



**ARTHUR SILVA CASTRO**

**USO DE DIFERENTES TÉCNICAS NA AVALIAÇÃO DO  
SEXO E ESTÁGIO DE MATURAÇÃO GONADAL EM  
*Astronotus ocellatus***

**LAVRAS – MG**

**2022**

**ARTHUR SILVA CASTRO**

**USO DE DIFERENTES TÉCNICAS NA AVALIAÇÃO DO SEXO E ESTÁGIO DE  
MATURAÇÃO GONADAL EM *Astronotus ocellatus***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Luis David Solis Murgas

Orientador

**LAVRAS – MG**

**2022**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Castro, Arthur Silva.

Uso de diferentes técnicas na avaliação do sexo e estágio de  
maturação gonadal em *Astronotus ocellatus* / Arthur Silva Castro. -  
2022.

48 p.

Orientador(a): Luis David Solis Murgas.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2022.

Bibliografia.

1. Aquicultura. 2. Reprodução. 3. Endocrinologia. I. Murgas,  
Luis David Solis. II. Título.

**ARTHUR SILVA CASTRO**

**USO DE DIFERENTES TÉCNICAS NA AVALIAÇÃO DO SEXO E ESTÁGIO DE  
MATURAÇÃO GONADAL EM *Astronotus ocellatus***

**USE OF DIFFERENT TECHNIQUES TO ASSESS THE SEX AND STAGE OF  
GONADAL MATURATION IN *Astronotus ocellatus***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 26 de outubro de 2022

Profº. Drº Carlos Antonio Martinez-Palacios – Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Profº. Drº Galileu Crovatto Veras – UFMG

Profº. Drº William Franco Carneiro - UFLA

Profº. Drº. Luis David Solis Murgas UFLA

Orientador

**LAVRAS – MG**

**2022**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente à minha família pois foi devido ao esforço dos meus pais que cheguei até aqui, obrigado pelo apoio constante e por acreditarem sempre em mim.

Agradeço ao Professor Luis David Solis Murgas pelas orientações que foram muito além do âmbito acadêmico, seu apoio durante a pós-graduação foi essencial ao meu desenvolvimento pessoal.

Agradeço a Universidade Federal de Lavras por me acolher e possibilitar meu engrandecimento acadêmico, assim como agradeço ao Biotério Central por todo aprendizado nos mais diversos projetos ali desenvolvidos.

Agradeço em especial a Gilmara Junqueira, Naiara Melo e Kianne Monteiro por estarem presentes ao longo dessa jornada, me aconselhando e ajudando das mais diversas formas possíveis.

Agradeço aos meus amigos e minha cadela Paquita por serem conforto nos momentos difíceis, agradeço ainda a Taize por estar ao meu lado e proporcionar amor, carinho e compreensão nos momentos mais difíceis.

Agradeço por fim à CAPES e ao CNPq pelo financiamento das pesquisas.

## RESUMO

Considerando a importância econômica, bem como a escassez de estudos aplicados a reprodução do peixe Oscar (*Astronotus ocellatus*), o objetivo geral deste estudo foi avaliar os métodos para identificação do sexo nessa espécie como dosagem de esteróides sexuais (testosterona e  $17\beta$ -estradiol), avaliação ultrassonográfica de gônadas, avaliação morfométrica e histologia gonadal. Exemplares de *A. ocellatus* com 12 meses de idade, em um total de 20 animais, foram utilizados para realização deste estudo. Foram coletadas amostras de sangue para dosagem hormonal de testosterona (T) e  $17\beta$ -estradiol (E2), com os exemplares também foi realizada ultrassonografia celomática, avaliação morfométrica e histologia gonadal para confirmação do sexo e avaliação de maturação gonadal. Os dados obtidos a partir das análises foram correlacionados ao sexo dos animais a 5% de significância pelo programa Minitab® versão 18 (Minitab LLC, State College, PA). Após avaliação histológica, foram constatadas a presença de 13 fêmeas e 7 machos, apresentando-se 40% em maturação inicial, 15% em maturação final, 20% maduros, 10% espermiados/desovados e 15% em repouso. Nenhum dos animais testados foi caracterizado como imaturo. Os dados morfométricos não apresentaram diferenças estatísticas ( $p>0,05$ ), entretanto as análises hormonais apresentaram diferença estatística quanto à razão T/E2 entre machos e fêmeas ( $p=0,013$ ) e apresentou 78,94% de eficácia na predição do sexo. Já os resultados da ultrassonografia gonadal apresentaram ecogenicidades diferentes com padrões hiperecoicos de ovários maduros em relação a padrões hipoeicoicos de ovários em maturação. Já os machos apresentaram padrão anecoico na região testicular. Pode-se concluir que nas condições em que o experimento foi realizado, o método de sexagem por dosagem hormonal foi validado. Entretanto os dados morfométricos não foram eficientes para a predição do sexo. Já os dados obtidos pela ultrassonografia, apesar de promissores, necessitam de mais trabalhos com um número maior de animais em diferentes faixas etárias para validação da técnica.

**Palavras-chave:** Aquicultura. Reprodução. Endocrinologia. Peixe ornamental amazônico. Piscicultura ornamental.

## ABSTRACT

Considering the economic importance, as well as the scarcity of studies applied to the reproduction of the Oscar fish (*Astronotus ocellatus*), the general objective of this study was to evaluate the methods for identifying the sex in this species, such as dosage of sexual steroids (testosterone and 17 $\beta$ -estradiol), ultrasonographic evaluation of gonads, morphometric evaluation and gonadal histology. *A. ocellatus* specimens with 12 months of age, in a total of 20 animals, were used for this study. Blood samples were collected for hormone dosage of testosterone (T) and 17 $\beta$ -estradiol (E2). Coelomic ultrasonography, morphometric evaluation and gonadal histology were also performed on the specimens to confirm sex and assess gonadal maturation. The data obtained from the analyzes were correlated to the sex of the animals at 5% significance using the Minitab® program version 18 (Minitab LLC, Stage College, PA). After histological evaluation, the presence of 13 females and 7 males were verified, with 40% in initial maturation, 15% in final maturation, 20% mature, 10% spermed/spawned and 15% at rest. None of the tested animals was characterized as immature. The morphometric data did not show statistical differences ( $p>0.05$ ), however the hormonal analyzes showed a statistical difference regarding the T/E2 ratio between males and females ( $p=0.013$ ) and showed 78.94% effectiveness in predicting sex. The results of gonadal ultrasonography showed different echogenicity with hyperechoic patterns of mature ovaries in relation to hypoechoic patterns of maturing ovaries. Males, on the other hand, presented an anechoic pattern in the testicular region. It can be concluded that under the conditions in which the experiment was carried out, the sexing method by hormone dosage was validated. However, the morphometric data were not efficient for gender prediction. The data obtained by ultrasonography, although promising, require further work with a larger number of animals in different age groups for validation of the technique.

**Keywords:** Aquaculture. Reproduction. Endocrinology. Amazon ornamental fish. Ornamental fish farming.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1. <i>Astronotus ocellatus</i>	11
2.1.1. Comportamento reprodutivo	12
2.1.2. Dimorfismo sexual	13
2.2. Endocrinologia reprodutiva em peixes.	15
2.2.1. Progestágenos em peixes.	16
2.2.2. Andrógenos em peixes	17
2.2.3. Estrógenos em peixes.	18
2.3. Técnicas de sexagem em peixes.	19
2.3.1. Sexagem manual ou fenotípica.	19
2.3.2. Sexagem por níveis séricos de esteróides sexuais.	20
2.3.3. Sexagem a partir de exames de imagem.	21
2.4. Histologia gonadal	22
3. OBJETIVOS	25
3.1. Objetivo geral	25
3.2. Objetivos específicos.	25
4. MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1. Declaração de ética.	26
4.2. Animais e estrutura.	26
4.3. Coleta de sangue e obtenção do plasma.	26
4.4. Dosagem de esteroides sexuais.	27
4.5. Avaliação ultrassonográfica das gônadas	27
4.6. Avaliação morfométrica.	28
4.7. Coleta de Gônadas e histologia.	29
4.8. Confecção de lâminas histológicas e avaliação de estágio de maturação gonadal.	29
4.9. Análises estatísticas	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.	32
5.1. Sexagem dos animais por histologia gonadal.	32
5.3. Morfometria.	36
5.4. Identificação do sexo a partir da razão T/E2	37
5.5. Avaliação ultrassonográfica	41



6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	44
7.	REFERÊNCIAS	45

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil vem apresentando constante crescimento na aquicultura, resultado da geografia do país que possui uma das maiores bacias hidrográficas do mundo, bem como a disseminação de conhecimentos para com os produtores aquícolas.

Ao longo dos últimos anos o cultivo de peixes para consumo e para ornamentação, se mostrou uma alternativa rentável para o mercado brasileiro. Fazendo com que, cada vez mais se mostre necessária a produção científica visando o domínio sobre as biotecnologias aplicadas às espécies de interesse.

A identificação do sexo nos peixes pode ser considerada o ponto de partida no processo de reprodução das espécies de peixes em cativeiro, seja com finalidade produtiva ou produção científica. Este processo possui como objetivo a divisão dos animais de acordo com o sexo, proporcionando um melhor controle do plantel de reprodutores bem como a distribuição adequada de machos e fêmeas de acordo com a espécie a ser trabalhada.

Em animais sem dimorfismo sexual, a identificação do sexo pode ocorrer de forma subjetiva, ocasionando erros e problemas na seleção de reprodutores como uma proporção inadequada de machos e fêmeas sendo que em algumas espécies com comportamento reprodutivo territorialista essa desproporção gera estresse, brigas e até mesmo ao óbito de reprodutores.

Tendo em vista essa problemática, faz-se necessária a implementação de técnicas de sexagem alternativas como a dosagem de esteroides sexuais e ultrassonografia gonadal. Tais técnicas já apresentam resultados promissores em espécies sem dimorfismo sexual, mostrando-se alternativas interessantes para a identificação do sexo.

A ultrassonografia gonadal vem sendo empregada em diversos trabalhos e com resultados promissores, uma vez que, com a visualização das gônadas pelo aparelho ultrassonográfico é possível identificar padrões que remetem aos ovários ou testículos, além de ser uma técnica não invasiva.

Os esteroides sexuais como a testosterona (T) e o estradiol (E2) possuem importância no controle endócrino da reprodução, tendo assim sua concentração plasmática alterada de acordo com o estágio do período reprodutivo e o sexo dos animais. A avaliação dessas concentrações já foi relatada em diversos trabalhos possuindo um bom índice de correlação com o sexo, sendo assim uma forma alternativa para a sexagem dos animais.

O *Astronotus ocellatus*, também conhecido popularmente como Oscar, Apaiari ou Acará-Açu, é uma espécie que não apresenta dimorfismo sexual nas primeiras fases de vida, além de possuir comportamento reprodutivo territorialista e monogâmico, fazendo com que a espécie se torne potencialmente agressiva durante o período de reprodução. Este comportamento se torna um empecilho na sua produção em cativeiro, uma vez que ao atingirem a maturidade sexual as interações com os outros animais se tornam agressivas devido a disputas por parceiros ou território, resultando muitas vezes em brigas e perdas econômicas.

Diante da necessidade de estabelecer métodos para a identificação sexual da espécie, este estudo propõe diferentes abordagens para a sexagem dos animais, como aspectos morfométricos, ultrassonografia gonadal e mensuração de esteroides sexuais em animais jovens, com objetivo de avaliar as diferentes técnicas de sexagem, além de gerar dados que contribuam para o desenvolvimento das biotecnologias da reprodução no *Astronotus ocellatus*.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1. *Astronotus ocellatus*

O *Astronotus ocellatus*, conhecido popularmente como peixe Oscar, Apaiari ou Acará-Açu, é uma espécie de peixe nativa da bacia do rio Amazonas, pertencendo à família Cichlidae e ordem dos Perciformes (PAVANELLI, 2000). Apesar de ser nativo da América do Sul, existem relatos da sua introdução no estado da Flórida nos Estados Unidos, além de ser uma espécie de grande interesse no aquarismo mundial, podendo ser encontrada em diversos países em criações de cativeiro ou aquários para ornamentação (FURY, 1994).

O *A. ocellatus* apresenta comportamento alimentar carnívoro, tendo como base da sua alimentação insetos, crustáceos e peixes de pequeno porte (HONEBRINK, 1990). Suas características físicas e comportamentais despertam um grande interesse no meio aquarista, pois a espécie possui cores marcantes e diversas como tons de dourado, vermelho e até mesmo indivíduos albinos. Seu comportamento tem feito com que a espécie ganhe uma boa representatividade no mercado pet devido à sua alta capacidade de condicionamento (PAES *et al.*, 2012).

Apesar do maior foco de produção da espécie ser voltada para o aquarismo, algumas populações do norte do Brasil, por meio da pesca extrativista, apreciam a carne da espécie devido a sua carne saborosa, firme e sem espinhas intramusculares (GURGEL; FREITAS, 1973). Porém, o *A. ocellatus* possui um crescimento lento e interações comportamentais agressivas e territorialista, fazendo com que a sua produção para consumo se torne muitas vezes inviável pela baixa densidade de estocagem necessária e o longo tempo de cultivo até atingir o peso de abate (GURGEL; FREITAS, 1973).

Na fase juvenil os animais apresentam comportamento gregário, formando cardumes, porém quando chegam em período reprodutivo por volta de 1 ano de idade, o *A. ocellatus* apresenta um comportamento monogâmico e territorialista (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

Na produção em cativeiro, essa fase de mudança comportamental muitas vezes acaba gerando perdas econômicas pelo processo hierárquico e reprodutivo. Sendo necessária a intervenção do produtor para que esses animais estejam em uma proporção adequada de machos e fêmeas. O grande entrave desse manejo se dá pela ausência de dimorfismo sexual na espécie e a subjetividade nas técnicas de sexagem envolvendo características morfológicas (CARVALHO *et al.*, 2017).

### 2.1.1. Comportamento reprodutivo

O *A. ocellatus* atinge a maturidade sexual por volta dos 12 meses de idade, durante essa fase os animais demonstram uma mudança comportamental, abandonando comportamento gregário para a formação de casais monogâmicos (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

O processo de formação de casais do *A. ocellatus* ainda não é muito bem elucidado pela literatura, sendo caracterizado como um aumento da agressividade e territorialismo entre os indivíduos (OLIVEIRA *et al.*, 2016). Na natureza esse processo se dá de forma natural devido ao cuidado biparental que a espécie apresenta com a prole, porém em cativeiro a formação de casais pode muitas vezes ocasionar em brigas e até óbito dos animais por diversos fatores como: altas densidades de estocagem e proporções inadequadas de machos e fêmeas (GURGEL; FREITAS, 1973).

Com preferência por águas lânticas, os reprodutores modificam o substrato com auxílio da boca formando ninhos onde é depositada a desova (SLOMAN *et al.*, 2006). Os ovos do *A. ocellatus* são adesivos, produzindo de 200 a 2000 ovos, que se aderem ao substrato do ninho eclodindo em torno de 3 a 4 dias, variando de acordo com a temperatura da água (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

Durante o processo de incubação dos ovos, os progenitores revezam em duas funções, enquanto um se mantém posicionado em cima da desova movimentando as nadadeiras peitorais para manter o fluxo de água nos embriões, o outro se mantém por perto com o objetivo de afugentar outros animais que possam preda a desova (FIGURA 1) (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

Figura 1- Casal de *A. ocellatus* pós desova, apresentando comportamento de controle parental para com a progênie.



Fonte: Do autor (2022).

Pós eclosão, as larvas são mantidas sob cuidado parental até a fase juvenil. Devido a sua desova ser caracterizada como parcelada, os casais de *A. ocellatus* podem reproduzir até 4 vezes durante o período reprodutivo, sendo que muitas vezes os reprodutores utilizam o mesmo ninho, mantendo o comportamento territorialista durante todo esse período. (SLOMAN *et al.*, 2006).

### **2.1.2. Dimorfismo sexual**

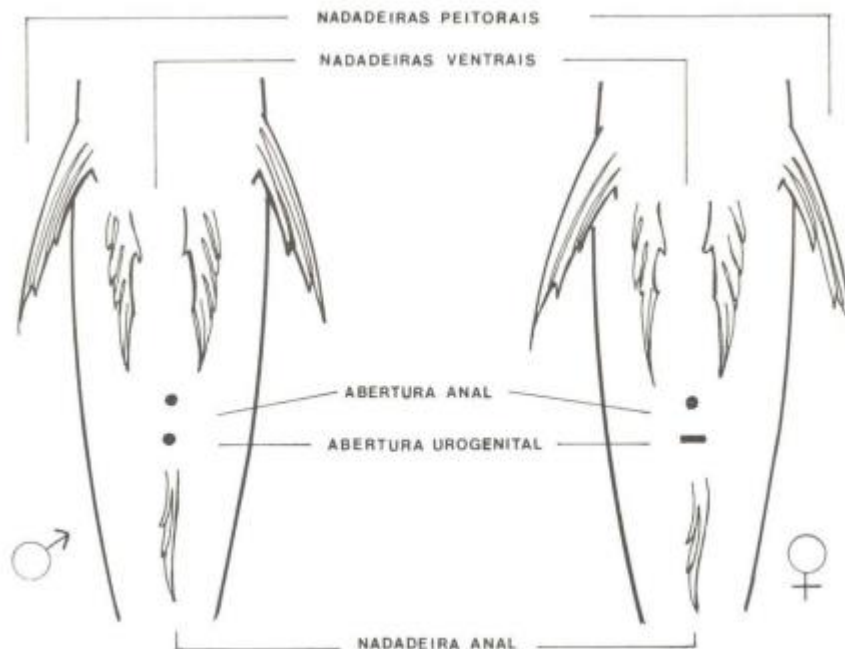
O dimorfismo sexual pode ser definido como a manifestação de divergências físicas entre machos e fêmeas, tais diferenças se manifestam a partir de ações hormonais na manifestação do fenótipo ou características sexuais secundárias (IGARASHI, 2016).

As características sexuais secundárias podem ser definidas como manifestações fenotípicas influenciadas pelo sexo dos animais. Desse modo a avaliação dos parâmetros morfométricos associados a machos e fêmeas, pode ser uma ferramenta útil da definição do sexo em peixes (NAVARRO *et al.*, 2006).

O *A. ocellatus* possui uma ampla variedade de colorações, indo do marrom ao vermelho e bronze. Durante o período reprodutivo as tonalidades tendem a se intensificar, principalmente o carmesim na base do opérculo e nas faixas verticais que se estendem do dorso ao ventre dos animais (FONTENELE, 1951).

Mesmo com a intensificação das colorações, a espécie não apresenta dimorfismo sexual aparente, principalmente na fase juvenil (CARVALHO *et al.*, 2017). Na cadeia produtiva é utilizada a sexagem manual a partir da avaliação das papilas urogenitais (FIGURA 2), nas quais segundo NEPOMUCENO, 1989 é possível a identificação do sexo pela conformação dessas estruturas.

Figura 2- Conformação da papila urogenital de *A. ocellatus*



Fonte: NEPOMUCENO (1989).

Entretanto, segundo CARVALHO *et al.*, 2017 o método de sexagem manual se mostrou subjetivo e inconclusivo em animais com 2 meses de idade, possuindo uma taxa de assertividade de 63% quando comparados à histologia.

O processo de sexagem dos animais é de suma importância na formação de plantéis de reprodutores, como no ciclídeo *Oreochromis niloticus* que apresenta dimorfismo sexual e existe na literatura proporções ideais de machos e fêmeas, simplificando assim a reprodução na espécie (IGARASHI, 2016). Quando as proporções de machos e fêmeas se mostram inadequadas, ocorrem interações de dominância e brigas entre os animais, comportamentos

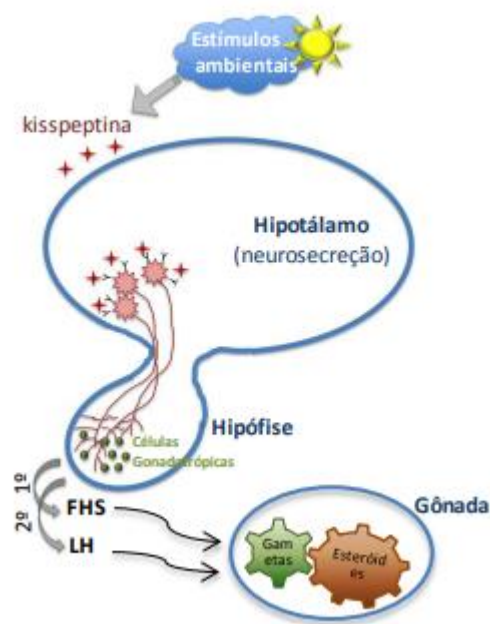
esses prejudiciais à saúde dos animais e ao processo de reprodução em cativeiro (IGARASHI, 2016).

## 2.2. Endocrinologia reprodutiva em peixes.

Durante o período reprodutivo, os animais sofrem uma variação no sistema endócrino a partir do hipotálamo, essa glândula localizada no SNC é influenciada por fatores externos como fotoperíodo e temperatura, secretando o hormônio liberador gonadotrofinas (GnRH) (PANKHURST, 2008).

O GnRH por sua vez, atua na hipófise estimulando a produção das gonadotrofinas, o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo estimulante (FSH) (FIGURA 3). O aumento sérico das gonadotrofinas estimula a maturação das gônadas e conseqüentemente o aumento dos níveis séricos de esteroides sexuais como a testosterona (T) e o estradiol (E2) (MOLES *et al.*, 2007).

Figura 3- Esquematização do eixo Hipotálamo-Hipófise-Gônada



Fonte: Almeida (2013).

As gonadotrofinas FSH e LH, possuem como principal função o estímulo da maturação de gametas, sendo o FSH principal modulador das fases iniciais da gametogênese e o LH como principal modulador das fases finais da gametogênese (ALMEIDA, 2013).



As gônadas masculinas e femininas apresentam sítios de ações para as gonadotrofinas controlando o processo reprodutivo em duas fases distintas: a esteroidogênese, caracterizada pela produção de esteroides sexuais e a gametogênese, caracterizada pela produção de gametas (ZOHAR, 2021).

A esteroidogênese ocorre a partir das interações entre as gonadotrofinas e sítios de ligação específicos como as células foliculares do ovário em fêmeas e células de Leydig nos testículos dos machos (PANKHURST, 2008), os produtos dessas interações são os esteroides sexuais que podem ser definidos em três categorias, sendo elas os progestágenos, estrógenos e andrógenos. Tendo função primordial no controle do eixo endócrino tanto em machos quanto em fêmeas (ZOHAR, 2021).

Os esteroides sexuais apresentam-se em diferentes concentrações séricas no plasma dos peixes (ZOHAR, 2021; ALMEIDA, 2013; PANKHURST, 2008), sendo influenciados principalmente pela fase do processo reprodutivo em que o animal se encontra e pelo sexo, uma vez que devido às suas interações com as gônadas masculinas e femininas, os hormônios apresentem *feedbacks* positivos e negativos entre eles (ZOHAR, 2021). Como a conversão de andrógenos como a testosterona (T) em estrógenos como o estradiol (E2) tendo importância fundamental na maturação final ovocitária em fêmeas (BOBE *et al.*, 2006).

### **2.2.1. Progestágenos em peixes.**

Na reprodução dos peixes, os progestágenos apresentam funções diretamente ligadas à maturação de gametas. Destaca-se entre os progestágenos a 17,20 $\beta$ ,21-trihidroxipregnenolona (20 $\beta$ S) com o maior potencial de maturação (PANKHURST, 2008).

Durante a fase final da maturação ovocitária, os níveis séricos da 20 $\beta$ S se encontram elevados devido à diminuição na expressão da enzima aromatase P450, sendo essa enzima responsável pela conversão da T em E2 (BOBE *et al.*, 2006). Essa interação endócrina possibilita a maturação final dos ovócitos viabilizando a liberação dos ovócitos maduros no oviduto e posterior desova (GOETZ; GARCYNISKI, 1997).

Nos machos a 20 $\beta$ S também apresenta uma importante função durante a fase de maturação final, em resposta ao aumento do LH nesse período, a via androgênica sofre uma alteração, diminuindo a produção dos andrógenos como a T e aumentando a síntese de 20 $\beta$ S (PANKHURST, 2008). Esse processo viabiliza a maturação final dos espermatócitos e a liberação nos ductos seminiais, além de induzir alterações no pH e fluidez do plasma seminal

que desencadeiam o processo de ativação da motilidade espermática (SCOTT; SUMPTER; STACEY, 2010).

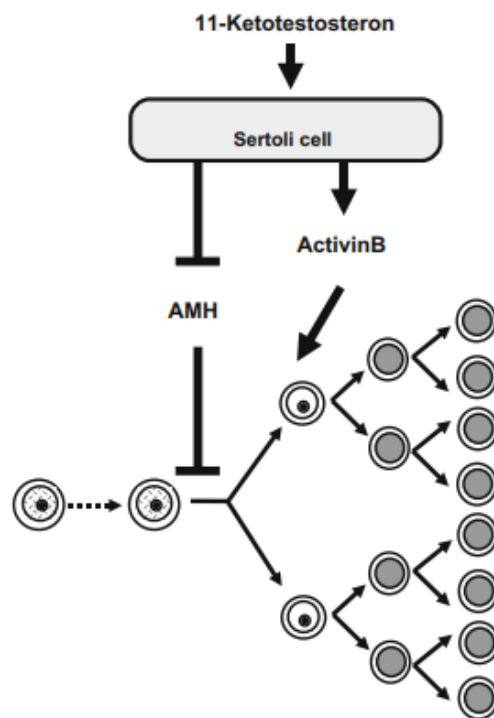
### **2.2.2. Andrógenos em peixes**

Os hormônios androgênicos possuem como principal função, regular as características reprodutivas tanto em machos quanto em fêmeas (PANKHURST, 2008). Destacam-se nesse grupo a 11-cetotestosterona (11-KT) e a testosterona (T) como os principais hormônios dessa classe (ZOHAR, 2021).

Apesar de serem comumente associados ao sexo masculino, os andrógenos apresentam uma importante função de substrato para a conversão de T em E2 sob a ação da enzima aromatase P450 (ZOHAR, 2021). Além do aporte de substrato, a 11-KT apresenta a função de estimular o desenvolvimento de ovócitos na maturação inicial, como foi constatado no trabalho de LOKMAN *et al.*, 2007, onde houve um crescimento e desenvolvimento de ovócitos expostos *in vitro* à 11-KT.

Nos machos os andrógenos possuem funções importantes no desenvolvimento de características sexuais secundárias e modulação do comportamento reprodutivo (ALMEIDA, 2013). Além dessa função, os andrógenos apresentam sítios de ligação nas células de Sertoli localizadas nos testículos, sendo responsáveis pela sintetização do hormônio anti-mulleriano, atuando nas fases iniciais da espermatogênese como a diferenciação de espermatogônias em espermatócitos (FIGURA 4) (PANKHURST, 2008; SCHULZ *et al.*, 2010).

Figura 4- Esquema endócrino da interação entre a 11-Cetotestosterona e a maturação espermática.



Fonte: Schulz (2010).

### 2.2.3. Estrógenos em peixes.

Os estrógenos possuem funções reprodutivas em ambos os sexos, porém nas fêmeas possuem papel chave na reprodução, como a regulação do crescimento e desenvolvimento dos ovócitos, desenvolvimento de caracteres sexuais secundários e estimula a síntese de vitelogenina hepática e proteínas da membrana ovocitária (TOKARZ *et al.*, 2015).

O Estradiol (E2) se apresenta como principal estrógeno em fêmeas, liberado pelas células de Leydig nos ovários em resposta ao estímulo realizado pelo FSH e possui sítios de ligação no fígado e nos ovários (ZOHAR, 2021). Durante as fases iniciais de maturação ovocitária o E2 estimula as primeiras divisões mitóticas em ovogônias, além de estimular a síntese de alvéolos corticais nos ovócitos (PANKHURST, 2008).

Além da função direta nos gametas, o E2 apresenta a característica de estimular a vitelogênese a partir da interação com os hepatócitos, induzindo uma maior produção de vitelogenina (Vtg) (OKUMURA *et al.*, 2002). Considerada a principal fosfolipoproteína na formação do vitelo, estrutura essa indispensável no aporte nutricional para o desenvolvimento embrionário (PANKHURST, 2008).

Outra importante interação hepática do E2 está na estimulação de precursores das proteínas estruturais ZP, responsáveis pelo desenvolvimento da zona pelúcida nos ovócitos e posterior formação do córion nos embriões (ZOHAR, 2021).

Nos machos, os estrógenos também possuem funções fisiológicas na reprodução. Apesar das concentrações séricas de E2 normalmente se encontrarem baixas nas primeiras fases da espermatogênese, o E2 apresenta a função de estimular a renovação de células-tronco espermatogônicas, e possui importantes relações de feedbacks negativos e positivos com outros hormônios ligados a esteroidogênese, auxiliando no controle endócrino da reprodução (SCHULZ *et al.*, 2010).

### **2.3. Técnicas de sexagem em peixes.**

A sexagem nos peixes pode ser definida como a identificação do sexo, manejo esse que pode ser concluído a partir de diversas metodologias de acordo com a fase de vida e espécie a ser trabalhada.

#### **2.3.1. Sexagem manual ou fenotípica.**

Esta técnica se caracteriza pela identificação de padrões morfométricos relacionados com o sexo dos animais. Em espécies que apresentam características sexuais bem definidas essa técnica se mostra útil e economicamente viável, já que por meio da observação de um profissional treinado é possível fazer a diferenciação do sexo (CARVALHO *et al.*, 2017).

Espécies de produção como a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) apresentam dimorfismo sexual, uma vez que sua maturação sexual ocorre de maneira precoce, em torno de 3 a 4 meses de vida. A papila urogenital desta espécie se diferencia de acordo com o sexo do animal, sendo possível a separação entre machos e fêmeas em sistemas de recria e engorda, no qual são utilizadas populações masculinas, e principalmente a seleção de reprodutores a serem mantidos em proporções adequadas para maior produção de embriões (IGARASHI, 2016).

Algumas espécies ornamentais como o peixe betta (*Betta splendens*) apresentam dimorfismo sexual marcante quanto à sua coloração e alongamento das nadadeiras caudal, anal e dorsal nos machos em comparação com as fêmeas (JUSTUS *et al.*, 2018). Essa espécie possui um comportamento reprodutivo territorialista e agressivo, o que se faz necessária a segregação entre os animais por meio da sexagem manual, evitando assim brigas e até óbitos entre os reprodutores (JUSTUS *et al.*, 2018).

Entretanto, em espécies sem dimorfismo sexual esta técnica se torna muitas vezes imprecisa e subjetiva, uma vez que a baixa expressão ou ausência de características fenotípicas ligadas ao sexo não permitem uma diferenciação precisa entre machos e fêmeas (CARVALHO *et al.*, 2017).

O *A. ocellatus* apresenta divergências na literatura quanto a presença ou ausência de dimorfismo sexual. NEPOMUCENO (1989) afirmou existir uma diferenciação no formato da papila urogenital entre machos e fêmeas, entretanto esta técnica apresenta resultados conflitantes quando testada em outros trabalhos que apresentaram resultados imprecisos na determinação sexual da espécie (CARVALHO *et al.*, 2017).

Existem diversos trabalhos que utilizaram medidas morfométricas e padrões de crescimento para avaliar características como rendimento de carcaça e manifestações fenotípicas em diferentes linhagens de peixe (SANTOS, 2004; RODRIGUES, 2010). Algumas espécies como o tambaqui (*Colossoma macropomum*) apresenta diferença no padrão de crescimento influenciado pelo sexo, na qual as fêmeas possuem uma taxa de crescimento de 9,34 gramas por dia, enquanto machos manifestam 8,66 gramas por dia (MELLO *et al.*, 2015).

As características sexuais secundárias podem ser definidas como manifestações fenotípicas influenciadas pelo sexo dos animais. Desse modo, a avaliação dos parâmetros morfométricos associados a machos e fêmeas, pode ser uma ferramenta útil da definição do sexo em peixes (NAVARRO *et al.*, 2006).

### **2.3.2. Sexagem por níveis séricos de esteróides sexuais.**

Os níveis séricos dos esteróides sexuais já vem sendo um método de sexagem amplamente estudado e discutido no meio científico, espécies como o Pirarucu (*Arapaima gigas*) (CHU-KOO *et al.*, 2009), Salmão (*Salmo salar*) (POTTINGER *et al.*, 2005) e até o próprio Oscar (*Astronotus ocellatus*) (CARVALHO *et al.*, 2017).

Apesar do eixo endócrino dos peixes apresentar variações séricas dos esteróides sexuais como a 11-KT, T e E2, foi possível observar um padrão nas concentrações desses hormônios de acordo com o sexo dos animais (CHU-KOO *et al.*, 2008; POTTINGER *et al.*, 2005; NAZERI *et al.*, 2014).

Segundo CHU-KOO *et al.*, 2008 os níveis plasmáticos de E2 em fêmeas adultas de *A. gigas* variaram de 14,0 a 637,0 pg/ml enquanto fêmeas juvenis apresentaram uma variação de

2,4 a 18,0 pg/ml, o que exemplifica a variação nas concentrações séricas do E2 em animais maduros e imaturos sexualmente.

A dosagem desses hormônios pode ser obtida através de ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA) (CHU-KOO *et al.*, 2008) ou radioimunoensaios (KOHN *et al.*, 2013). Os andrógenos (11-KT e T) são os principais esteroides sexuais utilizados na caracterização de machos, bem como o estrógeno E2 é considerado o principal esteroide sexual utilizado na caracterização de fêmeas apresentando uma maior concentração sérica em machos e fêmeas respectivamente (CHU-KOO *et al.*, 2008; POTTINGER *et al.*, 2005; NAZERI *et al.*, 2014; CARVALHO *et al.*, 2017).

Apesar dos hormônios, quando analisados individualmente, apresentarem informações importantes para a definição do sexo, a razão entre eles (T/E2) se mostra um método mais fidedigno (NAZERI *et al.*, 2014), uma vez que durante a maturação sexual ou até mesmo no ciclo reprodutivo os níveis séricos desses hormônios apresentam variações de acordo com a sua ação no organismo (ZOHAR, 2021).

Segundo CARVALHO *et al.*, 2017 a técnica apresentou uma diferença entre T/E2 correlacionados a machos e fêmeas, uma vez que se observou uma média de 0,70 e 0,24 respectivamente em *A. ocellatus* com 6 meses de vida. A partir dos resultados, foi utilizada a média como linha de corte (0,45) na qual animais com T/E2 superiores a 0,45 eram caracterizados como machos e resultados abaixo de 0,45 eram caracterizados como fêmeas, o que resultou em 80,56% de eficácia na sexagem.

Desse modo se torna imprescindível à técnica a determinação do estágio de maturação gonadal que os animais se encontram, apesar de ser um método oneroso devido aos kits de ELISA ou RIA, a determinação do sexo pode intensificar o processo de reprodução em cativeiro principalmente em espécies que não apresentam dimorfismo sexual, uma vez que definidos os sexos dos reprodutores, o produtor consegue exercer um melhor controle zootécnico do seu plantel de reprodutores (FEIST *et al.*, 2004; CARVALHO *et al.*, 2017).

### **2.3.3. Sexagem a partir de exames de imagem.**

Na aquicultura, os exames de imagem apresentam uma importância considerável na determinação do sexo em peixes, uma vez que a partir da visualização da morfologia gonadal é possível caracterizar ovários e testículos (FROST *et al.*, 2014; MANSUR *et al.*, 2021).

Dentre as diversas técnicas de diagnóstico por imagem se destaca a ultrassonografia por ser uma técnica com baixo grau de invasividade (FROST *et al.*, 2014). A técnica já se mostrou

efetiva em espécies nativas como o surubim (*Pseudoplatystoma coruscans*) e a tuvira (*Gymnotus sp.*) apresentando 100% e 98% respectivamente de acurácia na determinação do sexo em indivíduos maduros sexualmente (CREPALDI *et al.*, 2007).

A ultrassonografia utiliza a captação de sons refletidos ou ecos ao passarem por tecidos com diferentes impedâncias. A partir de uma *probe*, os sons são convertidos em imagem no aparelho ultrassonográfico possibilitando a diferenciação de estruturas de tecidos moles como os testículos e ovários (GODDART, 1995).

As imagens ultrassonográficas utilizam da ecogenicidade para a diferenciação do tecido avaliado, proporcionando imagens variando do preto ao branco passando por tons de cinza. Essas diferenças na tonalidade são denominadas imagens hiperecoicas, quando se exibem tons mais claros, e hipoecoicas, quando se exibem tons mais escuros (GODDART, 1995).

Tanto os tecidos ovarianos quanto testiculares, possuem característica hipoecóica o que resulta em uma imagem escura, entretanto substâncias lipídicas como componentes do vitelo e a membrana ovocitária composta por fosfolipídeos, produzem uma imagem hiperecóica em relação a tecidos aquosos (FROST *et al.*, 2014). Portanto, os ovócitos emitem uma silhueta hiperecóica quando se encontram em níveis avançados de maturação, característica utilizada para a identificação de ovários (CREPALDI *et al.*, 2007; FROST *et al.*, 2014)

Outra técnica de imagem utilizada na sexagem de peixes, a videoceloscopia gonadal apresenta altos valores de acurácia na predição do sexo (MANSUR *et al.*, 2021). Entretanto, ao contrário da ultrassonografia, apresenta um alto grau de invasividade, uma vez que para sua realização, se faz necessário um procedimento cirúrgico denominado celiotomia, o qual consiste em uma incisão da cavidade abdominal, para posterior inserção do endoscópio na cavidade celomática visando a visualização das gônadas (MANSUR *et al.*, 2021).

#### **2.4. Histologia gonadal**

O corte histológico das gônadas é o método padrão ouro para identificação sexual nos peixes, uma vez que a partir da avaliação por microscopia permite identificar estruturas anatômicas correspondentes a ovários ou testículos.

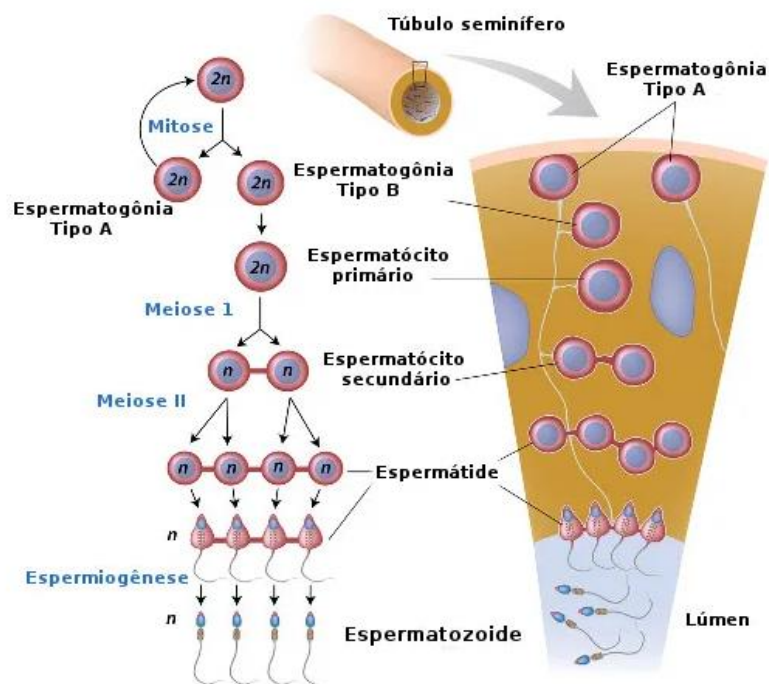
Além da identificação do sexo, a avaliação histológica das gônadas permite avaliar o grau de maturação gonadal dos peixes uma vez que tanto no processo de espermatogênese

quanto na ovogênese as células se diferenciam para formar os gametas (SCHULZ *et al.*, 2010; EMEL'YANOVA & PAVLOV 2022; MENEZES *et al.*, 2000).

Na espermatogênese (FIGURA 5), as espermatogônias sofrem um processo de mitose dando origem aos espermatócitos primários, sendo essas células diplóides. Na próxima etapa da espermatogênese os espermatócitos primários sofrem a primeira meiose, gerando assim os espermatócitos secundários, com essa divisão do material genético, as células se tornam haplóides (SCHULZ *et al.*, 2010).

Os espermatócitos secundários sofrem uma segunda mitose, na qual cada célula se divide em duas células com o mesmo número de cromossomos, chamadas espermatídes. Essas células, já próximas do lúmen seminífero, começam a se diferenciar morfológicamente para a formação do gameta masculino final, o qual será lançado nos ductos seminíferos, recebendo a denominação de espermatozoides (SCHULZ *et al.*, 2010).

Figura 5-Esquema ilustrado de espermatogênese



Fonte: Retirado de <https://www.biologianet.com> em 13/10/2022.

A presença de espermatozoides nos ductos seminíferos é um grande indicativo de estágio de maturação gonadal avançado em machos, bem como ausência dos mesmos



associados com ductos seminíferos pouco definidos, podem ser considerados animais imaturos sexualmente (SCHULZ *et al.*, 2010).

A morfologia ovariana se distingue da testicular principalmente pela presença de estruturas arredondadas de diferentes tamanhos envoltas por tecido conjuntivo denominados ovócitos. Assim como na espermatogênese, a ovogênese apresenta diferenciações das células primordiais, denominadas ovogônias, em seis fases de ovócitos: Cromatina-nucléolo (Fase 1), Perinucleolar (Fase 2), Alvéolo-cortical (Fase 3), Vitelogênico (Fase 4) Pós-vitelogênico (Fase 5) e Atrésico (Fase 6) (EMEL'YANOVA & PAVLOV 2022; MENEZES *et al.*, 2000 ).

A prevalência das diferentes fases ovocitárias permitem a avaliação do grau de maturação gonadal das fêmeas, uma vez que fêmeas imaturas apresentarão, em sua maioria, ovócitos de fases 1,2 ou 3. Por outro lado, fêmeas maduras tendem a apresentar ovócitos em fases 4,5 ou 6, na maioria dos exemplares avaliados (MENEZES *et al.*, 2000).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

O objetivo geral deste estudo é avaliar os métodos para identificação do sexo nessa espécie por meio de dosagem de esteroides sexuais, ultrassonografia gonadal, avaliação morfométrica e histologia gonadal em *A. ocellatus* com 12 meses de vida.

#### **3.2. Objetivos específicos.**

- Comparar as diferentes técnicas de sexagem de acordo com a sua eficiência na espécie;
- Identificar padrões morfométricos de dimorfismo sexual entre machos e fêmeas;
- Comparar o grau de maturação gonadal dos animais com os níveis séricos dos esteróides sexuais;

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Declaração de ética.

Todos os procedimentos experimentais deste estudo foram conduzidos em estrita conformidade com o Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Lavras- UFLA, Lavras, MG, Brasil, sob o nº 051/21 e atende às diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), seguindo as diretrizes para o cuidado e uso de animais de laboratório.

### 4.2. Animais e estrutura.

Para a realização deste trabalho, foram utilizados 20 exemplares de *A. ocellatus* com 12 meses de idade, com peso médio  $188 \pm 48,8$  g. e comprimento total médio de  $158 \pm 15,3$  mm advindos de reprodução natural no Biotério Central da UFLA.

O período pré-experimental consistiu na individualização dos animais em aquários de vidro com 10 L de capacidade inseridos em um sistema de recirculação de água com temperatura controlada a 26 °C. Os parâmetros limnológicos como pH e amônia tóxica, foram avaliados semanalmente com o auxílio de kits colorimétricos (Labcon Test), durante 30 dias, visando a ambientação dos animais no sistema.

A alimentação dos animais era realizada duas vezes ao dia, às 8:00 e 16:00 horas, *ad libitum* a partir de ração com 32 % de proteína bruta. Os aquários foram sifonados duas vezes ao dia pós alimentação, para remoção de fezes e restos de ração. O fotoperíodo foi mantido a 12 h de luz e 12 h de escuridão.

### 4.3. Coleta de sangue e obtenção do plasma.

As amostras de sangue, para obtenção do plasma, foram coletadas da veia caudal utilizando seringas de 5,0 ml com EDTA a 10%. Para tal, os animais foram retirados cuidadosamente das caixas d'água com o auxílio de puçá e, em seguida, foram imersos em aquário contendo solução anestésica de benzocaína (190 mg/L para sedação total) (CARVALHO *et al.*, 2017) e posterior coleta de sangue.

As amostras de sangue foram então transferidas para eppendorfs e centrifugadas a 14.000 rpm durante 5 minutos para a separação do plasma sanguíneo. Em seguida, as amostras de plasma foram armazenadas a -80 °C, em ultra freezer, para posteriores análises.

#### **4.4. Dosagem de esteroides sexuais.**

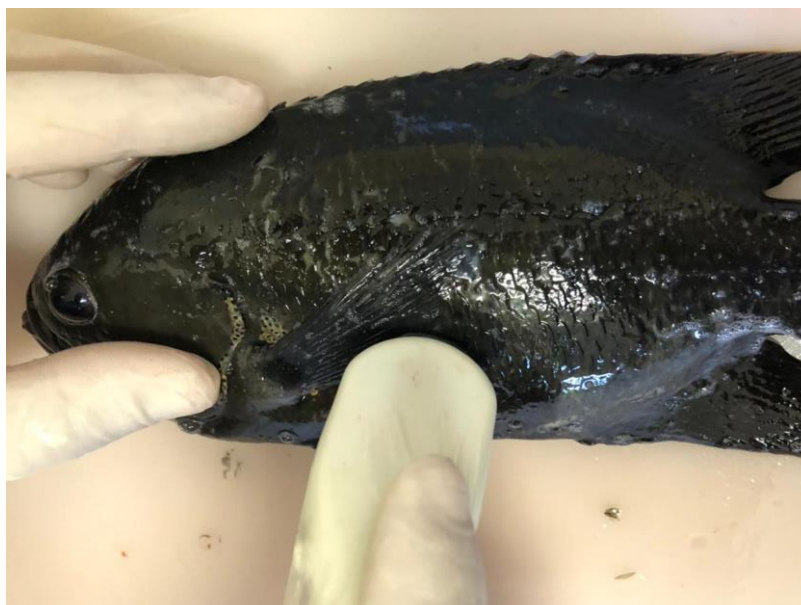
A mensuração dos esteroides sexuais foi obtida a partir do método ELISA utilizando kits comerciais (Estradiol (E2) – USA 9140; Testosterona Total – USA 8505) seguindo as orientações do fabricante.

Após leitura de absorvância em espectrofotômetro os valores foram convertidos obtendo-se as concentrações plasmáticas dos hormônios em nanograma/mililitro.

#### **4.5. Avaliação ultrassonográfica das gônadas**

Após a coleta do sangue com os animais ainda sedados, foi realizada a avaliação ultrassonográfica das gônadas com o auxílio de um ultrassom (ALOKA SSD-500). As imagens foram obtidas a partir da padronização do ponto de contato da probe paralela à nadadeira peitoral, região anatômica onde estão presentes as gônadas na espécie (FIGURA 6).

Figura 6- Posicionamento da probe para avaliação ultrassonográfica.



Fonte: Do autor (2022).

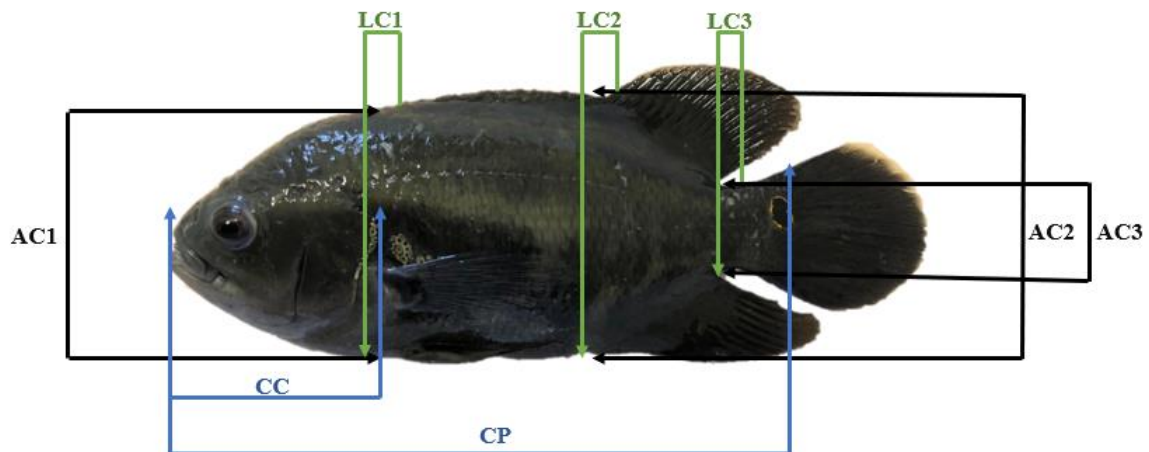
As imagens foram salvas para posterior avaliação de características ultrassonográficas da morfologia gonadal e possíveis diferenciações entre os sexos, bem como para verificação dos estágios de maturação gonadal.

#### 4.6. Avaliação morfométrica.

Com o auxílio de uma balança digital, os animais foram pesados e em seguida, com o auxílio de um paquímetro, foram realizadas as medidas de pontos específicos nos animais (FIGURA 7), sendo eles:

- Peso dos animais (P), mensurado a partir de balança digital.
- Comprimento da cabeça (CC), compreendido entre a extremidade anterior da cabeça e o bordo caudal do opérculo.
- Comprimento padrão (CP), compreendido entre a extremidade anterior da cabeça e o menor perímetro do pedúnculo (inserção da nadadeira caudal)
- Alturas do corpo medidas à frente do 1º raio das nadadeiras dorsal (AC1) e anal (AC2) e na menor circunferência do pedúnculo (AC3)
- Larguras do corpo tomadas na região do 1º raio das nadadeiras dorsal (LC1) e anal (LC2) e na menor circunferência do pedúnculo (LC3)

Figura 7- Pontos anatômicos utilizados na avaliação morfométrica



Fonte: Do autor (2022).

A partir dos dados obtidos, foi realizada a razão entre eles e correlação entre animais machos e fêmeas.

#### 4.7. Coleta de Gônadas e histologia.

Os animais foram eutanasiados por aprofundamento do plano anestésico via imersão em solução de benzocaína (250 mg/L) para coleta das gônadas (CARVALHO *et al.*, 2017).

Com o auxílio de uma tesoura e bisturi, foi realizada uma incisão a partir do orifício anal até a porção final da nadadeira peitoral, as costelas e musculatura da região foram removidas expondo a cavidade celomática e os órgãos (FIGURA 8).

As gônadas ficam alojadas na porção dorsal da cavidade celomática. Com o auxílio de uma pinça anatômica, as gônadas foram removidas e fixadas em recipientes contendo solução de Bouin por 24 h. Após esse tempo, as gônadas foram transferidas para uma solução de álcool etílico 70%.

Figura 8- Exemplar de *A. ocellatus* com a cavidade celomática exposta.



Fonte: Do autor (2022).

#### 4.8. Confeção de lâminas histológicas e avaliação de estágio de maturação gonadal.

As gônadas em cassetes histológicos foram desidratadas e diafanizadas a partir do seguinte procedimento histotécnico: banho 1 e 2 em álcool 70%, banho 3 em álcool 80%, banho 4 em álcool 85%, banho 5 em álcool 90%, banho 6 em álcool 95%, banho 7 e 8 em álcool PA,

sendo 20 minutos cada, banho 9 e 10 em xilol por 30 minutos e, em seguida, passagem pela parafina por 80 minutos.

Após esses procedimentos, as amostras passaram para o processo de inclusão em blocos de parafina em estação de inclusão de parafina aquecida. Após a etapa de processamento, foram realizados cortes seriados longitudinalmente em micrótomo. A coloração utilizada foi a Hematoxilina-Eosina (HE). Todo o procedimento histológico padrão e a coloração foram feitos no setor de Histologia da Universidade Federal de Lavras.

A partir da avaliação macroscópica das gônadas e posterior confirmação por histologia, os animais foram identificados como machos ou fêmeas. Em seguida foram classificados de acordo com o grau de maturação gonadal, utilizando o método de MENEZES *et al.*, 2000 (Tabela 1).

Tabela 1- Características microscópicas do grau de maturação gonadal em *A. ocellatus*.

Estágio	Características microscópicas	
	Macho	Fêmea
Imaturo	Túbulos seminíferos reduzidos, com presença de espermatogônias secundárias.	Estrutura organizada, com predominância de oócitos nas fases I e II
Maturação inicial	Presença de todos os tipos celulares, com muitas espermatogônias, espermatócitos e espermatídes. Poucos espermatozoides presentes no lúmen.	Prevalência de oócitos na fase II e poucos oócitos na fase III.
Maturação final	Presença de todos os tipos celulares com predominância de espermatídes. Maior quantidade de espermatozoides no lúmen.	Presença de grande número de ovócitos II, poucos oócitos nas fases III e IV
Maduro	Poucas espermatídes e grande número de espermatozoides no lúmen (ocupando > 70% do lúmen)	Presença de muitos oócitos na fase II, poucos oócitos nas fases I e IV e muitos oócitos na fase V.
Desovado e Esvaziado	Lúmens vazios, com parede muito fina e com poucos espermatídes e espermatozoides.	Presença de grande número de folículos pós-ovulatórios. Muitos oócitos nas fases I e II
Em repouso	Presença de poucas espermatogônias e muitos cistos com espermatócitos e espermatídes.	Estrutura desorganizada em comparação com o estágio imaturo, com poucos oócitos na fase I e muitos oócitos na fase II.

Fonte: Adaptado de Menezes (2000).

#### 4.9. Análises estatísticas

A partir dados obtidos pela morfometria, foi realizada então a razão entre os parâmetros e correlação ao sexo, os dados foram testados quanto à normalidade (Shapiro Wilk) e significância (teste T para amostras independentes e teste de Mann Whitney). Buscando uma correlação fenotípica ( $p < 0,05$ ) entre os dados morfométricos e o sexo dos animais.

Para as análises hormonais os dados foram submetidos a teste de normalidade, homocedasticidade e verificadas as pressuposições, os dados foram submetidos à análise de variância e teste T.



## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.**

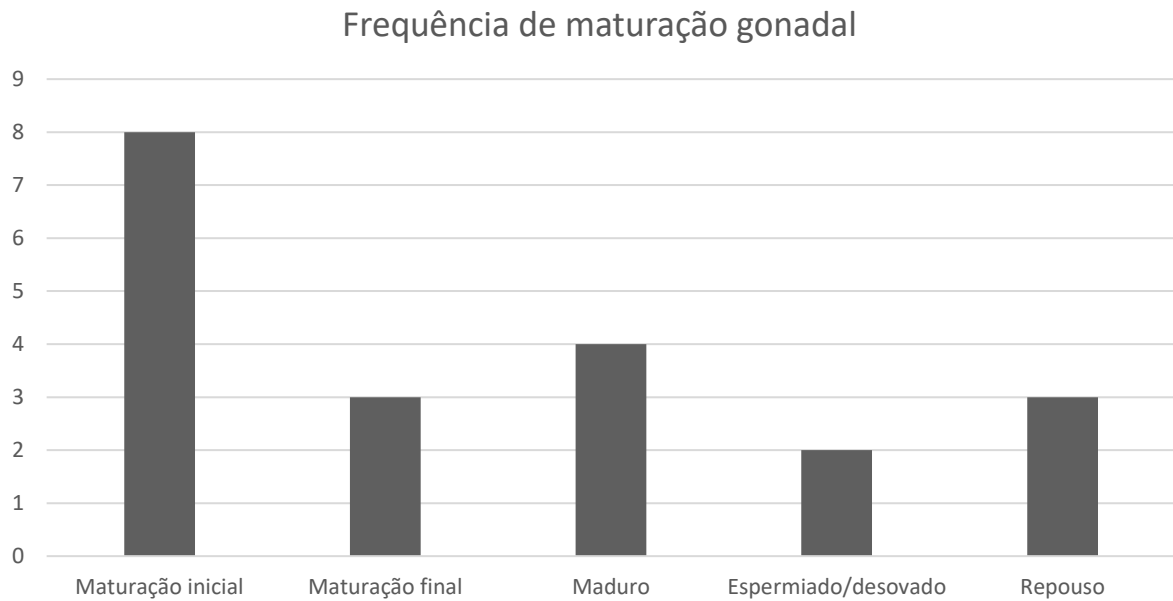
### **5.1. Sexagem dos animais por histologia gonadal.**

Após avaliação da morfologia gonadal no momento da coleta e confirmação a partir das lâminas histológicas, foi constatada a presença de 13 fêmeas e 7 machos dentre os 20 animais avaliados. Apesar de possuírem a mesma idade, foi possível observar diferentes estágios de maturação gonadal entre eles.

Dentre os animais avaliados, nenhum foi classificado como imaturo. Devido à idade dos animais ser compatível com a fase de maturação sexual preconizada pela espécie (12 meses de vida) foi possível observar que durante essa fase da vida, os exemplares já estavam aptos para reprodução.

O grau de maturação gonadal com maior frequência foi maturação inicial (40%) seguido de animais maduros (20%), as fases de maturação: repouso, espermiado/desovado e maturação final apresentaram frequência de 15%, 10% e 15% respectivamente entre os animais avaliados (FIGURA 9).

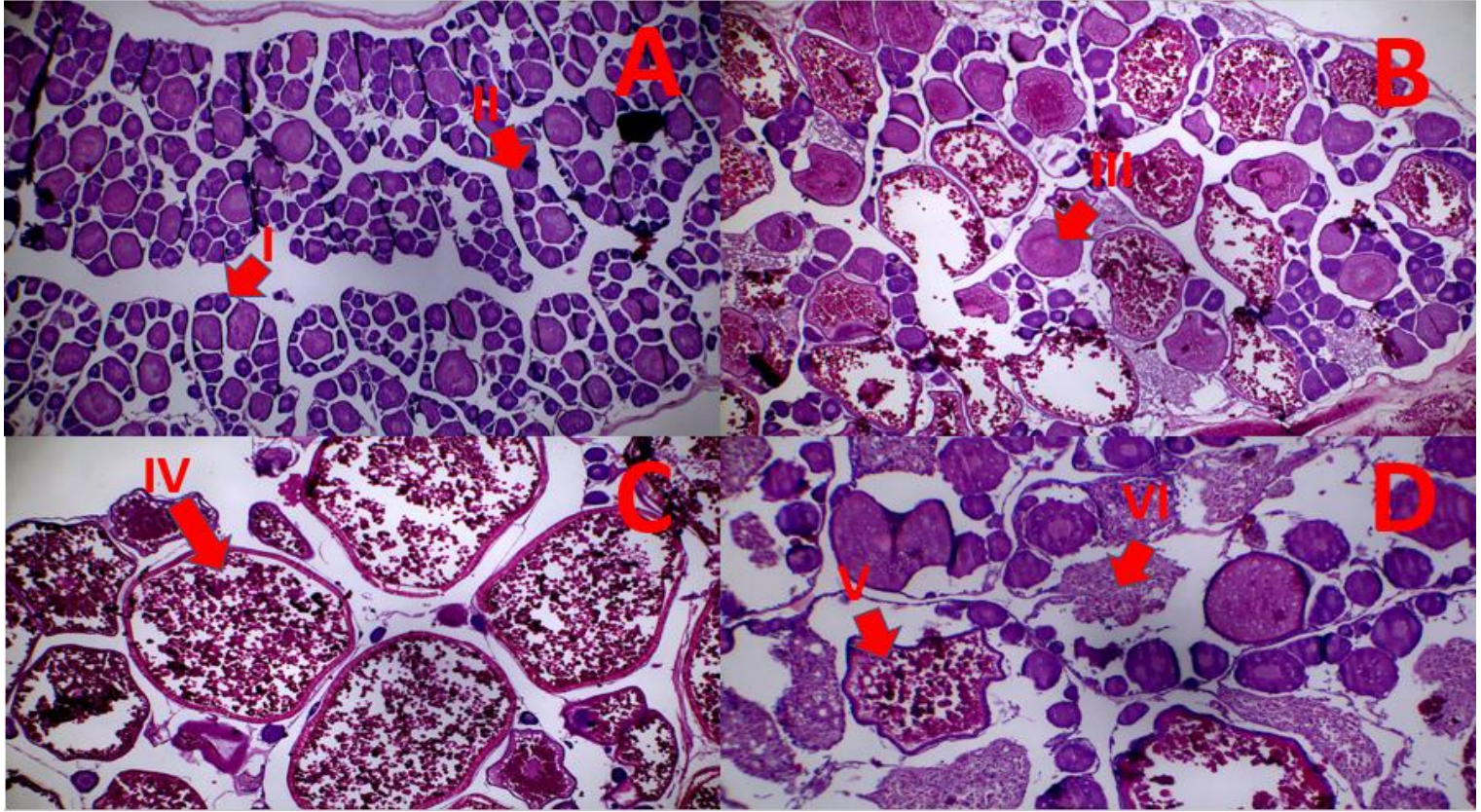
Figura 9- Gráfico de frequência dos animais identificados em seus respectivos estágios de maturação gonadal.



Fonte: Do autor (2022).

Foi possível observar nas fêmeas, diferentes fases de maturação ovocitária (FIGURA 10), bem como as concentrações de cada fase no campo óptico, possibilitando a caracterização do grau de maturação gonadal em cada animal.

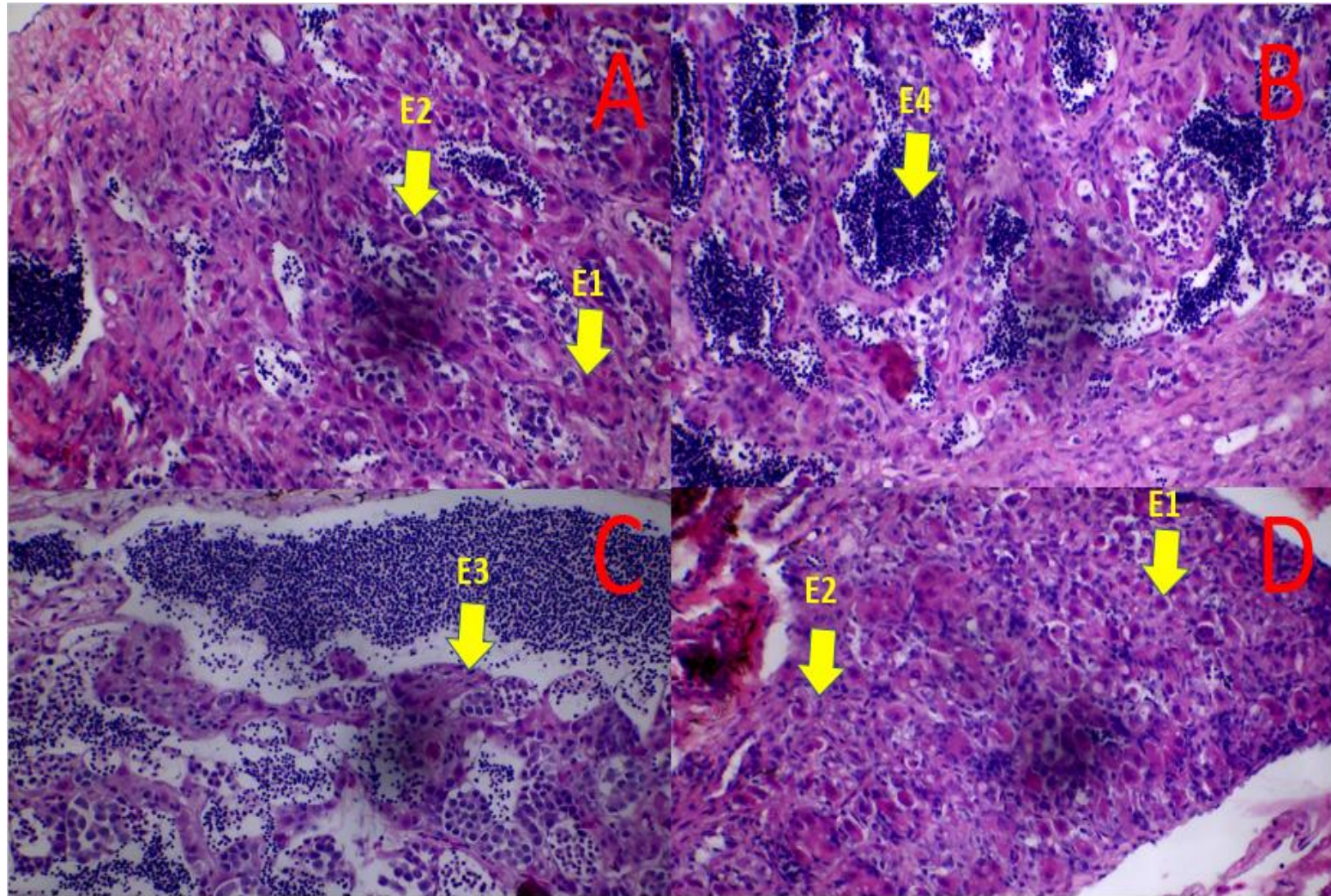
Figura 10- Cortes histológicos de ovários em aumento 4X caracterizados em Maturação inicial (A), Maturação Final (B), Maduro (C) e em Repouso (D). Apresentando ovócitos em Fase 1 (I), Fase 2 (II), Fase 3 (III), Fase 4(IV), Fase 5 (V) e Fase 6 (VI).



Fonte: Do autor (2022).

Nos machos, as estruturas e células que compõe a anatomia testicular também foram identificadas, uma vez que nos cortes histológicos apresentaram maiores quantidades de espermatozoides nos ductos seminíferos em animais sexualmente maduros. Em contrapartida, nos animais em fases iniciais de maturação gonadal, a quantidade majoritária de células eram espermatócitos e espermátides com menor quantidade de espermatozoides no lúmen seminal (FIGURA 11).

Figura 11- Cortes histológicos em aumento de 40x de testículo de *A. ocellatus* em Maturação inicial (Foto A) Maturação Final (Foto B) Maduro (Foto C) e em Repouso (Foto D). Apresentando Espermatócitos Primários (E1), Espermatócitos Secundários (E2), Espermátides (E3) e Espermatozoides (E4).



Fonte: Do autor (2022).

Tais resultados apontam que existem fatores individuais na maturação gonadal da espécie, uma vez que mesmo estando na mesma faixa etária e nas mesmas condições de cultivo, houve uma divergência nos estágios de maturação gonadal.

### 5.3. Morfometria.

Os dados morfométricos obtidos foram correlacionados de acordo com o sexo dos animais, entretanto não foi observada significância estatística em nenhuma das razões testadas ( $p > 0,05$ ) (Tabela 2).

Os resultados obtidos com essa análise corroboram com a ausência de dimorfismo sexual apontado para a espécie (CARVALHO *et al.*, 2017), uma vez que nessa fase de vida os animais não apresentaram diferenças de crescimento nos pontos mensurados influenciados pelo sexo, como acontece em espécies como o *Colossoma macropomum*, espécie amazônica em que as taxas de crescimento em fêmeas são maiores do que em machos (MELLO *et al.*, 2015).

Tabela 2- Razões morfométricas entre machos e fêmeas de *A. ocellatus*.

Razões Morfométricas		
Variável	Fêmea	Macho
CC/CP	0.331 ± 0.021	0.327 ± 0.008
AC1/CP	0.402 ± 0.022	0.401 ± 0.009
AC2/CP	0.436 ± 0.025	0.437 ± 0.021
AC3/CP	0.116 ± 0.009	0.119 ± 0.010
LC1/CP	0.163 ± 0.009	0.158 ± 0.012
LC2/CP	0.106 ± 0.018	0.104 ± 0.016
LC3/CP	0.028 ± 0.006	0.027 ± 0.003
AC1/LC1	2.468 ± 0.095	2.549 ± 0.178
AC1/LC2	3.909 ± 0.674	3.934 ± 0.618
AC1/LC3	14.885 ± 3.535	15.114 ± 1.889
AC2/LC1	2.673 ± 0.071	2.779 ± 0.242
AC2/LC2	4.229 ± 0.683	4.275 ± 0.581
AC2/LC3	16.100 ± 3.552	16.464 ± 2.067
AC3/LC1	0.717 ± 0.077	0.755 ± 0.075
AC3/LC2	1.136 ± 0.230	1.164 ± 0.189
AC3/LC3	4.354 ± 1.272	4.467 ± 0.571

CC: Comprimento de cabeça; CP: Comprimento padrão; AC1: Altura do corpo no ponto 1; AC2: Altura do corpo no ponto 2; AC3: Altura do corpo no ponto 3; LC1: Largura do corpo no ponto 1; LC2: Largura do corpo no ponto 2; LC3: Largura do corpo no ponto 3.

Fonte: Do autor (2022).

Este resultado associado aos diferentes níveis de maturação gonadal observados entre os animais reforçam a teoria de uma ausência nas manifestações fenotípicas associadas ao sexo.

Uma vez que, em animais que apresentam dimorfismo sexual como o peixe-betta (*Betta splendens*), o tambaqui (*Colossoma macropomum*) e a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) manifestam características sexuais secundárias, referentes à sua morfometria sob a influência

dos genes ligados ao sexo (MELLO *et al.*, 2015; JUSTUS *et al.*, 2018; IGARASHI, 2016). Tal interação não foi observada nos pontos mensurados no *Astronotus ocellatus*.

#### 5.4. Identificação do sexo a partir da razão T/E2

Os níveis séricos de testosterona e estradiol não apresentaram significância estatística ( $p > 0,05$ ) entre machos e fêmeas (TABELA 3).

Tabela 3- Níveis séricos de testosterona e estradiol em machos e fêmeas de *Astronotus ocellatus*.

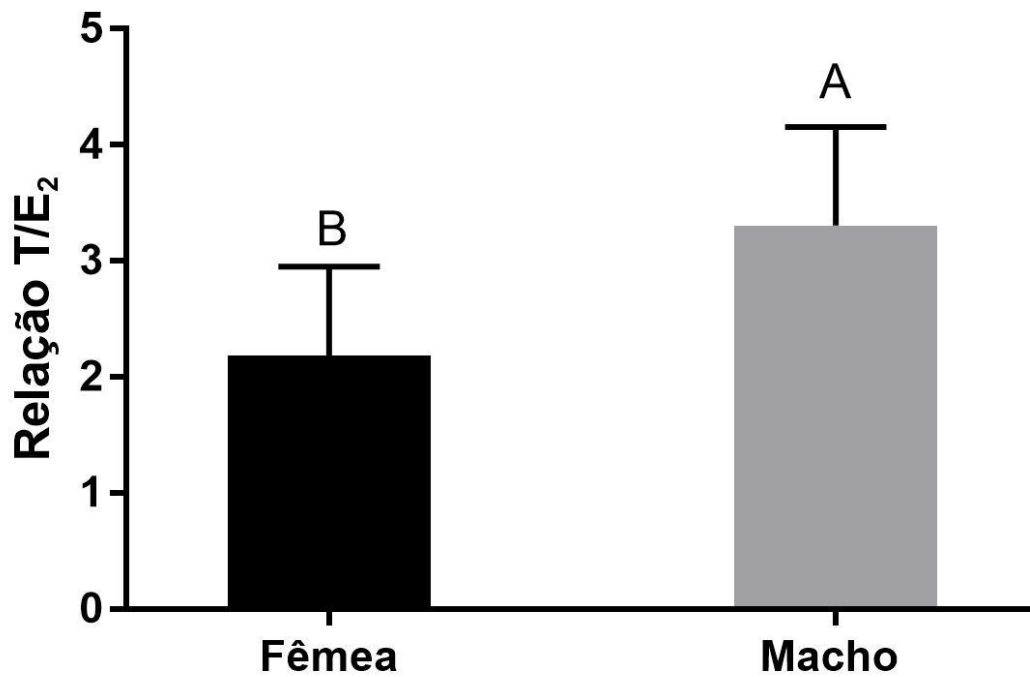
	Níveis séricos de testosterona (ng/ml)		Níveis séricos de estradiol (ng/ml)	
	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea
Valor mínimo	2,32	1,18	0,59	0,91
Valor máximo	4,69	5,61	1,38	1,77
Média	3,54	3,11	1,12	1,40
Desvio padrão	0,86	1,39	0,31	0,28
Distancia Interquartil	1,61	1,85	0,60	0,53
P valor	0,419		0,081	

Fonte: Do autor (2022).

Os níveis de T/E2 apresentaram diferenças estatísticas entre machos e fêmeas ( $p=0,013$ ), sendo os machos apresentando um maior valor da razão entre os esteroides em relação às fêmeas (FIGURA 12).

Tal resultado corrobora com Nazeri *et al.*, 2014, que constatou uma maior acurácia no uso da razão T/E2 do que os hormônios individualizados para a predição do sexo em peixes.

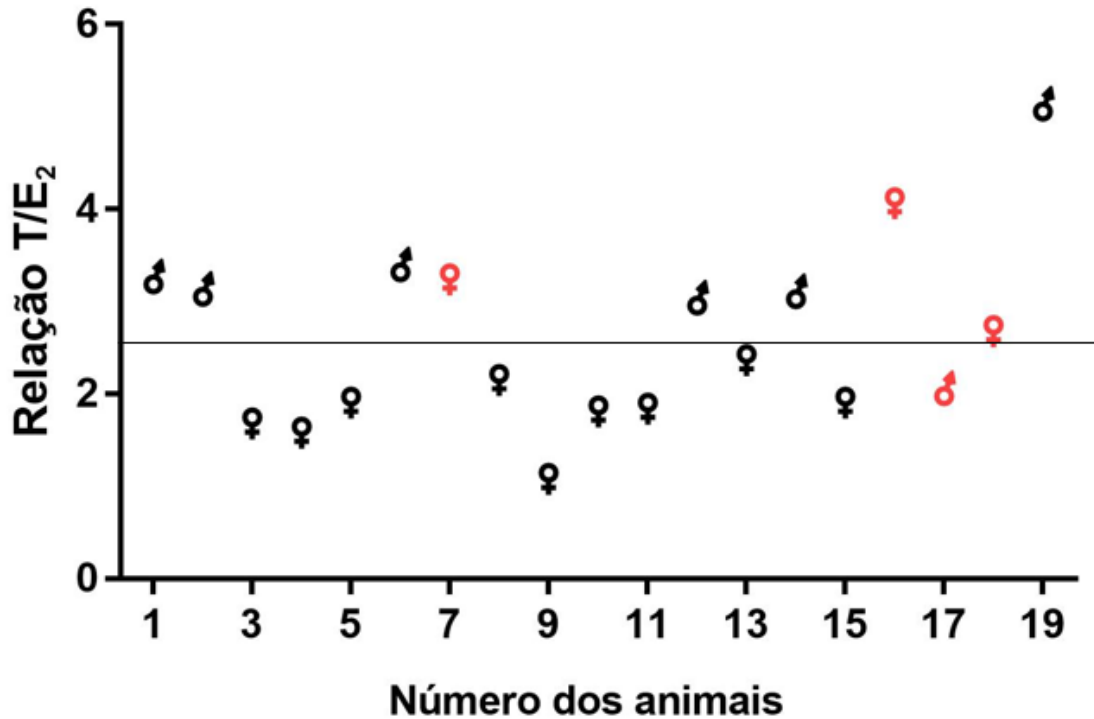
Figura 12- Relações da T/E2 entre machos e fêmeas.



Fonte: Do autor (2022).

Utilizando o método de Carvalho *et al.*, 2017, considerou-se então a média (2,59) como ponto de corte para a classificação entre machos e fêmeas, desse modo os animais com valores de T/E<sub>2</sub> superiores a 2,59 foram classificados como machos e os animais com valores inferiores a 2,59 foram classificados como fêmeas (FIGURA 13).

Figura 13- Classificação entre machos e fêmeas a partir do ponto de corte (2,59) sendo o símbolo ♀ para fêmeas e o símbolo ♂ para machos. Os símbolos em vermelho representam animais erroneamente sexados pelo método.



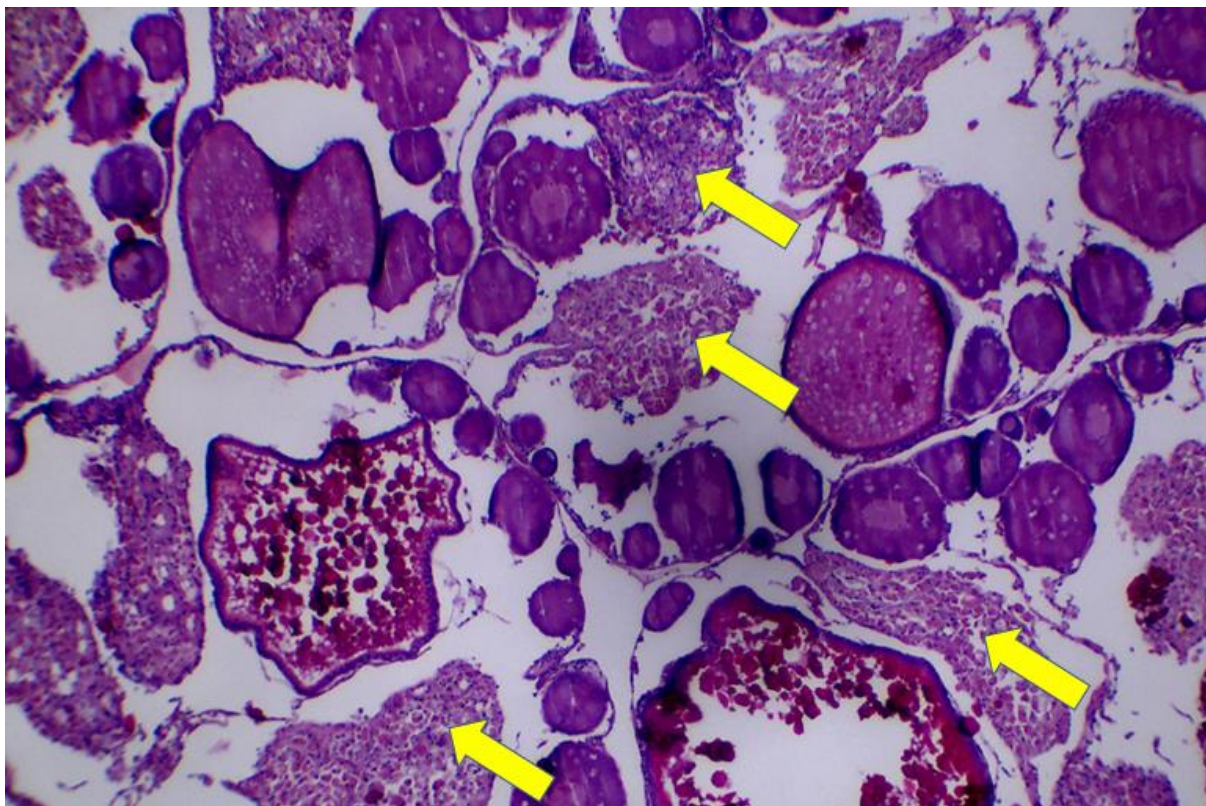
Fonte: Do autor (2022).

Tal método de sexagem apresentou eficácia de 78,94% uma vez que 3 fêmeas apresentaram altos valores de T/E<sub>2</sub> (3,22; 4,05 e 2,66) e 1 macho apresentou um valor baixo de T/E<sub>2</sub> (2,05). Das 3 fêmeas classificadas como machos, 2 estavam maduras e 1 estava em repouso, apresentando ovócitos vitelogênicos e em reabsorção (FIGURA 14).

Sendo o *A. ocellatus* uma espécie de desova parcelada, tal aumento nos níveis séricos de T pode ser justificado por sua função de maturação de ovócitos em fase inicial (PANKHURST, 2008), uma vez que esses animais já estavam em fase de regressão dos ovócitos maduros e maturação de novos ovócitos para o próximo ciclo reprodutivo.



Figura 14- Corte histológico de ovário em aumento de 10x, apresentando ovócitos em reabsorção (Seta).

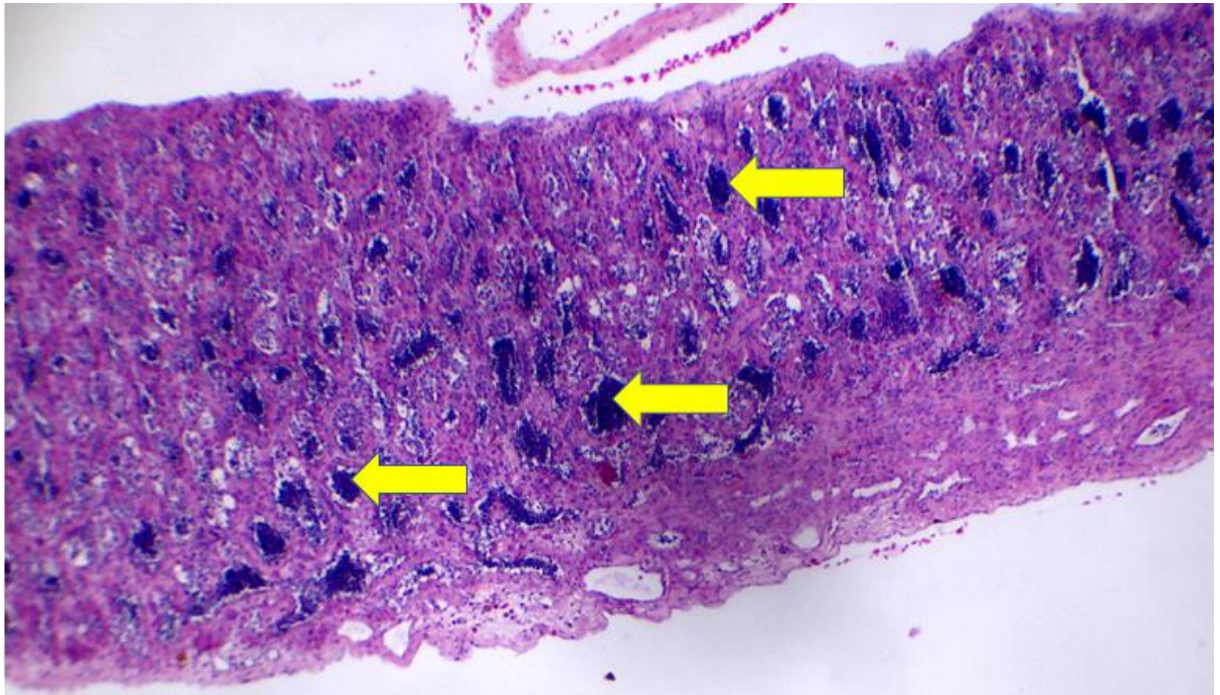


Fonte: Do autor (2022).

Por outro lado, o macho que foi classificado como fêmea apresentou baixos níveis de testosterona circulante (2,82 ng/ml) e altos níveis de E2 (1,37 ng/ml), mesmo estando em fase de maturação final. Este resultado diverge da literatura, uma vez que durante esta fase, a T apresenta um papel fundamental na maturação final dos espermatozoides (PANKHURST, 2008) que se encontravam em grande número nos ductos seminíferos (FIGURA 15).

Entretanto, segundo Tokarz *et al.*, 2015, durante a fase final da espermatogênese, a via esteroidogênica pode sofrer alteração sob estímulo do LH, resultando em uma diminuição na síntese dos andrógenos. Esse efeito se dá pela ação de hormônios progestágenos como o 17,20 $\beta$ P e 20 $\beta$ S, tendo efeito na liberação dos espermatozoides para os ductos espermáticos e posterior espermição (SCOTT *et al.*, 2010). Fato esse que poderia justificar os baixos níveis de T desse macho.

Figura 15- Testículo em aumento de 10x em fase de maturação final com abundância de espermatozoides (Setas) nos ductos seminíferos.



Fonte: Do autor (2022).

### **5.5. Avaliação ultrassonográfica**

Após avaliação das imagens obtidas a partir da ultrassonografia gonadal, foi possível a observação de estruturas arredondadas na cavidade celomática, associadas a ovócitos em fêmeas que apresentaram maior grau de maturação gonadal (FIGURA 16).

Figura 16- Imagem ultrassonográfica em fêmea de *A. ocellatus* apresentando estruturas arredondadas (destacado em vermelho) indicativas de ovócitos.

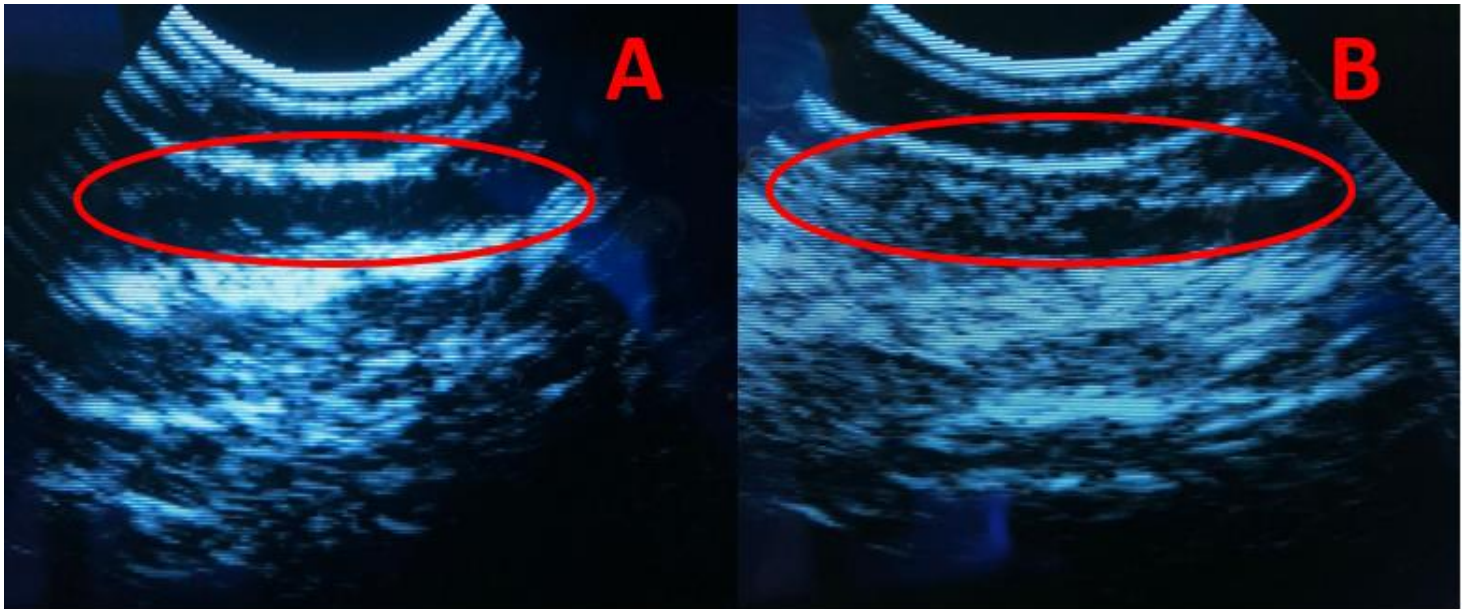


Fonte: Do autor (2022).

Em machos e em fêmeas classificadas em fases iniciais de maturação gonadal não foi possível a visualização de estruturas correspondentes a ovários ou testículos, contudo, nas imagens obtidas foi possível observar uma discreta diferença na ecogenicidade das gônadas (FIGURA 17).

Este resultado pode ser justificado a partir da composição das estruturas, uma vez que testículos de peixes possuem uma composição aquosa, resultando em imagens hipoeicoicas ou anecoicas, em contrapartida dos ovários que devido à sua composição lipídica geram imagens hipereicoicas (CREPALDI *et al.*, 2007; FROST *et al.*, 2014).

Figura 17- Imagem ultrassonográfica em macho de *A. ocellatus* (Foto A) apresentando padrão anecóico na região das gônadas (destacado em vermelho) e Imagem ultrassonográfica de fêmea de *A. ocellatus* em maturação inicial (Foto B) apresentando padrão hiperecótico na região anatômica das gônadas, porém sem padrão arredondado dos ovócitos (destacado em vermelho).



Fonte: Do autor (2022).

Durante as fases final de maturação ovocitária ocorre a formação do vitelo a partir da vitelogenina hepática, com um aumento de volume dos ovócitos (ZOHAR, 2021). A incorporação de compostos lipídicos, bem como a membrana ovocitária madura composta por fosfolípídeos, produzem uma silhueta hiperecoica nas imagens obtidas pelo ultrassom (FROST *et al.*, 2014), facilitando a observação dos ovócitos maduros na imagem a partir de sua ecogenicidade e formato globoso.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foi possível observar que a avaliação morfométrica na faixa etária estudada não se mostrou eficiente, uma vez que os animais não apresentam diferenças estatísticas da sua morfologia entre machos e fêmeas. A técnica de sexagem a partir da razão T/E2 apresentou uma maior eficácia na definição do sexo em *Astronotus ocellatus*, o que se mostra uma técnica satisfatória aos 12 meses de vida.

Os dados de avaliação histológica apontam que apesar da divergência entre os estágios maturacionais durante essa fase da vida, os animais se encontram em sua totalidade com algum grau de maturação sexual. Por sua vez, a ultrassonografia gonadal se mostra uma técnica promissora devido aos padrões ultrassonográficos observados entre machos e fêmeas, sendo necessários mais estudos em diferentes faixas etárias para a validação do método na espécie.

## 7. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, F.L. Endocrinologia aplicada na reprodução de peixes. *Revista Brasileira de Reprodução Anima*. v.37, n. 2, p. 174-180, 2013.

BOBE, J. *et al.* Identification of new participants in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) oocyte maturation and ovulation processes using cDNA microarrays. *Reproduction Biology Endocrinology*, London, v. 4, p. 39, July 2006.

BOGOCH, Yoel, Allison Jamieson-Lucy, Charles E. Vejnar, Karine Levy, Antonio J. Giraldez, Mary C. Mullins, and Yaniv M. Elkouby. "Stage Specific Transcriptomic Analysis and Database for Zebrafish Oogenesis." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 10, 2022.

CARVALHO, A. F. S. de *et al.* Identification of sex in *Astronotus ocellatus* through the evaluation of aggressive behavior and sexual steroid plasma level. *Aquaculture*, [S. l.], v. 481, p. 239-244, 1 Dec. 2017.

CHU-KOO, F., Dugué, R., Alván Aguilar, M., Casanova Daza, A., Alcántara Bocanegra, F., Chávez Veintemilla, C., ... Nuñez, J. (2008). Gender determination in the Paiche or Pirarucu (*Arapaima gigas*) using plasma vitellogenin, 17 $\beta$ -estradiol, and 11-ketotestosterone levels. *Fish Physiology and Biochemistry*, 35(1), 125–136. doi:10.1007/s10695-008-9211-8, 2008.

CREPALDI, Daniel Vieira; ROTTA, Marco Aurélio. *Uso do ultra-som em programas de reprodução de peixes nativos*. Corumbá, MS: Embrapa Pantanal, 2007.

EMEL'YANOVA, N. G., and D. A. PAVLOV. "Features of Oogenesis and Spermatozoa Ultrastructure in the Fishes of the Genera *Parascorpaena* and *Scorpaenopsis* (*Scorpaenidae*)." *Journal of Ichthyology* 61.6, 2022.

FROST Deborah A, W. Carlin MCAULEY, Bryon Kluver, Mike Wastel, Desmond Maynard & Thomas A. Flagg. *Methods and Accuracy of Sexing Sockeye Salmon Using Ultrasound for Captive Broodstock Management*, *North American Journal of Aquaculture*, 76:2, 153-158, DOI: [10.1080/15222055.2014.886647](https://doi.org/10.1080/15222055.2014.886647). 2014.

FONTENELE, O. Contribuição para o conhecimento da biologia do apaiari, *Astronotus ocellatus* (Spix) (Pisces, Cichlidae). *Revista Brasileira de Biologia*, v. 11, n. 4, p. 467-484. 1951.

FURY, J. R.; MORELLO, F. A. The contribution of an exotic fish, the oscar, to the sport fishery of the Everglades water conservation areas. In.: ANNUAL CONFERENCE OF THE SOUTHEASTERN ASSOCIATION OF FISH AND WILDLIFE AGENCIES, 48., 1994.

GODDARD, P. J. General principles. In: Goddard, P.J. (Ed.). Veterinary ultrasonography. Weybridge: CAB International, p. 1-19, 1995.

GOETZ, F. W.; GARCYNYSKI, M. The ovarian regulation of ovulation in teleost fish. Fish Physiology and Biochemistry, Amsterdam, v. 17, n. 1, p. 33-38, Dec. 1997.

GURGEL, J. J. S.; FREITAS, J. V. F. Aproveitamento final do pescado dos açudes do Nordeste brasileiro após beneficiado. Boletim do Departamento Nacional de Obras Contra as Secas, Fortaleza, v. 21, n. 1, p. 37-42, 1973.

HONEBRINK, R. Fishing in Hawaii: a student manual. education programme division of aquatic resours. Honolulu: Education Program, 1990.

IGARASHI, M. A. Aspectos tecnológicos e perspectivas de desenvolvimento do cultivo de tilápia no Brasil. Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR, Umuarama, v. 21, n. 3, p. 123-130, jul./set. 2018.

JUSTUS, Kevin T., and Tamra C. Mendelson. "Male Preference for Conspecific Mates Is Stronger than Females' in *Betta Splendens*." Behavioural Processes 151, 2018.

LOKMAN, P. M. *et al.* 11-Ketotestosterone and IGF-I increase the size of previtellogenic oocytes from shortfinned eel, *Anguilla australis*, in vitro. Reproduction, Cambridge, v. 133, n. 5, p. 955–967, May 2007.

MANSUR, V. F. R., Melo, N., Di Chiacchio, I. M., de Lima Assis, I., Machado, G. J., Paiva, I. M., ... Solis Murgas, L. D. *Sex identification of the ornamental amazon fish Astronotus ocellatus by videocelscopy and gonadal biopsy. Animal Reproduction Science, 230, 106780. doi:10.1016/j.anireprosci.2021.106780, 2021.*

MENEZES, M.S., Takeuti, D.F., Aranha, J.M.R., Verani, J.R.. Desenvolvimento gonadal de machos e fêmeas de *Pseudotothyris obtusa* (Ribeiro, 1911) (Loricariidae, Hypoptopomatinae)1 . Acta Biol. Par. 29, 89–100, 2000.

MELLO, Fernanda de *et al.* Growth curve by Gompertz nonlinear regression model in female and males in tambaqui (*Colossoma macropomum*). Anais da Academia Brasileira de Ciências [online]. 2015, v. 87, n. 4, pp. 2309-2315. Available from: <<https://doi.org/10.1590/0001-3765201520140315>>. Epub 27 Nov 2015.

MOLES, G. *et al.* Temporal profile of brain and pituitary GnRHs, GnRH-R and gonadotropin mRNA expression and content during early development in European sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*). General Comparative Endocrinology, Amsterdam, v. 150, n. 1, p. 75–86, Sept. 2007.

NAVARRO, Rodrigo Diana *et al.* Comparação morfométrica e índices somáticos de machos e fêmeas do lambari prata (*Astyanax scabripinnis* Jerenyns, 1842) em diferente sistema de cultivo. Zootecnia Trop., Maracay , v. 24, n. 2, p. 165-176, jun. 2006.

OKUMURA, H. *et al.* Changes in hepatic vitellogenin mRNA levels during oocyte development in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. General Comparative Endocrinology, San Diego, v. 125, n. 1, p. 9–16, Jan. 2002.

OLIVEIRA, Ana Paula Guedes, 1983- O48c Comportamento do peixe *Astronottus ocellatus* (Agassiz, 1861) submetidos a enriquecimento em aquário / Ana Paula Guedes Oliveira. – 2016.

PAES, M. C. F.; VASQUEZ, L. A.; FERNANDES, J. B. K.; NAKAGH, L. S. O. Early development of *Astronotus ocellatus* under stereomicroscopy and scanning electron microscopy. Zygote, v. 20, n. 03, p. 269-276, 2012.

PAES, Maria do Carmo Faria P126i Indução à reprodução e desenvolvimento embrionário e larval do ciclídeo acará-açu *Astronotus ocellatus* (Agassiz, 1831) /Maria do Carmo Faria Paes. Jaboticabal, 2008.

PANKHURST, N. W. Gonadal steroids: functions and patterns of change. In: ROCHA, M. J.; ARUKWE, A.; KAPOOR, B. G. (Ed.). Fish reproduction. Enfield: Science Publishers, p. 67–111, 2008.

PINTO-PAIVA, M.; HILTON-NEPOMUCENO, F. On the reproduction in captivity of the oscar, *Astronotus ocellatus* (Cuvier) according to the mating methods (Pisces-Cichlidae). Amazoniana, Manaus, v. 10, n. 4, p. 361-377, 1989.



POTTINGER, T.G., Pulman, K.G.T., Carrick, T.R. and Scott, A.P. Evaluation of biochemical methods for the non-destructive identification of sex in upstream migrating salmon and sea trout. *Journal of Fish Biology*, 2005.

RODRIGUES, Adilson. Morphometry and allometric growth in larval ontogeny of two species of large migratory fish native from South America. 2010. 29 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca) - Universidade Estadual do Oeste do Parana, Toledo, 2010.

SANTOS, Vander Bruno dos Crescimento morfométrico e alométrico de linhagens de tilápia (*Oreochromis niloticus*). / Vander Bruno dos Santos. -- Lavras: UFLA, 2004.

SCHULZ, R. W. *et al.* Spermatogenesis in fish. *General and Comparative Endocrinology*, New York, v. 165, n. 3, p. 390–411, Feb. 2010.

SCOTT, A. P.; SUMPTER, J. P.; STACEY, N. The role of the maturation inducing steroid, 17,20beta-dihydroxypregn-4-en-3-one, in male fishes: a review. *Journal of Fish Biology*, London, v. 76, n. 1, p. 183–224, Jan. 2010.

SLOMAN, K. A.; WOOD, C. M.; SCOTT, G. R.; WOOD, S.; KAJIMURA, M.; JOHANNSSON, O. E.; ALMEIDA-VAL, V. M. F.; VAL, A. L. Tribute to RG Boutilier: the effect of size on the physiological and behavioural responses of oscar, *Astronotus ocellatus*, to hypoxia. *Journal of Experimental Biology*, v. 209, n. 7, p. 1197-1205, 2006.

TOKARZ, J. *et al.* Steroids in teleost fishes: a functional point of view. *Steroids*, Stoneham, v. 103, p. 123–144, 2015.

ZOHAR, Y. Fish reproductive biology – Reflections on five decades of fundamental and translational research. *General and Comparative Endocrinology*. v.300, p. 1-15, 2021.