

**NÍVEIS DE 17 $\alpha$ -METILTESTOSTERONA EM  
DIFERENTES TEMPERATURAS NA INVERSÃO  
SEXUAL DE TILÁPIAS *Oreochromis niloticus***

**CRISTINA DELARETE DRUMMOND**

**2007**

**CRISTINA DELARETE DRUMMOND**

**NÍVEIS DE 17 $\alpha$ -METILTESTOSTERONA EM DIFERENTES  
TEMPERATURAS NA INVERSÃO SEXUAL DE TILÁPIAS**  
*Oreochromis niloticus*

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal, para a obtenção do título de "Doutor".

**Orientador**  
**Prof. Dr. Luis David Solis Murgas**

**LAVRAS**  
**MINAS GERAIS - BRASIL**  
**2007**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

Drummond, Cristina Delarete

Níveis de  $17\alpha$ -metiltestosterona em diferentes temperaturas na inversão sexual de tilápias *Oreochromis niloticus* / Cristina Delarete Drummond. -- Lavras : UFLA, 2007.  
90 p. : il.

Orientador: Luis David Solis Murgas.  
Tese (Doutorado) – UFLA.  
Bibliografia.

1. Tilápia. 2. Inversão sexual. 3. Temperatura. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-639.3758

**CRISTINA DELARETE DRUMMOND**

**NÍVEIS DE 17 $\alpha$ -METILTESTOSTERONA EM DIFERENTES  
TEMPERATURAS NA INVERSÃO SEXUAL DE TILÁPIAS**  
*Oreochromis niloticus*

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal, para a obtenção do título de "Doutor".

**APROVADA em 8 de março de 2007.**

Prof. Dr. Carlos José Pimenta - UFLA

Prof. Dr. Laércio dos Anjos Benjamin - UFV

Profa. Dra. Priscila Vieira Rosa Logato - UFLA

Prof. Dr. Rilke Tadeu Fonseca de Freitas - UFLA

**Prof. Dr. Luis David Solis Murgas**  
**UFLA**  
**(Orientador)**

**LAVRAS**  
**MINAS GERAIS - BRASIL**

*Ao meu marido, Bruno,*

*pelo carinho, companheirismo e incentivo;*

*À minha filha, Bia,*

*pelo simples fato de existir;*

*A todos aqueles que, de alguma forma, colaboraram para a  
concretização deste curso e deste trabalho.*

### **DEDICO**

Aos meus pais, Hely e Neuza, que sempre me apoiaram e me ajudaram durante  
toda a minha vida.

### **OFEREÇO**

## AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro.

À GENEFORTE Agropecuária, em especial ao Médico Veterinário Bruno Machado Queiroz, pelas orientações e apoio dispensado.

Especial agradecimento ao meu marido Bruno Vicentini, por todo o tempo dedicado e responsabilidade na realização deste trabalho.

Ao Prof. Luis David Solis Murgas pela orientação e tempo dispensado a este projeto.

Ao técnico da Estação de Piscicultura da UFLA, Elecir Pereira, por toda atenção e fundamental cooperação.

Aos estagiários, Natália Michele Nonato Mourad, Adriano Carvalho Costa, Daiane Moreira Silva, Aline Callegari Silva, Adriana Cristina da Silva, Ricardo Sales Araújo, Rodrigo Alves Barros e Luly de Assis Nogueira, por todo empenho e dedicação ao experimento.

Aos colegas, Leandra Queiroz de Melo, Juliana Milan de Aquino Silva, Gilmara Junqueira Machado Pereira e Aléssio Batista Miliorini, por toda a ajuda concedida.

Ao colega Márcio Gilberto Zangerônimo e ao Prof. Rilke Tadeu Fonseca de Freitas pela colaboração nas análises estatísticas e pelos conhecimentos transmitidos.

Enfim, a todos que contribuíram para minha formação e realização de mais esta etapa na minha vida, **agradeço**.

## SUMARIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>II</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>3</b>
2.1 Objetivo geral .....	3
2.2 Objetivos específicos .....	3
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>4</b>
3.1 Histórico do cultivo da tilápia.....	4
3.2 Tilápia do Nilo .....	7
3.3 Determinação e diferenciação sexual em peixes.....	9
3.4 Produção de populações monossexo.....	15
3.5 Inversão sexual utilizando hormônio na ração.....	16
3.5.1 Hormônio 17 $\alpha$ -metiltestosterona.....	18
3.5.2 Início e duração do tratamento hormonal para inversão sexual.....	20
3.5.3 Dosagem do hormônio.....	22
3.5.4 Arraçoamento.....	22
3.5.5 Preparo, conservação e armazenamento da ração com hormônio .....	24
3.5.6 Taxa de inversão sexual.....	25
3.5.7 Técnicas hormonais de inversão sexual utilizando hormônio na ração .....	26
3.5.7.1 Técnica hormonal direta .....	26
3.5.7.2 Técnica hormonal indireta .....	27
3.5.7.2.1 Tilápias geneticamente machos .....	29
3.5.8 Feminilização paradoxal .....	30
3.5.9 Resíduos do 17 $\alpha$ -metiltestosterona.....	31
3.6 Inversão sexual por imersão .....	34
3.7 Inversão sexual pela temperatura.....	35
3.8 Inversão sexual pela salinidade.....	38
3.9 Inversão sexual pelo pH.....	39
3.10 Hibridização.....	39
3.11 Sexagem manual.....	42

<b>4 MATERIAL E MÉTODO.....</b>	<b>44</b>
4.1 Local de execução do experimento.....	44
4.2 Animais e instalações.....	44
4.3 Preparo da ração.....	47
4.4 Experimento.....	48
4.5 Procedimento para estudo histológico.....	50
4.5 Delineamento experimental e análise estatística.....	52
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>53</b>
5.1 Avaliação dos parâmetros físico-químicos da água.....	53
5.2 Avaliação do peso, tamanho e sobrevivência das pós-larvas após 28 dias de tratamento.....	53
5.3 Avaliação da taxa de inversão sexual das pós-larvas de tilápia.....	63
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>69</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>70</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>84</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1.</b>	Peso (g) das pós-larvas de tilápia, após 28 dias de tratamento, criadas em tanques com diferentes temperaturas, alimentadas com ração contendo diferentes doses de hormônio.....	54
<b>TABELA 2.</b>	Tamanho (cm) das pós-larvas de tilápia, após 28 dias de tratamento, criadas em tanques com diferentes temperaturas, alimentadas com ração contendo diferentes doses de hormônio.....	56
<b>TABELA 3.</b>	Sobrevivência (%) das pós-larvas de tilápia, após 28 dias de tratamento, criadas em tanques com diferentes temperaturas, alimentadas com ração contendo diferentes doses de hormônio.....	58
<b>TABELA 4.</b>	Proporção (%) de machos identificados na sexagem visual (S) e na análise histológica (L) ao final do experimento.....	63
<b>TABELA 5.</b>	Porcentagem da relação da sexagem manual de alevinos de tilápia com a análise histológica das gônadas, ao final do experimento.....	64

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b>	Molécula do 17 $\alpha$ -metiltestosterona.....	18
<b>FIGURA 2.</b>	Modo de atuação do 17 $\alpha$ -metiltestosterona.....	20
<b>FIGURA 3.</b>	Esquema da papila genital da tilápia do Nilo.....	43
<b>FIGURA 4.</b>	Caixa d'água utilizada no experimento, dotada de sistema de aquecimento, aeração e abastecimento de água.....	45
<b>FIGURA 5.</b>	Bandejas plásticas utilizadas no experimento.....	46
<b>FIGURA 6.</b>	Hapas utilizados para alojar as pós-larvas de tilápia após o tratamento hormonal, localizados dentro de tanques de alvenaria.....	46
<b>FIGURA 7.</b>	Papilas genitais de tilápias observadas na sexagem manual.....	50
<b>FIGURA 8.</b>	Ovário de tilápia contendo ovócitos em diversos estádios de maturação (400x).....	51
<b>FIGURA 9.</b>	Testículo de tilápia contendo células da linhagem germinativa em vários estádios de diferenciação (400x)....	51
<b>FIGURA 10.</b>	Peso (g) médio das pós-larvas de tilápia após 28 dias de tratamento, em função da temperatura de estocagem, alimentadas com ração contendo A) 20 mg, B) 40 mg, e C) 60 mg de 17 $\alpha$ -metiltestosterona/Kg de ração.....	55
<b>FIGURA 11.</b>	Peso (g) médio das pós-larvas de tilápia após 28 dias de tratamento, criadas na temperatura de 28°C, alimentadas com ração contendo diferentes doses de 17 $\alpha$ -metiltestosterona/kg de ração.....	56
<b>FIGURA 12.</b>	Tamanho (cm) médio das pós-larvas de tilápia após 28 dias de tratamento, criadas em diferentes temperaturas de estocagem, independentemente da dose de 17 $\alpha$ -metiltestosterona na ração.....	57

- FIGURA 13.** Taxa de sobrevivência (%) das pós-larvas de tilápia após 28 dias de tratamento em função da temperatura de estocagem, alimentadas com ração contendo A) 0 mg, B) 20 mg, C) 40 mg e D) 60 mg de  $17\alpha$ -metiltestosterona/Kg de ração..... 59
- FIGURA 14.** Média de sobrevivência (%) das pós-larvas de tilápia após 28 dias de tratamento em função da dosagem de  $17\alpha$ -metiltestosterona incorporada na ração, independentemente da temperatura da água de estocagem..... 60
- FIGURA 15.** Média da porcentagem de machos de tilápia obtidos ao final do experimento em função das doses hormonais utilizadas, independentemente da temperatura de estocagem..... 64

## LISTA DE QUADROS

<b>QUADRO 1</b>	Características nutricionais da ração comercial utilizada no experimento.....	47
-----------------	---	----

## RESUMO

DRUMMOND, Cristina Delarete. **Níveis de 17 $\alpha$ -metiltestosterona em diferentes temperaturas na inversão sexual de tilápias *Oreochromis niloticus***. 2007. 90 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil.

Devido à precocidade sexual e ao maior crescimento do macho de tilápias do Nilo em relação às fêmeas, várias técnicas de inversão sexual, mais especificamente de masculinização ou produção de populações monossexo, têm sido preconizadas. Dentre as técnicas utilizadas para inversão sexual em tilápias, a mais difundida no mundo e no Brasil é a utilização de hormônios incorporados na ração, principalmente o 17 $\alpha$ -metiltestosterona. Apesar de ter sido demonstrado que a utilização de hormônio não resulta no acúmulo de resíduos nos tecidos dos peixes tratados, ainda existem preocupações quanto à sua liberação no ambiente e à reação dos consumidores. Portanto, o objetivo deste trabalho é avaliar a técnica de inversão sexual utilizando hormônio 17 $\alpha$ -metiltestosterona (MT), aliada à modificação da temperatura de estocagem das larvas de tilápia, visando diminuir a dosagem hormonal normalmente empregada, para minimizar o impacto ambiental que o uso de hormônios possa causar. O experimento foi conduzido na Estação de Piscicultura da UFLA, utilizando pós-larvas de tilápia obedecendo a um delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial 4x4, com 4 temperaturas (26°, 28°, 30° e 32°C) e 4 doses hormonais (0, 20, 40 e 60mg de MT/kg de ração) durante 28 dias, com 5 repetições. Para determinar a inversão sexual das tilápias, foi realizada a análise histológica das gônadas, além da sexagem manual. À medida que se elevou a temperatura, a taxa de ganho de peso, o tamanho e a sobrevivência foram maiores ( $p < 0,01$ ); entretanto, este aumento na temperatura não foi suficiente para alterar a proporção de machos ( $p > 0,01$ ), que ocorreu apenas em função do hormônio utilizado. A dose de 40 mg de MT/kg de ração proporcionou resultados semelhantes aos da dose de 60 mg de MT/kg de ração. Portanto, a faixa de temperatura entre 26° e 32°C não influencia na taxa de inversão sexual, mas temperaturas em torno de 30°C melhoram a performance das tilápias quanto a crescimento e sobrevivência. A dose de 40 mg de MT/kg de ração é suficiente para a obtenção de populações monossexo.

Comitê Orientador: Luis David Solis Murgas – UFLA (Orientador), Priscila Vieira Rosa Logato – UFLA, Rilke Fonseca de Freitas – UFLA.

## ABSTRACT

DRUMMOND, Cristina Delarete. **Levels of 17 $\alpha$ -methyltestosterone in different temperatures on sex inversion of Nile tilapias *Oreochromis niloticus***. 2007. 90 p. Thesis (Doctoral in Animal Production) - Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.

Due to sexual precocity and higher growth rate of Nile tilapia males in relation to females, several techniques on sex inversion, more specifically the masculinization or production of mono-sex populations, have been praised. Among the techniques used for sex inversion in tilapias, the most disseminated around the world and Brazil is the hormone usage incorporated to ration, mainly 17 $\alpha$ -methyltestosterone. In despite of it has been demonstrated that hormone usage does not result in residues accumulation in treated fish tissues, there still are concerns about its release in environment and consumers response. Therefore, the objective of this work is to evaluate the sex inversion technique using 17 $\alpha$ -methyltestosterone (MT) hormone, combined with temperature modification of tilapia larvae storage, aiming at the decrease of hormonal dosage normally employed, reducing an environmental impact which the hormone usage could cause. The experiment was performed at UFLA Fish Culture Station, using tilapia after-larvae obeying a totally randomized experimental delineation in a factorial scheme 4x4, in 4 temperatures (26°, 28°, 30°, 32°C) and 4 hormonal doses (0, 20, 40, 60mg of MT/kg of ration) during 28 days, with 5 repetitions. In order to determine tilapias sex inversion, gonads histological analysis was performed, beyond manual sexing. As temperature raised, weight gain rate, size and survival increased ( $p < 0,01$ ); however, this temperature raise was not effective in modifying males ratio ( $p > 0,01$ ), which occurred only due to the used hormone treatment. The dose of 40mg of MT/kg of ration provided similar results to those of 60mg of MT/kg of ration. Hence, the temperature band from 26° to 32°C does not affect sex inversion rate, but temperature around 30°C improves the performance of tilapias related to the growth and survival. The dose of 40 mg of MT/kg of ration is enough to achieve mono-sex populations.

Advisory committee: Luis David Solis Murgas - UFLA (Advisor), Priscila Vieira Rosa Logato - UFLA, Rilke Tadeu Fonseca de Freitas - UFLA.

## 1 INTRODUÇÃO

Devido à precocidade sexual e ao maior crescimento do macho de tilápias do Nilo em relação às fêmeas, várias técnicas de inversão sexual, mais especificamente de masculinização ou produção de populações monossexo, têm sido preconizadas.

Dentre as técnicas utilizadas para inversão sexual em tilápias, a mais difundida no mundo e no Brasil é a utilização de hormônios incorporados na ração, principalmente o  $17\alpha$ -metiltestosterona.

Entretanto, na prática, o produtor lança mão do aumento na quantidade de hormônio utilizada quando não atinge um bom índice de inversão, na tentativa frustrada de aumentar o índice de inversão. Com isso, maior quantidade de resíduos deste hormônio é lançada no ambiente.

Apesar de ter sido demonstrado que a utilização de hormônio não resulta no acúmulo de resíduos nos tecidos dos peixes tratados, ainda existem preocupações quanto à sua liberação no ambiente e à reação dos consumidores. Acredita-se que o uso indiscriminado do hormônio provoque um impacto ambiental considerável e que isto possa trazer alguns prejuízos a curto e longo prazos para a saúde do homem e dos animais. Por isso, existe a necessidade da redução na dosagem e do tempo de exposição dos funcionários durante os tratamentos hormonais.

Além da utilização de hormônios para se obter uma população monossexo macho em tilápias, o aumento da temperatura de criação também pode ser utilizado como uma forma alternativa de inversão sexual. Porém, as taxas de inversão sexual através da temperatura não são tão satisfatórias quanto a técnica de inversão através de hormônios para uma produção em larga escala.

Portanto, uma forma alternativa para tentar diminuir a dose hormonal utilizada no processo de inversão sexual em tilápias poderia ser a utilização de

hormônios aliada ao aumento da temperatura de criação, promovendo, assim, uma boa proporção de machos, com uma menor formação de resíduos, e conseqüente liberação no ambiente, diminuindo, ainda, os riscos do manuseio durante o tratamento hormonal.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o desempenho, a sobrevivência e a proporção de machos em pós-larvas de tilápias do Nilo submetidas a diferentes temperaturas de estocagem e diferentes doses hormonais durante o processo de inversão sexual.

### **2.2 Objetivos específicos**

1. Avaliar o desempenho (peso, comprimento) e a sobrevivência das pós-larvas de tilápias submetidas a diferentes doses de  $17\alpha$ -metiltestosterona, associadas a diferentes temperaturas;
2. Determinar a taxa de inversão sexual das pós-larvas de tilápias submetidas a diferentes doses de  $17\alpha$ -metiltestosterona, associadas a diferentes temperaturas;
3. Verificar histologicamente a eficácia da técnica de sexagem manual em peixes submetidos à inversão sexual.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Histórico do cultivo da tilápia

Tilápia é a denominação comum de grande gama de espécies de peixes ciclídeos que, conforme Popma & Phelps (1998), se distribuem originalmente do centro-sul da África até o norte da Síria, onde mais de 70 espécies têm sido identificadas. Cerca de 22 espécies de tilápia são cultivadas no mundo, porém a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), a tilápia mossâmbica (*O. mossambicus*), a tilápia azul (*O. aureus*), a *Tilápia zilli* e a *T. rendalli* são as espécies mais criadas comercialmente (El-Sayed, 1999). As tilápias de importância comercial estão divididas em três principais grupos taxonômicos, distinguidos basicamente pelo comportamento reprodutivo. São eles os gêneros *Tilapia* (os peixes incubam seus ovos em substratos), *Oreochromis* (os peixes incubam os ovos na boca da fêmea) e *Sarotherodon* (os peixes incubam os ovos na boca do macho ou de ambos) (Popma & Lovshin, 1996).

O cultivo de tilápias começou em 1924, no Quênia, e em seguida no Congo, em 1937. As primeiras informações sobre a tilápia como espécie promissora para a aquicultura ocidental surgiram no início da década de 50, com citações sobre a tilapicultura como sendo um dos melhores negócios para piscicultores e uma nova fonte para obtenção de proteínas (Mercado da Pesca, 2007).

De acordo com Lovshin (1997), a distribuição das tilápias pelo mundo começou com o intuito da criação de peixes para a subsistência de países em desenvolvimento. A primeira espécie introduzida em outros países foi a *O. mossambicus*, porém esta se mostrou de baixo desempenho para a aquicultura (Lazard & Rognon, 1997). Entretanto, apenas no final dos anos 70 a tilápia do Nilo demonstrou alto potencial para a aquicultura em vários sistemas de criação.

As estatísticas comprovam um elevado desenvolvimento do cultivo da tilápia, a qual corresponde ao segundo grupo de peixes mais cultivado no mundo, superado apenas pelas carpas. A produção mundial de tilápias praticamente dobrou entre 1984 e 1994, alcançando 620.000 toneladas. Em 1996, a produção saltou para 800.800 toneladas, apresentando o maior crescimento percentual entre os principais grupos de peixes cultivados no mundo. Os países asiáticos foram responsáveis pela produção de 700.400 toneladas de tilápia, das quais 56,3% foram produzidos pela China. Outros grandes produtores foram Indonésia, Tailândia, Filipinas e Taiwan. A produção brasileira de 1996 foi de 19.200 toneladas, o que correspondeu a 2,4% da produção mundial (Mercado da pesca, 2007) e, em 2002, a tilápia gerou US\$ 50 milhões em rendimentos ao setor.

O Brasil produziu cerca de 70 mil toneladas de tilápia em 2006, sendo que este negócio já movimentava 105 milhões de dólares por ano no país. Os Estados Unidos são os maiores compradores, adquirindo 135 mil toneladas por ano no mercado mundial. A China é o maior produtor do planeta e responde por 45% da oferta global. A estimativa é de que, em 2010, o mundo produzirá 3 milhões de toneladas por ano (Franco, 2006).

No Brasil, a tilápia do Nilo foi introduzida no nordeste, em 1971, proveniente da Costa do Marfim, no Oeste africano, e a partir daí distribuída pelo país, sendo uma das espécies mais cultivadas no Brasil, desde a bacia do rio Amazonas até o Rio Grande do Sul (Lovshin & Ciryno, 1998), já que as tilápias são predominantemente de águas quentes. Porém, a temperatura de cultivo pode variar de 20 a 30°C, embora elas possam tolerar temperaturas de aproximadamente 12°C.

Alguns acadêmicos ao fazerem uma analogia entre a avicultura e a piscicultura, garantem que a tilápia tornar-se-á a galinha dos viveiros (Mercado da pesca, 2007). Acredita-se que a produção mundial de alimentos por métodos

tradicionais esteja próxima do seu ponto máximo, existindo, assim, a necessidade de idealizar novas formas de produção de alimento para o homem. Por isso, a criação de tilápias tem recebido considerável atenção dos setores públicos e privados como um novo “agro-business” capaz de diversificar a economia agrícola e pesqueira de países desenvolvidos e em desenvolvimento.

Quando introduzida no Brasil, a tilápia foi considerada a salvação da piscicultura nacional por sua extensiva produção nos grandes reservatórios das usinas hidrelétricas do Nordeste e Sudeste. No entanto, em pouco tempo, sua reprodução exacerbada lotou os lagos de peixes pequenos, rebaixando o status da espécie de heroína para bandida. Seu retorno aconteceu na década de 90, no sul e sudoeste do país, com a introdução da inversão sexual.

Segundo Borghetti & Ostrensky (1998), o segmento responsável pelo grande incremento da produção de tilápias no Brasil foi o sistema de pesque-pague, que nos últimos anos ampliou em muito a sua demanda.

A tilápia é cultivada de seis diferentes formas no país: extrativa (proveniente das represas do interior de São Paulo, Minas Gerais e Nordeste); tanques escavados em solo agrícola (sistema muito flexível, em diferentes intensidades de cultivo, mas caracterizando-se por baixos custos operacionais); tanques-rede (águas represadas nas águas interiores, considerado um dos melhores processos); rizipiscicultura (presente em Santa Catarina e Rio Grande do Sul, consorciada com a cultura do arroz irrigado, permitindo ao produtor não utilizar defensivo agrícola, obtendo um arroz orgânico, já que a tilápia elimina as ervas daninhas dos arrozais); suinocultura (presente no oeste do Paraná e Santa Catarina, consorciada com a criação de suínos); e “raceway” (engorda em tanque de concreto com grande renovação de água, sistema encontrado na Bahia e em São Paulo). Destes sistemas, a produção em tanques-rede é hoje uma das mais utilizadas e, também, a mais produtiva por unidade de cultivo (Pacheco, 2004).

Estimativas apontam que 88% da produção nacional estão concentrados na Região Sul e Sudeste, que abastecem piscicultores de todo o País.

### **3.2 Tilápia do Nilo**

A tilápia do Nilo *O. niloticus* destaca-se como a principal espécie do gênero *Oreochromis* com potencial para a aquicultura devido a sua rusticidade; crescimento rápido, atingindo peso comercial em pequeno intervalo de tempo; grande capacidade de adaptação ao confinamento e a diversos sistemas de cultivo; alta capacidade de hibridização, que permite unir os caracteres desejados; tolerância a variações amplas de salinidade, temperatura e concentrações de oxigênio dissolvido; elevada resistência a doenças; alta qualidade de sua carne com coloração clara; e por apresentar elevada aceitação no mercado consumidor (Boscolo et al., 2001; Hayashi, 1995; Lovshin, 1997; Souza, 2001). De acordo com Popma & Lovshin (1996), elas são mais resistentes a doenças virais, bacterianas e parasitárias do que qualquer outra espécie comumente cultivada.

Além destas vantagens, existem outras, tais como: se alimentam dos itens básicos da cadeia trófica; aceitam uma grande variedade de alimentos; respondem com a mesma eficiência à ingestão de proteínas de origem vegetal e animal; apresentam resposta positiva à fertilização (adubação) dos viveiros; são bastante resistentes ao superpovoamento; e desovam durante todo o ano nas regiões mais quentes do país (Mercado da pesca, 2007). As tilápias possuem hábito alimentar onívoro, adequando-se facilmente ao arraçamento desde o período de pós-larva até a fase de terminação (Phelps & Cerezo, 1992).

De acordo com Popma & Phelps (1998), a tilápia é, entre as espécies de peixes mais cultivadas, a que melhor resiste a alta temperatura, a baixa concentração de oxigênio dissolvido e a alta concentração de amônia na água. Já

Lahav & Ra'Nam (1997) citam que a principal vantagem da tilápia do Nilo é o seu baixo custo relativo, principalmente quanto ao alevino, à alimentação e à qualidade da sua carne. Além disso, as tilápias possuem boas características organolépticas e nutricionais, tais como carne saborosa, baixo teor de gordura (0,9 g/100g de carne) e de calorias (172 kcal/100g de carne), ausência de espinho em forma de “Y” (mioceptos) e rendimento de filé de aproximadamente 35% a 40 %, em exemplares com peso médio de 450 g, o que as potencializa como peixes para industrialização (Mercado da pesca, 2007).

Entretanto, as tilápias consistem um paradoxo em relação à reprodução. Apresentam desovas parceladas e baixa fecundidade, que no gênero *Oreochromis* pode alcançar índices de 6.000 a 13.000 ovos/kg/desova (Phelps & Popma, 2000). Esta baixa fecundidade é compensada pela característica de desovas assincrônicas, associada às altas taxas de sobrevivência das proles, em virtude do cuidado parental, do tamanho das larvas ao nascer e da incubação bucal dos ovos e/ou larvas (Turner & Robinson, 2000).

Como as fêmeas desovam freqüentemente, elas desviam grande parte da energia que poderia ser gasta no crescimento para a produção de ovócitos. Durante este período, as fêmeas praticamente não se alimentam e, tendo em vista que o cuidado parental dispensado aos ovos e às pós-larvas pode se prolongar por uma semana, ocorre sensível redução no ganho de peso, perda da qualidade da carne e maior incidência de doenças (Baldisserotto, 2002). Já os machos apresentam maior ganho de peso e melhor conversão alimentar quando comparados com as fêmeas sob condições de cultivo intenso, chegando a crescer 18-25% mais rápido que as fêmeas (MacIntosh & Little, 1995).

Vários fatores podem contribuir para este crescimento diferencial, tais como os efeitos anabólicos dos andrógenos, o direcionamento da energia metabólica para a reprodução nas fêmeas e o padrão de comportamento social relacionado ao sexo (Toguyene et al., 1997). Estes fatos, aliados à precocidade

sexual, fazem com que as fêmeas apresentem respostas menos eficientes em relação à sua produtividade quando comparadas aos machos (Lahav & Lahav, 1990; Mair et al., 1997a; Mires, 1995; Popma & Lovshin, 1996). Portanto, o cultivo de populações mistas frequentemente resulta em maturação e reprodução precoces (Mires, 1995). Além disso, Toguyene et al. (1997) observaram que os machos demonstram uma maior proporção de crescimento e melhor conversão alimentar quando cultivados em uma população monossexo, se comparados com populações mistas.

Então, a inversão sexual, muito utilizada em tilápias, permite que o criador consiga ter, nos seus tanques, exemplares apenas machos, pois são os que apresentam melhor taxa crescimento, maior ganho de peso e melhor conversão alimentar quando comparados com as fêmeas e, conseqüentemente, aumento da rentabilidade.

### **3.3 Determinação e diferenciação sexual em peixes**

Nos peixes, a determinação sexual tem sido estudada para compreender os mecanismos utilizados na diferenciação sexual. Estes estudos têm revelado padrões complexos e variáveis, além dos mecanismos utilizados dentro das diferentes ordens de peixes.

A razão para se estudar a determinação sexual dos peixes está relacionada com implicações de manejo e comerciais (Mair et al., 1997b), através do aumento da sua utilização como fonte alimentar. A compreensão da diferenciação sexual e o controle reprodutivo são pontos centrais para a propagação eficiente das tilápias devido a diferenças na proporção do crescimento entre os sexos e à necessidade de sincronizar a maturação sexual.

A expressão do sexo depende de dois eventos: da determinação sexual e da diferenciação sexual. A distinção entre determinação sexual e diferenciação sexual é frequentemente difícil.

A determinação sexual é responsável pelo sexo genético (ou genotípico), sendo utilizada para descrever os processos genéticos, comportamentais e variáveis que influenciam a diferenciação sexual. A determinação sexual em peixes é controlada, principalmente, pela genética, mas também pode ser influenciada por condições ambientais (Hurley et al., 2004). A diferenciação sexual é responsável pelo desenvolvimento das gônadas (sexo gonadal ou fenotípico), usado para descrever a realização física destes eventos em termos do desenvolvimento de ovário ou testículo.

A interação desses dois eventos resulta em dois fenótipos, macho ou fêmea, seja morfológica, comportamental ou funcional (Piferrer, 2001). Ou seja, a diferenciação sexual envolve todos os eventos que ocorrem durante o desenvolvimento, resultando na expressão do sexo genético no sexo fenotípico. Inclui os eventos iniciais que ocorrem desde a gônada primordial até a diferenciação completa em testículos ou ovários.

No início da embriogênese, o indivíduo não é fenotipicamente nem macho nem fêmea, porque não possui ovário, testículo ou outras características associadas aos sistemas reprodutores. Ele possui apenas as células germinativas primordiais imersas em tecido conjuntivo indiferenciado, e que podem se desenvolver para macho ou fêmea.

Em tilápias, cerca de 5 dias após a eclosão das pós-larvas, um sinal químico originado de um gene, ou de um conjunto de genes, sinaliza ao tecido totipotente em que direção se desenvolver. Uma vez que isso ocorra e o tecido pré-gonadal complete seu desenvolvimento, o indivíduo se torna fisiologicamente macho ou fêmea. Após esta fase, não é mais possível alterar o sexo fisiológico, exceto por técnicas radicais como a cirurgia gonadal, cujo

sucesso é limitado (Patiño, 1996). Neste espaço de tempo, durante o qual o sexo fisiológico pode ser alterado, esteróides anabolizantes (administrados dieteticamente ou por meio de banhos de imersão) podem interferir diretamente no desenvolvimento das células totipotentes.

Nas tilápias, as células germinativas primordiais estão localizadas entre o intestino e os ductos mesonéfricos, no esboço primordial das gônadas (Zhu, 1987). Elas são similares nos dois sexos, permanecendo indiferenciadas e indeterminadas até a exposição ao hormônio ou outras influências que ocorram para o desenvolvimento gonadal. Dependendo deste desenvolvimento, elas se transformarão em ovogônias ou espermatogônias.

Um fator importante que diferencia a biossíntese dos esteróides sexuais de machos e fêmeas é a enzima aromatase produzida pelas células granulosas dos folículos ovarianos, que faz a clivagem da testosterona em estradiol. Estudos sugerem que o gene que codifica a aromatase presente nas células granulosas poderia ter um papel no controle da diferenciação sexual ou responder de forma diferente no desenvolvimento gonadal que ocorre em machos e fêmeas. A aromatase citocromo P450 (CYP19) é um produto do gene CYP19 e é uma enzima terminal da biossíntese de estrógeno, catalisando a formação de estrógeno a partir de andrógenos. Esta aromatase é principalmente expressada no ovário (Devlin & Nagahama, 2002).

Desde que eventos regulatórios do gene celular são requeridos para permitir a produção de esteróides, é improvável que estes esteróides sozinhos ou enzimas associadas sejam os fatores iniciais envolvidos na determinação do sexo (Yamamoto, 1969), mas eles estão correlacionados com vários passos iniciais da diferenciação gonadal. Portanto, se a capacidade de sintetizar esteróides é prejudicada, a determinação sexual pode ser alterada. Por exemplo, a inibição da síntese de estradiol no desenvolvimento inicial, utilizando inibidores da enzima

aromatase, pode causar masculinização em várias espécies de peixes, incluindo a tilápia (Chang et al., 2005).

A natureza do indutor endógeno da diferenciação sexual ainda não está totalmente esclarecida, mas muitas evidências reforçam a idéia de que os esteróides sexuais são, de fato, indutores da diferenciação sexual em peixes. Embora a biossíntese de esteróides possa não representar o evento inicial da determinação sexual, está claro que eles possuem um papel crítico no início da diferenciação da gônada em testículo ou ovário e, provavelmente, na manutenção desta condição. Os receptores, tanto para estrógenos quanto andrógenos, têm sido identificados precocemente nas gônadas de peixes, fornecendo um mecanismo de ação para os esteróides exógenos na diferenciação gonadal (Chang et al., 1999; Fitzpatrick et al., 1995).

Vários estudos sobre a manipulação da diferenciação sexual em peixes utilizando esteróides exógenos têm sido revisados (Nakamura et al., 1998; Piferrer, 2001). A maioria destas pesquisas tem sido direcionada para o controle da reprodução de algumas espécies; entretanto, poucos trabalhos têm explorado os mecanismos de ação dos esteróides exógenos. Experimentos têm envolvido diferentes andrógenos, estrógenos ou precursores de estrógenos administrados por imersão (Wassermann & Afonso, 2003) ou via dieta em vários estágios do desenvolvimento. Diferentes dosagens e durações de tratamentos têm sido utilizadas para elucidar os períodos críticos de sensibilidade para determinação sexual (Mainardes-Pinto et al., 2000).

Se níveis suficientes de esteróides sexuais forem fornecidos aos peixes, particularmente nos estágios iniciais do desenvolvimento em que a determinação sexual ainda não tenha sido completamente estabelecida, alterações na diferenciação sexual podem ocorrer. Por isso, tratamentos com andrógenos têm sido muito eficientes na indução da masculinização de peixes (Hunter &

Donaldson, 1983), enquanto estrógenos induzem a feminilização (Desprez et al., 1995).

O início do tratamento e a sua duração são de importância crítica para a indução da inversão sexual em peixes. Em geral, o período mais sensível é o tempo imediatamente antes ou concomitante com a diferenciação histológica inicial da gônada primitiva (Hunter & Donaldson, 1983). Tratamentos curtos com hormônios durante os estágios iniciais do período de determinação sexual podem resultar em alterações permanentes no fenótipo sexual.

Entretanto, tratamentos com doses excessivas de estrógenos ou andrógenos podem levar ao não desenvolvimento gonadal ou à esterilidade. Estes efeitos podem refletir incompatibilidades entre o esteróide exógeno e processos genéticos e fisiológicos internos, ou efeitos patológicos no desenvolvimento gonadal. Além disso, tratamentos com doses excessivas de andrógenos podem também levar a uma redução na masculinização e, em alguns casos, induzir feminilização paradoxal (Piferrer et al., 1993).

Na maioria dos casos, as funções genéticas que normalmente atuam para determinar o sexo não retornam à condição inicial de diferenciação sexual após o tratamento hormonal ter cessado, sugerindo que o locus de determinação sexual atua somente durante o desenvolvimento inicial, ou que sua ação não é suficiente para mudar o curso da diferenciação sexual estabelecido pelo tratamento com esteróide externo. Vários dados sugerem que o esteróide exógeno atua, em parte, pela alteração da expressão dos genes das enzimas esteroidogênicas envolvidas na diferenciação sexual (Devlin & Nagahama, 2002).

Ainda, de acordo com estudos sobre os mecanismos de determinação sexual das tilápias do Nilo, tem sido demonstrado que esta espécie tende a ser controlada poligenicamente por maiores ou menores fatores dos cromossomos sexuais e autossomos, apesar de exibir um sistema genotípico

predominantemente monofatorial com machos heterogaméticos e fêmeas homogaméticas (Mair et al., 1991; Mair et al., 1997b). Estudos das gerações indicam que o sexo é determinado principalmente pelos cromossomos sexuais (tanto no sistema XY quanto ZW), mas influências autossômicas também estão operando em muitas linhagens. Por exemplo, em *O. niloticus*, um sistema XY é o operante primário. Entretanto, a proporção sexual é variável e difere significativamente nas gerações, sugerindo que influências polifatoriais na determinação sexual são capazes de se sobreporem à atividade de determinação sexual dos cromossomos sexuais (Tuan et al., 1999). *O. niloticus* parece possuir uma capacidade substancial para modificar a proporção sexual. Esta plasticidade pode ser detectada em indivíduos em que o sexo fenotípico não está correlacionado com a constituição dos cromossomos sexuais. Fêmeas que produzem progênie YY pela ginogênese têm sido observadas sendo que a proporção sexual em cruzamentos regulares é de aproximadamente 3M:1F, sugerindo que algumas fêmeas podem ser indivíduos XY que seguiram o desenvolvimento para fêmea (Mair et al., 1991). Por outro lado, *O. niloticus* que possuem genótipo YY produzem uma prole contendo alta proporção de machos, indicando que as influências autossômicas podem ser minimizadas (Beardmore et al., 2001).

Observou-se, ainda, que a temperatura também pode influenciar a proporção de sexos (Baroiller & D’Cotta, 2001). Estes desvios significativos na proporção de sexo (predominantemente para o fenótipo macho) já foram observados tanto em fenótipos normais quanto em fêmeas genotipicamente monossexo nas tilápias do Nilo, para as quais elevadas temperaturas (que causam masculinização) estão associadas com redução dos níveis de RNAm para aromatase e com níveis inferiores de estradiol (D’Cotta et al., 2001).

Como a determinação sexual é controlada pela ação de várias proteínas, tais como fatores de transcrição, enzimas esteroidogênicas, receptores e sistemas

de segundo mensageiros, é bem conhecido que a temperatura pode alterar dramaticamente a estrutura e função das proteínas e de outras macromoléculas. Desta forma, as flutuações da temperatura podem alterar o direcionamento da determinação sexual e influenciar na probabilidade do desenvolvimento sexual, formando machos ou fêmeas. Em répteis, estes efeitos dependentes da temperatura parecem ser mediados, em parte, pela influência na atividade da aromatase e síntese de estradiol nas fêmeas, e nos receptores para esteróides de ambos os sexos. Tais efeitos também podem ocorrer em peixes (Devlin & Nagahama, 2002).

### **3.4 Produção de populações monossexo**

Atualmente, o produtor tem preferido a formação de populações monossexo nos seus tanques. Esta preferência pode ser devida a diferenças de crescimento entre sexos; por exemplo, nas tilápias, o macho cresce mais rápido do que as fêmeas, enquanto em salmonídeos as fêmeas se desenvolvem mais que os machos. Além disso, um sexo específico pode produzir produtos valorizados como o caviar, além de reduzir a reprodução não desejada, o que poderia levar a uma superpopulação (Bartley et al., 2001).

Diversas técnicas são empregadas para o controle da produção de machos em tilápias, tais como a sexagem manual ou visual (Popma & Masser, 1999), monossexo por hibridação (Wohlfarth & Hulata, 1981), poliploidia (Diaz, 1994), ginogênese e androgênese (Thorgaard, 1983), e inversão sexual com a utilização de hormônios (Guerrero III & Guerrero, 1997; Nakamura, 1975; Shelton et al., 1978). Os efeitos de diversas condições ambientais, como temperatura e fotoperíodo, além das técnicas de manejo no processo de inversão sexual em tilápias, também têm sido demonstrados por vários pesquisadores

(Baroiller & D’Cotta, 2001; Borges et al., 2005; Hunter & Donaldson, 1983; Hurley et al., 2004;).

Segundo Hunter & Donaldson (1983) e Phelps & Cerezo (1992), a técnica mais comum, prática, efetiva e viável economicamente é a inversão sexual com a utilização de hormônios masculinizantes, sendo a mais efetiva para produção de machos fenotípicos, além de eliminar problemas relativos à reprodução. Portanto, o método de uso comercial na inversão sexual envolve a administração de andrógenos sintéticos para diferenciação das pós-larvas, embora este método tenha suas limitações (Curtis et al., 1991; Gale et al., 1999; Hunter & Donaldson, 1983; Mair & Little, 1991; Vera Cruz & Mair, 1994).

Populações de machos monossexos podem ser produzidas usando técnicas diretas ou indiretas. Estas técnicas são consideradas como o melhor e mais seguro método de obtenção de peixes machos com o uso de hormônios andrógenos determinantes do sexo masculino.

### **3.5 Inversão sexual utilizando hormônio na ração**

Inversão sexual é o processo de administração de esteróides masculinizantes incorporados na ração oferecida a pós-larvas recentemente eclodidas, para que o tecido gonadal indiferenciado de fêmeas genéticas se desenvolva em testículos, produzindo indivíduos que crescem e funcionam reprodutivamente como machos (Popma & Lovshin, 1996). O tratamento hormonal não altera o genótipo do peixe, mas direciona a expressão do fenótipo. Uma população tratada de peixes pode ser fenotipicamente monossexo; entretanto, geneticamente irá permanecer com a mesma determinação do momento da fertilização (Phelps & Popma, 2000).

Então, os andrógenos esteróides atuam como agente inversor do sexo pela função masculinizante nos indivíduos da população. Vários métodos de

administração destes esteróides são possíveis, incluindo injeção, alimentação e imersão das pós-larvas. Devido ao seu caráter não-invasivo, os dois últimos são os mais praticados na aquicultura (Donaldson & Devlin, 1996; Gale et al., 1999). O modo mais comum de administração é via suplementação dietética, com o andrógeno sendo primeiro dissolvido em álcool antes de ser misturado à ração (Beardmore et al, 2001; MacIntosh & Little, 1995).

Na inversão sexual para machos, mais de 16 andrógenos naturais ou sintéticos têm sido utilizados para inverter o sexo em aproximadamente 35 espécies diferentes, sendo o mais comum o  $17\alpha$ -metiltestosterona (MT) (Beardmore et al, 2001), largamente utilizado na aquicultura de tilápias (MacIntosh & Little, 1995).

Além de ser o hormônio mais empregado na inversão sexual, o MT também apresenta a vantagem de ser facilmente excretado logo após o período de tratamento hormonal (Beardmore et al., 2001; Curtis et al., 1991), embora a mibolona (Torrans et al., 1988), o  $17\alpha$ -metildiidrotestosterona (Gale et al., 1999), o acetato de trembolona (Galvez et al., 1995), a androstenediona (Guerrero III & Guerrero, 1997) e outros andrógenos tenham se mostrado eficientes.

O MT é mais potente e resistente ao metabolismo do que a testosterona para a masculinização de peixes (Yamamoto, 1969). A potência do MT é atribuída ao grupo metil, o qual o torna mais resistente à excreção (Donaldson et al., 1979). Quando fornecido via alimentação, é absorvido pelo intestino, metabolizado lentamente no fígado e depois “jogado” na corrente sanguínea, indo atuar nos tecidos-alvo. Diferentemente, a testosterona natural sofre uma rápida degradação em seu primeiro passo no fígado.

Esta técnica apresenta como principais vantagens ser de fácil emprego pelos produtores; gerar populações só de machos (monossexo); e inibir a reprodução desordenada, embora alguns estudos sugiram que animais

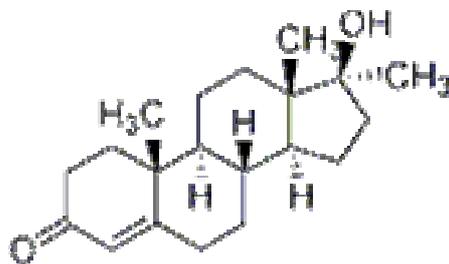
submetidos ao tratamento hormonal apresentem menor desempenho em relação a animais não-tratados (Boscolo et al., 2001).

Não há na literatura relatos que indiquem a possibilidade de tilápias invertidas voltarem ao seu sexo original, ou seja, tilápias XX ou ZW invertidas são machos funcionais e não produzem ovos. Outro ponto interessante é que, após a inversão, o macho invertido é funcional e tem a capacidade de se reproduzir com outras fêmeas, mesmo que seu genótipo seja fêmea e que apenas apresente aparência de macho.

### 3.5.1 Hormônio 17 $\alpha$ -metiltestosterona

O MT também pode ser chamado de 17 $\alpha$ -Methyl-4-androsten-17 $\beta$ -ol-3-one ou, então, de 17 $\beta$ -Hydroxy-17 $\alpha$ -methyl-4-androsten-3-one. Sua fórmula molecular é C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub>.

O MT, assim como os andrógenos, possui a estrutura básica composta por um núcleo ciclopentanoperihidrofenantreno – 3 anéis fenantrenos com 6 átomos de C completamente hidrogenados designados A, B e C, e um anel de 5 C designado D, um oxigênio na posição 3, uma dupla ligação na posição 4, e um radical metil no C<sub>17</sub> (Figura 1), o que aumenta a sua atividade biológica (quando comparado com a testosterona), faz com que seja conservada a sua ação androgênica e seja ativo quando fornecido por via oral (McEvoy, 1997).



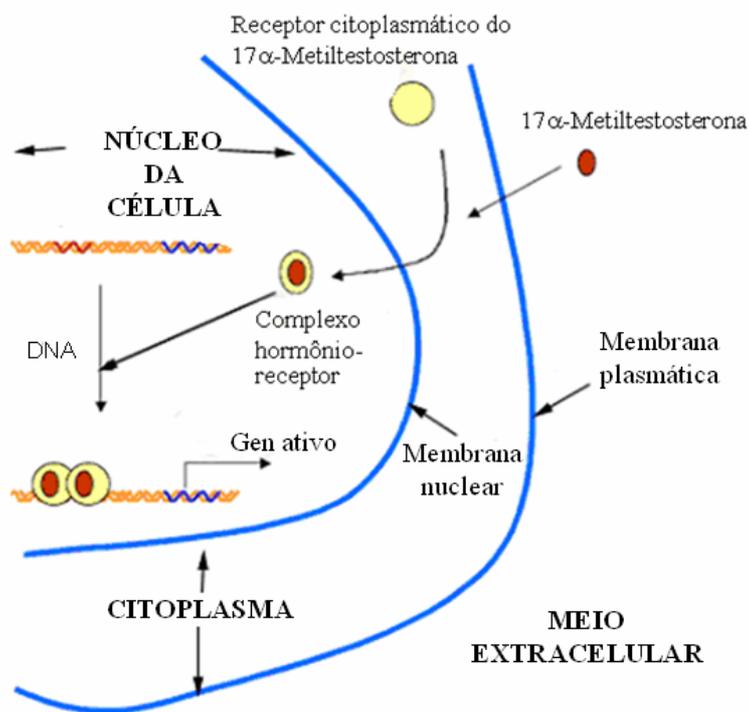
**FIGURA 1.** Molécula do 17 $\alpha$ -metiltestosterona

Os hormônios esteróides provocam uma variedade de respostas fisiológicas nos tecidos-alvo, tais como divisão celular, diferenciação tecidual, crescimento, síntese de proteínas específicas e contração da musculatura lisa. Na maioria dos tecidos são convertidos em um metabólito que suprime o LH nas fêmeas.

O mecanismo de ação dos anabolizantes se dá pela deposição de proteínas, que é resultado da diferença entre a síntese e a degradação proteica (Lone, 1997). Os agentes anabólicos são geralmente metabolizados e seus metabólitos, excretados ou levados para os tecidos numa forma livre, biologicamente não ativa. O fígado converte os agentes anabólicos em metabólitos menos ativos, e também em formas conjugadas, mais solúveis em água, que são secretadas na bile, sendo, então, excretados pelas fezes e urina. No entanto, uma parte dos metabólitos formados no fígado pode entrar no sistema circulatório e permanecer como resíduos em outros tecidos (Heitzman, 1983; Rico, 1983).

O MT atravessa facilmente a membrana celular, possuindo ação intracelular em tecidos sensíveis, pois se une aos receptores intracelulares específicos. A síntese destes receptores está determinada geneticamente no cromossomo X. O MT sofre a ação enzimática da 5  $\alpha$ -redutase, complexando-se a receptores citosólicos que se ativam e são transportados para o núcleo celular, unindo-se a um sítio receptor no DNA, dando início à transcrição dos genes da diferenciação sexual para macho. Eles aumentam a atividade da RNA polimerase e a formação de RNA mensageiros, resultando no aumento da síntese de proteínas celulares responsáveis finais pelas ações fisiofarmacológicas. Com isto, nas tilápias, as células indiferenciadas do tecido gonadal irão se diferenciar em células características de machos, formando os testículos (McEvoy, 1997).

A Figura 2 mostra a ação do MT no interior da célula alvo.



**FIGURA 2.** Modo de atuação do 17 $\alpha$ -metiltestosterona

### 3.5.2 Início e duração do tratamento hormonal para inversão sexual

Normalmente, o procedimento de inversão sexual utilizando hormônios deve ser iniciado antes que o tecido gonadal primário comece a se diferenciar em tecido ovariano, o que, em temperatura média de 24-28°C, ocorre a partir de 5 dias após a eclosão (um tamanho estimado da pós-larva de 11 a 14 mm) nas várias espécies de *Oreochromis*, estendendo-se por até três a quatro semanas (Popma & Lovshin, 1996). Um dos pioneiros na área de inversão sexual, Yamamoto (1969), determinou que a administração dos esteróides deveria iniciar em gônadas indiferenciadas e terminar após a sua diferenciação. Contudo,

estudos em diversas espécies têm mostrado que os tratamentos hormonais podem se limitar a curtos períodos de tempo, quando realizados na época de maior sensibilidade da espécie (Piferrer, 2001). Respostas diferenciadas foram observadas em diferentes estádios ontogênicos, tanto em metodologias empregando suplementação dietética quanto por imersão (Bombardelli e Hayashi, 2005; Piferrer & Donaldson, 1989).

Ao contrário de outras espécies de peixes, a pós-larva da tilápia possui trato digestivo completo e digestão enzimática funcional (Kubitza, 2000). A capacidade de se alimentar de ração nesta fase é muito importante no processo de inversão por hormônios. É durante este período que o protocolo de inversão sexual deve ser iniciado, adicionando-se o hormônio masculinizante à ração fornecida durante o 1º mês de vida.

O tratamento deve, segundo Kubitza (2000), durar de 21 a 28 dias, como também relatado por Green et al. (1997) em uma revisão sobre o tema. A duração do tratamento hormonal é determinada pelo consumo que, por sua vez, varia em função da temperatura da água e do estágio de desenvolvimento dos peixes (Pandian e Sheela, 1995; Popma e Lovshin, 1996).

A grande quantidade de alimento vivo (fitoplâncton e zooplâncton) disponível na água não prejudica o tratamento. Pelo contrário, a alimentação natural estimula a alimentação artificial das pós-larvas (Popma & Lovshin, 1996).

Fatores ambientais podem interferir na absorção do hormônio. A baixa qualidade da água, temperaturas baixas (menor de 22°C) e a exposição a doenças tendem a diminuir o apetite, o crescimento e a inversão sexual efetiva (Ezaz et al., 2004).

### **3.5.3 Dosagem do hormônio**

Normalmente, as pós-larvas de tilápia são alimentadas com ração contendo 60 mg de MT/kg de dieta durante um período de 28 dias (Popma & Lovshin, 1996). Entretanto, na literatura encontram-se valores de 30 a 60 mg de MT/kg de ração (Curtis et al., 1991; Green et al., 1997; Souza, 2001). De acordo com Mainardes-Pinto et al. (2000), a dosagem de 60 mg de MT/kg de ração é mais eficiente e resulta em maior número de machos, estando de acordo com Popma & Lovshin (1996). Porém, deve-se tomar cuidado com doses excessivas, pois elas podem levar a esterilidade ou feminilização paradoxal.

O MT possui uma boa absorção pela mucosa oral e do trato gastrintestinal, sendo que, geralmente, a sua concentração plasmática é atingida 2 horas após a administração oral, possuindo meia-vida entre 2,5 a 3,5 horas.

### **3.5.4 Arraçoamento**

Segundo Ponza et al. (1996), diversas variáveis podem influir no processo da inversão sexual por meio da utilização do MT, incluindo o ambiente de desenvolvimento das larvas, a dosagem e duração do tratamento hormonal, o tipo, a quantidade e a frequência da alimentação.

De acordo com Kubitzka (1999), as pós-larvas de peixes crescem rapidamente, portanto são bastante exigentes em nutrientes. Em condições naturais e em viveiros, os primeiros alimentos das pós-larvas de tilápias são o fitoplâncton e os copépodos e cladóceros. Estes organismos possuem alto valor energético e podem conter níveis de proteína na matéria seca variando de 20 a 60%, sendo, provavelmente, o motivo de os melhores resultados de crescimento de pós-larvas de tilápias terem sido obtidos com rações contendo entre 40 a 50% de proteína bruta. Meurer et al. (2005), após pesquisarem a exigência de proteína

digestível para a tilápia do Nilo durante o período de inversão sexual, recomendaram o nível de 45% de proteína digestível, pois a proteína tem papel importante na geração de energia, uma vez que os peixes não possuem muita facilidade em metabolizar carboidratos.

Para se obter um bom desempenho na inversão sexual, a ração contendo hormônio deve ser fornecida em 5 a 6 arraçoamentos diários (Kubitza, 1999; Popma & Lovshin, 1996). Vários autores, utilizando dietas com MT fornecidas duas a quatro vezes ao dia, obtiveram populações masculinas entre 95 e 99%, raramente 100% (Bocek et al., 1992; e Phelps et al., 1995). Entretanto, segundo Guerrero III & Guerrero (1997) e Sanches & Hayashi (2001), a frequência do arraçoamento durante o período do tratamento hormonal, quando é de cinco a seis vezes ao dia, resulta em maior quantidade de machos revertidos, tanto que Rani & Macintosh (1997) obtiveram 100% de machos arraçoando as pós-larvas seis vezes ao dia, durante o tratamento hormonal com MT.

A frequência de alimentação é importante no sentido de que ela afeta a absorção hormonal pelo alevino (Popma & Lovshin, 1996). Deve-se evitar sobras de ração excessivas nas unidades de inversão, pois elas podem aumentar a proliferação de microorganismos e aumentar a taxa de mortalidade. Anéis de alimentação flutuantes são úteis para evitar que a ração se espalhe, sendo muito usados quando a inversão é feita em hapas.

Na alimentação das larvas com ração contendo MT, que geralmente se inicia 5 dias após a eclosão, recomenda-se efetuar o arraçoamento inicial em 25% do peso total das pós-larvas por dia, diminuindo 5% por semana até o término do tratamento (Kubitza, 2000).

### **3.5.5 Preparo, conservação e armazenamento da ração com hormônio**

Através de manipulações moleculares pode-se alterar a estrutura das ligações bioquímicas da testosterona gerando diversas substâncias, com diferentes efeitos anabólicos e androgênicos. Para a formação do MT, a testosterona passa por processos químicos, sofrendo uma 17- $\alpha$ -alquilação com o objetivo de evitar sua degeneração e aumentar seu tempo de vida, dificultando sua degradação pelo fígado, quando ingerida oralmente (Piferrer & Donaldson, 1991).

O MT é um produto fotossensível, sendo que, em temperaturas acima de 30°C, ele perde sua estabilidade (McEvoy, 1997). Deve ser sempre armazenado em recipientes bem fechados, em lugares secos, frescos e ao abrigo da luz. Depois de ser fabricado, o pó geralmente tem validade máxima de 5 anos, quando bem armazenado.

O MT é praticamente insolúvel em água, ligeiramente solúvel em éter e facilmente solúvel em álcool. Geralmente, emprega-se álcool etílico como veículo, uma vez que este não prejudica as propriedades nutritivas da ração. Uma outra forma de se preparar MT para ser misturado na ração é sua diluição em DMSO (dimetilsulfóxido), que é um agente diluidor e potencializador.

Para confeccionar a ração para as pós-larvas que serão revertidas, o MT normalmente é diluído em meio litro de álcool etílico (96°GL) e borrifado na ração em pó. Durante a aspersão da solução, procede-se uma rigorosa homogeneização para que toda a ração receba igual quantidade de hormônio. Em seguida, a ração deve ser colocada para secagem por 24 horas em um ambiente escuro. Após este tempo, deve ser armazenado em recipientes fechados, em local protegido de luz, calor e umidade. Se possível, as rações devem ser armazenadas em sacos escuros protegidos da luz e sob refrigeração, recomendando-se retirar das embalagens apenas a quantidade a ser utilizada. Ocorre uma elevação

substancial na taxa de oxidação do MT na ração armazenada por períodos superiores a 30 dias (Popma & Lovshin, 1996).

Ao se confeccionar a ração, deve-se usar luvas e máscaras para não haver contato direto com o hormônio. Um dos problemas que podem ocorrer na preparação da ração é a falta de uniformidade na mistura do hormônio.

### **3.5.6 Taxa de inversão sexual**

Normalmente, utilizando uma dose de 40 a 60mg de MT/Kg de dieta, durante um período de 28 dias, é possível reverter de 90 a 99% das fêmeas em machos, dependendo do manejo e das condições ambientais, controlando, assim, a reprodução nos sistemas de criação (Green et al., 1997; Popma & Lovshin, 1996).

Quando há baixos índices de eficiência na inversão sexual por hormônios, geralmente eles se devem a emprego de lotes de larvas não homogêneos; uso de larvas com tamanho inicial acima do recomendado; má qualidade sanitária da larva; baixa qualidade e composição da ração; variação na fluabilidade, palatabilidade e granulometria da ração; dose de hormônio utilizada; preparo e acondicionamento da ração; variações no manejo alimentar e na qualidade da água. Desta forma, é importante que todos estes fatores sejam controlados antes de se iniciar o processo de inversão sexual nas tilápias, pois o sucesso não depende unicamente da utilização de hormônio (Popma & Lovshin, 1996; Varadaraj et al., 1994).

Além disso, apesar de simples, esta técnica é altamente influenciada por fatores ambientais e de manejo como temperatura, fotoperíodo, densidade de estocagem, taxa de alimentação, presença de alimento vivo na água, qualidade e concentração do hormônio e distribuição deste na ração, entre outros. Varadaraj et al. (1994) sugerem que o emprego da técnica de inversão sexual, com 100%

de sucesso, seria possível apenas se pudesse ser feito um controle rigoroso de todos os fatores que influenciam os resultados.

Outro fator que pode interferir na taxa de inversão sexual por hormônios é a linhagem de tilápia cultivada e a hierarquia (dominância) entre os peixes, pois geralmente os peixes maiores comem mais que os peixes menores. De acordo com estudos realizados para avaliar o desempenho de quatro linhagens diferentes de tilápia na fase de inversão sexual, elas apresentaram taxa de inversão sexual, de sobrevivência e de crescimento diferentes entre si (Tachibana et al., 2004).

### **3.5.7 Técnicas hormonais de inversão sexual utilizando hormônio na ração**

A produção de lotes monossexo macho pela técnica hormonal pode ser obtida de duas formas: DIRETA, em uma etapa, ou INDIRETA, em várias etapas. Tanto a técnica direta como a indireta para produção de progênie monossexo requerem métodos efetivos e repetitivos para a inversão hormonal do sexo.

#### **3.5.7.1 Técnica hormonal direta**

Na inversão sexual utilizando hormônios em uma etapa, altera-se apenas o sexo fisiológico dos peixes, ou seja, o sexo fenotípico, não ocorrendo alteração do sexo genético. As pós-larvas e alevinos de tilápia devem ser alimentados com ração contendo MT ou mantidos por certo tempo em água contendo concentrações diluídas desse hormônio (César et al., 2006).

O processo em uma única etapa é muito utilizado na produção comercial de tilápias, em que as pós-larvas são alimentadas com ração contendo de 40 a 60mg de MT/Kg de dieta, durante um período de 28 dias. Após este tempo, os

alevinos são alimentados com ração sem hormônio até atingirem o peso e tamanho desejados (Almeida-Toledo et al., 1996).

A técnica de inversão sexual em uma etapa só deve ser utilizada para fins de engorda e abate dos peixes, ou seja, para fins comerciais, pois no cruzamento de machos que sofreram inversão hormonal (XX) com fêmeas normais (XX), obtém-se uma F1 com 100% de fêmeas XX. Portanto, não se recomenda o uso de machos revertidos para a produção de pós-larvas, pois com um índice de 100% de fêmeas na F1, seria difícil conseguir atingir os 99% de inversão desejada (Popma & Lovshin, 1996).

### **3.5.7.2 Técnica hormonal indireta**

A inversão sexual utilizando hormônios em duas etapas é utilizada na obtenção de matrizes que sejam capazes de produzir linhagens monossexuais de machos. A nova técnica genética para gerar uma progênie toda de machos é através do cruzamento de super-machos que possuem o genótipo YY com fêmeas normais (XX), produzindo toda a progênie de machos (Mair & Little, 1991), descrita por Mair et al. (1995, 1997b) em *O. niloticus*. Após a obtenção do supermacho YY não seria mais necessária a utilização de hormônio na fase pós-larval.

Almeida-Toledo et al. (1996), descrevendo esta técnica, citam que nas tilápias do Nilo, para as quais o sistema de determinação do sexo é do tipo XY/XX, a primeira parte deste programa consta da alimentação das larvas sexualmente indiferenciadas com ração contendo estrógeno (17 $\beta$ -estradiol ou etinilestradiol) com a finalidade de produzir neofêmeas ou fêmeas revertidas (fêmeas que geneticamente são machos XY, mas que fenotipicamente e fisiologicamente são fêmeas). Ao fazer a sexagem, verifica-se que os peixes tratados se enquadram em três categorias: machos normais XY, neofêmeas

revertidas XY e fêmeas normais XX. Os machos e as fêmeas normais devem ser descartados, entretanto é difícil separar as fêmeas normais XX das neofêmeas XY examinando apenas as características sexuais externas, uma vez que as tilápias não possuem dimorfismo sexual.

Então, segue-se outra etapa, que consta da realização do teste de progênie para identificação das fêmeas revertidas XY e descarte das fêmeas normais XX. Isto é feito pelo cruzamento de cada fêmea com um macho normal, com o cultivo de cada família em tanques individuais, até que a descendência possa ser sexada.

As fêmeas que produzirem descendência constituída por 50% de fêmeas e 50% de machos são descartadas. As fêmeas que produzirem 75% de machos e 25% de fêmeas são neofêmeas XY. Dos 75% dos machos produzidos por esta fêmea, 50% são machos XY e 25% são os machos YY de interesse. Nesse ponto, os 25% de fêmeas formadas são descartadas e os 75% de machos (XY e YY) passarão por uma outra fase.

Como também não é possível separar machos normais XY de supermachos YY pelo exame das características sexuais externas, faz-se outro teste de progênie, agora para identificar os supermachos. Isto é feito novamente pelo cruzamento de cada macho com uma fêmea normal, com cultivo de cada família em tanques individuais, até que a descendência possa ser novamente sexada.

Os reprodutores que produzirem 50% machos e 50% fêmeas são descartados. Os machos que produzirem uma prole com 100% de machos serão os supermachos e deverão ser separados e mantidos para futuros cruzamentos, para a produção de populações monossexo macho (Almeida-Toledo et al, 1996).

Mair et al. (1995, 1997a) observaram que, através do teste de progênie, os machos YY possuem viabilidade e fertilidade equivalentes aos machos normais. Entretanto, Abucay et al. (1999) relataram que os machos com

genótipo YY são mais sensíveis a altas temperaturas do que os machos XY, levando-os a maior taxa de mortalidade.

Melard (1995) e Ovidio et al. (2002), estudando *Oreochromis aureus*, utilizaram pseudo-fêmeas (ZZ) para conseguir uma população apenas de machos (ZZ), pois, nesta espécie, os machos são homogaméticos (ZZ) e as fêmeas, heterogaméticas (ZW).

#### **3.5.7.2.1 Tilápias geneticamente machos**

Através da técnica de obtenção de supermachos pode-se fazer, ainda, o cruzamento dos supermachos YY com as fêmeas XY da segunda etapa. As pós-larvas obtidas deste cruzamento serão revertidas com etinilestradiol para se obter uma população feminina, constando de 50% de fêmeas XY e 50% de fêmeas YY. Todas as fêmeas deverão ser cruzadas com machos normais. As fêmeas YY deverão gerar progênie 100% macho, sendo então separadas. Estas fêmeas serão cruzadas com os machos YY, resultando em uma progênie 100% macho YY. Esta prole é denominada tilápias geneticamente machos (Genetically male tilapia - GMT) e consta de machos absolutamente normais, tendo grande vantagem no crescimento e homogeneidade do lote quando comparados com fêmeas revertidas, já que as últimas, mesmo com sucesso de inversão, permanecem com o genótipo XX, o que retarda o crescimento do animal.

As vantagens da criação de GMT sobre criações mistas ou revertidas sexualmente com hormônio incluem: não utilização de tratamento hormonal; maior viabilidade; melhor conversão alimentar; menor variação de tamanho; maior taxa de crescimento; e melhor rendimento na produção (Beardmore et al., 2001; Mair et al., 1997a, b).

Entretanto, a produção de supermachos (YY) e GMT é ainda uma prática nova, que requer pessoal especializado e alto custo de implantação. Além

destes fatores negativos, para a obtenção de um supermacho serão necessários de 4 a 5 anos para completar todas as fases do processo (Brunello, 2005).

### **3.5.8 Feminilização paradoxal**

Um problema potencial encontrado quando há desenvolvimento de novos métodos para masculinização induzida por esteróides é a feminilização paradoxal, a qual resulta na produção inadvertida de populações femininas ao invés de masculinas.

Os andrógenos têm sido mostrados interagindo com os receptores de estrógeno (Mori et al., 1998), direcionando os efeitos feminilizantes em alguns casos. Este fenômeno pode ser causado pela aromatização de andrógenos sintéticos para compostos estrogênicos feminilizantes e pode ser minimizado pela utilização de andrógenos não-aromatizáveis (Piferrer & Donaldson, 1991). De uma outra forma, os andrógenos também são os precursores imediatos do estrógeno, que quando em concentração elevada do seu substrato, pode estimular a síntese de aromatasas em maior quantidade.

Gale et al. (1999) demonstraram que andrógenos não-aromatizáveis (como, por exemplo, o  $17\alpha$ -metilhidrotestosterona) podem ser utilizados como uma alternativa hormonal para tratamentos por imersão na inversão sexual de tilápias do Nilo. Wassermann & Afonso (2003) citam que nos tratamentos com imersão simples o  $17\alpha$ -metilhidrotestosterona foi mais efetivo do que o MT e  $17\alpha$ -ethiniltestosterona. Mas quando se utiliza imersão dupla, o efeito masculinizante é diminuído e o MT se torna mais eficiente.

Algumas vezes, para prevenir esta feminilização, é adicionado um inibidor da aromatase junto com o andrógeno. De acordo com Afonso et al. (2001), a proporção de machos (invertidos pela administração dietética de MT) é significativamente superior nos grupos tratados com Fadrozole, um inibidor da

aromatase citocromo P450. Nakamura (1975) também observou este fenômeno em tilápias mossambicas (*Oreochromis mossambicus*).

Kwon et al. (2000) fizeram uma série de experimentos utilizando Fadrozole durante o período de diferenciação sexual. O tratamento durou 30 dias e foi iniciado após a reabsorção do saco vitelínico (7 - 37 dias após desova). Eles observaram que ocorreu um aumento na porcentagem de machos concomitante com o aumento da dose de Fadrozole, mas que a partir de 200 mg.kg(-1) não houve diferenças significativas. O estudo revelou que a 1ª semana foi o período mais sensível ao tratamento, concluindo que a atividade da aromatase é um fator chave na diferenciação sexual em tilápias.

### **3.5.9 Resíduos do 17 $\alpha$ -metiltestosterona**

Uma das preocupações na realização das tecnologias de inversão é que existem evidências de que a utilização de hormônios para a inversão sexual pode deixar resíduos tanto na carne dos peixes quanto na água de estocagem. Estes resíduos, por sua vez, podem produzir efeitos adversos na saúde de humanos, incluindo disfunção do fígado e adenocarcinoma hepático (Murad & Haynes, 1985).

O uso de andrógenos anabolizantes para a produção de peixes revertidos sexualmente é um assunto ainda alvo de muita polêmica no mundo. Um dos principais pontos de discussão é se os anabolizantes fazem ou não mal para a saúde do ser humano.

Em peixes, há vários trabalhos na literatura mostrando que, desde que corretamente usados para a inversão sexual, os hormônios não oferecem riscos para a saúde dos consumidores humanos. Um dos principais argumentos favoráveis ao uso de hormônios em peixes é de que a quantidade de anabolizantes ingerida por animal para a produção de linhagens monossexo é

muito pequena, inferior a 5 mg por animal. Outro argumento favorável ao uso é o de que a maior parte do hormônio ingerido é rapidamente eliminada (Abucay & Mair, 1997; Curtis et al., 1991).

Várias pesquisas têm demonstrado que o MT é rapidamente eliminado após o término do tratamento (Abucay & Mair, 1997; Curtis et al., 1991). A taxa de declínio do resíduo de MT nos peixes é muito rápida, e após 120 a 150 dias é possível contabilizar concentrações de MT iguais às concentrações do hormônio encontradas em peixes que não foram submetidos à inversão sexual. Sendo assim, um ser humano deveria comer de 500 a 2500 Kg de filé de tilápia diariamente para ingerir o equivalente a uma dose de MT usado em tratamentos médicos (Abucay & Mair, 1997).

Curtis et al. (1991), estudando as tilápias do Nilo, observaram que o MT foi rapidamente metabolizado e excretado poucos dias após o término do tratamento oral.

De acordo com Goudie et al. (1986), 90% do MT utilizado na inversão sexual de tilápias *O. aureus* foi eliminado 24 horas após a última alimentação contendo hormônio, e menos de 1% foi encontrado após 21 dias do término do tratamento. Outro argumento a favor é que, desde que seja utilizado segundo os protocolos indicados na literatura, o MT é detectado somente ao nível de partes por bilhão nos peixes revertidos com tamanho comercial, o que, em princípio, não ofereceria problemas para a saúde dos seres humanos.

Os argumentos contrários ao consumo de tilápias revertidas para a alimentação humana, em especial, dizem respeito aos riscos potenciais decorrentes do uso incorreto de anabolizantes sem controle de qualidade, ou aplicados em dosagens aleatórias e elevadas, resultando na produção de resíduos acima dos limites biologicamente aceitáveis (Contreras-Sanchez, 2001; Fitzpatrick et al., 1999;).

Um problema encontrado são os metabólitos ativos, resultantes da quebra do MT no fígado, excretados com a bile (Gomelsky et al., 1994). Abucay & Mair (1997) demonstraram que, nos sistemas de água fechados, os metabólitos ativos excretados pelos peixes tratados, ou ainda os restos de alimentos (rações) não ingeridos, podem levar à inversão em peixes de gaiolas adjacentes não tratadas pela utilização da mesma água de grupos tratados. Entretanto, este fenômeno não foi observado em sistemas de água corrente, nos quais os metabólitos são perdidos.

Poucos estudos têm sido realizados com objetivo de determinar a contaminação dos mananciais causada pela aplicação desta técnica. De acordo com Curtis et al. (1991), a bile é a maior rota de excreção dos metabólitos do MT. Recentes estudos detectaram o MT na água durante o tratamento de inversão, o qual eventualmente acumulava-se em sedimentos por 8 semanas (Contreras-Sanchez, 2001; Fitzpatrick et al., 1999;).

Já Contreras-Sánchez & Couturier (2002) não detectaram o MT na água durante todo o seu experimento, mas o encontraram no solo em pequena quantidade após 17 dias do início do experimento. Com o tempo, o MT foi degradado pela atividade bacteriana. Portanto, os autores concluíram que o MT não permanece na água após o tratamento, mas encontra-se depositado nos sedimentos.

Este fenômeno não é observado em sistemas de água corrente, nos quais os metabólitos são perdidos. Poucos estudos têm sido realizados com objetivo de determinar a contaminação dos mananciais causada pela aplicação desta técnica.

Na literatura não há evidências de que os níveis detectáveis de esteróides medidos representem um risco para a saúde e para o ambiente, já que se sabe que o MT é susceptível a quebra em altas temperaturas e sob intenso nível de luz natural, e que tanto fungos quanto bactérias podem metabolizar os esteróides

exógenos, resultando numa rápida quebra do MT (Abucay & Mair, 1997; Contreras-Sánchez & Couturier, 2002).

### **3.6 Inversão sexual por imersão**

Na literatura há vários trabalhos de inversão sexual utilizando a técnica de imersão das pós-larvas de tilápia em água contendo hormônio, mesmo não sendo a técnica mais usual (Bombardelli & Hayashi, 2005; Fitzpatrick et al., 1995; Gale et al., 1999; Torrans et al., 1988; Varadaraj & Pandian, 1987; Wassermann & Afonso, 2003). A técnica de banhos de imersão envolve exposições periódicas ou contínuas das larvas em solução contendo o agente alterador da diferenciação de sexo, sendo um método alternativo à suplementação dietética (Pandian & Sheela, 1995).

A imersão apresenta menor custo de aplicação e pode minimizar o efeito de variáveis potencialmente influentes no método de incorporação de esteróides na ração (Beardmore et al., 2001; Gale et al., 1999; Pandian & Sheela, 1995). Este método diminui o tempo de exposição do manipulador ao hormônio, sendo mais seguro para o ambiente por possibilitar o armazenamento do resíduo para posterior degradação (Gale et al., 1999) ou filtragem em carbono ativado (Specker & Chandlee, 2003).

De acordo com alguns autores, a técnica de imersão tem sido mais eficiente do que a administração oral em espécies de climas temperados (Baker et al., 1988; Beardmore et al., 2001). Entretanto, a técnica de imersão não é empregada comercialmente em razão da inexistência de protocolo efetivo para nível de intervenção, idade das larvas, densidade de estocagem e outros, precisando ainda ser otimizada antes de ser utilizada em tilápias para produção comercial, pois os resultados são inconstantes e o gasto de hormônio é superior

ao da técnica de adição à ração (Bombardelli & Hayashi, 2005; Wassermann & Afonso, 2003).

### **3.7 Inversão sexual pela temperatura**

Evidências do efeito do meio ambiente sobre a proporção sexual têm sido observadas em várias espécies de peixes. Muitos trabalhos sobre a determinação sexual em peixes ligada ao meio ambiente estão focalizados sobre os efeitos da temperatura (Hurley et al., 2004). Isto se deve ao fato de que os peixes são pecilotérmicos e o desenvolvimento embrionário ocorre no ambiente físico externo, em que alterações na temperatura podem ocorrer. Enquanto os peixes têm desenvolvido tolerância a estas mudanças de temperatura, há evidências de que estas variações podem exercer influência sobre a determinação e a diferenciação sexual (Abucay et al., 1999; Baroiller & D’Cotta, 2001; Borges et al., 2005; Desprez & Mélard, 1998). Em muitas espécies termosensitivas de peixes, a elevada temperatura durante o desenvolvimento embrionário aumenta a proporção de machos, mas altas temperaturas podem produzir uma proporção sexual com propensão a fêmeas em poucas espécies (Baroiller & D’Cotta, 2001).

Há duas possibilidades no desenvolvimento dos peixes em que a temperatura pode afetar na diferenciação sexual. Primeiro, um choque ambiental, tal como uma alta temperatura, pode romper o processo de desenvolvimento normal durante a diferenciação sexual, causando a mudança de machos para fêmeas e/ou de fêmeas para machos. Segundo, a alta temperatura pode ter um efeito sobre a estrutura e ação de hormônios ou atividade dos hormônios durante a diferenciação sexual (Hunter & Donaldson, 1983). De acordo com D’Cotta et al. (2001), a temperatura influencia o mecanismo de ação

da enzima aromatase, que catalisa a transformação de andrógenos em estrógenos.

Alguns estudos indicam que a temperatura elevada atua tanto reprimindo diretamente o gene da aromatase quanto indiretamente, através de um ou mais fatores de transcrição (Kitano et al., 1999). De acordo com D’Cotta et al. (2001), em machos de tilápia tratados com altas temperaturas também há um aumento na expressão do gene da 11 $\beta$ -hidroxilase, que é uma enzima chave para a produção de andrógenos 11-oxigenados.

As espécies sensíveis à temperatura parecem não responder a outros fatores do ambiente, tais como fotoperíodo, densidade ou salinidade, sugerindo certa especificidade para o tipo de sensibilidade aos fatores externos. Por exemplo, as tilápias são sensíveis a variações de temperatura, enquanto salinidade, densidade ou confinamento parecem não influenciar na proporção de sexos (Baroiller & D’Cotta, 2001).

Portanto, a temperatura pode ser utilizada como uma outra forma de inversão sexual, e a grande vantagem da utilização deste método para manipulação do sexo nos peixes utilizados no consumo alimentar é a não utilização de hormônios (Patiño, 1997).

Estudos recentes em tilápia do Nilo demonstraram que as altas temperaturas da água causam efeitos semelhantes aos provocados pelos hormônios esteróides na inversão sexual, com variações nas proporções macho:fêmea de acordo com a termosensibilidade das linhagens e das famílias dos peixes estudados (Abucay et al., 1999; Baras et al., 2001; Baroiller et al., 1995).

Abucay et al. (1999) observaram que quando alevinos fêmeas de tilápia do Nilo são expostos a altas temperaturas, produzem altas porcentagens de machos se comparados com grupos-controle à temperatura ambiente. Já baixas temperaturas e variações nos níveis de salinidade parecem não afetar a

proporção sexual. Estes dados confirmaram resultados obtidos para esta e outras espécies de tilápias em trabalhos anteriores (Baroiller et al., 1995, 1996a; Desprez & Mélard, 1998; Mair et al., 1989; Mbahinzireki & Dabrowski, 1997; Varadaraj et al., 1994).

Em *O. mossambicus*, grupos geneticamente fêmeas (derivados de cruzamentos entre machos XX revertidos e fêmeas normais XX) expostos a baixas temperaturas (19°C) resultaram em 89% de machos (Mair et al., 1989). Em estudos similares, com a mesma espécie exposta a várias temperaturas (20-32°C), também ocorreu uma masculinização com o aumento da temperatura (Wang & Tsai, 2000). Em *O. aureus* (os quais são do sistema ZW), altas temperaturas (32°C) induziram a diferenciação sexual para fêmeas em 20% da prole, comparados com 3% observado no controle (Mair et al, 1989). Entretanto, uma maior quantidade de machos (98% contra 63% no controle) tem sido observada em temperaturas mais altas (34°C) em outros experimentos com a mesma espécie, nos quais baixas temperaturas (21°C) não tiveram efeito sobre a determinação sexual, não afetando a proporção dos sexos (Desprez & Mélard, 1998).

De acordo com Patiño (1997), é possível que a resposta na diferenciação sexual, através de variações na temperatura, varie entre linhagens diferentes dentro da mesma espécie.

Borges et al. (2005), estudando tilápias do Nilo da linhagem chitralada a fim de avaliar o efeito da alta temperatura na proporção de sexos, encontraram que com 7 dias de exposição a altas temperaturas (35°C) ocorreu uma proporção maior de machos nas criações comparadas com o controle (27°C). Observaram, também, que não houve diferenças nas proporções de sexo entre os peixes mantidos a alta temperatura (35°C) por períodos de 7, 14, 21 e 28 dias, indicando ser possível adotar períodos mais curtos de exposição a alta temperatura (7 dias), uma vez que não diferiram quando comparados aos períodos de exposição mais

longos. Os autores concluíram, ainda, que o tratamento com temperatura alta é vantajoso devido à diminuição do período de manipulação dos animais e à redução de custos com o aquecimento da água, além de ser um método mais seguro por não utilizar esteróides.

Para que se obtenha sucesso na alteração da proporção sexual pela manipulação da temperatura, o tratamento deve ser aplicado antes do início da diferenciação sexual das gônadas, as quais parecem apresentar sensibilidade à alteração de temperatura no mesmo momento em que apresentam sensibilidade aos tratamentos hormonais (Baroiller & D'Cotta, 2001). Porém, Borges et al. (2005) observaram que tratamentos com temperaturas de 35°C causam redução nas taxas de sobrevivência quando comparados aos tratamentos com temperatura controle (27°C), apresentando taxas de 70-80%, confirmando os resultados obtidos por Baras et al. (2001).

### **3.8 Inversão sexual pela salinidade**

De acordo com Abucay et al. (1999), a salinidade não afeta a proporção de sexos nas tilápias *O. niloticus*. Esta ausência aparente de efeitos da salinidade sobre a proporção de sexos pode ser devida à falta de influência da salinidade no processo de desenvolvimento durante a diferenciação sexual.

As tilápias são peixes eurialínicos que podem viver e se desenvolver em uma grande variação de salinidade, desde ambientes de água doce até água salgada; entretanto, algumas espécies toleram melhor estas variações do que outras (Philippart & Ruwet, 1982). Das espécies mais cultivadas comercialmente, a tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* é mais dominante nas criações em água doce, mas não é muito tolerante a águas salinas. Já a *O. mossambicus* possui uma grande tolerância a altos gradientes salinos, existindo em muitas áreas de água salobra (Popper & Lichatowich, 1975).

Atualmente existem vários programas de pesquisa para desenvolver linhagens especificamente para água salobra, incluindo a avaliação de diferentes espécies e seleção de linhagens de origem híbrida tolerantes à salinidade (Tayamen et al., 2002). De acordo com Kamal & Mair (2005), os híbridos dos cruzamentos de *O. niloticus* X *O. mossambicus* demonstraram ótimo ganho de peso e biomassa, mostrando alta correlação significativa com a salinidade.

### **3.9 Inversão sexual pelo pH**

Não foram encontrados relatos de que o pH interfere na proporção de sexos em tilápias, mas Römer & Beisenherz (1996) observaram que a proporção de machos é mais alta em pH ácido (4,5) do que em valores mais neutros (6,5) nas espécies de *Apistogramma* e *Poecilia melanogaster*.

### **3.10 Hibridização**

Uma outra maneira de se formarem populações monossexo em tilápias é através da hibridização.

A hibridização, ou hibridação, é o cruzamento de indivíduos ou grupos geneticamente diferenciados, podendo envolver cruzamentos dentro de uma espécie (também conhecido como cruzamento linear ou cruzamento de raças) ou cruzamentos entre espécies diferentes. Esta técnica de procriação tem sido utilizada pelos aquicultores na esperança de produzirem organismos aquáticos com características desejáveis ou, então, para obter um aumento geral da performance. A hibridização também pode ser usada para transferir outras características desejadas (tais como resistência a doenças) de um grupo ou espécie para outra; para combinar características valiosas de duas espécies em um único grupo (tais como bom crescimento e qualidade da carne); produzir populações monossexo e produzir indivíduos estéreis (Bartley et al., 2001).

Tem-se discutido que as pesquisas em hibridização têm produzido pouco retorno frente aos investimentos realizados, pelo pequeno número relativo de peixes híbridos usados atualmente na aquacultura comercial (Mair, 2003). Entretanto, sabe-se que a hibridização tem ganhado novos incentivos, e tem sido muito utilizada para se conseguir um maior desempenho na aquacultura comercial.

Atualmente, uma das grandes aplicações da hibridização é a manipulação na proporção dos sexos para a formação de populações monossexo com maior desempenho. O fenômeno de criações de 100% machos, ou ultimamente híbridos 100% machos, tem sido muito observado em peixes-lua (sunfishes), mas o melhor exemplo são as tilápias. A hibridização entre algumas tilápias como *O. niloticus* e *O. aureus* resulta na produção de uma prole predominantemente de machos e reduz a reprodução natural não desejada. Neste cruzamento, o predomínio de machos ocorre por causa dos mecanismos de determinação sexual que são diferentes entre as duas espécies (Wohlfarth, 1994).

A produção de híbridos machos de tilápia tem como base a genética da determinação do sexo. Em *O. niloticus* e *O. mossambicus*, o sexo é determinado por cromossomos X e Y como em seres humanos. As fêmeas são XX (homogaméticas) e os machos são XY (heterogaméticos). Já em *O. aureus* e *O. hornorum*, os machos são ZZ (homogaméticos) e as fêmeas são ZW (heterogaméticas). Por exemplo, quando se cruza uma fêmea pura homogamética XX com macho puro homogamético ZZ, os híbridos seriam teoricamente heterogaméticos XZ e machos. Porém, nem todos os cruzamentos acabam resultando em uma progênie 100% masculina. Essa não obtenção de uma progênie 100% masculina pode se dar pelo genótipo contaminado das linhagens parentais, contaminação que pode ser causada por tilápias de outras espécies. Outro fator pode ser a presença de genes localizados nos cromossomos

autossômicos que controlam a manifestação de outros genes localizados nos cromossomos sexuais Y e Z (Brunello, 2005).

De acordo com Beardmore et al. (2001), os cruzamentos de maior êxito têm sido realizados com progenitores geneticamente puros de espécies distintas, quando se utiliza *O. niloticus* como fêmea e *O. hornorum* como macho, estando de acordo com Mair et al. (1997b). Cabe ressaltar que a pureza genética é fundamental para conseguir resultados positivos.

Falhas na manutenção da produção de híbridos de tilápias 100% macho provavelmente devem estar relacionadas ao descuido de guardar a prole segregada pelo cruzamento das famílias em tanques individuais, e na prevenção da introdução de híbridos dentro dos tanques das matrizes de linhagem pura (Beardmore et al., 2001).

Portanto, alguns dos impedimentos encontrados na utilização de híbridos monossexo são a dificuldade de manter a pureza dos progenitores e a escassa fecundidade, que restringe a formação de alevinos. Em algumas ocasiões, ocorre grande mortalidade nos tanques de cria com densidade alta, que reduzem, todavia, a produção dos alevinos, pois a manipulação na produção de alevinos híbridos não está ao alcance da maioria dos piscicultores individuais. Necessitam-se de unidades de produção em larga escala para a administração dos alevinos híbridos, com meios especiais para manter os reprodutores puros, alevinos de cria separados e controle de enfermidades (FAO, 1979).

Resumindo, as principais vantagens da hibridação, como forma alternativa na obtenção de populações masculinas de tilápias, são: elimina o uso de hormônios na alimentação das pós-larvas para obter uma população monossexo; o possível benefício do vigor híbrido na taxa de crescimento e produção; dependendo das espécies envolvidas, pode-se alcançar uma resistência e tolerância ao frio e a alta salinidade, e até mesmo maior taxa de

sobrevivência, resistência a doenças e maior facilidade na captura dos peixes; e formação de uma prole estéril ou com capacidade reprodutiva diminuída.

As principais desvantagens encontram-se na dificuldade de obtenção e manutenção de linhagens puras; na maior demanda de espaço para criação das linhagens puras e sua progênie; na reduzida produção de larvas na hibridação, devido à incompatibilidade comportamental das matrizes de diferentes espécies; e no fato de que nem todos os cruzamentos resultam em 100% de masculinidade em uma população.

### **3.11 Sexagem manual**

Uma outra forma de obter uma população monossexo é através da sexagem manual dos sexos ou “hand-sexing”. Ela é realizada pela inspeção visual da papila genital dos alevinos de tilápia.

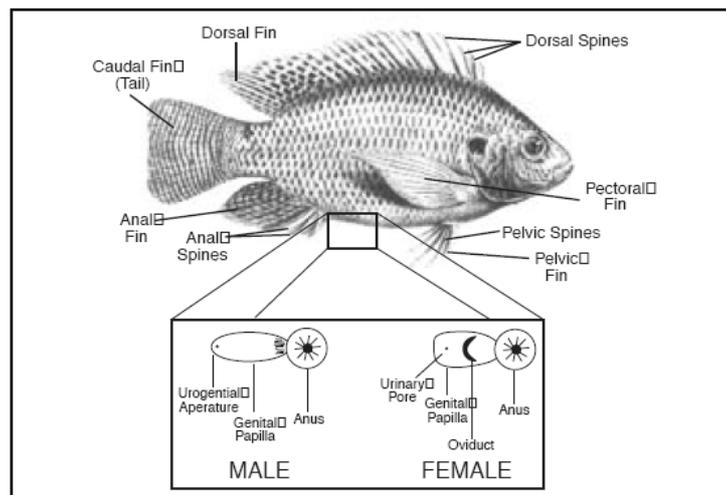
As tilápias mossambica são as mais facilmente sexadas, pois as papilas dos machos e das fêmeas são facilmente distinguíveis, mesmo em peixes de 15 a 25g. As tilápias do Nilo já são mais difíceis de serem separadas, e os alevinos devem estar entre 25 a 30g para se obter sucesso; mesmo assim, normalmente o resultado pode chegar a 95% de acurácia (Popma & Lovshin, 1996).

O sexo de um alevino de 25g pode ser examinado pela papila genital localizada imediatamente caudal ao ânus (Figura 3). Nos machos, a papila genital possui apenas uma abertura (o poro urinário do ureter), através da qual tanto o esperma quanto a urina passam. Nas fêmeas, os ovos saem através de um oviduto separado e somente a urina passa pelo poro urinário. Colocar uma gota de corante (azul de metileno) sobre a região genital ajuda a destacar a papila e sua abertura (Popma & Masser, 1999).

A vantagem desta técnica é a não utilização de esteróides e a não ocorrência de cruzamentos interespecíficos. Todavia, é uma técnica utilizada

somente em pequenas e médias escalas, e não em larga escala (comercial), porque cerca de metade da produção poderá ser de fêmeas, que são um produto de valor limitado.

Além disso, a sexagem visual é muito laboriosa, e trabalhadores muito experientes só conseguirão separar aproximadamente 2.000 alevinos por hora, entre os quais nem sempre 1.000 serão machos. Outra desvantagem é que a taxa de erros pode ser largamente variável, dependendo do nível de experiência do trabalhador e da precisão desse trabalho com o tamanho do peixe (Popma & Lovshin, 1996).



Fonte: Popma e Masser, 1999.

**FIGURA 3.** Esquema da papila genital da tilápia do Nilo.

## **4 MATERIAL E MÉTODO**

### **4.1 Local de execução do experimento**

O experimento foi realizado nas dependências da Estação de Piscicultura do Departamento de Zootecnia/UFLA, Campus Universitário, na cidade de Lavras, Minas Gerais, situada a 21,23° de latitude Sul e 45,00° de longitude Oeste, com temperatura média anual de 19,3°C, máxima de 27,8 e mínima de 13,5°C. O processamento histológico e as análises das lâminas foram realizados no Setor de Morfologia do Departamento de Medicina Veterinária/UFLA.

### **4.2 Animais e instalações**

Foram utilizadas, no experimento, pós-larvas de tilápia provenientes de reprodutores de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) da linhagem tailandesa, logo após a eclosão dos ovos, adquiridas junto à empresa GENEFORTE Agropecuária Ltda., localizada na Fazenda do Engenho, zona rural do município de Pedro Leopoldo, Minas Gerais.

Foram utilizadas, em todo o experimento, 16.400 pós-larvas de tilápia, sendo 4.100 para cada fase. Inicialmente; as pós-larvas foram alojadas em hapas com malha de 1,0 mm, dentro de quatro caixas d'água de fibra de vidro (500 litros).

As caixas d'água possuíam um sistema de aquecimento por resistência elétrica de aço inox de 500W ligado a um termostato (Figura 4), mantendo-se a temperatura constante de acordo com cada tratamento, e estavam localizadas dentro do laboratório.



**FIGURA 4.** Caixa d'água utilizada no experimento, dotada de sistema de aquecimento, aeração e abastecimento de água.

Durante o período do tratamento hormonal, as pós-larvas foram estocadas em bandejas plásticas. Todas as bandejas plásticas tinham o mesmo tamanho e cor, contendo o mesmo volume de água (cinco litros). As bandejas possuíam orifícios laterais cobertos com tela de malha 1 mm para permitir a troca de água com a caixa d'água (Figura.5). As bandejas receberam aeração constante por pedra microporosa ligadas a um aerador de aquário (60 litros), para evitar a hipóxia. Foram utilizados 4 aeradores, sendo 1 para cada cinco bandejas.



**FIGURA 5.** Bandejas plásticas utilizadas no experimento.

Após o período do tratamento hormonal, as pós-larvas foram transferidas para hapas com tela de 1 mm, localizados dentro de tanques de alvenaria (Figura 6) ao ar livre.



**FIGURA 6.** Hapas utilizados para alojar as pós-larvas de tilápia após o tratamento hormonal, localizados dentro de tanques de alvenaria.

### 4.3 Preparo da ração

As pós-larvas foram alimentadas com uma ração-base comercial (Quadro 1), que atendia às exigências nutricionais da espécie nesta fase, contendo 55% de proteína bruta.

**QUADRO 1.** Características nutricionais da ração comercial utilizada no experimento.

Níveis de Garantia *	AL55	Níveis de Garantia	AL55
Umidade (max.)	13%	Vitamina A (UI)	18000
Proteína Bruta (min.)	55%	Vitamina D3 (UI)	3600
Extrato Etéreo (min.)	10%	Vitamina E (UI)	270
Fibra (max.)	5,0%	Vitamina K (UI)	36
Cinzas (max.)	14%	Ácido Fólico (mg)	15
Cálcio (max.)	2%	Biotina (mg)	0,45
Fósforo (min.)	0,6%	Colina (mg)	720
Magnésio (mg)	0,4	Niacina (mg)	252
Ferro (mg)	75	Pantotenato de Cálcio (mg)	72
Cobre (mg)	10	Tiamina (mg)	29
Zinco (mg)	100	Riboflavina (mg)	36
Manganês (mg)	10	Piridoxina (mg)	36
Iodo (mg)	1	Vitamina B12 (mcg)	36
Selênio (mg)	0,15	Vitamina C (mg) **	500

\* Energia digestível: 5.130 EB/Kg de ração

\*\* Fonte de Vitamina C estável ao processo de extrusão.

As dosagens de MT (20, 40, 60 mg/kg de ração) foram diluídas em 500 mL de álcool etílico. Estas soluções foram misturadas separadamente a 1 kg de ração, permanecendo em temperatura ambiente por 24 horas, em um quarto escuro. Na hora da mistura do hormônio à ração, o manipulador usou luvas de látex para evitar o contato do hormônio com a pele.

Após secagem, as rações foram armazenadas em sacos plásticos pretos à temperatura ambiente e ao abrigo de luz e calor.

Para o arraçoamento das pós-larvas durante o tratamento hormonal, as rações foram pesadas diariamente em balança de precisão, sendo colocadas individualmente em pequenos sacos plásticos, separadamente para cada bandeja e para cada alimentação, dentro dos diversos tratamentos. Isto foi feito para se evitar ao máximo o contato do trabalhador com a ração contendo hormônio.

#### **4.4 Experimento**

O experimento foi dividido em quatro fases, sendo cada fase submetida a uma determinada temperatura (26°, 28°, 30° e 32°C). Em cada fase, as pós-larvas de tilápia foram subdivididas em 4 grupos, com diferentes doses do hormônio 17- $\alpha$  metiltestosterona (MT) na ração (0, 20, 40 e 60 mg de MT/kg de ração). Para cada grupo houve 5 repetições.

Portanto, para cada temperatura de estocagem, seis dias após a eclosão, as pós-larvas de tilápia foram contadas e separadas ao acaso em 20 lotes contendo 200 pós-larvas cada, e estocadas em bandejas plásticas (40 pós-larvas/l) para receberem os tratamentos. Inicialmente, antes de as pós-larvas serem transferidas para as bandejas, foi retirada uma amostra de 100 pós-larvas para a determinação do peso e do comprimento total médio, que foram, respectivamente, de  $0,008 \pm 0,002$  g e  $0,9 \pm 0,1$  cm. As bandejas plásticas ficaram acondicionadas dentro de caixas d'água de 500L.

A alimentação das pós-larvas com ração contendo MT teve início sete dias após eclosão das larvas, com duração de 28 dias. A ração foi oferecida 6 vezes ao dia (8h, 9h30, 11h30, 13h, 15h e 17h), na forma farelada. Na primeira

semana do tratamento, a ração foi oferecida em 30% do peso vivo; na segunda semana, 25%; na terceira semana, 20%; e na quarta semana, 15% do peso vivo.

Durante os tratamentos hormonais, nas caixas d'água de 500 litros houve troca de água duas vezes por dia, durante 1 hora, proporcionando uma taxa de renovação de 20% do volume total ao dia. As bandejas foram sifonadas duas vezes por dia (11h e 16h30), para retirada dos restos de ração e excretas, havendo uma taxa de renovação de aproximadamente 40% do volume total da água da bandeja. O fundo das caixas d'água foi sifonado uma vez por semana para retirada de eventuais restos de ração e sujeira, sendo retirados, em média, 30% do volume total de água da caixa.

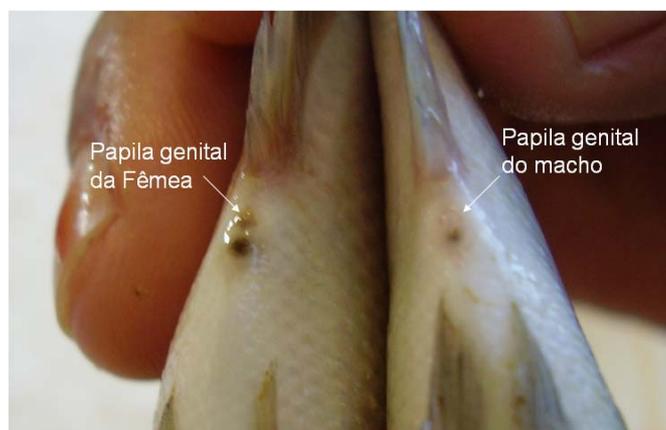
A temperatura da água foi aferida duas vezes por dia (9h e 16h), com um termômetro de mercúrio com escala de 1°C, dentro das bandejas e na caixa d'água. Para acompanhamento das características da água durante o experimento foram quantificados semanalmente, pela manhã, antes da limpeza das bandejas, o oxigênio dissolvido por meio de leitura direta em oxímetro e do pH da água por meio de leitura direta em peagâmetro.

Após os 28 dias de tratamento, foi retirada uma amostra de 20 alevinos por bandeja para mensuração do peso (mg) e do comprimento total (mm) final. Os alevinos restantes nas bandejas foram contados para saber a taxa de sobrevivência (%) em cada tratamento.

Em seguida, os alevinos foram transferidos para hapas ao ar livre e alimentados com ração sem hormônios 4 vezes ao dia (8:00, 11:00, 13:00 e 16:00), em quantidade correspondente a 10% do peso vivo. Os alevinos permaneceram nos hapas por mais 3 meses.

Após este período de tempo foi realizada a sexagem manual por meio do exame da papila genital para verificação da efetividade da inversão sexual, por um técnico experiente em sexagem (Figura 7).

Em seguida, 100 alevinos de cada tratamento (50 sexados como macho e 50 sexados como fêmea) foram dessensibilizados por choque térmico a aproximadamente 2°C e eutanasiados. Foram coletadas as gônadas dos alevinos para processamento histológico, comprovação da efetividade da sexagem manual e verificação da inversão sexual, com conseqüente determinação da proporção entre os sexos.



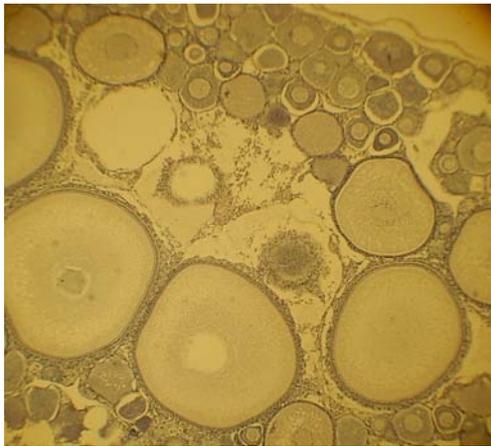
**FIGURA 7.** Papilas genitais de tilápias observadas na sexagem manual.

#### **4.5 Procedimento para estudo histológico**

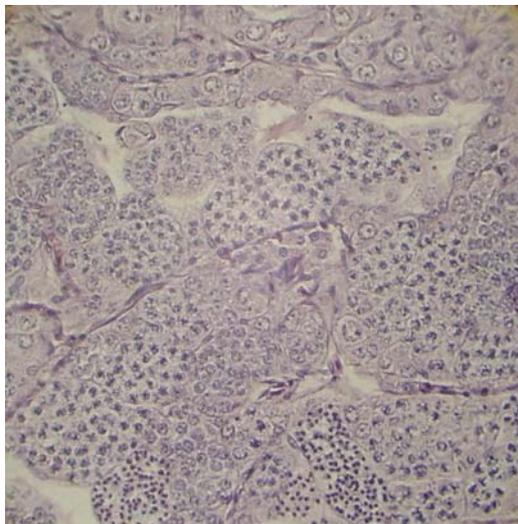
Os fragmentos das gônadas de tilápias coletados foram fixados em líquido de Bouin durante 24 horas, em temperatura ambiente. Após este tempo, eles foram transferidos e armazenados em álcool etílico 70% para posterior processamento.

Após técnicas rotineiras para inclusão em parafina foram obtidos cortes de 5 a 7 µm de espessura, os quais foram corados pela Hematoxilina-Eosina. Os cortes foram analisados sob microscopia óptica de campo claro, com a objetiva

de 40X, para a identificação do sexo, com base nas características histológicas de ovários e testículos de tilápias, conforme ilustradas nas Figuras 8 e 9.



**FIGURA 8.** Ovário de tilápia contendo ovócitos em diversos estádios de maturação. (400x)



**FIGURA 9.** Testículo de tilápia contendo células da linhagem germinativa em vários estádios de diferenciação. (400x)

#### 4.5 Delineamento experimental e análise estatística

O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 x 4, utilizando 4 temperaturas (26°, 28°, 30° e 32°) e 4 doses hormonais (0, 20, 40 e 60mg de MT/kg de ração). Para cada tratamento houve 5 repetições. Cada parcela constou de 200 pós-larvas.

Ao final do experimento, os resultados obtidos nas diferentes variáveis foram submetidos à análise de variância de acordo com o modelo:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + H_j + (TH)_{ij} + e_{ij}$$

Em que:

$Y_{ij}$  : observação dos peixes submetidos à temperatura  $i$ , na dose hormonal  $j$ ;

$\mu$  : média geral;

$T_i$  : efeito da temperatura  $i$ , sendo  $i = 1, 2, 3, 4$ ;

$H_j$  : efeito da dose hormonal  $j$ , sendo  $j = 1, 2, 3, 4$ ;

$(TH)_{ij}$  : interação da temperatura  $i$  na dose hormonal  $j$ ;

$e_{ij}$  : erro associado a cada observação.

As diferenças entre os tratamentos foram submetidas a análises de variância e de regressão. O software utilizado para a realização das análises estatísticas foi o Sisvar – Sistema de Análise de Variância (Ferreira, 2004).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Avaliação dos parâmetros físico-químicos da água

Não foram observadas diferenças significativas nos parâmetros físico-químicos da água durante o experimento. As médias de oxigênio dissolvido e pH foram de  $6,82 \pm 1,2$  mg/L e  $7,23 \pm 0,57$ , respectivamente, permanecendo dentro dos níveis recomendados para a espécie (Popma & Phelps, 1998).

A média das temperaturas nos tratamentos de 26, 28, 30 e 32°C foram, respectivamente, de  $25,9 \pm 0,4$ °C;  $27,9 \pm 0,3$ °C;  $30 \pm 0,1$ °C e  $32,2 \pm 0,6$ °C. A temperatura da água se manteve constante, sem variações bruscas, mesmo quando se realizou o fluxo de água nas caixas d'água, pois a água que entrava era pré-aquecida, sendo proveniente de uma caixa d'água externa equipada com uma resistência elétrica. Isto foi feito para que não ocorresse um choque térmico e não prejudicasse a manutenção da temperatura pré-estabelecida para o experimento.

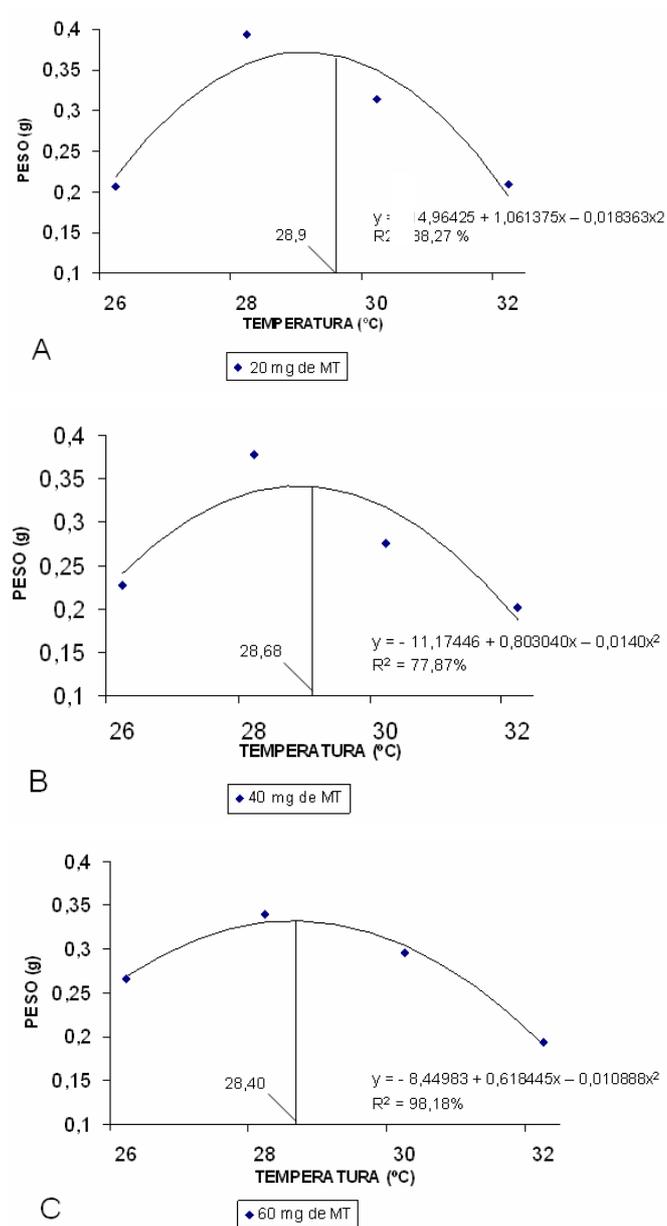
### 5.2 Avaliação do peso, tamanho e sobrevivência das pós-larvas após 28 dias de tratamento

Os valores médios do peso das pós-larvas após 28 dias de tratamento estão na Tabela 1. Houve interação significativa entre temperatura e dose hormonal para ganho de peso ( $p < 0,01$ ). Quando foi feita análise do desdobramento da temperatura dentro de cada dose, observou-se que houve um efeito quadrático ( $p < 0,01$ ) da temperatura dentro das doses 20, 40 e 60 mg (Figura 10), enquanto na dose 0 não houve diferença significativa. Quando realizada a análise do desdobramento da dose dentro das temperaturas, apenas a temperatura de 28°C mostrou interação significativa (Figura 11).

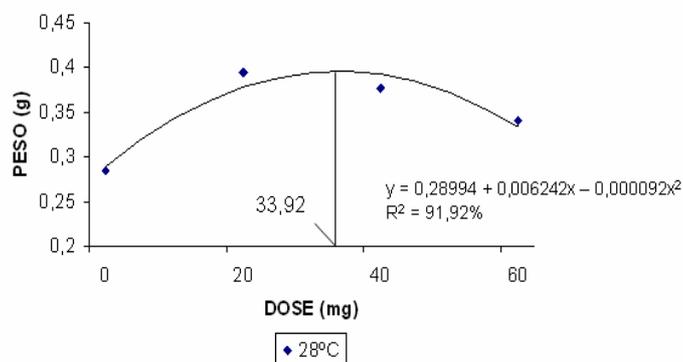
**TABELA 1.** Peso (g) das pós-larvas de tilápia, após 28 dias de tratamento, criadas em tanques com diferentes temperaturas, alimentadas com ração contendo diferentes doses de hormônio.

Dose (mg)	Temperatura (°C)				Média	p
	26	28 <sup>1</sup>	30	32		
0	0,278	0,285	0,261	0,237	0,265	0,4045
20 <sup>1</sup>	0,206	0,394	0,315	0,209	0,281	0,000
40 <sup>1</sup>	0,226	0,377	0,274	0,201	0,270	0,000
60 <sup>1</sup>	0,266	0,340	0,295	0,195	0,274	0,000
Média	0,244	0,349	0,286	0,211		
P	0,0731	0,0031	0,3151	0,5331		
cv (%)	17,65					

<sup>1</sup> Regressão quadrática (p<0,01)



**FIGURA 10.** Peso (g) médio das pós-larvas de tilápia após 28 dias de tratamento, em função da temperatura de estocagem, alimentadas com ração contendo A) 20 mg, B) 40 mg, e C) 60 mg de 17 $\alpha$ -metiltestosterona/kg de ração.



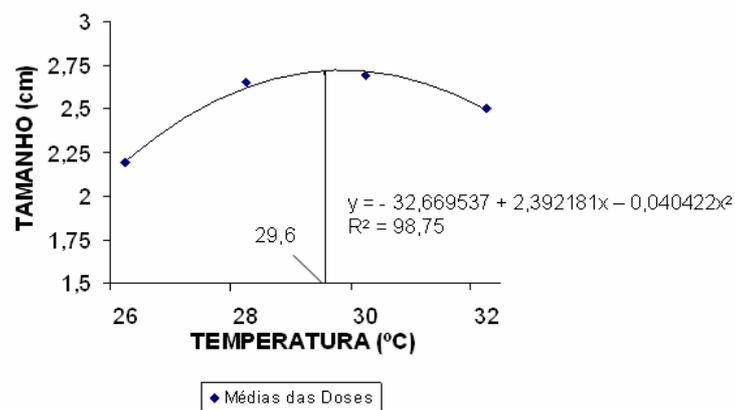
**FIGURA 11.** Peso (g) médio das pós-larvas de tilápia após 28 dias de tratamento, criadas na temperatura de 28°C, alimentadas com ração contendo diferentes doses de 17 $\alpha$ -metiltestosterona/kg de ração.

Os valores médios de tamanho das pós-larvas após 28 dias de tratamento estão representados na Tabela 2. Não houve interação significativa entre a temperatura e as dosagens hormonais utilizadas. Entretanto, houve um efeito quadrático ( $p < 0,01$ ) da temperatura, independentemente da dose hormonal utilizada (Figura 12).

**TABELA 2.** Tamanho (cm) das pós-larvas de tilápia, após 28 dias de tratamento, criadas em tanques com diferentes temperaturas, alimentadas com ração contendo diferentes doses de hormônio.

Dose (mg)	Temperatura (°C)				Média
	26	28	30	32	
0	2,246	2,482	2,624	2,586	2,485
20	2,171	2,784	2,754	2,488	2,549
40	2,108	2,664	2,650	2,458	2,470
60	2,244	2,670	2,720	2,460	2,524
Média <sup>1</sup>	2,192	2,650	2,687	2,498	
cv (%)	7,15				

<sup>1</sup> Regressão quadrática ( $p < 0,01$ )



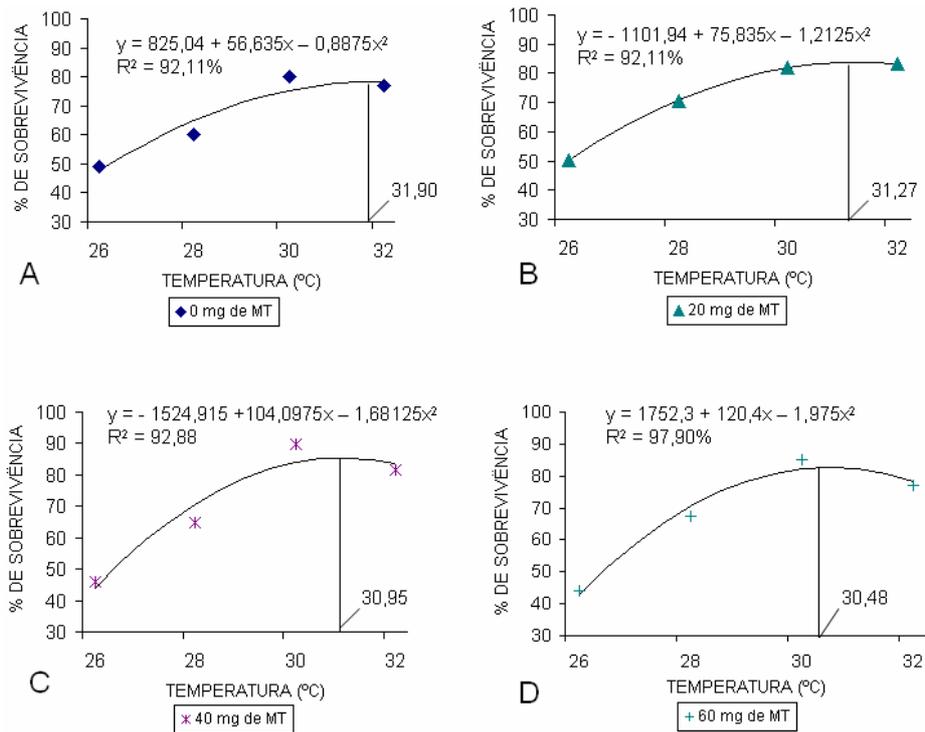
**FIGURA 12.** Tamanho (cm) médio das pós-larvas de tilápia após 28 dias de tratamento, criadas em diferentes temperaturas de estocagem, independentemente da dose de  $17\alpha$ -metiltestosterona na ração.

Os valores de sobrevivência (%) das pós-larvas após 28 dias de tratamento estão representados na Tabela 3. Houve interação significativa da temperatura nas dosagens hormonais utilizadas ( $p < 0,01$ ) (Figura 13), mas não houve diferença significativa entre a dose de hormônio utilizada dentro das temperaturas sobre a taxa de sobrevivência. Entretanto, houve um efeito quadrático quando se observou a média de sobrevivência em relação à dosagem de MT, independentemente da temperatura de criação (Figura 14).

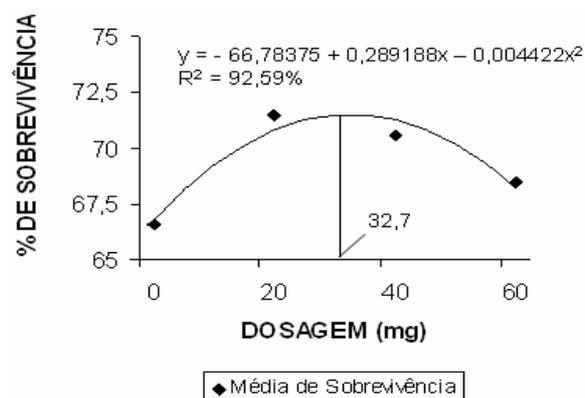
**TABELA 3.** Sobrevivência (%) das pós-larvas de tilápia, após 28 dias de tratamento, criadas em tanques com diferentes temperaturas, alimentadas com ração contendo diferentes doses de hormônio.

Dose (mg)	Temperatura (°C)				Média <sup>1</sup>	p
	26	28	30	32		
0 <sup>1</sup>	49,1	60,2	80,0	76,9	66,6	0,000
20 <sup>1</sup>	50,2	70,6	82,1	83,1	71,5	0,000
40 <sup>1</sup>	46,1	64,7	89,9	81,6	70,6	0,000
60 <sup>1</sup>	44,0	67,5	85,2	77,1	68,5	0,000
Média	47,4	65,8	84,3	79,7		
p	0,3398	0,1570	0,0570	0,2464	0,010	
Cv (%)	8,56					

<sup>1</sup> Regressão quadrática (p<0,01)



**FIGURA 13.** Taxa de sobrevivência (%) das pós-larvas de tilápia após 28 dias de tratamento em função da temperatura de estocagem, alimentadas com ração contendo A) 0 mg, B) 20 mg, C) 40 mg e D) 60 mg de  $17\alpha$ -metiltestosterona/kg de ração.



**FIGURA 14.** Média de sobrevivência (%) das pós-larvas de tilápia após 28 dias de tratamento em função da dosagem de  $17\alpha$ -metiltestosterona incorporada na ração, independentemente da temperatura da água de estocagem.

De acordo com Bocek et al. (1992), o crescimento e a taxa de sobrevivência das pós-larvas durante o tratamento hormonal dependem de vários fatores, entre eles alimentação, temperatura e condições ambientais.

No presente experimento, houve diferença significativa quanto ao ganho de peso, tamanho e sobrevivência de acordo com a temperatura da água das bandejas. Entretanto, para estes parâmetros, não houve diferença em relação à dose de hormônio utilizada nos tratamentos, corroborando os resultados obtidos por Guerrero III & Guerrero (1997) e Mainardes-Pinto et al. (2000), os quais observaram que o MT tem pouco ou nenhum efeito sobre o crescimento e a sobrevivência de tilápia do Nilo durante o tratamento hormonal. Vera Cruz & Mair (1994) também não encontraram efeito significativo sobre o crescimento e sobrevivência de *O. niloticus* durante o período de tratamento com MT na dose de 40 mg/kg de ração. De acordo com Bombardelli & Hayashi (2005), a inexistência de diferença significativa para peso, comprimento e sobrevivência

entre os tratamentos pode ser devida ao andrógeno ser rapidamente metabolizado e excretado, não causando efeito anabólico.

Guerrero III & Guerrero (1997) citam que baixos níveis de andrógenos aparentemente podem ter um efeito positivo sobre o crescimento e a sobrevivência de pós-larvas de tilápias durante o período de tratamento, quando comparados com altos níveis de hormônio. Este comportamento também foi observado no experimento, pois houve um declínio do peso e da sobrevivência a partir da dose de 40 mg de MT.

Em relação à temperatura, Popma & Lovshin (1996) afirmam que as tilápias preferem águas com temperatura entre 29 e 31°C para um bom crescimento. Isto foi corroborado por Kubitzka (1999), segundo o qual, no cultivo de tilápias, a zona de conforto térmico está entre 28 a 32°C. Baras et al. (2001) também constataram, na sua pesquisa sobre os efeitos da temperatura na criação de tilápias, que a faixa de temperatura para melhor performance de sobrevivência e crescimento está entre 27 e 35°C, sendo 29,7°C a temperatura ideal. Esses autores observaram, ainda, que em temperaturas acima de 35°C ocorreu um decréscimo significativo na sobrevivência e crescimento dos peixes, sendo que, em quase todos os tratamentos em que foi utilizada a temperatura de 39°C (considerada por alguns pesquisadores como ideal para masculinização), houve 100% de mortalidade em 3 semanas, fato devido a esta temperatura ser considerada, em tilápias, a temperatura (38,5 a 39°C) em que se inicia a mortalidade para tilápias juvenis.

Já Borges et al. (2005), estudando o efeito da temperatura na proporção de sexos de tilápia chitralada, observaram que com o aumento da temperatura, as taxas de sobrevivência relacionaram-se diretamente com a ocorrência de canibalismo, significativamente maior a 35°C.

Os dados obtidos na presente pesquisa estão de acordo com os observados por estes autores, pois se registrou que a temperatura ideal para sobrevivência, ganho de peso e tamanho está entre 28,5 e 31°C, e que acima deste ponto começam a decrescer tanto a sobrevivência quanto o crescimento dos alevinos.

Vera Cruz & Mair (1994) citam que a mortalidade observada durante a fase de tratamento hormonal pode ser explicada pelo estabelecimento de hierarquia na alimentação entre os peixes, em que indivíduos dominantes dentro da população podem consumir mais alimento e crescer mais rapidamente, deixando menos alimento para os indivíduos submissos, que apresentam menos crescimento e tornam-se, conseqüentemente, vulneráveis ao canibalismo e à morte por inanição.

No presente trabalho, a maior taxa de mortalidade foi observada nos tratamentos com temperatura de 26 e 28°C. Durante o experimento, observou-se que o tamanho das pós-larvas não foi muito uniforme nestas temperaturas, sendo que, nas temperaturas de 30 e 32°C, as pós-larvas apresentaram tamanhos homogêneos. Sugere-se que esta diferença de tamanho entre os peixes possa ter influenciado na alta taxa de mortalidade, através do estabelecimento da hierarquia na alimentação, já que a ração era a única fonte de alimento. Por outro lado, nas temperaturas de 30 e 32°C, como o tamanho das pós-larvas era mais homogêneo, a taxa de sobrevivência ficou em torno de 79 a 85%, estando de acordo com Popma & Lovshin (1996), que afirmam que normalmente a taxa de sobrevivência das pós-larvas gira em torno de 70 a 80% no processo de inversão.

Outra possível hipótese para a mortalidade em todos os tratamentos poderia estar na forma de criação. De acordo com Phelps & Popma (2000), quando a inversão ocorre em tanques “indoor”, a mortalidade de peixes é maior do que em tanques ao ar livre. Popma (1987) relatou uma taxa de apenas 40% de

sobrevivência quando *O. niloticus* foi submetida à inversão sexual em tanques “indoor”.

### 5.3 Avaliação da taxa de inversão sexual das pós-larvas de tilápia

Os valores percentuais de machos obtidos através da sexagem manual e da análise histológica ao final de quatro meses, nos diferentes tratamentos, estão na Tabela 4. A relação obtida entre estes dois métodos (% de acerto da sexagem manual em relação à análise histológica) está representada na Tabela 5.

Não houve interação significativa da temperatura nas dosagens hormonais utilizadas ( $p < 0,01$ ) em relação à proporção de machos avaliados histologicamente. Quando se utilizou o valor da média final de machos obtidos nas respectivas doses, observou-se uma diferença significativa ( $p < 0,01$ ), ocorrendo um efeito quadrático (Figura 15).

**TABELA 4.** Proporção (%) de machos de tilápia identificados na sexagem visual (S) e na análise histológica (L), ao final do experimento.

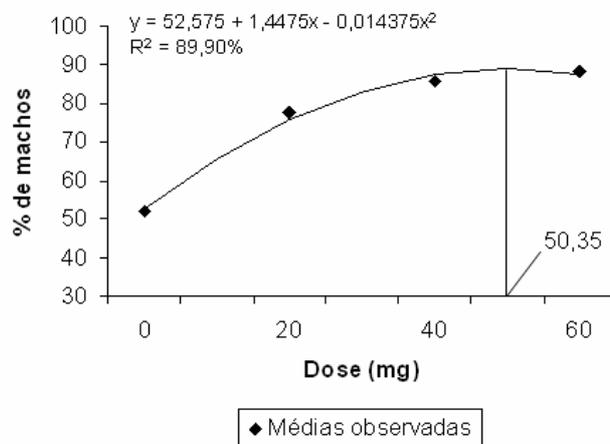
Dose (mg)	Temperatura (°C)								Média	
	26		28		30		32			
	S	L	S	L	S	L	S	L	S	L <sup>1</sup>
0	51	55	39	51	40	45	54	57	46,0	52,0
20	58	77	75	80	63	74	70	79	66,5	77,5
40	85	91	72	78	87	92	46	82	72,5	85,8
60	78	91	73	81	66	87	74	94	72,8	88,3
Média	68,0	78,5	64,8	72,5	64,0	74,5	61,0	78,0		
cv (%)	L = 6,831									

<sup>1</sup> Regressão quadrática ( $p < 0,01$ )

**TABELA 5.** Porcentagem (%) da relação da sexagem manual de alevinos de tilápia com a análise histológica das gônadas, ao final do experimento.

Dose (mg)	Temperatura (°C)								Média	
	26		28		30		32			
	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
0	93	80	76	87	89	94	95	100	88	90
20	75	100	94	95	85	58	89	24	86	69
40	93	67	92	86	95	25	56	89	84	67
60	86	44	90	63	76	77	79	17	83	50
Média	87	73	88	83	86	64	80	58		

M = machos F = fêmeas



**FIGURA 15.** Média da porcentagem de machos de tilápia obtidos ao final do experimento em função das doses hormonais utilizadas, independentemente da temperatura de estocagem.

De acordo com Mainardes-Pinto et al. (2000), a identificação de machos e fêmeas por sexagem manual é confiável. Em sua pesquisa, comparando diferentes doses e diferentes rações para tilápias do Nilo, os autores observaram que os resultados em termos de frequência entre sexagem e análise histológica foram semelhantes, sendo observados, nas duas diferentes técnicas, 98% de machos na dosagem de 60 mg de MT. Este resultado foi obtido em tilápias pesando, em média, 40g após 6 meses de cultivo, corroborando Popma & Lovshin (1996) quando afirmam que para se obter sucesso na sexagem manual, as tilápias do Nilo devem estar pesando entre 25 a 30g.

No presente trabalho não foi observada a mesma frequência entre as duas técnicas, pois quando foi realizada a análise histológica, alguns alevinos sexados como machos eram fêmeas, e alguns alevinos sexados como fêmeas eram machos. A média geral da proporção de relação entre estes dois métodos foi de 77%. Esta baixa relação pode ter ocorrido porque os alevinos sexados se encontravam com peso em torno de 8 a 30 gramas. Possivelmente isso fez com que os resultados entre sexagem visual e análise histológica não fossem semelhantes em termos de frequência, mesmo o processo sendo realizado por uma pessoa muito experiente.

A maior proporção de acerto (89%) observada neste experimento ocorreu nos peixes que não receberam hormônio. Este resultado já era esperado, pois no momento da sexagem manual, eles foram os mais facilmente identificados. Em contrapartida, os peixes alimentados com 60 mg de MT foram os que apresentaram maior dificuldade de identificação, sendo também os que obtiveram a menor relação (62%) entre as duas técnicas. Isto sugere que o tratamento hormonal pode prejudicar o sucesso da sexagem visual, fazendo com que os machos revertidos sejam mais difíceis de serem identificados.

Da mesma forma, Phelps et al. (1993), pesquisando a relação entre a morfologia externa da papila genital e as gônadas de tilápias tratadas com MT, também não obtiveram uma boa correlação entre as duas técnicas. No seu experimento, apenas 60% dos peixes examinados possuíam gônadas que correspondiam ao sexo sugerido pela papila.

Estes resultados sugerem que o uso apenas da forma da papila genital para determinar o sexo pode corromper a avaliação do sucesso do tratamento de tilápias com andrógenos para produzir populações de machos.

Para se obter um bom desempenho na inversão sexual no presente estudo, a ração comercial utilizada continha 55% de proteína, os minerais e as vitaminas adequados e necessários a esta fase de crescimento, e foi oferecida com uma frequência de seis arraçoamentos por dia. Como ocorreu a troca de grande parte da água das bandejas plásticas (duas vezes diariamente), não houve tempo para a formação de plâncton, que contribui de forma significativa na alimentação das tilápias. De acordo com Kubitz (1999), o excesso de renovação de água é o principal fator responsável pelo insucesso na formação de plâncton. Com isso, a ração ofertada foi a única fonte de alimento das pós-larvas, o que pode ter contribuído para o baixo índice de inversão sexual do nosso experimento, quando comparado a outros trabalhos.

Em média, obteve-se uma taxa de 84% de inversão sexual nos tratamentos que utilizaram hormônio, sendo que, na dose de 60mg, a proporção de machos nos tratamentos foi de 88%, em média, chegando a 94% na temperatura de 32°C, corroborando vários autores que afirmam que a dose de 60mg é ideal no processo de inversão sexual (Curtis et al., 1991; Green et al., 1997; Kubitz 1999; Mainardes-Pinto et al., 2000; Popma & Lovshin, 1996).

Quando se observa a taxa de inversão sexual nos grupos que não receberam hormônio, constata-se que não houve diferença significativa, ficando

a proporção, em média, de quase 1:1. Isto demonstra que as temperaturas utilizadas nos tratamentos não foram suficientes para induzir a inversão sexual, pois não ocorreu alteração na proporção de machos nestes grupos.

Estes resultados corroboram os do experimento de Baras et al. (2001), os quais observaram que na faixa de temperatura entre 20 e 33°C ocorreu a mesma proporção de machos (42 a 60%) que na criação em temperatura de 27°C, não havendo diferenças significativas, e estão de acordo com outros autores, que afirmam que baixas temperaturas não afetam a proporção sexual (Abucay et al., 1999; Baroiller et al., 1996a,b,c; Desprez & Mélard, 1998).

Em contrapartida, Wang & Tsai (2000) observaram um aumento na proporção de machos quando pós-larvas de 5 dias foram expostas a temperaturas de 28 e 32°C, mas que a proporção de deformidades nas larvas também aumentou significativamente com o aumento da temperatura. Isto não foi observado no presente trabalho.

De acordo com vários autores, a temperatura para começar a ocorrer alteração na proporção sexual é de 35°C, independentemente do uso de hormônio. Tessema et al. (2006), ao pesquisarem o efeito da temperatura sobre a proporção de sexos, encontraram que a temperatura de 36° e 38°C aumentou a proporção de machos (78%) quando comparada ao controle (1:1), mas que na temperatura de 38°C a taxa de mortalidade foi maior. Estes autores observaram, ainda, que há diferença na resposta à temperatura de acordo com a sensibilidade da população. Por outro lado, Baroiller et al. (1996b, c) citam que uma forte influência no sexo fenotípico e uma masculinização significativa somente são obtidas em temperaturas em torno de 37°C; porém, de acordo com Abucay et al. (1999), esta temperatura pode induzir a feminilização de alguns machos genotípicos. De acordo com Baras et al. (2001), esta feminilização pode ser parte de um processo de conservação da espécie.

O índice de inversão sexual obtido neste estudo se deu apenas pela ação do hormônio utilizado. Mesmo assim, obteve-se uma boa taxa de inversão sexual. Normalmente a taxa de inversão é de 95%, mas observa-se também uma taxa de 80 a 90%, pois quando ocorre o rápido crescimento, combinado pela alta temperatura com boa qualidade da ração, a época de susceptibilidade da inversão pode passar mais rápido.

Em relação às doses de hormônio utilizadas, a resposta da taxa de inversão sexual dos peixes se deu de maneira semelhante em todas as temperaturas utilizadas, sendo que, na dosagem de 40 e de 60 mg de MT, foram obtidos resultados semelhantes (86 e 88%, respectivamente). A dose de hormônio encontrada como a melhor para a inversão sexual é de 50 mg, mas a proporção de machos nesta dosagem (89%) também estaria muito próxima das obtidas nas doses de 40 e 60 mg.

Ainda, quando se analisam os resultados obtidos pela dose de 40 mg no processo de inversão sexual, observa-se que o melhor resultado ocorreu na temperatura de 30°. Coincidentemente, 30°C estão dentro da faixa considerada como a de melhor performance dos peixes em termos de crescimento e sobrevivência.

Portanto, se o produtor elevar a temperatura de cultivo (30°C), aliada à utilização de uma menor dose de hormônio (40 mg) no processo de inversão sexual, serão obtidas uma boa taxa de inversão e a uma menor taxa de mortalidade em seus tanques, resultando em maiores lucros.

Além disso, a utilização de uma dose hormonal mais baixa diminuiria a contaminação e o acúmulo de resíduos nos tecidos dos peixes tratados e a sua conseqüente liberação no meio ambiente, diminuindo, assim, o impacto ambiental e os riscos que estes hormônios podem causar à saúde humana.

## CONCLUSÕES

Sob as condições em que este experimento foi realizado, pode-se concluir que:

1. O aumento da temperatura da água de cultivo de pós-larvas de tilápias do Nilo influencia na sua performance, ocorrendo um aumento no ganho de peso, tamanho e sobrevivência.
2. A temperatura da água para o melhor desempenho de crescimento e taxa de sobrevivência das tilápias em processo de inversão sexual é de 30°C.
3. A dose de 40 mg de MT/kg de ração é suficiente para a obtenção de populações monossexo.
4. Para tilápias do Nilo menores de 25 g, a técnica de sexagem manual não é totalmente eficaz, podendo alterar a avaliação do sucesso do tratamento com andrógenos.
5. Na temperatura da água entre 26 a 32°, só ocorre a inversão sexual com aplicação hormonal.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUCAY, J. S.; MAIR, G. C. Hormonal sex reversal of tilapias: Implications of hormone treatment applications in close water systems. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 28, n. 11, p. 841-845, Nov. 1997.

ABUCAY, J. S.; MAIR, G. C.; SKIBINSKI, D. O. F.; BEARDMORE, J. A. Environmental sex determination: the effect of temperature and salinity on sex ratio in *Oreochromis niloticus* L. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 173, n. 1/4, p. 219-234, Mar. 1999.

AFONSO L. O.; WASSERMANN, G. J.; TEREZINHA DE OLIVEIRA, R. Sex reversal in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using a nonsteroidal aromatase inhibitor. **Journal of Experimental Zoology**, New York, v. 2, n. 290, p. 177-181, July 2001.

ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; FOREST, S. A.; TOLEDO-FILHO, G. Biotecnologia: genética aplicada à piscicultura. **Caderno de Ictiogenética**, [S. l.], v. 1, n. 3, p. 27, 1996.

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

BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura**, Santa Maria: Editora UFSM, 2002. 212 p

BARAS, E.; JACOBS, B.; MÉLARD, C. Effect of water temperature on survival, growth and phenotypic sex of mixed (XX-XY) progenies of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 192, n. 2/4, p. 187-199, Jan. 2001.

BAROILLER, J. F.; CHOURROUT, D.; FOSTIER, A.; JALABERT, B. Temperature and sex chromosomes govern Sex ratios of mouthbrooding Cichlid fish *Oreochromis niloticus*. **The Journal of Experimental Zoology**, New York, v. 272, n. 3, p. 213-223, Oct. 1995.

BAROILLER, J. F.; CLOTA, F.; GÉRAZ, E. Temperature sex determination in two tilapia species, *Oreochromis niloticus* and the red tilapia\_Red Florida

strain.: effect of high or low temperatures. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE REPRODUCTIVE PHYSIOLOGY OF FISH, 5.; 1996, Austin, Texas. **Proceeding...** Austin, Texas, 1996a. p. 158–160.

BAROILLER, J. F.; D’COTTA, H. Environment and sex determination in farmed fish. **Comparative Biochemistry and Physiology**, New York, v. 130, n. 4, p. 399-409, Dec. 2001.

BAROILLER, J. F.; FOSTIER, A.; CAUTY, C.; ROGNON, X.; JALABERT, B. Effects of high rearing temperatures on the sex ratio of progeny from sex-reversed males of *Oreochromis niloticus*. In: PULLIN, R. S. V.; LAZARD, J.; LEGENDRE, M.; AMON KOTHIAS, J. B.; PAULY, D. (Eds.). **The Thrid Symposium on Tilapia in Aquaculture**, ICLARM Conf. Proc. 41, 1996b. p. 246-256.

BAROILLER, J. F.; NAKAYAMA, I.; FORESTI, F.; CHOURROUT, D. Sex determination studies in two species of teleost fish, *Oreochromis niloticus* and *Leporinus elongatus*. **Zoology Studies**, Taipei, v. 35, n. 4, p. 279–285, Oct. 1996c.

BARTLEY, D. M.; RANA, K.; IMMINK, A. J. The use of inter-specific hybrids in aquaculture and fisheries. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, Dordrecht, v. 10, n. 3, p. 325-337, 2000.

BEARDMORE, J. A.; MAIR, G. C.; LEWIS, R. I. Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: applications, problems, and prospects. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 197, n. 1/4, p. 283-301, June 2001.

BOCEK, A.; PHELPS, R. P.; POPMA, T. J. Effect of feeding frequency on Sex-reversal and on growth of Nilo tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Journal of Applied Aquaculture**, Binghamton, v. 1, n. 3, p. 97-103, 1992.

BOMBARDELLI, R. A, HAYASHI, C. Masculinização de larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) a partir de banhos de imersão com 17 $\alpha$ -metiltestosterona. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 34, n. 2, p. 365-372, set./out. 2005.

BOSCOLO, W. R.; HAYASHI, C.; SOARES, C. M.; FURUYA, W. M.; MEURER, F. Desempenho e Características de Carcaças de Machos Revertidos de Tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), Linhagens Tailandesa e Comum, nas Fases Inicial e de Crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 30, n. 5, p. 1391-1396, set./out. 2001.

BORGES, A. M.; MORETTI, J. O. C.; McMANUS, C.; MARIANTE, A. S. Produção de populações monossexo macho de tilápia-do-nilo da linhagem Chitralada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 2, p. 153-159, fev. 2005.

BORGHETTI, J. R.; OSTRENSKY, A. Estratégias e ações governamentais para incentivar o crescimento da atividade aquícola no Brasil. In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DE AQUICULTURA, 1.; 1998, Recife, PE. **Anais...** Recife: SIMBRAQ, 1998. p. 437-447.

BRUNELLO, A. E. M. Reversão sexual para a obtenção de populações monossexo de tilápias. 2005. Disponível em:  
<[www.ufv.br/dbg/bioano01/div31.htm](http://www.ufv.br/dbg/bioano01/div31.htm)>. Acesso em: mar. 2005.

CÉSAR, M. P.; MURGAS, D. S.; ARAÚJO, R. V.; DRUMMOND, C. D. **Métodos para obtenção de população monossexo na Piscicultura**. Lavras: UFLA, 2006. 27 p. (Boletim Agropecuário, n. 69).

CHANG, X.; KOBAYASHI, T.; SENTHILKUMARAN, B.; KOBAYASHI-KAJURA, H.; SUDHAKUMARI, C. C.; NAGAHAMA, Y. Two types of aromatase with different encoding genes, tissue distribution and developmental expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 141, n. 2, p. 101-115, Apr. 2005.

CHANG, X. T.; KOBAYASHI, T.; TODO, T.; IKEUCHI, T.; YOSHIURA, Y.; KAJIURA-KOBAYASHI, H.; MORREY, C.; NAGAHAMA, Y. Molecular cloning of estrogen receptors alpha and beta in the ovary of a teleost fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Zoological Science**, Tokyo, v. 16, n. 4, p. 653-658, Aug. 1999.

CONTRERAZ-SÁNCHEZ, W. M. **Sex determination in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: Gene expression, masculinization methods, and environmental effects**. 2001. 193 p. Dissertation (PhD) - Oregon State University, Corvallis, Oregon,

CONTRERAZ-SÁNCHEZ, W. M.; COUTURIER, G. M. Fate of Methyltestosterone in the Pond Environment: Use of MT in Earthen Ponds with No Record of Hormone Usage. In: McELWEE, K.; LEWIS, K.; NIDIFFER, M.; BUITRAGO, P. (Ed.). **Nineteenth Annual Technical Report. Pond Dynamics/Aquaculture CRSP**. Corvallis, Oregon: Oregon State University, 2002.

CURTIS, L. R.; DIREN, F. T.; HURLEY, M. D.; SEIM, W. K.; TUBB, R. A. Disposition and elimination of 17 $\alpha$ -methyltestosterone in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 99, n. 1/2, p. 193-201, Nov. 1991.

D'COTTA, H.; FOSTIER, A.; GUIGUEN, Y.; GOVOROUN, M.; BAROILLER, J. F. Aromatase plays a key role during normal and temperature-induced sex differentiation of tilapia *Oreochromis niloticus*. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 59, n. 3, p. 265-276, July 2001.

DESPREZ, D.; MÉLARD, C. Effect of ambient water temperature on sex determinism in the blue tilapia *Oreochromis aureus*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 162, n. 1/2, p. 79-84, Mar. 1998.

DESPREZ, D.; MÉLARD, C.; PHILIPPART, J. C. Production of high percentage of male offspring with 17 $\alpha$ -ethynylestradiol sex-reversed *Oreochromis aureus*. II. Comparative reproductive biology of females and F2 pseudofemales and large-scale production of male progeny. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 130, n. 1, p. 35-41, Feb. 1995.

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

DIAZ, M. Análisis de viabilidad y crecimiento hasta el levante de triploides y diploides de tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*, Linné). **Boletim Científico INPA**, Manaus, n. 2, p. 33-45, 1994.

DONALDSON, E. M.; DEVLIN, R. H. Uses of biotechnology to enhance production. In: PENNEL, W. BARTON, B. (Ed.). **Principles of Salmonids Culture**. Amsterdam: Elsevier, 1996. p. 969-1020.

DONALDSON, E. M.; FAGERLAND, U. H. M.; HIGGS, D. A.; McBRIDE, J. R. Hormonal enhancement of growth. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J. BRETT, J. R. (Ed.) **Fish physiology**. New York: Academic Press, 1979. v. 8, p. 456-578.

EL-SAYED, A. F. M. Alternative dietary protein sources for farmed tilapia, *Oreochromis* spp. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 184, n. 1/4, p. 221-231, Sept. 1999.

EZAZ, M. T.; MYERS, J. M.; POWELL, S. F.; MCANDREW, B. J.; PENMAN, D. J. Sex ratios in the progeny of androgenetic and gynogenetic YY male Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 232, n. 1/4, p. 205-214, Apr. 2004.

FAO. 1979 Disponível em:

<[www.fao.org/docrep/L5902S/L5902s00.htm#Contents](http://www.fao.org/docrep/L5902S/L5902s00.htm#Contents)>. Acesso em: mar. 2005.

FERREIRA, D. F. **Sistema de Análise de Variância (Sisvar)**, ver 4. 6 (Build 61). Lavras: UFLA. Departamento de Ciências Exatas da UFLA, 2004.

FITZPATRICK, M. S.; CONTRERAS-SÁNCHEZ, W. M.; MILSTON, R. H.; HORNIK, R.; FEIST, G. W.; SCHRECK, C. B. Detection of MT in aquarium water after treatment with MT food. In: MCELWEE, K.; BURKE, D.; NILES, M.; EGNA, H. (Ed.). **Sixteenth Annual Technical Report. Pond Dynamics/Aquaculture CRSP**, Corvallis, Oregon: Oregon State University, 1999. p. 81-84.

FITZPATRICK, M. S.; GALE, W. L.; SLATER, C. H.; SCHRECK, C. B. Gonadal androgen receptors in fishes. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE REPRODUCTIVE PHYSIOLOGY OF FISH, 5.; 1995, Austin. **Proceedings...** Austin, TX (USA), 1995. p. 308. (Fish Symposium 95).

FRANCO, L. **Tilápia: criação tipo exportação**. 2006. Disponível em: <<http://www.portaldoagronegocio.com.br/index.php?p=texto&&idT=794>>. Acesso em: 01 fev. 2007.

GALE, W. L.; FITZPATRICK, M. S.; LUCERO, M.; CONTRERAS-SÁNCHEZ, W. M.; SCHRECK, C. B. Masculinization of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by immersion in androgens. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 178, n. 3/4, p. 349-357, Aug. 1999.

GALVEZ, J. I.; MAZIK, R. M.; PELPS, R. R.; MULVANEY, D. R. Masculinization of channel catfish *Ictalurus punctatus* by oral administration of trenbolone acetate. **Journal of the World Aquacultural Society**, Louisiana, v. 26, n. 4, p. 378-383, Dec. 1995.

GOMELSKY, B.; CHERFAS, N. B.; PERETZ, Y.; BEM-DOM, N.; HULATA, G. Hormonal Sex inversion in the common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 126, n. 3/4, p. 265-270, Oct. 1994.

GOUDIE, C. A.; SHELTON, W. L.; PARKER, N. C. Tissue distribution and elimination of radiolabelled methyltestosterone fed to sexually undifferentiated blue tilapia. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 58, n. 3/4, p. 215-226, Nov. 1986.

GREEN, B. W.; VEVERICA, K. L.; FITZPATRICK, M. S. Fry and fingerling production. In: EGNA, H. S.; BOYD, C. E. (Ed.) **Dynamics of pond aquaculture**. Boca Raton: CRC Press, 1997. p. 215-243.

GUERRERO III, R. D.; GUERREIRO L. A. Effects of Androstenedione and methyltestosterone on *Oreochromis niloticus* fry treated for sex reversal in outdoor net enclosure. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TILAPIA IN AQUACULTURE, 4.; 1997, Orlando, Florida - USA. **Proceedings...** Orlando, 1997. v. 12, p. 772-777.

HAYASHI, C. Breves considerações sobre as tilápias. In: RIBEIRO, R. P.; HAYASHI, C.; FURUYA, W. M. (Ed.) **Curso de piscicultura-Criação racional de tilápias**. 1995. p. 4.

HEITZMAN, R. J. Coordination of information on residues of veterinary drugs in the European Community. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 275, n. 1/2, p. 17-22, Mar. 1983.

HUNTER, G. A.; DONALDSON, E. M. Hormonal sex control and its application to fish culture. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J.; DONALDSON, E. M. (Ed.) **Fish Physiology Reproduction**, Behavior and Fertility Control, V. IX-B. New York: Academic Press, 1993. p. 23-303.

HURLEY, M. A.; MATTHIESSEN, P.; PICKERING, A. D. A model for environmental sex reversal in fish. **Journal of Theoretical Biology**, London, v. 227, n. 2, p. 159-165, Mar. 2004.

KAMAL, A. H. M. M.; MAIR, G. C. Salinity tolerance in superior genotypes of tilapia *Oreochromis niloticus*, *Oreochromis mossambicus* and their hybrids. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 247, n. 1/4, p. 189-210, June 2005.

KITANO, T.; TAKAMUNE, K.; KOBAYASHI, T.; NAGAHAMA, Y.; ABE, S. I. Suppression of P450 aromatase gene expression in sex-reversed males produced by rearing genetically female larvae at a high water temperature during a period of sex differentiation in the Japanese flounder *Paralichthys oliaceus*. **Journal of Molecular Endocrinology**, Bristol, v. 23, n. 2, p. 167-176, Oct. 1999.

KUBITZA, F. Nutrição e alimentação de tilápias. **Panorama da Aqüicultura**, Rio de Janeiro, v. 9, n. 52, p. 42-48, jan./fev. 1999.

KUBITZA, F. **Qualidade da água na produção de peixes. Cursos Avançados em Piscicultura**, 2000. p. 3-14. Apostila.

KWON, J.Y., HAGHPANAH, V., KOGSON-HURTADO, L.M., McANDREW, B.J., PENMAN, D.J. Masculinization of genetic female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by dietary administration of an aromatase inhibitor during sexual differentiation. **Journal of Experimental Zoology**, New York, v. 287, n. 1, p. 46-53, 2000.

LAHAV, E.; RA'NAN, Z. Salinity tolerance of genetically produced tilapia (*Oreochromis*) hybrids. **Israely Journal of Aquaculture**, Bamidgeh, v. 49, n. 3, p. 160-165, Sept. 1997.

LAHAV, M.; LAHAV, E. The development of all-male tilapia hybrids in Nir David. **The Israely Journal of Aquaculture**, Bamidgeh, v. 42, n. 2, p. 58-61, July 1990.

LAZARD, J.; ROGNON, X. Genetic diversity of tilapia and aquaculture development in Côte D'Ivoire and Niger. **The Israely Journal of Aquaculture**, Bamidgeh, v. 49, n. 2, p. 90-98, June 1997.

LONE, K. P. Natural Sex steroids and their xenobiotic analogs in animal production: growth, carcass quality, pharmacokinetics, metabolism, mode of action, residues, methods and epidemiology. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 37, n. 2, p. 93-209, 1997.

LOVSHIN, L. L. Tilapia farming: a growing worldwide aquaculture industry. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE PEIXES, 1., 1997, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: CBNA, 1997. p. 137-164.

LOVSHIN, L. L.; CYRINO, J. E. P. Status of commercial fresh water fish culture in Brazil. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE PEIXES, 2., 1998, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: CBNA, 1998. p. 1-20.

MACINTOSH, D. J.; LITTLE, D. C. Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). In: BROMAGE, N. R.; ROBERTS, R. J. (Ed.), **Broodstock management and egg and larval quality**. Cambridge, MA: Blackwell, 1995. Chap. 12, p. 277-320.

MAINARDES-PINTO, C. S. R.; FENERICH-VERANI, N.; CAMPOS, B. E. S.; SILVA, A. L. Masculinização da Tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, utilizando diferentes rações e diferentes doses de  $17\alpha$ -metiltestosterona. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 29, n. 3, p. 654-659, maio/jun. 2000.

MAIR, G. C. Hybridisation – more trouble than its worth? **Aquaculture Asia**, Hanoi, v. 8, n. 1, p. 23-25, 2003.

MAIR, G. C.; ABUCAY, J. A.; BEARDMORE, J. A.; SKIBINSKI, D. O. F. Growth performance trials of genetically male tilapia (GMT) derived from YY-males in *Oreochromis niloticus* L.: On station compararisons with mixed sex and sex reversed male populations. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 137, 1/4, p. 313-322, Dec. 1995.

MAIR, G. C.; ABUCAY, J. A.; SKIBINSKI, D. O. F.; ABELLA, T. A.; BEARDMORE, J. A. Genetic manipulation of sex ratio for the large scale production of all-male tilapia *Oreochromis niloticus* L. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, Montreal, v. 54, n. 2, p. 396-404, Feb. 1997a.

MAIR, G. C.; BEARDMORE, J. A.; SKIBINSKI, D. O. F. Experimental evidence for environmental sex determination in *Oreochromis* species. In: ASIAN FISHERIES FORUM, 2.; 1989, Tokyo, Japan. **Proceedings...** Tokyo, Japan, 1989. p. 555-558.

MAIR, G. C.; DAHILIG, L. R.; MORALES, E. J.; BEARDMORE, J. A.; SKIBINSKI, D. O. F. Application of genetic techniques for the production of monoses male tilápia in aquaculture: Early experiences from the Philippines. In: CENTRAL AMERICA SYMPOSIUM ON AQUACULTURE, 4.; 1997, Tegucigalpa, Honduras. **Proceedings...** Tegucigalpa, Honduras, 997. p. 225-227. 1997b.

MAIR, G. C.; LITTLE, D. C. **Population control in farmed tilapia**. NAGA ICLARM Q, Manila, v. 14, n. 3, p. 8-13, 1991.

MAIR, G. C.; SCOTT, A. G.; PENMAN, D. J.; BEARDMORE, J. A.; SKIBINSKI, D. O. F. Sex determination in the genus *Oreochromis*. 1: Sex reversal, Gynogenesis and triploidy in *O. niloticus* (L.). **Theoretical Applied and Genetics**, Berlin, v. 82, n. 2, p. 144-152, 1991.

MBAHINZIREKI, G.; DABROWSKI, K. **Production of male tilapia by heat-treatment of embryos and growth of different diets in recirculating systems**. Paper presented during the World Aquaculture Society Conference

held at Washington State Convention Center, Seattle, WA, USA. 19-23 February 1997.

McEVOY, G. K. **Drug information. American Society of Health-System Pharmacists**, AHFS 97. Washington, D. C.; 1997. 2955 p.

MELARD, C. Production of a high percentage of male offspring with 17 $\alpha$ -ethynylestradiol sex-reversed *Oreochromis aureus*. . I. Estrogen sex-reversal and production of F2 pseudofemales. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 130, n. 1, p. 25-34, Feb. 1995.

MERCADO DA PESCA. A tilápia: a escolha da espécie. 2007. Disponível em: <[http://www.mercadodapesca.com.br/cadeias\\_tilapia.php?pag=a\\_tilapia](http://www.mercadodapesca.com.br/cadeias_tilapia.php?pag=a_tilapia)>. Acesso em: 13 fev. 2007.

MEURER, F.; FRECCIA, A.; MAUERWERK, V.; MAUERWERK, M. T. Exigência de proteína digestível para a tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) durante o período de reversão sexual. Disponível em: <<http://www.pucpr.br/educacao/pibic/arquivo/2005/evento/sic/CV34.html>>. Acesso em: 05 set. 2005.

MIRES, D. The tilapias. In: NASH, C. E.; NOVOTONY, A. J. (Eds.). **Production of aquatic animals**. New York: Elsevier, 1995. Chap. 7. p. 133-152.

MORI, T.; MATSUMOTO, H.; YOKOTA, H. Androgen-induced vitellogenin gene expression in primary cultures of rainbow trout hepatocytes. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 67, n. 2, p. 133-141, Oct. 1998.

MURAD, F.; HAYNES JR, R. C. Androgens. In: GILMAN, A. G.; GOODMAN, L. S.; RALL, T. W.; MURAD, F. (Ed.). **The pharmacological basis of therapeutics**. 7. ed. New York: MacMillan Publishing, 1985. p. 1440-1458.

NAKAMURA, M. Dosage-dependent changes in the effect of oral administration of methyltestosterone on gonadal Sex differentiation in *Tilapia mossambica*. **Bulletin of the Faculty Fisheries Hokkaido University**, Hokkaido, v. 26, p. 99-108. 1975.

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

OVIDIO, M.; DESPREZ, D.; MELARD, C.; PONCIN, P. Influence of sexual genotype on the behaviour of females (Genotype WZ) and pseudofemales (genotype ZZ) in tilapia *Oreochromis aureus*. **Aquatic Living Resources**, Paris, v. 15, n. 3, p. 163-167, June 2002.

PACHECO, D. O peixe de ouro da aquicultura brasileira. **Revista Nacional da Carne**, São Paulo, v. 28, n. 325, p. 154-159, 2004.

PANDIAN, T. J.; SHEELA, S. G. Hormonal induction of sex reversal in fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 138, n. 1/4, p. 1-22, Dec. 1995.

PATIÑO, R. Manipulations of the Reproductive System of Fishes by Means of Exogenous Chemicals. **The Progressive Fisheries Culturist**, Bethesda, v. 59, n. 2, p. 118-128, Apr. 1997.

PATIÑO, R.; DAVIS, K. B.; SCHOORE, J. E.; UGUZ, C.; STRUESSMANN, C. A.; PARKER, N. C.; SIMCO, B. A.; GOUDIE, C. A. Sex differentiation of channel catfish gonads: normal development and effects of temperature. **Journal Experimental of Zoology**, New York, v. 276, n. 3, p. 209-218, Dec. 1996.

PHELPS, R. P.; ARANA, E.; ARGUE, B. Relationships between the external morphology and gonads of androgen-treated *Oreochromis niloticus*. **Journal of Applied Aquaculture**, Binghamton, v. 2, n. 2, p. 103-108, 1993.

PHELPS, R. P.; CEREZO, G. The effect of confinement in hapas on sex reversal and growth of *Oreochromis niloticus*. **Journal of Applied Aquaculture**, Binghamton, v. 1, n. 4, p. 73-81, 1992.

PHELPS, R. P.; POPMA, T. J. Sex reversal of Tilapia. In: COSTA-PIERCE, B. A.; RAKOCY, J. E. (Eds.) **Tilapia Aquaculture in the Americas**. Louisiana: The World Aquaculture Society, 2000. v. 2, p. 34-59.

PHELPS, R. P.; SALAZAR, G. C.; ABE, V.; ARGUE, B. Sex reversal and nursery growth of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), free-swimming in earthen ponds. **Aquaculture Research**, Amsterdam, v. 26, p. 293-295, 1995.

PHILIPPART, J. C.; RUWET, J. C. Ecology and distribution of tilápias. In: PULLIN, R. S. V.; LOWE-McCONNELL, R. H. (Ed.). **The biology and**

**culture os tilapias**. Amsterdam: International Center for living Aquatic Resources Management, 1982. p. 15-59. (ICLARM Conference Proceedings 7).

PIFERRER, F. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 197, p. 229-281, 2001.

PIFERRER, F.; BAKER, I. J.; DONALDSON, E. M. Effects of natural, synthetic, aromatizable, and nonaromatizable androgens in inducing male sex differentiation in genotypic female chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 91, n. 1, p. 59-65, July 1993.

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**, Amsterdam, v. 9, n. 2, p. 145-150, Apr. 1991.

PIFERRER, F.; DONALDSON, E. M. Gonadal differentiation in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, after a single treatment with androgen or estrogen at different stages during ontogenesis. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 77, n. 1/4, p. 251-262, June 1989.

PONZA, S.; LITTLE, D. C.; BOOTHAMJINDA, C. Effects of the timing of treatment on set after hatching on the efficacy of 17  $\alpha$ -methyltestosterone for masculinization of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry. In: CRESWELL, R. L. (Ed.) **World aquaculture: book of abstracts**. Baton Rouge, USA: Louisiana State University/World Aquaculture Society, 1996. p. 314-315.

POPPER, D.; LICHTOWICH, T. Preliminary success in predator control of *Tilapia Mossambica*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 5, n. 2, p. 213-214, 1975.

POPMA, T. J. **Freshwater fishculture development project, ESPOL, Guayaquil, Ecuador: final technical report**. Department of Fisheries and Allied Aquacultures, Auburn University, AL, USA. 1987.

POPMA J. T.; LOVSHIN, L. L. Worldwide prospects for commercial production of Tilapia. **Research and Development Series**, Auburn, n. 41, p. 15-17, 1996.

POPMA, T. J.; MASSER, M. Tilapia: Life history and biology. **Southern Regional Agricultural Center**. SRAC Publication n. 283, 1999. Disponível em:

<<http://govdocs.aquake.org/cgi/reprint/2003/705/7050040.pdf>>. Acesso em: dez. 2005.

POPMA, T. J.; PHELPS, R. P. Status report to commercial tilapia producers on monosex x fingerling production techniques. In: AQUICULTURA BRASIL '98, 1998, Recife. **Anais...** Recife: SIMBRAQ, 1998. p. 127-145.

RANI, A.; MACINTOSH, D. J. An evaluation of the effects of hormone concentration, treatment period, feeding regime, and rearing salinity on production of all-male Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry using 17  $\alpha$  methyltestosterone. In: SYMPOSIUM ON TILLAPIA IN AQUACULTURE, 4., 1997, Orlando, Flórida - USA. **Proceedings...** Flórida, 1997. v. 2, p. 791-802.

RICO, A. G. Metabolism of endogenous and exogenous anabolic agents in cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 57, n. 1, p. 226-232, Jan. 1983.

ROMER, U.; BEISENHERZ, W. Environmental determination of sex in Apistogramma Cichlidae and two other freshwater fishes Teleostei. **Journal of Fish Biology**, London, v. 48, n. 4, p. 714-725, Apr. 1996.

SANCHES, L. E. F.; HAYASHI, C. Effect of feeding frequency on Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) fries performance during sex reversal in hapas. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 23, n. 4, p. 871-876, Aug. 2001.

SHELTON, W. L.; HOPKINS, K. D.; JENSEN, G. L. Use of hormones to produce monosex tilapia for aquaculture. In: SMITHERMAN, R. O.; SHELTON, W. L.; GROVER, J. H. (Ed.). **Culture of exotic fishes symposium**. Auburn: Alabama University/Fish Culture Section/American Fisheries Society, 1978. p. 10-33, 1978.

SOUZA, F. O. **Estudo do efeito da relação macho/fêmea em desova natural e dosagem de 17-alfa metiltestosterona na reversão sexual de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) linhagem Tailandesa**. 2001. 45 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SPECKER, J. L.; CHANDLEE, M. K. Methodology for estradiol treatment in marine larval and juvenile fish: uptake and clearance in summer flounder. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 217, n. 1/4, p. 663-672, Mar. 2003.

TACHIBANA, L.; CASTAGNOLLI, N.; PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M.; VALLE, J. B.; SIQUEIRA, M. R. Desempenho de diferentes linhagens de

tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) na fase de reversão sexual. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, Maringa, v. 26, n. 3, p. 305-311, July/Sept. 2004.

TAYAMEN, M. N.; REYES, R. A.; DANTING, Ma. J.; MENDOZA, A. M.; MARQUES, E. B.; SALGUET, A. C.; GONZALES, R. C.; ABELLA, T. A.; VERA-CRUZ, E. M. Tilápia broodstock development for saline waters in Philippines. **NAGA-ICLARM Quaterly**, Manila, v. 25, n. 1, p. 32-36, 2002.

TESSEMA, M.; MÜLLER-BELECKE, A.; HÖRSTGEN-SCHWARK, G. Effect of rearing temperatures on the sex ratios of *Oreochromis niloticus* populations. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 258, n. 1/4, p. 270-277, Aug. 2006.

THORGAARD, G. H. Chromosome set manipulation and sex control in fish. In: HOAR, W. W.; RANDALL, D. J.; DONALDSON, E. M. (Ed.) **Fish physiology**. New York: Academic Press, 1983. v. 9, part B, p. 405-428.

TOGUYENE, A.; FAUCONNEAU, B.; BOUJARD, T.; FOSTIER, A.; KUHN, E. R.; MOL, K. A.; BAROILLER, J-F. Feeding Behaviour and Food Utilisation in Tilápia, *Oreochromis niloticus*: Effect of Sex Ratio and Relationship with the Endocrine Status. **Physiology & Behaviour**, Oxford, v. 62, n. 2, p. 273-279, Aug. 1997.

TORRANS, L.; MERIWEETHER, F.; LOWELL, F.; WYATT, B.; GWINUP, P. D. Sex-reversal of *Oreochromis aureus* by immersion in mibolerone, a synthetic steroid. **Journal World Aquatic Society**, Louisiana, v. 19, n. 1, p. 97-102, 1988.

TUAN, P. A.; MAIR, G. C.; LITTLE, D. C.; BEARDMORE, J. A. Sex determination and the feasibility of genetically male tilapia production in the Thai-Chitralada strain of *Oreochromis niloticus* (L.). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 173, n. 1/4, p. 257-269, Mar. 1999.

TURNER, G. F.; ROBINSON, R. L. Reproductive biology, mating systems and parental care. In: BEVERIDGE, M. C. M.; MCANDREW, B. J. (Ed.) **Tilapias: biology and exploration**. London: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 33-58.

WASSERMANN, G. J.; AFONSO, L. O. B. Sex reversal in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus) by androgen immersion. **Aquaculture Research**, Amsterdam, v. 34, n. 1, p. 65-71, Jan. 2003.

WOHLFARTH, G. W. The unexploited potential of tilapia hybrids in aquaculture. **Aquaculture Fisheries Management**, Amsterdam, v. 25, p. 781-788, 1994.

WOHLFARTH, G.W., HULATA, G.I. Applied genetics of tilapias. **ICLARM Studies and Reviews Manila**, Philippines, v. 6, 26 p, 1981.

VARADARAJ, K.; PANDIAN, T. J. Masculinization of *Oreochromis mossambicus* by administration of 17 $\alpha$ -methyl-5-androsten-3-17 $\beta$ -diol through rearing water. **Current Science**, Bangalore, v. 56, n. 9, p. 412-413, May 1987.

VARADAJ, K.; SINDHU KUMARI, S.; PANDIAN, T. J. Comparison of conditions for hormonal sex reversal of Mozambique tilapias. **The Progressive Fish-Culturist**, Bethesda, v. 56, n. 2, p. 81-90, Apr. 1994.

VERA CRUZ, E. M.; MAIR, G. C. Conditions for effective androgen Sex reversal in *Oreochromis niloticus* (L). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 122, n. 2/3, p. 237-248, May 1994.

YAMAMOTO, T. Sex differentiation. In: HOAR, W.; RANDALL, D. (Ed.). **Fish physiology**. New York: Academic Press, 1969. p. 117-175.

WANG, L. H.; TSAI, C. L. Effects of temperature on the deformity and sex differentiation of tilapia, *Oreochromis mossambicus*. **Journal of Experimental Zoology**, New York, v. 286, n. 5, p. 534-537, Apr. 2000.

ZHU, Y. A study of the development of the gonads of *Tilapia nilotica*. **Journal of the Fujian Teachical University**, Xuebao, v. 3, p. 74-81, 1987.

## ANEXOS

ANEXO A	Página
<b>TABELA 1A.</b> Análise de variância e regressão do efeito da mudança da temperatura de criação sobre o peso das pós-larvas de tilápias alimentadas com rações contendo diferentes doses de MT.....	86
<b>TABELA 2A.</b> Análise de variância do efeito da mudança da temperatura de criação sobre o tamanho das pós-larvas de tilápias alimentadas com rações contendo diferentes doses de MT.....	87
<b>TABELA 3A.</b> Análise de regressão do efeito da temperatura de criação sobre o tamanho das pós-larvas de tilápias...	87
<b>TABELA 4A.</b> Análise de variância e regressão do efeito da mudança da temperatura de criação sobre a sobrevivência das pós-larvas de tilápias alimentadas com rações contendo diferentes doses de MT.....	88
<b>TABELA 5A.</b> Análise de regressão do efeito das diferentes doses hormonais sobre na sobrevivência das pós-larvas de tilápias.....	89

**ANEXO B**

**Página**

<b>TABELA 1B.</b> Análise de variância do efeito da mudança da temperatura de criação sobre a porcentagem de machos de tilápias alimentados com rações contendo diferentes doses de MT, obtida através de análise histológica das gônadas.....	90
--	----

## ANEXO A

**TABELA 1A.** Análise de variância e regressão do efeito da mudança da temperatura de criação sobre o peso das pós-larvas de tilápias alimentadas com rações contendo diferentes doses de MT.

<b>Causas de Variação</b>	<b>Graus de Liberdade</b>	<b>Quadrado Médio</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
TEMP	3	0,071532	0,0000
DOSE	3	0,000929	0,7522
TEMP*DOSE	9	0,006974	0,0046
TEMP	3	0,002276	0,4045
TEMP	3	0,041250	0,0000
<i>Linear</i>	<i>1</i>	<i>0,001332</i>	<i>0,451</i>
<i>Quadrática</i>	<i>1</i>	<i>0,107898</i>	<i>0,000</i>
<i>Desvio</i>	<i>1</i>	<i>0,014520</i>	<i>0,015</i>
TEMP	3	0,030285	0,0000
<i>Linear</i>	<i>1</i>	<i>0,008028</i>	<i>0,067</i>
<i>Quadrática</i>	<i>1</i>	<i>0,062720</i>	<i>0,000</i>
<i>Desvio</i>	<i>1</i>	<i>0,020107</i>	<i>0,004</i>
TEMP	3	0,018643	0,0001
<i>Linear</i>	<i>1</i>	<i>0,016978</i>	<i>0,009</i>
<i>Quadrática</i>	<i>1</i>	<i>0,037932</i>	<i>0,000</i>
<i>Desvio</i>	<i>1</i>	<i>0,001018</i>	<i>0,509</i>
DOSE	3	0,005605	0,0731
DOSE	3	0,011766	0,0031
<i>Linear</i>	<i>1</i>	<i>0,005655</i>	<i>0,123</i>
<i>Quadrática</i>	<i>1</i>	<i>0,026791</i>	<i>0,001</i>
<i>Desvio</i>	<i>1</i>	<i>0,002852</i>	<i>0,271</i>
DOSE	3	0,002778	0,3151
DOSE	3	0,001702	0,5331
Resíduo	64	0,002312	
CV (%)	17,65		

**TABELA 2A.** Análise de variância do efeito da mudança da temperatura de criação sobre o tamanho das pós-larvas de tilápias alimentadas com rações contendo diferentes doses de MT.

<b>Causas de Variação</b>	<b>Graus de Liberdade</b>	<b>Quadrado Médio</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
TEMP	3	1,013316	0,0000
DOSE	3	0,026216	0,4898
TEMP*DOSE	9	0,036648	0,3482
Resíduo	64	0,032130	
CV (%)	7,15		

**TABELA 3A.** Análise de regressão do efeito da temperatura de criação sobre o tamanho das pós-larvas de tilápias.

<b>Causas de Variação</b>	<b>Graus de Liberdade</b>	<b>Quadrado Médio</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
b1	1	0,910593	0,000
b2	1	2,091428	0,000
Desvio	1	0,037928	0,281
Resíduo	64	0,032130	

**TABELA 4A.** Análise de variância e regressão do efeito da mudança da temperatura de criação sobre a sobrevivência das pós-larvas de tilápias alimentadas com rações contendo diferentes doses de MT.

<b>Causas de Variação</b>	<b>Graus de Liberdade</b>	<b>Quadrado Médio</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
TEMP	3	5513,611458	0,0000
DOSE	3	98,311458	0,0472
TEMP*DOSE	9	60,411458	0,1031
TEMP	3	1054,750000	0,0000
<i>Linear</i>	1	2662,560000	0,000
<i>Quadrática</i>	1	252,050000	0,009
<i>Desvio</i>	1	249,640000	0,010
TEMP	3	1169,033333	0,0000
<i>Linear</i>	1	3036,010000	0,000
<i>Quadrática</i>	1	470,450000	0,001
<i>Desvio</i>	1	0,640000	0,893
TEMP	3	1880,912500	0,0000
<i>Linear</i>	1	4336,222500	0,000
<i>Quadrática</i>	1	904,512500	0,000
<i>Desvio</i>	1	402,002500	0,001
TEMP	3	1590,150000	0,0000
<i>Linear</i>	1	3422,250000	0,000
<i>Quadrática</i>	1	1248,200000	0,000
<i>Desvio</i>	1	100,000000	0,097
DOSE	3	39,950000	0,3398
DOSE	3	97,483333	0,0480
<i>Linear</i>	1	64,000000	0,182
<i>Quadrática</i>	1	72,200000	0,157
<i>Desvio</i>	1	156,250000	0,039
DOSE	3	92,500000	0,0570
DOSE	3	49,612500	0,2464
Resíduo	64	2250,500000	
CV (%)	8,56		

**TABELA 5A.** Análise de regressão do efeito das diferentes doses hormonais na sobrevivência das pós-larvas de tilápias.

<b>Causas de Variação</b>	<b>Graus de Liberdade</b>	<b>Quadrado Médio</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
b1	1	22,800625	0,424
b2	1	250,278125	0,010
Desvio	1	21,855625	0,433
Resíduo	64	35,164062	

## ANEXO B

**TABELA 1B.** Análise de variância do efeito da mudança da temperatura de criação sobre a porcentagem de machos de tilápias alimentados com rações contendo diferentes doses de MT, obtidos através de análise histológica das gônadas.

<b>Causas de Variação</b>	<b>Graus de Liberdade</b>	<b>Quadrado Médio</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
TEMP	3	32,91667	0,35587
<i>Linear</i>	<i>1</i>	<i>0,050000</i>	<i>*****</i>
<i>Quadrática</i>	<i>1</i>	<i>90,25000</i>	<i>0,10002</i>
<i>Cúbica</i>	<i>1</i>	<i>8,449997</i>	<i>*****</i>
DOSE	3	1097,750	0,00001
<i>Linear</i>	<i>1</i>	<i>2737,800</i>	<i>0,00000</i>
<i>Quadrática</i>	<i>1</i>	<i>528,9999</i>	<i>0,00163</i>
<i>Cúbica</i>	<i>1</i>	<i>26,45007</i>	<i>*****</i>
Resíduo	9	26,86111	
CV (%)	6,83		