonian fish *Arapaima gigas*

- (Schinz, 1822) (Osteoglossiforme, Arapaimidae). Neotropical Ichthyology, Maringá, v. 13, n 1, p. 195-204, 2015.
- FERRARIS, J.R.C.J. Family Arapaimatidae (Bonytongues) In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS J.R.,C.J. (org.). Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Porto Alegre: Edipucrs, 2003. p. 742.
- FLORES, H. G. Desarrollo sexual del paiche *Arapaima gigas* en las zonas reservadas del estado (Rios Pacaya y Samiria) 1971-1975. Informe Instituto del Mar del Peru, IMARPE, v.67, p 1-21, 1980.
- FONTENELE, O. Contribuição para o conhecimento da biologia do pirarucu, *Arapaima gigas* (Cuvier) em cativeiro (Actinopterygii, Osteoglossidae). Revista Brasileira de Biologia, Rio de Janeiro, v. 8, n. 4, p. 445-459, 1948.
- FONTENELE, O. Hábitos de desova do pirarucu, *Arapaima gigas* (Cuvier) e evolução de sua larva. Fortaleza: Departamento Nacional de Obras Contra as Secas – Serviço de piscicultura, 17p. 1952.
- FOYLE, T.P. A histological description of gonadal development and sex differentiation in the salmon (*Oncorhynchus kisutch*) for both untreated and estradiol immersed fry. J. Fish. Biol., v. 42, n. 5, p. 699-712, 1993.
- FRACALOSSO, D.M. No rastro das espécies nativas. Panorama da Aquicultura, São Paulo, v. 12, n. 74, p.43-49, 2002.
- GARCÍA-ALONSO, J.; RUIZ-NAVARRO, A.; CHAVES-POZO, E.; TORRALVA, M.; GARCÍA-AYALA, A. Gonad plasticity and gametogenesis in the endangered Spanish toothcarp *Aphanius iberus* (Teleostei: Cyprinodontidae). Tissue and Cell. v. 41, n; 3, p. 206-213, 2009.
- GEFFROY, B.; GUIGUEN, Y.; FOSTIER, A.; BARDONNET, A. New insights regarding gonad development in European eel: evidence for a direct ovarian differentiation. Fish Physiology and Biochemistry, v. 39, n.5, p. 1129-1140, 2013.
- GODINHO, H.P.; SANTOS, J.E.; FORMAGIO, P.S.; GUIMARÃES CRUZ, R.J. Gonadal morphology and reproductive traits of the Amazonian fish *Arapaima gigas* (Schinz, 1822). Acta Zoologica (Stockholm). v. 86, n.4, p.289-294. 2005.
- GODINHO, H.M., BASILE-MARTINS, M.A., FENERICH, N. Desenvolvimento embrionário e larval de *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840) (*Siluriformes, Pimelodidae*). Revista Brasileira de Biologia, v. 38, n. 1, p. 151-156, 1978.
- GOMES, L.C.; GOLOMBIESKI, J.I.; GOMES, A.R.C.; BALDISSEROTTO, B. Biologia do Jundiá *Rhamdia quelen* (TELEOSTEI, PIMELODIDAE). Ciência Rural, Santa Maria. v. 30, n. 1, p. 179-185, 2000.
- GRAEFF, A.; SEGALIN, C.A.; PRUNER, E.N.; AMARAL JUNIOR, H. Produção de alevinos de jundiá *Rhamdia quelen*. Florianópolis: Epagri, 2008. 34p.
- GRANDI, G.; COLOMBO, G. Development and early differentiation of gonad in the European eel (*Anguilla anguilla*, Anguilliformes, Teleostei): A cytological and ultrastructural study. Journal of Morphology, v. 231, n. 2, p. 195-216, 1997.

- GRIER, H.J. Ovarian germinal epithelium and folliculogenesis in the Common Snook, *Centropomus undecimalis* (Teleostei: Centropomidae). J. of Morphol., v. 243, n. 3, p. 265-281, 2000.
- GRIER, H.J. The germinal epithelium: its dual role in establishing male reproductive classes and understanding the basis for indeterminate egg production in female fishes. In: Proceedings of the fifty-third annual Gulf and Caribbean Fisheries Institute (Creswell, R.L. ed.). Fort Pierce: Mississippi/Alabama Sea Grant Consortium. 2002. p. 537-552.
- GRIER, H.J.; TAYLOR, R.G. Testicular maturation and regression in the common snook. J. Fish Biol., v. 53, n. 3, p. 521-542, 1998.
- 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). J. of Morphol. v. 268, n. 4, p. 293-310, 2007.
- GRIER, J.H.; URIBE, M.C. The Testis and Spermatogenesis in Teleosts. In: JAMIESON, B.J.M. (Ed): Reproductive Biology and Phylogeny of Fishes (Agnathans and Bony Fishes) Phylogeny Reproductive System Viviparity Spermatozoa. 2009. p. 802.
- GRIER, J.H.; URIBE, M.C.; PATIÑO, R. The ovary, folliculogenesis and oogenesis in teleosts. In: JAMIESON, B.J.M. (Ed): Reproductive Biology and Phylogeny of Fishes (Agnathans and Bony Fishes) Phylogeny Reproductive System Viviparity Spermatozoa. 2009. p. 802.
- GRIER, H.J.; LO NOSTRO, F. The germinal epithelium in fish gonads: the unifying concept. In: NORBERG, B.; KJESBU, O.S.; TARANGER, G.L.; ANDERSSON, E.; STEFANSSON, S.O. Editors. Proceedings of the 6th International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. Norway: University of Bergen. 2000. p. 233-236.
- GRIER, H.J.; URIBE, M.C.; PARENTI, L.R.; ROSA-CRUZ, G. Fecundity, the Germinal, and Folliculogenesis in Viviparous fishes. Viviparous Fishes, First edition published by New Life Publication. p. 191-216, 2005.
- GUEDES, D.S. Contribuição ao estudo da sistemática e alimentação de jundiás (*Rhamdia spp*) na região central do Rio Grande do Sul (Pisces, Pimelodidae). 1980. 99p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria – RS.
- HOAR, W.S. Reproduction. In Hoar, W.S.; RANDALL, D.J. Fish Physiology. New York: Academic Press, 1969. p. 1-72.
- HUNTER, G.A.; DONALDSON, E.M. 5 Hormonal sex control and its application to fish culture. Fish Physiology, v. 9, p. 223-303, 1983.
- IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa pecuária municipal. Rio de Janeiro: IBGE, 2016. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/ estatística/](http://www.ibge.gov.br/estatística/)>. Acesso em: 28 jun. 2016.

- KOBAYASHI, T.; KAJIURA-KOBAYASHI, H.; NAGAHAMA, Y. Differential expression of vasa homologue gene in the germ cells during oogenesis and spermatogenesis of a teleost fish, tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Mech. Develop.* v. 99, n.1-2, p. 139-142, 2000.
- KOMATSU, T.; NAKAMURA, S.; NAKAMURA, M. A sex cord-like structure and some remarkable features in early gonadal sex differentiation in the marine teleost *Siganus guttatus* (Bloch). *Journal of fish biology*, v. 68, n. 1, p. 236-250, 2006.
- KOMEN, J.; YAMASHITA, M.; NAGAHAMA, Y. Testicular development induced by a recessive mutation during gonadal differentiation of female common carp *Cyprinus carpio*. *Development Growth and Differentiation*, v. 34, n.5, p. 535-544, 1992.
- LEÃO, A.S.A. Análise da variabilidade genética das populações de pirarucu *Arapaima gigas* (SCHINZ, 1822) dos principais tributários do rio Amazonas através do uso de marcadores microssatélites. 2009. Dissertação de mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – Universidade Federal do Amazonas – Programa de pós-graduação em biologia tropical e recursos naturais.
- LEE, Y.D.; RHO, S.; CHANG, Y.J.; BAEK, H. J.; AN, C. M. Sex differentiation of the rockfish, *Sebastes schlegeli*. *Journal-Korean Fisheries Society*, v. 29, n. 1, p.44-50, 1996.
- LIMA, A.F.;VARELA, E.S.; MACIEL, P.O.; ALVES, A.L.; RODRIGUES, A.P.O.; TORATI, L.S.; MATAVELLI, M. & BEZERRA, T.A. Manejo de plantel de reprodutores de pirarucu. Brasília - DF, EMBRAPA, 2015.
- LIN, F.; DABROWSKI, K.; TIMMERMANS, L.P.M. Early gonadal development and sexual differentiation in muskellunge (*Esox masquinongy*). *Canadian Journal of Zoology*, v. 75, n. 8, p. 1262-1269, 1997.
- LUCHINI, L.; AVERDANO, T. Primeros resultados de cultivo de un pez de aguas cálidas (*Rhamdia sapo*) con fines de producción y consumo humano. *Rev. Arg.Prod. Anim.*, v. 4, n. 5, p.621-9, 1985.
- MAGGESE, M.C.; CUKIER, M.; CUSSAC, V.E. Morphological changes, fertilizing ability and motility of *Rhamdia sapo* (*Pisces, Pimelodidae*) sperm induced by media of different salinities. *Revista Brasileira de Biologia*, v. 44, n. 4, p. 541- 546, 1984.
- MANUAL, SKULDTECH. Teste de sexagem para *Arapaima gigas*, França, 2013, 10 p.
- MARDINI, C.V.; SILVEIRA, M.A.; BARENHO D.H.L. Técnica de indução da desova em jundiá (*Rhamdia quelen*) empregada na estação experimental de piscicultura da Lagoa dos Quadros. Porto Alegre: Secretaria da Agricultura. v. 4, n.4, p. 1-14, 1981.
- MAZZONI, T.S. Formação do epitélio germinativo durante a morfogênese e diferenciação gonadal em *Cyprinus carpio* (Teleostei: Cypriniformes): análise estrutural e ultraestrutural das células germinativas e somáticas. 2009. 115f. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo.

- 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). *Anat. Rec.*, v. 293, n. 9, p. 1581-1606, 2014.
- MEIJIDE, F.J.; LO NOSTRO, F.; GUERRERO, G.A. Gonadal Development and Sex Differentiation in the Cichlid Fish *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes): A Light- and Electron-Microscopic Study. *J. of Morphol.*, v. 264, n.2, p. 191-210, 2005.
- MELLO, M.P.; ASSUMPÇÃO, J.G.; HACKEL, C. Genes Envolvidos na Determinação e Diferenciação do Sexo. *Arquivo Brasileiro Endocrinologia Metabolismo*, v. 49 n. 1, p. 1-3, 2005.
- MOLYNEAUX, K.; WYLIE, C. Primordial germ cell migration. *Int. J. Dev. Biol.*, v. 48, n. 5-6, p. 537-44, 2004.
- MONTEIRO, L.B.B. Caracterização de crescimento, reprodução e perfil hormonal dos esteroides sexuais do pirarucu, *Arapaima gigas* (SCHINZ, 1822), em condições de cativeiro. 2005. Dissertação de mestrado em recursos pesqueiros e aquicultura, Universidade Federal de Pernambuco.
- MORAIS, I.S. Avaliação da influência da temperatura e do pH na determinação sexual do tambaqui *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1816). 2016. Dissertação de Mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em ciências Pesqueiras nos Trópicos. Universidade Federal do Amazonas.
- MPA – Ministério da Pesca e Aquicultura. 2009. Boletim estatístico da Pesca e Aquicultura – <[www.mpa.gov.br/](http://www.mpa.gov.br/)>.
- NAKAMURA, M.; KOBAYASHI, T.; CHANG, X.T.; NAGAHAMA, Y. Gonadal sex differentiation in teleost fish. *J. Exp. Zool.*, v. 281, n. 5, p. 362-372, 1998.
- NAKAMURA, M.; TAKAHASHI, H.; HIROI, O. Sex differentiation in the masu salmon (*Oncorhynchus masou*). *Sci. Rep. Hokkaido Salmon Hatchery*, v. 28, p. 1-8, 1974.
- NAKAMURA, S.; AOKI, Y.; SAITO, D.; KUROKI, Y.; FUJIYAMA, A.; NARUSE, K.; TANAKA, M. Sox9b/sox9a2-EGFP transgenic medaka reveals the morphological reorganization of the gonads and a common precursor of both the female and male supporting cells. *Mol. Reprod. Dev.*, v. 75, n. 3, p. 472-476, 2008.
- NAKAMURA, S.; KOKAYASHI, D.; AOKI, Y.; YOKOI, H.; EBE, Y.; JOACHIM, W.; TANAKA, M. Identification and lineage tracing of two populations of somatic gonadal precursors in medaka embryos. *Dev. Biol.*, v. 295, n. 2, p. 678–688, 2006.
- NARAHARA, M.Y.; GODINHO, H.M.; ROMAGOSA, E. Estrutura da população de *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840) (Osteichthyes, Siluriformes, Pimelodidae). *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 12, n. 3, p. 123-137, 1985.
- NELSON, J.S. *Fishers of the world*, 3.ed. John Wiley & Sons, New York. 1994. p. 600.
- ONO, E.A.; HALVERSON, M.R.; KUBITZA, F. Pirarucu, o gigante esquecido. *Panorama da Aquicultura*, v. 14, n. 81, p. 14-25, 2004.

- OTANI, S.; KITAUCHI, T.; SAITO, T.; SAKAO, S.; MAEGAWA, S.; INOUE, K.; YAMAHA, E. The formation of primordial germ cells from germline cells in spherical embryos derived from the blastodisc of 2-cell embryos in goldfish, *Carassius auratus*. *Int. J. Dev. Biol.*, v. 49, n. 7, p. 843-850, 2005.
- PANDIAN, T.J. Genetic sex differentiation in fish. CRC Press. 2012. p. 1-60.
- PARENTI, L.R.; GRIER, H.J. Evolution and phylogeny of gonad morphology in bony fishes. *Integr. Comp. Biol.*, v. 44, n.5, p. 333-348, 2004.
- PATÍÑO, R.; TAKASHIMA, F. In: TAKASHIMA, F.; HIBIYA, T., editors. An atlas of fish histology, 2nd ed. Stuttgart Kodansha-Gustav Fisher, 1995. p. 128-153.
- PEIXE, BR. Anuário Peixe BR da piscicultura (2018). São Paulo: Associação Brasileira de Piscicultura.
- PENMAN, D.J.; PIFERRER, F. Fish Gonadogenesis. Part I: Genetic and Environmental Mechanisms of Sex Determination. *Reviews in Fisheries Science*, v. 16, n. 1, p. 16–34, 2008.
- PEREIRA, N.O. O pirarucu, Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura, Divisão de caça e pesca, 1954. p. 23.
- PIAIA, R.; TOWNSEND, C.R.; BALDISSEROTTO, B. Growth and survival of fingerlings of *Rhamdia quelen* exposed to different light regimes. *Aquaculture International*, v. 7, n. 3, p. 201-205, 1999.
- PIFERRER, F.; DONALDSON, E. M. Gonadal differentiation in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, after a single treatment with androgen or estrogen at different stages during ontogenesis. *Aquaculture*, v. 77, n. 2-3, p. 251- 262, 1989.
- QUEIROZ, H.L. Natural history and conservtion of pirarucu, *Arapaima gigas*, at the Amazonian várzea: red gigant in mudder waters. 2000. 226f. Tese (Doutorado) - University of St. Andrews. St. Andrews.
- RADÜNZ NETO, J. Desenvolvimento de técnicas de reprodução e manejo de larvas e alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen*). 1981. 77 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria – RS.
- SADOVY DE MITCHESON, Y.; LIU, M. Functional hermaphroditism in teleosts. *Fish and Fisheries*, v. 9, n. 1, p. 1-43, 2008.
- SAITO, D.; MORINAGA C.; AOKI, Y.; NAKAMURA, S.; MITANI, H.; FURUTANI-SEIKI, M.; KONDH, H.; TANAKA, M. Proliferation of germ cells during gonadal sex differentiation in medaka: insights from germ cell-depleted mutant zenzai. *Dev Biol.*, v. 310, n. 2, p. 280–290, 2007.
- SILFVERGRIP, A.M.C. A sistematic revision of the neotropical catfish genus *Rhamdia* (Teleostei, Pimelodidae). 1996. 156p. (PhD Thesis) - Department of Zoology, Stockholm University and Department of Vertebrate Zoology, Swedish Museum of Natural History, Stockholm, Sweden.
- STEWART, D.J. Re-description of *Arapaima agassizii* (Valenciennes), a rare fish from Brazil (*Osteoglossomorpha*, *Osteoglossidae*). *Copeia*, v. 2013, n. 1, p. 38-51, 2013a.
- STEWART, D.J. 2013b. A new species of *Arapaima* (*Osteoglossomorpha*, *Osteoglossidae*) from the Solimões River, Amazonas State, Brazil. *Copeia*, v. 2013, n. 2, p. 470-473, 2013. In

- Press. VERÍSSIMO J. A Pesca no Amazônia. Rio de Janeiro: Livraria Clássica Alves and Companhia. 1895.
- STRÜSSMANN, C.A.; NAKAMURA, M. Morphology, endocrinology, and environmental modulation of gonadal sex differentiation in teleost fishes. *Fish Physiol. Biochem.*, v. 26, n.1, p. 13-29, 2002.
- STRÜSSMANN, C.A.; TAKASHIMA, F.; TODA, K. Sex differentiation and hormonal feminization in pejerrey *Odontesthes bonariensis*. *Aquaculture*, v. 139, n. 1-2, p. 31-45, 1996.
- STRUSSMANN, C.A.; COTA, J.C.C.; PHONLOR, G.; HIGUCHI, H.; TAKASHIMA, F. Temperature effects on sex differentiation of two south American atherinids, *Odontesthes argentinensis* and *Patagonina hatcheri*. *Environmental Biology of Fishes*, v. 47, n. 2, p.143-154, 1996.
- TAKAHASHI, H.; SHIMIZU, M. Juvenile intersexuality in a cyprinid fish, the Sumatra barb, *Barbus tetrazona tetrazona*. *Bulletin of the Faculty of Fisheries Hokkaido University*, v. 34, n. 2, p. 69-78, 1983.
- TAKASHIMA, F.; PATINO, R.; NOMURA, M. Histological studies on the sex differentiation in rainbow trout. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish*, v. 46, p. 1317-1322, 1980.
- TALIKINA, M.G. Sex differentiation and gonad development during the first years of life in the bream *Abramis brama* from the Rybinsk water reservoir. *Vopr Ikhtiol*, v. 35, p. 114-119, 1995.
- VALENTIN, F.N. Processo de diferenciação gonadal em *Pseudoplatystoma fasciatum* e tentativa de feminilização com 17 $\beta$ -estradiol. 2013. 34p. Tese (Doutorado em aquicultura). Programa de Pós-graduação em Aquicultura, do Centro de Aquicultura da UNESP, Campus de Jaboticabal, São Paulo.
- VIÑAS, J. et al. Gonadal sex differentiation in the Senegalese sole (*Solea senegalensis*) and first data on the experimental manipulation of its sex ratios. *Aquaculture*, v. 384, p. 74-81, 2013.
- VLIEGENTHART, A.D.; TUCKER, C.S.; DEL POZO, J.; DEAR, J.W. Zebrafish as model organisms for studying drug induced liver injury. *British Journal of Clinical Pharmacology*, v. 78, n. 6, p. 1217-1227, 2014.
- WAGER, K.; MAHMOOD, F.; RUSSELL, C. Modelling inborn errors of metabolism in zebrafish. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, v. 37, n. 4, p. 483-495, 2014.
- WALLACE R.A.; SELMAN K. Ultrastructural aspects of oogenesis and oocyte growth in fish and amphibians. *J. Electron Microsc. Tech.*, v. 16, n. 3, p. 175-201, 1990.
- YAMAMOTO, T. Sex differentiation. In: HOAR W.S.; RANDALL D.J. Editors. New York: Academic Press. *Fish physiol.* v. 3, p.117-175, 1969.
- YOSHIKAWA, H.; OGURI, M. Sex differentiation in a cichlid, *tilapia-zillii*. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, v. 44, n. 4, p. 313-318, 1978.





**MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF PIRARUCU *Arapaima gigas***  
**(SCHINZ, 1822) GONADAL DIFFERENTIATION**

<sup>1</sup>Amaral, A.C., <sup>2</sup>Mazzoni, T.S., <sup>3</sup>Lima, A.F., <sup>3</sup>Ganeco-kirschnik, L.N., <sup>4</sup>Almeida, F.L.

**Artigo submetido à Revista: Journal of Morphology**

## **Abstract**

The pirarucu *Arapaima gigas* is a giant bony-tongue fish from the Amazon and a promising species for the Brazilian aquaculture. However, the farming industry of the species is still not consolidated due to the lack of information about its reproductive physiology. Reproduction in captivity cannot be manipulated or stimulated and the identification of males and females in a broodstock is not easy. We aimed at revealing the morphological sex differentiation of pirarucu as studies involving gonad development are essential for understanding the reproductive physiology of any species. We performed histological analysis on the whole body and extracted gonads of 60 (from 2.7 to 17 cm total length-TL) and 90 (from 15 to 80 cm TL) juveniles, respectively. The first sign of ovary differentiation on pirarucu is the sex-specific rearrangement of the germ cells. In females of around 9 cm TL, the germ cells become grouped in nests and restricted to the lateral side of the gonad, in a close contact with the abdomen wall. With further development, this region suffers invaginations that later develop into the ovigerous lamellae. Meiosis starts very soon after ovary differentiation. In the presumptive males, the germ cells are scattered along the elongated differentiating testis at first, and then become more restricted to the central region where the spermatogonial cysts develop. In pirarucu, the somatic cells appear to be involved in the process of germ cell reorganization during gonadal differentiation, specifically when the germ cells of undifferentiated gonads begin to establish new associations during the development of both the germinal epithelium and stroma.

**Keywords:** Amazonian basin, gonad differentiation, ovary, primordial germ cell, somatic cell.

## 1.INTRODUCTION

In the recent decades, changes in food habits and the growth of the world population have fostered a growing search for fish meat as a healthy animal protein. This global situation represents a challenge for the aquaculture industry, since natural fish stocks are decreasing and directly affecting the extractive fishing.

For a future scenario, Brazil has all the favorable conditions to outstand against the largest fish producing countries in the world. However, in order to reach this potential, it is necessary to develop technologies for the sustainable economic exploitation of the natural resources existing in each region of the country. In the Amazon basin, the pirarucu *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) has been distinguished for its potential for continental fish farming. There are numerous advantages that justify an effort to subsidize and develop the cultivation of the species. For instance, the size (it is the largest freshwater fish in the world, Goulding, 1980; Santos *et al.*, 2004), high carcass yield, rapid growth, good feed conversion, and competitive price have stimulated the farming of pirarucu in the last years. Moreover, the international interest for its meat voided of small bones (Lima *et al.*, 2015) and wide geographic distribution (Pereira, 1954) make the pirarucu a valuable fish. However, in spite of several economic advantages, there are still some relevant bottlenecks in the pirarucu production cycle. Among them, the lack of technology for manipulating the reproduction stands out, and farmers still depends on the natural mating and reproduction to produce fingerlings. This situation means a huge hindrance and delay for the commercial production of the species.

Sexual differentiation is a minutely coordinated cascade of morphological events that occur during gonadal development that allow the expression of the genetic sex into the appropriate phenotypic sex. It involves the formation of the gonadal ridge, including the migration of primordial germ cells, the establishment of the gonadal primordium, and the consolidation of the undifferentiated gonads into testes or ovaries (Bruslé & Bruslé, 1983). The characterization of gonadal morphophysiology is fundamental for the establishment of any livestock, evolutionary studies, climate change and comparative biology. In fish, gonad differentiation and development was first characterized by Padoa (1937) in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, and today the processes are described for more than 30 fish species.

The sexual differentiation in fish can be direct, in which the gonad differentiates directly and definitively into an ovary or testis, or indirect, when all the individuals first develop an ovary-like gonad and later in part of the population this initial ovary regresses and a stable testicular development occurs (Yamamoto, 1969; Maack & Segner, 2003; Chen & Ge, 2013). In

most fish species, the ovarian differentiation occurs before than the testicular and develops in a species-specific manner. Ovarian differentiation has been identified as high germ cell proliferation, onset of meiosis or even formation of the ovarian cavity in different species (Devlin & Nagahama, 2002). In addition, the period in which differentiation occurs is also species-specific, ranging from 1 day post hatching (medaka *Oryzias latipes*; Satoh & Egami, 1972) to 8 months of age (sturgeon *Acipenser baerii*; Vizziano-Cantonnet *et al.*, 2016).

Considering the ecological, evolutive and social importance of the pirarucu, its economic potential, and the gap of knowledge regarding the reproductive physiology, we performed the histological characterization and timing of the sexual differentiation of the species. This represents the beginning of a series of studies involving the reproduction of pirarucu by our group in Embrapa, as a subsidy for the development of technologies for pirarucu farming, conservation programs, and studies on evolution, comparative biology and climate change.

## 2. MATERIAL AND METHOD

### 2.1. FISH AND SAMPLING

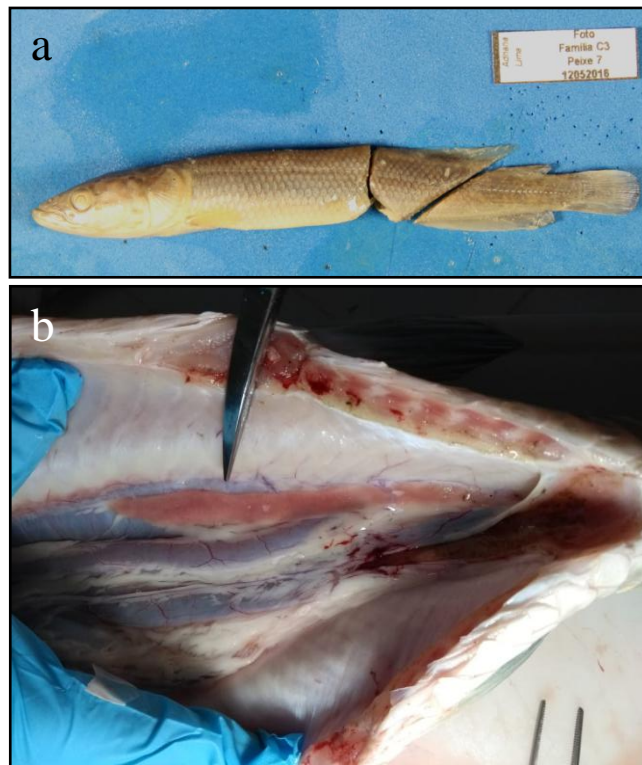
Pirarucu (*Arapaima gigas*) juveniles of different sizes (2.7 to 80.0 cm total length -TL) were purchased in commercial farms from different regions of Brazil: Coari (Amazonas), Presidente Figueiredo (Amazonas), Pimenta Bueno (Rondônia), Santarém (Pará) and Palmas (Tocantins). The specimens of 2.7 to 6.9 cm TL (n = 20) were anesthetized with 0.01% benzocaine (Acros®, New Jersey, USA) and sacrificed by cerebral concussion. A central section of the abdomen, near the urogenital pore (Figure 1a), was cut and immediately fixed in 5% glutaraldehyde in phosphate buffer (0.1M at pH 7.2) for a minimum of 24 hours. The samples were dehydrated and included in glycol methacrylate (Leica®, Heidelberger, Germany). The 5 µm thick serial histological were stained with toluidine blue (1%) borax (1%).

The specimens of 7.0 to 17 cm TL (n = 40) were anesthetized with 0.06% Eugenol (Sigma®; Saint Louis, MO - USA), sacrificed by concussion and immediately fixed in 10% formaldehyde for 48 hours. After fixation, a section of the central part of the abdomen, near the urogenital pore (Figure 1a), was cut, dehydrated in alcohol, embedded in paraffin, sectioned serially at 4 µm and stained with hematoxylin-eosin.

The specimens from 15 to 80 cm TL (n = 90) were sedated with 0.01% benzocaine and sacrificed by cerebral concussion, after biometry. Afterwards, the left gonad (Figure 1b) was identified, photographed, removed and immersed in 5% glutaraldehyde in phosphate buffer

(0.1M at pH 7.2) for 24 hours individually. After dehydration, the gonad was included in glycol methacrylate, cut serially in 5  $\mu\text{m}$  thick sections and stained with hematoxylin-eosin.

The study was approved by the Ethics Committee for the Use of Animals (CEUA) of Embrapa Amazonia Ocidental, under the protocol number 01/2018. The project has Authorization of Access to Genetic Heritage under number A5784B5.



**Figure 1.** Sampling of *A. gigas* for histological studies. **a)** Sample of a central section of the abdomen sampled from fish of 2.7 to 17 cm total length (TL); **b)** Removal of the left gonad (pointed by the scissors) from fish of 15 to 80 cm TL. Scale bar represents 0.54 cm in **a**.

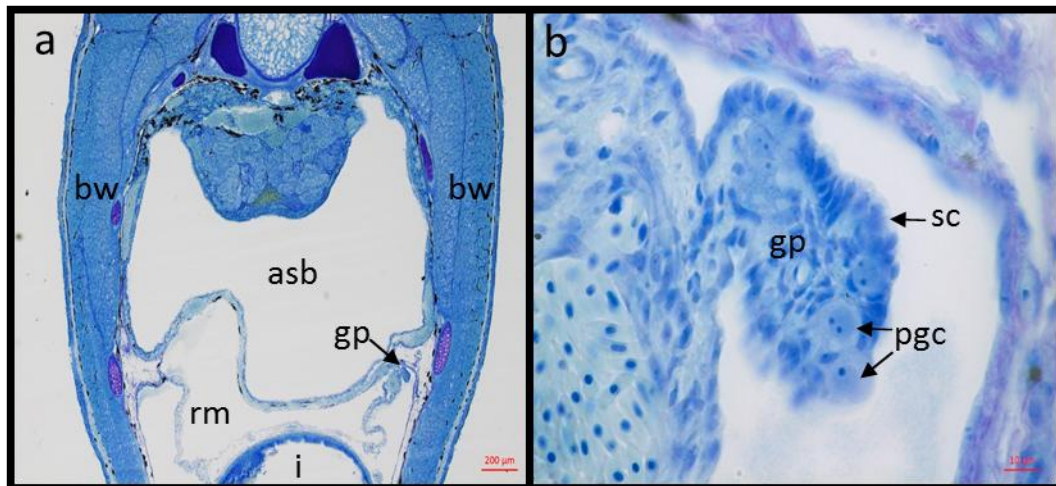
## 2.2. ANALYSIS

The abdomen fragments and gonads were analyzed for the shape, location and presence of germ cells. We also analysed the formation of the main gonadal structures, such as ovigerous lamellae, germinal epithelium and germ cell cords.

## 3. RESULTS

### 3.1. GONADAL PRIMORDIUM AND UNDIFFERENTIATED GONAD

The gonadal primordium of pirarucu was observed in individuals from 2.7 cm TL. It is a single organ, suspended in the left portion of the abdomen by a thick fibrous mesogonadium, below the adapted swimming bladder (Figure 2a). The gonadal primordium could be characterized by the presence of somatic cells and rare primordial germ cells (PGCs). The PGCs were present isolated or in pairs in between the abundant somatic cells (Figure 2b).



**Figure 2.** Gonadal primordium (**gp**) of *A. gigas* (2.8 cm total length). **a)** Localization of the gonadal tissue in the abdominal cavity; **b)** Magnification of the single (left) gonadal tissue. Adapted swimming bladder (**asb**), intestine (**i**), body wall (**bw**), right mesogonadium (**rm**), primordial germ cell (**pgc**) and somatic cell (**sc**).

Only the left gonad was present in all analyzed fish, regardless of the size. There was no indicative of a gonad precedent formation on the right side that eventually underwent regression. However, in the majority of individuals analyzed, remnants of the right mesogonadium could be observed, somehow longer than the left mesogonadium.

The undifferentiated gonads were observed in individuals from 4.5 cm TL. The undifferentiated gonad was larger than the gonadal primordium because of a major increase in the number of somatic cells.

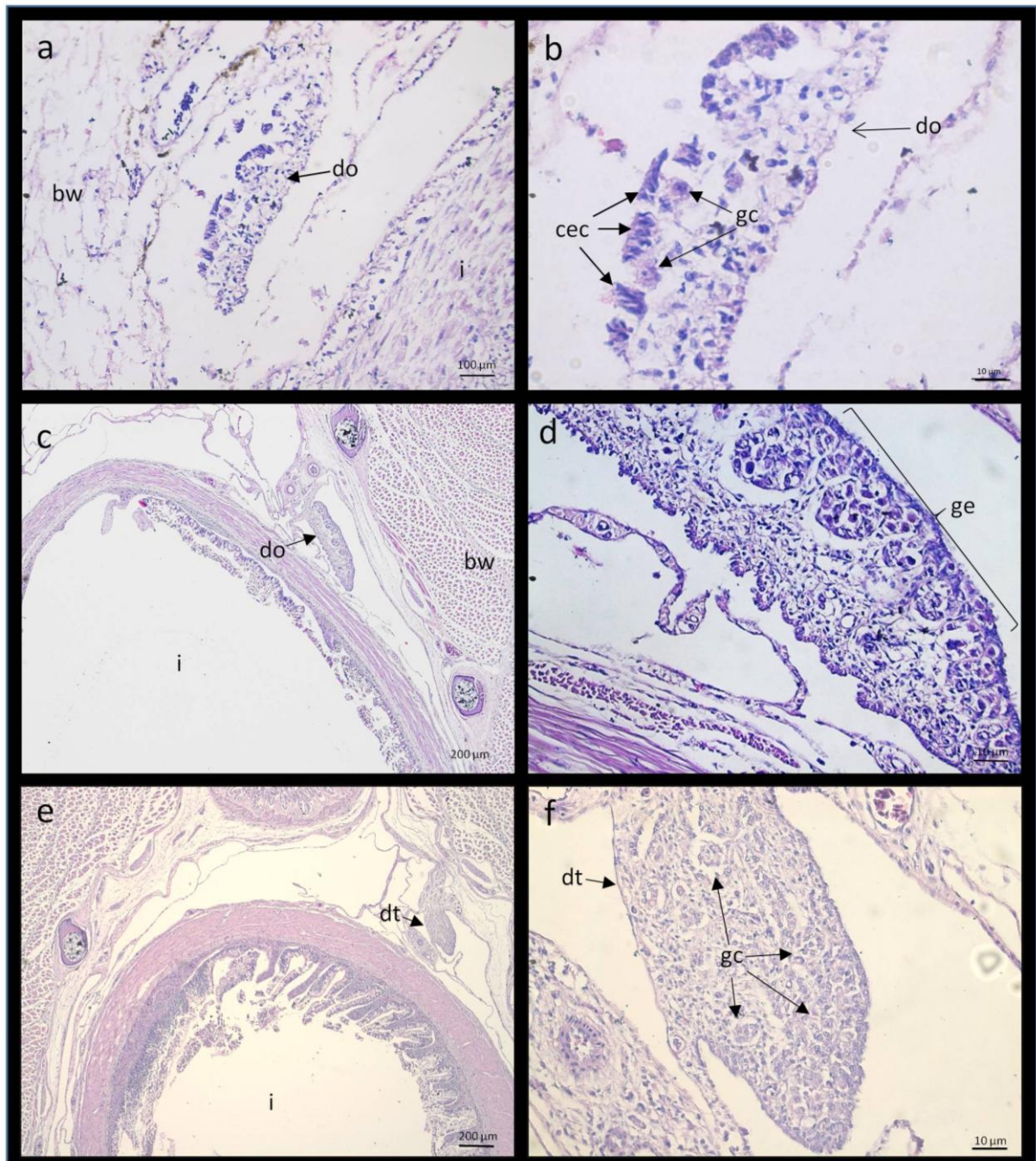
### 3.2 OVARIAN DIFFERENTIATION

The undifferentiated gonads of *A. gigas* originated directly ovaries or testes, and the ovarian differentiation occurred earlier than the testicular.

The ovarian differentiation was observed in individuals from 9.2 cm TL, when the epithelial cells of the lateral region of the gonadal primordium, originally squamous, began to

gain a cuboid shape resulting in a lateral enlargement of the gonad (Figure 3a and b). With further development, the germ cells became restricted to this region of the gonad, grouped in nests and surrounded by somatic cells. Structurally, these nests together with the epithelial cells formed the germinal compartment of the ovary. At this stage, the germ cells could be identified as oogonia and the somatic cells as pre-follicle cells. In females of 15 cm TL, the ovarian stroma and the germinal compartment could easily be identified (Figure 3c and d). In larger females, the germinal tissue suffered invaginations, which lead to the establishment of the germinal epithelium. These invaginations become more prominent, originating the ovarian lamellae. In differentiating ovary, the number of germ cells was high due to their intense proliferation by successive mitoses.

In the presumptive males of same size, the gonads remained homogeneous and apparently with a reduced number of PGCs (Figure 3e and f). In these gonads, the germ cells were not restrict to a specific area, but instead distributed scattered over the gonad.



**Figure 3.** Differentiating ovary (**do**) and testes (**dt**) of *A. gigas*. Ovary in: **a** and **b**) 9.2 cm total length (TL) female; **c** and **d**) 16 cm TL female; and testes of 14 cm TL male in **e** and **f**. Intestine (**i**), body wall (**bw**), germ cell (**gc**), cuboid epithelial cell (**cec**) and germinal epithelium (**ge**).

### 3.3 PRIMARY GROWTH AND PRE-VITELOGENESIS

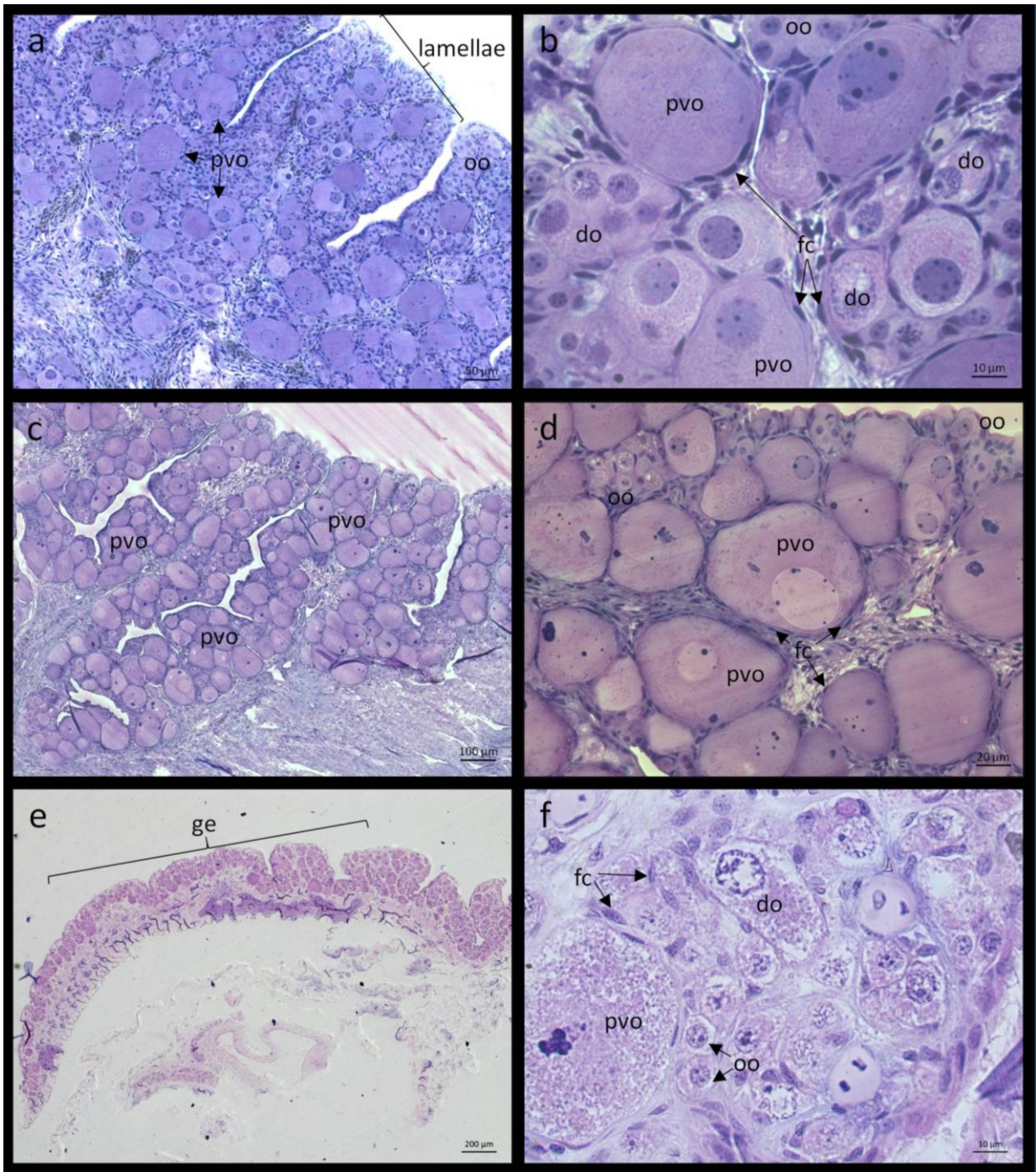
Soon after ovary differentiation, some oogonia entered meiosis, originating the prophase oocytes, which remained within the germline cysts (Figure 4). The oocytes were round, with a slight acidophilus cytoplasm and nucleus containing chromatin in different forms of organization, according to the stage of the prophase in which they were. At this stage, the gonad



- already established as an ovary - consisted of isolated oogonia, cysts of oogonia and oocytes, follicle cells, and somatic (including epithelial) cells.

Preceding the primary growth, the diplotene oocytes were gradually and individually involved by the follicle cells originating the ovarian follicles. As they grew and increased their volume, they formed the previtellogenic oocytes. The constant entry of the oogonia into meiosis and the increase in cellular volume of the pre-vitellogenic oocytes resulted in a rapid and constant expansion of the germinal epithelium of the ovary. Consequently, there was a major development and increase of the ovigerous lamellae invaginations on the lateral side of the ovary. However, this ovarian growth was not uniform in all females. For instance, the females from Presidente Figueiredo presented larger and more developed ovaries (in amount of pre-vitellogenic oocytes) than females from Tocantins, for instance (Figure 4a and b *versus* e and f).

During pirarucu ovarian differentiation and development, the ovary remained flat and elongated in the abdominal cavity, suspended by the thick and firm mesovary. This structural pattern was observed until the complete differentiation of the gonad, constantly increasing in volume according to the fish body size.



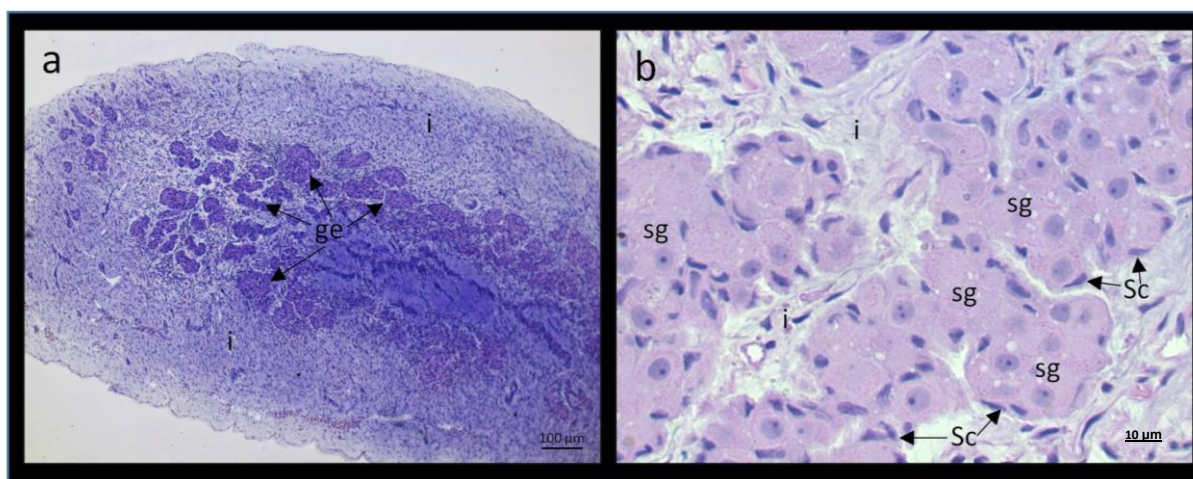
**Figure 4.** Growing ovary of *A. gigas*. **a** and **b**) Initial formation of the ovigerous lamellae (15 cm total length – TL fish); **c** and **d**) Further development and growth of the germinal epithelium (35 cm TL fish); Small ovary in 46 cm TL female in **e** and **f**. Diplotene oocyte (**do**) surrounded by follicle cells (**fc**) forming the ovarian follicles; oögonia (**oo**), previtelogenic oocyte (**pvo**) and germinal epithelium (**ge**).

### 3.4 TESTICULAR DIFFERENTIATION

The testicular differentiation of the pirarucu was also characterized by the spatial rearrangement of germ and somatic cells in the undifferentiated gonad. PGCs were first

homogeneously distributed among a large number of somatic cells (Figure 3f) in the differentiating testis.

With the constant development of the testis, the germ cells, now differentiated in spermatogonia, became gradually concentrated in the central portion of the organ, and there was no germ cells left in the periphery of the gonad (Figure 5a), as observed in the ovaries. Spermatogonia were round, with abundant cytoplasm and condensed chromatin (Figure 5b). With constant mitosis, the spermatogonia formed testicular cords that are typical of the testicular germinal epithelium and eventually originates the spermatogonial cysts, surrounded by the somatic Sertoli cells.



**Figure 5.** Growing testis (t) of *A. gigas*. **a** and **b**) Immature testis (75 cm total length male). Germinal epithelium (ge), interstitium (i), spermatogonia (sg) and Sertoli cell (Sc).

The largest male evaluated in this study had 75 cm TL and none male contained spermatocyte (meiotic) cysts.

#### 4. DISCUSSION

The pirarucu *A. gigas*, native from the Amazon basin, is the most promising fish for the consolidation of the Brazilian native fish farming. Different features contribute to this potential: it is a docile and easily domesticated fish, large (reaching up to 200 kg), air breathing, highly resistant to temperature variations and, especially, its meat has already a high market value. Nowadays, the greatest obstacle for the consolidation of the pirarucu industry is the absence of a constant production of seeds to sustain the production line. In farms, the production of pirarucu fingerlings depends on natural reproduction of isolated couples, which beforehand must be

properly sex identified. Hence, pirarucu farmers completely rely on natural mating and breeding. The lack of scientific information on the reproductive physiology of the species contributes to this technological delay for the reproduction of farmed pirarucu. We present here the histological description of pirarucu sexual differentiation, contributing with knowledge of the development and subsequent gonadal activity as a basis for the improvement of the commercial production of the species.

As the majority of the teleost, at hatch the pirarucu does not present the phenotypic sex, and the gonad-component cells are pluripotent, i. e., can give rise to both genders (Cesar *et al.*, 2005). Several genetic and/or environmental factors may influence the definition of the sex in this case due to the great plasticity during the development of their structures, and the variety of sex determination systems that occur in the teleost species (Devlin & Nagahama, 2002).

The pirarucu, species belonging to the most primitive group of teleost, possess only the left gonad, located dorsum-laterally in the abdominal cavity, suspended by a thick and fibrous mesogonadium (Godinho *et al.*, 2005; and present work). Based on macroscopic and histological analyzes of 150 juveniles from 2.7 to 80 cm total length (TL), there is no evidence of formation and subsequent regression of the right gonad, as suggested by Fontenele (1948). However, in the majority of the individuals analyzed up to 17 cm (of which a part of the abdomen was included entirely, without the removal of the gonad), a remnant of the right mesogonadium was present.

As in most fish species (reviewed in Mazzoni & Grassiotto, 2014), the undifferentiated gonad of pirarucu is characterized by the presence of somatic cells and primordial germ cells (PGCs). The PGCs are initially isolated or in pairs among the abundant somatic cells. Generally in teleost, the successive cellular divisions of PGCs can indicate the onset of gonadal differentiation, ovarian or testicular, as well as meiosis points the future females (Nakamura & Takahashi, 1973; Strüssmann *et al.*, 1996; Nakamura *et al.*, 1998; Maack & Segner, 2003; Meijide *et al.*, 2005; Mazzoni *et al.*, 2014). However, there are some species that do not follow this order of development and the differentiation starts with the formation of the ovarian cavity before the intensification of the PGC mitotic and/or meiotic activity, as for the American catfish *Ictalurus punctatus* (Patiño *et al.*, 1996), tilapia *Sarotherodon niloticus* (Nakamura & Takahashi, 1973) and Atlantic cod *Gadus morhua* (Haugen *et al.*, 2012). There are still some species in which both events occurs simultaneously, as the Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus* (Nakamura & Takahashi, 1973) and the viviparous eelpout *Zoarces viviparus* (Rasmussen *et al.*, 2006). This occurs when the somatic cells begin to penetrate the continuous strands of PGC's and reorganize the spatial structure before the onset of meiosis.

An important factor for fish sex expression is the process of cellular development and the spatial distribution of the cells along the (still) undifferentiated gonadal tissue. According to Nakamura *et al.* (1998), the morphological differences in the stroma can give a more correct indication of the moment of the sexual differentiation than the germ cell morphology itself. The sexual differentiation of *A. gigas* is gonochoric direct, and begins in fish of approximately 9 cm TL. It is a process initially characterized by i) changes on the epithelial cell format and ii) spatial restriction of the germ cells. The squamous epithelial cells of the lateral area of the gonad become cuboid, which is typical of ovarian epithelial cells. At the same time the germ cells concentrate in this lateral region, in pairs or groups. These cell clusters are surrounded by a particular type of somatic cells, known as pre-follicle cells. With this spatial arrangement it is easy to distinguish the germinal epithelium of the pirarucu growing ovary. At this stage, the ovary has two distinct compartments - the germinal epithelium, containing the germ cells, and the stroma, both separated only by a continuous basement membrane.

Soon after the spatial restriction of the oogonia in the future ovigerous lamellae, some of them initiate the process of cell division, multiplying their number by successive mitosis (originating new oogonial groups) or entering into meiosis originating the oocytes (meiotic prophase). The high mitotic activity of germ cells in developing ovaries is very common in different fish species (Strussman & Nakamura, 2002; Lewis *et al.*, 2008; Haugen *et al.*, 2012). Some 15 cm TL females of pirarucu have already ovaries with distinctive germinal epithelium, ovigerous lamellae and oocytes in diplotene (Figure 4). Diplotene oocytes are individually involved by the follicle cells, which also proliferate, originating the ovarian follicles. According to Le Menn *et al.* (2007), Grier & Uribe (2009) and Mazzoni *et al.* (2014), the primary follicles are settled on the basement membrane that isolates them from the other cellular components. As they grow and enlarge, the early diplotene oocytes enter into primary growth, known as pre-vitellogenic oocytes.

It is interesting to note that even in this initial phase of *A. gigas* organogenesis, there is already a difference in the gonadal development among females from different locations, a trait already reported by Godinho *et al.* (2005) working with prepubertal pirarucu. In the present work, we observed that some 15 cm TL females from Presidente Figueiredo (Amazonas) had well-developed lamellae with prophase oocytes, while 46 cm TL females from Palmas (Tocantins) presented oocytes in pre-vitellogenesis, but smaller and less developed (Figure 4a and b *versus* e and f). If this asynchronous ovarian development is due to differences in temperature, body condition, or if it is intrinsic of different populations, it remains to be properly investigated.

From the beginning of its development, the pirarucu ovary is a compact organ and does not present any type of cavity, except for the blood vessels. Indeed, in adult females of pirarucu, the ventral part of the ovary is foliaceous, without any ovarian capsule or oviduct (Fontenele, 1948; Godinho *et al.*, 2005). Due to these morphological characteristics, the oocytes are released into the abdominal cavity and thereafter into the environment by the urogenital papilla.

On the other hand, in the males the testicular differentiation appears to be later and slower, especially regarding to the germ cell proliferation. Unfortunately, the quality of the smaller specimens (paraffin embedded) did not allow us to perform any stereological approach, such as the germ cell number in this study. At the beginning of pirarucu testicular differentiation, the germ cell distribution is disperse throughout the organ and arranged in fine cell cords. Theses cords eventually fragment giving rise to several groups of spermatogonia, isolated by one or more Sertoli cells, called the spermatogonial cysts. Eventually the spermatogonial cysts become restricted to the central area of the testis. As meiosis in male pirarucu begins only in fish above 100 cm TL (Godinho *et al.*, 2005), most probably during this juvenile stage the testis undergoes only allometric growth, with slow but constant proliferation of isolated type A spermatogonia.

The knowledge on the process of gonadal differentiation in fish is important for adequacy of reproductive management and development of new technologies. The present work presents a temporal description of the morphological aspects that characterize the sexual differentiation of *A. gigas*. The ovarian differentiation occurs before the testicular and begins with sex-specific changes in the epithelial cells, which from squamous (in the undifferentiated gonad) become cuboid in the region of the future ovigerous lamellae. At the same time, the germ cells concentrate in this region, forming nests of oogonia and characterizing, together with the pre-follicle cells, the germinal epithelium of the developing ovary. There is no ovarian cavity formation. Soon after the consolidation of this spatial conformation, the oogonia differentiate into oocytes, which then initiate the meiotic prophase. In fish from different location the development and growth of the oocytes and consequently of the ovary itself appears to be uneven. It would be interesting to investigate whether this occurs by influence of local factors, such as temperature and body condition of the individuals or by genetic differences between the populations. In males, germ cells are initially scattered along the gonad, posteriorly being restricted to the central region of the gonad (in the ovaries, the germinal epithelium is restricted to the periphery). With further testis development, each spermatogonium originates a spermatogenic cyst that will initiate the meiosis in fish above 80 cm TL.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge the financial support of Embrapa (SEG 12.16.05.018.00.00) for the project and of Capes for the fellowship grant of AAC.

## FUNDING

The study was financially supported by Embrapa (SEG 12.16.05.018.00.00) and the fellowship grant was supported by CAPES for AAC.

## REFERENCES

- Bruslé, J. & Bruslé, S. (1983) La gonadogenèse des Poissons. *Reproduction Nutrition Développement* **23**, 453-491.
- Cesar, M.P, Murgas L.D.S., Araújo R.V. & Drummond C.D. (2005) Métodos para obtenção de população monossexo na piscicultura. *Bol. Agropec. Universidade Federal de Lavras- MG* **69**, 1-27.
- Chen, W. & Ge, W. (2013) Gonad differentiation and puberty onset in the zebrafish: evidence for the dependence of puberty onset on body growth but not age in females. *Mol. Reprod. Dev.* **80**, 384-392.
- Devlin, R.H. & Nagahama, Y. (2002) Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* **208**, 191–364.
- Fontenele, O. (1948) Contribuição para o conhecimento da biologia do pirarucu *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) em cativo (Actinopterygii, Osteoglossidae). *Revista Brasileira de Biologia* **8**, 445-459.
- Godinho, H.P., Santos, J.E., Formagio, P.S. & Guimarães-Cruz, R.J. (2005) Gonadal morphology and reproductive traits of the Amazonian fish *Arapaima gigas* (Schinz, 1822). *Acta Zool. (Stockholm)* **86**, 289-294.
- Goulding, M. (1980) *The fishes and the forest: exploration in Amazonian natural history*. Berkeley, University of California.
- Grier, J.H. & Uribe, M.C. (2009) The Testis and Spermatogenesis in Teleosts. *Reproductive Biology and Phylogeny of Fishes (Agnathans and Bony Fishes) Phylogeny Reproductive System Viviparity Spermatozoa* (Jamieson, B.J.M., eds), pp. 1-39.
- Haugen, T., Almeida, F.F., Andersson, E., Bogerd, J., Male, R., Skaar, K.S. & Taranger, G.L. (2012) Sex differentiation in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.): morphological and gene expression studies. *Reproductive biology and endocrinology* **10**, 1-47.
- Le Menn, F., Cerdà J. & Babin, P.J. (2007) Ultrastructural aspects of the ontogeny and differentiation of ray-finned fish ovarian follicles. *The Fish Oocyte: From Basic Studies to Biotechnological Applications* Springer (Babin, J.P., Cerda and Lubzens E., eds), pp 1-37. Dordrecht.
- Lewis, Z.R., McClellan, M.C., Postlethwait, J.H., Cresko, W.A., & Kaplan, R.H. (2008) Female-specific increase in primordial germ cells marks sex differentiation in three-spine Stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *J. Morphol.* **269**, 909–921.

- Lima, A.F., Varela, E.S., Maciel, P.O., Alves, A.L., Rodrigues, A.P.O., Torati, L.S., Matavelli, M. & Bezerra, T.A. (2015) Manejo de plantel de reprodutores de pirarucu. Brasília.
- Maack, G. & Segner, H. (2003) Morphological development of the gonads in zebrafish. *Journal of Fish Biology* **62**, 895–906.
- Mazzoni, T.S., Grier, H.J. & Quagio-Grassiotto, I. (2014) Germline cysts and the formation of the germinal epithelium during the female gonadal morphogenesis in *Cyprinus carpio* (Teleostei: Ostariophysi: Cypriniformes). *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biol.* **293**, 1581-1606.
- Meijide, F.J., Lo Nostro, F. & Guerrero, G.A. (2005) Gonadal Development and Sex Differentiation in the Cichlid Fish *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes): A Light and Electron-Microscopic Study. *J. Morphol* **264**, 191-210.
- Nakamura, M. & Takahashi, H. (1973) Gonadal sex differentiation in *Tilapia mossambica*, with special regard to the time of estrogen treatment effective in inducing complete feminization of genetic males. *Bull. Fac. Fish Hokkaido Univ.* **24**, 1-13.
- Nakamura, M., Kobayashi, T., Chang, X.T. & Nagahama, Y. (1998) Gonadal sex differentiation in teleost fish. *J. Exp. Zool.* **281**, 362-372.
- Padoa, E. (1937) Differenziazione e inversione sessuale (femminilizzazione) dia notti di trota (*Salmo irideus*) tratta ticonormone follicolare. *Monit. Zool. Ital.* **48**, 195-203.
- Patiño, R., Davis, K.B., Schoore, J.E., Uguz, C., Strussmann, C.A., Parker, N.C., Simco, B.A. & Goudie, C.A. (1996) Sex differentiation of channel catfish gonads: normal development and effects of temperature. *J. Exp. Zool.* **276**, 209-218.
- Pereira, N.O. (1954) O pirarucu Ministério da Agricultura, Divisão de Caça e Pesca, Rio de Janeiro, p 23.
- Rasmussen, T.H., Jesperesen, A. & Korsgaard, B. (2006) Gonadal morphogenesis and sex differentiation in intraovarian embryos of the viviparous fish *Zoarcetes viviparous* (Teleostei, Perciformes, Zoarcidae): A histological and ultrastructural study. *J. Morphol.* **267**, 1032–1047.
- Santos, G.M., Merona, B., Juras, A.A. & Jégu, M. (2004) Peixes do Baixo Rio Tocantins: 20 anos depois da Usina Hidrelétrica Tucuruí, Eletronorte, Brasília, p 215.
- Satoh, N. & Egami, N. (1972) Sex differentiation of germ cells in the teleost, *Oryzias latipes*, during normal embryonic development. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **28**, 385–395.
- Strüssmann, C.A. & Nakamura, M. (2002) Morphology, endocrinology, and environmental modulation of gonadal sex differentiation in teleost fishes. *Fish Physiol. Biochem.* **26**, 13-29.
- Strüssmann, C.A., Takashima, F., & Toda, K. (1996) Sex differentiation and hormonal feminization in pejerrey *Odontesthes bonariensis*. *Aquaculture* **139**, 31-45.
- Vizziano-Cantonnet, D., Di Landro, S., Lasalle, A., Martínez, A., Mazzoni, T.S., & Quagio-Grassiotto, I. (2016). Identification of the molecular sex-differentiation period in the siberian sturgeon. *Mol. Reprod. and Dev.* **83**, 19-36.
- Yamamoto, T. (1969) Sex differentiation. *Fish physiol.* (Hoar, W.S., Randall, D.J., eds.) pp 117-175. New York: Academic Press.





**ASPECTOS MORFOLÓGICOS DA DIFERENCIAÇÃO SEXUAL DO JUNDIÁ *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824)**  
<sup>1</sup>Amaral, A.C., <sup>2</sup>Almeida, F.L.

**Parte de manuscrito a ser submetido à revista *Gene* sobre diferenciação sexual fenotípica e genética do jundiá *Rhamdia quelen*.**

## 1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o crescimento populacional se tornou um grande desafio para o agronegócio, reforçando a necessidade de intensificação da produção agrícola e pecuária em todo o mundo. Dentre as atividades pecuárias, a aquicultura vem se destacando, pois, segundo dados da FAO (2018), o item alimentar mais consumido de 1961 a 2016 foi o pescado, com um aumento médio anual de 3,2%, excedendo o crescimento populacional (1,6%) e o consumo de todos os outros animais terrestres (2,8%). Isso demonstra a importância da aquicultura, uma vez que ao mesmo tempo em que o pescado é o item alimentar mais consumido no mundo, os estoques naturais de peixes estão diminuindo constante e rapidamente.

Assim, cabe à piscicultura a missão de aumentar a oferta do pescado, principalmente em países como o Brasil, que possuem características favoráveis ao desenvolvimento da aquicultura, mas ainda não alcançaram seu potencial de produção aquícola. Para isso, é necessário que sejam desenvolvidas tecnologias adequadas para a exploração econômica sustentável dos recursos naturais existentes em cada região do país. Neste sentido, na região Sul do Brasil, o Jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) vem se destacando por apresentar diversas características peculiares que favorecem seu cultivo e justificam o esforço para subsidiar e desenvolver o cultivo da espécie. Esta espécie se destaca no cultivo por ser um bagre onívoro (Epagri, 2016), atingir 600 g a 800 g de massa corporal em apenas oito meses (Borges, 2005), apresentar um excelente desempenho zootécnico, destacando o rápido crescimento, a fácil adaptação à criação intensiva, rusticidade, facilidade para indução a reprodução, alta taxa de fecundação, possuindo ainda carne saborosa com baixo teor de gordura e com poucas espinhas (Luchini; Avendano, 1985; Carneiro et al., 2002; Fracalossi et al., 2004). Em 2017 o jundiá já era a terceira espécie mais produzida no Rio Grande do Sul, em mono ou policultivo, junto com tilápia (Peixe Br, 2018).

Em cultivo, as fêmeas de jundiá apresentam desempenho zootécnico muito superior ao dos machos, crescendo aproximadamente 30% a mais até a fase da primeira maturação sexual. Isso ocorre porque os machos apresentam maturação sexual bem mais precoce que as fêmeas (Ghiraldelli et al., 2007; Graeff et al., 2008). Em casos como este, o cultivo de população monossexo de fêmeas aumenta enormemente a lucratividade da atividade, além de propiciar lotes mais uniformes e, conseqüentemente, mais valorizados. Há alguns anos, Amaral Junior (2008) já havia iniciado os estudos para a formação de lotes monossexuados de jundiá, porém a eficiência não foi alta (70 a 80%). Isso muito provavelmente devido à lacuna de conhecimento

acerca do momento certo da diferenciação sexual da espécie. Para se reverter o sexo fenotípico de peixes, é fundamental identificar quando os indivíduos se diferenciam sexualmente. Somente com base nesses dados, os protocolos de indução de sexo fenotípico podem ser eficazes. Segundo Piferrer (2001) e Wang et al. (2008), inversões sexuais inferiores a 100% geralmente ocorrem por dosagem hormonal insuficiente e/ou tempo curto de tratamento.

A diferenciação sexual é um processo minucioso de eventos morfológicos que ocorrem durante o desenvolvimento gonadal e que permitem a expressão do sexo genético para o sexo fenotípico apropriado. Atualmente, aproximadamente 30 espécies de peixes já têm o seu processo de desenvolvimento gonadal caracterizado, possibilitando o desenvolvimento de técnicas de cultivo de peixes de valor econômico, além de fornecer dados para estudos evolutivos, de mudança climática e de biologia comparada.

Considerando o potencial econômico do jundiá na região Sul do Brasil, e a lacuna de conhecimento a respeito de sua fisiologia reprodutiva, realizamos a caracterização histológica do processo de diferenciação sexual da espécie. Este estudo tem como objetivo auxiliar na otimização de um protocolo eficiente de feminização, e foi desenvolvido em paralelo com estudos genéticos acerca da determinação sexual da espécie.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. PEIXES, AMOSTRAGENS E PROCESSAMENTO DO MATERIAL**

Larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*) foram adquiridos de piscicultura comercial em Campos do Jordão, SP e mantidas em tanques experimentais nas instalações da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios - APTA, da Secretaria de Agricultura e Abastecimento em Campos do Jordão. Os peixes foram mantidos com renovação parcial de água, fotoperíodo e temperaturas normais da região e receberam dieta *ad libitum* na taxa diária de 5% da biomassa.

As coletas foram realizadas na segunda, quarta e sexta semanas de vida, e foram realizadas individualmente. Em cada amostragem, 12 espécimes foram capturados aleatoriamente (n total = 36), sedados com benzocaína 0.01% e eutanasiados. Uma secção do abdomen, perto do poro urogenital, foi removida e imediatamente imersa em solução fixadora para histologia (Bouin) por pelo menos 24 horas. Após fixação, as amostras foram desidratadas em série crescente de etanol, infiltradas e incluídas em glicol metacrilato (Leica®; Heidelberg, Alemanha). Foram realizados cortes histológicos seriados transversais no sentido crânio-caudal

de 5 µm de espessura e corados com azul de Toluidina (1%) bórax (1%). A documentação histológica foi realizada através de microscópio acoplado a uma câmera digital e um computador com o programa Leica QWIN.

O trabalho foi previamente aprovado pela comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Embrapa Amazônia Ocidental, sob o protocolo número 01/2018. E também possui cadastro para Autorização de Acesso ao Patrimônio Genético sob o número A5784B5.

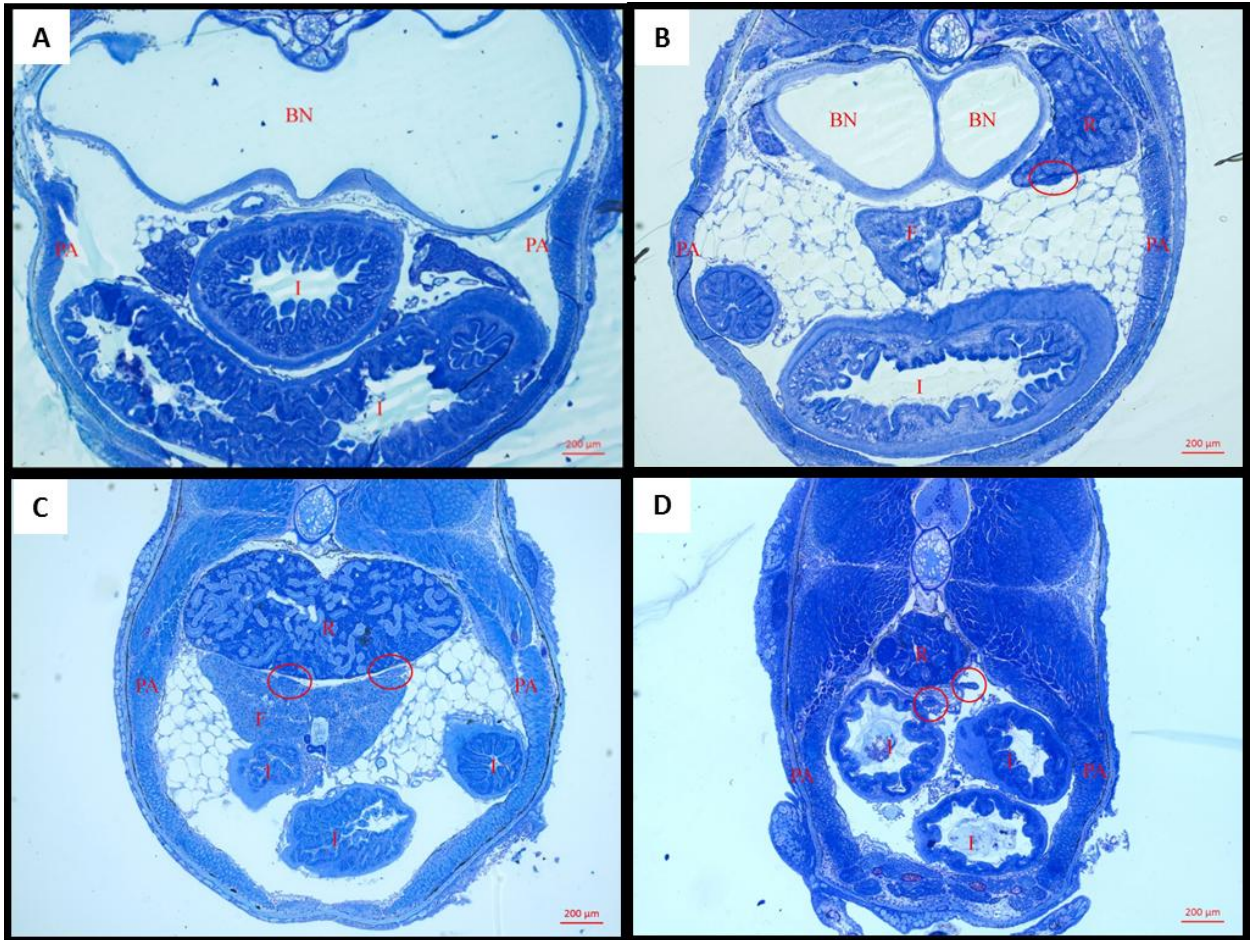
## 2.1 ANÁLISES

Os fragmentos abdominais foram primeiramente analisados quanto a presença, localização e forma das gônadas. Nas gônadas foram avaliadas a presença de células germinativas, além de outras estruturas importantes, como lamelas ovígeras e epitélio germinativo.

## 3. RESULTADOS

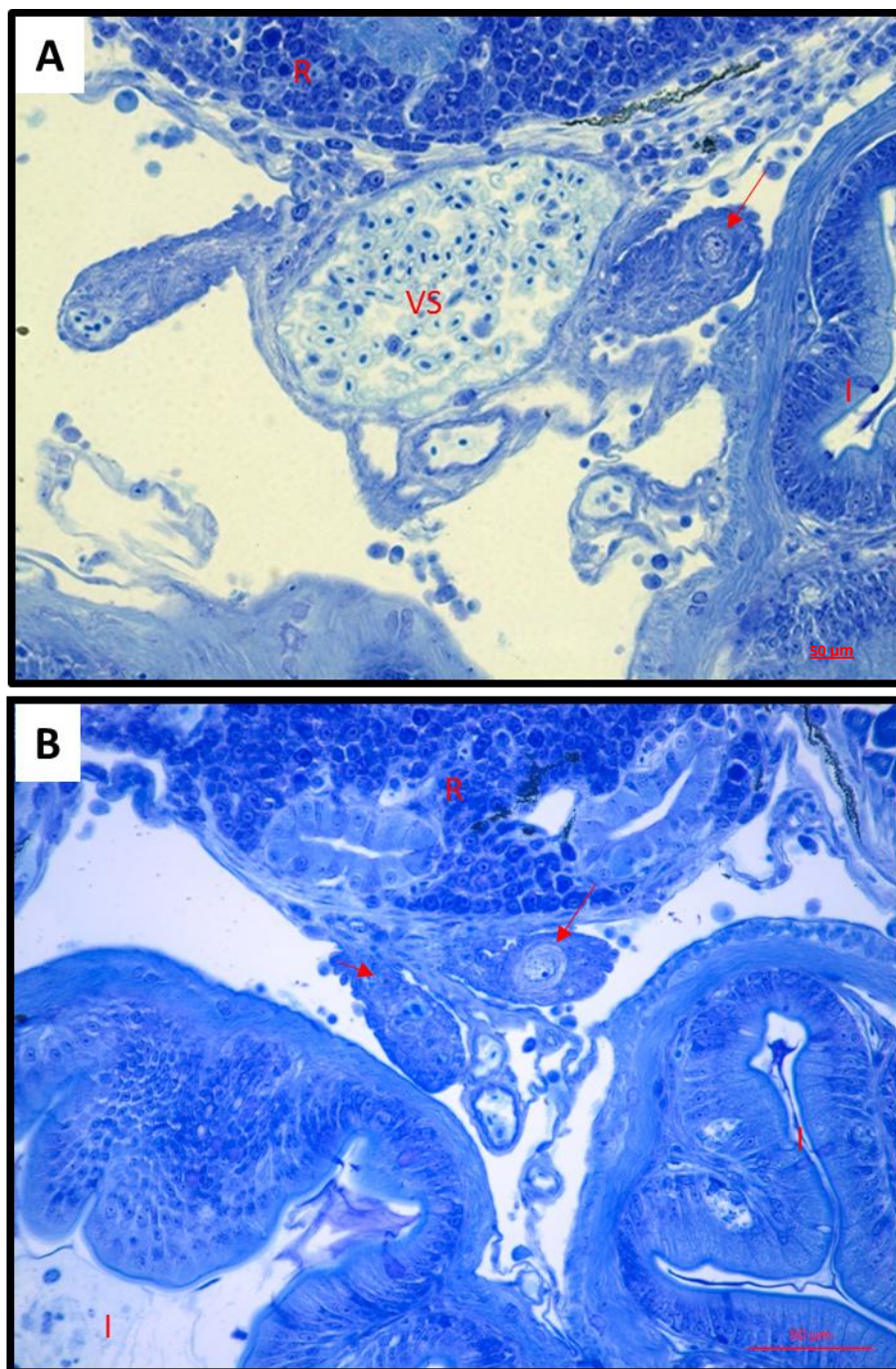
### 3.1. LOCALIZAÇÃO DA GÔNADA

Desde as gônadas indiferenciadas, ambas gônadas estavam presentes em todos os peixes analisados. As gônadas ficam na porção dorsal da cavidade celomática, suspensas por um curto mesogonadium, tornando-se bem visíveis ao final da bexiga natatória e início do rim (Figura 1). As gônadas ficam localizadas em quase toda extensão da cavidade celomática, logo, através de cortes seriados transversais, foi possível identificar sua localização (posição) nas diferentes regiões analisadas. Na região cranial, as gônadas foram observadas nas extremidades laterais entre rim e fígado (Figura 1B). No entanto, à medida que os cortes foram avançando e se aproximando da região caudal, observou-se que a localização foi se modificando, ocorrendo a aproximação das mesmas, quando estão próximas de se fundirem à papila urogenital (Figuras 1 C e D).



**Figura 01:** Localização das gônadas em cortes histológicos seriados transversais de jundiá *R. quelen* com quatro semanas pós-eclosão. A) Região cranial, início da bexiga natatória e sem indícios de gônada. B) Região cranial, próximo ao fim da bexiga natatória e início do rim, primeiras imagens da gônada indiferenciada (círculo vermelho). C) Presença de ambas gônadas entre rim e fígado. D) Região caudal, próximo ao orifício urogenital, quando as gônadas se aproximam. Notar que a bexiga natatória divide-se em dois compartimentos. **BN** - Bexiga natatória; **F** - Fígado; **I** - Intestino; **PA**- parede do abdominal; **R** - Rim. (Coloração: Azul de toluidina).

Em jundiá, não foi possível localizar a gônada em peixes com duas semanas pós-eclosão (spe) por problemas de processamento do material. Mesmo assim, nos peixes de 4 spe, foram verificadas gônadas ainda indiferenciadas ou em início de diferenciação ovariana. A gônada indiferenciada caracteriza-se pela presença de células somáticas e raras células germinativas primordiais, grandes, com formato inicialmente elíptico e nucléolos evidentes. Na maioria das gônadas analisadas, essas células estavam isoladas entre as células somáticas (Figura 2).

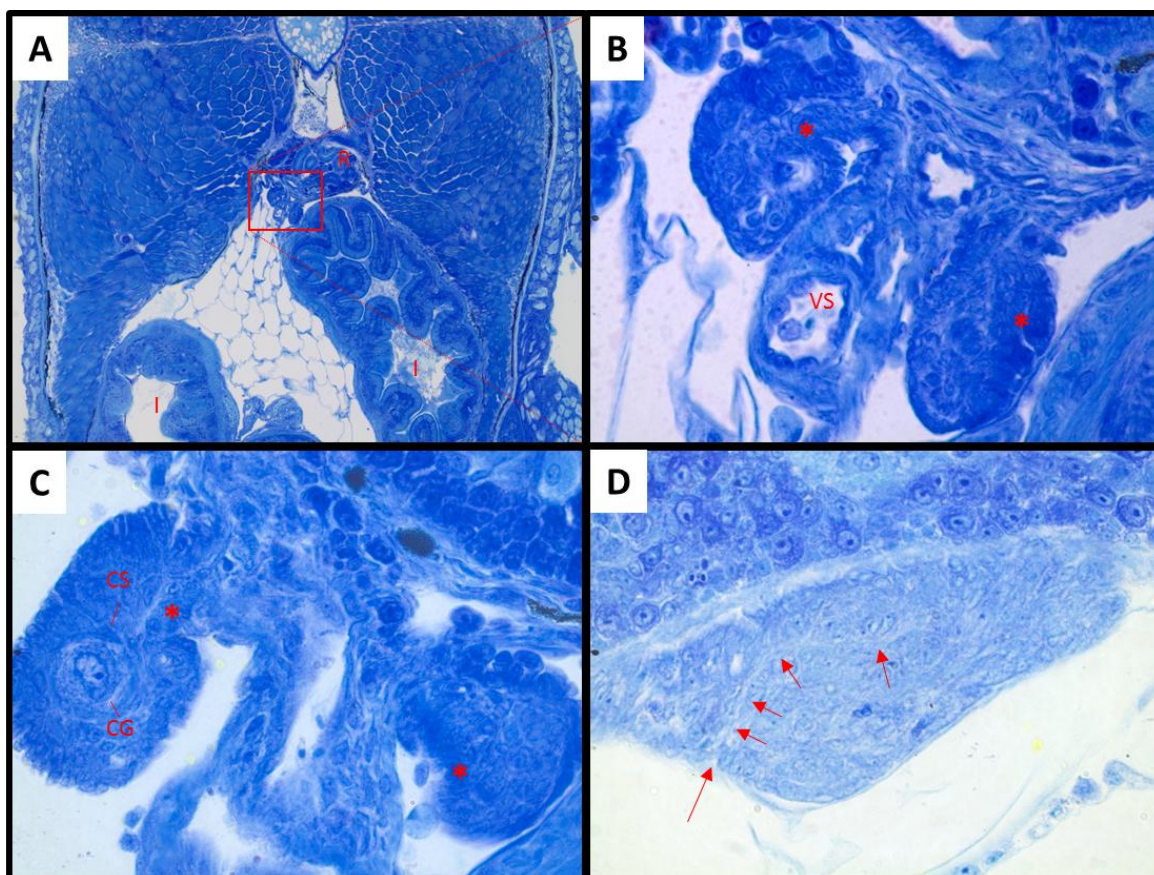


**Figura 2:** Gônada indiferenciada de jundiá *R. quelen* com quatro semanas pós-eclosão. A) Peixe 1. Região proximal; B) Peixe 4. Região mais caudal. Célula germinativa primordial (seta) apresentando formato arredondado (em A) ou elíptico (em B), com nucléolo evidente, e isolado entre as células somáticas. I - Intestino; VS – vaso sanguíneo; R - Rim. (Coloração: Azul de toluidina).

### 3.2. DIFERENCIAÇÃO GONADAL

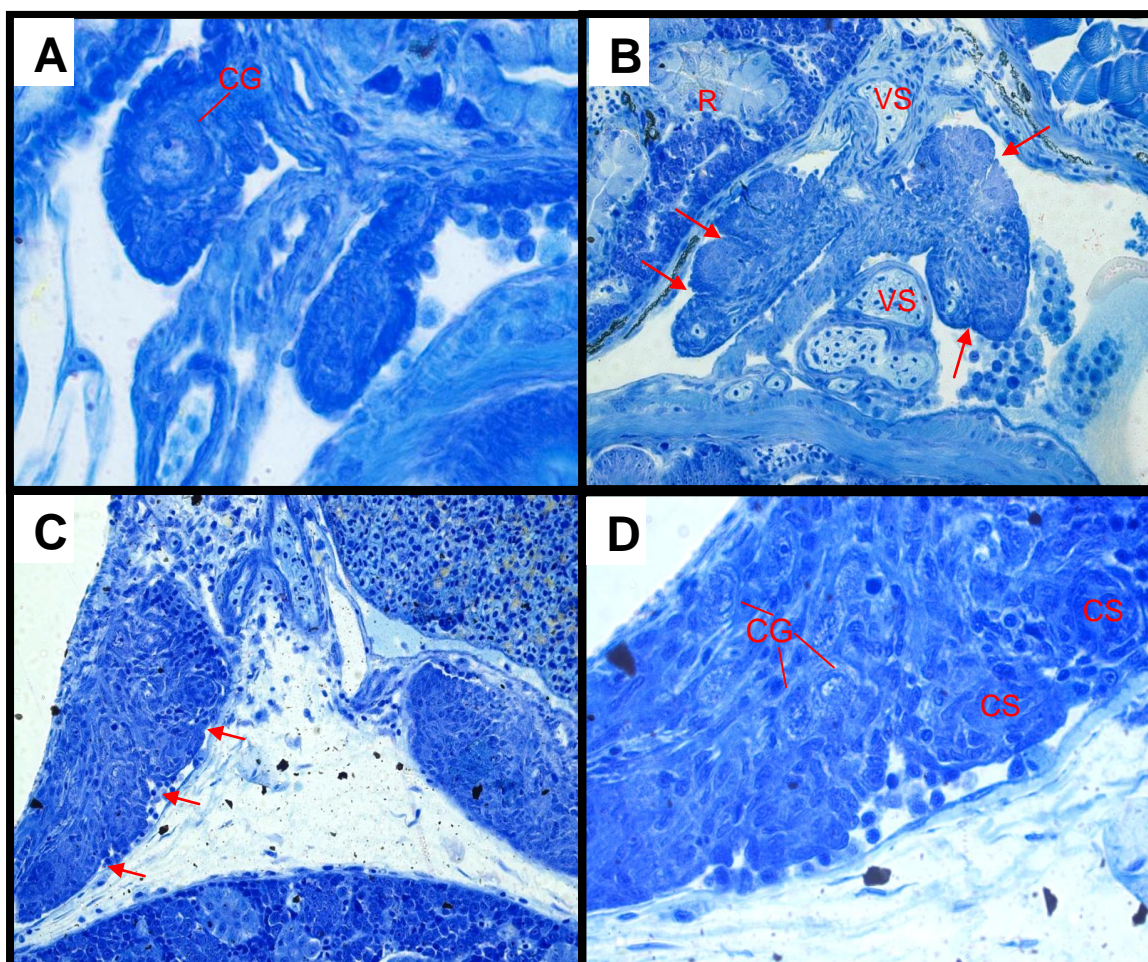
Muito provavelmente com o desenvolvimento da gônada primordial, o número de CGP aumentou da quarta à sexta semana de vida, com sucessivas mitoses, que é característico da gônada indiferenciada. As gônadas indiferenciadas de jundiá originaram diretamente ovários ou testículos e o início da diferenciação ovariana pôde ser observada em alguns exemplares de 4 spe, enquanto que a diferenciação testicular foi observada somente em indivíduos de 6 spe.

A diferenciação do ovário iniciou-se com pequenas projeções do epitélio gonadal que formaram uma curva no órgão, marcando o início da formação de uma cavidade, a cavidade ovariana (Figura 3), ainda em gônadas bem pequenas. Com isso, houve uma alteração na organização espacial da gônada e esta passou a ter um formato mais abaulado, com uma cavidade fechada em seu interior. Avaliando os exemplares com 6 spe, os ovários em diferenciação mostravam-se maiores, e com cavidade ovariana também maior, embora ainda fechada (Figura 3 D).



**Figura 03:** Diferenciação ovariana de jundiá *R. quelen*. A) Início de projeções (\*) do epitélio germinativo em peixe de 4 semanas pós-eclosão (spe), magnificado em B. C) Formação de uma curva na face mediana da gônada em peixe de 4 spe. D) Ovário com cavidade fechada (setas) em peixe de 6 spe. CG – Célula germinativa; CS – Célula somática; I - Intestino; VS- vaso sanguíneo; R - Rim. (Coloração: Azul de toluidina).

Nos prováveis machos de 4 spe, as gônadas permaneceram com aspecto indiferenciado, ou seja, as células germinativas estavam no interior da gônada, sem arranjos celulares ou morfológicos específicos (Figura 4 A). Já nos machos de 6 spe, foi possível observar o início da diferenciação testicular, com o surgimento de 2 a 3 lóbulos na região lateral das gônadas (Figura 4 B). No início, as células somáticas dessa região das gônadas alteraram seu arranjo espacial, causando um abaulamento na gônada, que se tornou bem redonda e depois sofreu algumas invaginações profundas. Essas invaginações formaram então os lóbulos, que continham células germinativa isoladas ou em pares, entre células somáticas achatadas ou elípticas. Com o crescimento do órgão, o número de lóbulos aumentou gradativamente, causando um aumento no tamanho dos testículos em desenvolvimento (Figuras 4 C e D). Nesses peixes em diferenciação testicular, as células germinativas, já diferenciadas em espermatogônias, apresentavam-se envoltas por células somáticas achatadas, as células de Sertoli. Outros tipos celulares somáticos estavam agrupados formando nichos celulares arredondados.



**Figura 04:** Diferenciação testicular de jundiá *R. quelen*. A) Gônadas indiferenciadas em peixe de 4 semanas pós-eclosão (SPE). B) Formação de sulcos (setas) no epitélio germinativo e interstício gonadal em peixe de 6 spe. C) Aumento do número de sulcos em peixes maiores, magnificado em D. CG – Célula germinativa; CS – Célula somática; VS- vaso sanguíneo; R - Rim. (Coloração: Azul de toluidina).



#### 4. DISCUSSÃO

Em piscicultura, uma vez identificada a superioridade de um gênero em relação ao outro, busca-se a produção de lotes monossexo, com o objetivo de otimizar a produção ao máximo e com isso alcançar maior rentabilidade, sem negligenciar a sustentabilidade e segurança biológica da atividade. A técnica de se produzir peixes de um único sexo somente é possível porque os mecanismos de determinação e diferenciação sexual em teleósteos são variados e, principalmente, muito lábeis.

Entretanto, para se desenvolver essa tecnologia para uma determinada espécie, estudos prévios espécie-específicos são fundamentais. Dentre eles, destacam-se a identificação do mecanismo de determinação sexual e a caracterização temporal do processo de diferenciação das gônadas.

O jundiá *Rhamdia quelen* é uma espécie que vem se destacando na piscicultura da região sul do Brasil e se demonstra promissora para a indústria aquícola brasileira. Como a fêmea chega a ser 30% mais pesada que o macho de mesma idade, a busca por um protocolo eficiente de população monossexo de fêmeas de jundiá tem sido alvo de diferentes estudos (Graeff et al., 2008; Amaral Junior et al., 2008). Apesar desta busca, este é o primeiro trabalho voltado à caracterização histológica da diferenciação sexual do jundiá, para o qual foram analisados exemplares de 4 e 6 semanas pós-eclosão (spe).

Assim como a maioria dos teleósteos, o jundiá não apresenta o sexo definido no período de embriogênese. Neste estágio, as células das gônadas são pluripotentes, podendo dar origem a ambos os sexos (Cesar et al., 2005). À eclosão, as larvas de teleósteos não apresentam gônadas bem definidas e primeiros forma-se um primórdio gonadal, que é a crista gonadal povoada por células germinativas, de origem extra-embriônica. Com o desenvolvimento desta estrutura primordial, a gônada indiferenciada é então caracterizada pela presença de células somáticas e células germinativas primordiais (CGP's), que ficam inicialmente isoladas ou em pares entre as células somáticas (Mazzoni et al., 2014).

Na maioria dos teleósteos, as sucessivas divisões celulares das CGP's indicam o princípio da diferenciação gonadal, seja ela ovariana ou testicular, e mais especificamente quando se inicia o processo de meiose nas fêmeas (Nakamura e Takahashi, 1973; Strüssmann et al., 1996; Nakamura et al. 1998; Maack e Segner, 2003; Meijide et al., 2005; Mazzoni et al., 2014). No entanto, no jundiá essa alta proliferação das células germinativas não foi observado em nenhum exemplar e o início da diferenciação dos ovários foi marcada pelo desenvolvimento da cavidade ovariana em peixes a partir de 4 spe. A formação da cavidade ovariana em jundiá dá-se por uma

reorganização das células epiteliais, que começam a se projetar e se encurvam, formando um C e reorganizando a estrutura espacial da gônada, originando, finalmente, uma cavidade dentro dela. Esse tipo de diferenciação ovariana ocorre em outros bagres, como o bagre americano *Ictalurus punctatus* (Patiño et al., 1996), o bagre africano *Clarias gariepinus* (Santi et al., 2016) e o cachara *Pseudoplatystoma fasciatum* (Valentin et al., 2016).

Após a formação da cavidade ovariana, o número de células germinativas, agora diferenciadas em oogônios aumenta, por uma alta atividade mitótica. A alta proliferação de células germinativas é comum durante o desenvolvimento de ovários de muitas espécies de teleósteos (Strussman e Nakamura, 2002, Lewis et al., 2008). Com isso, o ovário de jundiá em diferenciação aumenta de tamanho e fica mais arredondado, sempre com a cavidade fechada em seu interior. Como a cavidade ovariana de jundiá não se abre em fêmeas de até 6 spe, não foi possível analisar a formação das lamelas ovarianas nesta espécie com os exemplares utilizados neste estudo.

Por outro lado, nos machos o desenvolvimento testicular parece ser um pouco mais tardio, em peixes de 6 spe. Os primeiros sinais da diferenciação dos testículos em jundiá é o surgimento de invaginações no epitélio gonadal, que origina de dois a três lóbulos nas gônadas. Com o tempo o número de lóbulos aumenta, e todo o testículo fica maior. As células germinativas também aumentam seu número. Esses lóbulos também foram bem caracterizados no cachara, e marcam o início das franjas testiculares, que são estruturas típicas de alguns bagres (Valentin et al., 2019).

O identificação do processo de diferenciação gonadal dos peixes serve como base para o desenvolvimento de tecnologias de produção e também para estudos de fisiologia, evolução e efeitos de mudanças climáticas. O presente trabalho apresenta uma curta descrição temporal dos aspectos morfológicos que definem a diferenciação sexual do jundiá, identificando principalmente a idade em que ocorre a diferenciação ovariana, marco inicial da diferenciação na espécie, e da diferenciação testicular, que ocorre mais tardiamente. Embora este estudo não tenha acompanhado o desenvolvimento das gônadas até o início da meiose em machos e fêmeas de jundiá, os dados aqui apresentados já contém informações suficientes para o direcionamento de técnicas de inversão sexual na espécie. Somados aos estudos de expressão gênica das vias de diferenciação ovariana *versus* testicular que estão sendo conduzidas em nosso projeto, essas informações caracterizarão, conjuntamente, todo o processo de diferenciação sexual desta tão importante espécie nativa, contribuindo com dados sobre sua fisiologia reprodutiva.

## 5. REFERÊNCIAS

- Amaral Junior, H., Silva, N.M.F. & Garcia, S. (2008) Análise de diferentes dosagens de hormônio na ração, para definição de um protocolo de feminilização do jundiá *Rhamdia quelen*. Revista eletrônica de Veterinária **9**, 1-7.
- Borges, A. Valores hematológicos e bioquímicos séricos, efeitos de doses subletais da cipermetrina e características físicoquímicas do sêmem do Jundiá *Rhamdia quelen*. Porto Alegre, 2005. 175f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Carneiro, P.C.F. (2002) Jundiá: um grande peixe para a Região Sul. Panorama da Aqüicultura, São Paulo **12**, 41-46.
- Cesar, M.P, Murgas L.D.S., Araújo R.V. & Drummond C.D. (2005) Métodos para obtenção de população monossexo na piscicultura. Bol. Agropec. Universidade Federal de Lavras- MG **69**, 1-27.
- Epagri, Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (2016). Disponível em: [http://www.epagri.sc.gov.br/?page\\_id=676](http://www.epagri.sc.gov.br/?page_id=676). Acesso em: 18/08/2016.
- Fao, Fida, Unicef, Pma, & Oms. (2018) El estado de la seguridad alimentaria y la nutrición en el mundo. Fomentando la resiliencia climática en aras de la seguridad alimentaria y la nutrición. FAO, Roma.
- Fracalossi, D.M. et al. (2004) Desempenho o Jundiá, *Rhamdia quelen*, e do dourado, *Salminus brasiliensis*, em viveiros de terra na região sul do Brasil. Acta Sci. Biol. Sci., Maringá **26**, 345-352.
- Ghiraldelli, L., Machado, C., Fracalossi D.M., & Zaniboni, F.E. (2007) Desenvolvimento gonadal do jundiá, *Rhamdia quelen* (Teleostei, Siluriformes), em viveiros de terra, na região sul do Brasil. Acta Scientiarum. Biol. Sci. **29** 1-8.
- Graeff, A., Segalin, C.A., Pruner, E.N. & Amaral Junior, H. (2008) Produção de alevinos de jundiá *Rhamdia quelen*. Florianópolis: Epagri, 34p.
- Lewis, Z.R., McClellan, M.C., Postlethwait, J.H., Cresko, W.A., & Kaplan, R.H. (2008) Female-specific increase in primordial germ cells marks sex differentiation in three-spine Stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). J. Morphol. **269**, 909–921.
- Luchini, L., & Averdano, T. (1985) Primeros resultados de cultivo de un pez de aguas cálidas (*Rhamdia sapo*) con fines de producción y consumo humano. Rev. Arg. Prod. Anim. **4**, 621-629.
- Maack, G. & Segner, H. (2003) Morphological development of the gonads in zebrafish. Journal of Fish Biology **62**, 895–906.
- Mazzoni, T.S., Grier, H.J. & Quagio-Grassiotto, I. (2014) Germline cysts and the formation of the germinal epithelium during the female gonadal morphogenesis in *Cyprinus carpio* (Teleostei: Ostariophysi: Cypriniformes). The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biol. **293**, 1581-1606.
- Meijide, F.J., Lo Nostro, F. & Guerrero, G.A. (2005) Gonadal Development and Sex Differentiation in the Cichlid Fish *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes): A Light and Electron-Microscopic Study. J. Morphol. **264**, 191-210.

- Nakamura, M. & Takahashi, H. (1973) Gonadal sex differentiation in *Tilapia mossambica*, with special regard to the time of estrogen treatment effective in inducing complete feminization of genetic males. *Bull. Fac. Fish Hokkaido Univ.* **24**, 1-13.
- Nakamura, M., Kobayashi, T., Chang, X.T. & Nagahama, Y. (1998) Gonadal sex differentiation in teleost fish. *J. Exp. Zool.* **281**, 362-372.
- Patiño, R., Davis, K.B., Schoore, J.E., Uguz, C., Strussmann, C.A., Parker, N.C., Simco, B.A. & Goudie, C.A. (1996) Sex differentiation of channel catfish gonads: normal development and effects of temperature. *J. Exp. Zool.* **276**, 209-218.
- Peixe, BR. Anuário Peixe BR da piscicultura (2018). São Paulo: Associação Brasileira de Piscicultura.
- Piferrer, F. (2001) Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. *Aquaculture* **197**, 229-281.
- Santi, S., Gennotte, V., Toguyeni, A., Mélard, C., Antoine, N., & Rougeot, C. (2016) Thermosensitivity of the sex differentiation process in the African catfish, *Clarias gariepinus*: Determination of the thermosensitive period. *Aquaculture* **455**, 73-80.
- Strüssmann, C.A. & Nakamura, M. (2002) Morphology, endocrinology, and environmental modulation of gonadal sex differentiation in teleost fishes. *Fish Physiol. Biochem.* **26**, 13-29.
- Strüssmann, C.A., Takashima, F., & Toda, K. (1996) Sex differentiation and hormonal feminization in pejerrey *Odontesthes bonariensis*. *Aquaculture* **139**, 31-45.
- Valentin, F.N., Batlouni, S.R., Nascimento, N.F., Silva, R.C., Manzini, B., Hilbig, C.C., & Nakaghi, L.S.O. (2016). Ovarian differentiation and development in cachara *Pseudoplatystoma fasciatum*. *Journal of fish biology* **89**, 445-466.
- Valentin, F.N., Nakaghi, L.S., Batlouni, S.R., do Nascimento, N.F., do Carmo F.P.M., Cristina da Silva, R., & Henrique, C.A.M. (2019). Testicular differentiation and development in South American catfish, surubim, *Pseudoplatystoma fasciatum*. *Journal of Applied Ichthyology* **35**, 529-540.
- Wang, H.P., Gao, Z., Beres, B., Ottobre, J., Wallat, G., Tiu, L., & Yao, H. (2008). Effects of estradiol-17 $\beta$  on survival, growth performance, sex reversal and gonadal structure of bluegill sunfish *Lepomis macrochirus*. *Aquaculture* **285**, 216-223.



## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A explosão demográfica aliada à busca por alimentos saudáveis e à diminuição dos estoques naturais de peixes pela sobrepesca são os principais fatores que impulsionaram o crescimento e o avanço da aquicultura mundial. Em geral, a indústria da piscicultura cresceu aproximadamente 12 vezes nas últimas três décadas, período em que a aquicultura não somente se disseminou, mas também evoluiu em termos de inovação tecnológica e adaptação para atender às novas exigências de mercado, alcançando a produção mundial de 60 milhões de toneladas em 2010. Da mesma forma, embora com um certo atraso, a piscicultura no Brasil se difundiu e se intensificou, com altos investimentos no aperfeiçoamento das técnicas de cultivo, com o objetivo de melhorar o desempenho produtivo e econômico na criação de peixes. Todas as espécies de peixe hoje mais produzidas e/ou valorizadas no mundo já passaram por processos intensivos de domesticação, seleção, manipulação sexual e fertilidade. Assim, no Brasil atual, que apresenta uma aquicultura infante em pleno desenvolvimento, é urgente que sejam desenvolvidas pesquisas voltadas ao aperfeiçoamento de pacotes tecnológicos para as espécies de peixes com destaque zootécnico em todas as regiões do país. Com esse intuito, esta dissertação apresenta a caracterização morfológica do processo de diferenciação sexual de duas espécies de regiões geográficas distintas, mas com semelhante interesse para a piscicultura nacional: o pirarucu (*Arapaima gigas*) e o jundiá (*Rhamdia quelen*), para o embasamento de tecnologias de produção em cultivo, visto que a falta de informações acerca da fisiologia reprodutiva destas espécies são entraves em suas cadeias produtivas. Ambas são espécies que possuem potencial para alcançar altos níveis de crescimento e de qualidade de carne através de programas melhoramento genético e por produção de lotes monoss sexuados de fêmeas.

O pirarucu é um peixe Amazônico com características biológicas muito distintas por ser uma das espécies mais remotas na cadeia evolutiva dos teleósteos. Devido seu tamanho e sua carne desprovida de espinhas, este apresenta um grande potencial para a indústria de aquicultura da região Norte, principalmente. Para que o cultivo do pirarucu chegue a nível industrial, é necessário que sejam estabelecidos protocolos eficientes de sexagem de formas jovens e de indução hormonal para a espécie. A consolidação de qualquer cadeia pecuária se inicia com a constante oferta de formas jovens de boa qualidade que sustentem a cadeia produtiva. Diferentes estudos sobre a maturação gonadal do pirarucu, os cuidados parentais da espécie e análises transcriptômicas de tecidos de machos e fêmeas já foram desenvolvidos, demonstrando o grande interesse da comunidade acadêmica em solucionar os gargalos tecnológicos da produção industrial do pirarucu.

No caso do jundiá, espécie de crescente importância na piscicultura da região Sul, a criação de lotes monossexo de fêmeas é muito interessante economicamente, pela superioridade da fêmea (em peso) em comparação ao macho. Para isso é fundamental caracterizar o processo de diferenciação sexual da espécie de forma a orientar os protocolos de indução sexual fenotípica.

Como na maioria dos teleósteos, ambas espécies apresentam diferenciação sexual direta, ou seja, as gônadas indiferenciadas se diferenciaram diretamente em ovário ou em testículo. Entretanto, enquanto que no pirarucu a diferenciação ovariana foi um pouco mais precoce que a testicular, no jundiá o início da diferenciação de ovários e testículos ocorreu em peixes de mesma idade. Até o momento, não se sabe se as alterações morfológico-estruturais que ocorrem nas gônadas ao início da diferenciação é determinado em nível bioquímico ou celular e nem mesmo se é iniciada nas células germinativas ou nas células somáticas presentes nas gônadas, ou ainda se acontece nas duas ao mesmo tempo. Além disso, as estruturas morfológicas que marcam o processo de diferenciação sexual (forma) podem variar de acordo com a espécie e gênero, o que dificulta ainda mais o processo de caracterização. No pirarucu, marco da diferenciação ovariana (fêmea) é a concentração das células germinativas na face lateral da gônada, cercada por células somáticas pré-foliculares, ao mesmo tempo em que o epitélio passa de escamoso para cúbico em peixes de aproximadamente 9 cm de comprimento total. Com o desenvolvimento destas estruturas, inicia-se a formação de pequenas lamelas ovígeras, que posteriormente formam as franjas ovarianas, que são características desta espécie. Os supostos machos permanecem com a gônada com aspecto indiferenciado por mais tempo, até que as células germinativas se rearranjam espacialmente no órgão (concentrando-se em seu interior) para dar origem aos cordões testiculares. Esses cordões posteriormente se fragmentam originando os cistos espermatogênicos, ou seja, a intrínseca relação das células germinativas (espermatogônias) com as células somáticas. No jundiá, a formação do ovário se com o desenvolvimento da cavidade ovariana em exemplares de 4 semanas após a eclosão. Essa estrutura é formada por uma pequena projeção do epitélio gonadal, que eventualmente se curva e se fecha, deixando uma cavidade no interior do órgão. Neste trabalho, não conseguimos exemplares de tamanhos suficientes para uma completa caracterização do desenvolvimento ovariano ou testicular do jundiá, mas essa cavidade, inicialmente fechada, mais tarde abre-se para a formação e desenvolvimento das lamelas ovarianas dentro dela. Nos machos de mesma idade, a gônada indiferenciada começa a apresentar sulcos que são a origem das franjas testiculares características de algumas espécies de bagres.

Com base no exposto acima e se considerando: a importância ecológica e social destas espécies, seus potenciais produtivos e econômicos para suas respectivas regiões e o quadro atual de desconhecimento a respeito de suas fisiologias reprodutivas, o presente trabalho caracterizou o processo de formação do primórdio gonadal e da gônada em diferenciação destas duas espécies, através de estudo em secções histológicas seriadas, como subsídio para o desenvolvimento de tecnologias para o cultivo da espécie em pisciculturas comerciais, em programas de conservação e ainda em estudos evolutivos e de mudanças climáticas.