



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA
ANIMAL E RECURSOS PESQUEIROS



IRANI DA SILVA DE MORAIS

AVALIAÇÃO DA PUBERDADE E INDUÇÃO DE NEOMACHOS DE
TAMBAQUI *Colossoma macropomum* ATRAVÉS DA ADMINISTRAÇÃO DE
ESTEROIDES SEXUAIS NA RAÇÃO

MANAUS

2023

IRANI DA SILVA DE MORAIS

AVALIAÇÃO DA PUBERDADE E INDUÇÃO DE NEOMACHOS DE
TAMBAQUI *Collossoma macropomum* ATRAVÉS DA ADMINISTRAÇÃO DE
ESTEROIDES SEXUAIS NA RAÇÃO

Orientadora: Prof.^a Dr^a Gabriela Tomas Jerônimo

Coorientadora: Prof.^aDr^a Fernanda Loureiro de Almeida O'Sullivan

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciência Animal e
Recursos Pesqueiros - PPGCARP da
Universidade Federal do Amazonas -
UFAM como requisito parcial para
obtenção do grau de Doutor em Ciência
Animal e Recursos Pesqueiros

MANAUS

2023

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

M827a **Morais, Irani da Silva de**
Avaliação da puberdade e indução de neomachos de tambaqui
Colossoma macropomum através da administração de esteroides
sexuais na ração / Irani da Silva de Moraes . 2023
129 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Gabriela Tomas Jerônimo
Coorientadora: Fernanda Loureiro de Almeida O'Sullivan
Tese (Doutorado em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Aquicultura. 2. Cultivo intensivo. 3. Hormônio. 4. Monosexo. 5.
Piedade. I. Jerônimo, Gabriela Tomas. II. Universidade Federal
do Amazonas III. Título

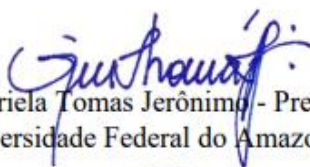
IRANI DA SILVA MORAIS

AVALIAÇÃO DA PUBERDADE E INDUÇÃO DE NEOMACHOS DE TAMBAQUI *Colossoma Macropomum* ATRAVÉS DA ADMINISTRAÇÃO DE ESTERÓIDES SEXUAIS NA RAÇÃO

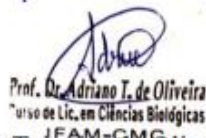
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Doutor (a) em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros, área de concentração em Produção Animal.

Aprovado em 5 de maio de 2023.

BANCA EXAMINADORA

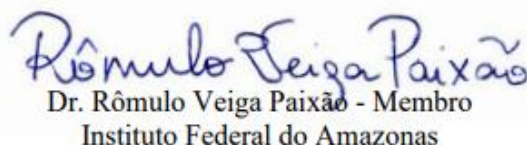


Dra. Gabriela Tomas Jerônimo - Presidente
Universidade Federal do Amazonas



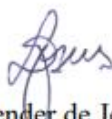
Prof. Dr. Adriano T. de Oliveira
Curso de Lic. em Ciências Biológicas
UFAM-CMG

Dr. Adriano Teixeira de Oliveira - Membro
Instituto Federal do Amazonas



Dr. Rômulo Veiga Paixão - Membro
Instituto Federal do Amazonas

Dr. Diogenes Henrique De Siqueira Silva - Membro
Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará



Dr. Lázaro Wender de Jesus - Membro
Universidade Federal de Alagoas

Primeiramente a Deus por ser essencial em minha vida, ao meu marido Dyja, a minha mãe Deise e as orientadoras Fernanda e Gabriela. Vocês fizeram muito por mim e deram todo o suporte necessário para que eu pudesse realizar esse trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida, pela saúde e pela força que possibilitaram alçar novos desafios.

Ao programa e aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros (PPG-CARP) e à Universidade Federal do Amazonas (UFAM), pela oportunidade de aprendizado e crescimento profissional.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Amazônia Ocidental (EMBRAPA) por conceder o local para os experimentos e laboratórios para desenvolver as pesquisas e, principalmente, por permitirem meu crescimento profissional. Sou muito grata pela sensibilidade humana destes gestores.

À Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), pelo projeto Amazonas Estratégico que apoiou essa pesquisa.

À Secretaria Executiva de Pesca e Aquicultura e a Secretaria de Estado de Produção Rural do Amazonas (SEPA/SEPROR), por concederem os animais para a realização deste projeto.

A minha orientadora, professora Gabriela Jerônimo, por seu ensinamento, por suas palavras sábias e calmas na hora que eu precisava e também por sua gentileza em contribuir com sua orientação em um momento delicado, você foi muito generosa.

A minha coorientadora Fernanda Almeida, pessoa excepcional, de uma grandeza enorme, desde o mestrado você aceitou um grande desafio em me orientar e esse desafio aumentou com o doutorado. Sei que você pensou menos em você e mais em mim e na oportunidade única que eu tinha de realizar essa capacitação. Obrigada por me aconselhar em continuar na área de reprodução de peixes, e por não me permitir desistir e enfrentar as situações complicadas dos últimos anos e por tantos outros conselhos e incentivos que dispensou a mim. Sou imensamente grata a você!

A minha família: meu irmão Ivo, minhas irmãs Ivani e Irene, meus sobrinhos (Walesca, Gustavo, Deise, Isabel e Valentina), que cada um do seu jeito deu incentivo na minha árdua tarefa de estudar e trabalhar.

A minha querida mãe, Deise, como sempre presente e um presente na minha vida, sempre apoiadora de minhas idéias, nem sempre sensatas, e muitas vezes ousadas. Seu apoio sempre me ajudou a chegar ao final delas.

Ao meu querido marido, Dyjaylson, você sonhou esse doutorado para mim, me incentivou, me encorajou, me apoiou e segurou firme todas as situações. Você foi/é um grande companheiro, parceiro e amigo em dividir esse período de tanto trabalho e pouco descanso.

A minha querida amiga Claudia Majolo, sempre incentivadora e bondosa, o respeito que você tem pelas pessoas é um exemplo para mim, o mundo precisa de mais pessoas como você.

A minha outra querida amiga e comadre Vanessa, Vanessinha, você é muito sábia.

Aos muitos amigos que me ajudaram em coletas e análises, que em meio à pandemia se expuseram a riscos para que eu não perdesse um experimento, vocês também foram muito generosos Karina, Claudia Afras, Daniel China, Aldessandro, Gabi Bambrila, Déborah e Rose (Rosilane) minha parceira de todas as coletas.

Ao Jeferson, técnico do Laboratório de Biologia Molecular pela paciência.

Aos supervisores do campo experimental Alexandro e Mário Kokai que sempre tiveram prontidão em atender nossas demandas, e também aos colegas do campo experimental, Luiz Alberto, Marcondes, Antônio, Roque, Renaldo, Chiquinho, Pedro, Bruno e Auri.

Aos colegas do Setor de Máquinas e Veículos (SMV) Rivonilson, Clayton, Raimundo e Fernando.

Aos colegas do Setor de Infraestrutura e Logística (SIL), senhor Alexandro, Joca, Benayon, Galúcio, Carlinhos e Luzimar, o trabalho de vocês é primordial.

Ao Dr. Gilvan Ferreira pelo apoio nesse período final do curso.

Aos Doutores Everton, Kátia Emídio, Ronaldo, Jony e Cheila.

Meu obrigado a todos que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente para minha formação ou para meu crescimento como pessoa. O doutorado foi uma lição de vida, me ensinou a reconhecer os meus limites, e principalmente a reconhecer e respeitar o limite de outros.

Tenho certeza que nenhum trabalho conseguimos realizar sozinhos e que sempre necessitamos do outro, sem sombra de dúvida cada um de vocês contribuiu de algum modo e sou grata a todos.

Muito obrigada!

RESUMO

A aquicultura tem se destacado ano após ano no Brasil como uma das atividades agropecuárias que contribui para o cenário de produção de proteína animal de alta qualidade. Nesse contexto, o tambaqui (*Colossoma macropomum*) é a principal espécie nativa cultivada no país, e possui técnica de reprodução induzida já consolidada. No entanto, ainda é necessário esclarecer informações a respeito das fases reprodutivas, fundamentais para melhorar a produção, bem como é possível desenvolver novas tecnologias, como produção de população monossexo. Com base nisso, a produção de neomachos de tambaquis, pode ser uma alternativa viável, para produzir populações exclusivamente femininas, uma vez que fêmeas desta espécie apresentam crescimento superior quando comparado aos machos, culminando em maior rentabilidade. Sendo assim, a proposta dessa tese foi produzir neomachos através de tratamento hormonal com andrógenos na fase de pré-diferenciação dos juvenis. Este trabalho teve como objetivo caracterizar as fases de desenvolvimento gonadal de uma população de tambaquis, e identificar a melhor dosagem de mesterolona (M) e de 17 α -metiltestosterona (MT) para produzir neomachos de tambaqui. Para isso, três experimentos foram desenvolvidos, sendo: i) estudo da puberdade do tambaqui, no qual foi acompanhado o processo da maturação gonadal do tambaqui dos 5 aos 32 meses de idade; ii) avaliação de diferentes doses de M (1- α -metilandrosterona; a 10, 20 e 40 mg.Kg⁻¹) através da dieta de juvenis pré-diferenciados por 3 meses, para masculinizar as fêmeas; e iii) utilização do hormônio sintético MT, adicionado à ração nas concentrações de 0, 30, 60, 90 e 120 mg.kg⁻¹, durante dois tempos de tratamento: 90 e 120 dias para masculinizar juvenis de tambaqui. Neste estudo, as fêmeas de tambaqui iniciaram o período de puberdade tardiamente aos 11 meses de idade e os machos iniciaram espermatogênese aos 7 meses, sendo as fêmeas mais tardias e com maior ganho de peso que os machos nos dois últimos meses observados. As doses de M de 20 e 40 mg.Kg⁻¹ de ração é eficaz na produção de mais de 77% dos machos fenotípicos, com pouca influência nos parâmetros sanguíneos e bioquímicos e sem causar micronúcleos, nem efeitos tóxicos ao fígado do tambaqui. E o uso da MT na alimentação de juvenis de tambaqui por 90 dias apresentou 68,7% de masculinização nos peixes tratados com 90 mg.Kg⁻¹ de MT na ração, e apresentou ocorrência de animais intersexuados, enquanto o tratamento por 120 dias com MT induziu 71,4% a machos fenotípicos, na concentração de 90 mg.Kg⁻¹ de MT na ração, sem ocorrência de animais intersexuados. O tratamento com MT não causou efeito hepatotóxico e nem efeito citogenético nas células do sangue. Concluímos que ambos andrógenos avaliados são promissores para formação de neomachos de tambaqui.

Palavras-chave: Aquicultura. Cultivo intensivo. Hormônio. Monossexo. Puberdade.

ABSTRACT

Aquaculture has stood out in the past years as one of the Brazilian agricultural activities that contributes to the production of high quality animal protein. In this context, tambaqui (*Colossoma macropomum*) is the main native species cultivated in the country, and already has a consolidated artificial reproduction technique. However, it is still necessary to better characterize the reproductive stages, which are fundamental to improve production, as well as make it feasible to develop new technologies, such as the production of monosex populations. Therefore, the production of tambaqui neo-males can be a viable alternative to produce exclusively female populations, since females of this species present superior growth when compared to males, culminating in greater profitability. The proposal of this thesis was to produce neomales through hormonal treatment with androgen in the pre-differentiation phase of juveniles. Thus, this work aimed to verify the stages of gonadal development of a population of tambaqui, and to identify the best dosage of mesterolone (M) and 17 α -methyltestosterone (MT), to produce new males of tambaqui. For this, three experiments were developed, namely: i) study of tambaqui puberty, in which the development of tambaqui gonadal maturation from 5 to 32 months of age was followed; ii) evaluation of different doses of mesterolone (1- α -methylandrosterone; at 10, 20 and 40 mg.kg⁻¹) through the diet of pre-differentiated juveniles for 3 months, to masculinize the females; and iii) use of MT added to the feed at concentrations of 0, 30, 60, 90 and 120 mg.kg⁻¹, during two treatment times: 90 and 120 days to masculinize juveniles from tambaqui. The results indicate that tambaqui females begin puberty at 9 months of age and males begin spermatogenesis at 7 months. Hence, females are later in gonadal maturity and weighed more during the last two months of our study. Mesterolone has little influence on blood and biochemical parameters, does not cause micronuclei or toxic effects on tambaqui liver, and at doses of 20 and 40 mg.Kg⁻¹ of feed it is effective in producing more than 77% of phenotypic males. In turn, the use of the hormone MT in the feeding of tambaqui juveniles for 90 days has a lower rate of masculinization (68,7%), and stimulated intersex gonads. On the other hand, treating tambaqui with MT during 120 days, induced 71% of males at 90 mg/kg of food, without the presence of intersex fish. Additionally, the treatments did not cause a negative effect on blood physiology and there was also no hepatotoxic effect on the liver or cytogenetic effect on blood cells. We therefore conclude that both androgens are promising drugs to produce tambaqui neomales.

Keywords: Aquaculture intensive. Farming. Monosex. Hormones. Puberty.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
2. REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1. Produção de população monosexo em tambaqui.....	24
2.2. Métodos para produção de populações monossexo.....	26
2.3. Esteroides anabólicos-androgênicos.....	28
2.3.1. 17 α -Metiltestosterona	29
2.3.2. Mesterolona	30
2.4. Avaliação do efeito do hormônio no metabolismo.....	31
2.4.1. Teste de Micronúcleo (MN)	31
2.5. Hematologia como ferramenta de avaliação da fisiologia em peixes.....	33
2.6. Bioquímica do sangue e hepatotoxicidade	33
3. JUSTIFICATIVA.....	35
4. OBJETIVOS.....	35
4.1. Objetivo Geral	35
4.2. Objetivos Específicos	35
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
Capítulo I.....	45
Avaliação da puberdade do tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i> , Cuvier, 1818)	46
Resumo	46
Abstract.....	47
1. Introdução.....	48
2. Material e Métodos.....	50
2.1 Declaração de Ética	50
2.2 Peixes e condições de cultivo	50
2.3 Biometria e coleta das amostras	51
2.4 Análise de esteroides	51
2.5 Variáveis hematológicas.....	52
2.6 Análise histológica das gônadas	52
2.7 Classificação das fases reprodutivas do tambaqui.....	52
2.8 Parâmetros físico-químicos da água	53
2.9 Estatística.....	53
3. Resultados.....	53

3.1 Biometria	53
3.2 Fases de desenvolvimento gonadal em machos	55
3.2.1 Fase imatura e de desenvolvimento inicial.....	55
3.2.2 Fase de desenvolvimento - maturação.....	55
3.2.3 Fase reprodutiva apto a desova.....	55
3.2.4 Fase de regressão	56
3.2.5 Fase de regeneração.....	56
3.3 Fases de desenvolvimento gonadal em fêmeas	58
3.3.1 Fase imatura.....	58
3.3.2 Fase de desenvolvimento inicial.....	58
3.3.3 Fase de desenvolvimento - maturação.....	58
3.3.4 Fase reprodutiva apto a desova.....	59
3.3.5 Fase reprodutiva de regressão e regeneração	59
3.4 Hormônios esteroides	61
3.5 Variáveis do sangue.....	62
3.6 Índice hepatossomático (IHS) e índice gonadossomático (IGS).....	63
4. Discussão	65
5. Conclusão	70
6. Referências bibliográficas	71
Capítulo II.....	76
Effects of mesterolone on the sex ratio, physiology and liver function of juvenile tambaqui Colossoma macropomum	77
Abstract.....	77
1. Introduction	78
2. Material and methods	80
2.1 Ethics statement.....	80
2.2 Fish and water parameters	80
2.3 Treatments and sampling.....	80
2.4 Histology	81
2.5 Hematological parameters	81
2.6 Liver biochemical parameters and enzyme activity	82
2.7 Micronucleus in erythrocytes	82
2.8 Statistical analysis	82

3. Results	82
3.1 Water parameters and fish survival and growth	82
3.2 Gonadosomatic index (GSI), sex identification and sex ratio	84
3.3 Hepatosomatic index (HIS) and hepatic-histopathology	86
3.4 Hematological parameters	88
3.5 Biochemical parameters and enzyme activity	89
3.6 Micronucleus in erythrocyte	91
4. Discussion.....	91
5. References	95
Capítulo III	99
Efeito da metiltestosterona na razão sexual, fisiologia e função hepática de juvenis de tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>).....	100
Resumo	100
1. Introdução.....	101
2. Material e Métodos	102
2.1. Declaração de Ética	102
2.2. Aquisição dos peixes, local e caracterização da área de estudo	102
2.3. Tratamentos e alimentação	103
2.4. Amostragens	103
2.5. Variáveis hematológicas.....	104
2.6. Histologia	105
2.7. Parâmetros bioquímicos do fígado e atividade enzimática	105
2.8. Análise de micronúcleo	106
2.9. Análise estatística	106
3. Resultados.....	106
3.1. Variáveis da água, sobrevivência e crescimento dos peixes	106
3.2 Índice gonadossomático (IGS) e índice hepatossomático (IHS).....	109
3.3. Identificação sexual e razão sexual	110
3.4. Histopatologia hepática	112
3.4. Parâmetros hematológicos.....	113
3.5. Parâmetros bioquímicos e atividade enzimática.....	115
3.6 Análise de Micronúcleo.....	117
4. Discussão	117

5. Conclusão	123
6. Referências	124
Capítulo IV Conclusão Geral da Tese	132

1 INTRODUÇÃO

A aquicultura mundial encontra-se em pleno crescimento e fornece mais da metade dos peixes do consumo humano (FAO, 2022), enquanto que a produção de pescado oriunda da pesca está em declínio já por algumas décadas (MELLO et al., 2017). E sendo o peixe um alimento de alto valor biológico, que além de apresentar-se como fonte de proteína animal saudável mais consumida em todo o mundo, ainda possui um sistema de produção relativamente fácil (MELLO et al., 2017). Sendo assim, é importante avançar em estudos que auxiliem a aumentar a produção, sem aumentar a área de cultivo e que explorem as características de melhor desempenho zootécnico deste grupo.

Quando o objetivo é produzir somente o gênero mais produtivo zootecnicamente, um dos principais aspectos para intensificar a produção piscícola comercial com mais sustentabilidade econômica e ambiental, é a utilização de técnicas de manipulação do sexo (ALMEIDA et al., 2018; ZHAI et al., 2022). A produção de população monossexo se justifica, por exemplo, em espécies ornamentais quando é desejável obter características como crescimento e cor, como do ciclídeo amarelo (*Labidochromis caeruleus*; KARSLI, et al., 2022), o guppy (*Poecilia reticulata*; PIFERRER & LIM, 1997; TURAN et al., 2006), o rosy barb (*Pethia conchonius*), dwarf gourami (*Trichogaster lalius*) (RAMEE et al., 2020) e no Betta sp. (SUSANTO et al., 2021). Em espécies que apresentam dimorfismo sexual de maior crescimento das fêmeas, como da carpa comum (*Cyprinus carpio* L.; ZHAI et al., 2022), do Yellow drum (*Nibea albiflora*; XU et al., 2018) e do peixe carvão (*Anoploma fimbria*; LUCKENBACH et al., 2017). Algumas fêmeas são viáveis para a produção de caviar do esturjão russo (*Acipenser gueldenstaedtii*; CURZON et al., 2022), e para melhor qualidade de carne stinging catfish (*Heteropneustes fossilis*; AHMED et al., 2015), na truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*; KUZMINSKI & DOBOSZ, 2010) e do salmão do Atlântico (*Salmo salar*; LEE et al., 2004).

Dentre as espécies nativas brasileiras de importância econômica, as fêmeas de jundiá (*Rhamdia quelen*) e de tambaqui (*Colossoma macropomum*) crescem 20 a 50% (GHIRALDELLI et al., 2007; ALMEIDA et al., 2016; ARIEDE et al., 2023) mais que os machos, respectivamente, no momento do abate. Por isso, nestas espécies brasileiras idealiza-se a população monossexo para aumento da rentabilidade da atividade (ALMEIDA et al., 2018). Buscando a melhor solução para a produção de lotes monossexo de fêmeas de tambaqui, esta tese visou primeiramente caracterizar a puberdade do tambaqui e identificar o melhor andrógeno, bem como a melhor dosagem de andrógeno para a produção de

neomachos, que é condição fundamental para a produção indireta de lotes femininos em espécies XX/XY, como o tambaqui.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Produção de população monosexo em tambaqui

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é um peixe redondo dos rios Amazonas e Orinoco que possui características muito favoráveis a aquicultura, tais como, rusticidade, facilidade de obter juvenis, e bom desempenho zootécnico, além de ter carne saborosa e com baixo acúmulo de gordura (PENNA et al., 2005; ARAÚJO-LIMA; GOMES, 2005; GOMES et al., 2010). O tambaqui é a espécie que lidera a produção aquícola entre os peixes nativos no Brasil (IBGE, 2022)

Devido à grande demanda por sua carne, a população natural do tambaqui sofreu um declínio acentuado, pois evidências apontam que o estoque desta espécie está sobre explorado desde 1996, chegando a uma produção pesqueira de apenas 3,49% do total desembarcado nos portos de Manaus entre 2018/2019 (MATOS, 2021). Este fato impulsionou a criação comercial da espécie, tanto em quantidade de fazendas produtoras quanto na intensificação da produção (MORAIS & ALMEIDA, 2017). Segundo o IBGE (2022), em 2021 o Amazonas produziu 6,88 mil toneladas de tambaqui, ocupando o quarto lugar na produção nacional de espécies nativas e ainda de acordo com os dados do PEIXE BR (2023), em 2022 o Amazonas produziu 21,300 t, o equivalente a 7,97% da produção de peixes nativos no país que foi de 267,060 t neste último ano. Portanto, ainda se almeja o aumento da produção comercial do tambaqui para atender a alta demanda do mercado consumidor, e esse aumento depende do desenvolvimento de tecnologias para o aprimoramento da produção.

Tanto na natureza quanto em sistemas de criação, as fêmeas de tambaqui crescem mais e são mais pesadas que os machos a partir dos 2 Kg (VILLACORTA-CÔRREA & SAINT-PAUL, 1999; ALMEIDA et al., 2016; ARIEDE et al., 2023). Essa diferença entre machos e fêmeas, provavelmente se deve à precocidade da puberdade dos machos (SOUZA & ALMEIDA, 2012; IZEL et al., 2013; ALMEIDA et al., 2016). Logo, na indústria da piscicultura, a variação fenotípica entre os sexos pode representar ganhos econômicos significativos, principalmente após a puberdade, proporcionando aumento na produtividade e rentabilidade, caso sejam produzidos somente indivíduos do sexo com superioridade

zootécnica (REIS et al., 2016; ALMEIDA et al., 2018). Assim, o cultivo exclusivo de fêmeas pode aumentar a produtividade do cultivo de tambaqui.

Com este objetivo, Reis & Almeida (2018), estabeleceram um protocolo para feminização de tambaqui administrando 17β -estradiol (E_2) na ração, onde 120 mg Kg^{-1} de E_2 na ração por seis semanas foi suficiente para produzir lotes monossexos femininos de tambaqui. Os grupos tratados apresentaram 84% de fêmeas e 16% de peixes intersexo (gônadas com tecido ovariano e testicular), sem presença de machos (REIS & ALMEIDA, 2018). Entretanto, não foram avaliadas em longo prazo as fases do desenvolvimento gonadal de machos e fêmeas de tambaqui. Se, por exemplo, após os 10 meses de idade a fêmea mantivesse o desenvolvimento gonadal mais tardio, a técnica traria vantagens econômicas, uma vez que fêmeas maturando antecipadamente teriam seu crescimento somático prejudicado, bem como os machos que são naturalmente mais precoces. A superioridade da fêmea está no fato da mesma ser mais tardia sexualmente e uma possível antecipação da puberdade prejudicaria o ganho de peso que as fêmeas normais têm por serem imaturas (ALMEIDA et al., 2016). Considerando uma possível antecipação da maturidade, a produção de neomachos possibilita a produção exclusiva de fêmeas genéticas normais da espécie. Nessa técnica, conhecida por produção indireta de população monossexo de fêmeas, somente os parentais recebem tratamento hormonal e 100% da prole é feminina (REIS et al., 2016). Outra vantagem dessa técnica é a ausência de tratamento hormonal nos lotes de consumo e uso reduzido de hormônio, uma vez que só os parentais são invertidos e assim permanecem durante toda a vida útil desses reprodutores (PIFERRER, 2001; REIS et al., 2016).

Neste caso, primeiro é realizada a masculinização direta de juvenis, com uso de andrógenos ou bloqueadores de aromatase, que são enzimas que catalisam a aromatização dos andrógenos em estrogénos, resultando em uma população com machos normais (XY) e neomachos (XX), que são fêmeas invertidas que apresentam o fenótipo masculino com produção de sêmen. Na segunda etapa, esses neomachos (XX) ao serem cruzados com fêmeas normais (XX) dão origem a uma população 100% feminina (XX) (PIFERRER, 2001; REIS et al., 2016). Nosso grupo de estudo verificou que a diferenciação sexual do tambaqui não é influenciada pelo pH (MORAIS et al., 2020) e nem pela temperatura da água (REIS et al., submetido), mas é desencadeada por um sistema de determinação sexual cromossômica simples, no qual as fêmeas são homogaméticas (XX) (VARELA et al., 2021). Varela et al. (2018) investigaram a proporção sexual de quatro famílias de irmãos de *C.*

macropomum e verificaram uma razão sexual equilibrada com possível influência de fatores ambientais. Adicionalmente, Morais (2016) verificou o efeito de fatores ambientais, como o pH e a temperatura na determinação sexual do tambaqui e notou, que embora esses fatores ocasionem uma tendência de sexo, não influenciam na determinação do sexo da espécie. Esses fatores conjuntamente corroboram na indicação de formação de grupos monossexos de tambaqui com o uso de andrógenos, uma vez que fatores físicos e químicos da água não foram eficazes em masculinizar juvenis de tambaqui.

2.2 Métodos para produção de populações monossexo

A manipulação do sexo fenotípico em peixes para obtenção de lotes monossexos pode ser realizada por hibridização, manipulações genéticas, como ginogênese e androgênese, ou através do uso de esteroides sexuais (PIFERRER, 2001). Em algumas espécies de peixes, a masculinização pode ainda ser feita com a administração de inibidores de aromatase (ALMEIDA et al., 2018). A formação de populações monossexuadas de peixes pode ser realizada pelo método direto (em uma etapa), ou indireto (em duas ou mais etapas). O método direto pode ser utilizado em qualquer espécie de peixe, independentemente do sistema de determinação sexual. A principal vantagem do método direto é a simplicidade, e por isso é frequentemente usado na maioria das espécies em que pretende-se obter populações monossexo de peixes (PIFERRER, 2001; REIS et al., 2016).

O método indireto é mais demorado, exige duas ou mais etapas de cruzamentos para obtenção dos lotes monossexuados e é adequado apenas para as espécies que possuem o sistema de determinação sexual conhecido, que deve ser cromossômico simples, como XX/XY ou ZW/ZZ. A vantagem desse método é que os peixes dos lotes monossexuados não recebem hormônio e sim seus parentais, e quando estabelecido o lote de reprodutores (invertidos), a produção de lotes monossexo é constante (PIFERRER, 2001; DEVLIN & NAGAHAMA, 2002; BRASIL, 2010). Os peixes podem receber o hormônio administrado na alimentação, com a incorporação do hormônio na ração, por meio de banhos de imersão ou através de via injetável (PANDIAN & SHEELA, 1995; PIFERRER, 2001).

Na indução pelo método direto, o tratamento hormonal é realizado durante as fases iniciais de desenvolvimento larval dos animais tratados (BOMBARDELLI et al., 2007). As larvas são alimentadas com ração contendo andrógenos e estrógenos, ou mantidos por certo tempo em água contendo concentrações diluídas do hormônio de interesse (PANDIAN & SHEELA, 1995; BRASIL, 2010). O método direto é considerado seguro por serem

utilizadas doses baixas de hormônio, pelo período de tratamento ser geralmente curto, que pode variar entre dias, semanas ou no máximo meses, e por terminar meses ou anos antes do abate e comercialização. Em geral, os resíduos de esteroides desaparecem em menos de um mês após o final do tratamento (PIFERRER, 2001).

Para obtenção de lotes exclusivamente femininos pelo método indireto nas espécies XX/XY, as linhagens monosexuadas de fêmeas são produzidas em duas fases. Na primeira ocorre o tratamento dos peixes com andrógenos, tornando todos os animais machos fenotípicos. Os machos genéticos continuam do sexo masculino, e as fêmeas genéticas tornam-se machos fenotípicos, neomachos, pois apresentam o fenótipo masculino e com produção de sêmen. Entretanto, por serem geneticamente fêmeas, produzem somente espermatozoides contendo cromossomo sexual X, resultando em uma prole 100% feminina quando cruzados com fêmeas normais (XX). Visualmente não é possível separar os neomachos (XX) dos machos normais (XY). Neste caso podem ser usados marcadores sexuais genéticos ou cariotipagem para identificá-los ou pode ser feito um teste de progênie (PIFERRER, 2001). O teste consiste no cruzamento entre casais de fêmeas normais e machos tratados. Cada família é então criada separadamente até que a descendência possa ser sexada. Caso a descendência seja de 50% fêmeas e de 50% machos, o macho parental é XY (macho genético) e deve ser descartado. Caso a descendência for 100% fêmeas, então o macho parental testado é um neomacho (XX) e deve ser mantido como reprodutor para a produção de sucessivas linhagens de fêmeas (HUNTER & DONALDSON, 1983; BLÁZQUEZ et al., 1999). O método indireto tem a vantagem de os peixes comercializados não serem tratados com esteroides. Este método já é utilizado em escala comercial no cultivo de fêmeas de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), no Reino Unido (BYE & LINCOLN, 1986) e de salmão (*Salmo salar*) no Canadá (DONALDSON, 1986).

Para obter linhagens monossexo de machos em espécies XX/XY pelo método indireto, a reprodução precisa ser feita por meio da produção de matrizes de super-machos (machos YY ao invés de XY). É um método demorado, pois para conseguir um reprodutor YY, três gerações são necessárias. Porém, é um dos métodos mais eficientes de produção de machos. A primeira fase é a do tratamento das larvas com estrógenos, para produzir neofêmeas ou fêmeas invertidas (XY). Ao verificar que os peixes tratados com hormônio são fêmeas invertidas (XY) (PIFERRER, 2001), passam para a segunda fase: o cruzamento das neofêmeas com machos normais, que resulta na produção de 75% de machos. Desses, 50% são machos normais (XY) e 25% são os machos de interesse - YY, os super-machos

(CESAR et al., 2004). A terceira fase é o cruzamento de super-machos com fêmeas normais para originar proles inteiras de machos (XY). Este método já é utilizado em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (TURRA et al., 2010), e já foi descrita para o guppy (*Poecilia reticulata*) (KAVUMPURATH & PANDIAN, 1993).

Para o método indireto de produção de lotes de fêmeas nas espécies em que a fêmea é heterogamética, ZW/ZZ, deve ocorrer a produção de matrizes super-fêmeas (WW). Nesse caso também são necessárias três fases, as mesmas descritas para obtenção dos super-machos YY, porém com hormônios masculinizantes (andrógenos) (CESAR et al., 2004). A produção de super-fêmeas já foi realizada na tilápia azul (DESPREZ et al., 2003) e no ornamental molinésia negra (*Poecilia sphenops*) (GEORGE & PANDIAN, 1998).

2.3 Esteroides anabólicos-androgênicos

Os esteroides anabólico-androgênicos (EAA) são compostos naturais ou sintéticos derivados da testosterona (YESALIS & BAHRKE, 2002). A testosterona é um esteroide sexual produzido pelo córtex da suprarrenal e pelas gônadas, responsável pelo desenvolvimento e manutenção das características sexuais dos vertebrados e pelo *status* anabólico dos tecidos somáticos. Além dos EAA naturais, como a própria testosterona, a androsterona, 3- α -hidroxi-5- β -androsta-17-ona e androstenediona, existem os sintéticos, que foram formulados de forma a aumentar a atividade anabólica e/ou minimizar a atividade androgênica (HOBBERMAN & YESALIS, 1995; BAHRKE & YESALIS, 2002; 2004), principalmente para camuflar a evidência de doping no meio esportivo. Os EAA agem em um único tipo de receptor citoplasmático (receptor de andrógeno) que então migra ao núcleo celular e modula de forma igual os efeitos androgênicos e anabólicos dos compostos (GHAPHERY, 1995; LUKAS 1996).

Existem três formas de sintetizar EAA: alquilação na posição 17- α ; esterificação do grupo 17- β -hidroxil ou pela alteração do anel esteroide. A alquilação na posição 17- α retarda a metabolização hepática, favorecendo a efetividade oral, porém o composto originado é mais tóxico ao fígado (LUKAS, 1993). Para o desenvolvimento desta tese, a masculinização de tambaqui foi baseada em estudos com inversão sexual de teleósteos, e dois EAA foram selecionados, sendo um obtido por alquilação da testosterona - 17 α -metiltestosterona e outro pela alteração do anel esteroide - mesterolona (WASSERMAN & AFONSO, 2003; OYIN et al., 2008; MOHAMED, 2019).

2.3.1. 17 α -Metiltestosterona

A 17 α -metiltestosterona (MT) é um andrógeno sintético, obtido pela metilação (alquilação com grupo metil) da testosterona na posição 17- α (Figura 1). Este esteroide possui características físico-químicas como pó branco a cristalino sendo praticamente insolúvel em água, facilmente solúvel em álcool e ligeiramente solúvel em éter. Na medicina humana, é usado para suprimir a deficiência de testosterona (hipogonadismo) e no tratamento dos sintomas da andropausa em homens. Nas mulheres, pode ser associado ao estrógeno como paliativo no tratamento de alguns sintomas da menopausa, como a falta de desejo sexual (BEJMA et al., 2005; FILHO et al., 2005). Na aquicultura é amplamente utilizado em peixes para a reversão sexual fenotípica de indivíduos do sexo feminino (RIVERO-WENDT et al, 2016), como mostra a Tabela 1.

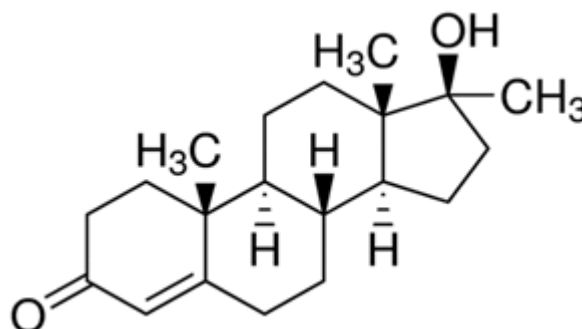


Figura 1 - Estrutura química do 17 α -metiltestosterona (MT). Fonte: Sigma-Aldric.

Tabela 1 - Espécies induzidas fenotipicamente com o uso do hormônio metiltestosterona para a produção de machos fenotípicos

Espécie	Referências
<i>Betta splendens</i>	Kirankumar & Pandian (2002)
<i>Bidyanus bidyanus</i>	Sulaeman & Fotedar (2017)
<i>Cichlasoma nigrofasciatum</i>	Mousavi-Sabet et al. (2011)
<i>Cyprinus carpio</i>	Nagy et al. (1981)
<i>Dicentrarchus labrax L</i>	Blázquez et al. (1995)
<i>Epinephelus marginatus</i>	Sanches et al. (2009)
<i>Gadus morhua</i>	Haugen et al. (2011)
<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	Baker et al. (1988)

<i>Oreochromis niloticus</i>	Gayão et al. (2013); Mainardes-Pinto et al. (2000); Yasui et al. (2007)
<i>Oryzias latipes</i>	Seki et al. (2004)
<i>Poecilia reticulata</i>	Takahashi (1975); Mousavi-Sabet et al. (2012)
<i>Rhamdia quelen</i>	Weiss et al. (2016)
<i>Stizostedion lucioperca L.</i>	Demska-Zakes & Zakes (1997)
<i>Sturgeon – Hybrid</i>	Omoto et al. (2002)
<i>Xiphophorus variatus</i>	Faghani-Langroudi et al. (2014)

2.3.2. Mesterolona

A mesterolona (M, 17-β-hydroxy-1-α-methyl-5-α-androstan-3-one (C₂₀H₃₂O₂) ou de forma simplificada 1-α-metilandrosterona (Figura 2), é um esteroide anabólico-androgênico não alquilado, derivado da dihidrotestosterona e alterado através da inclusão de um grupo metílico, 1-metil-dihidrotestosterona, no primeiro carbono. A M é considerada menos tóxica para o fígado do que os andrógenos 17α-alkilados (EL-SADR et al., 1990; HANDELSMAN, 2016). É comercialmente vendida como Proviron®, indicada no tratamento do hipogonadismo, para uso via oral. Praticamente insolúvel em água sob a forma de pó cristalino, possui cor variando de branco ao amarelado, é indicado para tratamento de homens com problemas provocados pela baixa produção de androgênio, depressão, impotência sexual, baixa libido, ansiedade, doenças bipolares e baixo espermatozóide (FERNÁNDEZ & ACOSTA, 2008; SINGH et al., 2013; BAYER, 2019). Na piscicultura, a M já foi usada para masculinização de tilápias, como mostra a Tabela 2.

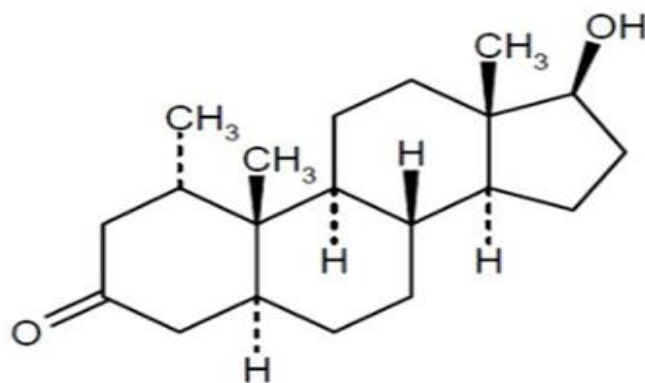


Figura 2 - Estrutura química do mesterolona - 17 beta-hidroxi-1-alfa-metil-5-alfa-androstan-3-ona. Fonte: PubChem.

Tabela 2 - Exemplos de tilápias induzidas a machos fenotípicos com o uso de Mesterolona

Espécie	Dose (mg.kg ⁻¹)	Referências
<i>Oreochromis niloticus</i>	200	Oyin et al. (2008)
<i>Oreochromis niloticus</i>	60	Nwachuku (2012)
<i>Oreochromis niloticus</i>	200	Caiche & William (2014)
<i>Oreochromis niloticus</i>	25, 50 e 75	Mohamed, (2019)

2.4 Avaliação do efeito do hormônio no metabolismo

A adição de hormônios, disruptores endócrinos ou qualquer agente aditivo na ração ou no ambiente pode levar a alterações no organismo dos indivíduos (ALMEIDA et al., 2008; VALENTE, et al., 2017). Para verificar essas alterações, existem biomarcadores que têm a características de avaliar e/ou monitorar um processo biológico de um organismo exposto a uma situação ambiental (VALENTE, et al., 2017; BALLESTRERI, 2017).

2.4.1. Teste de micronúcleo (MN)

Ao se desenvolver tecnologias para a produção animal, três pilares de segurança devem ser observados e atendidos: segurança do produto (a ser consumido pelo homem); segurança ambiental e bem-estar animal. Ao estipular o protocolo de população monosexo para tambaqui, REIS & ALMEIDA (2018) garantiram a segurança ambiental e alimentar da técnica através de análises do sangue e água dos tambaquis tratados. A produção de peixes monossexos de tambaqui tratados com 17- β -estradiol, assim como acontece com outros peixes tratados com outros hormônios, não deixa resíduo na carne de consumo. Hoga et al. (2019) analisaram o músculo do tambaqui feminizado por Reis & Almeida (2018), com sete meses após o término do tratamento, e não detectaram nível de resíduo hormonal, garantindo que o consumo de tambaqui tratado com E₂ para fins de reversão sexual não representa riscos associados a resíduos hormonal na carne de consumo humano. Entretanto, o efeito do hormônio exógeno no metabolismo animal não foi avaliado. Os micronúcleos (MN) são estruturas formadas a partir de fragmentos de cromossomos ou cromossomos inteiros no citoplasma que não foram envolvidos no núcleo principal durante a divisão celular no estágio de anáfase e que são observadas nas células filhas (Figura 3). Uma vez formados,

esses cromossomos separados são envolvidos por uma membrana nuclear resultando em um pequeno núcleo separado do núcleo principal, e passa a ser considerado como uma lesão que ocorre no DNA (SCHMID, 1975; BALLESTRERI, 2017).

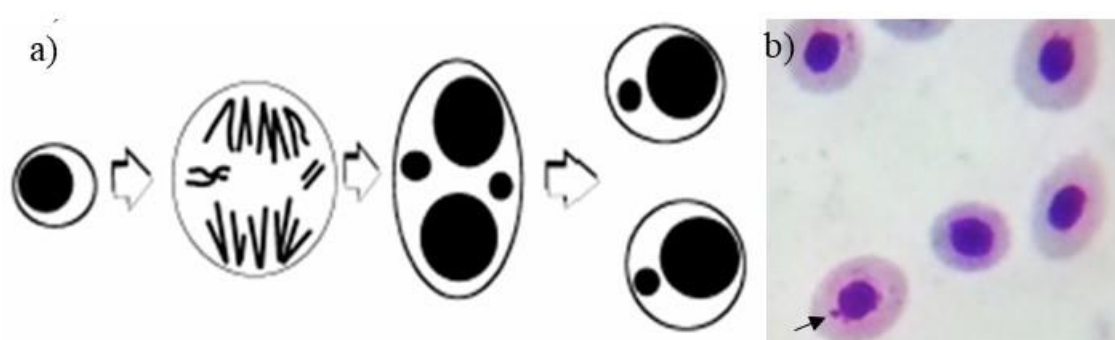


Figura 3 - Ilustração de formação de micronúcleo (a) (Fenech et al. 1999) e célula de eritrócito com um micronúcleo (MN) (b) (Bueno et al. 2017).

O teste de micronúcleo foi desenvolvido para uso em células de mamíferos, e passou a ser bastante aplicado em outras espécies de modelos biológicos, sendo considerado o melhor teste para avaliação citogenética de lesões que ocorrem no DNA por ser simples, fácil e rápido de realizar (HEDDLE et al., 1983; SCHMID, 1975).

É importante o monitoramento do ambiente aquático para identificação de compostos potenciais que possam causar danos aos organismos aquáticos (RIBEIRO et al., 2014). Assim, em peixes o teste do micronúcleo em eritrócitos mostrou ser um bioensaio sensível para detectar poluição mutagênica em ambientes de água doce (MISSINI et al., 1996). Em estudo realizado no Rio Madeira, o teste MN foi utilizado para avaliar a mutagenicidade da concentração de mercúrio na água, avaliando as espécies curimatã (*Prochilodus nigricans*), pacu branco (*Mylossoma duriventris*), e traíra (*Hoplias malabaricus*), onde foi identificada ação genotóxica ao comparar com espécies de área não poluída do Rio Solimões (PORTO et al., 2005). É frequente o uso de agrotóxicos em fazendas localizadas na bacia do rio Lamedor (Guatambu, SC), e análises em peixes dessa região, carpa comum (*Cyprinus carpio*), cascudo chinelo (*Hypostomus punctatus*), jundiá (*Rhamdia quelen*) e tilápia (*Oreochromis niloticus*) evidenciaram aumento médio na frequência de micronúcleos (SALVAGNI et al., 2011), e em peixe-espada (*Eingenmannia virescens*) exposto ao benzeno (BÜCKER et al., 2006). Além do mercúrio e de pesticidas, outro fator que favorece

o aumento de MN são resíduos provenientes de esgoto doméstico, conforme observado em estudos com o barbo italiano (*Barbus plebejus*) no rio Tiber (MISSINI et al., 1996), o lambari (*Astyanax paranae*) do rio São Francisco (RIBEIRO et al., 2014), e o tucunaré (*Cichla temensis*) do Lago do Paranoá (RIVERO, 2007).

Em peixes, o estradiol (E_2) demonstrou ser um contaminante aquático, pois foi observado a presença de alterações em células sanguíneas através do teste de micronúcleo em tilápias (*O. niloticus*), expostas a 6 ng.L^{-1} de E_2 , durante 24h, 48h e 10 dias (SPONCHIADO et al., 2010), e em robalo Europeu (*Dicentrarchus labrax L*) adulto exposto ao E_2 nas concentrações de 200 e 2000 ng/L dissolvidos em água e $0,5 \text{ mg.Kg}^{-1}$ e 5 mg.Kg^{-1} injetados via intraperitoneal, demonstrando ser um contaminante aquático, já que aumentou a frequência de micronúcleos em todas as doses testadas (TELES et al., 2005). O 17α -etinilestradiol (EE_2) também apresentou dano ao DNA dos eritrócitos do peixe zebra (*Danio rerio*) com 21 dias de idade exposto a $3,5 \text{ ng.L}^{-1}$ de E_2 (MICAEL et al., 2007). E estudos feitos com 17α -metiltestosterona (MT) evidenciaram que o MT tem ação genotóxica moderada e causa alterações no sistema reprodutivo de espécies nativas neotropicais e risco ambiental. Na concentração de $0,01 \text{ mg.Kg}^{-1}$ de MT verificou-se alterações na frequência de MN no lambari (*Astyanax bimaculatus*; RIVERO-WENDT et al., 2013), e em lambari-dorabo-amarelo (*Astyanax lacustris*) com tratamentos de 40 e 60 mg.Kg^{-1} de MT (FARIAS et al., 2023).

2.5 Hematologia como ferramenta de avaliação da fisiologia em peixes

Os parâmetros sanguíneos podem ser usados como indicadores biológicos no monitoramento do bem-estar dos peixes, sendo utilizados como ferramenta para o diagnosticar o estresse animal, os possíveis desequilíbrios causados por condições do ambiente, devido à presença de agentes infecciosos, efeito de agentes anabólicos ou por fatores internos como sexo, maturação gonadal, idade e modo de vida (GHAPHERY, 1995; RANZANI-PAIVA et al., 2004; SILVA et al., 2012). A hematologia avalia a composição e elementos celulares do sangue, e auxilia em estudos de alterações dos padrões e dos distúrbios morfológicos das células do sangue, por isso é usada como ferramenta diagnóstica capaz de indicar o estado fisiológico dos animais (RANZANI-PAIVA et al., 2004; SILVA et al., 2012).

2.6 Bioquímica do sangue e hepatotoxicidade

A inalação, ingestão ou administração de agentes químicos ou farmacológicos pode causar alteração ou lesão no fígado, a hepatotoxicidade (SILVA et al., 2004). O uso exógeno

de altas doses de esteroides androgênicos anabolizantes (EAA), pode levar a um quadro de hepatite (devido ao esforço exigido do fígado em metabolizar seus componentes), induzir ao desenvolvimento de colestase (dificuldade de escoar a secreção da bile - icterícia) e menos comum o adenoma e carcinoma hepatocelular (CUNHA et al., 2004; KICMAN, 2008; MARQUES et al., 2012). Para averiguar se há presença ou suspeita de lesão hepática são usados biomarcadores de função hepática não específicos, são avaliadas as enzimas: aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (ALP), gama glutamil transferase (GGT) e bilirrubina total (JESUS et al., 2014).

A disfunção hepática ocasionada por EAAs, pode ser avaliada como hepatocelular pelas transaminases AST e a ALT, e como colestase pelas enzimas ALP e a GGT (ANTOINE et al., 2009; JESUS et al., 2014). Em peixes são usadas com maior frequência as AST, ALT e a ALP (SOUZA et al., 2017). Em ratos tratados com decanoato de nandrolona, houve alteração dos níveis das enzimas ALT e AST sugerindo a presença de lesão hepática, visto a enzima ALT ser um indicador primário de lesão ao fígado (ANTOINE et al., 2009; SOUZA et al., 2017).

Em pacientes humanos que fizeram uso de testosterona, estanozolol, trembolona e nandrolona injetáveis, o aumento nos níveis de ALP, GGT e bilirrubina se correlacionaram com dano hepático, comprovado por histologia de fígado (BRINQUINHO et al., 2016). Todavia, geralmente as anormalidades na função hepática são reversíveis com a descontinuação do uso da droga (LISE et al., 1999).

Em peixes, a dosagem das enzimas AST e ALT permitiu a identificação de diferentes níveis de lesão celular em jundiá (*Rhamdia quelen*). Os resultados obtidos demonstraram alterações importantes nos dos peixes tratados quando comparados com os peixes controle, indicando que a exposição desses animais aos hormônios estriol e estrona é capaz de promover danos hepáticos (HARZER et al., 2015). Em juvenis de bagre Africano (*Clarias gariepinus*) foi investigado o efeito de um aditivo orgânico-mineral quelatado (contendo Fe, Mn, Cu, Zn, Co, Se e I). A análise bioquímica do sangue de peixes que receberam concentrações médias e altas dos compostos quelatados mostrou alta atividade de ALT comparado ao controle (GOLOVACHEVA, et al., 2022). Carpa comum (*Cyprinus carpio*) exposta ao lufenuron, um pesticida benzoilureia utilizado na agricultura e na veterinária, apresentou aumento nos níveis plasmáticos de ALT e AST, além de lesões histopatológicas no fígado (GHELICHPOUR et AL., 2020). Nos peixes marinhos goraz (*Pagrus major*) e rockfish preto (*Sebastes schlegelii*), foram verificadas diminuições significativas nas

atividades das enzimas hepáticas ALT e AST no grupo de peixes expostos a $10 \mu\text{gL}^{-1}$ de Diuron, ([3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilureia]) um herbicida feniluréia, usado em tintas anti-incrustantes para revestir as superfícies de cascos de navios (NAM, et al 2023).

Fêmeas adultas de *Catla catla*, um peixe ciprinídeo comum nos rios do Paquistão, foram expostas a concentrações crescentes (10, 100, 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$) de bisfenol-A (BPA), um químico antropogênico que imita as ações do estradiol 17β , usado como monômero para a produção de plástico. Nesta ocasião, foi observado aumento dependente da concentração das enzimas hepáticas AST e ALT em comparação com o controle.

3 JUSTIFICATIVA

Na fase adulta, o tambaqui apresenta dimorfismo sexual nos padrões de crescimento e ganho de peso, sendo a fêmea maior e mais pesada em relação ao macho, tanto na natureza como em cultivo. Essa diferença pode ser convertida em aumento na produtividade e rentabilidade, se lotes exclusivos de fêmeas forem utilizados na piscicultura de corte da espécie. Considerando o aumento da rentabilidade na produção de lotes monossexos de fêmeas de tambaqui e a contribuição da técnica para aumentar a produção da espécie, este trabalho teve como objetivo identificar as fases de maturação gonadal de juvenis de tambaqui para possivelmente aproveitar os peixes para a reprodução ainda mais jovens. Além disso, encontrar um andrógeno (mesterolona e/ou 17-alfa-metiltestosterona) eficaz na indução fenotípica de machos de tambaqui e ter conhecimento não só da dosagem adequada para masculinizar, mas também do impacto na fisiologia do animal. Portanto, este trabalho propõe contribuir com informações importantes para o desenvolvimento de produção de lotes monossexos, técnica que, embora utilizada há anos em escala comercial para outros peixes de valor comercial, ainda não foi adaptada para a principal espécie nativa brasileira.

4 OBJETIVOS

2.7 Objetivo Geral

Caracterizar o desenvolvimento gonadal de tambaqui e verificar a eficácia da mesterolona (M) e da 17- α -metiltestosterona (MT) na indução fenotípica de machos de tambaqui e suas possíveis toxicidades.

2.8 Objetivos Específicos

Acompanhar o desenvolvimento gonadal de juvenis de tambaqui para caracterizar as fases da espermatogênese e oogênese na espécie.

Verificar se a mesterolona induz à masculinização fenotípica de fêmeas de tambaqui.

Verificar se a 17- α -metiltestosterona (MT) induz à masculinização fenotípica de fêmeas de tambaqui.

Avaliar se a administração de hormônios esteroides anabolizantes na ração ocasiona genotoxicidade nos núcleos dos eritrócitos (MN) em tambaqui.

Avaliar se as administrações de hormônios esteroides anabolizantes na ração ocasionam hepatotoxicidade em tambaqui.

Avaliar se a administração de hormônios esteroides anabolizantes na ração alteram os parâmetros hematológicos e bioquímicos em tambaqui.

5 HIPÓTESES

H₁: Juvenis machos de tambaqui entram na puberdade mais precocemente em relação às fêmeas.

H₂: A administração de mesterolona na ração de tambaqui induz a produção de lote monossexo de machos de tambaqui (neomachos).

H₃: A administração de 17 α -metiltestosterona (MT) na ração de tambaqui induz a produção de lote monossexo de machos de tambaqui (neomachos).

H₄: A administração de andrógenos via alimentação não causa toxicidade e nem afeta os parâmetros hematológicos e bioquímicos de tambaquis.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTONI, A et al. Danazol and stanozolol in long-term prophylactic treatment of hereditary angioedema. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 65, n. 1, p. 75-79, 1980.

AHMED, G. U. et al. Trial of sex reverse percentage on female Shing (*Heteropneustes fossilis*) by using 17 β -Estradiol sex hormone. *Research in Agriculture Livestock and Fisheries*, v. 2, n. 2, p. 313-317, 2015.

ALMEIDA, F. L. et al. Early puberty of farmed tambaqui (*Colossoma macropomum*): Possible influence of male sexual maturation on harvest weight. *Aquaculture*, v. 452, p. 224-232, 2016.

ALMEIDA, F. L. et al. Puberty variances (male x female) drive harvest weight in the Amazonian tambaqui (*Colossoma macropomum*). In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON REPRODUCTIVE PHYSIOLOGY OF FISH, n° 10, 2014, Olhão. Abstract Book. Olhão, Portugal, 2014, p. 206.

ALMEIDA, F. L.; REIS, V. R.; MORAIS, I. S. Populações monosexo em peixes nativos brasileiros: iniciando o futuro. In: IX CONGRESSO NORTE E NORDESTE DE REPRODUÇÃO ANIMAL, n° 9, 2018, Belém. Anais. Belo Horizonte: Rev. Bras. Reprod. Anim., 2019, p.158-165.

ALMEIDA, J. Reversión sexual de tilapia roja (*Oreochromis niloticus*), utilizando dos tipos de andrógenos comerciales y un testigo (androil y proviron). 2014. Tese de Doutorado. Tesis de Licenciatura). Universidad Técnica de Machala.

ANTOINE, D. J. et al. Mechanism-based bioanalysis and biomarkers for hepatic chemical stress. *Xenobiotica*, v. 39, n. 8, p. 565-577, 2009.

ARAÚJO-LIMA, C.; GOMES, L. Tambaqui *Colossoma macropomum*. In: BALDISSEROTO, B.; GOMES, L. Espécies nativas para piscicultura no Brasil. Santa Maria: Editora UFSM, 2005, p. 175-202.

ARIEDE, R. B. et al. Computer vision system using deep learning to predict rib and loin yield in the fish *Colossoma macropomum*. *Animal Genetics*, n. 00, p. 1-14, 2023.

BAKER, I. J.; SOLAR, I. I.; DONALDSON, E. M. Masculinization of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) by immersion treatments using 17 α -methyltestosterone around the time of hatching. *Aquaculture*, v. 72, n. 3-4, p. 359-367, 1988.

BALLESTRERI, E. Teste de micronúcleos como ferramenta para avaliação da exposição ocupacional a pesticidas: revisão. *Revinter*, v. 10, n. 1, p. 19-28, 2017.

BAYER S.A. 2019. Proviron® (mesterolona). Comprimidos, MS1. 7056.0057. Farm. Resp.: Dra. Dirce Eiko Mimura. CRF-SP n° 16532. Fabricado por: Schering do Brasil, Química e Farmacêutica Ltda. São Paulo-SP. Bayer S.A.

BEJMA, J. P. et al. Controversies regarding testosterone supplementation in the prostate cancer patient. *Current Sexual Health Reports*, v. 2, p. 41-44, 2005.

BLÁZQUEZ, M. et al. Development of sex control techniques for European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) aquaculture: effects of dietary 17 α -methyltestosterone prior to sex differentiation. *Aquaculture*, v. 135, n. 4, p. 329-342, 1995.

BLÁZQUEZ, M. et al. Sex ratios in offspring of sex-reversed sea bass and the relationship between growth and phenotypic sex differentiation. *Journal of Fish Biology*, v. 55, p. 916-930, 1999.

BOMBARDELLI, R. A. et al. Idade de maior sensibilidade de tilápia-do-nilo aos tratamentos de masculinização por banhos de imersão. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 36, n. 1, p. 1-6, 2007.

- BOMBARDELLI, R. A.; HAYASHI, C. Masculinização de larvas de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus* L.) a partir de banhos de imersão com 17 α -metiltestosterona. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 34, n. 2, p. 365-372, 2005.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura. Brasília, 2010.
- BRINQUINHO, M. et al. Hepatotoxicidade associada ao uso de esteroides anabolizantes. *Gálicia Clínica*, v. 78, n. 2, p. 79-81, 2017.
- BÜCKER, A.; CARVALHO, W.; ALVES-GOMES, J. A. Avaliação de mutagenicidade e gentotoxicidade in *Eigenmanniavirescens* (Teleostei: Gymnotiformes) exposed to benzene. *Acta Amazonica*, v.36, n. 3, p. 357-364, 2006.
- BUENO, A. P. M. et al. Teste de micronúcleos em peixes e parâmetros físico-químicos da água da represa Cocais, Minas Gerais. *Acta Brasiliensis*, v. 1, n. 3, p. 32-36, 2017.
- BYE, V. J.; LINCOLN, R. F. Commercial methods for the control of sexual maturation in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R). *Aquaculture*, v. 57, p. 299-309, 1986.
- CESAR, M. P. et al. Métodos para obtenção de população monosexo na piscicultura. Boletim Agropecuário da Universidade Federal de Lavras, Lavras, n. 69, p. 1-27, 2004.
- CUNHA, T. S. et al. Esteroides anabólicos androgênicos e sua relação com a prática desportiva. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 40, n. 2, p. 165-179, 2004.
- CURZON, A. Y. et al. Cross-species conservation of a transposase-linked element enables genetic sexing of commercial populations of Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*). *Animal Genetics*, v. 53, n. 3, p. 441-446, 2022.
- DE MATOS, O. F. Características da frota e avaliação do desembarque de pescado na Amazônia Central. In: Vieira, T. A. D. S. et al. Engenharia de pesca: aspectos teóricos e práticos. Guarujá: Científica Digital, 2021, p. 116-137.
- DEMSKA-ZAKES, K.; ZAKES, Z. Effect of 17 α -methyltestosterone on gonadal differentiation in pikeperch, *Stizostedion lucioperca* L. *Aquaculture Research*, v. 28, n. 1, p. 59-63, 1997.
- DESPREZ, D. et al. Inheritance of sex in two pseudofemale lines of tilapia *Oreochromis aureus*. *Aquaculture*, v. 218, p. 131-140, 2003.
- DEVLIN, R. H.; NAGAHAMA, Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*, v. 208, p. 191-364, 2002.
- DONALDSON, E. M. Manipulation of reproduction in farmed fish. *Animal Reproduction Science*, v. 42, p. 381-392, 1996.
- EL-SADR, A. et al. Treatment of primary nocturnal enuresis by oral androgen mesterolone A clinical and cystometric study. *Urology*, v. 36, n. 4, p. 331-335, 1990.
- FAGHANI-LANGROUDI, H. et al. Sex reversal, mortality rate and growth performance of platy *Xiphophorus variatus* (Poeciliidae) treated by methyltestosterone. *Poeciliid Research*, v. 4, n. 1, p. 6-12, 2014.
- FAHEEM, M.; KHALIQ, S.; LONE, K. P. Effect of bisphenol-A on serum biochemistry and liver function in the freshwater fish, *Catla catla*. *Pak. Vet. J*, v. 39, n. 1, p. 1-5, 2019.
- FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Fishery and Aquaculture Statistics 2022. Roma: FAO yearbook, p. 110, 2022.

- FARIAS, R. S. et al. Effect of dosage of orally administered 17 α -methyltestosterone on sex reversion of the yellowtail tetra *Astyanax lacustris* (Lütken, 1875). *Animal Reproduction*, v. 20, p. e20220080, 2023.
- FENECH, M. et al. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 534, n. 1-2, p. 65-75, 2003.
- FERNÁNDEZ, A. B. et al. Documento básico de consenso sobre el síndrome de hipogonadismo de inicio tardío. *Endocrinología y Nutrición*, v. 55, n. 1, p. 5-28, 2008.
- FILHO, J. M et al. Efeitos da associação estro-androgênica em mulheres na pós-menopausa. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v. 27, p. 118-124, 2005.
- GAYÃO, A. L. B. A. et al. Histologia hepática e produção em tanques-rede de tilápia-do-nylo masculinizada hormonalmente ou não masculinizada. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 48, p. 991-997, 2013.
- GEORGE, T.; PANDIAN, T. J. Dietary administration of androgens induces sterility in the female-heterogametic black molly, *Poecilia sphenops* (Cuvier & Valenciennes, 1846). *Aquaculture Research*, v. 29, p. 167-175, 1998.
- GHAPHERY, N. A. Performance-enhancing drugs. *Orthopedic Clinics of North America*, v. 26, n. 3, p. 433-442, 1995.
- GHELICHPOUR, M. et al. Plasma antioxidant and hepatic enzymes activity, thyroid hormones alterations and health status of liver tissue in common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to lufenuron. *Aquaculture*, v. 516, p. 734634, 2020.
- GHIRALDELLI, L. et al. Desenvolvimento gonadal do jundiá, *Rhamdia quelen* (Teleostei, Siluriformes), em viveiros de terra, na região sul do Brasil. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, v. 29, n. 4, p. 349-356, 2007.
- GOLOVACHEVA, N. A. et al. O cultivo de peixes em um sistema de recirculação de aquicultura (RAS) e os vários fatores de estresse que afetam diretamente sua condição fisiológica. *Brazilian Journal of Biology*, v. 84, 2022.
- GOLOVACHEVA, N. A. et al. O cultivo de peixes em um sistema de recirculação de aquicultura (RAS) e os vários fatores de estresse que afetam diretamente sua condição fisiológica. *Brazilian Journal of Biology*, v. 84, 2022.
- GRISOLIA, C. K. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 518, n. 2, p. 145-150, 2002.
- HACKEL, C. et al. Deficiência de 5 α -redutase tipo 2: experiências de Campinas (SP) e Salvador (BA). *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 49, p. 103-111, 2005.
- HANDELSMAN, D. J. Performance Enhancing Hormones in Sports Doping. *In: Endocrinology: Adult and Pediatric*. 7th Edition. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders, 2016, p. 441-444.
- HARZER, B.; STIPP, M. C.; HERRERIAS, T. Avaliação da função hepática de peixes *Rhamdia quelen* expostos aos desreguladores endócrinos estriol e estrona. *Revinter*, v. 8, n. 1, p. 82-99, 2015.
- HAUGEN, T. et al. The production of hermaphrodites of Atlantic cod (*Gadus morhua*) by masculinization with orally administered 17- α -methyltestosterone, and subsequent production of all-female cod populations. *Aquaculture*, v. 311, n. 1-4, p. 248-254, 2011.
- HEDDLE, J. A. A rapid in vivo test for chromosomal damage. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, v. 18, n. 2, p. 187-190, 1973.

- HOBBERMAN, J. M.; YESALIS, C. E. The history of synthetic testosterone. *Scientific American*, v. 272, n. 2, p. 76-81, 1995.
- HOGA, C. A. et al. Development and validation of an analytical method for the determination of 17 β -estradiol residues in muscle of tambaqui (*Colossoma macropomum* Cuvier, 1818) by LC-MS/MS and its application in samples from a fish sexual reversion study. *Journal of Chromatography B*, v. 1128, p. 121774, 2019.
- HUNTER, G. A. et al. Production of monosex female groups of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) by the fertilization of normal ova with sperm from sex-reversed females. *Aquaculture*, v. 33, p. 355-364, 1983.
- IBGE, Produção da Pecuária Municipal 2021; Rio de Janeiro: IBGE, 2022.
- IZEL, A. C. U. et al. Produção intensiva de tambaqui em tanques escavados com aeração. Circular técnica. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, n. 39, p. 4, 2013.
- JESUS, G. C.; SOUSA, H. H. B. A.; BARCELOS, R. S. S. Principais patologias e biomarcadores das alterações hepáticas. *Revista EVS-Revista de Ciências Ambientais e Saúde*, v. 41, n. 3, 2014.
- KARSLI, Z. et al. The Effect of Dietary Supplementation of 17 α -Methyltestosterone and 17 β -Estradiol Hormones on Growth, Sex Conversion and Reproduction in Electric Yellow Cichlid (*Labidochromis caeruleus*). *Pakistan J. Zool.*, p. 1-6, 2021.
- KAVUMPURATH, S.; PANDIAN, T. J. Production of an YY female guppy, *Poecilia reticulata*, by endocrine sex reversal and progeny testing. *Aquaculture*, v. 118, p. 183-189, 1993.
- KICMAN, A. T. Pharmacology of anabolic steroids. *British journal of pharmacology*, v. 154, n. 3, p. 502-521, 2008.
- KIRANKUMAR, S.; PANDIAN, T. J. Effect on growth and reproduction of hormone immersed and masculinized fighting fish *Betta splendens*. *Journal of Experimental Zoology*, v. 293, n. 6, p. 606-616, 2002.
- KUZMINSKI, H.; DOBOSZ, S. Effect of sex reversal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) using 17-methyltestosterone and 11-hydroxyandrostenedione. *Arch. Pol. Fish.* v. 18, p. 45-49, 2010.
- LEE, P.; KING, H.; PANKHURST, N. Preliminary assessment of sex inversion of farmed Atlantic salmon by dietary and immersion androgen treatments. *North American Journal of Aquaculture*, v. 66, n. 1, p. 1-7, 2004.
- LISE, M. L. Z. et al. O abuso de esteroides anabólico-androgênicos em atletismo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 45, p. 364-370, 1999.
- LUCKENBACH, J. A.; FAIRGRIEVE, W. T.; HAYMAN, E. S. Establishment of monosex female production of sablefish (*Anoplopoma fimbria*) through direct and indirect sex control. *Aquaculture*, v. 479, p. 285-296, 2017.
- LUKAS, S. E. CNS effects and abuse liability of anabolic-androgenic steroids. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v. 36, n. 1, p. 333-357, 1996.
- LUKAS, S. E. Current perspectives on anabolic-androgenic steroid abuse. *Trends in pharmacological sciences*, v. 14, n. 2, p. 61-68, 1993.
- MAINARDES-PINTO, C. S. R. et al. Masculinização da tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, utilizando diferentes rações e diferentes doses de 17alfa-metiltestosterona. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 29, p. 654-659, 2000.
- MARQUES, A. C. P. R. et al. Abuso e Dependência de Anabolizantes. Autoria: Associação Brasileira de Psiquiatria Sociedade Brasileira de Pediatria Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia. 2012, p.14.

- MELLO, S. C. R. P.; DE OLIVEIRA, E. C. P.; DE SEIXAS FILHO, J. T. Aspectos da aquicultura e sua importância na produção de alimentos de alto valor biológico. *Semioses*, v. 11, n. 2, p. 28-34, 2017.
- MICAEL, J. et al. Genotoxic effects of binary mixtures of xenoandrogens (tributyltin, triphenyltin) and a xenoestrogen (ethinylestradiol) in a partial life-cycle test with Zebrafish (*Danio rerio*). *Environment international*, v. 33, n. 8, p. 1035-1039, 2007.
- MINISSI, S.; CICCOTTI, E.; RIZZONI, M. Micronucleus test in erythrocytes of *Barbus plebejus* (Teleostei, Pisces) from two natural environments: a bioassay for the in situ detection of mutagens in freshwater. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, v. 367, n. 4, p. 245-251, 1996.
- MOHAMED, H. A. O. The Use of Sex Hormone in Sex Reversal of *Oreochromis niloticus*. *Journal of Aquatic Science and Marine Biology*, v. 2, n. 1, p. 1-7, 2019.
- MORAIS, I. S. M. Avaliação da influência da temperatura e do Ph na determinação sexual do tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). 2016. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2016.
- MORAIS, I. S.; O'Sullivan, F. L. A. Biologia, habitat e cultivo do tambaqui *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1816). *Scientia Amazonia*, v. 6, n. 1, p. 81-93, 2017.
- MORAIS, I. S.; REIS, V. R.; ALMEIDA, F. L. The influence of the water pH on the sex ratio of tambaqui *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818). *Aquaculture Reports*, v. 17, p. 100334, 2020.
- MOUSAVI-SABET, H. et al. The effect of 17-alpha methyl testosterone on masculinization, mortality rate and growth in convict cichlid (*Cichlasoma nigrofasciatum*). *World Journal of Fish and Marine Sciences*, v. 3, n. 5, p. 422-426, 2011.
- MOUSAVI-SABET, H.; LANGROUDI, H. F.; ROHANIRAD, M. Sex reversal, mortality rate and growth of guppy (*Poecilia reticulata*) affected by 17-alpha methyltestosterone. *Poeciliid Research*, v. 2, n. 1, p. 1-8, 2012.
- NAGY, A.; BERCSENYI, M.; CSANYI, V. Sex reversal in carp (*Cyprinus carpio*) by oral administration of methyltestosterone. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, v. 38, n. 6, p. 725-728, 1981.
- NAKAGHI, L. S. O. et al. Morphometry and morphology of nucleus of the Sertoli and interstitial cells of the tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1881) (Pisces: Characidae) during the reproductive cycle. *Brazilian Journal of Biology*, v. 63, p. 97-104, 2003.
- NAM, S. E. et al. Chronic effects of environmental concentrations of antifoulant diuron on two marine fish: Assessment of hormone levels, immunity, and antioxidant defense system. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 263, p. 109510, 2023.
- NWACHUKU, V. N. Use of proviron tablets as source of androgen for sex reversal of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus 1758), *In: 27th Annual Conference and Biennial General Meeting of the Fisheries Society of Nigeria*. FISON, Bayelsa, pp. 64-70.
- OMOTO, N. et al. Effects of estradiol-17 β and 17 α -methyltestosterone on gonadal sex differentiation in the F2 hybrid sturgeon, the bester. *Fisheries Science*, v. 68, n. 5, p. 1047-1054, 2002.
- OYIN, O.; OLUGBEMI, E. V.; OLA, A. G.; Production of all male fingerlings through feeding of androgenic steroid (Mesterolone) in the diet fed as first food to tilapia *Oreochromis niloticus*, *In: 22nd Annual Conference of the Fisheries Society of Nigeria*. FISON, Kebbi, pp. 258-263.
- PANDIAN, T. J.; SHEELA, S. G. Hormonal induction of sex reversal in fish. *Aquaculture*, v. 138, n. 1-4, p. 1-22, 1995.
- PEIXE, BR. Anuário Peixe BR da piscicultura 2023. São Paulo: Associação Brasileira de Piscicultura, 2023.

- PENNA, M. A. H. et al. Growth of the tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier) (Characiformes: Characidae): which is the best model? *Brazilian Journal of Biology*, v. 65, n. 1, p. 129-139, 2005.
- PIFERRER, F. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. *Aquaculture*, v. 197, p. 229-281, 2001.
- PIFERRER, F.; LIM, L. C. Application of sex reversal technology in ornamental fish culture. *Aquarium Sciences and Conservation*, v. 1, n. 2, p. 113-118, 1997.
- PORTO, J. I. R.; ARAÚJO, C. S. O.; FELDBERG, E. Mutagenic effects of mercury pollution as revealed by micronucleus test on three Amazonian fish species. *Environmental Research*, n. 97, p. 287-292, 2005.
- RAMEE, S. W.; LIPSCOMB, T. N.; DIMAGGIO, M. A. Effects of 17 α -methyltestosterone feeding and immersion on masculinization of rosy barbs *Pethia conchonius* and dwarf gouramis *Trichogaster lalius*. *Journal of the World Aquaculture Society*, v. 51, n. 6, p. 1341-1353, 2020.
- RANZANI-PAIVA, M. J. T.; TAKEMOTO, R. M.; LIZAMA, M. A. P. Sanidade de organismos aquáticos. *In*: RANZANI-PAIVA, M. J. T.; SILVA-SOUZA, A.T., *Hematologia de peixes brasileiros*. São Paulo: Varela, 2004.
- REIS, V. R.; ALMEIDA, F. L. Effect of 17 β -oestradiol on the sex ratio of tambaqui, *Colossoma macropomum*. *Aquaculture Research*, v. 50, n. 1, p. 154-161, 2018.
- REIS, V. R.; ALMEIDA, F. L.; PIFERRER, F. Produção de populações monossexo em peixes. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 40, n. 1, p. 22-28, 2016.
- RIBEIRO, D. L.; BARCELOS, G. R. M.; D'ARCE, L. P. G. Genotoxic effects of water from São Francisco River, Brazil, in *Astyanax paranae*. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, v. 93, n. 3, p. 274-279, 2014.
- RIVERO, C. L. G. Perfil da frequência de micronúcleos e de danos no DNA de diferentes espécies de peixes do Lago Paranoá, Brasília-DF, Brasil. 2007. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília, Brasília, 2007.
- RIVERO-WENDT, C. L. G. et al. Steroid androgen 17 alpha methyltestosterone used in fish farming induces biochemical alterations in zebrafish adults. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, v. 55, n. 11, p. 1321-1332, 2020.
- SALVAGNI, J. I.; TERNUS, R. Z.; FUENTEFRIA, A. M. Assessment of the genotoxic impact of pesticides on farming communities in the countryside of Santa Catarina State, Brazil. *Genetics and molecular biology*, v. 34, n. 1, p. 122-126, 2011.
- SANCHES, E. G.; OLIVEIRA, I. R.; SERRALHEIRO, P. C. S. Inversão sexual da garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus*. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v. 10, p. 198-209, 2009.
- SCHMID, W. The micronucleus test. *Mutation Research Amsterdam*. v. 31, p. 9-15, 1975.
- SEKI, M. et al. Fish full life cycle testing for androgen methyltestosterone on medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, v. 23, n. 3, p. 774-781, 2004.
- SILVA, A. A., et al. Avaliação clínica de *Rattus norvegicus* após terapia antiinflamatória com inibidor seletivo ou não para cox-2 por extrapolação alométrica. 2004. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2004.
- SILVA, A. S. E.; LIMA, J. T.; BLANCO, Q. S. Hematologia em peixes (revisão bibliográfica). *Revista Centauro*, v. 3, n. 1, p. 24-32, 2012.
- SINGH, A. K. Introduction of modern endocrine techniques for the production of monosex population of fishes. *General and Comparative Endocrinology*, v. 181, p. 146-155, 2013.

- SOUZA, I. P. et al. Toxicidade hepática no organismo de ratos Wistar machos causados por pró-hormonal. *Revista Eletrônica FACIMEDIT*, v. 6, n. 1, 2017.
- SOUZA, J. S. L.; ALMEIDA, F. L. Desenvolvimento gonadal de tambaqui *Colossoma macropomum*. In: IX Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental, nº 9, Manaus, Anais. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2012, 100 - 320 p.
- SPONCHIADO, G. et al. Genotoxic effects in erythrocytes of *Oreochromis niloticus* exposed to nanograms-per-liter concentration of 17 β -estradiol (E₂): an assessment using micronucleus test and comet assay. *Water, Air, & Soil Pollution*, v. 218, p. 353-360, 2011.
- SULAEMAN, A. B.; FOTEDAR, R. Masculinization of silver perch (*Bidyanus bidyanus* Mitchell 1838) by dietary supplementation of 17 α -methyltestosterone. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, v. 43, n. 1, p. 109-116, 2017.
- SUSANTO, G. N. et al. Genital reversal of betta fish by immersion using steroid extract of sea urchins. In: IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. IOP Publishing, 2021. p. 012057.
- TAKAHASHI, H. Rmctional Masculinization of Female Guppies, *Poecilia reticulata*, Influenced by Methyltestosterone before Birth. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, v. 41, n. 5, p. 499-506, 1975.
- TELES, M.; PACHECO, M.; SANTOS, M. A. *Sparus aurata* L. liver EROD and GST activities, plasma cortisol, lactate, glucose and erythrocytic nuclear anomalies following short-term exposure either to 17 β -estradiol (E₂) or E₂ combined with 4-nonylphenol. *Science of the total environment*, v. 336, n. 1-3, p. 57-69, 2005.
- TURAN, F.; ÇEK, Ş.; ATIK, E. Production of monosex male guppy, *Poecilia reticulata*, by 17 α -methyltestosterone. *Aquaculture Research*, v. 37, n. 2, p. 200-203, 2006.
- TURRA, E. M et al. Controle reprodutivo em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) por meio de manipulações sexuais e cromossômicas. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 34, p. 21-28, 2010.
- VALENTE, D. et al. Utilização de biomarcadores de genotoxicidade e expressão gênica na avaliação de trabalhadores de postos de combustíveis expostos a vapores de gasolina. *Revista Brasileira de Saúde Ocupacional*, v. 42, n. 1, p. 1-21, 2017.
- VARELA, E. S. et al. A high-density linkage map and sex-linked markers for the Amazon Tambaqui *Colossoma macropomum*. *BMC genomics*, v. 22, n. 1, p. 1-10, 2021.
- VARELA, E. S. et al. Preliminary data on the sex ratio in full-sib families of tambaqui *Colossoma macropomum*. In: 11th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON REPRODUCTIVE PHYSIOLOGY OF FISH, nº 11, 2018, Manaus. Abstract Book. Manaus, Amazonas, 2014.
- VILLACORTA-CORREA, M. A.; SAINT-PAUL, U. Structural indexes and sexual maturity of tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) (Characiformes: Characidae) in central Amazon, Brazil. *Revista Brasileira de Biologia*, v. 59, p. 637-652, 1999.
- WASSERMANN, G. J.; AFONSO, L. O. B. Sex reversal in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus) by androgen immersion. *Aquaculture Research*, v. 34, n. 1, p. 65-71, 2003.
- WEISS, L. A. Inversão sexual em jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy e Gaimard, 1824): masculinização com 17alfa-metiltestosterona e feminilização indireta, 2016. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.
- XU, D. et al. Production of neo-males from gynogenetic yellow drum through 17 α -methyltestosterone immersion and subsequent application for the establishment of all-female populations. *Aquaculture*, v. 489, p. 154-161, 2018.

YASUI, G. S. et al. Masculinização de três linhagens de tilápias do Nilo utilizando o andrógeno sintético 17-á-metil-testosterona. *Zootecnia Tropical*, v. 25, n. 4, p. 307-310, 2007.

YESALIS, C. E.; BHRKE, M. S. Anabolic-androgenic steroids and related substances. *Current Sports Medicine Reports*, v. 1, n. 4, p. 246-252, 2002.

ZHAI, G. et al. Successful production of an all-female common carp (*Cyprinus carpio* L.) population using cyp17a1-deficient neomale carp. *Engineering*, v. 8, p. 181-189, 2022.

Capítulo I

A ser submetido à revista

Aquaculture International

Journal of the European Aquaculture Society

Avaliação da puberdade de tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier, 1818)

Iraní da Silva de Moraes¹, Aldessandro da Costa Amaral¹, Rosilane Gomes de Souza de Oliveira¹, Vanessa Ribeiro Reis², Gabriela Brambila de Souza³, Karina Priscila Bichara⁴, Gabriela Tomas Jerônimo¹, Fernanda L. A. O'Sullivan⁵

¹Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil

²Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil

³Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas, Campus Presidente Figueiredo, Amazonas, Brasil

⁴Pós graduação em Instituto de Ciência, Tecnologia e Qualidade (ICTQ), Anápolis, Goiás, Brasil

⁵Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, Amazonas, Brasil

Autor Correspondente: Fernanda Loureiro de Almeida O'Sullivan; Email: fernanda.almeida@embrapa.br

Resumo

A aquicultura reduz os impactos da exploração de peixes dos recursos naturais, além de oferecer proteína animal de excelente qualidade. O meio ideal para aumentar a produção da aquicultura inicia com a escolha assertiva da espécie a ser produzida, que deve ser adaptada à região, apresentar boa adaptabilidade ao cultivo e aceitação no mercado consumidor. O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é uma espécie nativa da Amazônia que se qualifica nessas características para a produção no Norte do Brasil e países vizinhos. Neste sentido, caracterizar a fisiologia reprodutiva do tambaqui é importante não só como informação para auxiliar na preservação dos estoques naturais da espécie, mas também para o desenvolvimento de novas tecnologias de produção, como populações monosexo, por exemplo. Neste estudo, acompanhamos o desenvolvimento e a maturação gonadal de machos e fêmeas de tambaqui dos 5 aos 32 meses de idade. Para isso, 200 peixes foram microchipados e soltos em tanque escavado, e a cada dois meses 6 animais eram capturados para a realização de biometria, coleta de sangue (para dosagem de esteroides sexuais e variáveis do sangue), de fígado (para estimativa do índice hepatossomático) e das gônadas (para cálculo do índice gonadossomático e identificação da fase do desenvolvimento gonadal por histologia). As variáveis do sangue foram semelhantes entre machos e fêmeas e os dados de histologia combinados aos de concentração plasmática de esteroides sexuais indicaram que machos e fêmeas iniciaram a puberdade aos 7 e 11 meses de idade, respectivamente. As fêmeas foram mais tardias que os machos em todas as fases de desenvolvimento gonadal, e inferimos que a reduzida diferença no peso das fêmeas em comparação com os machos está relacionada com taxa de arraçoamento inadequada no decorrer do estudo.

Palavras chaves: Epermatogênese. Gametogênese. Meiose. Puberdade. Tambaqui.

Abstract

Aquaculture reduces the impacts of fish exploitation on natural resources, in addition to offering high quality meat. The ideal way to develop aquaculture production starts with the assertive choice of the species to be farmed, which must be adapted to the region, present good adaptability to cultivation and acceptance in the consumer market. The tambaqui (*Colossoma macropomum*) is a species native to the Amazon that qualifies for these characteristics for production in northern Brazil and neighboring countries. Hence, characterizing the reproductive physiology of tambaqui is important not only as information to help preserve the species' natural stocks, but also for the development of new production technologies, such as monosex populations, for example. In this study, we followed the development and gonadal maturation of tambaqui males and females from 5 to 32 months of age. For this, 200 fish were tagged and released into an earthen pond. Every two months 6 animals were randomly sampled for biometrics, collection of blood (to measure sex steroids), liver (to estimate the hepatosomatic index) and gonads (to calculate the gonadosomatic index and identify the stage of gonadal development by histology). Histology data combined with plasma sex steroid concentrations indicated that males and females started puberty at 7 and 11 months of age, respectively. Females were later than males in all phases of gonadal development, and we believe that the reduced difference in female weight compared with male's is related to a deficient feeding rate provided during the study.

Keywords: Gametogenesis. Meiosis. Puberty. Spermatogenesis. Tambaqui.

1 Introdução

A reprodução é o evento fisiológico fundamental para a manutenção das espécies. Entretanto, os mecanismos que controlam o início da puberdade ainda não são totalmente elucidados nos vertebrados, uma vez que existem grandes variações entre as classes (Chen e Ge, 2013; Daí et al. 2021). Considerando-se os peixes, o assunto é ainda mais complexo, pois o momento, a idade e o tamanho de início na puberdade, bem como os hormônios envolvidos e as formas de gametogênese, variam entre espécies e até mesmo linhagens, sendo moduladas por uma combinação de fatores genéticos e ambientais (Taranger et al, 2010; Volkoff e London, 2018).

Para estar apto a reprodução, o indivíduo necessita passar por diferentes etapas de desenvolvimento até alcançar a puberdade (Chen e Ge, 2013). Na fase embrionária, as células germinativas primordiais (PGCs) migram para a crista gonadal e se dispõem entre as células somáticas, proliferam-se por mitose, constituindo o primórdio gonadal (Nakamura et al. 1998; Braat et al. 1999; Kobayashi et al. 2013). Posteriormente, ainda em fase imatura, os testículos são pequenos, transparentes, filiformes e sem lúmen nos túbulos seminíferos, apresentando apenas espermatogônias isoladas do tipo A (diferenciadas e indiferenciadas), envolvidas pelas células de Sertoli (Schulz et al. 2010; Brown-Peterson et al. 2011). Já os ovários imaturos são pequenos e transparentes, e não apresentam vasos sanguíneos distinguíveis. O parênquima geralmente se distingue entre epitélio germinativo e estroma. No compartimento germinativo, restrito às lamelas ovígeras, estão presentes as oogônias (geralmente em grupos e envolvidas pelas células pré-foliculares) e oócitos pré-vitelogênicos. Nesta fase, a parede ovariana é bastante fina e há pouco espaço entre os oócitos (Brown-Peterson et al. 2011; Quagio-Grassiotto et al. 2013).

Morfologicamente, o início da puberdade é percebido pelo aparecimento de cistos de espermatócitos nos machos (espermatogênese) (Schulz et al. 2010) e pelo aparecimento de oócitos alvéolo corticais (AC) nas fêmeas (vitelogênese) (Patiño e Sullivan 2002; Nocillado e Elizur, 2008). A espermatogênese é constituída por três fases: (a) proliferação mitótica de espermatogônias; (b) meiose de espermatócitos e; (c) espermiogênese que é a diferenciação de espermátides em espermatozoides (Schulz e Miura, 2002). E a oogênese pode ser descrita em seis etapas: (a) formação de PGCs; (b) transformação de PGCs em oogônias (diferenciação sexual); (c) transformação da oogônia em oócitos (início da meiose); (d) crescimento de oócitos no estágio de parada meiótica; (e) retomada da meiose (maturação) e; (f) expulsão do oócito maduro de seu folículo (ovulação) (Patiño e Sullivan, 2002).

O principal fator que coordena todos esses processos ao início da puberdade é a ativação do eixo hipotálamo - hipófise - gonada (BPG) (Nocillado e Elizur, 2008; Taranger et al. 2010). Conjuntamente, as condições ambientais externas e internas, juntamente com as condições corporais do indivíduo, são os principais ativadores deste eixo. Ao início do recrutamento reprodutivo, o hipotálamo produz e libera em pulsos regulares o hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) que estimula a síntese e liberação de gonadotrofinas (Gths) pela hipófise. As Gths, hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH), caem na circulação e atuam principalmente nas gônadas, regulando toda a produção de esteroides gonadais (andrógenos, estrógenos e progestágenos) e gametas (espermatozoides e oócitos), dando início ao período púbere (Taranger et al. 2010; Mylonas et al. 2010; Gabilondo et al. 2022). Esse processo requer uma grande quantidade de reserva energética para atender as necessidades nutricionais e metabólicas demandadas nessa fase (Taranger et al. 2010; Volkoff e London, 2018; Daí et al. 2021).

Durante o processo de maturação sexual, além das Gths, os esteroides sexuais também são importantes mediadores da regulação endócrina do eixo BPG e atuam, via células somáticas, como uma unidade funcional nesse processo. Em geral, a testosterona é responsável pelo desenvolvimento dos testículos e das características sexuais secundárias em machos (Schulz et al. 2010). Além disso, os peixes produzem a 11-cetotestosterona (11-KT), que é um andrógeno não aromatizável responsável pelo comportamento reprodutivo dos machos (Schulz et al. 2010; Snaterse et al. 2021). O estradiol atua na proliferação das oogônias por mitose, e na indução da síntese e secreção hepática da vitelogenina (Lubzens et al. 2010; Yaron e Levavi-Sivan, 2011). Enquanto que a progesterona atua na fase de maturação final dos gametas (Lubzens et al. 2010). A esteroidogênese gonadal é fundamental para sincronizar vários estágios reprodutivos, incluindo o desenvolvimento sexual, crescimento e amadurecimento (Tenugu et al. 2021) e por isso são utilizados como importantes sinalizadores do estágio de maturação gonadal nas diferentes espécies de peixes.

Os índices hepatossomático (IHS) e gonadossomático (IGS) auxiliam na identificação das fases do ciclo reprodutivo dos peixes, pois a proliferação e maturação das células germinativas implicam em aumento exponencial do peso das gônadas (Bazzoli e Godinho, 1991; Vazzoler, 1996). O IHS está diretamente relacionado à mobilização de reservas energéticas necessárias para o processo de vitelogênese nas fêmeas (Reidel et al. 2010).

Para aumentar a produção da aquicultura, a escolha assertiva da espécie a ser produzida é fator essencial, em se considerando a aceitação no mercado consumidor e a adaptação às condições locais para o seu cultivo. Na região Norte do Brasil, o tambaqui é tradicionalmente o peixe mais valorizado. Além disso, apresenta condições altamente favoráveis ao seu cultivo como boa adaptabilidade a diferentes sistemas produtivos, crescimento rápido, e boa tolerância a condições extremas (revisado em Hilsdorf et al. 2023). Nas outras regiões do Brasil a espécie é muito utilizada para formar híbridos redondos, que apresentam características produtivas excelentes nestas regiões mais frias. Embora o tambaqui seja a principal espécie nativa da aquicultura brasileira, ainda faltam informações científicas sobre seu desenvolvimento reprodutivo, principalmente na fase da puberdade (Almeida et al. 2016). Dentre as variáveis que envolvem o gerenciamento dos recursos pesqueiros e do manejo reprodutivo da espécie, a reprodução é um dos parâmetros de maior relevância (Lowere-Barbieri et al. 2011). Para melhor elucidar as decisões referentes aos recursos pesqueiros e ao manejo reprodutivo da espécie, descrevemos as fases reprodutivas do tambaqui, através da caracterização da gametogênese através da histologia gonadal, análises hematológicas, dos níveis plasmáticos dos esteroides, e dos índices hepato e gonadossomático.

2 Material e Métodos

2.1 Declaração de ética

Todos os procedimentos deste trabalho estão de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) – Embrapa Amazônia Ocidental (nº 02/2021, SEI 21158.000868/2021-29). O projeto possui Autorização de Acesso ao Patrimônio Genético sob o registro A5784B5.

2.2 Peixes e condições de cultivo

Juvenis de tambaqui com 30 dias pós eclosão foram adquiridos no Centro de Tecnologia, Treinamento e Produção em Aquicultura de Balbina – CTTPA – Presidente Figueiredo, Brasil (1° 55'10.01" S; 59° 27'54.67" W) e transferidos para o campo experimental da Embrapa Amazônia Ocidental, AM 010, Km 29, Manaus-AM (2° 53'27,0" S; 59°58'11,9" W). Os animais foram alocados em um tanque de alvenaria com capacidade de 5 mil litros de água e alimentados com ração comercial com 45% de proteína bruta (PB),

durante 120 dias. Após isso, 200 peixes foram microchipados e soltos em tanque escavado de 1000 m² (20m x 50 m), onde permaneceram até aos 32 meses de idade. A densidade inicial foi de 2 peixes/m² e a alimentação ofertada foi ração comercial de 32% proteína bruta (PB), duas vezes ao dia. A cada biometria, sempre que possível, o arraçoamento foi ajustado 10% da biomassa do tanque e ao completar 12 meses de cultivo passou a ser 1,5 % da biomassa. Importante salientar que do 21º ao 27º mês a alimentação ocorreu de forma reduzida apenas para manutenção dos animais, devido a Pandemia do Covid 19, houve uma diminuição na alimentação dos peixes devido ao número reduzido de funcionários durante as situações de isolamento social.

2.3 Biometria e coleta das amostras

A primeira biometria foi realizada com 150 dias após a eclosão, período em que a espécie já se diferenciou sexualmente, e posteriormente ocorreu a cada dois meses até o vigésimo primeiro mês. Devido ao período da pandemia, as biometrias ficaram suspensas durante quatro meses. O retorno das atividades biométricas ocorreu no vigésimo quinto mês após a eclosão e a partir da vigésima sétima, passaram a ocorrer mensalmente até o trigésimo segundo mês.

Em cada biometria, seis peixes foram selecionados de forma aleatória e sedados com benzocaína (4-Aminobenzoato de etilo), diluída a 250 mg.L⁻¹ de água (Gomes et al. 2001; CONCEA, 2018). Durante a biometria foram obtidas as medidas de comprimento padrão (CP; cm), comprimento total (CT; cm) e peso (g), e posteriormente, foi realizada a coleta de sangue por punção da veia caudal. Em seguida, os peixes foram sedados profundamente e submetidos à perfuração intracranial, para a realização da incisão ventral e retirada do fígado e das gônadas para posterior pesagem.

O peso das amostras de fígado foi utilizado para o cálculo do índice hepatossomático (peso do fígado/peso corporal) x 100], e das gônadas para o cálculo do índice gonadosomático (peso das gônadas/peso corporal) x 100].

2.4 Análise de esteroides

Os esteroides 17 β -estradiol (E₂) e testosterona (T) foram quantificados por ELISA, com kits comerciais (IBL® International; Hamburg, Germany). As análises foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram testadas para acerto da diluição, e não foi necessário diluir. O limite de detecção do teste é de 45,2 pg.mL⁻¹ para E₂ e de 0,12 pg.mL⁻¹ para T. A absorbância foi medida utilizando um leitor de microplacas

(Spectra Max 250 Molecular Devices, California, United States of America) em 450 nm. As amostras foram realizadas em duplicata de acordo com instruções do fabricante. O coeficiente de variação intra-ensaio (CV) (18,0%) foi calculado considerando as duplicatas das amostras na mesma placa, enquanto o CV inter-ensaio foi calculado considerando as amostras analisadas em diferentes placas (17,5%).

2.5 Variáveis hematológicas

O sangue foi coletado com seringa e agulha enxaguadas com EDTA 10% (ácido etilenodiamino tetra-acético), logo após a sedação. Foram determinados o hematócrito, seguindo o método de Goldenfarb et al. (1971), a concentração de hemoglobina, de acordo com Drabkin (1948) e a contagem do número de eritrócitos, conforme Collier (1944).

2.6 Análise histológica das gônadas

Para avaliação da fase do desenvolvimento gonadal, um pequeno fragmento do tecido gonadal foi fixado em solução tamponada de glutaraldeído 5% por 24 horas, processadas e incluídas em glicol metacrilato (Leica®; Heidelberg, Alemanha) conforme rotina do laboratório de fisiologia vegetal da EMBRAPA Amazônia Ocidental. Os cortes de 4 µm de espessura foram então montados e corados com azul de toluidina (1%) bórax (1%), para identificação das fases reprodutivas de acordo com o sexo.

2.7 Classificação das fases reprodutivas do tabaqui

Para classificar as fases reprodutivas do tabaqui foi utilizada a classificação de Brown-Peterson et al. (2011), conforme segue, para os machos: i) imaturo - quando o indivíduo nunca desovou e abrange a fase anterior a fase reprodutiva, ii) desenvolvimento, com subfase em desenvolvimento inicial, (iii) apto à desova, com subfase chamada liberação de esperma, (iv) a fase de regressão com o término da liberação do esperma, os testículos são pequenos e flácidos, e não libera esperma sob pressão e, (v) regeneração, indivíduos sexualmente maduro e reprodutivamente inativo em que o lúmen dos túbulos seminíferos não é detectável ou é discreto, com espermatogônias em proliferação por todo testículo e o epitélio seminífero é contínuo e apresentando ou não espermatocistos.

E para as fêmeas ocorrem às fases: i) imatura - quando o animal nunca desovou e abrange a fase anterior a fase reprodutiva, ii) desenvolvimento, com subfase em desenvolvimento inicial, o ovário ainda não está pronto para desova, (iii) apta para desovar em termos de desenvolvimento e fisiológico, com subfase de desova ativa apresentando

oócitos em maturação final, ovulando ou folículos pós-ovulatórios, (iv) a fase de regressão com o término da desova, ovário flácidos e, (v) regeneração, indivíduos sexualmente maduro e reprodutivamente inativo, com ovários pequenos com parede ovariana espessa e com presença apenas de oogônias, oócitos profásicos iniciais e oócitos pré-vitelogênicos em crescimento primário.

2.8 Parâmetros físico e químicos da água

Durante o experimento, mensalmente, algumas variáveis de qualidade da água foram analisadas, sendo elas: temperatura $29,5 \pm 0,9$ (°C), pH $7,5 \pm 0,6$, oxigênio dissolvido $6,6 \pm 1,2$ mg.L⁻¹, amônia $0,2 \pm 0,2$ mg.L⁻¹, nitrito $0,1 \pm 0,1$, mg.L⁻¹, alcalinidade $21,5 \pm 7,5$ mg.L⁻¹ e dureza $29,5 \pm 9,9 \pm$ mg.L⁻¹. Os valores encontrados pelas variáveis estão dentro dos índices aceitáveis para criação de tambaqui.

2.9 Estatística

Os dados de biometria, parâmetros sanguíneos, índice gonadosomático e índice hepatossomático foram avaliados qualitativamente para cada grupo. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média (SEM). As diferenças entre as médias foram avaliadas usando análise de teste-t de student para comparar as médias de dois grupos (machos e fêmeas). As diferenças foram consideradas significativas em $p < 0,05$. As análises foram realizadas no software GraphPad Prism 9.

3 Resultados

3.1 Biometria

Na primeira biometria, no quinto mês de idade, os juvenis estavam com tamanho médio de $13,7$ cm \pm $1,3$ cm de CP, $16,9$ cm \pm $1,6$ cm de CT e o peso médio de $96,6$ g \pm $27,7$ g. E a última biometria, com os peixes já adultos, foi realizada no trigésimo segundo mês de idade (Figura 1), nessa coleta os machos estavam medindo 40 cm \pm $1,41$ cm CP, 47 cm \pm $1,41$ cm CT e pesavam $2042,5$ g \pm $173,24$ g, e as fêmeas estavam medindo $39,85$ cm \pm $2,43$ cm CP, $46,75$ cm \pm $2,5$ cm e pesavam $2272,5$ g \pm $404,28$ g.

Não houve diferença significativa entre machos e fêmeas durante o experimento, sendo que: a) a média total do comprimento padrão para os machos foi de $29,91$ cm \pm 14 cm e das fêmeas de 31 cm \pm $7,9$ cm, com o valor de $p = 0,6932$; b) a média total para o comprimento total para os machos foi de $35,54 \pm 5,2$ cm e das fêmeas de $36,94$ cm $\pm 5,1$ cm, com o valor de $p = 0,6687$ e c) a média total do peso para machos foi de $1024,1$ cm ± 34 g e

das fêmeas foi de $1170,9 \text{ g} \pm 5 \text{ g}$, com o valor de $p = 0,5657$. Porém, vale ressaltar que em relação ao peso, as fêmeas apresentaram-se mais pesadas que os machos nos meses 31 (22,37%) e 32 (10,78%) apenas em percentual, sem significância estatística (Figura 1).

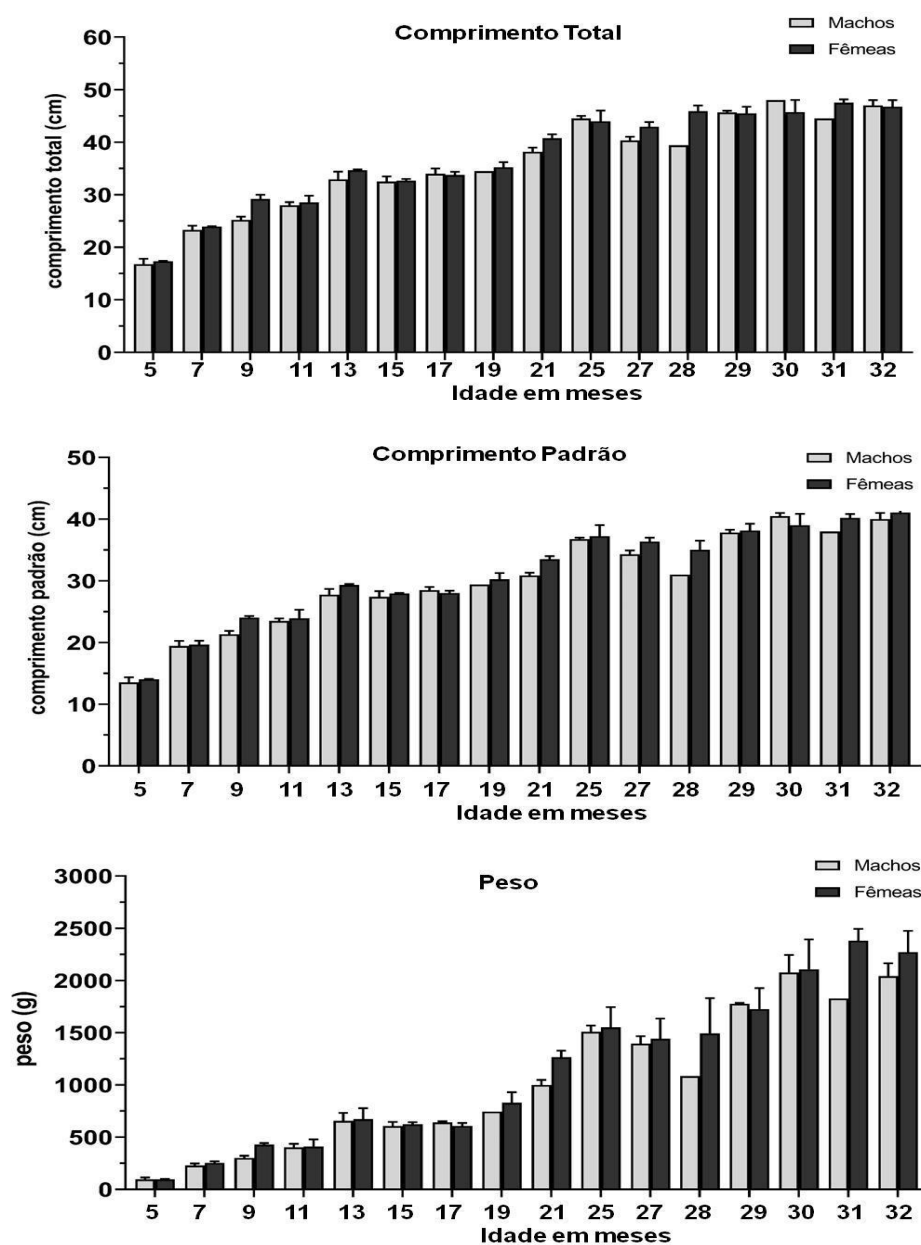


Figura 1: Medidas biométricas de machos e fêmeas de tambaqui mantidos em viveiro escavado do quinto ao trigésimo segundo mês de idade (n= 6 peixes/coleta com média de 3 machos e 3 fêmeas).

3.2 Fases de desenvolvimento gonadal em machos

3.2.1 Fase imatura e de desenvolvimento inicial

Os machos analisados na fase imatura tinham tamanho médio de 13,9 cm \pm 3,7 cm CP, 17,4 cm \pm 0,9 cm CT, peso médio de 104,49 g \pm 23 g e a idade de cinco a sete meses. Os machos apresentavam espermatogônias (Sg) com núcleo bem definido e envolvidas por células de Sertoli (Se) em detalhe, além de cistos de espermatogônias e cordões sexuais primários (Figura 2 a).

Os machos observados na fase de desenvolvimento inicial estavam com tamanho médio de 20,1 cm \pm 1,0 cm CP, 24,0 cm \pm 0,8 cm CT e peso médio de 242,82 g \pm 42 g, com sete meses de idade. O estroma testicular destes peixes continha cistos (Ci) de espermatogônias (Sg) e cistos com espermatócitos (Sc), presença de espermátides (St), espermatozoides (Sz), vaso sanguíneo (vs) e o epitélio germinativo (EG) separado por membrana basal, demonstrados na Figura 2 b.

3.2.2 Fase de desenvolvimento - maturação

Os machos foram observados nesta fase com nove meses de idade, com tamanho médio de 22,4 cm \pm 0,2 cm CP, 26,9 cm \pm 0,5 cm CT e peso médio de 278,8 g \pm 1,4 g. Morfologicamente alguns machos apresentavam gônadas fusiformes e cor levemente rosada. Histologicamente, os testículos em maturação se apresentam bem estruturados e com o epitélio germinativo (EG) delineado por membranas basais que formam os compartimentos intersticiais (IC). Dentro dos compartimentos intersticiais, foi verificado a formação do compartimento germinativo (CG), juntamente com os cistos de espermatogônias (Sg), espermatócitos (Sc), espermátides (St) e bastante espermatozóides (Sz), representados na Figura 2 c. Essas observações foram feitas no mês de novembro, coincidindo com o período reprodutivo do tambaqui em ambiente natural que ocorre de setembro a fevereiro.

3.2.3 Fase reprodutiva apto a desova

Os machos estavam aptos à desova (maduros) aos 13 meses de idade, com tamanho médio de 27,75 cm \pm 0,9 cm CP, 32,95 cm \pm 1,5 cm CT e peso médio de 656,05 g \pm 76,5 g. Macroscopicamente, os machos apresentam corpo mais alongado, quilha protuberante e liberavam sêmen sob leve pressão no abdômen. Histologicamente apresentavam epitélio germinativo descontínuo e lúmen dos túbulos (Lu) dilatados parcialmente preenchidos pelos espermatozoides (Sz). Cistos de espermatogônias (Sg) e espermatócitos (Sc) também podiam ser observados, como demonstrado na Figura 2 d.

3.2.4 Fase de regressão

Os machos foram observados nessa fase a partir do décimo terceiro mês com tamanho médio de 27,75 cm \pm 0,9 cm CP, 32,95 cm \pm 1,5 cm CT e peso médio de 643,19 g \pm 7,2 g, porém foi observado um indivíduo no décimo primeiro mês (23,1 cm \pm 0,1 cm CP, 27,4 cm \pm 0,0 cm CT e peso de 394,38 g \pm 54 g), já apresentando sinais de regressão. Nos testículos foi observado lúmen dos túbulos dilatados contendo espermatozóides residuais, espermatócitos (Sc), e espermatogônia (Sg), Figura 2 e.

3.2.5 Fase de regeneração

Os animais machos foram observados nessa fase a partir do décimo quinto mês, nesta fase apresentaram o tamanho médio de 28,0 cm \pm 0,1 CP, 33,0 cm \pm 0,0 cm CT e peso médio de 643,19 g \pm 7,2 g, e a partir do décimo quinto mês o tamanho e peso médio variou de acordo com a idade. Nos testículos foi observado que o epitélio germinativo continha cistos cheios de espermatogônias (Sg) em proliferação ou com espermatozóides em regeneração, apresentado lúmen seminífero não detectável ou discreto, por todo o testículo, e também vaso sanguíneo (vs) bem evidenciado na Figura 2 f.

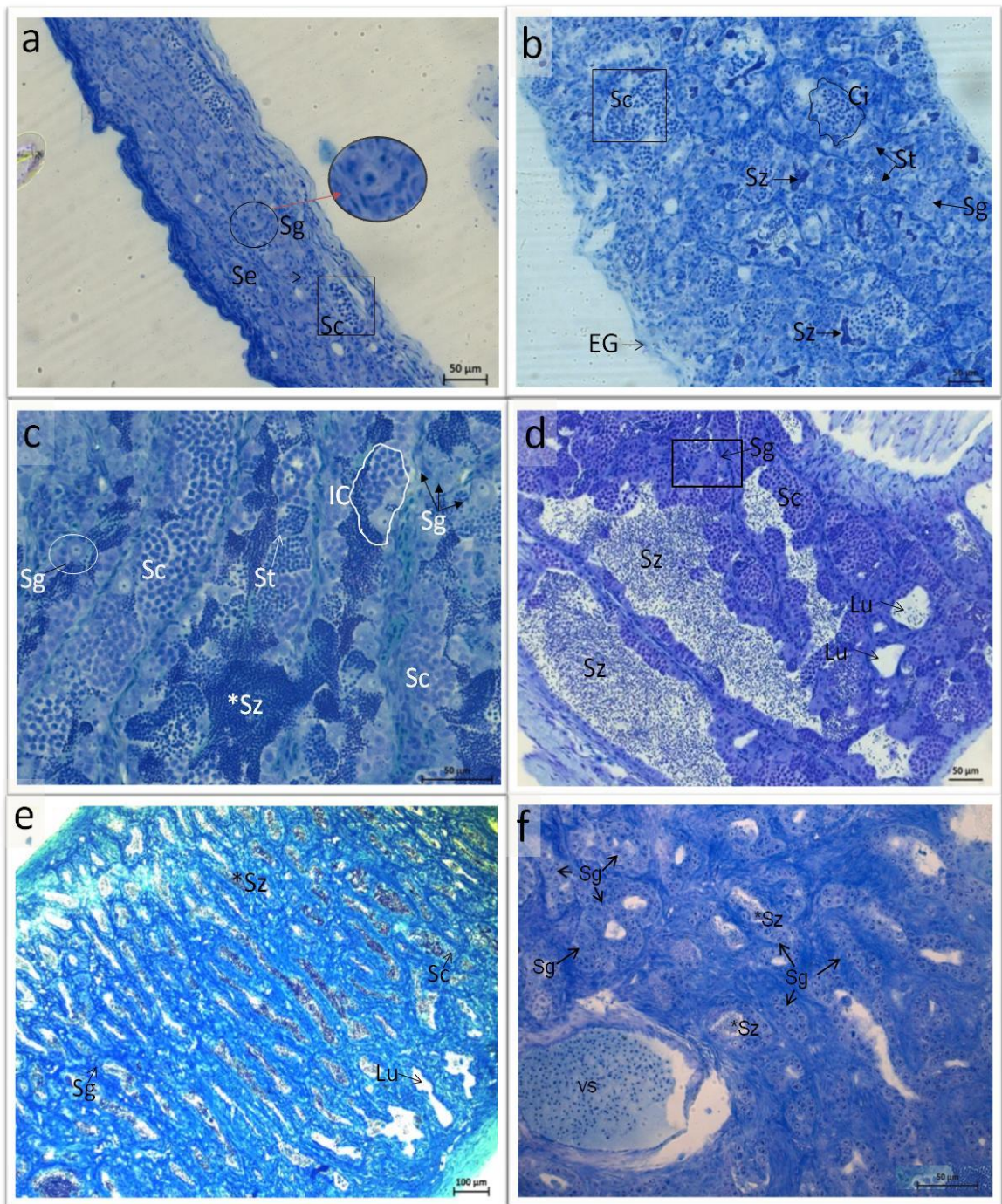


Figura 2: Fases do desenvolvimento gonadal de machos de tabaqui: **a** - Macho imaturo de sete meses de idade apresentando células de Sertoli circundando espermatogônia (Sg) (círculo) e núcleo bem definido e com os primeiros cordões sexuais formando cistos de espermatócitos; **b** - Testículo de juvenis de tabaqui em fase de desenvolvimento inicial com espermatogônias (Sg), cistos (Ci) com espermatócitos (Sc), espermatídes (St), espermatozóides e epitélio germinativo (EG) separado por uma membrana basal; **c** - Testículo na fase de desenvolvimento apresentando epitélio germinativo com compartimento intersticial (IC - linha branca), com cistos delimitando a formação das espermatogônias (Sg), espermatócitos (Sc), espermatídes (St), e espermatozóides (Sz). **d** - Testículo de tabaqui na fase apto a liberar esperma, apresentando epitélio germinativo e lúmen (Lu) dos túbulos

dilatados e preenchidos por espermatozóides residuais (Sz) e ainda espermatogônias (Sg) e espermátocitos (Sc); **e** – Testículo na fase de regressão apresentando lúmen dos túbulos dilatados contendo espermatozóides residuais, espermátocitos (Sc), e espermatogônia (Sg); **f** - Testículo em fase de regeneração com epitélio germinativo com cistos cheios de espermatogônias (Sg) em proliferação ou com espermatozóides (Sz) em regeneração e lúmen seminífero não detectável ou discreto e vaso sanguíneo (vs). As barras de escala representam 50 µm em a, b, c, d e f e; 100 µm em e.

3.3 Fases de desenvolvimento gonadal em fêmeas

3.3.1 Fase Imatura

Nas coletas realizadas do quinto ao nono mês de idade, as fêmeas ainda se encontravam imaturas, com características de desenvolvimento gonadal mais tardia que os machos. O tamanho médio das fêmeas imaturas foi de 20,3 cm ± 4,1 cm CP, 24,7 cm ± 4,9 cm CT, e peso de 223,8 g ± 133,9 g. Vale ressaltar que algumas fêmeas aos 15 meses de idade ainda estavam imaturas, com a gônada de uma fêmea apresentando tecido gonadal que continha tecido conjuntivo rico em células somáticas (CS), oogônias e poucos oócito em prófase inicial (OPI ou oócito em desenvolvimento primordial (OCP), conforme mostra a figura 3 a.

3.3.2 Fase de desenvolvimento inicial

As fêmeas nesta fase estavam do décimo primeiro ao décimo quinto mês de idade, com tamanho médio de 27,2 cm ± 3 cm CP, 30,9 cm ± 4,1 cm CT e peso médio de 541,3 g ± 199 g. Nos ovários com onze meses de idade foi observado os primeiros sinais de puberdade, com epitélio germinativo apresentando um estroma ovariano bem definido, grande quantidade de células somáticas, algumas oogônias, oócitos em crescimento primário e oócitos em crescimento secundário e poucos alvéolos corticais, e também lamelas ovarianas, caracterizando o princípio da fase de desenvolvimento inicial. Os ovários do décimo terceiro ao décimo quinto mês, além das células já citadas, apresentavam cistos com oogônias e oócitos (união desses cistos formam os ninhos), lamela ovariana (Lo), estroma ovariano (EO) os oócitos com núcleos com nucléolos bem evidentes (dispostos nas extremidades ou espalhados), demonstrado na Figura 3 b.

3.3.3 Fase de Desenvolvimento - maturação

As fêmeas de 17 e 19 meses estavam em maturação gonadal, com tamanho de 29,1 cm ± 1,8 cm CP, 34,5 cm ± 1,6 cm CT e com peso médio de 719,4 g ± 179,4 g. Morfologicamente, a partir do décimo sétimo mês as fêmeas já possuíam a aparência

ligeiramente mais abaulada que os machos. Histologicamente, as fêmeas com 17 meses de idade apresentaram oócitos profásicos com a cromatina bem compactada, com cistos individualizados através da expansão das lamelas ovarianas, foi percebido uma padronização no tamanho dos oócitos, o aumento da quantidade de oócitos e a diminuição do tecido conjuntivo, além da formação de novas oogônias e nos ovários com 19 meses foi verificado a expansão dos oócitos e oócitos vitelogênicos, Figura 3 c.

3.3.4 Fase reprodutiva apta a desova

Na fase apta à desova, as fêmeas tinham a idade a partir dos 30 meses com tamanho médio de 39,2 cm \pm 2,9 cm CP, 46,2 cm \pm 3 cm CT e peso médio de 2191,9 g \pm 455,5 g. Nessa fase as fêmeas tinham a aparência abaulada e corpo ligeiramente mais curto que os machos. Anatomicamente os ovários eram volumosos e a cor variava do alaranjado ao cinza e com oócitos aparentes ao olho nu. Histologicamente apresentaram oócitos em diferentes fases de desenvolvimento como oócitos em crescimento primário, crescimento secundário, oócito pré-vitelogênico, oócito vitelogênico (com gotas lipídicas e grânulos de vitelo) e oócito maduro, Figura 3 d.

3.3.5 Fase reprodutiva de regressão e regeneração

O início das fases de regressão e regeneração foram verificadas nos três últimos meses do experimento. Porém, em alguns ovários do décimo nono mês foi verificada a presença de folículos atrésicos (FA), estágio de absorção e complexo folicular pós-ovulatório (pof) que são indícios da caracterização destas fases podem ser observadas na Figura 3 e. Apesar de alguns oócitos apresentarem evidências das fases de regressão e regeneração, essas fases não foram completamente caracterizadas durante o experimento.

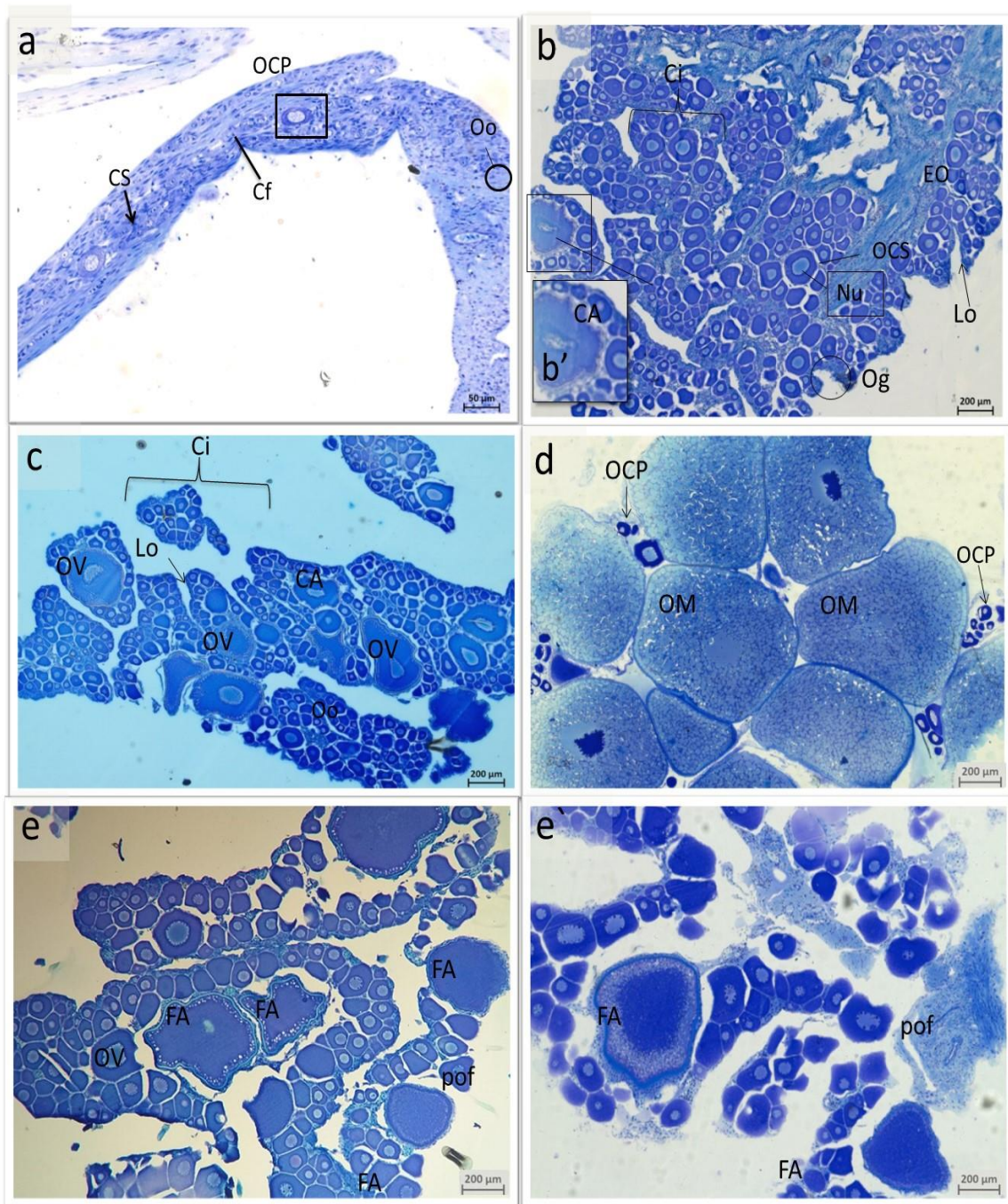


Figura 3: Fases de desenvolvimento gonadal de fêmeas de tambaqui. **a** - Ovário imaturo até os 9 meses de idade, contendo bastante tecido conjuntivo entremeadado por células somáticas (CS), células foliculares (Cf), oogônias (Oo), oócito em crescimento primário (OCP) (quadrado pequeno); **b** - Fase de desenvolvimento inicial. Foi observado em ovários a partir de onze meses de idade, o estroma ovariano (EO) bem definido, grande quantidade de oócitos em crescimento primário (OCP), oócitos em crescimento secundário (OCS) e alvéolo cortical (CA) caracterizando o princípio da fase de desenvolvimento inicial, e lamelas ovarianas (Lo). **c** - Fase de desenvolvimento, as fêmeas com 17 meses de idade apresentaram oócitos profásicos com a cromatina bem compactada, com cistos individualizados (Ci) através da expansão das lamelas ovarianas (Lo), oócitos vitelogênicos

(OV) e alvéolo cortical (CA); **d** - Ovários aptos a reprodução a partir de 30 meses de idade, apresentando oócitos em diferentes fases de desenvolvimento como em crescimento primário (OCP), crescimento secundário (OCS), oócito vitelogênico (OV) além de oócitos maduros (OM) que caracterizam a fase. **e** - Ovários apresentam poucas características da fase de regressão como folículo atrésico (FA) e folículo pós ovulatório (pof). As barras de escala representam 50 μm em a e; 200 μm em b, c, d e e.

3.4 Hormônios esteroides

Nos machos o E_2 apresentou-se alto no período imaturo (524,5 pg.mL^{-1}) e na fase de desenvolvimento inicial (404,8 pg.mL^{-1}) e reduziu durante a espermatogênese, na fase de desenvolvimento (51,8 pg.mL^{-1}) e de apto à reprodução (45,13 pg.mL^{-1}) (sendo que nesta última o E_2 por apresentar apenas um n amostral teve apenas a concentração comparada para machos), voltando aos níveis basais nas fases de regressão (148,3 pg.mL^{-1}) e de regeneração (157,4 pg.mL^{-1}). A testosterona (T) foi medida em apenas um macho imaturo (102,5 pg.mL^{-1}), sendo considerada mais elevada na fase de desenvolvimento inicial (73,3 pg.mL^{-1}) e apresentou uma redução a partir da fase de desenvolvimento (0,15 pg.mL^{-1}) para frente onde a 11-cetotestosterona (11KT) começa a atuar, ou seja, em machos nas fase de apto (0,17 pg.mL^{-1}), regressão (0,31 pg.mL^{-1}) e regeneração (0,40 pg.mL^{-1}) (Figura 4).

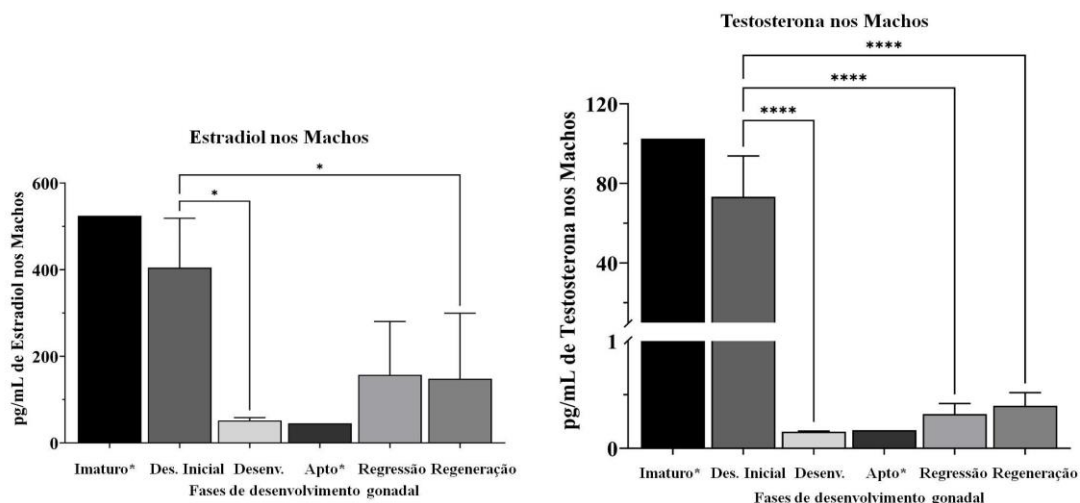


Figura 4: Concentração plasmática de E_2 e T (média \pm DP) em tambaqui (*Colossoma macropom*) machos nas fases imatura, desenvolvimento inicial, desenvolvimento, apto à reprodução, regressão e regeneração. Imaturo*, Apto*, Macho* não representam médias, estes são os níveis plasmáticos de apenas um macho em cada fase.

Nas fêmeas a concentração de E₂ foi aumentando durante a oogênese, no período imaturo (176,5 pg.mL⁻¹) e na fase de desenvolvimento inicial (214,6 pg.mL⁻¹) com uma exceção de diminuição na fase de desenvolvimento (60,6 pg.mL⁻¹), muito provavelmente devido ao baixo número de animais amostrados, voltando a subir na fase de apto à reprodução (352,6 pg.mL⁻¹). Enquanto a T apresentou nível basal no período imaturo (18,5 pg.mL⁻¹), e um pico mais elevado na fase de desenvolvimento inicial (105,5 pg.mL⁻¹) (onde ocorre o recrutamento folicular) e apresentou uma redução a partir da fase de desenvolvimento (0,30 pg.mL⁻¹) e na fase de apto à reprodução (0,13 pg.mL⁻¹). As fases de regressão e de regeneração nas fêmeas não foi possível dosar os níveis de E₂ e T visto não ter sido possível caracterizar completamente essas duas fases de desenvolvimento nas fêmeas (Figura 5).

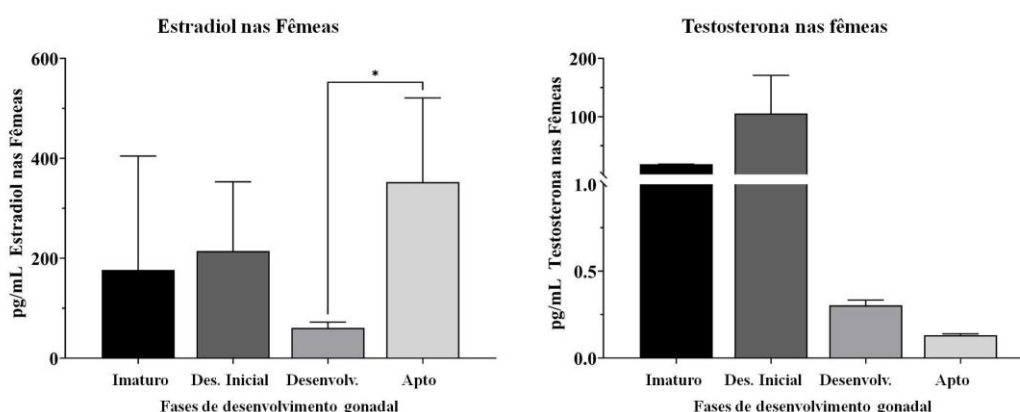


Figura 5: Concentração plasmática de E₂ e T (média ± DP) em tambaqui (*Colossoma macropomum*) fêmeas nos estágios imaturo, desenvolvimento inicial, desenvolvimento e apto à reprodução.

3.5 Variáveis do sangue

Os valores das variáveis do sangue não diferiram significativamente entre os sexos, a concentração de hemoglobina (p=0,53), a porcentagem de hematócrito (p=0,46) e o número de eritrócitos (p=0,61) encontrados estão dentro do esperado para tambaqui (Figura 6).

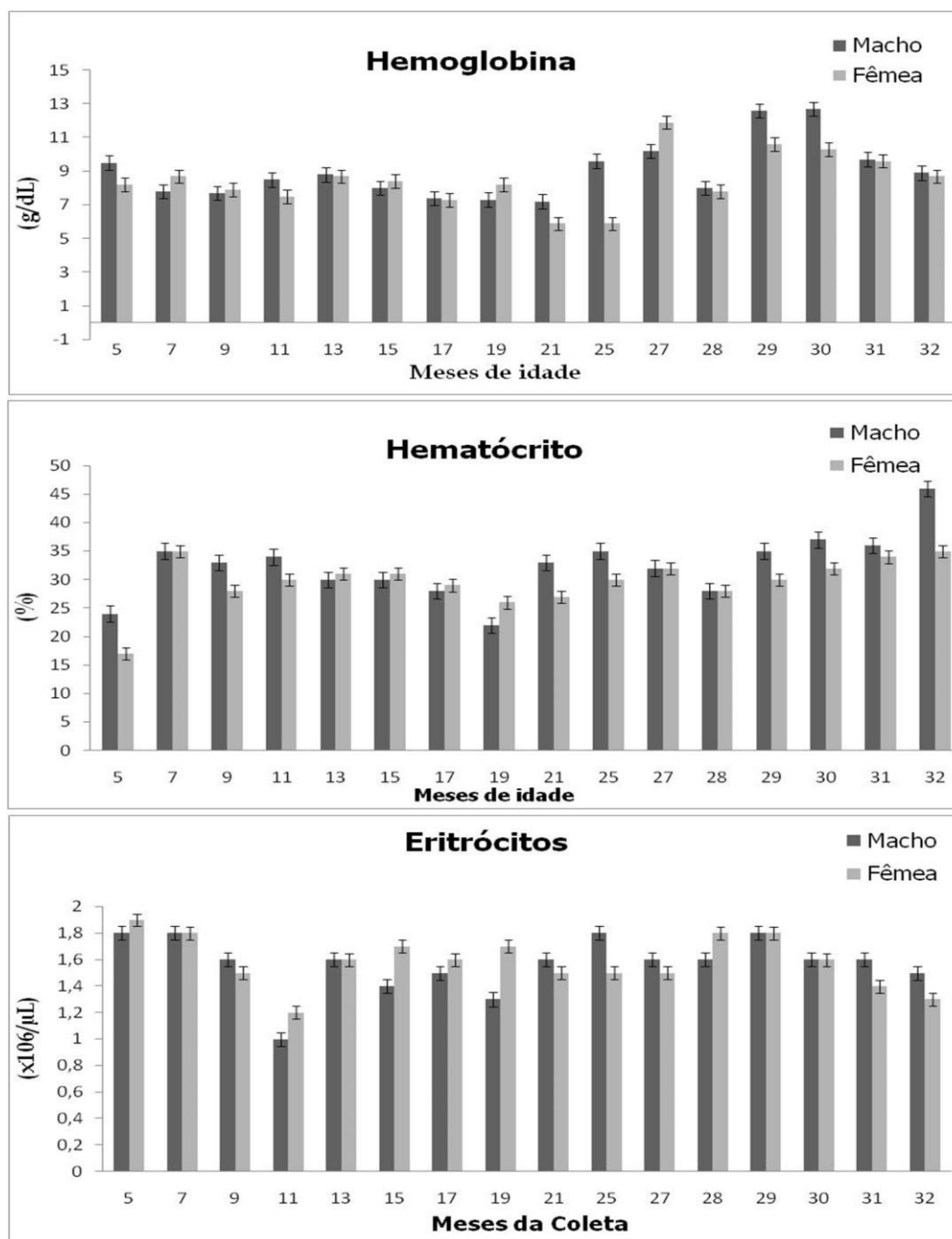


Figura 6. Variáveis sanguíneas realizadas durante o experimento para comparação entre machos e fêmeas. As variáveis avaliadas foram hemoglobina ($\text{g}\cdot\text{dL}^{-1}$), hematócrito (%) e eritrócitos ($\times 10^6\cdot\mu\text{L}^{-1}$).

3.6 Índice hepatossomático (IHS) e índice gonadossomático (IGS)

Estatisticamente não houve significância nos valores do IHS ($p=0.9557$), foi observado apenas uma tendência à valores mais elevados na primeira coleta, em peixes com 5 meses de idade, e uma diminuição desses valores do sétimo ao vigésimo quinto mês,

reduzindo até a metade do valor estimado no quinto mês. No vigésimo sétimo mês, o IHS diminuiu voltando a subir no mês seguinte e mantendo o padrão observado anteriormente. Esse comportamento foi observado para machos e fêmeas, exceto no mês 27, quando o valor médio dos machos apresentou uma redução em percentual (Figura 7).

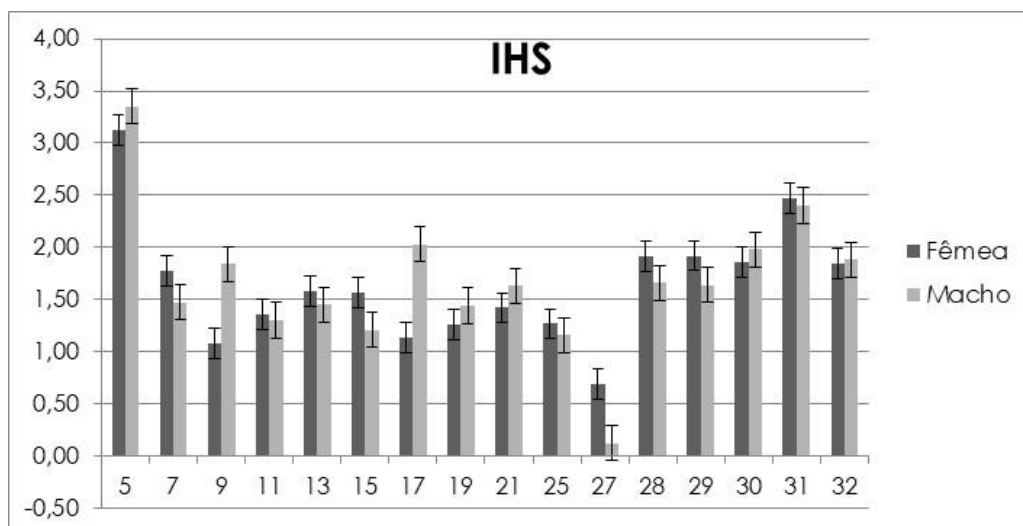


Figura 7: Índice hepatossomático de tabaqui machos e fêmeas do quinto ao trigésimo segundo mês de idade.

O IGS não apresentou significância estatística ($p=0,5445$) do quinto ao trigésimo mês o IGS dos tabaquis apresentou-se baixo, com uma leve tendencia de aumento do vigésimo primeiro ao trigésimo mês. E uma tendencia de aumento mais expressivo foi verificado a partir do trigésimo primeiro mês para ambos os sexos (Figura 9).

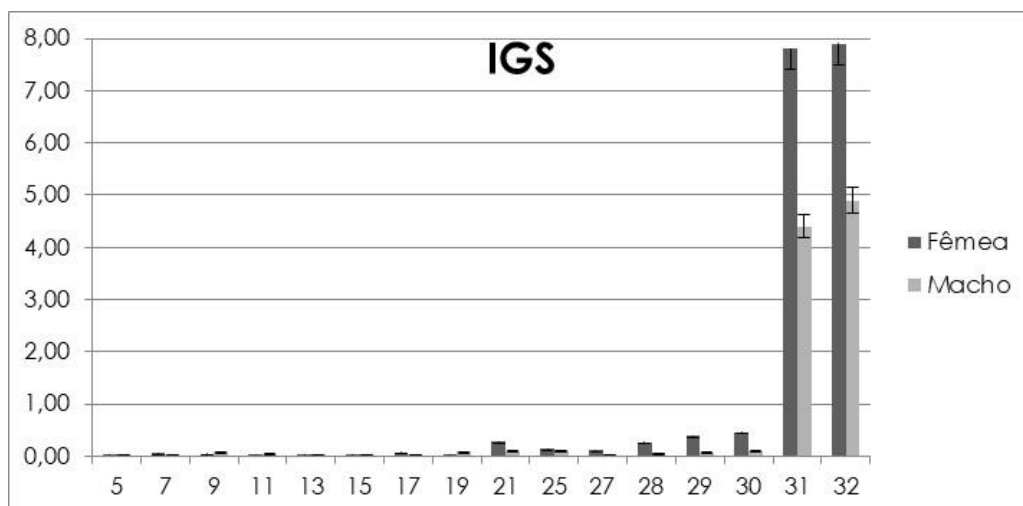


Figura 8: Índice gonadosomático de machos e fêmeas do quinto ao trigésimo segundo mês de idade.

4 Discussão

Com o objetivo de gerar informações sobre a fisiologia reprodutiva da principal espécie nativa da piscicultura brasileira, neste trabalho caracterizamos o desenvolvimento gonadal de machos e fêmeas de tambaqui dos 5 aos 32 meses de idade. De acordo com a classificação de Brown-Peterson et al. (2011), no período analisado, identificamos seis fases de desenvolvimento gonadal para o macho (imaturo, desenvolvimento inicial, desenvolvimento, apto a desova, regressão e regeneração) e quatro fases nas fêmeas (imatura, desenvolvimento inicial, desenvolvimento e apto a desova (fisiologicamente capaz de desovar). É comum haver diferenças no número de fases entre as espécies assim como ocorrer variação das mesmas entre machos e fêmeas. Como exemplo, no cascudo (*Hypostomus puzarum*) foi observado quatro fases de desenvolvimento dos testículos (Bueno et al. 2017), no lambari (*Astyanax bimaculatus*) foram descritas apenas duas fases reprodutivas nas fêmeas (desenvolvimento e apta a desova) e nos machos da espécie foram observadas cinco fases diferentes durante o período reprodutivo (Cordeiro et al. 2019); no robalo comum (*Centropomus undecimalis*), foi classificada a maturação gonadal em cinco fases (Passini et al. 2019) e no cangulo-preto (*Melichthys niger*) peixe marinho, o desenvolvimento ovariano foi dividido em cinco estágios (Branco et al. 2013). Em trabalhos abordando o desenvolvimento gonadal do tambaqui, 4 ou 5 fases puderam ser descritas (Lima, 1997; Almeida et al. 2016), porém, ainda existe uma lacuna nas informações

referentes às fases reprodutivas do tambaqui devido ao curto tempo das observações realizadas. Os peixes podem entrar em maturidade sexual de acordo com o tamanho, peso ou idade, e a maturação depende diretamente das condições de manejo e alimentação (Godinho, 2007).

Os peixes deste estudo mantiveram o tamanho em comprimento total (CT) e comprimento padrão (CP) semelhantes entre machos e fêmeas, com algumas tendências do comprimento das fêmeas ser maior que dos machos durante a maior parte do período experimental. Esperávamos, entretanto, uma diferença significativa, uma vez que Almeida et al. (2016) e Ariede et al. (2023) constataram que as fêmeas de tambaqui crescem mais rápido e são maiores e mais pesadas que os machos. Os meses em que as fêmeas apresentaram o peso mais expressivo em relação aos machos foi nos dois últimos meses avaliados (31º e 32º), com o peso 22,37% e 10,78% maior. Esse aumento no peso foi acompanhado pelo aumento do IGS e a diminuição do IHS, que são indicadores que estão relacionados com o período reprodutivo, sugerindo um investimento energético para reprodução durante suas fases de desenvolvimento gonadal (Caramaschi e Brito, 2021). A combinação dos resultados biométricos com IGS e IHS indica que a diferença morfométrica do tambaqui está relacionada com o gasto energético destinado para reprodução, que afeta diretamente o crescimento. Essa diferença no tamanho se caracteriza como um dimorfismo sexual entre os gêneros no qual as fêmeas se apresentam maiores e mais pesadas do que os machos (Mello et al. 2015; Almeida et al. 2016).

Os primeiros sinais de entrada na puberdade foram verificados aos sete e onze meses em machos e fêmeas, respectivamente. Já Junior et al. (2012) e Almeida et al. (2016) observaram uma maior precocidade na puberdade do tambaqui, sendo que os machos confinados atingiram a puberdade antes das fêmeas. Outro fato observado por Almeida et al. (2016) é que nos machos o desenvolvimento testicular ocorreu aos cinco meses de idade e nas fêmeas o início da oogênese ocorreu aos sete meses, isso demonstra que a idade pode não ser o fator determinante para a entrada na puberdade. Provavelmente existem outros fatores influenciando a puberdade, como o manejo alimentar, que está intimamente relacionado com o peso e tamanho dos indivíduos.

Outro aspecto importante na puberdade e maturação sexual é a produção dos *esteroides* sexuais, visto que a maturação dos gametas é regulada pelas gonadotrofinas e pelos próprios esteroides produzidos nas gônadas (Navarro e Navarro, 2012), e que as variações nos esteroides sexuais (T, 11-KT e E₂) regulam a progressão da espermatogênese e

foliculogênese (revisado em Schulz et al. 2010). Em nosso estudo o estradiol (E₂) se manteve alto nas fêmeas durante a oogênese, aumentando de acordo com o avançar das fases, com exceção na fase de desenvolvimento, quando observamos uma redução, provavelmente devido ao baixo número de animais amostrados. E nos machos a concentração de E₂ foi mais alta na fase imaturo e de desenvolvimento inicial e baixo durante a espermatogênese, voltando a subir com valores aproximados aos níveis basais na fase de regeneração e de regressão. Em tambaqui, as concentrações de T e E₂ são muito semelhantes entre machos e fêmeas na fase imatura (Lima, 1997; Almeida et al. 2016; Oliveira et al. 2018). Ambos esteroides aumentam com o desenvolvimento dos testículos (principalmente a T) e crescimento primário do ovário (principalmente o E₂). O valor de E₂ observado nos machos imaturos foi mais que o dobro das fêmeas, havendo a possibilidade da idade ter influenciado, uma vez que estes machos embora imaturos tinham idade mais avançada que os machos dos autores citados. Outra constatação foi que o E₂ nas fêmeas em fase pré-meiótica foi menor (176 pg.mL⁻¹) do que nas fêmeas com crescimento primário (214 pg.mL⁻¹) e os machos imaturos apresentaram valores de E₂ maiores (524 pg.mL⁻¹) do que os machos maduros (45,13 pg.mL⁻¹). Nas fêmeas que estavam em crescimento folicular primário, a concentração de estradiol subiu para a média de 214 pg.mL⁻¹, valor aproximado ao relatado por Oliveira et al. (2018) 280 pg.mL⁻¹. Em nosso estudo, o estradiol se manteve alto em quase todas as fases, confirmando ser um hormônio importante durante a maturação ovariana, principalmente na fase de desenvolvimento inicial. Diferente do que foi verificado em machos de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) com 12 meses de idade, os valores do E₂ foram mais altos na fase de desenvolvimento (Rotili et al. 2022), e machos de robalo comum (*Centropomus undecimalis*) apresentaram níveis de E₂ mais baixo durante sua estação reprodutiva (Passini et al. 2019).

Nas fêmeas de tambaqui, a concentração de testosterona (T) esteve alta durante o desenvolvimento inicial e a partir desta fase foi reduzindo, durante o recrutamento folicular. Nos machos, a concentração de T também foi alta na fase de desenvolvimento inicial e apresentou uma redução ao avançar da maturação, quando espera-se que a 11 cetotestosterona inicie sua atuação na maturação final e comportamento reprodutivo (Schulz et al. 2010). Os andrógenos são fundamentais no processo de crescimento e transição do oócito em crescimento secundário, e são essenciais em todas as fases da espermatogênese (Almeida et al. 2016). Nas fêmeas os níveis de testosterona aumentam à medida que se inicia o processo de recrutamento folicular e desenvolvimento inicial (Oliveira et al. 2018).

Os níveis de testosterona aumentam no plasma sanguíneo à medida que a espermatogênese avança e alcança o pico durante o final das etapas de espermiacão e liberação de espermatozoides (Schulz et al., 2010). Essas mudanças anuais nos níveis dos esteroides plasmáticos E₂ e T regulam a progressão da espermatogênese durante a estação reprodutiva assim como ocorre também à influência do ambiente de cultivo. Essas observações podem ser corroboradas com o trabalho de Schiavone et al. (2012) onde em machos de corvina (*Argyrosomus regius*) durante a época de desova os níveis de T são mais baixos que outros hormônios androgênicos. Em fêmeas da mesma espécie, Schiavone et al. (2012) verificaram um aumento dos níveis de T e E₂ durante a primeira estação de desova. Nossos resultados das variáveis hematológicas demonstram que os peixes analisados estavam em boas condições fisiológicas durante o experimento. Os valores observados neste trabalho são corroborados com outros estudos realizados com tambaqui, como o de Junior et al. (2013) que trabalharam com juvenis até 70 dias, o de Maciel (2009), que trabalhou com peixes com peso de $32,9 \pm 4,7$ g e tamanho $10,1 \pm 0,6$ cm, de Inoue et al. (2011) que trabalharam com tambaqui jovem (peso $407,9 \pm 182,3$ g e comprimento de $28,3 \pm 4,2$ cm), de Mendes, (2013) que trabalhou com tambaqui (com peso de 1 a 1,5 kg) e de Ranzani-Paiva et al. (1998/1999) (peixe com 2,6 anos). Segundo Ranzani-Paiva e Godinho, (1986) e Ranzani-Paiva, (1995) as fases de maturação gonadal em que ocorrem as alterações mais significativas no quadro hemático são durante os estágios de repouso e regressão, porém essas fases não foram caracterizadas para as fêmeas de tambaqui durante esse estudo.

A primeira maturação sexual foi considerada quando os indivíduos apresentavam características de aptos à reprodução. Os machos maduros foram identificados aos 13 meses de idade e peso de $732,0 \pm 108,1$ g, enquanto as fêmeas apenas aos 30 meses de idade e com peso de $2191,9 \pm 455,5$ g. Este experimento foi conduzido em sistema semi-intensivo e a maturidade sexual dos machos foi mais tardia que de machos criados em sistema intensivo (Almeida et al. 2016), que atingiram a maturidade com 12 meses de idade aos $2705 \pm 7,8$ g. Esta diferença na maturidade sexual pode estar relacionada com o tipo de sistema de criação, pois o peso superior nos machos relatados por Almeida et al. (2016) pode ter favorecido a maturação sexual mais precoce. Algumas espécies atingem a maturidade sexual somente na fase adulta, e economicamente, isso é mais dispendioso quando se trata de formação de plantel de reprodutores. Por outro lado, tem espécies que atingem a puberdade precocemente e isso prejudica seu rendimento na fase de engorda e prolonga seu período para abate (Godinho, 2007). Para o robalo comum (*Centropomus undecimalis*), a entrada na puberdade

está mais relacionada ao tamanho do corpo do que à idade (Passini et al. 2019). Para o tambaqui ainda não está claro qual é o fator que determina a entrada na puberdade, inferimos que a idade, o peso e o manejo exercem bastante influência, visto que os machos deste estudo apresentaram os primeiros sinais de espermatogênese aos sete meses de idade e com peso de $335,3 \pm 128$ g e as fêmeas apresentaram os primeiros sinais de oogênese aos onze meses de idade, com peso de $586,0 \text{ g} \pm 88,5$ g. Ambos os sexos mais tardios e menos pesados que os peixes de Almeida et al. (2016) que apresentaram a entrada na puberdade aos cinco meses para os machos com 750 g e aos sete meses para fêmeas com 1200 g. Embora haja bastante diferença de tamanho em ambos os estudos, os animais demonstraram necessitar de uma idade e peso mínimo para serem capazes de desenvolver as gônadas, e também em ambos estudos os machos de tambaqui entraram em puberdade mais precocemente do que as fêmeas, além de completar a maturação testicular em tempo mais curto que a maturação ovariana (Souza e O'Sullivan, 2012). Algo parecido ocorre com a Corvina (*Argyrosomus regius*), os machos tornam-se reprodutivamente maduros aos dois anos de idade enquanto as fêmeas somente aos três anos (Schiavone et al. 2012).

Foi verificado um aumento do IHS na fase imatura e de desenvolvimento dos juvenis de tambaqui e uma diminuição desse índice em fases mais avançadas do período reprodutivo. Provavelmente, o aumento do IHS deve estar relacionado à mobilização de reservas energéticas necessárias ao processo de vitelogênese e reprodução. Visto que, o processo de maturação das células gonadais estão ligados ao processo de vitelogênese, que envolve outros órgãos como o fígado, que aumenta seu peso durante a produção de vitelogenina e reduz a gordura visceral, que é utilizada como fonte extra de energia para o desenvolvimento das gônadas e conseqüentemente da formação dos gametas (Baldisserotto, 2002; Costa et al. 2005). Um efeito contrário, como é esperado, foi observado com o índice gonadossomático (IGS), à medida que os animais foram avançando nas fases reprodutivas o IGS também foi aumentando coincidindo com a diminuição do IHS. Os mesmos efeitos foram observados em tambaquês cultivados em tanques escavados (Almeida et al. 2016). O aumento do IGS com a progressão do peixe na maturidade sexual foi observado em acari (*Locariichthys platymetopon*; Querol et al. 2002) e em manjuba (*Curimatella lepidura*; Andrade et al. 2010).

5 Conclusão

Consideramos que as fêmeas de tambaqui iniciam o desenvolvimento ovariano, que marca o início da puberdade, dos 11 aos 15 meses enquanto os machos são mais precoces iniciando a espermatogênese a partir dos 7 meses de idade, e que machos e fêmeas da espécie não apresentam diferenças nas variáveis do sangue. E em ambos os sexos o estradiol apresenta picos durante o desenvolvimento inicial da gametogênese, demonstrando que pode ter um papel importante nesta fase, ou seja, na meiose. Concluimos que existe um conjunto de fatores relacionados ao manejo, como arraçamento adequado que influenciam na maturação sexual do tambaqui, fazendo com que ocorra uma variação no desenvolvimento gonadal, puberdade e maturação sexual entre os diferentes sistemas de cultivos.

Financiamento

Este trabalho foi apoiado por bolsas da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM (Amazonas Estratégico 145/2018). Gabriela Tomas Jerônimo agradece ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de pesquisa concedida (Processo nº 314239/2020-0). Os autores também agradecem à Embrapa Amazônia Ocidental pela infraestrutura para realização dos trabalhos, à SEPROR e à Estação Piscicultura de Balbina/Presidente Figueiredo.

Declaração de Interesse

Os autores declaram que não têm interesses financeiros concorrentes conhecidos ou relacionamentos pessoais que possam parecer influenciar o trabalho relatado neste artigo.

Contribuições do autor

Iraní da Silva de Moraes: Investigação, analisou e interpretou os dados e redigiu o artigo. **Vanessa Ribeiro Reis:** Investigação, analisou e interpretou os dados estatísticos. **Gabriela Brambila de Souza:** Investigação, analisou e interpretou os dados esteroides. **Aldessandro da Costa Amaral:** Investigação, analisou e interpretou os dados histológicos. **Rosilane Gomes de Souza de Oliveira:** Investigação e amostragem. **Karina Priscila Bichara:** Investigação e amostragem. **Gabriela Tomas Jerônimo:** Supervisão do estudo, assessoria conceitual, redação - revisão e edição. **Fernanda L. Almeida O'Sullivan:** Conceituação, supervisão, obtenção de financiamento, administração do projeto, recursos, curadoria de dados, redação - revisão e edição.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Embrapa Amazônia Ocidental, à SEPROR e à Estação Piscicultura de Balbina/Presidente Figueiredo.

6 Referências bibliográficas

Almeida, F. D. Lopes, J. S. Crescêncio, R. Izel, A. C. U., Chagas, E. C. Boijink, C. Early puberty of farmed tambaqui (*Colossoma macropomum*): Possible influence of male sexual maturation on harvest weight. *Aquaculture*, 452, 224-232. 2016.

Ariede, R.B., Lemos, C.G., Batista, F.M., Oliveira, R.R., Agudelo, J.F.G., Borges, C.H.S., Iope, R.L., Almeida, F.L.O., Brega, J.R.F., Hashimoto, D.T., 2023. Computer vision system using deep learning to predict rib and loin yield in the fish *Colossoma macropomum*. *Anim Genet* 00, 1–14. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/age.13302>.

Baldiasserotto, B. 2002. *Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura*. Santa Maria: Ed. UFSM. RG.212p.

Braat, A.K., Zandbergen, T., van de Water, S., Goos, H.J., Zivkovic, D. Characterization of zebrafish primordial germ cells: morphology and early distribution of vasa RNA. *Dev. Dyn.* 216, 153–167. 1999b.

Branco, I. S., Viana, D. L., Félix, R. T., Vêras, D. P., & Hazin, F. H. (2013). Oocyte development and ovarian maturation of the black triggerfish, *Melichthys niger* (Actinopterygii: Balistidae) in São Pedro e São Paulo Archipelago, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 11, 597-606.

Brown-Peterson N.J., Wyanski D.M., Saborido-Rey F., Macewicz B.J., Lowerre-Barbieri S.K. A standardized terminology for describing reproductive development in fishes. *Mar Coast Fish* [online serial], v.3, p.52-70, 2011.

Bueno, R. M. X., Oliveira, M. R., Chellappa, S. Desenvolvimento gonadal, fecundidade e tipo de desova do cascudo, *Hypostomus puarum* (Starks, 1913)(Actinopterygii: Loricariidae) do açude Marechal Dutra, Rio Grande do Norte, Brasil. *Biota Amazônia (Biote Amazonie, Biota Amazônia, Amazonian Biota)*, 7(4), 30-33. 2017.

Caramaschi, É. P., & Brito, M. F. G. Reprodução de peixes de riacho: estado da arte, métodos e perspectivas. *Oecologia Australis*, 25(2), 343. *Oecologia Australis*, 25(2):323–343, 2021. <https://doi.org/10.4257/oeco.2021.2502.07>.

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. *Molecular reproduction and development*, 80(5), 384-392.

Collier, H.B. The standardization of blood haemoglobin determinations. *Canadian Medical Association Journal*, Vancouver, v.50, p.550-552, 1944.

Concea - De Instituições, Peixes Mantidos Em Instalações. Anexo Da Resolução Normativa Nº 44 Do Conselho Nacional De Controle De Experimentação Animal. 2018.

Cordeiro J.G. et al. Jeane Rodrigues¹, Maira da Silva Rodrigues³, Rafaela Manchin Bertolini², Rafael Henrique Nóbrega³, George Shigueki Yasui^{2,4}, Caio Maximino^{1,5} and Diógenes Henrique de Siqueira-Silva^{1,5} (2019) Reproductive cycle of the tetra *Astyanax bimaculatus* (Characiformes: Characidae) collected in Amazonian streams. *Zygotepage* 1 of 8. doi: 10.1017/S0967199419000601.

- Costa, A. P. R., Andrade, D. R. D., Vidal Junior, M. V., Souza, G. Indicadores quantitativos da biologia reprodutiva de fêmeas de piau-vermelho no Rio Paraíba do Sul. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 40, 789-795. 2005. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2005000800009>
- Dai, X., Pu, D., Wang, L., Cheng, X., Liu, X., Yin, Z., & Wang, Z. Emergence of breeding tubercles and puberty onset in male zebrafish: evidence for a dependence on body growth. *Journal of Fish Biology*, 99 (3), 1071-1078. 2021.
- De Andrade, D. R.; Tonini, W. C. T.; Burkert, D.; Godinho, H. P.; Vidal JR., M. V. Maturação testicular em machos da manjuba *Curimatella lepidura* Eigenmann & Eigemmann, 1889 (PISCES, CURIMATIDAE) da represa de três Marias, rio São Francisco, Brasil. *Ciência Animal Brasileira*, Goiânia, v. 11, n. 1, p. 9–16, 2010. Disponível em: <https://www.revistas.ufg.br/vet/article/view/2529>. Acesso em: 20 mar. 2022.
- Drabikin, D.L. *The standardization of hemoglobina measurement*. *Am. J. Med. Sci.* 215: 210-211. 1948.
- Gabilondo, A. R., Pérez, L. H., Rodríguez, R. M. Hormonal and neuro endocrine control of reproductive function in teleost fish. *Review in Bionatura*, 6, 2122. 2022.
- Bazzoli, N. Godinho, H. P. Reproductive biology of *Acestorhynchus lacustris* (Reinhardt, 1874) (Pisces: Characidae) from Três Marias reservoir, Brazil. *Zoo A E.* V.226, p.285-299, 1991.
- Godinho, H.P. Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. Reproductive strategies of fishes applied to aquaculture: bases for development of production technologies. *Rev Bras Reprod Anim, Belo Horizonte*, v.31, n.3, p.351-360. 2007. jul./set. 2007. Disponível em www.cbpa.org.br.
- Goldenfarb, P. B.; Bowyer, F. P.; Hall, E.; Brosious, E. Reproducibility in the hematology laboratory: the micro hematocrit determination. *American Journal of Clinical Pathology*. v. 56, n. 1, p.35-39, jul. 1971.
- Gomes, L. C., Chippari-Gomes, A. R., Lopes, N. P., Roubach, R., Araújo-Lima, C. A. Efficacy of benzocaine as an anesthetic in juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. *Journal of the World Aquaculture society*, 32(4), 426-431. 2001.
- Grier HJ. The germinal epithelium: Its dual role in establishing male reproductive classes and understanding the basis for indeterminate egg production in female fishes. In: Creswell RL (Ed.). Proceedings of the Fifty-third Annual Gulf and Caribbean Fisheries Institute, 2000, Biloxi, Mississippi. Fort Pierce, FL: *Gulf and Caribbean Fisheries Institute*, p.537-552. 2002.
- Hilsdorf, AWS, Hallerman, E, Valladão, GMR, et al. The farming and husbandry of *Colossoma macropomum*: From Amazonian waters to sustainable production. *Rev Aquac.* 2022; 14: 993– 1027. doi:10.1111/raq.12638.
- Inoue, L. A. K. A., Boijink, C. L., Ribeiro, P. T., Silva, A. M. D. D., Affonso, E. G. Avaliação de respostas metabólicas do tambaqui exposto ao eugenol em banhos anestésicos. *Acta Amazonica*, 41, 327-332. 2011.
- Júnior, D. P. S; Povh, J. A.; Fornari, D. C.; Galo, J. M.; Guerreiro, L. R. J.; De Oliveira, D.; Digmayer, M.; De Godoy, L. C. Recomendações técnicas para a reprodução do tambaqui. Teresina, PI: Embrapa Meio Norte, *Documentos 212*, 2012.
- Junior, G. P., de Oliveira Pereira, E. M., Pereira Filho, M., de Sousa Barbosa, P., Brasil, E. M., Shimoda, E. Parâmetros hematológicos de juvenis de tambaqui alimentados com rações contendo farinha de crueira de mandioca. *Acta Biomédica Brasiliensia*, 4(1), 1-11. 2013.
- Koulish, S., Kramer, C. R. & Grier, H. J. Organization of the male gonad in a protogynous fish, *Thalassomabi fasciatum* (Teleostei: Labridae). *Journal of Morphology*, 254, 292-311. 2002.
- Lima, R. L. V. de A. Determinação de esteroides e eletrólitos plasmáticos em fêmeas adultas de tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) Pisces, Teleostei durante a maturação gonadal (*Tese de Doutorado*). Universidade de São Paulo, São Paulo. 1997.

- Lowerre-Barbieri, S. K., Ganius, K., Saborido-Rey, F., Murua, H., & Hunter, J. R. Reproductive timing in marine fishes: variability, temporal scales, and methods. *Marine and Coastal Fisheries*, 3(1), 71-91. 2011.
- Lubzens E, Young G, Bobe J, Cerdà J. Oogenesis in teleosts: how eggs are formed. *Gen Comp Endocrinol*. 2010 Feb 1;165(3):367-89. doi: 10.1016/j.ygcen.2009.05.022. Epub 2009 Jun 6. PMID: 19505465.
- Maciel, P. O. (2009). Efeito do praziquantel sobre as variáveis sanguíneas de *Colossoma macropomum* Curvier, 1818 (Characidae: Serrasalminae) e sua eficiência como anti-helmíntico no controle de parasitas monogenóides (Plathyhelminthes: Monogenoidea) / Patrícia Oliveira Maciel. Manaus: [s.n.], 2009. xv, 81 f. : il. *Dissertação* (mestrado)-- INPA/UFAM, Manaus, 2009 Orientador: Elizabeth Gusmão Affonso Área de concentração : Biologia de Água Doce e Pesca Interior. CDD 19. ed. 597.5042.
- Mello, F. O.; Ribeiro, C. A. L.; Resende, R. P.; Emiko K., Povh, J. A.; Fornari, D. C.; Barreto, R. V.; MCmanus, C.; e Streit JR, D. Growth curve by Gompertz non linear regression model in female and males in tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 87(4), 2309-2315. Epub 27 de novembro de 2015. Disponível em <https://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201520140315>.
- Mendes, J. M. (2013). Influência do estresse do pré-abate e durante o abate na qualidade do tambaqui (*Colossoma macropomum*) cultivado. *Dissertação* (mestrado) – ATU/INPA, Manaus, 2013 Orientador: Jesus, Rogério Souza de Co-orientador: Inoue, Luís Área de concentração: Manejo e tecnologia de pescado.
- Mylonas, C. C., Fostier, A., Zanuy, S. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *General and comparative endocrinology*, 165 (3), 516-534. 2010.
- Nakamura, M. et al. Gonadal sex differentiation in teleost fish. *Journal of Experimental Zoology*, v. 281, p. 362-372, 1998.
- Navarro, F. K. S. P., & Navarro, R. D. Importância do foto período no crescimento e na reprodução de peixes. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 36(2), 94-99. 2012.
- Nocillado, J. N., Elizur, A. Neuro endocrine regulation of puberty in fish: insights from the grey mullet (*Mugil cephalus*) model. *Molecular Reproduction and Development*, 75(2), 355-361. 2008.
- Oliveira, L., O'sullivan, F. L. A., Duncan, w., & Santos, N. D. S. (2018). Avaliação de parâmetros de puberdade em tambaquis (*Colossoma macropomum*) mantidos em tanques-rede. *Anais da XIV jornada de iniciação científica da Embrapa Amazônia Ocidental*; Embrapa, 2018.
- Oliveira-Ribeiro, C. A., Pelletier, E., Pfeiffer, W. C. e Rouleau. Comparative uptake, bioaccumulation, and gill damages of inorganic mercury. in tropical and Nordic fresh water fish. *Environmental Research*. vol. 83, p. 286-292, 2000.
- Passini, G., Carvalho, C. V. A., Sterzelecki, F. C., Baloi, M. F., Cerqueira, V. R. Spermatogenesis and steroid hormone profile in puberty of laboratory-reared common snook (*Centropomus undecimalis*). *Aquaculture*, 500, 622-630. 2019.
- Patiño, R., and Sullivan, C.V. Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in teleost fishes. *Fish Physiol. Biochem.*, 26: 57–70. 2002.
- Quagio-Grassiotto, I., Wildner, D. D., Ishiba, R. Gametogenesis in fish: relevant aspects for the reproductive management. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 37(2), 181-191. 2013.
- Querol, M. V. M., Querol, E., Gomes, N. N. A. Fator de condição gonadal, índice hepatossomático e recrutamento como indicadores do período de reprodução de *Loricariichthys platymetopon* (Osteichthyes, Loricariidae), bacia do rio Uruguai médio, sul do Brasil. *Iheringia. Série Zoologia*, 92, 79-84. 2002.
- Ranzani-Paiva, M. J. T., Salles, F. A., da Costa Eiras, J., das Eiras, A. C., Ishikawa, C. M., Alexandrino, A. C. Análises hematológicas de curimatá (*Prochilodus scrofa*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e tambaqui

(*Colossoma macropomum*) das estações de Piscicultura do Instituto de Pesca, Estado de São Paulo. *Boletim do Instituto de pesca*, 25(único), 77-83, 1998/1999. 1999.

Ranzani-Paiva, M.J.T. Características hematológicas de tainha, *Mugil platanus* Günther, 1880 (Osteichthyes, Mugilidae) da região estuarino-lagunar de Cananéia-SP (Lat. 25000'S – Long. 47055'W). *B. Inst.Pesca*, 22 (1): 1-22. 1995.

Ranzani-Paiva, M.J.T. Godinho, H.M. *Hematological characteristics of the curimatá Prochilodus scrofa* (Osteichthyes, Characiformes, Prochilodontidae), stocked in experimental conditions. *B. Inst.Pesca*, 13 (2):115-120. 1986.

Reidel, A., Romagosa, E., Feiden, A., Boscolo, W. R., Coldebella, A., Signor, A. A. Rendimento corporal e composição química de jundiás alimentados com diferentes níveis de proteína e energia na dieta, criados em tanques-rede. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 39, 233-240. ISSN 1806-9290. 2010. www.sbz.org.br.

Rotili, DA, Fornari, DC, Zardo, EL, Esquivel-Muelbert, JR, Bernardi, M., Siqueira-Silva, DH, & Streit Jr, DP. Níveis de esteroides sexuais em fêmeas e machos de *Brycon orbignyanus* ao longo de diferentes idades juvenis e adultas e durante a indução hormonal nas fêmeas maduras. *Aquicultura*, v. 548, p. 737695, 2022.). Contents lists available at Science Direct Aquaculture journal homepage: www.elsevier.com/locate/aquaculture <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737695>

Schiavone, R., Zilli, L., Storelli, C. y Vilella, S. Changes in hormonal profile, gonads and sperm quality of *Argyrosomus regius* (Pisces, Scianidae) during the first sexual differentiation and maturation. *Therio genology* 77, 888-898. 2012.

Schulz, R. W., de França, L. R., Lareyre, J.-J., Le Gac, F., LeGac, F., Chiarini-Garcia, H., et al. Spermatogenesis in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165, 390–411. 2010. doi: 10.1016/j.ygcen.2009.02.013

Schulz, R.W. and Miura, T. Spermatogenesis and its endocrine regulation. *Fish Physiol. Biochem.* 26: 43–56. 2002.

Snaterse G, van Dessel LF, van Riet J, Taylor AE, van der Vlught-Daane M, Hamberg P, de Wit R, Visser JA, Arlt W, Lolkema MP, Hofland J. 11-Ketotestosterone is the predominant active androgen in prostate cancer patients after castration. *JCI Insight.* 2021 Jun 8;6(11):e148507. doi: 10.1172/jci.insight.148507. PMID: 33974560; PMCID: PMC8262344.

Souza, J., & O'sullivan, F. L. A. Desenvolvimento gonadal de tambaqui (*Colossoma macropomum*). In Embrapa Amazônia Ocidental-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: Jornada de iniciação científica da Embrapa Amazônia Ocidental, 9., 2012, Manaus. *Anais...* Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2012. p. 123-132. (Embrapa Amazônia Ocidental. Documentos, 100). 2012.

Taranger, G. L., Carrillo, M., Schulz, R. W., Fontaine, P., Zanuy, S., Felip, A., Hansen, T. Control of puberty in farmed fish. *General and comparative endocrinology*, 165(3), 483-515. 2010.

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.

Tenugu, S., Pranoty, A., Mamta, S. K., Senthilkumaran, B. Development and organisation of gonadal steroidogenesis in bony fishes-A review. *Aquaculture and Fisheries*, 6(3), 223-246. 2021.

Vazzoler, A. E. A. DE M. Biologia da população de peixes teleósteos, teoria e prática. Maringá – PR. 169p. 1996.

Volkoff, Helene; London, Sydney. Nutrition and reproduction in fish. *Encyclopedia of reproduction*, v. 9, p. 743-748, 2018.

Yaron, Z. & Levavi-Sivan, B. (2011) Endocrine regulation of fish reproduction. In: Farrel AP. (ed). Encyclopedia of fish physiology: from genome to environment. San Diego: Academic Press, Elsevier, pp. 1500–1508.

Capítulo II
Submetido à revista Aquaculture

Effects of mesterolone on the sex ratio, physiology and liver function of juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*

Iraní da Silva de Morais¹, Vanessa Ribeiro Reis², Gabriela Brambila de Souza³, Aldessandro da Costa Amaral¹, Rosilane Gomes de Souza de Oliveira⁴, Gabriela Tomas Jerônimo¹, Fernanda L. Almeida O'Sullivan⁴

¹Universidade Federal do Amazonas, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros, Manaus, Amazonas, Brazil; ²Universidade Federal do Amazonas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Manaus, Amazonas, Brazil; ³Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas, Campus Presidente Figueiredo, Amazonas, Brazil; ⁴Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, Amazonas, Brazil.

Corresponding author: Fernanda L. Almeida O'Sullivan. Email: fernanda.almeida@embrapa.br Postal address: 319, CEP: 69010-970, Manaus, Amazonas, Brasil.

Abstract

In fish, sex dimorphism generates benefits for farming when one gender displays better production trait(s) than the other. In such cases, farming exclusively one sex becomes more profitable. The tambaqui *Colossoma macropomum* is the Brazilian native species with the highest production in the Brazilian fish industry. In tambaqui farming, it is more lucrative to produce females because they grow faster than males. As the species has the XX/XY genetic sex determination system, the use of XX neo-males (masculinized genetic females) as breeders to produce solely all-female populations is the most sustainable approach. Aiming to obtain tambaqui neo-males, we tested three doses of mesterolone (1- α -methylandrosterone; at 10, 20 and 40 mg kg⁻¹) through the diet of pre-differentiated juveniles for 3 months, to masculinize the females. We evaluated the sex ratio and immediate and long-term effects on the physiology of the fish, by hematological and biochemical analysis of the blood plasma at the end of the treatment, and 3 months later. Possible hepatotoxic and mutagenic effects of mesterolone were also assessed by liver histopathology, concentration of hepatic enzymes and micronucleus test (fragmented DNA) in the erythrocytes. The results indicate that 20 and 40 mg kg⁻¹ of mesterolone produced over 77% phenotypic males, has no influence on growth and on the biochemical parameters, does not cause DNA damage, nor has toxic effects to the liver of tambaqui. A decrease in the hepatosomatic index and increase in some hematological parameters were observed during the treatment, but all values became similar to the control 3 months after the end of the experiment.

Keywords: Aquaculture. Masculinization. Monosex population. Sex steroid.

Highlights of the manuscript

- 20 mg.Kg⁻¹ of Mesterolone in the feed of undifferentiated tambaqui results in 79% of males.
- Mesterolone does not affect tambaqui growth.
- Mesterolone has an acute effect on the hematocrit, hemoglobin, erythrocyte, MCH and MCHC concentrations of juvenile tambaqui.
- Mesterolone added to the diet does not have mutagenic effects in tambaqui.

1. Introduction

Aquaculture has emerged as an important livestock activity to meet the constant increase in fish consumption while natural stocks are depleting. In most fish species, some production traits stand out in a gender, making it more lucrative. For these species, the cultivation of monosex population is desirable. In ornamental species, features as growth, body size and color justifies research effort dispensed to monosex population production of electric yellow cichlid (*Labidochromis caeruleus*) (Karshli et al., 2021), guppy (*Poecilia reticulata*) (Piferrer and Lim, 1997; Turan et al., 2006), rosy barb (*Pethia conchonius*), dwarf gourami (*Trichogaster lalius*) (Ramee et al., 2020) and betta (*Betta sp.*) (Susanto et al., 2021). The growth sexual dimorphism favors the females in common carp (*Cyprinus carpio* L) (Zhai et al., 2022), yellow drum (*Nibea albiflora*) (Xu et al., 2018) and black cod (*Anoploma fimbria*) (Luckenbach et al., 2017). Females are also desired for the production of caviar by the Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) (Curzon et al., 2022), and to obtain higher meat quality in stinging catfish (*Heteropneustes fossilis*) (Ahmed et al., 2015), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Kuzminski and Dobosz, 2010) and Atlantic salmon (*Salmo salar*) (Lee et al., 2004).

To produce a monosex population, it is fundamental to manipulate the sex phenotype of the fish directly or of their parents. In species in which females are homogametic (XX), an efficient masculinization of the females generates sex-reversed females, or neo-males, which exhibit male physiology and produce semen when mature (Piferrer, 2001). However, their female genotype remains unaltered and neo-males present only X sex chromosome-carrying spermatozoa, which ultimately leads to the production of all-female offspring when crossed with normal females (Piferrer, 2001). By this indirect production of a female population, only one founder receives the hormonal treatment and at very early stages and

thereupon can be used along its entire reproductive life for the production of successive batches of females. This avoids the recurrent steroid administration in each batch of fries (Piferrer, 2001).

It is widely reported that sex in fish can be manipulated by the administration of different estrogens, androgens, or even endocrine disruptors, such as aromatase or androgen receptor inhibitors (Fenske and Segner, 2004; Xiong et al., 2022). For producing neo-males, different natural and synthetic androgens can be used. The mesterolone (M, 17- β -hydroxy-1- α -methyl-5- α -androstan-3-one, C₂₀H₃₂O₂, or 1- α -methylandrosterone) is a non-17- α -alkylated steroid synthetically derived from dihydrotestosterone (Agostoni et al., 1980; PubChem, 2022). It is a non-aromatizable androgen and cannot be converted to estradiol. M is efficient in creating a masculine phenotype in ornamental guppy (*Poecilia reticulata*) (Vidyarathna and Cumaranatunga, 2009), and in hybrids of *Cichlasoma trimaculatum* crossed with other cichlids (Silarudee and Kongchum, 2008). For the industry of fish meat production, mesterolone has been widely used to masculinize Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Mohamed, 2019; Nwachuku, 2012; Oyin et al., 2008), hybrid Thai red tilapia (*Oreochromis* sp.) (Petchjul, 2005) and blue tilapia (*O. aureus*) (Desprez et al., 2003).

Tambaqui (*Colossoma macropomum*) is the native species most produced in Brazilian aquaculture (IBGE, 2022). The farming of tambaqui is endorsed by its favorable characteristics to cultivation (easy reproduction, good growth ratio, great resistance to pH changes and to low water oxygen), in addition to having a tasteful and largely appreciated meat (Hilsdorf et al., 2022). In Brazil, the industry is still not meeting the production numbers required to supply the high demand for this species. To meet the current and future demand, a considerable increase in production of tambaqui urges, while it also requires sustainable solutions (reviewed in Hilsdorf et al., 2022). Female tambaqui grow faster and therefore are heavier (16 - 50%) than males (Almeida et al., 2016; Ariede et al., 2023). To support the native aquaculture industry, our group has developed a protocol to feminize pre-differentiating tambaqui with the use of estrogen to produce all-female populations (Reis and Almeida, 2018). However, the recent information that tambaqui sex differentiation is not influenced by water pH or temperature (Morais et al., 2020), but instead is triggered by a chromosomal sex determination system in which females are homogametic (Varela et al., 2021) opened the opportunity for the production of neo-male in the species. To do so, in this work we aimed to sex reverse female tambaqui by using mesterolone, due to its androgenic activity with low toxic effects (Koukkou, 2008). Hence, we evaluated the effects of

mesterolone in the masculinization, physiology, and hepatotoxicity of treated larvae. This is the first study aiming at developing a technique to produce tambaqui neo-males, as an environmentally friendly solution to increase tambaqui farming production.

2. Material and methods

2.1 Ethics statement

All procedures of this work comply with the Ethical Principles of Animal Experimentation adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and were approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) – Embrapa Amazônia Ocidental (n° 02/2021, SEI 21158.000868/2021-29). The project has Authorization of Access to Genetic Heritage under register A5784B5.

2.2 Fish and water parameters

Two days-old larvae were transported from the Center of Aquaculture Technology, Training and Production of Balbina – CTTPA – Presidente Figueiredo, Brazil (1° 55'10.01" S; 59 ° 27'54.67" W) to the facilities of Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, Amazonas, Brazil (2° 53'27.0" S; 59°58'11.9" W). After 28 days of quarantine, larvae were randomly distributed in 12 polyethylene tanks (270 L; n = 100/tank), in a closed recirculating system to receive the treatments.

Before and during the experimental period, water temperature (°C), pH and dissolved oxygen (mg L⁻¹) were measured daily; and ammonia (mg L⁻¹), nitrite (mg L⁻¹), alkalinity (mg L⁻¹) and hardness (mg L⁻¹) weekly.

2.3 Treatments and sampling

Three doses of mesterolone (Proviron®; Schering, São Paulo, Brazil) were tested within three repetitions: 10, 20 and 40 mg kg⁻¹ of feed. The steroid was first dissolved in 90% ethanol (EtOH), mixed with polyvinylpyrrolidone (PVP; 0.5%) for polymerization and sprayed onto commercial fish feed containing 45% crude protein (CP). The control group received feed treated with 90% EtOH and 0.5% PVP. Each treatment was offered in three random tanks, containing 100 30-days-old juveniles (total length 2.5 ± 0.4 cm and body weight 0.5 ± 0 gr) for 90 days. To simplify our data presentation ahead, we identify these three months of treatment as the phase 1 of our study.

At the end of phase 1, we sampled six fish per tank (n= 18/treatment) to evaluate a possible acute effect of mesterolone on the blood parameters and on the integrity of the

hepatic stroma (i.e. hepatotoxic effects). For sampling, fish were deeply sedated with 250 mg L⁻¹ benzocaine before killing (Sigma-Aldrich, 2018). Blood was sampled from the caudal vein with a syringe rinsed with 10% EDTA. Liver was removed and weighted for estimation of the hepatosomatic index (HSI; liver weight/body weight x 100) and a small fragment was rapidly fixed in 10% formalin buffered in PBS at pH 6.9, and included in paraffin for histology, according to routine procedures.

The remaining fish were transferred to 12 net cages placed in a common earth pond. They were fed with commercial fish feed (32% CP), twice a day, until apparent satiety during 3 months, which we consider the growth period of our study, or phase 2. At the end of phase 2, when the fish were 7 months old, we did the final sampling, as described above, with the exception that also the gonads were sampled, weighed, a small fragment fixed (in Bouin's solution) and processed for histology analysis. The gonadosomatic index was calculated as follows: gonad weight/body weight x 100. The histological analysis of the gonads allowed the sex identification of each individual, which was used to estimate the ratio of females and males in the groups.

2.4 Histology

The liver parenchyma was evaluated considering the shape and organization of the hepatocytes, the presence of one or more nuclei and their shape. The presence of exocrine pancreatic tissue was also evaluated. The bile duct was also analyzed, characterized by the presence of a simple cubic epithelial tissue under a smooth muscle tissue, as already described for tambaqui by Costa et al. (2012).

To register the sex ratio of each group, the gonads were histologically analyzed. Testis were identified as presenting early germ cells, i.e. spermatogonia (mostly alone), surrounded by the somatic Sertoli cells. The presence of developing spermatogenic cysts was also recorded in some males. Ovaries were mainly identified by the presence of clusters of oogonia, restricted to the developing ovarian lamella. In some samples, some individualized previtellogenic oocytes could be already observed.

2.5 Hematological parameters

Hematocrit and hemoglobin rate were analyzed as described by Goldenfarb et al. (1971) and Drabkin (1948), respectively. Erythrocytes were counted in a Neubauer chamber under an optical microscope with a 40X objective, after blood dilution in citrate formaldehyde (Collier, 1944). Then, we could estimate mean corpuscular volume [MCV =

(hematocrit x 10)/erythrocytes], mean corpuscular hemoglobin [MCH = (hemoglobin x 10)/erythrocytes] and mean corpuscular hemoglobin concentration [MCHC = (hemoglobin rate x hematocrit) x 100], according to Wintrobe (1934).

2.6 Liver biochemical parameters and enzyme activity

Immediately after sampling, the blood samples were centrifuged at 2500 rpm for five minutes and the plasma was collected and frozen at -80°C until analysis. The biochemical variables analyzed were: glucose, determined by an enzymatic colorimetric test (InVITRO[®], Belo Horizonte, Brazil), total protein, measured by the biuret method, and albumin, determined by the bromocresol green method (colorimetric determination; InVITRO[®], Belo Horizonte, Brazil). The subtraction of albumin from total plasma protein concentration allowed the estimation of serum globulin. To determine the activity of the enzyme alanine aminotransferase, the kinetic method was used with the use of commercial kit (InVITRO[®], Belo Horizonte, Brazil).

2.7 Micronucleus in erythrocytes

Mutagenicity was examined in the blood erythrocytes, which were used to investigate the presence of micronucleus (MN). At the end of the treatment, the MN assay was applied in air dried, methanol fixed blood smears stained with Giemsa (10% in phosphate buffer at pH 6.8) for 10 minutes. In each sample, 2000 erythrocytes were analyzed by the presence of MN. The evaluation of MNs was according to the criteria proposed by Fenech et al. (2003).

2.8 Statistical analysis

All data were checked for normal distribution and homogeneity of variance by the Shapiro-Wilk and Bartlett's test, respectively. The Chi-Square (χ^2) test was used to check differences in the sex ratio between each treatment and the control group. The equality of the remaining data was analyzed by ANOVA, followed by Tukey post hoc test ($p < 0.05$). Data are represented as mean \pm SD. GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, Inc.) was used for statistical analysis and graphs design.

3. Results

3.1 Water parameters and fish survival and growth

During 90 days of treatment, water temperature (27.1 ± 2.7 °C), pH (6.7 ± 0.4), dissolved oxygen (5.6 ± 0.8 mg L⁻¹), ammonia (0.7 ± 0.1 mg L⁻¹), nitrite (0.2 ± 0.1 mg L⁻¹),

alkalinity ($8.8 \pm 4.4 \text{ mg L}^{-1} \text{ CaCO}_3$) and hardness ($15.2 \pm 11.7 \text{ mg L}^{-1} \text{ CaCO}_3$) were appropriate for the cultivation of tambaqui (Hilsdorf et al., 2022). No mortality was recorded during this first phase, except in two tanks (treatments of 20 and 40 mg kg⁻¹), when the supply of oxygen failed overnight, and the fish died. No mortality was recorded during the growth period (phase 2), when fish were reared in net-cages.

Biometrics at the end of phase 1 showed that the weight and total length of all groups were similar. However, fish treated with 10 or 20 mg kg⁻¹ were bigger in standard length than the controls at this point (Fig. 1). This difference disappeared within 3 months (end of phase 2), when no treated group was different from the controls in weight, total length or standard length. However, there was a slight increase in weight along with the concentration of mesterolone, reaching significance from the lowest to the highest dose (Figure 1).

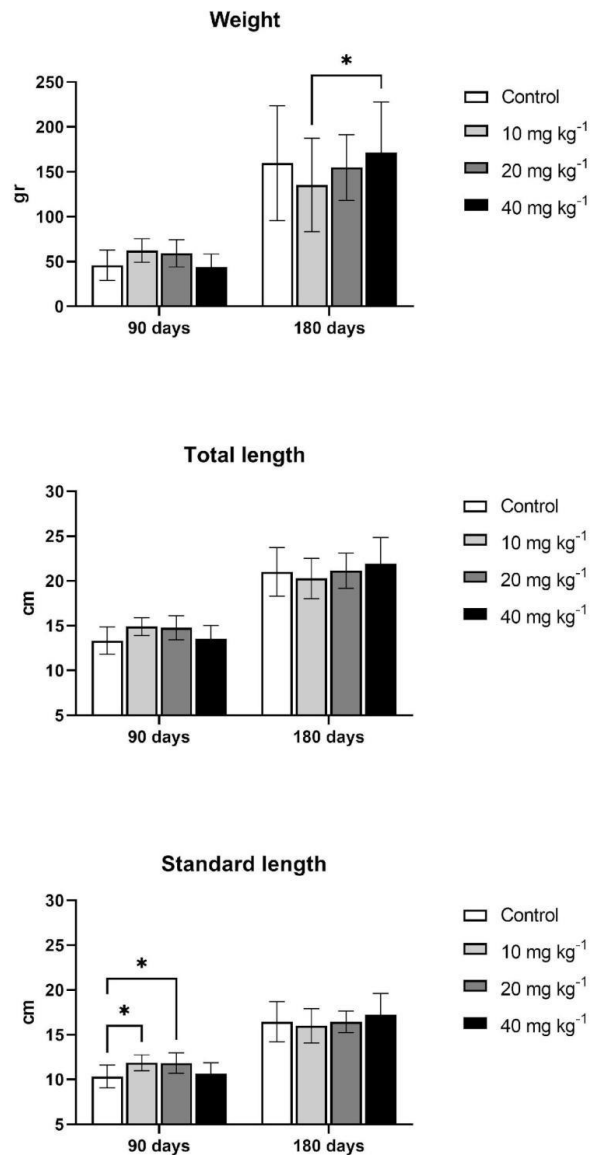


Figure 1. Weight, total and standard length of tambaqui *C. macropomum* treated with different doses of mesterolone (0 - control, 10, 20 and 40 mg kg⁻¹ of feed) after 90 days of treatment (90 days) and 3 months after the end of the treatment (180 days)(n = 18/group).

3.2 Gonadosomatic index (GSI), sex identification and sex ratio

At the final sampling, when the fish were 7 months old and gonads were sampled, there was no visual difference between ovaries and testes as the gonads were similar in color, weight and shape in all fish. Accordingly, there was no difference on the mean GSI of all groups (Figure 2).

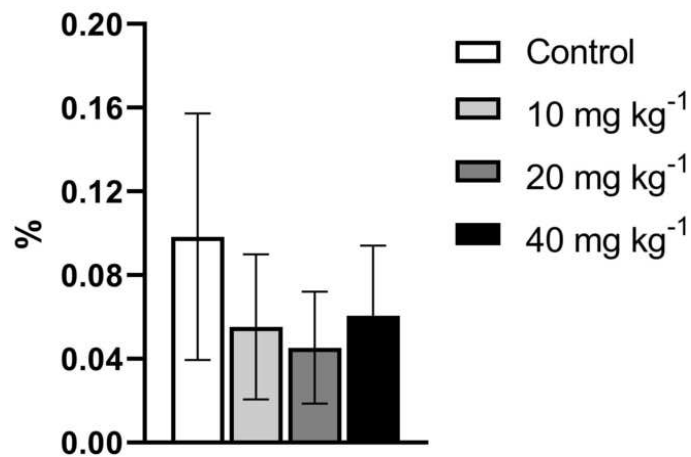


Figure 2. Gonadosomatic index of 7 months old tambaqui *C. macropomum* treated with different doses of mesterolone (0 - control, 10, 20 and 40 mg kg⁻¹ of feed) over the period of sex differentiation during 90 days (n = 18/group).

Histologically, the ovaries were abundant in connective tissue and contained randomly distributed nests of oogonia. Some ovaries also presented pre-vitellogenic oocytes restricted to the developing ovarian lamella. All females were immature (Figure 3a). Testis presented single type A spermatogonia associated with Sertoli cell, distributed uniformly in the stroma. In some areas there were cysts of type B spermatogonia, representing the proliferative phase of spermatogenesis. Some testis presented more advanced spermatogenic cysts in the germinal compartment, containing spermatocytes and spermatids (Figure 3b). Therefore, the males presented an earlier onset of gametogenesis than the females .

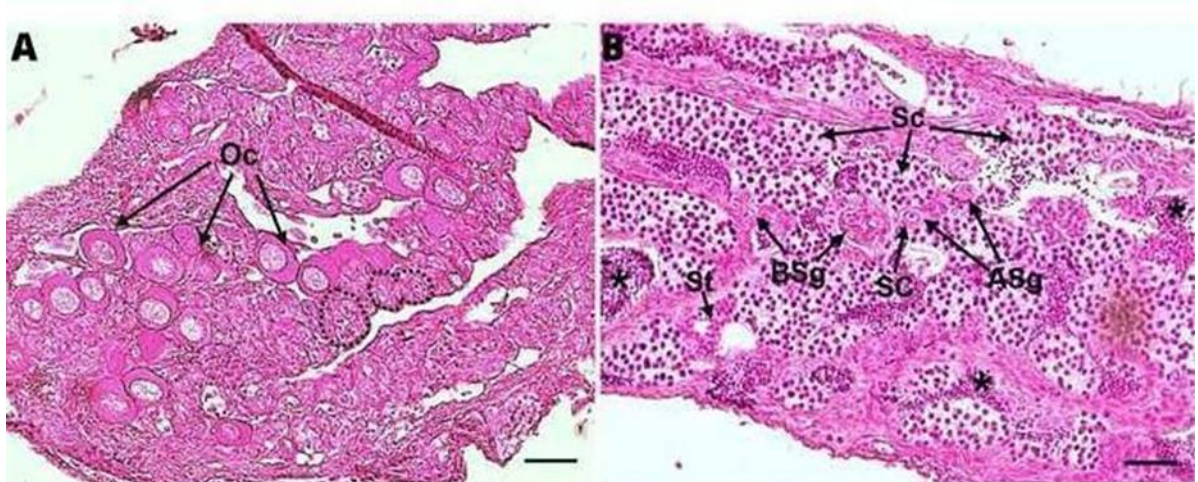


Figure 3. Gonad parenchyma of tambaqui *C. macropomum* females (A) and males (B). Oc: previtellogenic oocytes, ASg: type A spermatogonia, BSg: type B spermatogonia, Sc: spermatocytes, St: spermatids, SC: Sertoli cell. Asterisks point spermatozoa and dotted line show oogonial niche. Scale bars represent 25 μm in A and 10 μm in B.

The control group presented 44.4% of males and the groups treated with 10, 20 and 40 mg kg^{-1} of mesterolone had 55.5, 76.6 and 77.7% of males, respectively. The treatment with 10 mg kg^{-1} was not efficient in the masculinization of tambaqui ($p = 0.6473$), while 20 and 40 mg kg^{-1} of mesterolone were effective in increasing the number of males to the control (Figure 4).

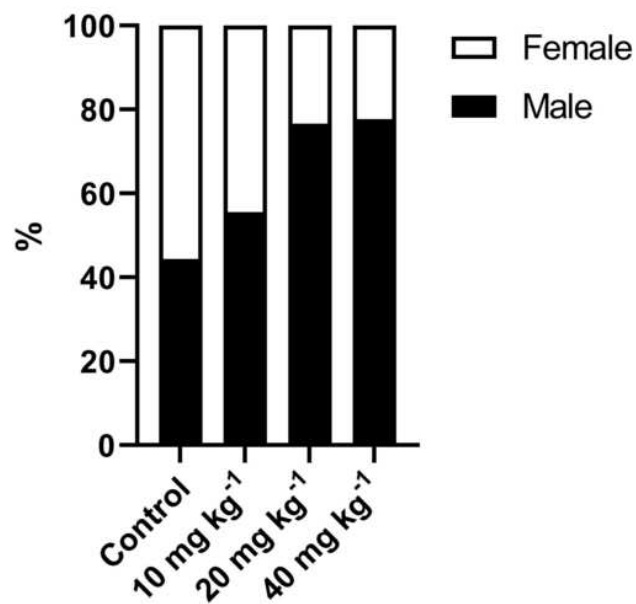


Figure 4. Sex ratio of tambaqui *C. macropomum* treated with different doses of mesterolone (0 - control, 10, 20 and 40 mg kg^{-1} of feed) over the period of sex differentiation during 90 days ($n = 30$ to 45).

3.3 Hepatosomatic index (HSI) and hepatic-histopathology

At the end of the phase 1, the HSI of the fish treated with 20 (2.38 ± 0.2 %) or 40 mg kg^{-1} (2.25 ± 0.2 %) of mesterolone was lower than the control group (2.69 ± 1.2 %; Figure 5). However, at the end of the growth period, the HSI was unbiased.

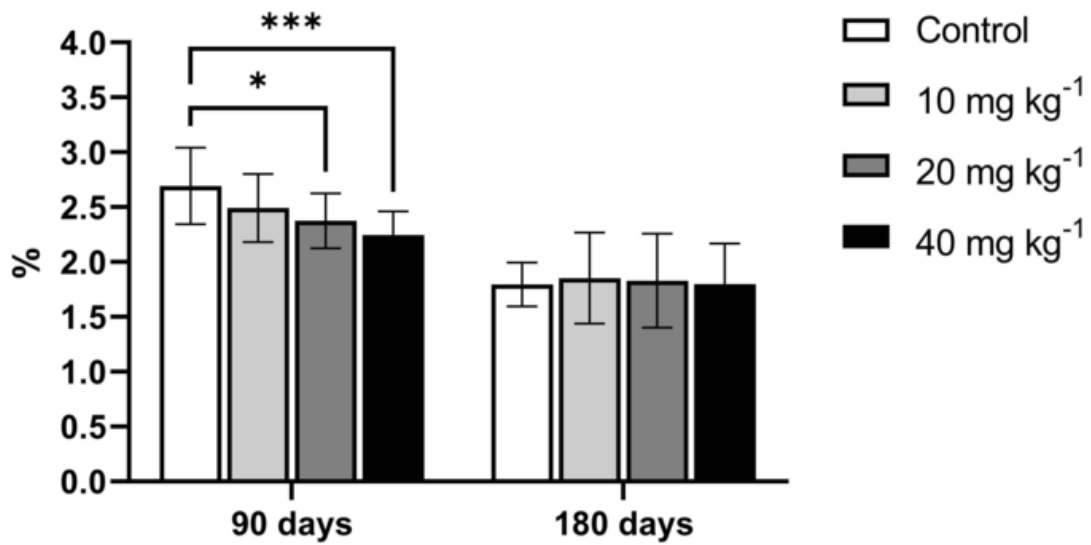


Figure 5. Hepatosomatic index of tambaqui *C. macropomum* treated with different doses of mesterolone (0 - control, 10, 20 and 40 mg kg⁻¹ of feed) after 90 days of treatment (90 days) and 3 months after the end of the treatment (180 days)(n = 18/group).

The hepatic stroma of the fish treated with mesterolone did not differ from the control group in both phases of the study. In general, the liver parenchyma displayed irregularly shaped hepatocytes containing large, slightly rounded and not always centralized nuclei. The hepatocytes were distributed forming misaligned cords between sinusoids (Figure 6). The sinusoids converged to the centrilobular vein. In general, pancreatic tissue was observed involving the central vein and bile ducts. The bile ducts could be characterized by a simple cubic epithelial tissue surrounded by a smooth muscular tissue and were found alone and/or close to blood vessels. We did not observe infiltrations in the sinusoids, lesions, vacuolization of hepatocytes, inflammation or altered shape of sinusoid capillaries in any sample.

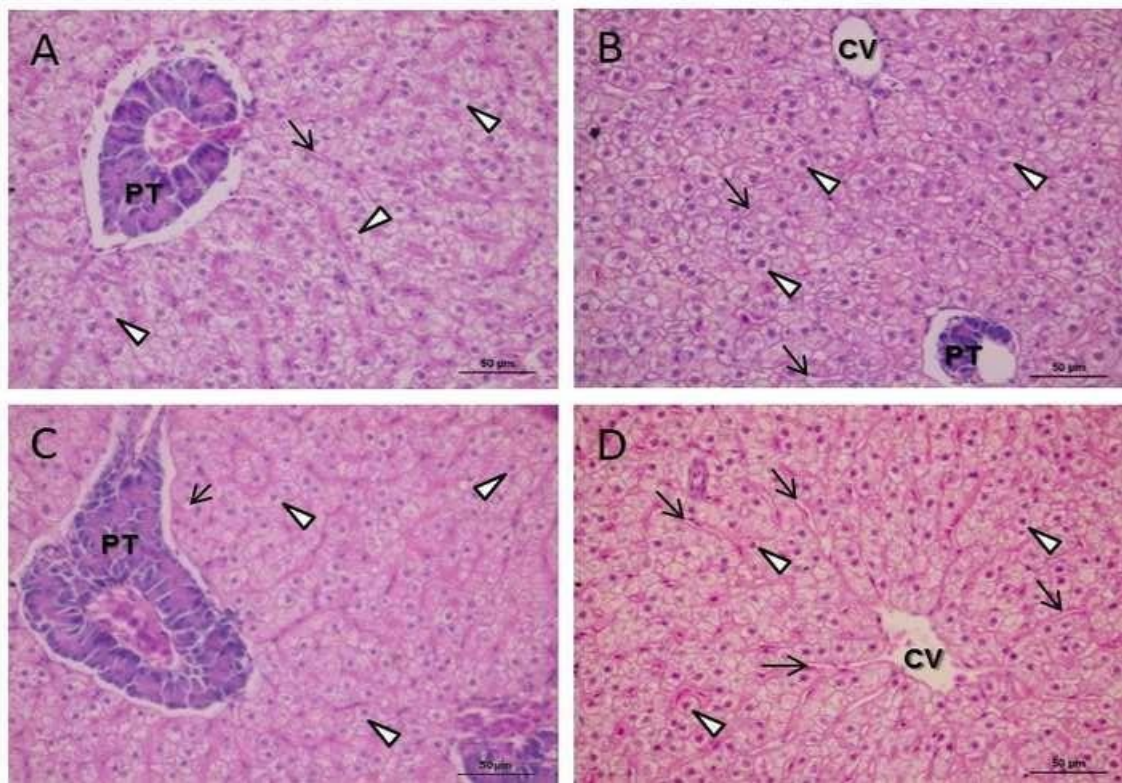


Figure 6. Liver parenchyma of tambaqui *C. macropomum* treated with mesterolone during sex differentiation. A) Control fish at 90 days; B) Fish treated with 40 mg kg⁻¹ of mesterolone after 90 days of treatment; C) Control fish at 180 days; D) Fish treated with 40 mg kg⁻¹ of mesterolone 3 months after the end of the treatment (180 days). Hepatocytes (forming misaligned cords) pointed by white arrowheads; sinusoids pointed by black arrows; bile duct showed by white arrow. CV: central vein; PT: pancreatic tissue.

3.4 Hematological parameters

After 90 days of treatment, the groups that received mesterolone showed alterations in the blood variables. Hematocrit was higher in the treatment of 20 mg M ($28.5 \pm 4.9\%$) than the control group ($24 \pm 4\%$). At this stage, all mesterolone-treated groups presented hemoglobin higher than the control (9.7 ± 1.3 , 10.6 ± 1.36 and 8.5 ± 1.3 g dL⁻¹, respectively versus 7.5 ± 1.8 g dL⁻¹ of the control) as well as higher number of erythrocytes per uL (1.5 ± 0.3 , 1.6 ± 0.2 and $1.4 \pm 0.2 \times 10^6$ respectively versus $1.2 \pm 0.2 \times 10^6$). Regarding the hematimetric indices, there was no difference in mean corpuscular volume (MCV) ($p = 0.261$), but mean corpuscular hemoglobin (MCH) and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) were higher in the treated groups than in the control group (Figure 7).

At the end of the growth phase (at 180 days) the variables above were similar in all groups, except hematocrit, which was lower in the control group ($p = 0.016$) compared to the group of 20 mg M (Figure 7).

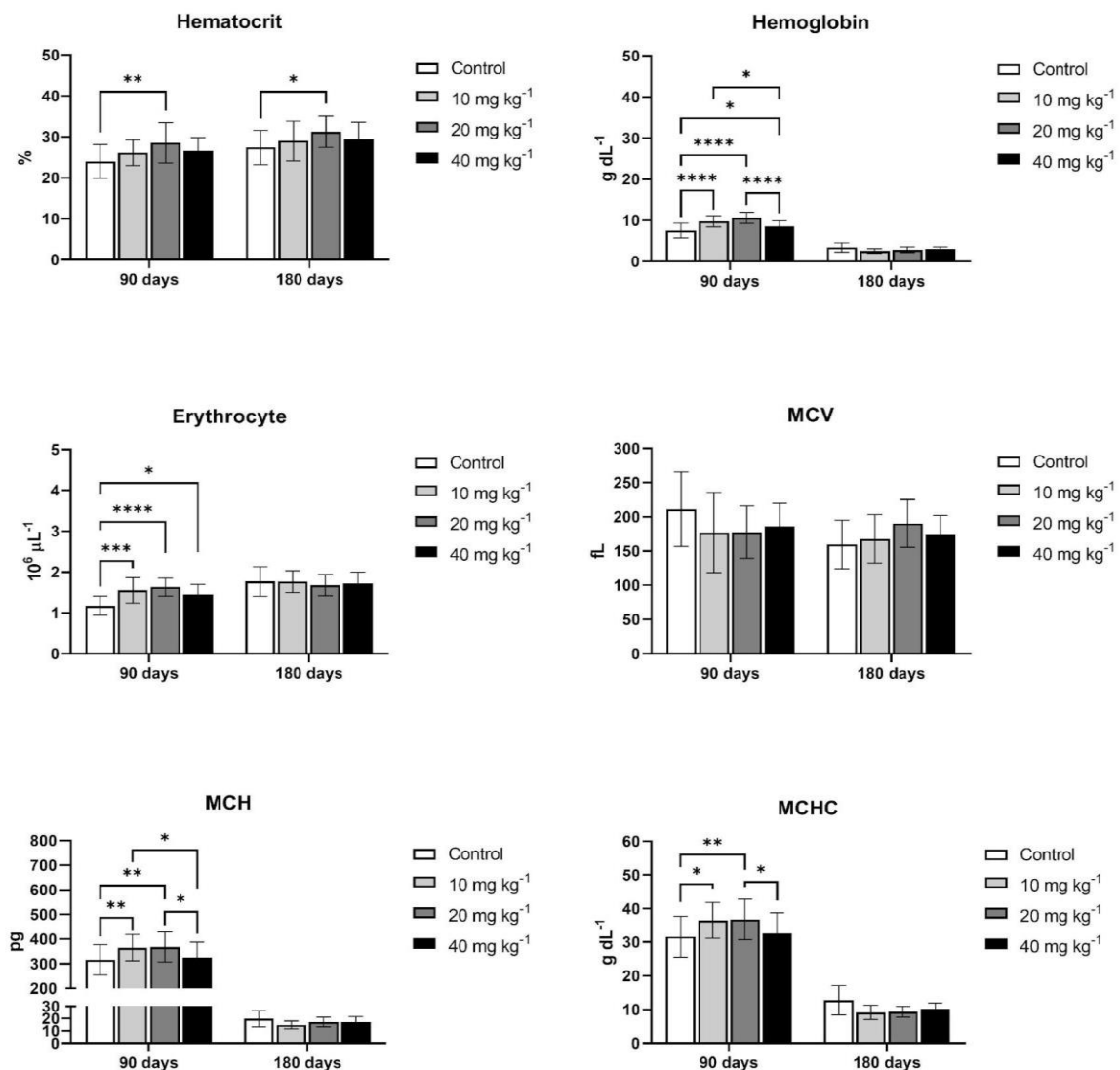


Figure 7. Blood parameters of tambaqui *C. macropomum* treated with different doses of mesterolone (0 - control, 10, 20 and 40 mg kg⁻¹ of feed) after 90 days of treatment (90 days) and 3 months after the end of the treatment (180 days)($n = 18$ /group). MCV: mean corpuscular volume; MCH: mean corpuscular hemoglobin; and MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration.

3.5 Biochemical parameters and enzyme activity

The biochemical assays at 90 days of treatment showed that there was a difference in the values of glucose only between the different doses of mesterolone. The group treated

with the lowest dose of mesterolone presented the highest value, which decreased along with the increasing doses. And the concentration of total protein, albumin, globulin and alanine aminotransferase (ALT) were similar between the control and treated groups. In the final sampling, there was no difference in the concentration of glucose, albumin or the liver enzyme ALT in all groups. However, total protein and globulin were higher in the 10 and 20 mg M groups than in all other groups (Figure 8).

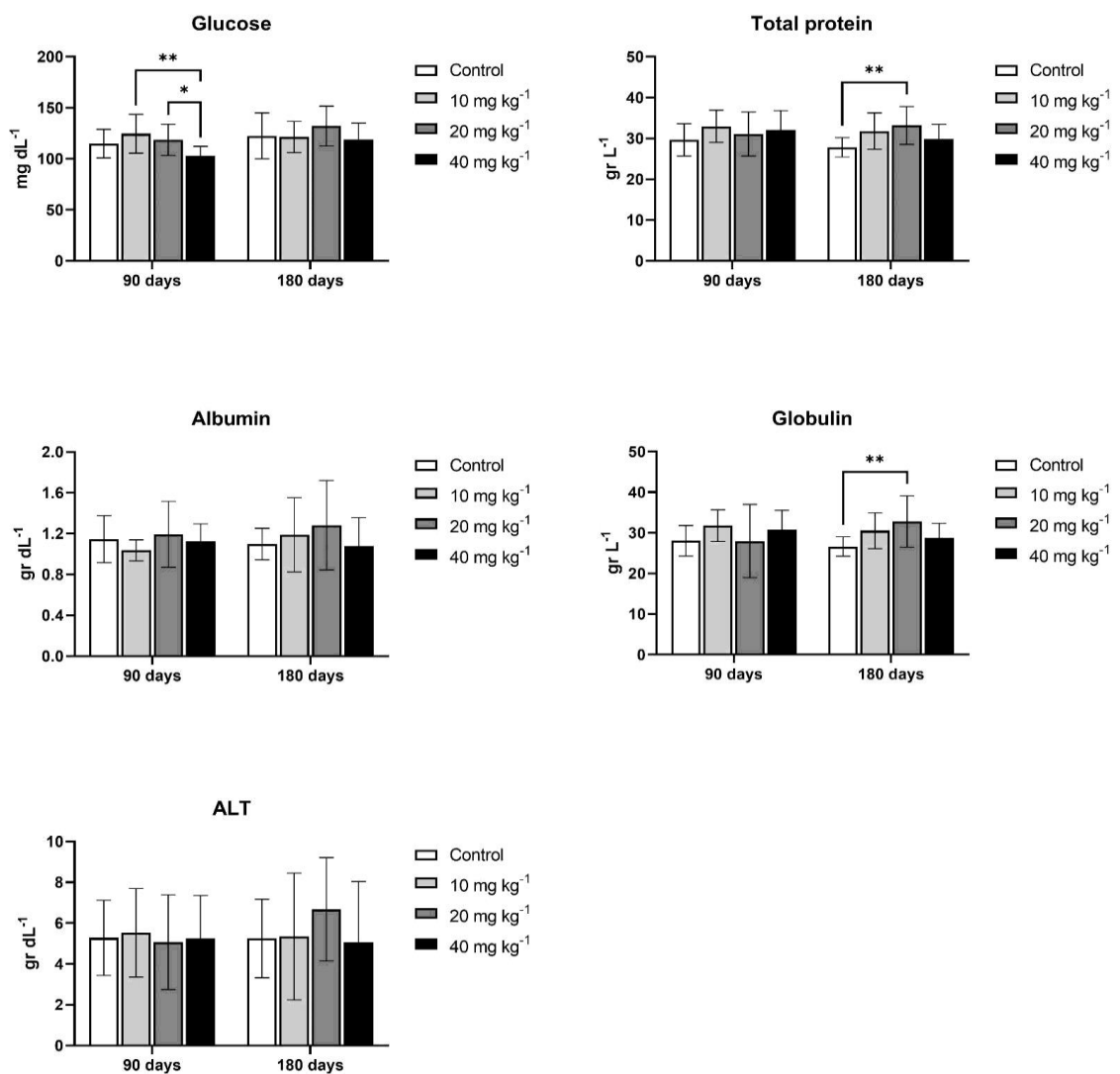


Figure 8. Plasma parameters of tambaqui *C. macropomum* treated with different doses of mesterolone (0 - control, 10, 20 and 40 mg kg⁻¹ of feed) after 90 days of treatment (90 days) and 3 months after the end of the treatment (180 days)(n = 18/group). ALT: alanine aminotransferase.

3.6 Micronucleus in erythrocyte

Mutagenicity was examined by observing the presence of micronucleus (MN) in peripheral blood. The results showed that the tested doses of mesterolone did not damage the DNA of peripheral blood erythrocytes (Figure 9).

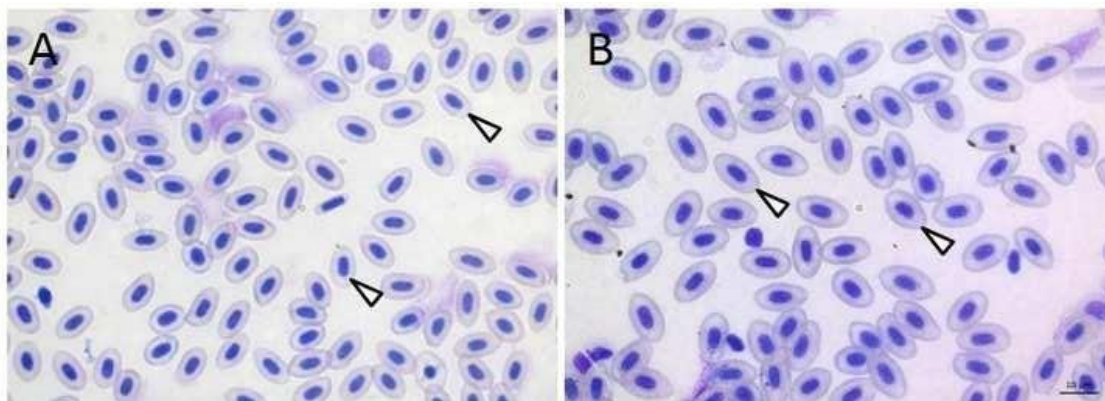


Figure 9. Blood smear of *C. macropum* non-treated (A) and treated (B) with 40 mg kg⁻¹ of mesterolone. No signs of broken DNA was observed in the erythrocytes (arrowhead) of both groups.

4. Discussion

Different synthetic hormones are commonly used in aquaculture for the production of monosex populations in various fish species (Piferrer, 2001). Our group developed a protocol for the direct feminization of tambaqui through the use of estradiol (Reis and Almeida, 2018). However, the recent discovery that tambaqui sex determination is homogametic for females (Varela et al., 2021) endorsed studying the production of neomales (XX♂) to warrant natural generation of female-exclusive batches. This is the first work investigating the use of a synthetic anabolic androgenic steroid (AAS) to masculinize female tambaqui, including the appropriate analysis of its possible effects on the health of the fish.

The inclusion of the non-aromatizable mesterolone (M; 1 α -methyl-5 α -androstan-17 β -ol-3-one) in the diet of pre-differentiating tambaqui was effective in increasing the number of phenotypic males in the population. Treating 1-month-old fish with 20 or 40 mg kg⁻¹ of M during 90 days resulted in 79% and 77% of males, respectively. Most likely, this proportion of males is the resilience limit of the species for a M-induced masculinization, since the ratio of males is stabilized from 20 mg kg⁻¹, and there was no incidence of intersex fish, which would imply insufficient doses (Piferrer, 2001). Moreover, after 3 months of treatment fish

were above 10 cm in total length, indicating that the sex differentiation had completed (Lobo et al., 2020). A limited effect of M on the sex ratio is also reported in Nile tilapia, for which different studies show that the administration of 200 mg kg⁻¹ of M in the diet resulted in the highest number of males in the population, even in comparison with higher doses (250, 300 and 350 mg) (Alam and Monwar, 1998; Oyin et al., 2008) pointing to a limit in this species. Although there are several studies on the use of androgen to masculinize fish, the use of mesterolone is rarely reported, and restricted to tilapias (*Oreochromis spp.*) in which M is able to produce from 97 to 100% of males in Mozambican (*Oreochromis mossambicus*) (Arias, 1995) and Nile tilapia (*O. niloticus*) (Alam and Monwar, 1998; Mohamed, 2019; Oyin et al., 2008).

M-treated tambaqui presented similar GSI to non-treated fish. However, the GSI of the control fish presented a large variance within the group, probably owing to a faster and/or earlier gonad development of some control fish compared with M-treated ones (data not recorded). If this is the case, the use of M delayed gonad development in tambaqui. GSI is an auxiliary parameter to determine the phases of the reproductive cycle, since the maturation of the reproductive cells implies an increase in the weight of the gonads (Barcellos et al., 2001).

Mesterolone did not affect the weight and total length after 90 days of treatment. An increase in standard length was observed at this point in fish treated with 10 or 20, but not 40 mg kg⁻¹ of mesterolone. Three months after the treatment, body weight, total and standard length were similar between treated groups and the control group, showing that there is no long term effect of this androgen in the growth of tambaqui. In tilapia, M has a positive effect on weight gain soon after the treatment (Mohamed, 2019; Nwachuku, 2012; Oyin et al., 2008).

Soon after the treatment, tambaqui treated with M had lower hepato-somatic index (HSI). However, three months later, the HSI of M-treated fish was equal to the control, indicating that there was an immediate but transitory effect of M in the liver size. Since liver is responsible for the metabolism and excretion of various substances, including steroid hormones (Schinoni, 2006), a possible reason for the lower HSI during the treatment is a reduced endogenous steroid synthesis due to a negative control caused by circulating M. When evaluating the liver stroma, we did not find a signal of pathogenicity in M-treated fish. Fish from all groups presented the hepatic parenchyma composed mainly by linear cords composed by hepatocytes and limited by sinusoids that led to central veins. We didn't

record the presence of hepatic lobules nor the formation of a portal triad in any fish, as described by Costa et al. (2012) but instead, the combination of bile duct with vein (mainly) or with artery. Although the steroids are degraded and partially detoxified by the hepatocytes, the liver itself can also be a target of the potential hazardousness of such compounds (Pelissero and Sumpter, 1992). Exogenous chemicals can cause morphological changes in the liver, such as structural lesions, vacuolization of hepatocytes, inflammation, and alteration in the shape of sinusoid capillaries.

Mesterolone increased hematocrit, hemoglobin and erythrocyte concentrations as well as increased MCH and MCHC values soon after the treatments, but disappeared after 3 months. Most likely there was an acute response to M, since AAS retains water and increases the number of red blood cells, causing changes in biochemical and hematological profiles in mammals and fish (Kale et al., 2019; Mohamed, 2019; Sales et al., 2017).

The concentration of glucose, plasma proteins and the hepatic ALT enzyme were not affected by M. Among these parameters, only globulin (and consequently total protein) increased 3 months after the treatment with 20 mg kg⁻¹ M. Globulin is responsible for binding and transporting sex hormones (Lok et al., 2010). Nile tilapia exposed to wastewater effluents exhibit an increase in total protein and globulin levels (Zahran et al., 2021). The ALT is important for assessing the health status of fish exposed to toxins and is commonly used as markers of liver function (Coz-Rakovac et al., 2005; Telli et al., 2016; Zhang et al., 2016). An increase in the ALT levels indicates hepatocellular disorder (Telli et al., 2016). In our study there was no variation in ALT values, and this result associated with liver histology indicates that M did not have hepatotoxic effect in tambaqui.

There was no mutagenic effect of M in any sample. The micronucleus test is used to detect DNA damage in fish exposed to hazard compounds and it is a bioindicator of genotoxic pollution in aquatic environments for Nile tilapia (Vijitkul et al., 2022), jundiá (*Rhamdia quelen*) and catfish (*Pimelodes* sp and *Netuma* sp.).

Altogether, our results show that M has an effect in masculinizing tambaqui from the dose of 20 mg kg⁻¹ of feed, resulting in 79% of males. While there was no influence on fish growth or hepatic stroma, increasing doses of M reduced the HSI. Pre-differentiating tambaqui exposed to M have an increase in some hematological parameters, such as hematocrit, hemoglobin, erythrocyte, MCH and MCHC, which return to normal values 3 months after the treatment.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Amazonas State Research Foundation – FAPEAM (Amazonas Estratégico 145/2018). G.T. Jerônimo thanks the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for the granted research fellowship (Grant No. 314239/2020-0). The authors also wish to thank Embrapa Amazônia Ocidental for the infrastructure to perform the work, to SEPROR, and Fish Farming Station of Balbina/Presidente Figueiredo.

Author Contributions

Iraní da Silva de Moraes: Investigation, analyzed and interpreted the data, and wrote the article. Vanessa Ribeiro Reis: Investigation, analyzed and interpreted the hematological data. Gabriela Brambila de Souza: Investigation, analyzed and interpreted the histological data. Aldessandro da Costa Amaral: Investigation, analyzed and interpreted the histological data. Rosilane Gomes de Souza de Oliveira: Investigation, and sampling. Gabriela Tomas Jerônimo: Supervision of the study, conceptual advice, writing - review and editing. Fernanda L. Almeida O'Sullivan: Conceptualization, supervision, funding acquisition, project administration, resources, data curation, writing - review and editing.

5 References

- Agostoni, A., Cicardi, M., Martignoni, G.C., Bergamaschini, L., Marasini, B., 1980. Danazol and stanozolol in long-term prophylactic treatment of hereditary angioedema. *J Allergy Clin Immunol* 65, 75–79. [https://doi.org/10.1016/0091-6749\(80\)90181-5](https://doi.org/10.1016/0091-6749(80)90181-5)
- Ahmed, G.U., Rahman, M.M., Alam, M.N., Alam, M.A., 2015. Trial of sex reverse percentage on female Shing (*Heteropneustes fossilis*) by using 17 β -Estradiol sex hormone. *Research in Agriculture Livestock and Fisheries* 2. <https://doi.org/10.3329/ralf.v2i2.25016>
- Alam, S., Monwar, M.K., 1998. Effects of mesterolone on growth and sex-ratio of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus). *Indian J. Fish* 45, 293–299.
- Almeida, F.L., Lopes, J.S., Crescencio, R., Izel, A.C.U., Chagas, E.C., Boijink, C., 2016. Early puberty of farmed tambaqui (*Colossoma macropomum*): Possible influence of male sexual maturation on harvest weight. *Aquaculture* 452, 224–232. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.10.031>
- Arias, A.W.H., 1995. Determinación de la eficiencia de la hormona Mesterolona como tratamiento de reversión química del sexo frente a la metiltestosterona para tilapia híbrida roja (*Oreochromis mossambicus*). Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias de Mar, Guayaquil.
- Ariede, R.B., Lemos, C.G., Batista, F.M., Oliveira, R.R., Agudelo, J.F.G., Borges, C.H.S., Iope, R.L., Almeida, F.L.O., Brega, J.R.F., Hashimoto, D.T., 2023. Computer vision system using deep learning to predict rib and loin yield in the fish *Colossoma macropomum*. *Anim Genet* 00, 1–14. <https://doi.org/10.1111/age.13302>
- Barcellos, L.J.G., Wassermann, G.F., Scott, A.P., Woehl, V.M., Quevedo, R.M., Itzés, I., Krieger, M.H., Lulhier, F., 2001. Steroid profiles in cultured female jundiá, the siluridae *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, Pisces Teleostei), during the first reproductive cycle. *Gen Comp Endocrinol* 121. <https://doi.org/10.1006/gcen.2001.7603>
- Collier, H.B., 1944. Haemoglobin. The Standardization of blood haemoglobin determinations.
- Costa, G. de M., Ortis, R.C., de Lima, M.G., Casals, J.B., de Lima, A.R., Kfoury, J.R., 2012. Estrutura morfológica do fígado de tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). *Pesquisa Veterinaria Brasileira* 32. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2012000900022>
- Coz-Rakovac, R., Strunjak-Perovic, I., Hacmanjek, M., Topic Popovic, N., Lipej, Z., Sostaric, B., 2005. Blood chemistry and histological properties of wild and cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in the North Adriatic Sea. *Vet Res Commun* 29. <https://doi.org/10.1007/s11259-005-3684-z>
- Curzon, A.Y., Shirak, A., Meerson, A., Degani, G., Hurvitz, A., Ben-Naim, N., Domovitz, R., Ron, M., Seroussi, E., 2022. Cross-species conservation of a transposase-linked element enables genetic sexing of commercial populations of Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*). *Anim Genet* 53, 441–446. <https://doi.org/10.1111/age.13188>
- Desprez, D., Mélard, C., Hoareau, M.C., Bellemène, Y., Bosc, P., Baroiller, J.F., 2003. Inheritance of sex in two ZZ pseudofemale lines of tilapia *Oreochromis aureus*. *Aquaculture* 218. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00572-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00572-0)
- Drabkin, D.L., 1948. The Standardization of Hemoglobin Measurement. *Am J Med Sci* 215, 110. <https://doi.org/10.1097/00000441-194801000-00017>
- Fenech, M., Chang, W.P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S., Zeiger, E., 2003. HUMN project: Detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 534. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(02\)00249-8](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(02)00249-8)

- Fenske, M., Segner, H., 2004. Aromatase modulation alters gonadal differentiation in developing zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* 67, 105–126. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2003.10.008>
- Goldenfarb, P.B., Bowyer, F.P., Hall, E., Brosious, E., 1971. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. *Am J Clin Pathol* 56. <https://doi.org/10.1093/ajcp/56.1.35>
- Hilsdorf, A.W.S., Hallerman, E., Valladão, G.M.R., Zaminhan-Hassemer, M., Hashimoto, D.T., Dairiki, J.K., Takahashi, L.S., Albergaria, F.C., Gomes, M.E. de S., Venturieri, R.L.L., Moreira, R.G., Cyrino, J.E.P., 2022. The farming and husbandry of *Colossoma macropomum*: From Amazonian waters to sustainable production. *Rev Aquac.* <https://doi.org/10.1111/raq.12638>
- Kale, O.E., Awodele, O., Akindele, A.J., 2019. *Acridocarpus Smeathmannii* (DC.) Guill. & Perr. Root enhanced reproductive behavior and sexual function in male wistar rats: Biochemical and pharmacological mechanisms. *J Ethnopharmacol* 230. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.10.024>
- Karşlı, Z., Şahin, D., Öz, M., Öz, Ü., Aral, O., 2022. The Effect of Dietary Supplementation of 17 α - Methyltestosterone and 17 β -Estradiol Hormones on Growth, Sex Conversion and Reproduction in Electric Yellow Cichlid (*Labidochromis caeruleus*). *Pak J Zool* 54, 213–218. <https://doi.org/10.17582/JOURNAL.PJZ/20210105110138>
- Koukkou, E.G., 2008. Androgen Compounds in Clinical Andrology. *ANHP ANIR* 10(3), 182–187.
- Kuzminski, H., Dobosz, S., 2010. Effect of sex reversal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) using 17 α -methyltestosterone and 11 β -hydroxyandrostenedione. *Archives of Polish Fisheries* 18. <https://doi.org/10.2478/v10086-010-0005-0>
- Lee, P., King, H., Pankhurst, N., 2004. Preliminary Assessment of Sex Inversion of Farmed Atlantic Salmon by Dietary and Immersion Androgen Treatments. *N Am J Aquac* 66. <https://doi.org/10.1577/a03-015>
- Lobo, I.K.C., Nascimento, Á.R. do, Yamagishi, M.E.B., Guiguen, Y., Silva, G.F. da, Severac, D., Amaral, A. da C., Reis, V.R., Almeida, F.L. de, 2020. Transcriptome of tambaqui *Colossoma macropomum* during gonad differentiation: Different molecular signals leading to sex identity. *Genomics* 112. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2020.01.022>
- Lok, S., Tasgin, E., Demir, N., Ozdemir, M., 2010. Long term used testosterone may cause heart and liver damage. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 9. <https://doi.org/10.3923/javaa.2010.2343.2345>
- Luckenbach, J.A., Fairgrieve, W.T., Hayman, E.S., 2017. Establishment of monosex female production of sablefish (*Anoplopoma fimbria*) through direct and indirect sex control. *Aquaculture* 479, 285–296. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.05.037>
- Mohamed, H.A.O., 2019. The Use of Sex Hormone in Sex Reversal of *Oreochromis niloticus*. *Journal of Aquatic Science and Marine Biology* 2, 1–7.
- Morais, I. da, Reis, V.R., de Almeida, F.L., 2020. The influence of the water pH on the sex ratio of tambaqui *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818). *Aquac Rep* 17, 100334. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100334>
- Nwachuku, V.N., 2012. Use of proviron tablets as source of androgen for sex reversal of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus 1758), in: 27th Annual Conference and Biennial General Meeting of the Fisheries Society of Nigeria. FISON, Bayelsa, pp. 64–70.
- Oyin, O., Olugbemi, E.V., Ola, A.G., 2008. Production of all male fingerlings through feeding of androgenic steroid (Mesterolone) in the diet fed as first food to tilapia *Oreochromis niloticus*, in: 22nd Annual Conference of the Fisheries Society of Nigeria. FISON, Kebbi, pp. 258–263.
- Peixe BR, 2023. Anuário Peixe BR da piscicultura, 2023. Texto Comunicação Corporativa, Pinheiros .

- Pelissero, C., Sumpter, J.P., 1992. Steroids and “steroid-like” substances in fish diets. *Aquaculture*. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(92\)90078-Y](https://doi.org/10.1016/0044-8486(92)90078-Y)
- Petchjul, K., 2005. Effects of synthetic androgens on sex reversal and gonadal development of the hybrid, Thai Red Tilapia (*Oreochromis* sp.), in: Proceedings of 43rd Kasetsart University Annual Conference. Kasetsart University, Bangkok, pp. 360–366.
- Piferrer, F., 2001. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. *Aquaculture* 197. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00589-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00589-0)
- Piferrer, F., Lim, L.C., 1997. Application of sex reversal technology in ornamental fish culture. *Aquarium Sciences and Conservation* 1, 113–118. <https://doi.org/10.1023/A:1018391702814>
- PubChem. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 15020, Mesterolone; accessed 2023 Mar. 7. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Mesterolone>
- Ramee, S.W., Lipscomb, T.N., DiMaggio, M.A., 2020. Effects of 17 α -methyltestosterone feeding and immersion on masculinization of rosy barbs *Pethia conchonius* and dwarf gouramis *Trichogaster lalius*. *J World Aquac Soc* 51. <https://doi.org/10.1111/jwas.12703>
- Reis, V.R., Almeida, F.L., 2018. Effect of 17 β -oestradiol on the sex ratio of tambaqui, (*Colossoma macropomum*). *Aquac Res* v. 50, 154–161. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/are.13878>
- Sales, C.F., Silva, R.F., Amaral, M.G.C., Domingos, F.F.T., Ribeiro, R.I.M.A., Thomé, R.G., Santos, H.B., 2017. Comparative histology in the liver and spleen of three species of freshwater teleost. *Neotropical Ichthyology* 15. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-20160041>
- Schinoni, M.I., 2006. Fisiologia Hepática Hepatica. *Gazeta Médica da Bahia* 76, 5–9.
- Silarudee, S., Kongchum, P., 2008. Masculinization of flowerhorn by immersion in androgens. *Silpakorn University Science and Technology Journal* 2, 26–32.
- Sigma-Aldrich. 17 α -Methyltestosterone. accessed 2023 Mar. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/aldrich/69240>
- Susanto, G.N., Sutyarso, Busman, H., Kurniawan, N.R., Hasanah, S.M., 2021. Genital reversal of betta fish by immersion using steroid extract of sea urchins. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci* 674, 012057. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/674/1/012057>
- Telli, E.M.R.P., Frigeri, M., Mello, S.R., 2016. Avaliação da atividade de enzimas hepáticas em dependentes, ex-dependentes e não usuários do etanol. *Brazilian Journal of Clinical Analysis* 48, 245–52.
- Varela, E.S., Bekaert, M., Ganeco-Kirschnik, L.N., Torati, L.S., Shiotsuki, L., de Almeida, F.L., Villela, L.C.V., Rezende, F.P., da Silva Barroso, A., de Freitas, L.E.L., Taggart, J.B., Migaud, H., 2021. A high-density linkage map and sex-linked markers for the Amazon Tambaqui *Colossoma macropomum*. *BMC Genomics* 22, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-08037-8>
- Vidyarathna, N.K.N.K., Cumarantunga, P.R.T., 2009. Effects of mesterolone (a synthetic testosterone derivative) treated food on the sex reversal of young guppy, *Poecilia reticulata* (PETERS), Proceedings of the Sixth Academic Sessions.
- Vijitkul, P., Kongsema, M., Toommakorn, T., Bullangpoti, V., 2022. Investigation of genotoxicity, mutagenicity, and cytotoxicity in erythrocytes of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) after fluoxetine exposure. *Toxicol Rep* 9. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2022.03.031>
- Wintrobe, M., 1934. Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. *Folia haematologica* 51, 3249.

Xiong, Y., Han, Q., Liu, Y., Wang, S., Yang, J., Jiang, W., Hu, J., Chen, J., Li, P., Mei, J., 2022. Biotechnological manipulation of the transition from genetic to temperature-dependent sex determination to obtain high quality neomale in aquaculture. *Aquaculture* 560. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738471>

Xu, D., Yang, F., Chen, R., Lou, B., Zhan, W., Hayashida, T., Takeuchi, Y., 2018. Production of neo-males from gynogenetic yellow drum through 17 α -methyltestosterone immersion and subsequent application for the establishment of all-female populations. *Aquaculture* 489, 154–161. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.02.015>

Zahran, E., Abdelhamid, F., Aboelfadl, E., El-Matbouli, M., 2021. Biomarker responses of Nile tilapia towards wastewater effluents exposure. *Aquac Res* 52, 1382–1394. <https://doi.org/10.1111/are.14992>

Zhai, G., Shu, T., Chen, K., Lou, Q., Jia, J., Huang, J., Shi, C., Jin, X., He, J., Jiang, D., Qian, X., Hu, W., Yin, Z., 2022. Successful Production of an All-Female Common Carp (*Cyprinus carpio* L.) Population Using cyp17a1-Deficient Neomale Carp. *Engineering* 8, 181–189. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2021.03.026>

Zhang, Y., Liu, H., Yao, J., Huang, Y., Qin, S., Sun, Z., Xu, Y., Wan, S., Cheng, H., Li, C., Zhang, X., Ke, Y., 2016. Manipulating the air-filled zebrafish swim bladder as a neutrophilic inflammation model for acute lung injury. *Cell Death Dis* 7, e2470–e2470. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.365>.

Capítulo III

A ser submetido à revista Fishes

Efeito da metiltestosterona na razão sexual, fisiologia e função hepática de juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*)

Iraní da Silva de Moraes¹, Rosilane Gomes de Souza de Oliveira², Gabriela Tomas Jerônimo¹, Fernanda L. Almeida O'Sullivan^{2,*}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil

²Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, Amazonas, Brasil

*Correspondência: fernanda.almeida@embrapa.br

Resumo

O tambaqui é um peixe de porte grande e carne saborosa, compõe o grupo de peixes redondos de grande importância para a piscicultura nacional e principalmente para a aquicultura da região Norte. Todavia, ainda é preciso melhorar as tecnologias de produção para aumentar sua produtividade. Uma das possibilidades de se aumentar a produção sem aumentar a área de cultivo, é a produção de população monossexo de fêmeas. Para o tambaqui é interessante a produção de população monossexo de fêmeas visto que elas crescem mais rápido e são mais pesadas que os machos. Essa técnica consiste na manipulação do fenótipo sexual dos peixes ou de seus parentais. Em espécies em que as fêmeas são homogaméticas (XX), como o tambaqui, se as fêmeas forem masculinizadas de forma eficiente (originando os neomachos), elas apresentarão fisiologia masculina, levando à produção de sêmen ao atingir a puberdade. Assim, ao serem cruzadas com fêmeas normais, produzirão uma descendência exclusiva de fêmeas. Para obter neomachos é necessário administrar substâncias androgênicas ou disruptores endócrinos. Neste trabalho utilizamos o hormônio sintético 17 α -metiltestosterona (MT), adicionado à ração nas doses 0, 30, 60, 90 e 120 mg.kg⁻¹, durante dois tempos de tratamento: 90 e 120 dias para alimentar juvenis de tambaqui. Verificamos que o uso da MT por 90 dias apresentou baixa taxa de masculinização no tambaqui; o grupo controle apresentou 35,3% de machos e os tratamentos 30, 90 e 120 mg.Kg⁻¹ de MT apresentaram 58,8, 41,2, 68,7 e 58,8% de machos, respectivamente, e favoreceu a ocorrência de animais intersexuais nos grupos de 60 mg (5,9%) e 90 mg (6,25%). Já os peixes que receberam tratamento por 120 dias apresentaram uma proporção maior de machos: o grupo controle apresentou 41,6% e os tratamentos com 30, 60, 90 e 120 mg.Kg⁻¹ de MT 50, 52,4, 71,4% e 68,2 % respectivamente, sem a ocorrência de intersexos. As maiores doses de metiltestosterona administradas no maior tempo induziram as fêmeas a machos fenotípicos, sem apresentar efeitos na fisiologia hematológica e bioquímica do sangue dos peixes, e também não foram observados efeitos hepatotóxicos nem mutagênicos às células do sangue.

Palavras-chave: Aquicultura. Esteroides. Indução sexual. Masculinização. Metiltestosterona.

1. Introdução

O tambaqui é um peixe de piracema nativo das bacias do Solimões, Amazonas e Orinoco (Araújo-Lima & Goulding, 1998). Possui porte grande e carne saborosa, compõe o grupo de peixes redondos de grande importância para a piscicultura nacional. Por questões climáticas sua criação no país se concentra nas regiões Norte, Centro Oeste e Nordeste, onde também tem ampla valorização pelo mercado consumidor e a espécie apresenta condições altamente favoráveis ao seu cultivo como boa adaptabilidade a diferentes sistemas produtivos, crescimento rápido, boa tolerância a condições extremas, e também alto valor agregado aos produtos da pesca e características zootécnicas que impulsionou a popularidade do tambaqui entre os piscicultores (revisado em Hilsdorf et al., 2022). Entretanto, ainda existe a necessidade de tecnologias inovadoras para alavancar a produção de tambaqui e atender a todo esse mercado. Uma das tecnologias para incrementar a produção do tambaqui sem aumentar a área de cultivo é a produção de população monossexo, que consiste em manipular o fenótipo sexual dos peixes ou de seus pais. Em espécies em que as fêmeas são homogaméticas (XX), as fêmeas masculinizadas de forma eficiente, apresentam fisiologia masculina, levando à produção de sêmen ao atingir a puberdade, com produção de 100 % de fêmeas com o cruzamento com fêmeas normais (Piferrer, 2001; Luo et al., 2011). Na produção indireta de uma população unissexuada, apenas um parental recebe o tratamento hormonal e em estágios de vida muito iniciais e então pode ser usado durante toda a sua vida reprodutiva para a produção de lotes sucessivos de descendentes femininos (Piferrer, 2001).

Para produzir neomachos, diferentes andrógenos naturais e sintéticos podem ser usados, como por exemplo o hormônio andrógeno sintético, 17 alfa-metiltestosterona, um derivado metilado, aromatizável, da testosterona (Piferrer & Donaldson, 1991), que já foi amplamente utilizada para induzir a maculinização de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*: Mainardes-Pinto et al., 2000; Yasui et al., 2007; Zanardi et al., 2011; Mateen & Ahmed 2015), de Tenhuayaca (*Petenia splendida*, Günther, 1862; Vidal-López et al., 2009) do guppy, (*Poecilia reticulata*; Díaz & López, 2019), do peixe espada (*Xiphophorus hellerii*, Poeciliidae; Mousavi-Sabet & Ghasemnezhad 2013), da garoupa-verdadeira (*Epinephelus marginatus*: Sanches et al., 2009), da perca amarela (*Perca flavescens*; Othman et al., 2022), e perca prateada (*Bidyanus bidyanus*; Sulaeman & Fotedar, 2017). O 17-alfa-metiltestosterona também já foi utilizado para

produzir neomachos de jundiá (*Rhamdia quelen*; Borges, 2015; Rocha, 2017; Chaveiro, 2017; Aparício, 2018), de truta arco íris (*Oncorhynchus mykiss*; Aristizabal & Londoño, 2009; Michalik et al., 2017), mandarim (*Siniperca chuatsi*; Liu et al., 2021; Huang et al., 2023), Yellow drum (*Nibea albiflora*; Xu et al., 2018), barbo de Java (*Barbonymus gonionotus*; Rahman et al., 2018).

Para o tambaqui é viável a produção de população monossexo visto que as fêmeas crescem mais rápido e são mais pesadas que os machos (Villacorta-Correa & Saint-Paul, 1999; Almeida et al., 2016; Ariede et al., 2023), portanto economicamente são mais interessantes para a produção em larga escala. É possível desenvolver lotes de fêmeas monossexos de tambaqui usando a técnica de indução indireta com uso de esteroides, pois a determinação do sexo do tambaqui é do tipo genética-cromossômica em que as fêmeas são homogaméticas (Varela et al., 2021). E considerando que o uso de andrógenos pode afetar a fisiologia do peixe e exercer efeitos tóxicos, é importante avaliar alguns indicadores biológicos como a análise hematológica do sangue periférico que é um método barato e uma ferramenta muito útil para avaliar o estado fisiológico e condição nutricional dos peixes (Witeska et al., 2022; Ranzani-Paiva et al., 2013). Para isso, neste trabalho utilizamos quatro doses de 17alfa-metiltestostrona (MT) com o objetivo de avaliar seus efeitos na masculinização, fisiologia, mutagenicidade de eritrócitos de sangue periférico e na hepatotoxicidade dos juvenis de tambaqui.

2. Material e Métodos

2.1. Declaração de ética

Todos os procedimentos deste trabalho estão de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) – Embrapa Amazônia Ocidental (nº 02/2021, SEI 21158.000868/2021-29). O projeto possui Autorização de Acesso ao Patrimônio Genético sob o registro A5784B5.

2.2. Aquisição dos peixes, local e caracterização da área de estudo

Juvenis com 30 dias de idade foram adquiridos no Centro de Tecnologia, Treinamento e Produção em Aquicultura de Balbina – CTPA – Presidente Figueiredo, Brasil (1° 55'10.01" S; 59° 27'54.67" W) e transferidos para as instalações da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, Brasil (2° 53'27,0" S; 59°58'11,9" W). Após 10 dias de

quarentena, os juvenis foram distribuídos aleatoriamente em 18 tanques de polietileno de 270 L (n = 50), com sistema semiaberto de recirculação e com aquecimento. Cada dose do hormônio e o controle foram testados em triplicatas. Ao início do experimento, os peixes tinham comprimento total $2,9 \pm 0,3$ cm e peso $0,9 \pm 0$ g. Os tempos de tratamento foram de 90 e 120 dias para avaliar o melhor tempo de tratamento hormonal. Diariamente pela manhã e pela tarde foram mensurados o oxigênio dissolvido (mg/L) e temperatura (°C) verificados com oxímetro digital (YSI-ECO 200A) e o pH com medidor de pH digital (pH-1700, InstruTherm). Outras variáveis de qualidade da água foram avaliadas quinzenalmente em laboratório. A alcalinidade foi determinada por titulação com H₂SO₄; a dureza por titulação com EDTA (APHA, 2005); determinação de nitrito por espectrometria da reação da sulfanilamida em meio ácido, e de amônia, pelo método do endofenol (APHA, 2005).

2.3. Tratamentos e alimentação

Foram testadas quatro doses do hormônio 17 alfa-metiltestosterona (MT) comercial nacional (São Paulo, Brasil), nas concentrações de 30, 60, 90 e 120 mg.Kg⁻¹ de ração para peixe granulada (2 - 4 mm) com 45% de proteína bruta, e mais um grupo controle, o qual recebeu apenas ração pulverizada com EtOH 90%, (as concentrações foram definidas de acordo com resultados observados na literatura). Em cada tratamento, a MT foi diluída em álcool EtOH 90% e aplicada à ração com pulverizador manual. Depois de adicionado o hormônio, a ração foi seca em temperatura ambiente e armazenada até o uso. Durante o experimento os peixes foram alimentados três vezes ao dia, sendo que a oferta de alimento diária foi ajustada a cada biometria, correspondendo inicialmente a 10 % do peso vivo e no último mês de experimento a 5 % da biomassa.

2.4. Amostragens

Foram realizadas três amostragens durante o experimento, aos 45, 90 e 120 dias de tratamento, e uma amostragem final quatro meses após terminar o tratamento, aos nove meses de idade dos animais. Nas três coletas feitas durante o tratamento, foram coletados seis peixes por tanque (utilizamos o número mínimo de animais para atender ao cálculo estatístico e também atender ao comitê de ética (CEUA), totalizando um número de 18 peixes por tratamento. Durante as amostragens, os peixes foram sedados com benzocaína (4-Aminobenzoato de etilo), diluída a 250 mg.L⁻¹ de água (Gomes et

al., 2001; Conceia, 2018). O sangue foi coletado da veia caudal com o auxílio de uma seringa enxaguada com EDTA (10%), após a coleta do sangue os peixes foram mortos por perfuração intracraniana e sucedeu a retirada de uma amostra de fígado e de gônada para histologia. Para avaliar o efeito agudo da metiltestosterona na fisiologia dos peixes foram realizadas biometrias, análises dos parâmetros sanguíneos, testes bioquímicos no plasma sanguíneo, avaliação da mutagenicidade em células sangue periférico e histológica do estroma hepático (efeitos hepatotóxicos).

Na amostragem de quatro meses após término do experimento, os peixes estavam com 9 meses de idade. Na coleta, também foram realizadas biometria, coleta de sangue, do fígado, e de gônadas para avaliação do efeito do MT na proporção sexual dos grupos. O fígado foi coletado e pesado para estimativa do índice hepatossomático (IHS; peso do fígado / peso corporal x 100) e um pequeno fragmento foi rapidamente fixado em formol 10% tamponado em PBS a pH 6,9, após 24 horas o fragmento foi lavado em água corrente e preservado em álcool 70%. Para o processo de inclusão em parafina, o tecido passou por desidratação crescente em álcool, clarificação em xilol, e incluído em parafina. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina e montados em lâminas e lamínula com entellan, conforme procedimentos de rotina. As gônadas também foram amostradas, pesadas (g), fixadas em solução de glutaraldeído 5% e posteriormente processadas para análise histológica. O peso total das gônadas foi utilizado para estimar o índice gonadosomático (IGS; peso das gônadas/peso corporal x 100). A análise histológica das gônadas permitiu a identificação do sexo de cada indivíduo, o que serviu para estimar a proporção de fêmeas e machos nos grupos.

2.5. Variáveis hematológicas

O hematócrito e a taxa de hemoglobina foram analisados conforme descrito por Goldenfarb et al., (1971) e Drabkin (1948), respectivamente. Os eritrócitos foram contados em câmara de Neubauer sob microscópio óptico com objetiva de 40x, após diluição do sangue em citrato formaldeído (Collier, 1944). Em seguida pode ser estimado o volume corpuscular médio [$VCM = (\text{Hematócrito} \times 10) / \text{eritrócitos}$], hemoglobina corpuscular média [$HCM = (\text{Hemoglobina} \times 10) / \text{eritrócitos}$] e concentração média de hemoglobina corpuscular [$CHCM = (\text{taxa de Hemoglobina} \times \text{Hematócrito}) \times 100$], segundo Wintrobe (1934).

2.6. Histologia

Para a histologia do fígado, um fragmentado do tecido foi fixado em formol 10 % tamponado em PBS (pH 6,9), por 24 horas, após a fixação em álcool 70% foi desidratado em série crescente de etanol, clarificado em xilol e incluído e emblocado em parafina. Posteriormente os blocos foram cortados em micrótomo (Yedi YP - 315) em secções de 5 µm de espessura e corados com Hematoxilina e Eosina, montadas em lâminas com Entellan® e analisadas em microscópio Axio Lab A1 (Zeiss®, Alemanha). O parênquima hepático foi avaliado, considerando a forma e organização dos hepatócitos, a presença de um ou mais núcleos e sua forma e a disposição dos sinusóides, conforme descrito para tambaqui por Costa et al. (2012).

Para identificação do sexo de cada peixe, uma parte do tecido gonadal foi fixado em solução de glutaraldeído 5% tamponado, por 24 horas, lavado duas vezes em tampão fosfatado e deixado em repouso neste, por 12 horas, e preservado em álcool 70% até a inclusão em resina. Para a inclusão, as amostras foram desidratadas em série crescente de etanol, infiltradas e incluídas em glicol metacrilato (Leica®; Heidelberg, Alemanha). Posteriormente os blocos foram cortados em micrótomo (Yedi YP - 315) em secções de 4 µm de espessura e corados com azul de toluidina (1%) bórax (1%), montadas em lâminas com Entellan® e analisadas em microscópio Axio Lab A1 (Zeiss®, Alemanha).

O epitélio germinativo foi avaliado histologicamente para identificar o fenótipo sexual de cada amostra. Nas fêmeas, o ovário foi caracterizado pela presença de células germinativas grandes e agrupadas (oogônias) e pela presença de células germinativas menores, mas ainda agrupadas (oócitos pré-vitelogênicos). Nos machos, os testículos foram caracterizados pela presença de células germinativas isoladas circundadas pelas células de Sertoli e pela presença de cistos espermatogênicos em desenvolvimento.

2.7. Parâmetros bioquímicos do fígado e atividade enzimática

Logo após a coleta, as amostras de sangue foram centrifugadas a 2.500 rpm por cinco minutos e o plasma foi separado e congelado em ultra freezer (-80°C) até a análise. As variáveis bioquímicas analisadas foram: glicose, determinada por teste enzimático colorimétrico (InVitro, Belo Horizonte, MG, Brasil), proteína total, medida pelo método do biureto (InVitro - Belo Horizonte, MG, Brasil), e albumina, determinada pelo método verde de bromocresol (determinação colorimétrica; InVitro,

Belo Horizonte, Brasil). Os valores de albumina e proteína plasmática permitiram o cálculo da globulina sérica, que foi determinada subtraindo-se a concentração de albumina da concentração de proteína total. Para avaliar a função hepática através da atividade enzimática dosamos as enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) pelo método cinético, com a utilização de kits comerciais (InVitro, Belo Horizonte, Brasil).

2.8. Análise de micronúcleo

A avaliação de possível genotoxicidade do metiltestosterona em tambaqui foi feita através do teste do micronúcleo (MN). Foram preparados esfregaços sanguíneos de 6 peixes de cada tanque ($n = 18/\text{tratamento}$) em cada amostragem 45, 90, 120 dias de tratamento e final (9 meses de idade). Após secagem das lâminas por 12 horas em temperatura ambiente e fixação em metanol (100%) por 15 minutos, as lâminas foram coradas com Giemsa (10% em tampão fosfato a pH 6,8) por 10 minutos, lavadas e secas ao ar livre (Heddle, 1973). O número de micronúcleos foi registrado em 2.000 células/lâminas (Grisolia, 2002). A avaliação dos MNs seguiu os critérios propostos por Fenech et al. (2003).

2.9. Análise estatística

Para verificar diferenças na razão sexual entre cada tratamento e o grupo controle, foi utilizado o teste Qui-quadrado (χ^2). Todos os dados restantes foram verificados quanto à distribuição normal e homogeneidade de variância pelo Shapiro-Wilk e Bartlett's teste para teste de variâncias iguais, respectivamente. Em seguida, sua igualdade foi analisada por ANOVA, seguida do teste post hoc de Tukey, onde as médias de todos os tratamentos foram comparadas. Os dados são representados como média \pm DP. O programa GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, Inc.) foi usado para a análise estatística e para gerar os gráficos.

3. Resultados

3.1. Variáveis da água, sobrevivência e crescimento dos peixes

Os valores médios registrados para oxigênio ($7,0 \pm 1,7 \text{ mg.L}^{-1}$), temperatura ($27,9 \pm 1,0 \text{ }^\circ\text{C}$), pH ($6,8 \pm 1,6$), alcalinidade ($4,2 \pm 2,3 \text{ mg.L}^{-1} \text{ CaCO}_3$), dureza ($8,9 \pm 2,9 \text{ mg.L}^{-1} \text{ CaCO}_3$) amônia ($1,58 \pm 0,5 \text{ mg.L}^{-1}$) e nitrito ($0,02 \pm 0,01 \text{ mg.L}^{-1}$), são apresentados na Tabela 1. Nenhuma mortalidade foi registrada durante o experimento e também

nenhuma mortalidade durante o período de crescimento, quando os peixes foram criados em tanque escavado.

Tabela 1. Variáveis da água durante os 4 meses de tratamento de juvenis de tambaqui com diferentes doses de metiltestosterona e durante os 4 meses de viveiro.

Tratamento	Oxigênio	Temperatura	pH	Alcalinidade	Dureza	Amônia	Nitrito
Controle	6,7±3,4	28,8±0,8	7,2±3,0	4,5±2,6	8,8±3,7	3,2±1,8	0,02±0,01
30 mg	6,9±1,5	27,8±1,0	6,9±2,6	4,0±2,3	11,7±4,3	1,2±0,1	0,03±0,01
60 mg	7,4±3,7	27,8±1,9	6,8±2,1	4,6±2,5	6,5±2,0	1,0±0,3	0,1±0,02
90 mg	7,5±3,7	28,0±1,0	6,7±0,5	3,5±1,5	10,0±2,6	0,9±0,2	0,02±0,02
120 mg	6,8±1,3	28,2±1,1	6,6±0,4	4,2±2,6	7,7±2,2	1,6±0,1	0,02±0,00
Viveiro	6,3±0,5	26,8±0,6	7,2±1,0	6,9±1,8	10,0±3,2	0,2±0,2	0,02±0,01

Em relação a biometria, o peso apresentou diferença estatística, somente no grupo tratado com 120 mg.Kg⁻¹ aos 90 dias. E aos 120 dias de tratamento pode ser observado também uma tendência de peso mais baixo nos animais do grupo de 30 mg e um leve aumento sem significância no peso dos animais do grupo de 90 mg.Kg⁻¹ (Figura 1). Na amostragem aos 9 meses de idade, em ambos os tempos de tratamento 90 e 120 dias não ocorreu diferença estatística.

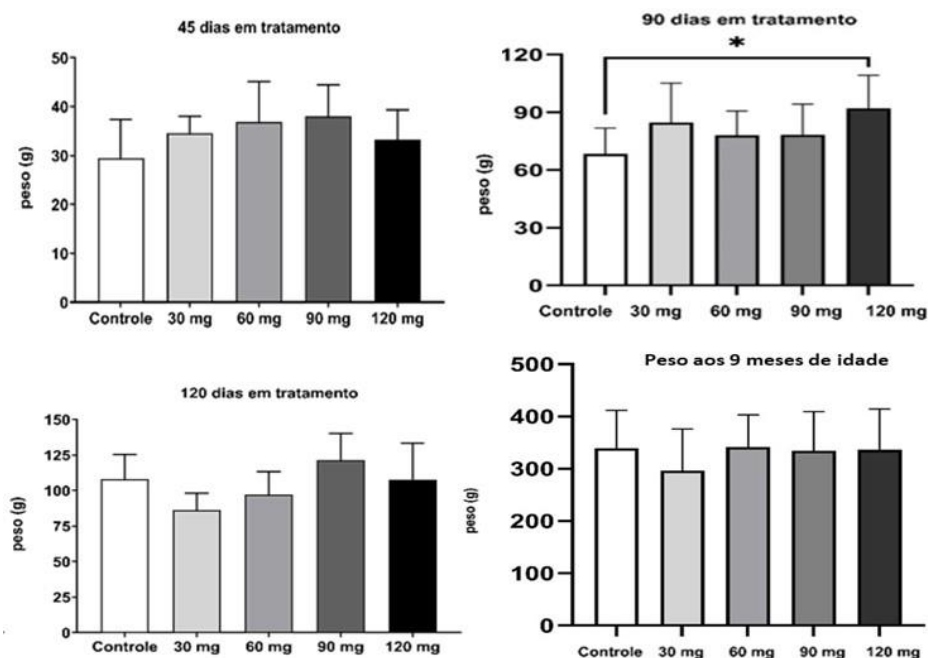


Figura 1. Peso médio (g) dos peixes por grupo de tratamento nas amostragens durante o tratamento hormonal e após os 4 meses de tratamento.

Em relação ao tamanho dos peixes, o comprimento padrão (cm; Figura 2), e o comprimento total (cm; Figura 3), não apresentaram diferença significativa em nenhuma das amostragens. Aos 45 e aos 90 dias, houve uma leve tendência de maior tamanho em todos os peixes tratados com MT. Aos 120 dias os peixes tratados com 30 e 60 mg apresentaram uma tendência de menor comprimento e os tratados com 90 mg de MT maiores (Figura 2). E na amostragem realizada aos 9 meses de idade, tanto os animais tratados por 90 dias com MT como os animais tratados por 120 dias não apresentaram diferença significativa.

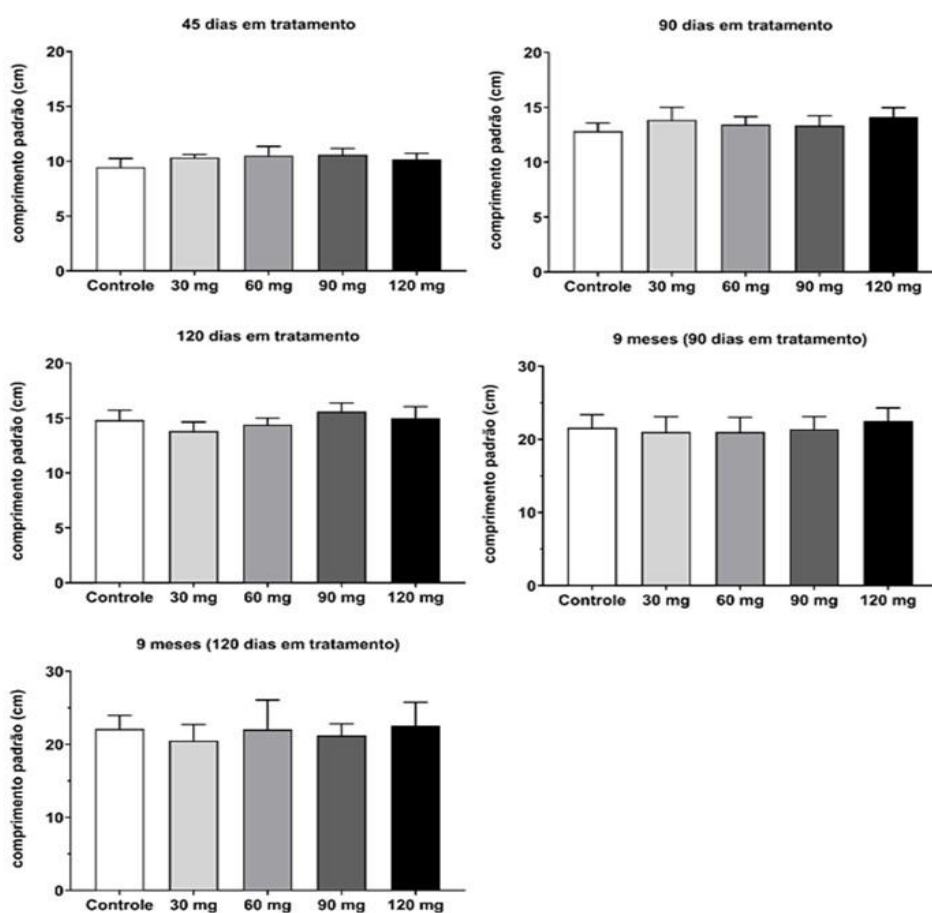


Figura 2. Comprimento padrão em cm dos peixes por grupo de tratamento nas amostragens durante o tratamento hormonal e 4 meses após os tratamentos, aos 9 meses de idade dos peixes.

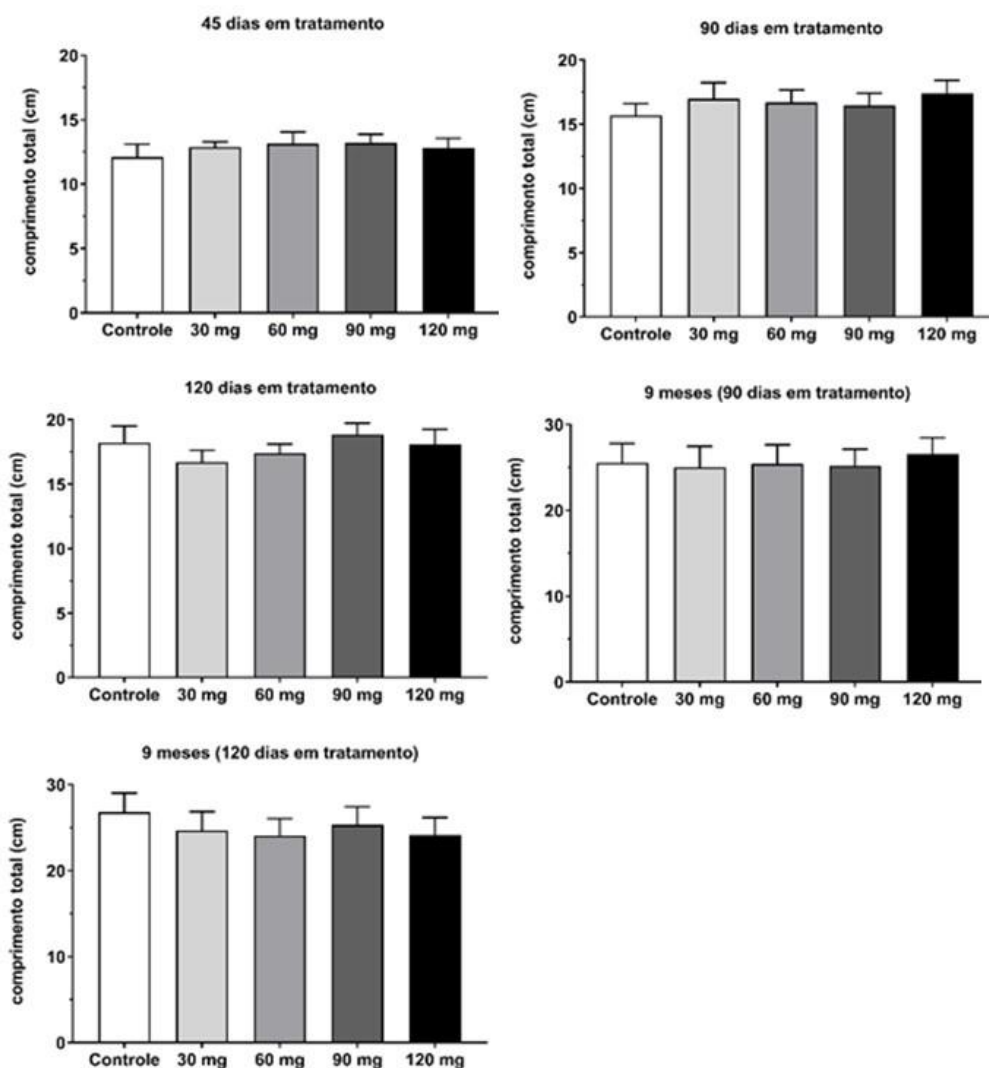


Figura 3. Comprimento total (cm) dos peixes por grupo de tratamento nas amostragens realizadas durante o tratamento hormonal e aos 9 meses de idade, após o tratamento.

3.2 Índice gonadossomático (IGS) e índice hepatossomático (IHS)

O IGS foi estimado nas amostragens realizadas aos 90 e aos 120 dias de tratamento e também na amostragem final aos 9 de meses de idade, não apresentando diferença estatística em nenhuma das amostragens. Vale ressaltar que todos os peixes coletados em todas as amostragens eram animais juvenis, muito imaturos e com o peso da gônada muito pequeno, (Figura 4).

O IHS foi mais elevado nos grupos tratados com MT aos 90 e 120 dias. Porém, aos 9 meses de idade a média do grupo controle e dos grupos tratados foram semelhantes (Figura 4).

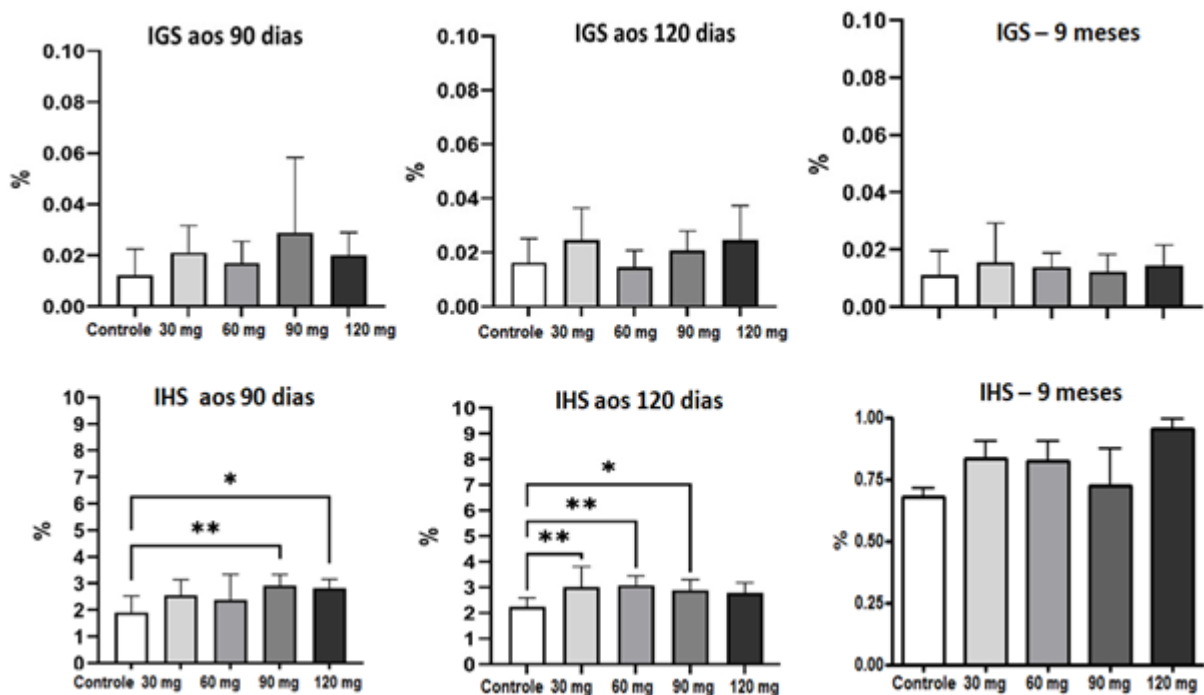


Figura 4. Apresentação do IGS e IHS nas principais amostragens realizadas.

3.3. Identificação sexual e razão sexual

A sexagem através da histologia das gônadas foi realizada na amostragem final, quando os peixes tinham 9 meses de idade (4 meses após terminar os tratamentos). Visualmente, nenhuma diferença foi observada entre ovários e testículos, pois as gônadas eram ainda muito imaturas e semelhantes em cor, peso e forma. Pelo mesmo motivo, e devido a homogeneidade dessas semelhanças, não houve diferença no IGS de todos os grupos como comentado acima.

Histologicamente, os ovários eram abundantes em tecido conjuntivo onde se observavam ninhos com oogônias. Alguns ovários também continham oócitos pré-vitelogênicos na lamela ovariana em formação (Figura 5a). Os testículos apresentaram espermatogônias associadas a células de Sertoli, uniformemente distribuídas no estroma. Em alguns testículos haviam cistos espermatogênicos, contendo espermatócitos e/ou espermatozoides no compartimento germinativo (Figura 5b).

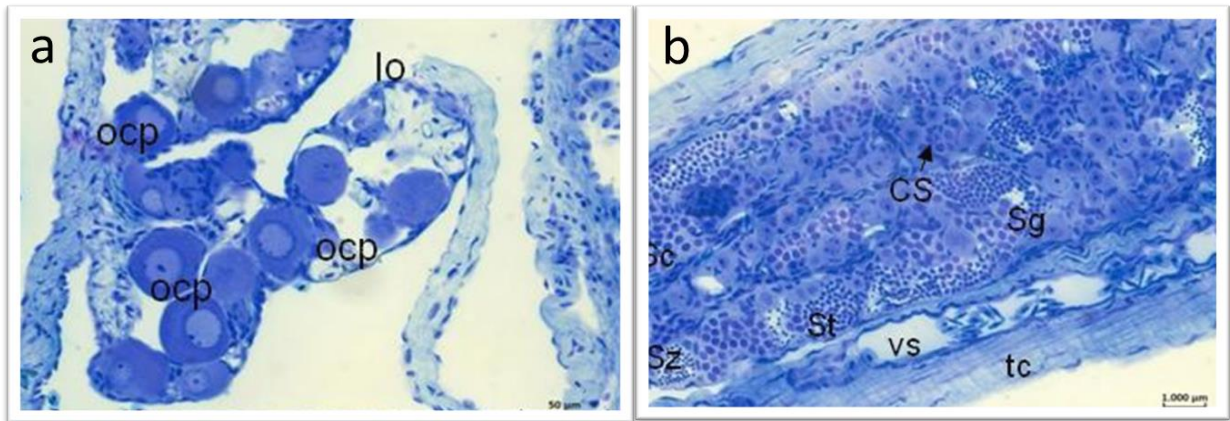


Figura 5. a – ovário apresentando lamela ovariana (lo), oócito e desenvolvimento primário (ocp), oogônias (og) e ninhos de oogônias (ni). b – testículo apresentando tecido conjuntivo (tc), célula somática (CS), cistos contendo espermatócitos (Sc) e espermatozoides (Sz), espermatogônias (Sg). c – gônada apresentando células de testículo (Sc) e célula de ovário (ocp).

Na coleta final, aos 9 meses, nos animais tratados por 90 dias com MT o grupo controle apresentou 35,3% de machos e os tratamentos com 30, 60, 90 e 120 mg.Kg⁻¹ de MT tiveram 58,8%, 41,2%, 68,7% e 58,8% de machos, respectivamente, demonstrado na Figura 6 a. Com 90 dias de tratamento, apenas o grupo de 90 mg apresentou resultado significativo (p=0,0314) e neste tratamento ocorreu a presença de gônadas que apresentavam células germinativas femininas e células masculinas, representado na Figura 6 b, conhecidas por gônadas intersexo, com a porcentagem de 5,9% em 60 mg.Kg⁻¹, e 6,25 % em 90 mg.Kg⁻¹.

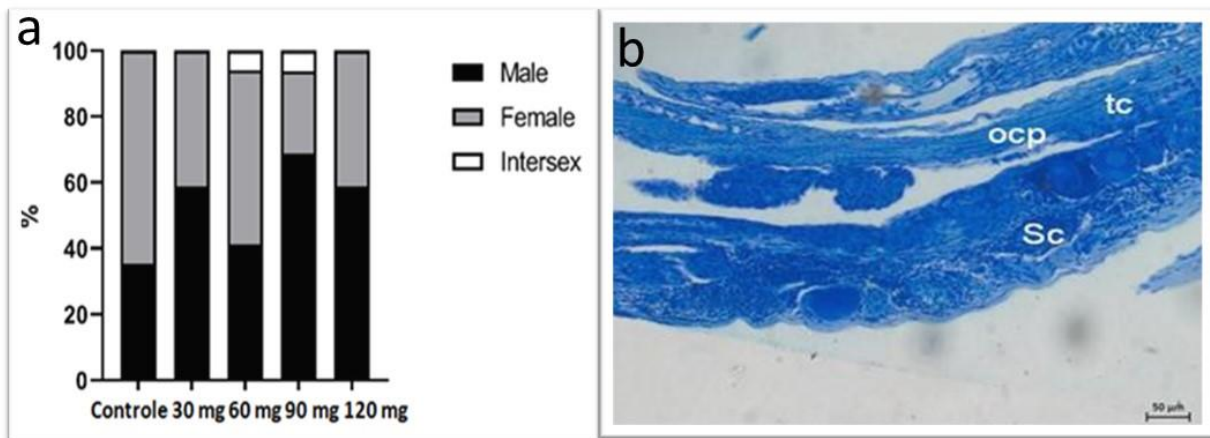


Figura 6. **a** – Sexagem em porcentagem nos grupos tratados por 90 dias com MT; **b** - gônada com bastante tecido conjuntivo (tc) e característica intersexual apresentando células de testículo, espermatócito (Sc) e célula de tecido ovariano, oócito (ocp).

E na coleta final dos animais tratados por 120 dias com MT realizada aos 9 meses, o grupo controle apresentou 41,6% de machos e os tratamentos com 30, 60, 90 e 120 mg.Kg⁻¹ de MT teve as proporções de 50%, 52,4%, 71,4% e 68,2 % de machos, respectivamente, dados podem ser observados na Figura 7. Os animais tratados por 120 dias com MT não apresentaram peixes intersexos. Dentre as dosagens utilizadas apenas o tratamento com 90 mg.Kg⁻¹ foi estatisticamente eficiente na masculinização do tambaqui (p:0,033; Figura 7).

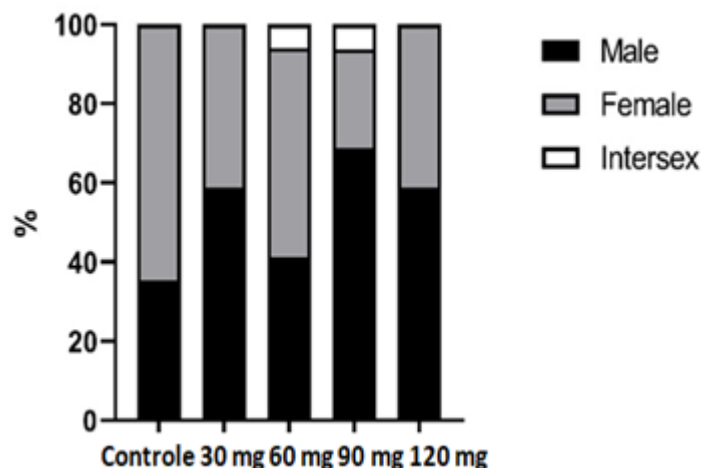


Figura 7. Apresentação da sexagem em porcentagem nos grupos tratados por 120 dias com MT.

3. 4. Histopatologia hepática

Todas as amostras de fígado coletadas nas amostragens durante os tratamentos, bem como na amostragem final aos 9 meses de idade, que ocorreu 4 meses após terminar os tratamentos, foram avaliadas histologicamente (n = 18/tratamento/amostragem). O estroma hepático dos grupos tratados não diferiu do grupo controle.

Em geral, o parênquima hepático apresentava hepatócitos contendo núcleos grandes, levemente arredondados e nem sempre centralizados, distribuídos em forma de

cordões desalinhados localizados entre os sinusóides (Figura 8). Os sinusóides convergiram para a veia centrolobular, semelhante à descrição de Sales et al. (2017). Em muitas amostras foi registrada a presença do pâncreas exócrino envolvendo a veia central, e também ductos biliares, identificados pela presença de tecido epitelial cúbico simples circundado por tecido muscular liso. Os ductos foram encontrados isolados e/ou próximos a vasos sanguíneos. Não observamos efeitos danosos à saúde do peixe como infiltrações nos sinusóides, lesões, vacuolização dos hepatócitos, inflamação ou alteração da forma dos capilares sinusóides em nenhuma amostra. Também não registramos a presença de lóbulos hepáticos ou a formação de uma tríade portal, como descrito por Costa et al., (2012), mas sim a combinação de uma veia e via biliar ou uma artéria e via biliar.

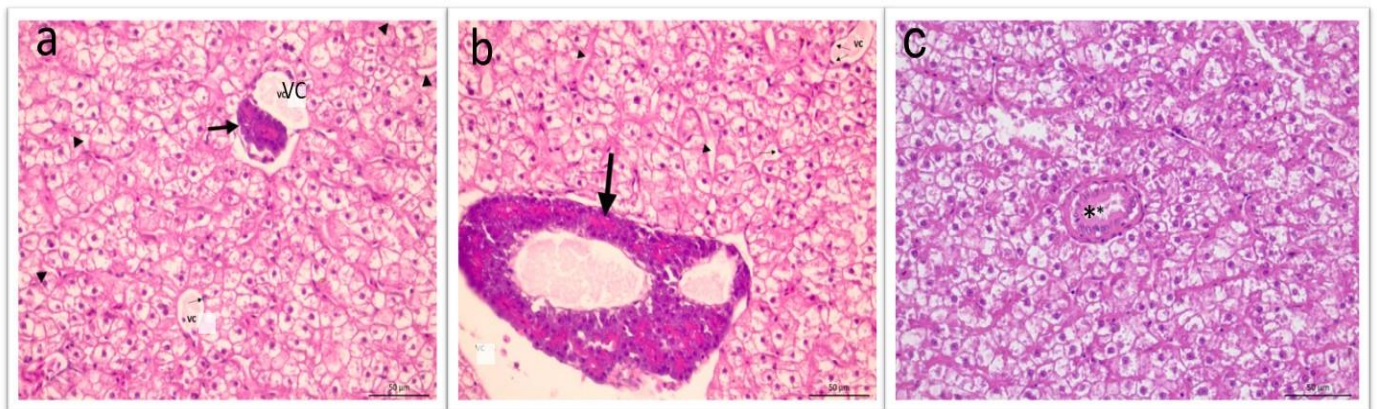


Figura 8. Parênquima hepático apresentando hepatopancreas (seta), veia central (vc), sinusóides (ponta de seta), ducto biliar (*).

3.4. Parâmetros hematológicos

A concentração de hemoglobina, o número de eritrócitos e porcentagem de hematócrito não apresentaram significância estatística em nenhuma das amostragens (Figura 9).

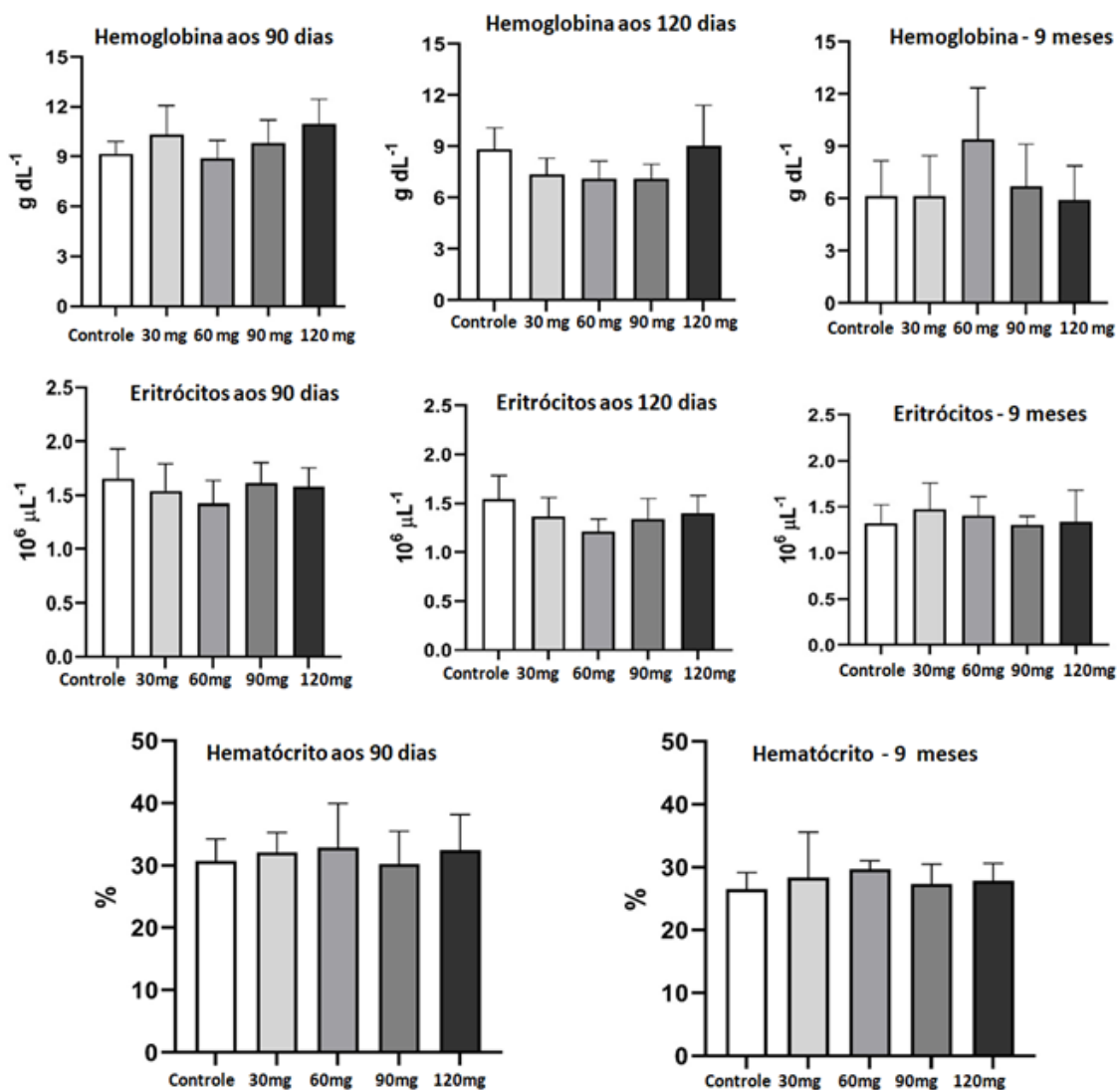


Figura 9. Representação da variação da hemoglobina, eritrócitos e hematócrito nas amostragens realizadas.

Também não foi observada significância estatística nos índices hematimétricos, em nenhuma das amostragens feitas durante os tratamentos hormonais, e nem nas amostragens aos 9 meses de idade, quatro meses após os tratamentos (Figura 10).

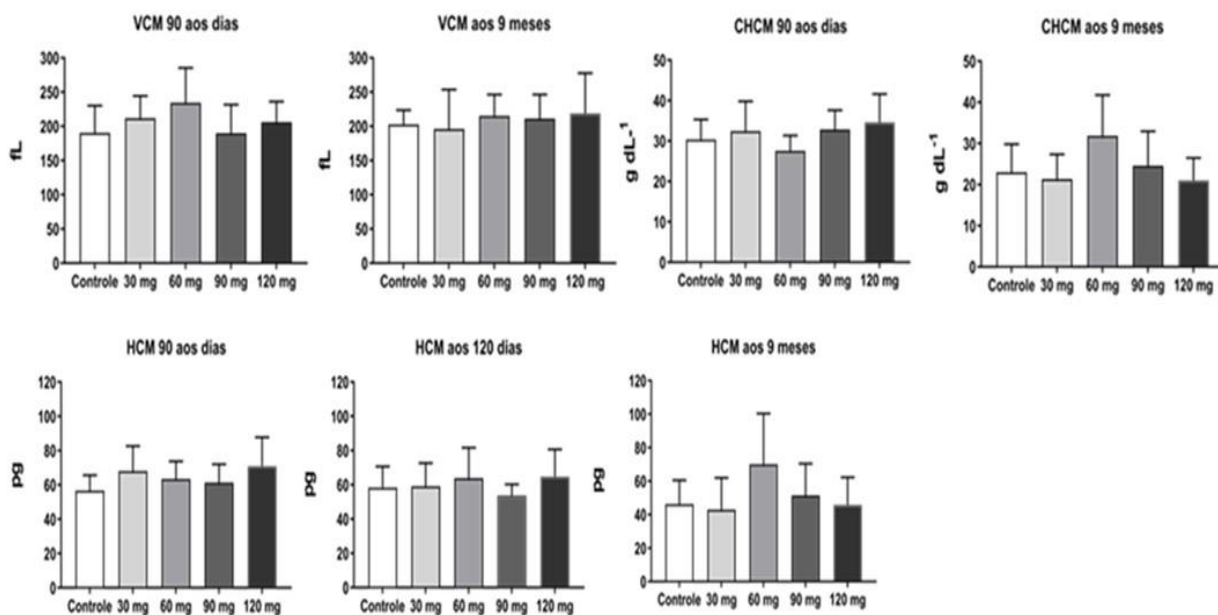


Figura 10. Índices hematimétricos.

3.5. Parâmetros bioquímicos e atividade enzimática

Não houve diferença estatística nos níveis de glicose, proteína total, albumina e nas enzimas ALT e AST em nenhuma das amostragens. Somente a globulina apresentou significância na amostragem aos 45 dias de tratamento, (Figura 11).

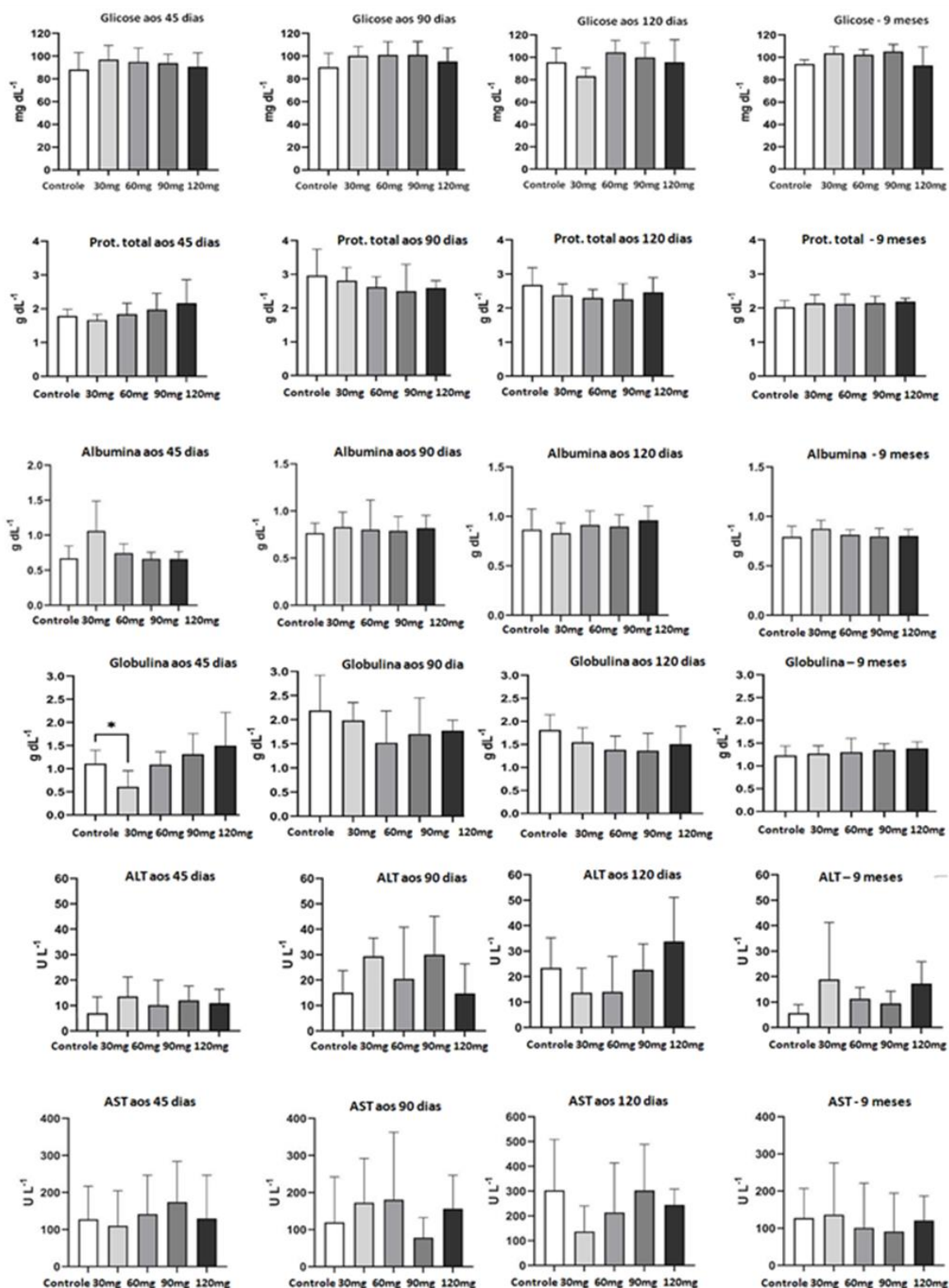


Figura 11. Gráficos apresentando os níveis das variáveis bioquímicas e enzimáticas em todas as amostragens.

3.6 Análise de micronúcleo

A administração de MT nas concentrações administradas não teve efeito genotóxico ou mutagênico nos peixes tratados. Não observamos presença de micronúcleo nas células sanguíneas, indicando que não houve dano cromossômico nestas células (Fenech, 2000) (Figura 12).

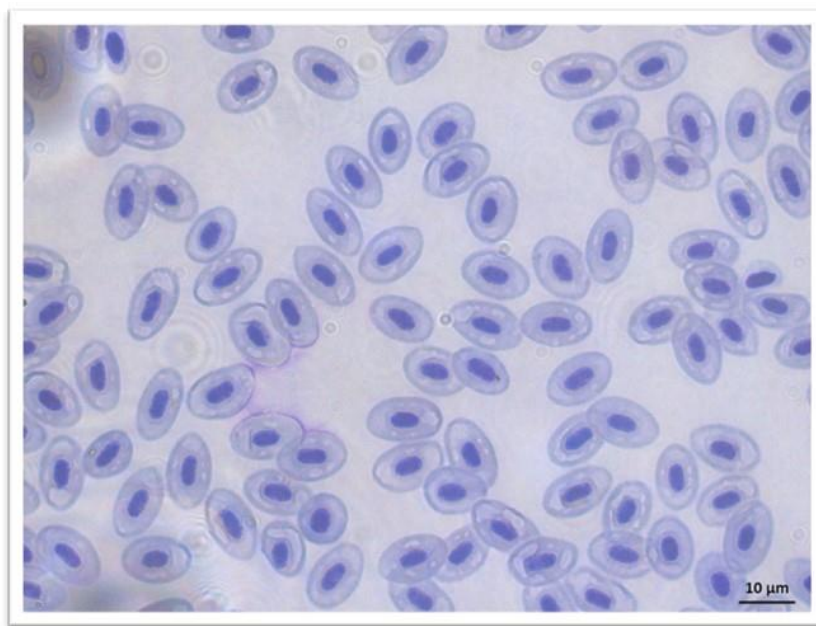


Figura 12. Lâmina de esfregaço de células sanguíneas.

4. Discussão

O tambaqui *Colossoma macropomum* é a espécie nativa mais importante da piscicultura brasileira, principalmente na Amazônia, sendo produzido em viveiros escavados, tanques-rede e gaiolas flutuantes (Brabo et al., 2017; Castro et al., 2020; Hilsdorf et al., 2022). A produção comercial da espécie exige gastos financeiros razoáveis que podem ser minimizados caso sejam utilizadas tecnologias modernas, como a produção de populações monosexuadas nas pisciculturas, como uma alternativa para melhorar a produtividade do setor, promovendo conseqüentemente a sua sustentabilidade (Castro et al., 2020; Lima et al., 2021). Por esse motivo, nosso objetivo foi desenvolver um método para a produção de neomachos de tambaqui para futuramente promover a produção somente de fêmeas. Para isso testamos o hormônio 17alfa-metiltestosterona (MT) para a masculinizar juvenis de tambaqui, para isso, foram utilizadas quatro diferentes doses (0 (controle), 30, 60, 90 e 120 mg.Kg⁻¹ de MT) ofertadas por 90 ou 120 dias. Durante o experimento, a qualidade da água foi

considerada adequada para o cultivo do tambaqui, pois as variáveis se mantiveram dentro dos limites toleráveis para cultivo da espécie.

Era esperada alguma diferença no tamanho ou peso dos peixes, visto que os hormônios androgênicos-anabólicos podem exercer algum efeito biológico na fisiologia animal, que incluem a promoção do crescimento muscular (Vingren et al, 2010), devido ao aumento da taxa de síntese protéica (efeito anabólico), estimulada no músculo pela testosterona e que também inibe a degradação de proteínas (efeito anti-catabólico) (Vingren et al., 2010), promove o aumento do apetite (Woo et al, 1993) e pode melhorar a eficiência da conversão alimentar, como observado em carpa comum (*Cyprinus carpio* L) tratadas com MT (Lone & Matty, 1980; Matty & Cheema, 1978). Os esteroides podem também aumentar ou diminuir o apetite em peixes (Rotta, 2003). Neste caso, foi observado um bom apetite nos peixes durante o período experimental, porém é possível que para o tambaqui, não tenha ocorrido essa eficiência ou as dosagens utilizadas no experimento tenham sido insuficientes para ativar esse mecanismo fisiológico. Um melhor ganho de peso e tamanho foi observado em algumas espécies quando tratadas com 17-a-metiltestosterona (MT), como a enguia (*Anguilla anguilla* L: Degani, 1986), salmão (*Oncorhynchus kisutch*) (Piferrer & Donaldson, 1991), e bagre americano (*C. punctatus*: Kapur, 2016). Juvenis de tambaqui que receberam hormônio do crescimento tiveram um efeito positivo sobre os índices de desempenho em ganho de massa, crescimento em comprimento, conversão alimentar e taxa de crescimento específico (Paz & Val, 2018).

Em nosso estudo não ocorreu significância na concentração de hemoglobina, nem no número de eritrócitos e nem na porcentagem de hematócrito. Da mesma forma, não houve diferença estatística nos índices hematimétricos (CHCM, CHM e MCV), isso indica que o hormônio na dosagem ofertada não afetou a condição de saúde ocasionando estresse fisiológico e nem a condição nutricional dos peixes, visto que a ocorrência de aumento ou diminuição de hemoglobina, hematócitos eritrócitos, e índices hematimétricos (CHCM, CHM e MCV), pode ser explicado como uma resposta ao estresse agudo (Lima, 2018), que exige maior gasto de energia (“lutar ou fugir”) (Witeska et al., 2022). Similarmente aos parâmetros sanguíneos, os parâmetros bioquímicos do plasma sanguíneo e as enzimas hepáticas também indicam a condição de saúde e de estresse dos peixes e também não houve significância nas concentrações das variáveis bioquímicas de glicose plasmática, proteína total, albumina e nas enzimas

ALT e AST. Ocorreu diferença significativa apenas na concentração de globulina aos 45 dias de tratamento.

O nível de glicose, proteína plasmática total e de suas frações, albumina e globulina, podem sofrer aumento ou diminuição por condições de estresse (Barton e Iwana, 1991), e também pode ocorrer uma variação de seus níveis devido à exposição a esteroides oferecidos na dieta (Witeska et al., 2022). Quanto à glicose, é um importante substrato energético para vários tecidos (Martínez-Porcás et al., 2009), os níveis plasmáticos dos metabólitos, glicose e proteína, aumentaram em dourada (*Sparus auratus*) e em dourada vermelha (*Chrysophrys major*) após o tratamento com testosterona, indicando que nestas espécies deve haver um papel osmorregulatório e metabólico da testosterona relacionado (Woo et al., 1993; Sangiao-Alvarellos et al., 2006). Em truta arco-íris (*Salmo gairdneri* Richardson) a metiltestosterona não alterou a concentração da glicose e nem das enzimas transferases plasmáticas (Leatherland, 1985). Diferente do estudo com tilápias (*O. niloticus*) o MT ocasionou variação nos níveis de glicose (Sayed & Moneeb, 2015). A proteína total, é alterada principalmente por mudanças no volume plasmático, aumentando em caso de desequilíbrio osmótico, causado por condições de estresse (McDonald & Milligan, 1992), como ocorreu em robalo (*Dicentrarchus labrax*), provavelmente devido à dieta (Coz-Rakovac et al., 2005), e em tilápia (*Oreochromis niloticus*) sob estresse hipóxico (Melo et al., 2009). A albumina é responsável pelo transporte de nutrientes e manutenção do equilíbrio osmótico e reflete a capacidade funcional do fígado, que quando baixo pode sinalizar doença hepática (Thomas, 2000; Perin, 2021). Seu aumento também pode estar relacionado ao sexo, como ocorreu em tilápia (*O. niloticus*), que apresentou aumento dos níveis de albumina no grupo de machos estressados (Melo et al., 2009). A fração globulina está envolvida nos mecanismos de defesa dos animais e o estresse pode causar uma diminuição na produção de anticorpos (IgM) e no número de células produtoras de anticorpos (Carlson et al., 1993; Thomas, 2000). Foi observado em tilápia do Nilo (*O. niloticus*) exposta a água de efluente industrial, um aumento de proteínas totais e globulinas, indicando uma resposta orgânica à agressão xenobiótica (Zunino, 2006). E o estresse também elevou os níveis de globulina em tilápia (*O. niloticus*) sob efeito de hipóxia (Melo et al., 2009) e sob altas variações de densidade e temperatura (Rodrigues et al., 2018). Aumento nos níveis de proteína total, albumina e globulina, também é

sugestivo do efeito da ação do esteroide nas vias metabólicas, como observado por Melo (2009) em tilápia (*O. niloticus*).

As enzimas transferases (ALT e AST) são importantes para avaliar o estado de saúde dos peixes expostos a toxinas (Coz-Rakovac et al., 2005; Lu et al., 2013; Zhang et al., 2016). Um aumento nos níveis dessas enzimas indica um distúrbio hepatocelular, por isso são usadas como marcadores da função hepática (Telli et al., 2016; Hahsavani et al., 2010; Peng et al., 2016). Em nosso trabalho, houve uma baixa e não significativa elevação da ALT em alguns grupos tratados, e não foi observado nenhum tipo de lesão histopatológica no fígado. A avaliação do nível desta enzima associada à histologia hepática foi utilizada em pacu (*Piaractus mesopotamicus*) com lesão hepática histologicamente confirmada (Ziemniczak, 2021) e em tilápia do Nilo (*O. niloticus*) para toxicidade de aflatoxina (Mahfouz & Sherif, 2015).

A morfologia dos glóbulos vermelhos é um bom marcador de genotoxicidade, por isso o teste in vivo de micronúcleos (MN) foi realizado em eritrócitos de sangue periférico para avaliar os potenciais efeitos genotóxicos da exposição crônica dos animais à MT contida na ração (Summak, et al., 2010; Witeska et al., 2022). Os resultados demonstram que não houve efeito mutagênico nos eritrócitos de sangue periférico dos peixes estudados. O MT também não causou genotoxicidade em tilápia do Nilo (*O. niloticus*) e lambari (*Astyanax bimaculatus*) expostos ao metiltestosterona (Wendt, 2013). Esse tipo de efeito foi observado em espécies de peixes utilizados como bioindicadores ao serem expostos em ambientes aquáticos contaminados com vestígios de metais pesados, por exemplo, a tilápia do Nilo (*O. niloticus*) (Duarte et al. 2012), jundiá (*Rhamdia quelen*) pintado (*Pimelodes sp*) (Porto et al., 2009), e pregado (*Scophthalmus maximus*) expostos ao bisfenol A e éter tetrabromodifenílico (Bolognesi et al., 2006), e também em de tainha (*Mugil sp*; Çavas e Ergene-Gozukara, 2005) bagre (*Netuma sp*) (Silva et al., 2003), e tilápia do nilo (*O. niloticus*; Summak et al., 2010) expostos a água poluída com esgoto doméstico.

Ao avaliar células hepáticas de tambaqui não encontramos sinais de patogenicidade no fígado. O parênquima hepático apresentava cordões lineares limitados por sinusóides que conduzem às veias centrais e com ausência de lóbulos hepáticos, com veias centrais bem distribuídas. O espaço portal, na maioria dos casos, era formado apenas por uma veia hepática e um ducto biliar, e em outros locais observou-se uma artéria e um ducto e não se observou a formação de portais da tríade,

diferindo das observações de Costa et al. (2012). O fígado desempenha inúmeras funções, além de metabolizar e excretar hormônios esteroides, sendo também responsável pela regulação do transporte e biodisponibilidade desses hormônios para os tecidos (Toth, 1992; Schinoni, 2006). No caso dos hormônios esteroides, organicamente, eles são secretados pelo córtex adrenal e pelas gônadas e chegam aos hepatócitos através do sangue, sendo parcialmente degradados e no fígado algumas formas são desintoxicadas, mas este órgão também é um provável alvo destes compostos (Pelissero & Sumpter, 1992). Substâncias químicas estranhas como drogas ou mesmo uma dieta desbalanceada ou contendo novos compostos podem causar alterações morfológicas no fígado, como lesões, vacuolização de hepatócitos, inflamação e alteração na forma dos capilares sinusóides, indicando a necessidade de adaptação e implicando em características sanitárias e produtivas de peixes cultivados (Teh et al., 1997; Raskovic et al., 2011; Gayão, 2013; Honorato et al., 2014). Gayão (2013) observou o fígado de dois grupos de tilápia do Nilo, um masculinizado com hormônios e outro alimentado com ração contendo alto teor de proteína, durante a fase de engorda, e constatou que houve alterações mais acentuadas no tecido hepático dos peixes tratados com alto nível de proteína e sem alterações no grupo tratado com hormônio. Esses resultados corroboram com o nosso estudo, uma vez que não observamos alterações morfológicas no fígado de tambaquis tratados com MT. A avaliação histológica das gônadas foi realizada quando os peixes tinham 9 meses de idade. Identificamos o animal como fêmea quando observamos a presença de grupos de oogônias e/ou oócitos primários em desenvolvimento. E os classificamos como machos, quando observamos células de Sertoli na periferia dos cistos de células germinativas, e/ou espermatogônias isoladas ou em cistos, assim como espermatócitos tanto isolados quanto em cistos, sendo que em alguns testículos conseguimos visualizar espermátides envolvidos em cistos. no grupo de peixes tratados por 90 dias com MT, o controle apresentou 35,3% de machos e os tratamentos 30, 90 e 120 mg.Kg⁻¹ de MT apresentaram 58,8%, 41,2%, 68,7% e 58,8% de machos, respectivamente. Dentre as dosagens utilizadas, apenas o tratamento com 90 mg.Kg⁻¹ foi estatisticamente significativo para masculinização do tambaqui. Além da porcentagem de machos ser baixa também ocorreu a presença de gônadas que apresentavam células femininas e células masculinas, características de gônadas intersexo na porcentagem de 5,9 % (30 mg.Kg⁻¹), 25 % (60 mg.Kg⁻¹), 6,25 % (90 mg.Kg⁻¹) e 5,9% (120 mg.Kg⁻¹). Intersexo são

animais que apresentaram gônadas repletas de espermatogônias, espermatoócitos e muitas vezes lúmen com bastante espermatozóides, e também ocorreu a presença de oócitos íntegros ou oócitos em degeneração. Ou seja, ocorre simultaneamente tecido gonadal masculino e feminino em espécie gonocórica. A ocorrência de intersexualidade em espécies gonocóricas é muitas vezes resultado da exposição a compostos desreguladores endócrinos, muito embora já tenha sido relatada em animais provenientes da natureza (Williams et al., 2002; Bahamonde et al., 2013). No grupo de peixes tratados por 120 dias com MT, o grupo controle apresentou 41,6% de machos e os tratamentos com 30, 90 e 120 mg.Kg⁻¹ de MT tiveram as proporções de 50%, 52,4%, 71,4% e 68,2 % de machos, respectivamente. Nesses animais tratados com MT por 120 dias, não apresentaram peixes intersexos, e dentre as dosagens utilizadas apenas o tratamento com 90 mg.Kg⁻¹ foi estatisticamente eficiente na masculinização do tambaqui. Segundo Piferrer (2001), existe três fatores críticos para o sucesso no controle do sexo de peixes jovens: a dosagem hormonal, o tratamento hormonal e o estágio de desenvolvimento das gônadas. Nesse caso, consideramos a dosagem hormonal e o estágio de desenvolvimento das gônadas adequado, e inferimos que o tempo de tratamento hormonal de 90 dias como sendo insuficiente para a indução completa do fenótipo masculino, e que 120 dias de tratamento com 90 mg.Kg⁻¹ foi mais eficaz. Entretanto, a maior dosagem, 120 mg.kg⁻¹, no maior tempo de tratamento (120 dias) apresentou uma proporção menor de machos do que a dosagem inferior, de 90 mg.kg⁻¹. Essa diferença pode ser atribuída ao tipo de andrógeno testado. A MT tem a capacidade de ser parcialmente aromatizada a estrogênio, ao mesmo tempo em que altas concentrações podem inibir a biossíntese de andrógeno endógeno (Piferrer & Donaldson, 1991). Por outro lado, o uso de metiltestosterona foi eficaz em masculinizar tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*: Mainardes-Pinto et al., 2000; Yasui et al., 2007; Zanardi et al., 2011; Mateen & Ahmed 2015), de Tenhuayaca (*Petenias splendida*: Vidal-López et al., 2009) do guppy, (*Poecilia reticulata*: Díaz & López, 2019), do espada (*Xiphophorus hellerii* (Poeciliidae): Mousavi-Sabet & Ghasemnezhad, 2013), da garoupa-verdadeira (*Epinephelus marginatus*: Sanches et al., 2009), da perca amarela (*Perca flavescens*: Othman et al., 2022) e da perca prateada (*Bidyanus bidyanus* Mitchell 1838: Sulaeman & Fotedar, 2017). E a 17-alfa-metiltestosterona também foi eficaz para produzir neomachos de jundiá (*Rhamdia quelen*: Borges, 2015; Rocha, 2017; Chaveiro, 2017; Aparício, 2018), de truta arco íris (*Oncorhynchus mykiss*:

Aristizabal & Londoño, 2009; Michalik et al., 2017), do mandarim (*Siniperca chuatsi*: Liu et al., 2021), da corvina (*Nibea albiflora*: Xu et al. 2018), e do farpa prateada (*Barbonymus gonionotus*: Rahman et al., 2018).

Os índices IHS e IGS também foram observados aos 90 e 120 dias de tratamento e aos nove meses, quatro meses após o término dos tratamentos (n = 18/tratamento). O IGS auxilia na identificação das fases do ciclo reprodutivo dos peixes, devido a maturação das células reprodutivas ocorrerem simultaneamente com o aumento do peso das gônadas (Barcellos et al, 2001; Pereira et al, 2004). Em todas as coletas a média do IGS de todos os grupos sempre foi baixa e similar. Isso porque os peixes ainda estavam em fase pré-púbere, e, portanto, imaturos, ao final do experimento. O IHS apresentou diferença aos 90 e aos 120 dias de tratamento e não diferiu aos 9 meses de idade (n = 18/tratamento). Tanto aos 90 quanto aos 120 dias de tratamento os grupos tratados com MT apresentaram médias superiores aos grupos controles e, aos nove meses somente o grupo de 120 mg.Kg⁻¹ teve média menor que os demais grupos. O aumento do IHS pode ser explicado pela necessidade de metabolizar o andrógeno exógeno ofertado na ração, uma vez que o fígado é o órgão responsável pelo metabolismo e excreção de várias substâncias, incluindo hormônios esteroides (Schinoni, 2006).

5. Conclusão

Nossos resultados indicam que as doses hormonais da metiltestosterona utilizadas no estudo não afetaram a condição bioquímica do sangue, nem do fígado e nem tiveram efeito mutagênico nas células do sangue periférico de juvenis de tambaqui. Consideramos que 90 dias de tratamento com 90 mg de mg.Kg⁻¹ de ração foi eficaz para masculinizar 68,7% dos peixes tratados, no entanto não recomendamos esse tempo de tratamento (90 dias), devido a ocorrência de animais intersexuados. Já o tratamento hormonal por 120 dias foi mais eficaz em masculinizar juvenis de tambaqui em 71,4% e 68,2% nas concentrações de 90 mg.Kg⁻¹ e de 120 mg.Kg⁻¹, sem ocorrência de animais intersexos. O tratamento hormonal com 17 - alfa-metiltestosterona comercial para masculinizar juvenis de tambaqui, é mais eficaz quando usado por 120 dias nas concentrações de 90 e de 120 mg.Kg⁻¹ na ração. Essas duas doses resultam na proporção de 71,4% e de 68,2% de machos na população, sendo promissor para futuramente produzir uma população exclusivamente de fêmeas contribuindo para melhorar a produção de tambaqui.

Agradecimentos

Fapeam Amazonas Estratégico 145/2018, a Embrapa Amazônia Ocidental pelos laboratórios e Campo Experimental, e a SEPROR pela Estação de Piscicultura de Balbina/Presidente Figueiredo.

6 Referências

- Almeida, F. D., Lopes, J. S., Crescencio, R., Izel, A. C. U., Chagas, E. C., & Boijink, C. (2016). Early puberty of farmed tambaqui (*Colossoma macropomum*): Possible influence of male sexual maturation on harvest weight. **Aquaculture**, 452, 224-232.
- Andrade, D. R.; Tonini, W. C. T.; Burkert, D.; Godinho, H. P.; Vidal J. R., M. V. Maturação testicular em Machos da manjuba *curimãtella lepidura eigenmann & eigemmann*, 1889 (pisces, curimatidae) da represa de Três Marias, Rio São Francisco, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 11, n. 1, p. 9–16, 2010. Disponível em: <https://www.revistas.ufg.br/vet/article/view/2529>. Acesso em: 20 mar. 2022.
- Aparício, G.K.D.S. (2018). Desempenho zootécnico de fêmeas de jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1984) produzidas por inversão sexual indireta.
- APHA, 2005. Standard Methods for Water and Wastewater Examination, 21st Edition, Centennial Edition, Editado por Andrew D. Eaton, Leonore S. Clesceri; Eugene W. Rice e Arnold Greenberg, Método 2320 B, pág. 2-28, 2005. Editora: **Amer Public Health Assn**; 21ª edição (15 outubro 2005).
- Araújo-Lima, C. & Golding, M. 1998. Os frutos do tambaqui: ecologia, conservação e cultivo na Amazônia. Brasília: DF **Sociedade Civil Mamiará**. p.186.
- Ariede, R.B., Lemos, C.G., Batista, F.M., Oliveira, R.R., Agudelo, J.F.G., Borges, C.H.S., Iope, R.L., Almeida F.L.O., Brega, J. R. F., Hashimoto, D.T. (2023). Computer vision system using deep learning to predict rib and 2 loin yield in the fish *Colossoma macropomum*. **Animal Genetics**. Animal Genetics, 00, 1-14.
- Aristizabal, P. M., & Román Londoño, A. M. (2009). Porcentajes de reversión sexual em trucha arco íris (*oncorhynchus mykiss*) para la obtención de neomachos mediante la aplicación de la hormona masculinizante 17 a-metil testosterona por el método de ingestión (larvas) e inmersión (ovas y larvas).<http://hdl.handle.net/10946/1019>..
- Bahamonde, P. A., Munkittrick, K. R., & Martyniuk, C. J. (2013). Intersex in teleost fish: are we distinguishing endocrine disruption from natural phenomena? **General and comparative endocrinology**, 192, 25-35.
- Barcellos, L. J., Wassermann, G. F., Scott, A. P., Woehl, V. M., Quevedo, R. M., Itzès, I., ... & Lulhier, F. (2001). Steroid profiles in cultured female jundiá, the siluridae *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, Pisces Teleostei), during the first reproductive cycle. **General and Comparative Endocrinology**, 121(3), 325-332.
- Barros, Nirlei Hirachy Costa. Estratégia reprodutiva do peixe hermafrodita mussum, *Synbranchus marmoratus Osteichthyes, Synbranchidae* em um açude do Rio Grande do Norte, Brasil. 2012. 95 f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade; Biologia Estrutural e Funcional.) - **Universidade Federal do Rio Grande do Norte**, Natal, 2012.
- Barton, B.A.; Iwama, G.K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. **Ann. Rev. Fish Dis.**, v.1, p.3-26, 1991.

Bizarro, Yvonaldo Wladimir Saldanha. Efeito do fotoperíodo na glicemia, cortisol, parâmetros hematológicos e nos índices reprodutivos de machos de tilápia (*Oreochromis niloticus*) linhagem GIFT. 2013. xii, 37 f., il. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) - **Universidade de Brasília, Brasília**, 2013.

Bolognesi, C., Perrone, E., Roggieri, P., Pampanin, D.M., Sciutto, A., 2006. Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions. **Aquat. Toxicol.** 78, 93–98. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.02.015>.

Borges, B. A. A. (2015). Identificação de neomacho de Jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy e Gaimard, 1824) através do teste de progênie. TCC (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina. Centro de Ciências Agrárias. Curso de Engenharia de Aquicultura. <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle>.

Brabo, M. F., Natividade Júnior, L. S., Dias, C. L., Barbosa, J., Campelo, D. A. V., & Veras, G. C. (2017). Viabilidade econômica da produção familiar de tambaqui em gaiolas flutuantes no Oeste paraense, Amazônia, Brasil. **Custo e Agronegócios online**, 13.

Brito, J. M. (2021). Val, Vera Fonseca de Almeida. Influência de potenciais desreguladores endócrinos sobre as respostas moleculares e fisiológicas de *Crenuchus spilurus* (Günther, 1863). Dissertação GCBEv, INPA. <https://repositorio.inpa.gov.br/handle/1/37636>

Carvalho, C. V. A. D., Passini, G., Costa, W. D. M., Vieira, B. N., & Cerqueira, V. R. (2014). Effect of estradiol-17 β on the sex ratio, growth and survival of juvenile common snook (*Centropomus decimalis*). *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 36, 239-245.

Carvalho, C. V. A. D., Passini, G., Costa, W. D. M., Vieira, B. N., & Cerqueira, V. R. (2014). Effect of estradiol-17 β on the sex ratio, growth and survival of juvenile common snook (*Centropomus undecimalis*). **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, 36, 239-245. Doi: 10.4025/acta-scianimsci.v36i3.22839

Carvalho, F. M. (1980). Alimentação do mapará (*Hypophthalmus edentatus* Spix, 1829) do lago do Castanho, Amazonas (Siluriformes, Hypophthalmidae). **Acta Amazonica**, 10, 545-555.

Castro, D. R. C.; Brabo, M. F.; Rocha, R. M. da; Campelo, D. A. V.; Veras, G. C.; Rodrigues, R. P. Production cost and profitability of the creation of tambaqui *Colossoma macropomum* in the state of Pará, Amazon, Brazil. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 9, n. 9, p. e58996522, 2020. DOI: 10.33448/rsd-v9i9.6522. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/6522>. Acesso em: 19 dec. 2022.

Cavas, T., Ergene-Gozukara, S., 2005. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. **Aquat. Toxicol.** 74 (3), 264–271. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.06.001>.

Chaveiro, Susan Kelly Rodrigues de Sousa. Descendência de neomachos de *Rhamdia quelen*: desempenho de juvenis em diferentes densidades. **Dissertação** (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2017. <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/185526>.

Collier, H.B. The standardization of blood haemoglobin determinations. *Canadian Medical Association Journal*, Vancouver, v.50, p.550-552, 1944

Costa, F. G. (2015). Testículo de *Astyanax altiparanae* Garutti e Britski, 2000. Estudo morfológico, ultraestrutural e imuno-histoquímico (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).10.11606/T.42.2011.tde-26012012-111709.

Costa, G.M.; Ortis, R.C.; Lima, M.G.; Casals, J.B.; Lima, A.R.; Jr Kfoury, J.R. (2012). Estrutura morfológica do fígado de tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 32(9), 947-950, 2012.

Coz-Rakovac, R., Strunjak-Perovic, I., Hacmanjek, M., Popovic, N., Lipej, Z., & Sostaric, B. (2005). Blood chemistry and histological properties of wild and cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in the North Adriatic Sea. **Veterinary research communications**, 29(8), 677-687.

Cruz, C. K. F. (2017). Estudo da gametogênese e maturação gonadal do pacamã *Lophiosilurus alexandri* em condições de cultivo. Instituto de Ciências Biológicas **Universidade Federal de Minas Gerais** Março de 2017. <http://hdl.handle.net/1843/33891>.

Degani, G. (1986). Effect of dietary 17- β -estradiol and 17- α -methyltestosterone on growth and body composition of slow-growing elvers (*Anguilla anguilla* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 85(2), 243-247.

Díaz Huacho, A. J., & Infante López, E. T. (2019). Aplicación de la hormona 17 α metil testosterona em el guppy (*Poecilia reticulata*) para obtener una mayor producción de machos.

Drabikin, D.L. The standardization of hemoglobina measurement. *Am. J. Med. Sci.* 215: 210-211. 1948.

Duarte, F. O. S. (2017). Caracterização da carne de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) submetida à dietas suplementadas com óleo de peixe. **Tes-Doutor em Ciência Animal** junto a Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás.

Gayão, A. L. B. D. A., Buzollo, H., Fávero, G. C., Junior, S., Araújo, A., Portella, M. C., ... & Carneiro, D. J. (2013). Hepatic histology and Cage production of Nile tilapia hormonally masculinized or non masculinized. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 48, 991-997. **Pesq. agropec. bras., Brasília**, v.48, n.8, p.991-997, ago. 2013. DOI: 10.1590/S0100-204X2013000800026.

Goldenfarb, P. B.; Bowyer, F. P.; Hall, E.; Brosious, E. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. **American Journal of Clinical Pathology**. v. 56, n. 1, p.35-39, jul. 1971.

Gomes, L. C., Chippari-Gomes, A. R., Lopes, N. P., Roubach, R., & Araujo-Lima, C. A. (2001). Efficacy of benzocaine as an anesthetic in juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. **Journal of the World Aquaculture society**, 32(4), 426-431.

Gomes, L. C.; Brandão, F. R.; Chagas, E. C.; Ferreira, M. F. B.; Lourenço, J. N. P. 2004. Efeito do volume do tanque-rede na produtividade de tambaqui (*Colossoma macropomum*) durante a recria. **Acta Amazonica**, 34 (1): 111-113.

Grisolia, C. K. (2002). A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, 518(2), 145-150.

Hilsdorf, AWS, Hallerman, E, Valladão, GMR, et al. The farming and husbandry of *Colossoma macropomum*: From Amazonian waters to sustainable production. **Rev Aquac.** 2022; 14: 993– 1027. doi:10.1111/raq.12638.

Huang, J., Liu, S., Ouyang, H., Han, C., Li, M., Han, L., . & Zhang, Y. (2023). Production of XX neo-male mandarin fish, *Siniperca chuatsi*, after sexual differentiation by oral administration of 17 α -methyltestosterone. **Water Biology and Security**, 2(1), 100095.

Inoue, L. A. K. A., Boijink, C. L., Ribeiro, P. T., Silva, A. M. D. D., & Affonso, E. G. (2011). Avaliação de respostas metabólicas do tambaqui exposto ao eugenol em banhos anestésicos. **Acta Amazonica**, 41, 327-332.

Izel, A. C. U. & MELO, L. A. S. 2004(A). Criação de tambaqui (*Colossoma macropomum*) tanques escavados no Estado do Amazonas. Embrapa Amazônia Ocidental. **Documentos** 32. p. 20.

Junior, G. P., de Oliveira Pereira, E. M., Pereira Filho, M., de Sousa Barbosa, P., Brasil, E. M., & Shimoda, E. (2013). Parâmetros hematológicos de juvenis de tambaqui alimentados com rações contendo farinha de cruzeira de mandioca. **Acta Biomédica Brasiliensia**, 4(1), 1-11.

Kapur, S. Role of Dietary Endrogen (17 Alpha methyltestosterone) on growth rate, feed conversion efficiency and body composition in *C. punctatus*. v 4. Issue 3, p. 81 – March 2016. ISSN : 2319-6319. **International Journal of New Innovations in Engineering and Technology**. PG Deptt. of Zoology DAV College, Sector-10 Chandigarh, India.

Klipp, S. P., Pereira, M. O., & Jatobá, A. (2019). Influência da Frequência Alimentar Durante Inversão Sexual Da Tilápia-Do-Nilo. **Revista Científica Rural**, Bagé-RS, Volume 21, nº1, ano 2019 Submetido 02/05//2018. Aceito 09/10/2018. Doi: <https://doi.org/10.30945/rcr-v21i1.304>.

Kubitza, F. 2003. Qualidade da água no cultivo de peixes e camarões. Jundiaí. SP. p. 229.

Leatherland, J. F. (1985). Effects of 17 β -estradiol and methyltestosterone on the activity of the thyroid gland in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. **General and comparative endocrinology**, 60(3), 343-352.

Li GL, Liu XC, Lin HR. Effects of aromatizable and nonaromatizable androgens on the sex inversion of red-spotted grouper (*Epinephe lusakaara*). **Fish PhysiolBiochem**. 2006 Mar;32(1):25-33. doi: 10.1007/s10695-005-4900-z. PMID: 20035475; PMCID: PMC2780618.

Lima, C. A. S., Bussons, M. R. F. M., Aride, P. H. R., Oliveira, A. T., O'sullivan, F. L. A., & Pantoja-Lima, J. (2021). Análise socioeconômica e lucratividade da piscicultura do tambaqui (*Colossoma macropomum*) no estado do Amazonas, Brasil. Aquicultura na Amazônia: estudos técnicocientíficos e difusão de tecnologias. **Atena, Ponta Grossa**, 86-102.

Liu, S., Xu, P., Liu, X., Guo, D., Chen, X., Bi, S., ... & Li, G. (2021). Production of neo-male mandarin fish *Siniperca chuatsi* by masculinization with orally administered 17 α -methyltestosterone. **Aquaculture**, 530, 735904.

Lone, K. P., & Matty, A. J. (1980). The effect of feeding methyltestosterone on the growth and body composition of common carp (*Cyprinus carpio* L.). **General and Comparative Endocrinology**, 40(4), 409-424.

Lu, K. L., Xu, W. N., Li, J. Y., Li, X. F., Huang, G. Q., & Liu, W. B. (2013). Alterations of liver histology and blood biochemistry in blunt snout bream *Megalobrama amblycephala* fed high-fat diets. **Fisheries Science**, 79(4), 661-671.

Luo, K., Xiao, J., Liu, S., Wang, J., He, W., Hu, J., ...& Liu, Y. (2011). Massive production of all-female diploids and triploids in the crucian carp. **International Journal of Biological Sciences**, 7(4), 487.

Maciel, P. O. (2009). Efeito do praziquantel sobre as variáveis sanguíneas de *Colossoma macropomum* Curvier, 1818 (Characidae: Serrasalminae) e sua eficiência como anti-helmíntico no controle de parasitas monogenóides (Platyhelminthes: Monogenoidea).

Mahfouz, M. E.; Sherif, A.H. A multiparameter investigation into adverse effects of aflatoxin on *Oreochromis niloticus* health status. **J. Basic Appl. Zool.**, v.71, p.48–59, 2015.

Mainardes-Pinto, C. S. R., Fenerich-Verani, N., Campos, B. E. S. D., & Silva, A. L. D. (2000). Masculinização da tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, utilizando diferentes rações e diferentes doses de 17 a-metiltestosterona. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 29, 654-659.

Mateen, A., & Ahmed, I. (2015). Androgen sex reversal, subsequent growth and meat quality of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Pakistan Journal of Agricultural Sciences**, 52(1), 199-202.

- Matty, A. J.; Cheema, I. R. The effect of some steroid hormone on the growth and protein metabolism in rainbow trout. **Aquaculture**, v. 14, n. 2, p. 163-178, 1978.
- McDonald, D.G.; Milligan, C.L. Chemical properties of the blood. In: Fish Physiology (Hoar, W.S.; Randall, D.J.; Farrel, A.P., ed) v. XIIB, San Diego: **Academic Press**, 1992, p.55-134.
- Melo, D. C., Oliveira, D. A. A., Melo, M. M., Junior, D. V., Teixeira, E. A., & Guimarães, S. R. (2009). Proteic electrophoretic profile of chitralada tilapia nilotic (*Oreochromis niloticus*), exposed to hypoxia chronic stress. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 61, 1183-1190.
- Melo, L.A.S.; IZEL, A.C.U.; RODRIGUES, F.M. 2001. Criação de tambaqui (*Colossoma macropomum*) em viveiros de argila/barragens no estado do Amazonas. Embrapa Amazônia Ocidental. Série Documentos 18. p. 30.
- Mesquita, J. B. (2017). Efeito do 17 β -estradiol, potencial desregulador endócrino, sobre perfil hematológico e bioquímico em juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*) e acará (*Aequidens pallidus*). In **Anais do VI Congresso de Iniciação Científica do INPA-CONIC**, Volume VI, pg. 327-331. Brasil.
- Michalik, O., Kowalski, R., Ziomek, E., Hliwa, P., Mieszkowska, A., Rożyński, R., & Ocalewicz, K. (2017). Application of spermatozoa from neo-males (XX) to induce androgenetic development in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Folia Biologica** (Kraków), 65(2), 71-77.
- Mousavi-Sabet, H., & Ghasemnezhad, H. (2013). Masculinization, mortality and growth rates of swordtail *Xiphophorus hellerii* (Poeciliidae) affected by methyltestosterone. **Poeciliid Research**, 3(1), 7-13.
- Navarro, F.K.S. P Efeito do fotoperíodo na atividade locomotora e parâmetros fisiológicos em fêmeas de lambari (*Astyanax bimaculatus*). Dissertação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Lavras. 79 pag 2010.
- Nikaido, Y. ; Aluru, N. ; Mcguire, A. ; Park, Y., Mathilakath, V.M., Takemura, A. Effect of cortisol on melatonin production by the pineal organ of tilapia, *Oreochromis mossambicus*. Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: **Molecular & Integrative Physiology**. v. 155, n. 1, p. 84-90, 2010.
- Othman, R., Ron, X. J., Yao, H., O'Bryant, P., Rapp, D., Pei, J. C., ...& Wang, H. P. (2022). The effect of methyltestosterone (MT) on sex differentiation and growth in juvenile yellow perch (*Perca flavescens*). **Fish Physiology and Biochemistry**, 48(1), 161-171.
- Paz, A. D. L., & Val, A. L. (2018). Manipulation of growth of the Amazonian fish tambaqui, *Colossoma macropomum* (Characiformes: Serrasalminidae): analysis of physiological and zootechnical aspects. **Acta Amazonica**, 48, 197-206.
- Pelissero, C., & Sumpter, J. P. (1992). Steroids and "steroid-like" substances in fish diets. **Aquaculture**, 107(4), 283-301.
- Peng, X., Li, F., Lin, S., & Chen, Y. (2016). Effects of total replacement of fish oil on growth performance, lipid metabolism and antioxidant capacity in tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture International**, 24(1), 145-156. DOI 10.1007/s10499-015-9914-7.
- Perin, N. Avaliação laboratorial do fígado. Documento Científico. Departamento Científico de Hepatologia, 1-3. **Sociedade Catarinense de Pediatria Documento Científico**. 01 de Dezembro de 2021.
- Piferrer, F. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. **Aquaculture**, 197, 229-281. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-50913-0.50014-X>, 2001.

Piferrer, F.; Donaldson, E.M. Dosage – dependent differences in the effect of aromatizable and nonaromatizable androgens on the resulting phenotype of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Fish Physiology and Biochemistry*, v.9, n.2, p.145-150, 1991.

Porto, Luiz Carlos Santos. Avaliação de metais pesados e micronúcleos em peixes da bacia hidrográfica Butuí-Icamaquã e análise da água. 2009. Dissertação (Mestrado) – Curso de Ambiente e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Taquari - **Univates**, Lajeado, 27 mar. 2009. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10737/71>.

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

Quirino, P. P. (2022). A presença de intersexo em *Brycon orbignyanus* (Teleostei: Bryconidae): da diferenciação sexual, fisiologia a características sexuais secundárias. **Tese**, Programa de Pós - Graduação em Ciências Biológicas (Zoológica) – **Instituto de Biociências**, UNESP, Campus de Botucatu, São Paulo.

Rahman, M. R., Nishat, A. A., Sarder, M. R. I., & Islam, R. (2018). Comparison of growth performance of gynogenetic female, gynogenetic neo-male and normal mixed-sex silver barb (*Barbonymus gonionotus*) in earthen ponds. *Bangladesh Journal of Fisheries*, 30(1), 11-18.

Ranzani-Paiva, M. J. T., Padua, S. B., Tavares-Dias, M., Egami, M. I. Métodos para análise hematológicas em peixes. Maringá: Eduem, 2013. 140 p. **ISBN** 978-85-7628-530-4. CDD 23,Ed. 571.17.

Rašković, B., Stanković, M., Marković, Z., & Poleksić, V. (2011). Histological methods in the assessment of different feed effects on liver and intestine of fish. **Journal of Agricultural Sciences** (Belgrade), 56(1), 87-100.

Reidel, A., Romagosa, E., Feiden, A., Boscolo, W. R., Coldebella, A., & Signor, A. A. (2010). Rendimento corporal e composição química de jundiás alimentados com diferentes níveis de proteína e energia na dieta, criados em tanques-rede. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 39, 233-240. ISSN 1806-9290. www.sbz.org.br.

Rocha, V. M. D. (2017). Caracterização do sêmen de neomachos de *Rhamdia quelen*. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, **Programa de Pós-Graduação em Aquicultura**, Florianópolis, 2017. <https://repositorio.ufsc.br/xmlui/handle/123456789/183213>.

Rodrigues Filho, J. D. A. (2010). Alterações morfológicas e hormonais das gônadas e da hipófise da garoupa *Epinephelus marginatus* (Teleostei: Serranidae) durante a inversão sexual (**Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo**).

Rodrigues, G. M., Nascimento, F. G. O., Bizare, A., et al. 2018. Perfil bioquímico sérico de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) criadas em tanques rede durante as estações do verão e inverno. **Acta Scientiae Veterinariae**. 46: 1529.

Rotta, M. A. (2003). Aspectos gerais da fisiologia e estrutura do sistema digestivo dos peixes relacionados à piscicultura. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2003a. 48p. Embrapa Pantanal. Documentos, 53. (**INFOTECA-E**).

Sanches EG, Oliveira IR, Serralheiro PCS. Inversão sexual da garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus*. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.10, p.198-209, 2009.

Sangiao-Alvarellos, S., Polakof, S., Arjona, F. J., García-López, A., delRío, M. P. M., Martínez-Rodríguez, G., ... & Soengas, J. L. (2006). Influence of testosterone administration on osmoregulation and energy metabolism of gilthead sea bream *Sparus auratus*. **General and comparative endocrinology**, 149(1), 30-41.

- Shahsavani, D., Mohri, M., & Gholipour Kanani, H. (2010). Determination of normal values of some blood serum enzymes in *Acipenserstellatus* Pallas. **Fish physiology and biochemistry**, 36(1), 39-43.
- Shiotsuki, L. (2020). Núcleo de conservação de Tambaqui (*Colossoma macropomum*): Embrapa Pesca e Aquicultura. In: PÁDUA, J. G.; ALBUQUERQUE, M. do S. M.; MELLO, S. C. M. de (Ed.). Bancos e coleções de germoplasma da Embrapa: conservação e uso. Brasília: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 2020. infoteca.cnptia.embrapa.br.
- Silva, F. R. D., Andrade, V. M. D., & Freitas, T. R. O. D. (2003). Avaliação dos efeitos da poluição em duas espécies de peixes nos Rios Tramandaí e Mampituba (RS) através do teste de micronúcleos. **Salão de Iniciação Científica** (15.: 2003: Porto Alegre). Livro de resumos. Porto Alegre: UFRGS, 2003.
- Sulaeman & Fotedar, R. (2017). Masculinization of silver perch (*Bidyanus bidyanus* Mitchell 1838) by dietary supplementation of 17 α -methyltestosterone. The Egyptian **Journal of Aquatic Research**, 43(1), 109-116. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2016.10.002>.
- Sulaeman, Fotedar R (2017) Masculinization of silver perch (*Bidyanus bidyanus* Mitchell 1838) by dietary supplementation of 17 α -methyltestosterone. **Egypt J Aquat Res** 43:109–116.
- Summak, S., Aydemir, N.C., Vatan, O., Yilmaz, D., Zorlu, T., Bilaloglu, R., 2010. Evaluation of genotoxicity from Nilufer Stream (Bursa/Turkey) water using piscine micronucleus test. **Food Chem. Toxicol.** 48 (8–9), 2443–2447. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.06.007>.
- Tavares-Dias, M., Moraes, F.R., Imoto, M.E., 2008. Hematological parameters in two neotropical freshwater teleost, *Leporinus macrocephalus* (Anostomidae) and *Prochilodus lineatus* (Prochilodontidae). **Biosci. J.** 24 (3), 96–101. <http://200.19.146.79/index.php/biosciencejournal/article/view/6751>.
- Teh, S. J.; Adams, S. M.; Hinton, D. E. Histopathologic biomarkers in feral fresh water fish population sex posed to different types of contaminant stress. **Aquatic Toxicology**, v. 37, p. 51 – 70, 1997.
- Telli, E. M. R. P., Frigen, M., & Mello, S. R. (2016). Avaliação da atividade de enzimas hepáticas em dependentes, ex-dependentes e não usuários do etanol. **Revista brasileira de análises clínicas**, 48(3), 245-252.
- Thomas, J.S., 2000. Overview of plasma proteins, in: **Feldman**, B. F. et al., *Shalm's veterinary hematology*, Philadelphia: Lippincott, p.891-898.
- Toth, C. A., & Thomas, D. P. (1992). **Liver endocytosis and Kupffer cells**. *Hepatology*, 16(1), 255-266.
- Varela, E. S., Bekaert, M., Ganeco-Kirschnik, L. N., Torati, L. S., Shiotsuki, L., de Almeida, F. L., ... & Migaud, H. (2021). A high-density linkage map and sex-linked markers for the Amazon Tambaqui *Colossoma macropomum*. **BMC genomics**, 22(1), 1-10. doi.org/10.1186/s12864-021-08037-8.
- Vazzoler, A. E. A. de M. **Biologia da reprodução de peixes teleosteos: teoria e prática**. Maringá: EDUEM; Sao Paulo: 1996. SBI. 169 p.
- Ventura, A. S., Jerônimo, G. T., Corrêa Filho, R. A. C., de Souza, A. I., Stringhetta, G. R., da Cruz, M. G., ... & Povh, J. A. (2021). Ocimum basilicum essential oil as an anesthetic for tambaqui *Colossoma macropomum*: Hematological, biochemical, non-specific immune parameters and energy metabolism. **Aquaculture**, 533, 736124.
- Vidal-López, J. M., Álvarez-González, C. A., Contreras-Sánchez, W. M., & Hernández-Vidal, U. (2009). Masculinización del cíclido nativo Tenhuayaca, *Petenia splendida* (Günther, 1862), usando nauplios de *Artemia* como vehículo del esteroide 17- α metiltestosterona. **Hidrobiológica**, 19(3), 211-216.

- Villacorta-Correa, M. A., & Saint-Paul, U. (1999). Structural indexes and sexual maturity of tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818)(Characiformes: Characidae) in Central Amazon, Brazil. **Revista brasileira de biologia**, 59, 637-652.
- Vingren, J. L., Kraemer, W. J., Ratamess, N. A., Anderson, J. M., Volek, J. S., & Maresh, C. M. (2010). Testosterone physiology in resistance exercise and training. **Sports medicine**, 40(12), 1037-1053. doi: 10.2165/11536910-000000000-00000. PMID: 21058750.
- Wendt, Carla Letícia Gediel Rivero. Avaliação toxicológica do hormônio 17 Alfa metiltestosterona em espécies aquáticas. 2013. 198 f., il. Tese (Doutorado em Patologia Molecular)—**Universidade de Brasília**, Brasília, 2013.
- Williams, R. J., Keller, V. D., Johnson, A. C., Young, A. R., Holmes, M. G., Wells, C., ...& Benstead, R. (2009). A national risk assessment for intersex in fish arising from steroid estrogens. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, 28(1), 220-230.
- Witeska, M., Kondera, E., Ługowska, K., & Bojarski, B. (2022). Hematological methods in fish—Not only for beginners. **Aquaculture**, 547, 737498.
- Woo, N. Y. S., Chung, A. S. B., & Ng, T. B. (1993). Influence of oral administration of estradiol-17 β and testosterone on growth, digestion, food conversion and metabolism in the underyearling red sea bream, *Chrysophrys major*. **Fish Physiology and Biochemistry**, 10(5), 377-387.
- Woo, N. Y. S., Chung, A. S. B., & Ng, T. B. (1993). Influence of oral administration of estradiol-17 β and testosterone on growth, digestion, food conversion and metabolism in the underyearling red sea bream, *Chrysophrys major*. **Fish Physiology and Biochemistry**, 10(5), 377-387.
- Wootton, R. J., Evans, G. W., & Mills, L. (1978). Annual cycle in female three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus* L.) from an upland and lowland population. **Journal of Fish Biology**, 12(4), 331-343.
- Xu, D., Yang, F., Chen, R., Lou, B., Zhan, W., Hayashida, T., & Takeuchi, Y. (2018). Production of neomales from gynogenetic yellow drum through 17 α -methyltestosterone immersion and subsequent application for the establishment of all-female populations. *Aquaculture*, 489, 154-161.
- Yasui, G. S.; Santos, L. C. dos; Shimoda, E.; Ribeiro-Filho, O. P.; Calado, L. L.; Freitas, A. S.; Vidal, M. V.; Ferreira, E. B. Masculinização de três linhagens de tilápias-do-nylo utilizando o andrógeno sintético 17 α -metil-testosterona. **Zootecnia Tropical**, v. 25, n. 4, p. 307-310, 2007.
- Zanardi, M. F., Dias-Koberstein, T. C. R., Santos, M. A. D., & Malheiro, E. B. (2011). Desempenho produtivo e reversão sexual em tilápias em dois métodos hormonal. **Veterinária e Zootecnia**, 18(1), 45-52.
- Zhai, G., Shu, T., Chen, K., Lou, Q., Jia, J., Huang, J., ... & Yin, Z. (2022). Successful production of an all-female common carp (*Cyprinus carpio* L.) population using cyp17a1-deficient neomale carp. **Engineering**, 8, 181-189. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2021.03.026>.
- Zhang, Y. et al. Manipulating the air-filled zebrafish swim bladder as a neutrophilic inflammation model for acute lung injury. **Cell Death and Disease**, v. 7, p. 1-12. 2016b.
- Zienniczak, H. M., Honorato, C. A., Gandra, J. R. (2021). Adsorvente a base de probiótico como protetor hepático para *piaractus mesopotamicus* alimentados com dietas contendo aflatoxina B1. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2021. Disponível no **Repositório Institucional** da UFGD em:<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>.

Capítulo IV

CONCLUSÃO GERAL DA TESE

O pleno crescimento da aquicultura mundial contribui fortemente no fornecimento de peixes para consumo humano, ofertando proteína animal saudável e de boa qualidade. Em se considerando que as reservas naturais de pescado vêm diminuindo nas últimas décadas, é razoável avançar em estudos que ajudem economicamente a aumentar a produção sustentável, sem aumentar a área de cultivo e que contribuam na elucidação das fases reprodutivas de cada espécie, assim como estudos que explorem as características de melhor desempenho zootécnico de espécies de peixes nativos que sejam economicamente viáveis para produção na aquicultura.

Destacamos que é importante aumentar a produção sem impactar o ambiente com novas áreas de cultivo e preservando os ecossistemas. Este objetivo pode ser alcançado com o incremento de tecnologias inovadoras, como a produção de população monossexo, que pode ampliar a produção de tambaqui (*Colossoma macropomum*), uma vez que a espécie já possui tecnologias de cultivo e reprodução induzida bem consolidadas.

Visando contribuir com o aumento da produção da espécie, o estudo trouxe mais esclarecimentos sobre as fases reprodutivas do tambaqui. Verificamos que as fêmeas de tambaqui em sistema semi-intensivo iniciam a puberdade aos nove meses de idade e os machos mais precocemente aos sete meses. As fêmeas foram mais tardias quanto à entrada em todas as fases de maturidade gonadal e, muito provavelmente por serem mais tardias, apresentam maior peso e maior tamanho que os machos nas últimas biometrias. Inferimos que o manejo e o sistema de criação influenciam fortemente no desempenho e desenvolvimento sexual do peixe.

Observamos que a mesterolona não influencia os parâmetros sanguíneos e bioquímicos do tambaqui, não causa mutagenicidade aos eritrócitos do sangue periférico e nem efeitos tóxicos ao fígado do tambaqui. E que o tratamento de tambaquis juvenis indiferenciados com mesterolona nas doses de 20 e 40 mg.Kg⁻¹ de ração por 90 dias é eficaz na produção de mais de 77% de machos fenotípicos.

Verificamos que o andrógeno 17-alfa-metiltestosterona incluído na alimentação de juvenis de tambaqui por 90 dias apresentou baixa taxa de masculinização, e que nas concentrações de 90 e 120 mg.Kg⁻¹ de MT apresentaram 68,7% e 58,8% de machos,

respectivamente, além de induzir a ocorrência de animais intersexuais nos grupos de 60 mg (5,9%) e 90 mg (6,25%). E que o tratamento com MT por 120 dias nas concentrações de 90 e 120 mg.Kg⁻¹ apresentaram a proporção de 71,4% e 68,2 % de machos, respectivamente, sem apresentar intersexos. Os tratamentos com 17- α -metiltestosterona não causaram efeito negativo nos biomarcadores do sangue e também não houve efeito hepatotóxico ao fígado e nem efeito citogenético às células do sangue.

Recomendamos mais estudos sobre o desenvolvimento gonadal do tambaqui em sistemas de criação intensivo e com condições de manejo mais controladas, e que os estudos desenvolvidos nestas condições sejam conduzidos e acompanhados até a fase de reprodução (desova e espermição), para uma completa caracterização da fisiologia reprodutiva da espécie, em suas vertentes de produção de gametas, por histologia e produção de esteroides sexuais (por quantificação plasmática). Neste sentido, falta ainda verificar a idade exata em que as fêmeas de tambaqui estão aptas à reprodução induzida.

Por fim, é fundamental a continuidade do presente estudo quanto à fisiologia reprodutiva dos neomachos, ou seja, se esses peixes são realmente machos funcionais, condição fundamental para seu uso como produtores de lotes de fêmeas. Para isso, primeiramente deve ser realizada a genotipagem do sexo destes peixes, a fim de identificar quais são fêmeas masculinizadas. Assim, a maturação destes neomachos deve ser acompanhada, bem como sua produção espermática e por fim, a sexagem de suas proles.

Assim, exaltamos a importância e ineditismo desta tese, que não só contribui com novos dados sobre a fisiologia de tambaquis pré-púberes, mas também aponta o uso de EAAs como promissores indutores de fêmeas masculinizadas de tambaqui para a produção de lotes monosexos femininos, uma vez que produzem alto índice de machos fenotípicos e não afetam a saúde ou bem estar destes animais.