

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

FEMINIZAÇÃO DE TAMBACUI *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) COM  
ADMINISTRAÇÃO DE 17 $\beta$ -ESTRADIOL NA DIETA

VANESSA RIBEIRO REIS

MANAUS

2015

VANESSA RIBEIRO REIS

FEMINIZAÇÃO DE TAMBACUI *Collossoma macropomum* (Cuvier, 1818) COM  
ADMINISTRAÇÃO DE 17 $\beta$ -ESTRADIOL NA DIETA

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

Orientadora: Dra. Fernanda Loureiro de Almeida O'Sullivan

MANAUS

2015

## Ficha Catalográfica

R375f Reis, Vanessa Ribeiro  
Feminização de tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) com administração de 17-estradiol na dieta / Vanessa Ribeiro Reis. 2015  
77 f.: il. color; 31 cm.

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

1. Tambaqui. 2. Feminização. 3. Estradiol. 4. Cultivo intensivo. I. O'Sullivan, Dra. Fernanda Loureiro de Almeida II. Universidade Federal do Amazonas III. Título



Poder Executivo  
Ministério da Educação  
Universidade Federal do Amazonas  
Faculdade de Ciências Agrárias  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Pesqueiras nos Trópicos  
PPGCIPT

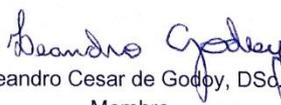


Ata da Defesa Pública da Dissertação de Mestrado da Bacharêu em Zootecnia Vanessa Ribeiro Reis, aluna do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Pesqueiras nos Trópicos, da área de conhecimento Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca, área de concentração em Uso sustentável de Recursos Pesqueiros Tropicais, realizada no dia 21 de agosto de 2015.

Aos vinte e um dias do mês de agosto do ano de dois mil e quinze, às nove horas e trinta minutos, na sala de alunos do prédio da Pós-Graduação da FCA/ICB, da Universidade Federal do Amazonas, localizado no setor Sul (Minicampus), realizou-se a Defesa Pública da Dissertação de Mestrado intitulada "Feminização de tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier, 1818) com administração de 17B – estradiol na dieta, da aluna **Vanessa Ribeiro Reis**, em conformidade com o Art. 58 do Regimento Interno" do PPG-CIPET-FCA e Artigo 85 do Regimento Geral da Pós-Graduação da Universidade Federal do Amazonas como parte final de seu trabalho para a obtenção do título de **MESTRE EM CIÊNCIAS PESQUEIRAS NOS TRÓPICOS**, área de concentração em **USO SUSTENTÁVEL DE RECURSOS PESQUEIROS TROPICAIS**. A Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Leandro Cesar de Godoy, DSc. (UNINILTONLINS), Jackson Pantoja Lima, DSc. (IFAM) e Wallice Luiz Paxiúba Duncan, DSc. (presidente-UFAM). O Presidente da Banca Examinadora deu início à sessão, convidando os membros e a mestranda a tomarem seus lugares. Em seguida, o Senhor Presidente informou sobre o procedimento do exame. A palavra foi facultada à mestranda para apresentar uma síntese do seu estudo e responder às perguntas formuladas pelos membros da Banca Examinadora. Após a apresentação e arguição, os membros da Banca Examinadora expressaram o parecer APROVADO.

A sessão foi encerrada e Eu, Wallice Luiz Paxiúba Duncan, lavrei a presente Ata, que depois de lida e aprovada será assinada pelos membros da Banca Examinadora, em Manaus (AM), 21 de agosto de 2015.

Banca Examinadora:



Leandro Cesar de Godoy, DSc. (UNINILTONLINS)  
Membro

  
Jackson Pantoja Lima, DSc. (IFAM)

Membro

  
Wallice Luiz Paxiúba Duncan, DSc. (UFAM)  
Presidente

À minha amada família  
*Pai, Mãe, Mano e Marido*

## AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e por sua infinita bondade.

Aos meus pais, Olavo e Alda, pelo amor incondicional e apoio em todos os momentos.

A Dra. Fernanda Loureiro de Almeida O'Sullivan, pela orientação, apoio, confiança, ensinamentos e amizade.

Ao Dr. Francesc Piferrer pela especial contribuição na revisão de literatura.

A Joyce e Iraní, pela amizade, ensinamentos, apoio e carinho dedicados a mim.

Ao *Meu Bem*, José Porfírio, por todo incentivo e amor.

Ao mano, Lucas, pela companhia durante o manejo nos fins de semana.

Aos bolsistas, Bruno, Dayana, Drielle, Erix, Framir, Isabela, Jailson, Júlio, Kátia, Mayene, Sígriid, Valéria, e funcionários Dra. Cláudia Majolo e Sr. Marcondes do AquaLab/Embrapa Amazônia Ocidental, pelo apoio nas coletas, análises e momentos de descontração.

Aos pesquisadores da Embrapa Amazônia Ocidental, Dr. Jony Dairiki, Dra. Edsandra Chagas e Dra. Cheila Boijink, pelo auxílio logístico, disponibilidade e dicas valiosas.

A Universidade Federal do Amazonas, pela oportunidade.

A Embrapa Amazônia Ocidental, pelos recursos para a realização do trabalho (SEG 03.1309.004.00.00).

A Dra. Rosa Toyoko Shiraishi Frighetto e a Embrapa Meio Ambiente pela análise da água.

A Estação de Piscicultura de Balbina, pela doação dos animais utilizados neste trabalho.

A CAPES, pela concessão da bolsa.

A todos os meus amigos que sempre torcem por mim e estão ao meu lado.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

*Muito Obrigada!*

## Resumo

O tambaqui *Colossoma macropomum* é o peixe mais produzido em cativeiro dentre as espécies nativas brasileiras. A fêmea se destaca por pesar cerca de 18% a mais que o macho em sistema de cultivo intensivo (dados não publicados). Quando as características zootécnicas de um gênero são mais rentáveis que de outro é comum o cultivo monosexo. As técnicas de inversão sexual podem ser utilizadas no direcionamento da diferenciação sexual para o gênero desejado. Este trabalho teve como objetivo identificar a melhor dose de  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) para a feminização direta de tambaqui. O experimento foi dividido em dois ensaios (setembro/novembro e outubro/dezembro de 2014). Para cada ensaio utilizou-se 500 pós-larvas de tambaqui (100/tratamento), com trinta dias pós-eclosão (dpe) e com comprimento médio 14,87 mm. Foram alimentadas com dietas contendo diferentes doses de  $E_2$  na ração (0, 20, 40, 80 e 120 mg/Kg) por seis semanas. Após os tratamentos os peixes foram transferidos para tanques-rede onde permaneceram até a realização da amostragem. Sessenta dias após o tratamento foi realizada coleta de sangue. A coleta das gônadas foi realizada quando os peixes tinham entre cinco e sete meses. Nos animais com comprimento padrão (CP) médio de  $13,96 \pm 1,29$  cm não foi possível a identificação do sexo, devido à ausência de evidências histológicas comprobatórias de ovários ou testículos. Nos animais sexados, o  $E_2$  demonstrou grande influência no aumento de fêmeas na dose mais elevada. A concentração de  $E_2$  no plasma dos animais mostrou que este esteroide foi totalmente metabolizado pelo organismo dos peixes, sendo estatisticamente igual para 20, 40 e 80 mg  $E_2$ /Kg de ração e o controle. Para dose de 120 mg/Kg os animais apresentaram uma concentração plasmática de estradiol significativamente menor que o controle e demais tratamentos. Sugerindo que para essa concentração o organismo dos peixes não só metabolizou todo o esteroide consumido, mas também diminuiu a produção endógena desse hormônio. As análises da água utilizada nos tratamentos, antes e após cloração, demonstraram a eficiência deste método na eliminação total dos resquícios hormonais de estradiol. Nossos resultados mostraram que 120 mg de  $E_2$  por quilograma de ração, administrados durante seis semanas, é o tratamento mais eficaz para a feminização de larvas de tambaqui a partir de 14 mm de comprimento. E a cloração da água após o tratamento com estradiol é 100% eficaz na eliminação de resíduos deste esteroide.

**Palavras-chave:** tambaqui, cultivo intensivo, fêmea,  $17\beta$ -estradiol.

## Abstract

The tambaqui *Colossoma macropomum* is the main farmed fish among the Brazilian native species. The female tambaqui stands out because it grows 18% more than the male in intensive farming fish system (unpublished data). When monosex cultivation is more profitable in fish industry, techniques of sex reversal can be used for directing the sexual differentiation towards to desired gender. The objective of this research was to identify the best dose of  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) for direct feminization of tambaqui, as the first step in developing a protocol for effective sex reversal for the specie. Due to experimental control and to avoid the possible genetic effects on the results, the study was divided into two tests (September / October and November / December 2014). In every test, it was used 500 tambaqui fries (100 fries/treatment) of 30 days post hatch (dph) with an average length  $14.87 \pm 2.85$  mm. The fries were fed diets containing different doses of  $E_2$  (0 - control, 20, 40, 80 and 120 mg/kg of  $E_2$  diet) for six weeks. After the treatments, the fish were transferred to cages where they remained growing for the sampling. Sixty days after the end of the treatment, blood sample was collected to determine the concentration of  $E_2$  in plasma. Sampling of the gonads was performed when the fish was around seven months. In the animals with standard length (SL) mean of  $13.96 \pm 1.29$  cm it was not possible to identify the sex, due to lack of histological evidence of ovaries or testes. In the individuals in which sex could be determined,  $E_2$  demonstrated great influence on the increase in females at the highest dose. The  $E_2$  concentration in the plasma of the animals showed that this hormone was fully metabolized by the fish body, as treated (20, 40 and 80 mg/kg  $E_2$  feed) and control presented similar plasma  $E_2$  values. However, in the treatment 120 mg of  $E_2$  kg of feed the animals presented a lower plasma concentration and statistically different from the control and other treatments. This suggests that the higher dose of  $E_2$  was not only fully metabolized by the organism, but also decreased the endocrine production of this hormone (negative feed-back). The water of the treatment was analyzed before and after chlorination. Results showed that there was a residual presence of  $E_2$  after the experiment which disappeared after chlorine. Our results indicate that 120 mg/kg  $E_2$  of diet administered for six weeks is the most effective treatment for tambaqui feminization from 14 mm length, and that water chlorination after estradiol treatment eliminates every residue of this steroid.

Keywords: tambaqui, intensive farming, female, sex reversal,  $17\beta$ -estradiol.

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1

<b>Figura 1.</b> Exemplar de tambaqui adulto.....	14
---	----

### Capítulo 2

<b>Figura 1.</b> Diagrama ilustrando o método direto para produção de lotes monosexo em teleósteos.....	35
---	----

<b>Figura 2.</b> Diagrama ilustrando o método indireto para produção de lotes monosexo feminino em espécies XX/XY.....	36
--	----

<b>Figura 3.</b> Diagrama ilustrando o método indireto para produção de lotes monosexo masculino em espécies XX/XY.....	37
---	----

<b>Figura 4.</b> Diagrama ilustrando o método indireto para produção de lotes monosexo feminino em espécies ZW/ZZ.....	38
--	----

<b>Figura 5.</b> Estrutura química do 17 $\beta$ -estradiol.....	39
--	----

### Capítulo 3

<b>Figura 1.</b> Cortes histológicos de gônadas de tambaqui corados com HE.....	62
---	----

<b>Figura 2.</b> Efeito de diferentes doses de E <sub>2</sub> na proporção de machos e fêmeas de tambaqui.....	64
--	----

<b>Figura 3.</b> Concentração plasmática de E <sub>2</sub> em tambaquis 60 dias após tratamentos.....	64
---	----

<b>Figura 4.</b> Concentração de estradiol na água antes e após a cloração.....	65
---	----

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1

<b>Tabela 1.</b> Classificação taxonômica do tambaqui.....	13
<b>Tabela 2.</b> Produção de pescado (t) da aquicultura continental por espécie.....	18

### Capítulo 2

<b>Tabela 1.</b> Exemplos de teleósteos com sistema de determinação sexual conhecido.....	24
<b>Tabela 2.</b> Exemplos de teleósteos com o tipo de diferenciação sexual conhecido.....	29
<b>Tabela 3.</b> Espécies em que há produção monosexo (comercial ou experimentalmente).....	31
<b>Tabela 4.</b> Propriedades físico-químicas do 17 $\beta$ -estradiol (E <sub>2</sub> ).....	39

### Capítulo 3

<b>Tabela 1.</b> Diluição da solução estoque para preparo das rações.....	57
<b>Tabela 2.</b> Parâmetros da água durante os tratamentos com E <sub>2</sub> .....	60
<b>Tabela 3.</b> Taxa de sobrevivência durante os tratamentos.....	61
<b>Tabela 4.</b> Percentual de fêmeas, machos, intersexos por ensaio e somatório dos ensaios.....	63

## SUMÁRIO

<b>Capítulo 1. O tambaqui <i>Colossoma macropomum</i> e a aquicultura.....</b>	<b>12</b>
<b>1 Tambaqui: taxonomia e características gerais.....</b>	<b>13</b>
1.1 Hábito alimentar .....	14
1.2 Migração e reprodução .....	15
<b>2 A aquicultura e a piscicultura .....</b>	<b>16</b>
2.1 Importância econômica do tambaqui.....	17
<b>3 Referências Bibliográficas.....</b>	<b>19</b>
<b>Capítulo 2. Determinação sexual e desenvolvimento gonadal em teleósteos: bases para a produção de populações monosexo em peixes.....</b>	<b>22</b>
<b>1 Classificação sexual em teleósteos .....</b>	<b>23</b>
<b>2 Determinação sexual.....</b>	<b>23</b>
2.1 Determinação sexual genética .....	25
2.1.1 Determinação sexual cromossômica .....	25
2.1.2 Determinação sexual poligênica .....	26
2.2 Determinação sexual ambiental.....	26
<b>3 Diferenciação sexual .....</b>	<b>28</b>
3.1 Tipos de diferenciação sexual .....	28
<b>4 Diferenças de desempenho zootécnico entre sexos em peixes .....</b>	<b>29</b>
<b>5 Espécies em que há produção de população monosexo.....</b>	<b>32</b>
<b>6 Métodos para produção de população monosexo .....</b>	<b>33</b>
6.1 Método direto para produção de lotes monosexo.....	34
6.2 Método indireto para produção de lotes monosexo feminino em espécies XX/XY .....	35
6.3 Método indireto para produção de lotes monosexo masculino em espécies XX/XY .....	36
6.4 Método indireto para produção de lotes monosexo feminino em espécies ZW/ZZ.....	37
<b>7 O 17<math>\beta</math>-estradiol (E<sub>2</sub>) .....</b>	<b>38</b>
<b>8 Riscos ambientais.....</b>	<b>39</b>
<b>9 Referências Bibliográficas.....</b>	<b>41</b>
<b>Capítulo 3. Feminização de tambaqui <i>Colossoma macropomum</i> com administração de 17<math>\beta</math>-estradiol na dieta .....</b>	<b>51</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>52</b>

<b>Abstrat.....</b>	<b>53</b>
<b>1 Introdução .....</b>	<b>54</b>
<b>2 Material e métodos .....</b>	<b>55</b>
2.1 Animais e condições experimentais .....	55
2.2 Tratamento hormonal .....	56
2.3 Amostragem .....	57
2.4 Concentração plasmática de E <sub>2</sub> .....	57
2.5 Sexagem .....	58
2.6 Cloração da água .....	58
2.7 Extração e quantificação de E <sub>2</sub> na água .....	59
2.8 Análise estatística .....	60
<b>3 Resultados.....</b>	<b>60</b>
3.1 Condições Experimentais .....	60
3.2 Sexagem .....	61
3.3 Efeito do E <sub>2</sub> na proporção de machos e fêmeas na população.....	63
3.4 Níveis plasmáticos de E <sub>2</sub> após tratamentos .....	64
3.5 Níveis de E <sub>2</sub> residual na água do experimento .....	65
<b>4 Discussão.....</b>	<b>65</b>
<b>5 Conclusão.....</b>	<b>69</b>
<b>6 Referências Bibliográficas.....</b>	<b>69</b>
<b>Capítulo 4. Considerações Finais .....</b>	<b>74</b>
<b>Referências Bibliográficas .....</b>	<b>77</b>

**O tambaqui *Colossoma macropomum* e a aquicultura**

Capítulo

1

## 1 Tambaqui: taxonomia e características gerais

O tambaqui é o segundo maior peixe de escama da América do Sul (ISAAC e RUFFINO, 2000) e é encontrado em estado silvestre nas bacias do rios Solimões/Amazonas e Orinoco e seus afluentes (ARAÚJO-LIMA e GOULDING, 1998). O tambaqui foi a primeira espécie de peixe nativo amazônico que atraiu um número relativamente grande de pesquisadores (ecólogos, biólogos pesqueiros, fisiologistas) e aquicultores (ARAÚJO-LIMA e GOULDING, 1998). Descrito pela primeira vez por Barão George Von Cuvier no início do século XIX, atualmente pertence à ordem dos Characiformes e a família Characidae (Tabela 1), a qual abrange 963 espécies descritas (REIS et al, 2003).

**Tabela 1.** Classificação taxonômica do tambaqui.

<b>Reino</b>	Animalia
<b>Filo</b>	Chordata
<b>Classe</b>	Actinopterygii
<b>Ordem</b>	Characiformes
<b>Família</b>	Characidae
<b>Subfamília</b>	Serrasalminae
<b>Gênero</b>	Colossoma
<b>Espécie</b>	<i>Colossoma macropomum</i>
<b>Nomes populares</b>	Tambaqui – Brasil Gamitana – Peru Canhama – Venezuela Cachama negra – Colômbia Black-pacu – USA

Fonte: Araújo-Lima e Goulding, 1998.

Durante o seu desenvolvimento até chegar à idade adulta, o tambaqui passa por grandes mudanças principalmente na sua forma e coloração. Segundo Araújo-Lima e Goulding (1998) artigos em jornais da década de 90 nos Estados Unidos mencionavam a captura de piranhas gigantes com quase 5 kg em rios, lagos e canais, porém estes pretensos

gigantes eram tambaquis pequenos que foram introduzidos por criadores de peixes ornamentais ou piscicultores dos EUA. Devido a essas grandes mudanças durante sua ontogenia, desde sua descrição até hoje a espécie já foi considerada pertencente a seis gêneros e já possuiu ao menos 12 nomes científicos diferentes. Seu nome científico tem origem no latim, “*collossoma*” que significa corpo sem chifres, isso porque ele não possui o espinho pré-dorsal, muito comum na maioria dos membros da subfamília dos pacus; e “*macropomum*” significa opérculo grande (ARAÚJO-LIMA e GOULDING, 1998).

Nos lagos, os adultos e jovens são capturados na água aberta e na floresta alagada (ARAÚJO-LIMA e GOULDING, 1998; CORREDOR, 2004) e os alevinos, na vegetação aquática (ARAÚJO-LIMA e GOULDING, 1998). Caracteriza-se por ter o corpo alto e levemente comprimido lateralmente. De coloração escura, sendo amarelada no dorso, com o abdômen esbranquiçado. Os rastros branquiais são longos e numerosos, possui dentes robustos, implantados fortemente na mandíbula. Apresenta de 13 a 14 raios peitorais, 30 a 31 raios caudais, nadadeira adiposa raiada e 67 a 76 escamas na linha lateral. Espécie de grande porte que pode alcançar 90 cm de comprimento total e 30 kg de peso (Figura 1). É encontrada livremente a coluna d’água, sendo considerada uma espécie pelágica e abundante nos lagos e rios de águas brancas, claras e pretas (FERREIRA et al, 1993,1998; ISAAC e RUFFINO, 2000; SAINT-PAUL et al, 2000; CLARO-JR., 2003; YAMAMOTO, 2004).



**Figura 1.** Exemplar de tambaqui adulto. Fonte: [www.canaldoprodutor.com.br](http://www.canaldoprodutor.com.br)

### 1.1 Hábito alimentar

Em relação ao pulso anual dos rios, o tambaqui se alimenta preferencialmente de frutos e sementes no período de enchente e cheia, porém em épocas de vazante e seca, consome principalmente zooplâncton. Por esse motivo seu hábito alimentar é comumente definido como onívoro-oportunista (HONDA, 1974; GOULDING e CARVALHO, 1982).

Apresenta variações ontogênicas na alimentação, os indivíduos adultos consomem principalmente frutos, sementes e zooplâncton (GOULDING, 1980; ROUBACH, 1991; SILVA, 1997; ARAÚJO-LIMA e GOULDING, 1998; MERONA e RANKIN-DE-MERONA, 2004), ao passo que os juvenis ingerem principalmente algas filamentosas, arroz silvestre, insetos, cladóceras, copépodos e larvas de quironomídeos (GOULDING e CARVALHO, 1982; ARAÚJO-LIMA e GOULDING, 1998). Algumas vezes macrófitas, insetos, algas, moluscos e peixes são consumidos por indivíduos adultos simultaneamente com os alimentos principais (HONDA, 1974; GOULDING e CARVALHO, 1982).

A dieta dessa espécie na natureza durante a enchente dos rios é composta por pelo menos 133 espécies de árvores, e seus os frutos e/ou sementes são encontrados inteiros ou triturados no conteúdo estomacal (SILVA et al, 2003). A grande disponibilidade de frutos e sementes leva a espécie a incluir em sua dieta uma mistura destes para conseguir melhor equilíbrio de proteína, carboidratos, gorduras e vitaminas (ARAÚJO-LIMA e GOULDING, 1998).

## 1.2 Migração e reprodução

O tambaqui é uma espécie de hábito diurno, migradora, com desova total, fecundação externa que não possui cuidados parentais. As fêmeas iniciam o processo de maturação sexual entre 55 e 61 cm, com idade média entre 3,5 e 5 anos (ARAÚJO-LIMA e GOULDING, 1998). Machos sexualmente maduros já foram encontrados com o comprimento variando entre 62 e 95 cm (VIEIRA et al, 1999).

Em seu estudo Villacorta-Correa e Saint-Paul (1999) não especificaram o gênero, mas relataram que o comprimento da maturidade sexual do tambaqui é de 60,69 cm. Em ambiente natural, o período reprodutivo desta espécie vai de setembro a fevereiro, com desovas concentradas entre os meses de setembro/outubro até janeiro/fevereiro (VILLACORTA-CORREA e SAINT-PAUL, 1999). Na vazante (setembro), o tambaqui se organiza em cardumes para desovar em áreas de pausadas ou vegetação marginal nos rios de águas brancas e a reprodução ocorre na enchente (VILLACORTA-CORREA e SAINT-PAUL, 1999). Sua fecundidade varia de 1 a 1.2 milhões de oócitos (VIEIRA et al, 1999).

Em condições de confinamento o tambaqui perde os estímulos ambientais (áreas para deslocamento, fotoperíodo e temperatura) necessários para a maturação gonadal final e

consequentemente para a reprodução natural, uma vez que é uma espécie reofílica. Desta forma, para sua reprodução em cativeiro são necessárias técnicas de indução à desova. Através dessas técnicas pode-se induzir os peixes a maturação final e liberação dos gametas para a reprodução. O método que utiliza injeções peritoneais de extrato bruto de hipófise de carpa é o mais utilizado na reprodução artificial do tambaqui.

## **2 A aquicultura e a piscicultura**

A aquicultura sustentável desempenha um papel crucial na segurança alimentar e nutricional, proporcionando os meios de subsistência de milhões de pessoas e contribuindo para o bem-estar e prosperidade no mundo. O consumo per capita mundial de pescado aumentou de 9,9 kg (peso vivo) em 1960 para 18,4 kg em 2009 (FAO, 2012). No Brasil, segundo um levantamento preliminar, em 2013 o consumo médio per capita de pescado por habitante/ano foi em torno de 14,5 kg (BRASIL, 2014).

Uma fatia considerável dos peixes consumidos nos países desenvolvidos consiste das importações, e devido à demanda constante e ao declínio da produção pesqueira desses países representado pela queda de 10% no período 2000 a 2010, a sua dependência das importações em especial de países em desenvolvimento está projetada para crescer nos próximos anos (FAO, 2012).

Com 12% da água doce disponível do planeta, um litoral de mais de oito mil quilômetros, o Brasil possui enorme potencial para a piscicultura. Apenas com o aproveitamento de uma fração desta lâmina d'água é possível criar com fartura, e de forma controlada, peixes, crustáceos (camarões, lagostas, etc.), moluscos (mexilhões, ostras, vieiras etc.) e algas, entre outros seres vivos (BRASIL, 2011). Mesmo dispondo de condições favoráveis, de empresas globalmente competitivas no setor de carnes e de um expressivo mercado consumidor potencial, o nosso país não ocupa posição de destaque no mercado mundial de pescados. O setor ainda não está plenamente estruturado, os métodos utilizados tanto na captura quanto no cultivo ainda são muito artesanais, havendo espaço para modernização e desenvolvimento tecnológico (SIDONIO, 2012).

Atualmente o país produz aproximadamente 1,25 milhões de toneladas de pescado, sendo 38% cultivados, a atividade gera um PIB pesqueiro de R\$ 5 bilhões, mobiliza 800 mil profissionais entre pescadores e aquicultores e proporciona 3,5 milhões de empregos diretos e

indiretos (BRASIL, 2011). A previsão é de que até 2030 a demanda internacional de pescado aumente em mais 100 milhões de toneladas por ano, de acordo com a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO, 2012). O Brasil é um dos poucos países que tem condições de atender à crescente demanda mundial por produtos de origem pesqueira, sobretudo por meio da aquicultura, pois em 2030 a produção pesqueira nacional teria condições de atingir 20 milhões de toneladas (FAO, 2012).

Cada região brasileira vem se especializando em determinados tipos de pescado. Na Região Norte predominam peixes como o tambaqui e o pirarucu. No Nordeste a preferência é pela tilápia e pelo camarão marinho. No Sudeste a tilápia tem grande presença na aquicultura. No Sul predominam as carpas, as tilápias, as ostras e os mexilhões. Já no Centro-oeste os destaques são o tambaqui, o pacu e os pintados (BRASIL, 2011).

## 2.1 Importância econômica do tambaqui

O peixe é um dos recursos naturais mais abundantes e consumidos na região Amazônica. Onde se destaca tanto na pesca quanto na aquicultura, pelo seu alto valor comercial e a tradicional preferência do consumidor. O consumo de peixe per capita/ano no Amazonas é de 30 kg, muito superior ao recomendado pela Organização Mundial da Saúde (12 kg/habitante/ano), configurando o primeiro lugar entre os estados do Brasil (BRASIL, 2010). O tambaqui tem sido explorado pela pesca comercial desde o século XIX. No entanto, a produção pela pesca comercial tem sofrido considerável diminuição em virtude do grande esforço de pesca investido no passado (BATISTA e PETRERE JR., 2003). Para suprir a demanda desta espécie, intensos esforços têm sido investidos para o seu cultivo em cativeiro (SANTOS et al, 2006). Segundo o 1º Anuário Brasileiro da Pesca e Aquicultura (2014), as espécies redondas como tambaqui e pacu têm muita força no mercado doméstico, e mesmo tendo espinhos é possível produzir produtos sem espinhos a partir delas, o principal deles é a costelinha de tambaqui, sua parte mais nobre.

Em 2011 o Amazonas atingiu a sétima colocação em produção de pescado da aquicultura continental por Unidade da Federação (BRASIL, 2011). De acordo com o Censo Aquícola Nacional, em 2008 o Brasil possuía mais 4,2 mil unidades produtivas (UP), sendo considerada UP toda unidade aquícola que estivesse em funcionamento em 2008, e cuja

produção destinou-se à comercialização, bem como unidades destinadas à pesquisa e unidades demonstrativas (BRASIL, 2013).

Com a finalidade de comercialização existiam 3.870 UPs, sendo predominante na região Norte. No Norte também foram predominantes as unidades “demonstrativas/pesquisa”, e o Amazonas concentrou 24% das UPs. O cultivo pesque-pague apresentou 372 UPs, que foram observadas de forma mais concentrada nas regiões Sudeste e Centro-Oeste. Em 2011 dentre as espécies nativas de água doce o tambaqui apresentou a maior produção na aquicultura brasileira, sendo ultrapassado somente pela tilápia que é uma espécie exótica (Tabela 2) (BRASIL, 2011). Diante da importância econômica e ecológica, o tambaqui foi selecionado como uma das espécies aquáticas de maior interesse para pesquisa no Brasil (QUEIROZ et al, 2002).

**Tabela 2.** Produção de pescado (t) da aquicultura continental por espécie em 2011.

<b>Espécie</b>	<b>Produção</b>
Bagres - <i>Bagre bagre</i> , <i>Bagre marinus</i> , <i>Bagre panamensis</i> , <i>Bagre pinnimaculatus</i>	7.048,1
Carpa - <i>Cyprinus carpio</i>	38.079,1
Cascudo - <i>Hypostomus spp.</i>	58,0
Curimatã - <i>Prochilodus spp.</i>	7.143,1
Jundiá - <i>Rhamdia spp.</i>	1.747,3
Matrinxã - <i>Brycon amazonicum</i>	5.702,1
Pacu - <i>Metynnis spp.</i> , <i>Myleus spp.</i> , <i>Myloplus spp.</i> , <i>Mylossoma spp.</i>	21.689,3
Piau - <i>Leporinus spp.</i>	4.309,3
Pirarucu - <i>Arapaima gigas</i>	1.137,1
Pirapitinga - <i>Piaractus brachypomus</i>	9.858,7
Piraputanga - <i>Brachyplatystoma vaillantii</i>	265,0
Pintado - <i>Pseudoplatystoma corruscans</i>	8.824,3
Tambacu - <i>Colossoma macropomum</i> (fêmea) + <i>Piaractus mesopotamicus</i> (macho)	49.818,0
Tambaqui - <i>Colossoma macropomum</i>	111.084,1

Tambatinga - <i>Colossoma macropomum</i> (fêmea) + <i>Piaractus brachypomus</i> (macho)	14.326,4
Tilápia - <i>Oreochromis spp.</i>	253.824,1
Traíra - <i>Hoplias malabaricus</i>	926,5
Truta arcoíris - <i>Oncorhynchus mykiss</i>	3.277,2
Outros	5.372,2
<b>TOTAL</b>	<b>544.490,0</b>

Fonte: Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura 2011.

Dentre as principais razões que justificam o cultivo crescente da espécie, destacam-se a facilidade de obtenção de juvenis, bom potencial de crescimento, alta produtividade e rusticidade e grande aceitação pelo mercado consumidor (GOMES et al, 2010). Atualmente muito se tem investido no aperfeiçoamento das técnicas de cultivo, com o objetivo de melhorar o desempenho produtivo e econômico na sua criação. Apesar de tantos esforços, nossos sistemas de produção de peixes em cativeiro ainda estão muito aquém em comparação a países mais desenvolvidos e em relação às outras espécies, principalmente mamíferas (suína, bovina, caprina e ovina) e aves. Portanto, pesquisas que fomentem o desenvolvimento e inovação de tecnologias de produção de peixes em cativeiro são necessárias e urgentes no Brasil.

### 3 Referências Bibliográficas

- ARAÚJO-LIMA, C.A.; GOULDING, M. (1998): **Os frutos do tambaqui: ecologia, conservação e cultivo na Amazônia**. Sociedade Civil Mamirauá. Brasília CNPq, Tefé, Amazonas. 186p. 1998.
- BATISTA, V.S.; PETRERE JR., M. Characterization of the commercial fish production landed at Manaus, Amazonas state, Brazil. **Acta Amazônica**, v. 33, n. 1, p. 53-66. 2003.
- BRASIL MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. **Aquicultura: Potencial Brasileiro**. 2014. Disponível em < <http://www.mpa.gov.br/aquicultura/potencial-brasileiro>>. Acesso em: 28 de julho de 2015.
- BRASIL. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009**. Aquisição alimentar domiciliar per capita. Brasil e Grandes regiões. Rio de Janeiro. 2010. 282 p.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura** 2011. 60 p.

BRASIL. MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. **Censo Aquícola Nacional: Ano 2008**. São Paulo, 2013. 336 p.

CLARO-JR., L. H. **A influência da floresta alagada na estrutura trófica de comunidades de peixes em lagos de várzea da Amazônia Central**. 2003. 61 f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Água Doce e Pesca Interior) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas, 2003.

CORREDOR, M. C. F. **Influência das variações temporais da disponibilidade relativa de habitats sobre a comunidade de peixes em um lago de várzea da Amazônia Central**. 2004. 89 f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Água Doce e Pesca Interior) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas, 2004.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The state of world fisheries and aquaculture 2012**. Fisheries and Aquaculture Department. Rome, 2012. p. 230.

FERREIRA, E. J. G. Composição, distribuição e aspectos ecológicos da ictiofauna de um trecho do rio Trombetas, na área de influência da futura UHE Cachoeira Porteira, Estado do Pará, Brasil. **Acta Amazonica**, 23(1/4) (suplemento): 1-89, 1993.

FERREIRA, E. J. G.; ZUANON, J. A. S.; SANTOS, G. M. **Peixes comerciais do médio Amazonas: Região de Santarém – PA**. Brasília: Edições IBAMA, Coleção Meio Ambiente, Série Estudos Pesca, 1998, 211 pp.

GOMES, L. C.; SIMÕES, L. N.; ARAÚJO-LIMA, C. A. R. M. Tambaqui (*Colossoma macropomum*). Espécies nativas para piscicultura no Brasil, v. 2, p. 175-204, 2010.

GOULDING, M. **The fishes and the forest. Explorations in Amazonian natural history**. University of California Press, Berkeley, 1980, 280 pp.

GOULDING, M.; CARVALHO M. L. **Life history and management of the Tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characidae): An important Amazonian food fish**. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 1, p. 107-133, 1982.

HONDA, E. M. S. Contribuição ao conhecimento da biologia de peixes do Amazonas. II. Alimentação do tambaqui, *Colossoma bidens*. **Acta Amazonica**, v. 4, p. 47-53, 1974.

ISAAC, V. J.; RUFFINO, M. L. **Informe estatístico do desembarque pesqueiro na cidade de Santarém, PA: 1992 – 1993**. In.: Fischer, C. F. (Ed.). Recursos pesqueiros do Médio Amazonas: biologia e estatística pesqueira. IBAMA/GTZ/GOPA, Brasília, 2000, 225-280 p.

MERONA, B.; RANKIN-DE-MERONA, J. Food resource partitioning in a fish community of the central Amazon floodplain. **Neotropical Ichthyology**, v. 2, n. 2, p. 75-84. 2004.

PRIMEIRO ANUÁRIO BRASILEIRO DA PESCA E AQUICULTURA. Florianópolis: Associação Cultural e Educacional Brasil – ACEB, v. 1, jan/ 2014, 136 p.

QUEIROZ, J. F.; LOURENÇO, J. N. P.; KITAMURA, P. C. **Embrapa e a aquicultura: demandas e prioridades de pesquisa**. Brasília, 2002, 36 p.

REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, JR. **Check list of the freshwater of South and Central America**. Porto Alegre, EDIPUCRS, 2003, 729 pp.

ROUBACH, R. **Uso de frutos e sementes de florestas inundáveis na alimentação de *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) (Pisces, Characidae)**.1991. 79 f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Água Doce e Pesca Interior) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas, 1991.

SAINT-PAUL, U. et al. Fish communities in central Amazonian white-and blackwater floodplains. **Environmental Biology of Fishes**, v. 57, p. 235-250, 2000.

SANTOS, G. M.; FERREIRA, E. J. G.; ZUANON, J. **Peixes comerciais do Médio Amazonas - Região de Santarém, PA**. Imprensa Oficial, Brasília, 2006, 211 pp.

SIDONIO, L. et al. **Panorama da aquicultura no Brasil: desafios e oportunidades**. BNDES Setorial–Agroindústria, n. 35, p. 421-463, 2012.

SILVA, J. A. M. **Nutrientes, energia e digestibilidade aparente de frutos e sementes consumidas pelo tambaqui (*Colossoma macropomum* Cuvier, 1818) nas florestas da Amazônia Central**. 1997. 142 f. Tese (Doutorado Biologia de Água Doce e Pesca Interior) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas, 1997.

SILVA, J. A. M.; PEREIRA FILHO, M.; OLIVEIRA-PEREIRA, M. I. Valor energético de espécies vegetais importantes na alimentação do tambaqui. **Acta Amazonica**, v. 33, p. 687-700, 2003.

VIEIRA, E. F.; LSAAC, V. J.; FABRÉ, N. N. Biologia reprodutiva do tambaqui, *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 (Teleostei: Serrasalminidae), no Baixo Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 29, p. 625-638, 1999.

VILLACORTA-CORREA, M. A.; SAINT-PAUL, U. Structural indexes and sexual maturity of tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) (Characiformes: Characidae) in Central Amazon, Brazil. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 59, n. 4, p. 637-652, 1999.

YAMAMOTO, K. C. **A estrutura de comunidades de peixes em lagos manejados da Amazônia Central**. 2004. 71 f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Água Doce e Pesca Interior) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas, 2004.

**Determinação sexual e desenvolvimento gonadal em teleósteos:  
bases para a produção de populações monosexo em peixes.**

Capítulo

2

## 1 Classificação sexual em teleósteos

Quanto ao sexo, os peixes são classificados em três tipos: hermafroditas, unissexuados e gonocóricos. O hermafroditismo é dividido em: sincrônico (simultâneo), quando os óvulos e espermatozóides amadurecem ao mesmo tempo, e assincrônicos (consecutivo), quando o peixe pode exercer as funções exclusivas do sexo masculino ou do sexo feminino a qualquer momento (PIFERRER, 2001). A ocorrência de unissexualidade em peixes é mais rara que a do hermafroditismo, e os exemplos são conhecidos por produzirem apenas descendentes fêmeas. Nos gonocóricos, maioria das espécies de peixes, há separação total do sexo nos indivíduos. Há ainda a classificação dos gonocóricos em indiferenciados ou diferenciados. Nos indiferenciados, a gônada inicia o seu desenvolvimento assemelhando-se a um ovário, mas depois em uma parcela da população esse ovário inicial regride e ocorre o desenvolvimento testicular definitivo, enquanto que no restante do grupo o ovário inicial continua se desenvolvendo normalmente. Um exemplo clássico deste tipo é o zebrafish *Danio rerio* (MAACK e SEGNER, 2003; CHEN e GE, 2013), um peixe muito utilizado como modelo para várias pesquisas em genética de vertebrados (CARROLL e NORTH, 2014; VLIEGENTHART et al, 2014; WAGER et al, 2014). Nos diferenciados, a gônada diferencia-se diretamente em testículo ou ovário (BRASIL, 2004).

## 2 Determinação sexual

Em vertebrados, a formação das gônadas envolve uma série complexa de eventos genéticos, moleculares e celulares que culminam com a formação e atividade (durante a puberdade) de ovários e testículos. E esse complexo processo de formação das gônadas depende fundamentalmente de dois fatores distintos, porém de semelhante importância: o sistema de determinação sexual e o processo de diferenciação sexual. Enquanto o primeiro se refere à soma dos mecanismos genéticos e ambientais que determinam a expressão do sexo de um indivíduo, o segundo corresponde a todas as alterações morfológicas pelas quais uma gônada indiferenciada passa até se consolidar como ovário ou testículo.

Os teleósteos possuem uma extraordinária variedade de mecanismos de determinação do sexo que, em larga escala, podem ser agrupados em determinação sexual genética (GSD, Genetic Sex Determination), determinação sexual ambiental (ESD, Environmental Sex Determination) ou ainda pela combinação de ambos (Tabela 1).

**Tabela 1.** Exemplos de teleósteos com sistema de determinação sexual conhecido.

<b>Espécie</b>	<b>Determinação sexual</b>	<b>Referências</b>
<i>Cyprinus carpio</i>	C	Davidson et al, 2009
<i>Danio rerio</i>	C (ZW/ZZ) – estirpes S; P - estirpes L.	Wilson et al, 2014 Liew et al, 2012
<i>Dicentrachus labrax</i>	P - ⇨ temperatura	Piferrer et al, 2005 Vandeputte et al, 2007
<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	C	Palaiokostas et al, 2013
<i>Leuresthes tenuis</i>	P - ⇨ fotoperíodo	Brown et al, 2014
<i>Odontesthes bonariensis</i>	GSD e TSD	Yamamoto et al, 2014
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	C	Yano et al, 2012
<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	C (XX/XY)	Devlin et al, 1994
<i>Oreochromis aureus</i>	C (WZ/ZZ) - gene autossômico	Desprez e Mélard, 1998 Desprez et al, 2003
<i>Oreochromis hornorum</i>	C (WZ/ZZ)	Lee et al, 2004
<i>Oreochromis niloticus</i>	C (XX/XY) - ⇨ temperatura - gene autossômico	Lee et al, 2004
<i>Oryzias latipes</i>	C (XX/XY)	Tanaka, 1995 Nanda et al, 2002
<i>Paralichthys lethostigma</i>	C (XX/XY) - ⇨ temperatura	Luckenbach et al, 2003
<i>Paralichthys olivaceus</i>	C (XX/XY) - ⇨ temperatura	Yamaguchi et al, 2010
<i>Poecilia reticulata</i>	C	Kavumpurath e Pandian, 1993
<i>Scophthalmus maximus</i>	C (ZZ / ZW)	Martínez et al, 2009 Haffray et al, 2009
<i>Sebastes schlegeli</i>	P - ⇨ temperatura	Ospina-Álvarez e Piferrer, 2008

C - sistema de determinação sexual cromossômico; P - sistema de determinação sexual poligênico; GSD - sistema de determinação sexual genético; ESD - sistema de determinação sexual ambiental; TSD - sistema de determinação sexual dependente da temperatura; Seta significa influência.

## 2.1 Determinação sexual genética

Comumente conhecida pela sigla GSD (Genetic Sex Determination), inclui sistemas monofatoriais e sistemas multifatoriais. Os sistemas monofatoriais também são conhecidos por determinação sexual cromossômica, onde um ou mais pares de cromossomos sexuais determinam o sexo do indivíduo. Nos sistemas multifatoriais, três ou mais fatores determinam o sexo do indivíduo. Esse sistema pode ainda ser classificado como polifatorial ou poligênico, pois o sexo é determinado pela combinação de vários fatores distribuídos ao longo do genoma, difíceis de caracterizar, e cada um com um efeito aditivo. Nestes, não há cromossomos sexuais e podem existir grandes flutuações na proporção sexual entre famílias. Ademais, as interações Genótipo X Ambiente são frequentes nestes casos (PENMAN e PIFERRER, 2008; LIEW et al, 2012).

### 2.1.1 Determinação sexual cromossômica

Implica na presença de cromossomos sexuais, ou seja, um ou mais pares de cromossomos que acumula a maioria dos genes responsáveis pelo desenvolvimento sexual (TAVE, 1993; SHEN e WANG, 2014). Nestes casos, o sexo é determinado no momento da fertilização (resultados da fusão dos cromossomos sexuais oriundos do pai e da mãe). Poucas espécies de peixes, mesmo os gonocóricos, apresentam este tipo de determinação (BEARDMORE et al, 2001), ou ainda, a ausência de heteromorfismo dos cromossomos sexuais dificulta a sua identificação.

Baseados em análises citogenéticas, inversão sexual e cruzamentos controlados, oito sistemas cromossômicos já foram descritos em peixes. Os que já foram descritos variam entre sistemas simples como XX/XY e ZW/ZZ, até os mais complexos, envolvendo mais de um par de cromossomos sexuais ou diferentes números de cromossomos dependendo do sexo (PIFERRER, 2001). Por exemplo, na tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* o sistema de determinação sexual é XX/XY, enquanto que outras espécies de tilápias, apesar da proximidade filogenética, como a tilápia Zanzibar *Oreochromis hornorum* e a tilápia Azul *Oreochromis aureus*, têm seus sexos determinados pelo sistema ZW/ZZ. Nestas espécies, o sexo heterogamético é a fêmea (ZW), ao contrário do que acontece no sistema anterior (PIFERRER, 2001; PANDIAN, 2011). Uma das espécies mais estudadas em relação à determinação sexual é o medaka *Oryzias latipes* (sistema cromossômico heterogamético

masculino, XX/XY), primeira espécie de teleósteo que teve o gene determinante do sexo identificado, o *dmy* (NAGAHAMA, 2005). O medaka é amplamente utilizado em estudos de determinação e diferenciação sexual, e muito do que se sabe hoje sobre a complexa cascata de eventos que ocorrem durante a organização gonadal de peixes foi primeiramente estudado nesta espécie.

### 2.1.2 Determinação sexual poligênica

Na determinação sexual poligênica, também chamada multigênica ou multifatorial, os genes com forte influência sobre a determinação do sexo e/ou diferenciação gonadal estão distribuídos ao longo do genoma, e então a combinação dos seus alelos determina o sexo do indivíduo (LIEW et al, 2012). Além disso, as proporções sexuais podem variar durante sucessivas ninhadas provenientes dos mesmos pais (PIFERRER, 2001; LIEW et al, 2012).

Liew e colaboradores (2012) investigando a determinação sexual em zebrafish não encontraram cromossomos sexuais aparentes (heteromórficos). Mas analisando a proporção sexual de um grande número de famílias observaram que: 1) as proporções sexuais variavam entre diferentes famílias; 2) os parentais tiveram um grande efeito sobre a proporção entre os sexos, mostrando que esta espécie possui características de uma determinação sexual poligênica. Entretanto, um recente estudo identificou o sistema cromossômico ZW/ZZ no zebrafish selvagem (WILSON et al, 2014). Os autores concluem que durante duas décadas de cultura em laboratório a linhagem hoje utilizada perdeu os cromossomos sexuais durante a evolução e seleção restritiva e tem o sistema polifatorial de determinação sexual.

## 2.2 Determinação sexual ambiental

Este é outro exemplo de sistema polifatorial, onde fatores ambientais, tais como temperatura, fotoperíodo, salinidade ou densidade da população, possuem grande influência no processo de determinação sexual. Os genes envolvidos no processo de determinação sexual são difíceis de caracterizar, e cada um apresenta um efeito aditivo. Nas espécies com determinação sexual ambiental ESD (Environmental Sex Determination), onde não existem diferenças genéticas consistentes entre os sexos, o sexo é determinado após a fertilização (VALENZUELA et al, 2003; SARRE et al, 2004; VALENZUELA, 2008).

Embora algumas espécies tenham sido identificadas como ESD, e mais especificamente TSD (Temperature Sex Determination, determinação sexual dependente da temperatura), Ospina-Álvarez e Piferrer (2008) mostraram que: 1) determinação sexual influenciada pela temperatura é menos comum do que se pensava anteriormente; sendo que em muitos casos onde é atribuído TSD, as temperaturas utilizadas em laboratório não são relevantes ecologicamente; 2) em contraste com os répteis, os peixes têm apenas um único padrão de proporção sexual quando do aumento da temperatura: mais machos na população; 3) algumas populações sensíveis ao aumento da temperatura (verdadeiros TSD) poderão servir como modelos de previsão para a magnitude do aquecimento global.

O peixe-rei *Odontesthes bonariensis* é um excelente modelo para o estudo de determinação sexual dependente da temperatura. Nesta espécie, a proporção sexual pode chegar a 100% de machos ou 100% de fêmeas em temperaturas ambientais de 29 e 17°C, respectivamente (YAMAMOTO et al, 2014). Acredita-se que a masculinização devido a altas temperaturas ocorre via cortisol, que é um indicativo de stress (FERNANDINO et al, 2013). Este padrão (em que altas temperaturas são masculinizantes) é observado também em exemplares de atherinídeos, poecilídeos, ciclídeos, pleuronectídeos e ciprinídeos (OSPINA-ÁLVAREZ e PIFERRER, 2008).

Algumas espécies, como as tilápias do Nilo e Azul, embora consideradas com determinação sexual cromossômica, como descrito anteriormente, podem também sofrer forte influência da temperatura na diferenciação sexual de suas gônadas (BAROILLER et al, 2009). Fêmeas (XX) de *Oreochromis niloticus* podem ser completamente induzidas a machos funcionais se mantidas em altas temperaturas (acima de 34°C) durante um período crítico da diferenciação sexual (D'COTTA et al, 2001; BAROILLER et al, 2009; POONLAPHDECHA et al, 2013; WESSELS et al, 2014). E em *Oreochromis aureus* até 100% de machos podem ser obtidos com temperaturas elevadas (DESPREZ e MÉLARD, 1998). Ou seja, provavelmente nestas espécies existe um ou mais fatores, ou genes autossômicos suscetíveis a condições ambientais específicas que exercem forte influência na diferenciação sexual dos indivíduos, chegando até se sobrepor ao comando do(s) gene(s) determinante(s) do sexo presentes nos cromossomos sexuais.

### 3 Diferenciação sexual

A diferenciação sexual foi demonstrada inicialmente por Padoa (1937) em truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss*, e se refere aos os eventos morfológicos que ocorrem durante o desenvolvimento gonadal que permitem a expressão do sexo genético para o sexo fenotípico apropriado. Segundo Bruslé e Bruslé (1983), a diferenciação de sexo abrange todos os eventos que ocorrem na gônada primordial, incluindo a migração de células germinativas primordiais, o estabelecimento de cristas gonadais e a diferenciação das gônadas em testículos ou ovários.

A diferenciação sexual ocorre primeiro nas fêmeas com a entrada da oogônia em meiose e/ou a proliferação de células somáticas para formar a cavidade do ovário (BRUSLÉ e BRUSLÉ, 1983), já nos machos a diferenciação sexual ocorre mais tarde e é caracterizada pelo aparecimento das espermatogônias, o arranjo das células germinativas e células somáticas em cistos e a diferenciação do sistema vascular do testículo, incluindo a veia testicular, a artéria testicular e os canais deferentes (PIFERRER, 2001). Normalmente, o genótipo feminino dá origem a um fenótipo feminino, da mesma forma que o sexo masculino é produto do genótipo masculino. No entanto, como apontado por Adkins-Regan (1987), em alguns animais, particularmente em vertebrados inferiores, a diferenciação sexual pode ser tão facilmente alterada por fatores ambientais que o sexo fenotípico resultante pode diferir do sexo genético.

#### 3.1 Tipos de diferenciação sexual

A diferenciação sexual em peixes pode seguir duas estratégias diferentes. A primeira é das espécies diferenciadas, onde a gônada se diferencia diretamente em um ovário ou em um testículo. Os exemplos de espécies de teleósteos onde já se conhece o processo de diferenciação sexual estão listados na Tabela 2. A natureza do indutor da diferenciação sexual é de suma importância, e ainda não houve acordo quanto ao modelo que explica satisfatoriamente o processo de diferenciação sexual em vertebrados não mamíferos, mas as investigações de Piferrer e colaboradores (1994), Nakamura e colaboradores (1998), Guiguen e colaboradores (1999), Gonzalez e Piferrer (2000), Nagahama (2000) e Vizziano-Cantonet e colaboradores (2011) são as melhores evidências obtidas para sustentar a ideia de que os esteroides sexuais são, de fato, os indutores naturais da diferenciação sexual em peixes. Os esteroides sexuais atuam através de receptores específicos em células alvo.

**Tabela 2.** Exemplos de teleósteos com o tipo de diferenciação sexual conhecido.

<b>Espécie</b>	<b>Diferenciação sexual</b>	<b>Referências</b>
<i>Abramis brama</i>	Direta	Talikina, 1995
<i>Anguilla anguilla</i>	Direta	Geffroy et al, 2013
<i>Barbus tetrazona</i>	Indireta	Takahashi e Shimizu, 1983
<i>Cyprinus carpio</i>	Direta	Komen et al, 1992
<i>Danio reio</i>	Indireta	Chen e Ge, 2013 Carroll e North, 2014 Vliegthart et al, 2014 Wager et al, 2014
<i>Dicentrachus labrax</i>	Direta	Blázquez et al, 1998
<i>Esox masquinongy</i>	Direta	Lin et al, 1997
<i>Oncorhynchus kistuch</i>	Direta	Piferrer e Donaldson, 1989
<i>Oncorhynchus mykis</i>	Direta	Takashima et al, 1980
<i>Sebastes schlegeli</i>	Direta	Lee et al, 1996

#### **4 Diferenças de desempenho zootécnico entre sexos em peixes**

Em animais, geralmente existe uma variação fenotípica entre machos e fêmeas da mesma espécie, principalmente na fase adulta (pós-púbere). Na piscicultura, essa diferença pode representar ganhos econômicos significativos, ou seja, pode haver uma agregação de valor ao produto se forem produzidos somente indivíduos do sexo com superioridade zootécnica. Dependendo da espécie, existem diferentes características fenotípicas que fundamentam a produção de populações monosexo de peixe em pisciculturas comerciais. Tais características podem estar relacionadas com a taxa de crescimento, tempo de maturação e idade, a forma ou coloração do corpo ou a composição da carcaça (ARAI, 2001; CNAANI e LEVAVI-SIVAN, 2009). Mesmo quando não há diferenças significativas entre os sexos nessas características economicamente importantes, os estoques monosexo podem ser vantajosos em determinadas espécies a fim de evitar a reprodução em cativeiro descontrolada, que resulta em lotes desuniformes e, portanto de baixo valor comercial (CNAANI e LEVAVI-

SIVAN, 2009, TURRA et al, 2010). Além disso, em algumas espécies de teleósteos altas incidências de brigas e de doenças estão relacionadas com a puberdade (TARANGER et al, 2010). O controle do sexo em peixes é um procedimento relativamente simples e de fácil sucesso. Isso porque a diferenciação de ovários e testículos em peixes é muito tardia e altamente suscetível a esteroides. Em comparação com os mamíferos, a via de diferenciação sexual em peixes é um processo relativamente flexível e pode ser afetado e modificado por vários fatores endógenos e exógenos (DEVLIN e NAGAHAMA, 2002).

Yamamoto (1969) postulou que para a inversão sexual eficaz, os esteroides sexuais devem ser administrados antes de qualquer sinal de diferenciação gonadal, em uma dose relacionada com a espécie tratada e com a natureza do esteróide, e que a administração do hormônio deve ser continuada até depois da época em que a diferenciação sexual normalmente ocorre. Andrógenos e estrógenos mimetizam os efeitos dos esteroides sexuais endógenos, direcionando, assim, o desenvolvimento das gônadas para testículos e ovários, respectivamente (DESPREZ et al, 2006). Os hormônios androgênicos são usados também para a esterilização de indivíduos, se administrados em concentrações relativamente altas (PIFERRER, 2001). Para a inversão sexual de peixes, o andrógeno mais utilizado para masculinização é a  $17\alpha$ -metil-testosterona, e entre os estrógenos o  $17\beta$ -estradiol é o mais empregado para feminização (CNAANI e LEVAVI-SIVAN, 2009). A inversão do sexo nem sempre é 100% efetiva, e pode ainda ser um processo de difícil sucesso em determinadas espécies. Nestes casos, o desenvolvimento de estoques com a totalidade de indivíduos pertencentes a apenas um sexo pode ser feito pela combinação destas técnicas com cruzamentos específicos (BOMBARDELLI e HAYASHI, 2005; DESPREZ et al, 2006), conforme detalhado adiante.

O primeiro trabalho experimental de inversão sexual de peixes foi realizado por Yamamoto (1958) utilizando o medaka *Oryzias latipes*. No âmbito de espécie de valor comercial, o primeiro relato de produção de população monosexo em peixes foi realizado com salmonídeos na década de 80 (DONALDSON e HUNTER, 1982), quando lotes exclusivos de fêmeas foram produzidos. Hoje, mais de 60 espécies de teleósteos distribuídas em 16 famílias já foram invertidas sexualmente com o uso de esteroides sexuais (aproximadamente 16 andrógenos e 12 estrógenos) (PIFERRER, 2001), e em ao menos 20 espécies de importância comercial tem sido usada população monosexo de fêmeas (Tabela 3).

**Tabela 3.** Espécies em que há produção monosexo (comercial ou experimentalmente).

<b>Espécie</b>	<b>Gênero</b>	<b>Vantagem</b>	<b>Referências</b>
<i>Anguilla anguilla</i>	F	Maior crescimento	Tzchori et al, 2004
<i>Betta splendens</i>	M	Coloração e nadadeiras	Kirankumar e Pandian, 2002
<i>Cyprinus carpio</i>	F	Valor de ovos (oócitos)	Kocour et al, 2003
<i>Dicentrarchus labrax</i>	F	Crescimento 20-50% maior	Navarro-Martín et al, 2009
<i>Epinephelus marginatus</i>	M	Escassez de reprodutores	Sanches et al, 2009
<i>Gadus morhua</i>	F	Qualidade da carne	Lin et al, 2012
<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	F	Maior crescimento	Hendry et al, 2003
<i>Ictalurus punctatus</i>	M	Crescimento 10-30% maior	Dunham et al, 2001
<i>Lepomis macrochirus</i>	M	Maior crescimento	Wang et al, 2008
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	F	Qualidade da carne	Bye e Lincoln, 1986 Kuzminski e Dobosz, 2010 Razmi et al, 2011
<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	F	Qualidade da carne	Hunter et al, 1983
<i>Oreochromis sp.</i>	M	Maior crescimento Evitar a reprodução	Drummond et al, 2009 Turra et al, 2010.
<i>Paralichthys lethostigma</i>	F	Maior crescimento	Luckenbach et al, 2003
<i>Poecilia latipinna</i>	M	Nadadeira dorsal	Kavitha e Subramanain, 2011
<i>Poecilia reticulata</i>	M	Coloração; nadadeira caudal	Kavumpurath e Pandian, 1993
<i>Pomoxis nigromaculatus</i>	M	Maior crescimento	Arslan e Fhelps et al, 2004
<i>Puntius gonionotus</i>	F	Maior crescimento	Pongthana et al, 1999
<i>Rhamdia quelen</i>	F	Crescimento 20-30% maior	Junior et al, 2008
<i>Salmo salar</i>	F	Qualidade da carne	Simpson et al, 1976 Lee et al, 2004
<i>Scophthalmus maximus</i>	F	Maior crescimento	Imsland et al, 1997

## 5 Espécies em que há produção de população monosexo

São vários os exemplos de características zootécnicas desejáveis que justificam a produção de lotes monosexuados em peixes de valor comercial. Na produção de peixes ornamentais, por exemplo, o interesse maior está na produção de linhagens monosexo de machos, que são apreciados pela presença de nadadeiras de visual atrativo e/ou coloração intensa. A produção monosexo de machos ornamentais já é praticada para o betta *Betta splendens* (KIRANKUMAR e PANDIAN, 2002) e para o guppy *Poecilia reticulata* (KAVUMPURATH e PANDIAN, 1993). A inversão sexual tem sido também utilizada para manejo de reprodutores. Um exemplo interessante é a criação da garoupa verdadeira *Epinephelus marginatus*. A espécie é hermafrodita protogínica, ou seja, matura inicialmente como fêmea e, em determinado momento sofre uma inversão sexual, tornando-se macho. Nesse serranídeo a mudança de sexo é sócio demograficamente controlada (SANCHES et al, 2009). A ausência de indivíduos jovens pode fazer com que fêmeas nunca iniciem o processo de inversão, em razão da complexidade do processo de inversão sexual. Na busca por alternativas para contornar este problema, a andronização de fêmeas em cativeiro tem-se demonstrado extremamente viável para a obtenção de reprodutores machos no plantel (SANCHES et al, 2009).

Na produção de peixes de corte são raros os casos em que os machos sejam mais vantajosos que as fêmeas. Nas espécies de tilápias, os machos apresentam crescimento mais rápido, devido a diferenças fisiológicas específicas, além de serem espécies altamente prolíferas nos tanques de piscicultura. Por isso, a criação de linhagens monosexo masculinas em tilápia é amplamente praticada em vários países, inclusive no Brasil, levando à obtenção de boas taxas de crescimento, evitando a reprodução em cativeiro e consequentemente produzindo lotes uniformes na despesca (TACHIBANA et al, 2004; BOMBARDELLI et al, 2007; TURRA et al, 2010; ZANONI et al, 2013). Com exceção de poucos exemplos, na maioria dos peixes de corte as fêmeas representam o gênero mais rentável por apresentarem crescimento mais acelerado. Esse fato explica os estudos voltados à produção de populações de fêmeas em linguado do sul *Paralichthys lethostigma* nos Estados Unidos, enguia europeia *Anguilla anguilla* em Israel, robalo *Dicentrarchus labrax* na Espanha e França, bacalhau *Gadus morhua* na Noruega e Canadá, alabote *Hippoglossus hippoglossus* na Noruega, Canadá e Escócia, sargo *Lepomis macrochirus* nos Estados Unidos, crappie *Pomoxis nigromaculatus* nos Estados Unidos e *Puntius gonionotus* na Austrália (Tabela 3).

O grupo dos salmonídeos, já amplamente estudado, apresenta características bem semelhantes entre eles. Durante o período da maturidade sexual, ocorre uma deterioração da qualidade da carne, reduzindo drasticamente o preço do produto. Nestas espécies, as fêmeas têm maturação sexual mais tardia que os machos, resultando em crescimento mais acelerado. Neste caso, a produção de populações monosexo femininas tem sido amplamente utilizada (principalmente nas fazendas de truta e salmão), permitindo um melhor manejo do estoque e tornando a produção mais lucrativa, tanto pela qualidade da carne quanto pela terminação precoce (SOLAR et al, 1994; DONALDSON, 1996; TARANGER et al, 2010).

Outra indicação e uso de lotes femininos se baseia na produção de ova. Em Israel, o governo produz populações monosexo de carpa comum *Cyprinus carpio* e as distribui para os produtores, para produção de ova, que é um produto altamente valorizado naquele país (GOMELSKY et al, 1994; KOCOUR et al, 2003; ROTHBARD, 2006). Em relação a espécies nativas brasileiras, as fêmeas de jundiá *Rhamdia quelen* e de tambaqui *Colossoma macropomum* crescem em torno de 20 a 30% (JUNIOR et al, 2008; ALMEIDA et al, 2014) mais que os machos, respectivamente, ao momento do abate. Por isso, nestas espécies brasileiras idealiza-se a população monosexo de fêmeas para aumento da rentabilidade da atividade.

## **6 Métodos para produção de população monosexo**

A produção de lotes monosexo de peixes pode ser obtida por manipulações genéticas, como ginogênese e triploidia, ou com o uso de esteróides sexuais. Ainda, em algumas espécies de peixe a masculinização é feita com a administração de inibidores de aromatase (por exemplo, Fradozole). A inibição da aromatase, e consequente o bloqueio da conversão de andrógenos a estradiol, resulta em uma masculinização mais próxima à fisiológica se comparado à administração direta de andrógenos. Entretanto, devido a esta ampla diversidade de procedimentos nos restringiremos a discutir o tratamento com hormônios, por ser o método mais utilizado atualmente.

A formação de populações monosexuadas de peixes com o uso de hormônio pode ser obtida pelo método direto - em uma etapa, ou indireto - em duas ou mais etapas. O método direto pode ser utilizado em qualquer espécie de peixe, independentemente do sistema de determinação sexual. Sua simplicidade representa a principal vantagem do método direto e

explica seu frequente uso na maioria das espécies onde pretende-se obter populações monosexuadas de peixes (PIFERRER, 2001). Entretanto, existe uma associação negativa da aquicultura com essas práticas de administração hormonal, e em alguns países (principalmente europeus) há uma preocupação sobre a comercialização (e consumo) de peixes que foram tratados com esteróides sexuais. É importante ter consciência que os peixes cujo fenótipo sexual foi manipulado não podem se tornar parte de um programa de melhoramento, uma vez uma parcela das fêmeas possui genótipo de machos ou vice-versa.

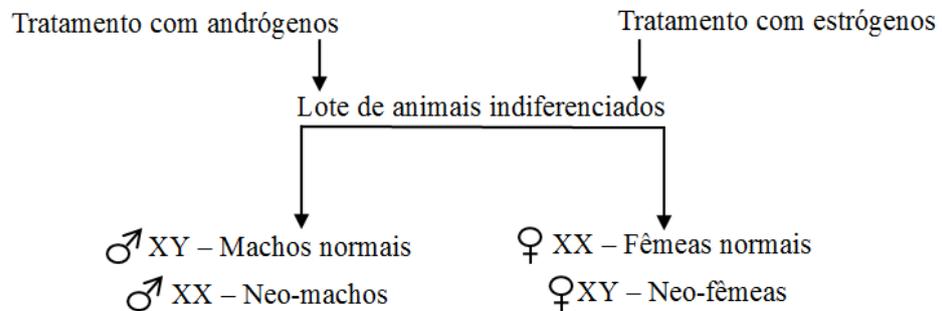
Já o método indireto é adequado apenas para as espécies em que seja conhecido o sistema de determinação sexual, que, ademais, deve ser cromossômico simples, como XX/XY ou ZW/ZZ, para o sucesso da técnica. O método indireto é mais demorado, pois são necessárias duas ou mais etapas de cruzamentos para obtenção dos lotes monosexuados. A grande vantagem, porém, é que os peixes dos lotes monosexuados não recebem hormônio. Uma vez alcançado o lote de reprodutores (invertidos), a produção de lotes monosexuados é constante e assim somente reposições temporárias dos parentais se fazem necessárias (ver exemplos a seguir) (PIFERRER, 2001; DEVLIN e NAGAHAMA, 2002, BRASIL, 2004).

Para fins do controle do sexo, seja pelo método direto ou indireto, três formas de administração dos hormônios podem ser usadas: 1) tratamento dietético, como incorporação na ração; 2) banhos de imersão; 3) injeções, que é a via menos utilizada devido à dificuldade de aplicação (PIFERRER, 2001).

### 6.1 Método direto para produção de lotes monosexo

Nesse método é realizado o tratamento hormonal durante as fases iniciais de desenvolvimento larval, para a produção do sexo fenotípico desejado no próprio lote que recebe o tratamento (Figura 1) (BOMBARDELLI et al, 2007). As larvas e/ou alevinos devem ser alimentados com ração contendo andrógenos ou estrógenos, ou mantidos por certo tempo em água contendo concentrações diluídas destes hormônios (BRASIL, 2004). Se aplicado corretamente, o método direto é considerado seguro: 1) por utilizar doses baixas; 2) pela curta duração do tratamento (pode variar entre dias, semanas ou no máximo dois meses); 3) pelo fato do tratamento ser precoce (e portanto terminar muito antes do abate); 4) pela rápida eliminação dos hormônios (os peixes eliminam cerca de 100% do hormônio em questão de 3-4 semanas após o final de tratamento). No entanto, o método direto implica em riscos de

contaminação da água e do solo e a necessidade de alta qualificação de funcionários para a manipulação e manejo do hormônio.



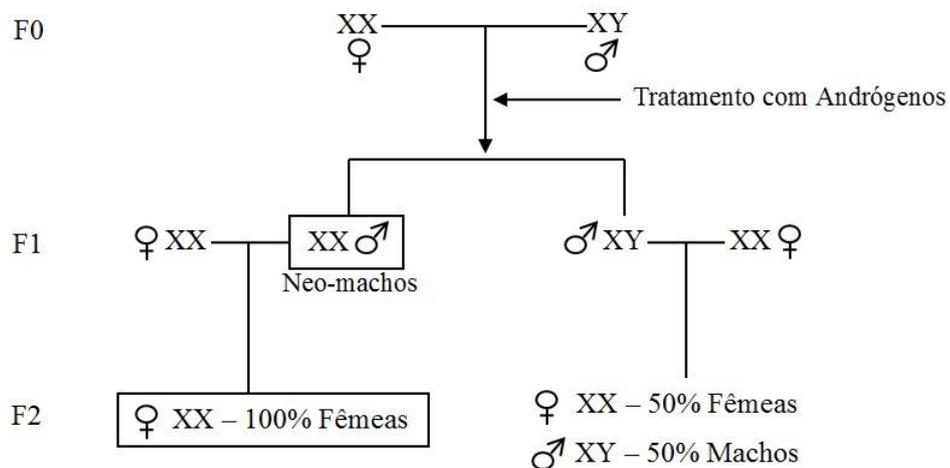
**Figura 1.** Diagrama ilustrando o método direto para produção de lotes monosexo em teleósteos. Símbolos indicam o sexo fenotípico (♀ feminino e ♂ masculino) e letras indicam o sexo genético (XX feminino e XY masculino).

## 6.2 Método indireto para produção de lotes monosexo feminino em espécies XX/XY

Nas espécies XX/XY as fêmeas são homogaméticas e linhagens monosexuadas de fêmeas podem ser produzidas em duas etapas. Na primeira, ocorre o tratamento de peixes sexualmente indiferenciados com andrógenos, tornando todos os animais machos fenotípicos. Os machos genéticos continuam do sexo masculino, mas as fêmeas genéticas tornam-se machos fenotípicos, também chamados neo-machos, pois apresentam todo o fenótipo masculino, inclusive com produção de sêmen. Entretanto, por serem geneticamente fêmeas, produzem somente espermatozoides contendo cromossomo sexual X, e isso resulta em prole 100% de fêmeas quando cruzados com fêmeas normais (XX), como mostra a Figura 2.

Como não é possível separar os neo-machos (XX) dos machos normais (XY) pelas suas características sexuais externas, marcadores sexuais genéticos ou cariotipagem são utilizados para a identificação dos neo-machos. Na ausência de marcador ou impossibilidade de realizar a cariotipagem dos machos, pode ser feito um teste de progênie (PIFERRER, 2001, BRASIL, 2004). O teste consiste no cruzamento entre casais de fêmeas normais e machos tratados hormonalmente (mistura de machos e neo-machos), identificados individualmente. Cada família é então criada separadamente até que a descendência possa ser sexada. Caso a descendência se mostre constituída por 50% de fêmeas e 50% de machos, o macho parental é XY e deve ser descartado. Se, por outro lado, a descendência for 100% fêmeas, então o macho parental testado é um neo-macho (portanto XX) e deve ser mantido como reprodutor

para a produção de sucessivas linhagens de fêmeas (HUNTER e DONALDSON, 1983; BLÁZQUEZ et al, 1999). Uma vez alcançado um estoque genotípico e fenotípico desejado, é relativamente fácil de manter a produção, com a masculinização anual de uma pequena porção da própria prole (100% XX) para fornecer mais neo-machos, fechando assim o ciclo de produção. Embora inicialmente tedioso e demorado, o método indireto tem a vantagem dos peixes comercializados não serem tratados com esteróides. Este método já é utilizado há muito tempo em escala comercial no cultivo de fêmeas de truta arco-íris, no Reino Unido (BYE e LINCOLN, 1986) e de salmão no Canadá (DONALDSON, 1986).

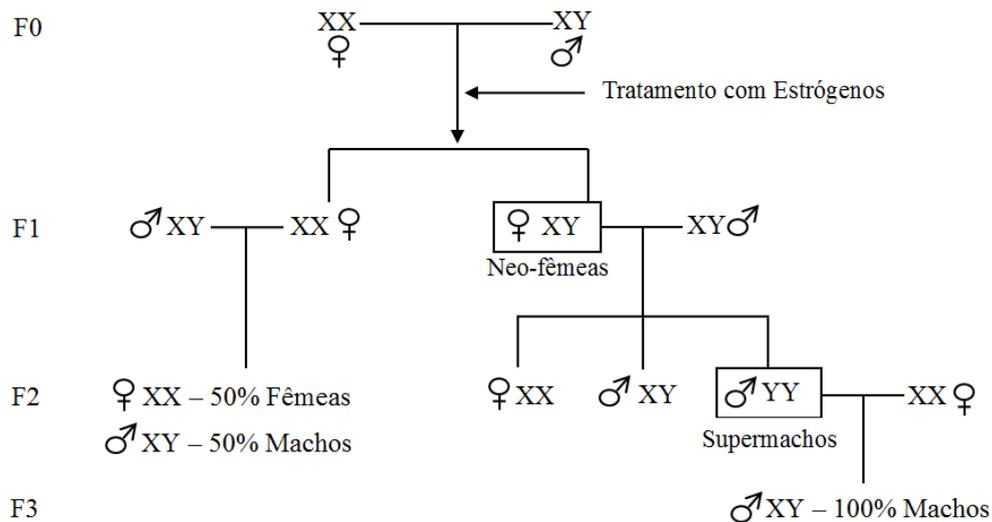


**Figura 2.** Diagrama ilustrando o método indireto para produção de lotes monosexo feminino em espécies XX/XY. Símbolos indicam o sexo fenotípico (♀ feminino e ♂ masculino) e letras indicam o sexo genético (XX feminino e XY masculino). Adaptado de Piferrer (2001).

### 6.3 Método indireto para produção de lotes monosexo masculino em espécies XX/XY

A obtenção de linhagens monosexo de machos em espécies XX/XY pode ser feita por meio da produção de matrizes de supermachos (machos que são YY ao invés de XY). É um dos mais eficientes métodos de produção de machos, porém, em contrapartida, é um método demorado, pois a obtenção do reprodutor YY demanda três descendências (Figura 3). A primeira etapa consta do tratamento das larvas sexualmente indiferenciadas com estrógenos, com a finalidade de produzir neo-fêmeas ou fêmeas invertidas (XY). Ao fazer a sexagem, verifica-se que os peixes tratados com hormônio são todas fêmeas, porém distribuídas em duas categorias: fêmeas invertidas (XY) e fêmeas normais (XX) (PIFERRER, 2001). Por marcador genético ou cariotipagem (ou em último caso, o teste de progênie), identificam-se as neo-fêmeas, que passam para a segunda etapa: o cruzamento com machos

normais, que resulta na produção de 75% de machos. Dentre esses 75% de machos, 50% são machos normais XY e 25% são os machos de interesse - YY, os supermachos (BRASIL, 2004). O posterior cruzamento de supermachos com fêmeas normais dará origem a proles inteiras de machos (XY), conforme mostra a Figura 3.



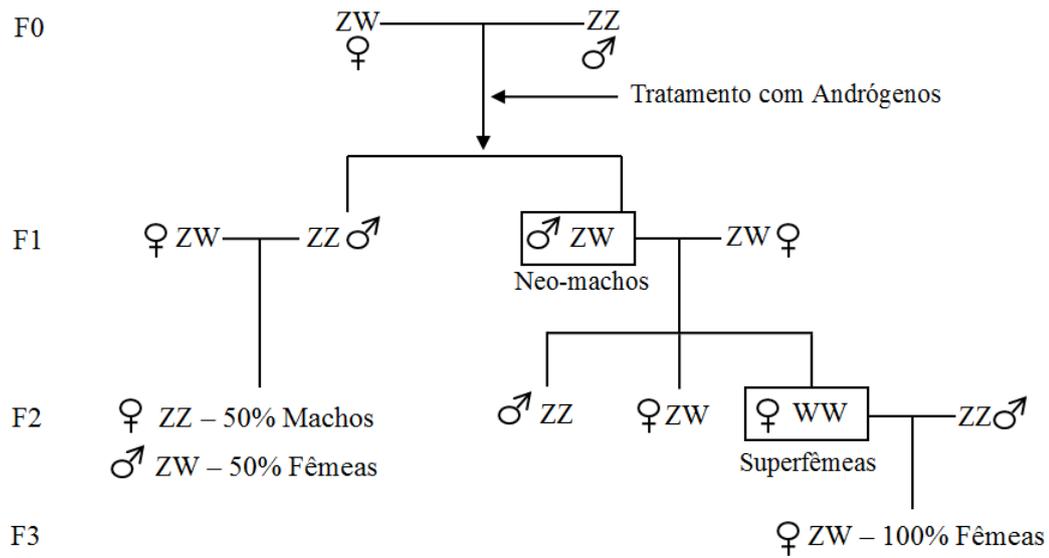
**Figura 3.** Diagrama ilustrando o método indireto para produção de lotes monosexo masculino em espécies XX/XY. Símbolos indicam o sexo fenotípico (♀ feminino e ♂ masculino) e letras indicam o sexo genético (XX feminino e XY masculino). Adaptado de Piferrer (2001).

Este método de produção é chamado de supermachos e é utilizado em tilápias do Nilo, em que matrizes de supermachos podem ser produzidas pela combinação das biotecnologias de inversão sexual, ginogênese e temperatura da água, já que são espécies com sistema de determinação do sexo tipo XX/XY com influência da temperatura (TURRA et al, 2010). A mesma forma de obtenção de machos já foi descrita para o guppy (KAVUMPURATH e PANDIAN, 1993).

#### 6.4 Método indireto para produção de lotes monosexo feminino em espécies ZW/ZZ

Para a produção indireta de lotes de fêmeas nas espécies em que a fêmea é heterogamética, deve ocorrer a produção de matrizes superfêmeas (WW). Para sua obtenção, realizam-se três etapas, sendo as mesmas para obtenção dos supermachos YY, seguindo os mesmos procedimentos, porém com hormônios diferentes (BRASIL, 2004). Nas etapas em que era utilizado esteróide feminilizante usa-se masculinizante (andrógenos), como mostra a

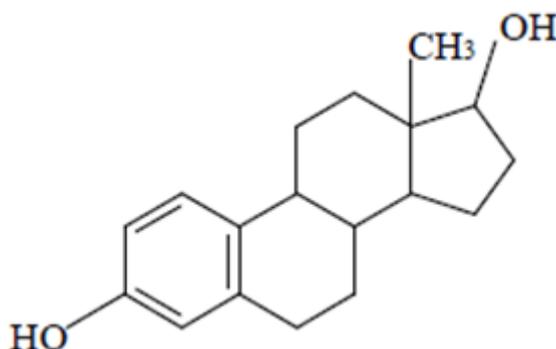
Figura 4. Se necessários, os testes de progênie também são os mesmos, para identificação das superfêmeas. A produção de superfêmeas para obtenção de lotes de fêmeas já foi realizado na tilápia Azul (DESPREZ et al, 2003) e no ornamental molinésia negra *Poecilia sphenops* (GEORGE E PANDIAN, 1998).



**Figura 4.** Diagrama ilustrando o método indireto para produção de lotes monosexo feminino em espécies ZW/ZZ. Símbolos indicam o sexo fenotípico (♀ feminino e ♂ masculino) e letras indicam o sexo genético (XX feminino e XY masculino). Adaptado de Piferrer (2001).

## 7 O 17β-estradiol (E<sub>2</sub>)

O estrogênio ovariano biologicamente mais potente é o 17β-estradiol (E<sub>2</sub>), que está relacionado ao desenvolvimento das características secundárias sexuais femininas e à reprodução (IKEHATA et al, 2006). Possui 18 carbonos com um anel fenólico (Figura 5) que é o componente estrutural responsável pela alta afinidade em ligar-se ao receptor de estrogênio e elucidar a resposta estrogênica (HUBER et al, 2003). Dessa forma, processos que sejam capazes de alterar o anel fenólico tendem a ser efetivos na remoção do seu potencial estrogênico.



**Figura 5.** Estrutura química do 17β-estradiol.

Por ser um potente estrogênio, o E<sub>2</sub> pode causar alterações nos sistemas endócrinos de organismos vivos mesmo em baixas concentrações na água, da ordem de ng/L (SUMPTER, 2005). As características físico-químicas que mais influenciam no comportamento dessas substâncias são: a solubilidade em água, natureza hidrofóbica estimada pela constante de partição octanol: água, pressão de vapor e a constante de sorção. Na Tabela 4 são apresentadas algumas propriedades físico-químicas desse estrógeno de acordo com Feng e colaboradores (2005) e Ying e colaboradores (2002).

**Tabela 4.** Propriedades físico-químicas do 17β-estradiol (E<sub>2</sub>)

Parâmetro	17β-estradiol (E <sub>2</sub> )
Fórmula Molecular	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>
Massa Molar (g/mol)	272,4
Ponto de Ebulição (°C)	178-179
Massa Específica (20°C)	1,170
Solubilidade (mg/L) (a 20°C)	13
Pressão de Vapor (mm Hg)	2,3.10 <sup>-10</sup>
LogKow (coeficiente de partição octanol água)	3.1
Koc (coeficiente de sorção)	3300
Meia-Vida (dias)	2 -3

## 8 Riscos ambientais

Coletivamente conhecidos como “endocrine-disrupting chemicals” (EDC), os desreguladores endócrinos representam uma gama extensiva de substâncias e podem ser

produtos naturais, como os fitoestrogênios (isoflavonas, lignanos e coumestanos), produzidos pelas próprias plantas e bastante comuns em produtos de origem animal e vegetal, ou compostos químicos sintéticos (xenoestrogênios), na sua grande maioria organoclorados, empregados nos mais variados usos industriais, comerciais e domésticos (detergentes surfactantes, resinas, aditivos e monômeros utilizados na produção de plásticos) (FERREIRA, 2008). Os hormônios presentes em cosméticos e anabolizantes utilizados em rações animais também são considerados desreguladores endócrinos (ALVES et al, 2007). Os compostos químicos exógenos interferem na atividade hormonal pela ativação de receptores (MAIA e DEZOTTI, 2007)

Os estrogênios têm sido classificados como os maiores contribuintes, dentre os desreguladores endócrinos, em provocar alterações endócrinas em organismos presentes em águas superficiais (GOMES et al, 2004). Isso ocorre porque os estrogênios naturais e sintéticos são efetivos em níveis de ng/L, enquanto que a maioria dos compostos químicos apresenta atividade estrogênica em níveis de µg/L e o sistema hormonal dos organismos é estimulado por baixíssimas concentrações de esteróides, da ordem de partes por bilhão (ppb) ou partes por trilhão (ppt) (NOGUEIRA, 2003).

Os efeitos desencadeados pelos hormônios dispostos no ambiente atingem desde microinvertebrados até grandes vertebrados, sendo amplamente relatados na literatura científica e considerados como uma questão de âmbito global (REIS-FILHO et al, 2006). Vários efeitos têm sido atribuídos à exposição a esses compostos, tais como a diminuição do volume seminal nos homens, o aumento de câncer de mama em mulheres e o aumento de certas anormalidades no sistema reprodutivo humano (LAGANÀ et al, 2004). Em peixes, foram observados efeitos como feminização e inversão sexual, inibição do crescimento testicular, inibição da espermatogênese, decréscimo da capacidade de fertilização dos ovos pela redução da produção dos hormônios sexuais masculinos e alteração no comportamento reprodutivo (MILLS e CHICHESTER, 2005; SUMPTER, 2005).

A presença de E<sub>2</sub> em rios e na água para abastecimento humano é cada vez mais frequente. O E<sub>2</sub> foi detectado em uma fonte de água nos EUA na concentração de 17 ng/L, em Taiwan na ordem de 1,4 a 33,9 ng/L em águas superficiais, no Brasil no afluente de uma estação de tratamento de água (ETA) convencional na ordem de 3,0 a 9,1 ng/L e na água de abastecimento humano com concentração de 0,78 a 1,48 ng/L e em mananciais de Belo

Horizonte e São Paulo com concentrações de 1,5 a 36,8 ng/L e 0,72 a 17,1 ng/L respectivamente (CHEN et al, 2007; GEROLIN, 2008; MIERZWA et al, 2009). A atividade dos desreguladores endócrinos no meio ambiente tem sido largamente estudada por meio de trabalhos realizados em diversos países. Essas substâncias tem sido encontradas em afluentes e efluentes de ETA, de Estações de Tratamento de Esgoto (ETE), lodo biológico das ETE, em sedimentos marinhos e solos e nas águas superficiais, subterrâneas e potáveis (FERREIRA, 2008). Para o E<sub>2</sub> o tratamento mais recomendado seria a remoção por carvão ativado, que tem uma elevada eficiência de remoção de 97% após 4 h de contato com 5 mg/L de carvão ativado (WESTERHOFF et al, 2005). Contudo, é um tratamento caro e que necessita de um tratamento posterior para o resíduo gerado e, adicionalmente, o tempo de detenção de 4 h é elevado para ser utilizado em uma ETA. A oxidação, por conseguinte, é um método utilizado nas ETA e pode ser usado para a remoção dos compostos estrogênicos. Pereira e colaboradores (2011) compararam o uso de diferentes oxidantes para a transformação de compostos estrogênicos, indicando que os tratamentos que apresentam as maiores eficiências de remoção são o ozônio, íon ferrato e dióxido de cloro. Contudo, segundo Pereira e colaboradores (2013), o cloro é amplamente utilizado como desinfetante e, por sua característica oxidante, pode remover compostos orgânicos ou converter compostos tóxicos em não tóxicos.

## 9 Referências Bibliográficas

- ADKINS-REGAN, E. **Hormones and sexual differentiation**. In: Norris, D.O., Jones, R.E. Eds., *Hormones and Reproduction in Fishes, Amphibians, and Reptiles*. Plenum, New York, 1987, pp. 1-29.
- ALMEIDA, F. et al. Puberty variances (male x female) drive harvest weight in the Amazonian tambaqui (*Colossoma macropomum*), Olhão, PT, 2014. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON REPRODUCTIVE PHYSIOLOGY OF FISH, 10., 2014, Olhão, PT. *Anais...* v.1. p. 206.
- ALVES, C. et al. **Exposição ambiental a interferentes endócrinos com atividade estrogênica e sua associação com distúrbios puberais em criança**. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 23, n. 5, 2007, pp. 1005-1014.
- ARAI, K. Genetic improvement of aquaculture finfish species by chromosome manipulation techniques in Japan. *Aquaculture*, v. 197, n. 1, p. 205-228, 2001.
- ARSLAN, T.; PHELPS, R. P. Production of monosex male black crappie, (*Pomoxis nigromaculatus*), populations by multiple androgen immersion. *Aquaculture*, v. 234, n. 1, p. 561-573, 2004.

BAROILLER, J. F.; D'COTTA, H.; SAILLANT, E. Environmental effects on fish sex determination and differentiation. **Sex Development**, v. 3, p. 118-135, 2009.

BEARDMORE, J. A. et al. Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: applications, problems, and prospects. **Aquaculture**, v. 197, n. 1, p. 283-301, 2001.

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

BLÁZQUEZ, M. et al. Structural and functional effects of early exposure to estradiol-17 $\beta$  and 17 $\alpha$ -ethynylestradiol on the gonads of the gonochoristic teleost *Dicentrarchus labrax*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.18, p.37-47, 1998.

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

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

BRASIL, GOVERNO DO. **Métodos para obtenção de população monosexo na piscicultura**. Boletim Agropecuário-n.º, v. 69, p. 1-27, 2004.

BROWN, E. E.; BAUMANN, H.; CONOVER, D. O. Temperature and photoperiod effects on sex determination in a fish. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 461, p. 39-43, 2014.

BRUSLÉ, J.; BRUSLÉ, S. La gonadogenèse des Poissons. **Reproduction Nutrition Développement**, v. 23, n. 3, p. 453-491, 1983.

BYE, V. J.; LINCOLN, R. F. Commercial methods for the control of sexual maturation in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R). **Aquaculture**, v. 57, p. 299-309. 1986.

CARROLL K. J; NORTH T. E. Oceans of Opportunity: Exploring Vertebrate Hematopoiesis in Zebrafish. **Experimental Hematology**, v. 42, p. 684-696, 2014.

CHEN, C. Y. et al. Determining estrogenic steroids in Taipei waters and removal in drinking water treatment using highflow solid-phase extraction and liquid chromatography. **Science of the Total Environment**, v. 378, p. 352-365, 2007.

CHEN, W.; GE, W. Gonad differentiation and puberty onset in the zebrafish: evidence for the dependence of puberty onset on body growth but not age in females. **Molecular reproduction & Development**, v. 80, p. 384-392, 2013.

CNAANI, A.; LEVAVI-SIVAN, B. Sexual development in fish, practical applications for aquaculture. **Sexual Development**, v. 3, n. 2-3, p. 164-175, 2009.

- D'COTTA, H. et al. Aromatase plays a key role during normal and temperature-induced sex differentiation of tilapia *Oreochromis niloticus*. **Molecular Reproduction and Development**, v. 59, p. 265-276, 2001.
- DAVIDSON, W. S. et al. The sex determining loci and sex chromosomes in the family salmonidae. **Sexual Development**, v. 3, p. 78-87, 2009.
- DESPREZ, D. et al. Inheritance of sex in two ZZ pseudofemale lines of tilapia *Oreochromis aureus*. **Aquaculture**, v. 218, p. 131-140, 2003.
- DESPREZ, D. et al. Study of sex ratio in progeny of a complex *Oreochromis* hybrid, the Florida red tilapia. **Aquaculture**, v. 251, p. 231-237, 2006.
- DESPREZ, D.; MÉLARD, C. Effect of ambient temperature on sex determinism in the blue tilapia *Oreochromis aureus*. **Aquaculture**, v. 162, p. 79-84, 1998.
- DEVLIN, R. H. et al. A rapid PCR-based test for Y-chromosomal DNA allows simple production of all-female strains of Chinook salmon. **Aquaculture**, v. 128, p. 211-220, 1994.
- DEVLIN, R. H.; NAGAHAMA, Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. **Aquaculture**, v. 208, p. 191-364, 2002.
- DONALDSON, E. M. Manipulation of reproduction in farmed fish. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 381-392, 1996.
- DONALDSON, E. M.; HUNTER, G. A. Sex control in fish with particular reference to salmonids. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, v. 39. p. 99-110, 1982.
- DRUMMOND, C. D.; MURGAS, L. D .S.; VICENTINI, B. Growth and survival of tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) submitted to different temperatures during the process of sex reversal. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, p. 895-902, 2009.
- DUNHAM, R.A. et al. **Review of the status of aquaculture genetics**. In: Aquaculture in the Third Millennium (NACA and FAO, Bangkok 2001). Technical Proceedings of the Conference on Aquaculture in the Third Millennium, Bangkok, Thailand. 2001. p. 137-166.
- FENG, X. et al. Degradation of estrone in aqueous solution by photo-fenton system. **Science of the Total Environmental**, v. 345, n. 1-3, p. 229-237, 2005.
- FERNANDINO, J. I. et al. Environmental stress-induced testis differentiation: androgen as a by-product of cortisol inactivation. **General and Comparative Endocrinology**, v. 192, p. 36-44, 2013.
- FERREIRA, M. G. M. **Remoção da atividade estrogênica de 17β-estradiol e de 17α-etinilestradiol pelos processos de ozonização e O3/H2O2**. 2008. 173 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.
- GEFFROY, B. et al. New insights regarding gonad development in European eel: evidence for a direct ovarian differentiation. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 39, p. 1129-1140, 2013.

GEORGE, T., PANDIAN, T. J. Dietary administration of androgens induces sterility in the female-heterogametic black molly, *Poecilia sphenops* (Cuvier & Valenciennes, 1846). **Aquaculture Research**, v. 29, p. 167-175, 1998.

GEROLIN, E. R. R. **Ocorrência e Remoção de disruptores endócrinos em águas utilizadas para abastecimento público de Campinas e Sumaré – São Paulo**. 2008. 185 f. Tese (Doutorado em Engenharia Civil) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, 2008.

GOMELSKY, B. et al. Hormonal sex inversion in the common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Aquaculture**, v. 126, p. 265- 270, 1994.

GOMES, R. L. et al. Steroid estrogen determination in sediment and sewage sludge: a critique of sample preparation and chromatographic/mass spectrometry considerations, incorporating a case study in method development. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 10-11, 2004.

GONZÁLEZ, A. V.; PIFERRER, F. Cytochrome P450 aromatase enzyme activity and reproduction in teleost fish: studies in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). In: Norberg, B., Kjesbu, O.S., Taranger, G.L., Andersson, E., Stefansson, S.O. (Eds.), Proc. **Sixth Int. Symp. Reprod. Physiol.** Fish. Univ. Bergen, 2000, pp. 39-42.

GUIGUEN, Y. et al. Involvement of estrogens in the process of sex differentiation in two fish species: the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and a tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Molecular Reproduction and Development**, v. 54, p. 154-162, 1999.

HAFFRAY, P. E. et al. Genetic determination and temperature effects on turbot *Scophthalmus maximus* sex differentiation: An investigation using steroid sex-inverted males and females. **Aquaculture**, v. 294, p. 30-36, 2009.

HENDRY, C. I.; MARTIN-ROBICHAUD, D. J.; BENFEY, T. J. Hormonal sex reversal of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). **Aquaculture**, v. 219, p. 769-781, 2003.

HUBER, M. M. et al. Oxidation of pharmaceuticals during ozonation and advanced oxidation processes. **Environment Science and Technology**, v. 37, p. 1016-1024, 2003.

HUNTER, G. A.; DONALDSON, E. M. Hormonal sex control and its application to fish culture. In: HUNTER, G.A.; DONALDSON, E.M. **Fish Physiology**. New York: Academic Press, INC, 1983. Cap. 5. p. 223-303.

HUNTER, G.A. et al. Production of monosex female groups of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) by the fertilization of normal ova with sperm from sex-reversed females. **Aquaculture**, v. 33, n. 1, p.355-364, 1983.

IKEHATA, K.; NAGHASHKAR, N. J.; EL-DIN, M. G. Degradation of aqueous pharmaceuticals by ozonation and advanced oxidation processes: A Review. **Ozone Science e Engineering**, v. 28, p. 353-414. 2006.

IMSLAND, A. K. et al. Sexual dimorphism in growth and maturation of turbot, *Scophthalmus maximus* (Rafinesque, 1810). **Aquaculture Research**, v. 28, p. 101-114, 1997.

- JUNIOR, H. A. et al. Análise de diferentes dosagens de hormônio na ração, para definição de um protocolo de feminilização do jundiá *Rhamdia quelen*. **Revista Eletrônica de Veterinária**, v. 9, n. 12, p. 1-7, 2008.
- KAVITHA, P.; SUBRAMANIAN, P. Effect of *Tribulus terrestris* on monosex production in *Poecilia latipinna*. **Current Science**, v. 101, 2011.
- KAVUMPURATH, S.; PANDIAN, T. J. Production of an YY female guppy, *Poecilia reticulata*, by endocrine sex reversal and progeny testing. **Aquaculture**, v.118, p.183-189, 1993.
- KIRANKUMAR, S.; PANDIAN, T. J. Effect on growth and reproduction of hormone immersed and masculinized fighting fish *Betta splendens*. **Journal of Experimental Zoology**, v. 293, n. 6, p. 606-616, 2002.
- KOCOUR, M.; LINHART, O.; GELA, D. Results of comparative growing test of all-female and bisexual population in two-year-old common carp (*Cyprinus carpio L.*). **Aquaculture International**, v. 11, p. 369-378, 2003.
- KOMEN, J.; YAMASHITA, M.; NAGAHAMA, Y. Testicular development induced by a recessive mutation during gonadal differentiation of female common carp *Cyprinus carpio L.* **Development Growth and Differentiation**, v. 34, p. 535-544, 1992.
- KUZMINSKI, H.; DOBOSZ, S. Effect of sex reversal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using 17 $\alpha$ -methyltestosterone and 11 $\beta$ -hydroxyandrostenedione. **Archives of Polish Fisheries**, v. 18, p. 45-49, 2010.
- LAGANÀ, A. et al. Analytical methodologies for determining the occurrence of endocrine disrupting chemicals in sewage treatment plants and natural waters. **Analytica Chimica Acta**, v. 501, p. 79-88. 2004.
- LEE, P; KING, H; PANKHURST, N. Preliminary assessment of sex inversion of farmed Atlantic salmon by dietary and immersion androgen treatments. **North American Journal of Aquaculture**, v. 66, p. 1-7, 2004.
- LEE, Y. D. et al. Sex differentiation of the rockfish, *Sebastes schlegeli*. **Journal-Korean Fisheries Society**, v.29, p.44-50, 1996.
- LIEW, W. C. et al. Polygenic sex determination system in zebrafish. **PLoS One**, v. 7, p. e34397, 2012.
- LIN, F.; DABROWSKI, K.; TIMMERMANS, L. P. M. Early gonadal development and sexual differentiation in muskellunge (*Esox masquinongy*). **Canadian Journal of Zoology**, v. 75, p. 1262-1269, 1997.
- LIN, S.; BENFEY, J. T; MARTIN-ROBICHAUD, D. Hormonal sex reversal in Atlantic cod, *Gadus morhua*. **Aquaculture**, v. 364-365, p. 192-197, 2012.
- LUCKENBACH, J. A. et al. Gonadal differentiation and effects of temperature on sex determination in southern flounder (*Paralichthys lethostigma*). **Aquaculture**, v. 216, p. 315-327, 2003.

MAACK, G., SEGNER, H. Morphological development of the gonads in zebrafish. **Journal of Fish Biology**, v. 62, p. 895-906, 2003.

MAIA, D.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e conseqüências. **Química nova**, v. 30, n. 3, p. 651-666. 2007.

MARTÍNEZ, P. et al. Identification of the major sex-determining region of turbot (*Scophthalmus maximus*). **Genetics**, v. 183, p. 1443-1452, 2009.

MIERZWA, J. C.; AQUINO, S. F.; VERAS, L. R. V. **Remoção de desreguladores endócrinos**. In: PÁDUA, V.L.P. (Coord.) Remoção de microrganismos emergentes e microcontaminantes orgânicos no tratamento de água para consumo humano. Belo Horizonte: Ed. ABES, 2009, p. 251-291.

MILLS, L. J.; CHICHESTER, C. Review of evidence: Are endocrine-disrupting chemicals in the aquatic environment impacting fish populations? **Science of the Total Environment**, v. 343, p. 1-34. 2005.

NAGAHAMA, Y. Gonadal steroid hormones: major regulators of gonadal sex differentiation and gametogenesis in fish. In: PROC. INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON REPRODUCTIVE PHYSIOLOGY OF FISH, 6, 2000. **Anais**. Bergen, 2000. p. 211-222.

NAGAHAMA, Y. Molecular mechanisms of sex determination and gonadal sex differentiation in fish. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 31, p. 105-109, 2005.

NAKAMURA, M. et al. Gonadal sex differentiation in teleost fish. **Journal of Experimental Zoology**, v. 281, p. 362-372, 1998.

NANDA, I. et al. A duplicated copy of DMRT1 in the sex-determining region of the Y chromosome of the medaka, *Oryzias latipes*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, p. 11778-11783, 2002.

NAVARRO-MARTÍN, L.; BLÁZQUEZ, M.; PIFERRER, F. Masculinization of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) by treatment with an androgen or aromatase inhibitor involves different gene expression and has distinct lasting effects on maturation. **General and Comparative Endocrinology**, v. 160, p. 3-11, 2009.

NOGUEIRA, J. M. F. Desreguladores endócrinos: efeitos adversos e estratégias para monitoração dos sistemas aquático. **Química**, v. 88, p. 65-71, 2003.

OSPINA-ÁLVAREZ, N.; PIFERRER, F. Temperature-dependent sex determination in fish revisited: prevalence, a single sex ratio response pattern, and possible effects of climate change. **PLoS One**, v. 3, p. e2837, 2008.

PADOA, E. Differenziazione e inversione sessuale (femminizzazione) di avanotti di trota (*Salmo irideus*) trattati con ormone follicolare. **Monit. Zool. Ital.**, v. 48, p. 195-203, 1937.

PALAIOKOSTAS, C. et al. Mapping the sex determination locus in the Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) using RAD sequencing. **BMC genomics**, v. 14, p. 566, 2013.

- PANDIAN, T. J. **Sex Determination in Fish**. New York: CRC Press; Taylor & Francis Group, 2011, 282p.
- PENMAN, D. J.; PIFERRER, F. Fish gonadogenesis. Part I: genetic and environmental mechanisms of sex determination. **Reviews in Fisheries Science**, v. 16, p. 16-34, 2008.
- PEREIRA, R. O. et al. Degradação parcial de 17 $\beta$ -estradiol por cloração aplicada ao tratamento da água. **Eng. Sanit. Ambient.**, v.18, n.3, p. 215-222, 2013.
- PEREIRA, R. O. et al. Removal of estrogens through water disinfection processes and formation of by-products. **Chemosphere**, v. 82, p. 789-799, 2011.
- PIFERRER, F. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. **Aquaculture**, v. 197, p. 229-281, 2001.
- PIFERRER, F. et al. Genetic, endocrine, and environmental components of sex determination and differentiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 142, p. 102-110, 2005.
- PIFERRER, F. et al. Introduction of sterility in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) by androgen or estrogen at different stages during ontogenesis. **Aquaculture**, v. 77, p. 251-262, 1994.
- PIFERRER, F.; DONALDSON, E. M. Gonadal differentiation in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, after a single treatment with androgen or estrogen at different stages during ontogenesis. **Aquaculture**, v. 77, p. 2-3, 1989.
- PONGTHANA, N. et al. Monosex female production in the silver barb (*Puntius gonionotus*). **Aquaculture**, v. 173, n. 1, p. 247-256, 1999.
- POONLAPHDECHA, S. et al. Temperature induced-masculinisation in the Nile tilapia causes rapid up-regulation of both dmrt1 and amh expressions. **General and Comparative Endocrinology**, v. 193, p. 234-242, 2013.
- RAZMI, K. et al. Hormonal sex reversal of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by ethynylestradiol-17 $\alpha$  (EE<sub>2</sub>). **Iranian Journal of Fisheries Sciences**, v. 10, p. 304-315, 2011.
- REIS-FILHO, R. W.; COUTINHO, A. J.; VIEIRA, E. M. Hormônios sexuais estrógenos: contaminantes bioativos. **Quim. Nova**, vol. 29, n. 4, p. 817-822, 2006.
- ROTHBARD, S. A review of ploidy manipulations in aquaculture: the Israeli experience. **Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh**, v. 58, p. 266-279, 2006.
- SANCHES, E. G.; OLIVEIRA, I. R.; SERRALHEIRO, P. C. S. Inversão sexual da garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus*. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 10, p. 198-209, 2009.
- SARRE, S.; GEORGES, A.; QUINN, A. The ends of a continuum: Genetic and temperature-dependent sex determination in reptiles. **BioEssays**, v. 26, p. 639-645, 2004.

- SHEN, Z. G.; WANG, H. P. Molecular players involved in temperature-dependent sex determination and sex differentiation in Teleost fish. **Genetics Selection Evolution**, v. 46, p. 26, 2014.
- SIMPSON, T. H. **Sex reversal in salmonids**. International Council for the Exploration of the Sea, CM/E: 48, 1976, 6 p.
- SOLAR, E. M.; DONALDSON, E. M.; CHARLES, J. The effect of three estrogens on the direct feminization of Chinook salmon. **Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences**, n. 1995, 8 p., 1994.
- SUMPTER, J. P. Endocrine disrupters in the aquatic environment: an overview. **Acta hydrochimica et hydrobiologica**, v. 33, n. 1, p. 9-16, 2005.
- TACHIBANA, L. et al. Desempenho de diferentes linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) na fase de reversão sexual. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 26, p. 305-311, 2004.
- TAKAHASHI, H.; SHIMIZU, M. Juvenile intersexuality in a cyprinid fish, the Sumatra barb, *Barbus tetrazona tetrazona*. **Bulletin of the Faculty of Fisheries Hokkaido University**, v. 34, p. 69-78, 1983.
- TAKASHIMA, F.; PATINO, R.; NOMURA, M. Histological studies on the sex differentiation in rainbow trout. **Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish**, v. 46, p. 1317-1322, 1980.
- TALIKINA, M. G. Sex differentiation and gonad development during the first years of life in the bream *Abramis brama* from the Rybinsk water reservoir. **Vopr Ikhtiol**, v. 35, p. 114-119, 1995.
- TANAKA, M. et al. Structure and promoter analysis of the cytochrome P-450 aromatase gene of the teleost fish, medaka (*Oryzias latipes*). **Journal of biochemistry**, v. 117, n. 4, p. 719-725, 1995.
- TARANGER, G. L. et al. Control of puberty in farmed fish. **General and Comparative Endocrinology**, v. 165, p. 483-515, 2010.
- TAVE, D. **Genetics for Fish Hatchery Managers**. Van Nostrand Reinhold, New York, 1993.p.7-20.
- TURRA, E. M et al. Controle reprodutivo em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) por meio de manipulações sexuais e cromossômicas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, p. 21-28, 2010.
- TZCHORI, I. et al. The influence of phytoestrogens and stradiol-17 $\beta$  on growth and sex determination in the European eel (*Anguilla anguilla*). **Aquaculture Research**, v. 35, p. 1213-1219, 2004.
- VALENZUELA, N. Sexual development and the evolution of sex determination. **Sex Development**, v. 2, p. 64-72, 2008.

VALENZUELA, N.; ADAMS, D. C.; JANZEN, F. J. Pattern does not equal process: Exactly when is sex environmentally determined. **The American Naturalist**, v. 161, p. 676-683, 2003.

VANDEPUTTE, M. et al. A polygenic hypothesis for sex determination in the European sea bass *Dicentrarchus labrax*. **Genetics**, v. 176, p. 1049-1057, 2007.

VIZZIANO-CANTONNET, D. et al. Sexual dimorphism in the brain aromatase expression and activity, and in the central expression of other steroidogenic enzymes during the period of sex differentiation in monosex rainbow trout populations. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v. 170, n. 2, p. 346-355, 2011.

VLIEGENTHART, A. D. et al. Zebrafish as model organisms for studying drug induced liver injury. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 78, p. 1217-1227, 2014.

WAGER, K; MAHMOOD, F; RUSSELL, C. Modelling inborn errors of metabolism in zebrafish. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 37, p. 483-495, 2014.

WANG, H. P. et al. Effects of estradiol-17 $\beta$  on survival, growth performance, sex reversal and gonadal structure of bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*). **Aquaculture**, v. 285, p. 216-223, 2008.

WESSELS, S. et al. Allelic variant in the anti-müllerian hormone gene leads to autosomal and temperature-dependent sex reversal in a selected Nile tilapia line. **PLoS ONE**, v. 9, p. e104795, 2014.

WESTERHOFF, P. et al. Fate of endocrine-disruptor, pharmaceutical, and personal care product chemicals during simulated drinking water treatment processes. **Environmental Science & Technology**, v. 39, p. 6649-6663, 2005.

WILSON, C. A. et al. Wild sex in zebrafish: loss of the natural sex determinant in domesticated strains. **Genetics**, v. 198, p. 1291-1308, 2014.

YAMAGUCHI, T. et al. Cortisol is involved in temperature-dependent sex determination in the Japanese flounder. **Endocrinology**, v. 151, p. 3900-3908, 2010.

YAMAMOTO, T. Artificial induction of functional sex-reversal in genotypic females of the medaka (*Oryzias latipes*). **J. Exp. Zool.**, v. 137, p. 227-263, 1958.

YAMAMOTO, T. Sex differentiation. **Fish physiology**, v. 3, p. 117-175, 1969.

YAMAMOTO, Y. et al. Coexistence of genotypic and temperature-dependent sex determination in pejerrey *Odontesthes bonariensis*. **PLoS ONE**, v. 9, p. e102574, 2014.

YANO, A. et al. An immune-related gene evolved into the master sex-determining gene in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Current Biology**, v. 22, p. 1423-1428, 2012.

YING, G. G.; KOOKANA, R. S.; RU, Y. J. Occurrence and fate of hormones steroids in the environment. **Environment International**, v. 28, p. 545-551, 2002.

ZANONI, M. A. et al. Inversão sexual de alevinos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) variedade Supreme, submetidos a diferentes temperaturas durante fase de diferenciação sexual. **Semina Ciências Agrárias**, v. 34, p. 455-466, 2013.

**Feminização de tambaqui *Colossoma macropomum* com  
administração de 17 $\beta$ -estradiol na dieta**

*A ser submetido para a Revista Aquaculture*

Capítulo

3

## Resumo

Pesquisas recentes comprovam que em sistema de cultivo intensivo as fêmeas de tambaqui *Colossoma macropomum* crescem aproximadamente 18% a mais que os machos. Na aquicultura, em casos como este, cultivar o gênero mais rentável pode proporcionar o aumento da produtividade sem precisar aumentar a área de cultivo. O objetivo deste trabalho foi identificar a melhor dose de  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) para a feminização direta de tambaqui, para um futuro desenvolvimento de protocolo de inversão sexual eficaz para a espécie. Pós-larvas de tambaqui, com aproximadamente 30 dias pós-eclosão (dpe) e comprimento médio de 14,87 mm, foram alimentadas com dietas enriquecidas com cinco concentrações de  $E_2$  (0, 20, 40, 80, 120 mg/Kg de ração) durante seis semanas consecutivas. Ao final do tratamento, os peixes foram transferidos para tanques-rede, onde permaneceram entre três a cinco meses, até a análise histológica das gônadas. Baseado nas análises histológicas, as proporções sexuais foram estatisticamente iguais nos tratamentos 0, 20, 40, 80 mg  $E_2$ /Kg de ração. Nos animais que receberam a dieta com maior concentração de  $E_2$ , nenhum macho foi encontrado, embora peixes intersexo tenham sido identificados, além das fêmeas. Após 60 dias do término dos tratamentos foi realizada coleta de sangue para análise da concentração plasmática de  $17\beta$ -estradiol. Os resultados encontrados para os tratamentos 0, 20, 40, 80 mg  $E_2$ /Kg de ração foram estatisticamente iguais, mas diferiram do tratamento 120 mg  $E_2$ /Kg de ração, que foi inferior. Os resultados apontam a dose de 120 mg de  $E_2$  por quilograma de ração como mais eficaz na feminização de tambaqui, dentre as quatro testadas.

**Palavras-chave:** aquicultura, tambaqui, feminização,  $17\beta$ -estradiol.

**Abstrat**

Recent studies show that under intensive farming the female tambaqui *Colossoma macropomum* grow approximately 18% more than males. In aquaculture, in similar condition the cultivation of female monosex population provides the most profitable production. The objective of this study was to identify the best dose of  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) in direct feminization of tambaqui, for further development of effective sex reversal protocol for the species. Post-larvae tambaqui, with approximately 30 days post-hatch (dpe) and average length of  $14.87 \pm 2.85$  mm, were fed diets enriched with five concentrations of  $E_2$  (0, 20, 40, 80, 120 mg/Kg  $E_2$  in the feed) for 6 consecutive weeks. At the end of the treatment, the fish were transferred to cages where they stayed from 3 to 5 months until the histological examination of the gonads for sexing. Based on histological analysis, the sex ratios were statistically the same in treatments 0, 20, 40, E2 80 mg/Kg  $E_2$  in the feed. In animals that received the diet with greater  $E_2$  concentration, no male was found, although intersex fish were identified, in addition to females. Sixty days after treatment blood sampling was performed for analysis of plasma levels of  $17\beta$ -estradiol. The results for the treatments 0, 20, 40, E2 80 mg/Kg  $E_2$  in the feed were statistically equal, but differed from treatment 120 mg/Kg  $E_2$  in the feed, which was higher. The results point the dose of 120 mg/Kg  $E_2$  in the feed as the most effective in the feminization of tambaqui, among the four tested.

**Keywords:** aquaculture, tambaqui, feminization,  $17\beta$ -estradiol.

## 1 Introdução

O tambaqui *Colossoma macropomum* é uma espécie migradora nativa da região Amazônica, pertence a ordem Characiforme, família Characidae subfamília Serrasalminae. Ocorre naturalmente do rios Solimões/Amazonas e Orinoco e seus afluentes (ARAÚJO-LIMA e GOULDING, 1998). É a espécie que mais se destaca na Região Amazônica, tanto na pesca quanto na aquicultura, pois possui um alto valor comercial e a preferência do consumidor.

Segundo o boletim estatístico do Ministério da Pesca e Aquicultura, em 2011 dentre as espécies nativas de água doce o tambaqui apresentou a maior produção na aquicultura brasileira com 111.084,1 t, sendo ultrapassado somente pela tilápia *Oreochromis spp.* que é uma espécie exótica e atingiu 253.824,1, t. Atualmente corresponde a aproximadamente 90% da aquicultura da região Norte, e já se expandiu para as regiões Nordeste, Centro Oeste e Sudeste (BRASIL, 2011). Recentemente constatou-se que em sistema de cultivo intensivo as fêmeas crescem 18% a mais e que seu início de maturação sexual ocorre mais tarde que nos machos (dados não publicados). Diante da sua importância econômica e ecológica, o tambaqui foi selecionado como uma das espécies aquáticas de maior interesse para pesquisa no Brasil (Queiroz et al, 2002).

Na aquicultura, se o início da puberdade ocorre em tamanho pré-despesca, geralmente ocorrem consequências indesejáveis aos parâmetros de produção como por exemplo: taxa de crescimento, conversão alimentar, características de qualidade de carne, aparência externa, comportamento, saúde, bem-estar, taxas de sobrevivência e uniformidade dos lotes (TARANGER et al, 2010). Além disso, existem características de alto valor econômico que estão relacionadas com a maturação sexual dos peixes, como padrão de cor e forma que são importantes em espécies de peixes ornamentais. Para contornar esses problemas relacionados à puberdade de peixes, uma técnica muito utilizada é a inversão sexual, onde lotes inteiros de peixes de um só sexo são produzidos. Mesmo quando não há diferenças significativas entre os sexos nas características economicamente importantes, os lotes monosexo podem ser vantajosos a fim de evitar reprodução descontrolada dos lotes (TURRA et al, 2010). Por essas razões, a produção do gênero com as melhores características morfológicas, fisiológicas e/ou etiológicas através de culturas monosexo tem sido utilizada mundialmente na produção aquícola.

A produção em escala comercial de estoques totalmente femininos, por exemplo, pode ser realizada através da exposição de peixes ao estrógeno (feminização direta) ou através do cruzamento de peixes sexualmente-induzidos com peixes normais (feminização indireta) (DEVLIN e NAGAHAMA, 2002). O método direto pode ser aplicado em qualquer espécie do peixe, enquanto que o método indireto é adequado apenas espécies em que as fêmeas são homogaméticas, ou seja, com sistema de determinação do sexo XX/XY fêmea/macho (PIFERRER, 2001). A identificação do período lábil (estágios iniciais de desenvolvimento), da dose e da duração do tratamento hormonal são passos críticos para a inversão sexual bem sucedida de peixes indiferenciados (CHATAIN et al, 1999).

O  $17\beta$ -estradiol é o esteroide mais utilizado para a formação de populações de fêmeas, sendo usado na inversão de várias espécies de enguias, salmonídeos, ciclídeos, ciprinídeos, anabantídeos, poecilídeos, ictalurídeos e bagres, embora alguns efeitos negativos do seu uso tenham sido relatados sobre a reprodução, crescimento e sobrevivência dos peixes tratados (PIFERRER, 2001; DEVLIN e NAGAHAMA, 2002). Em termos práticos, tratamentos hormonais bem sucedidos devem atingir o maior percentual de inversão sexual com o menor impacto aos animais ao meio ambiente (LIN et al, 2012). No caso dos esteroides naturais, os resíduos no peixe desaparecem em menos de um mês após término do tratamento (PIFERRER, 2001).

Com a finalidade de fomentar a indústria da piscicultura do tambaqui com tecnologia que permita o aumento da produção em 18%, este trabalho buscou identificar a melhor dose de  $17\beta$ -estradiol para a feminização de tambaqui, como o primeiro passo para o desenvolvimento de um protocolo de inversão sexual eficaz e seguro para a espécie.

## **2 Material e métodos**

### **2.1 Animais e condições experimentais**

Por razões de controle experimental e para evitar possíveis efeitos (genéticos) da família sobre quaisquer resultados, o experimento foi dividido em dois ensaios (setembro/novembro e outubro/dezembro de 2014). Para cada ensaio, os reprodutores e matrizes da Estação de Piscicultura de Balbina, localizada no município de Presidente Figueiredo – AM, foram induzidos por hipofiseação para a produção das larvas de tambaqui.

Com trinta dias pós-eclosão (dpe), 500 pós-larvas foram transferidas para o Setor de Piscicultura da Embrapa Amazônia Ocidental, onde ficaram em aclimatação por cinco dias, e atingiram comprimento de  $1,36 \pm 0,21$  cm (ensaio 1) e  $1,61 \pm 0,28$  cm (ensaio 2). Durante aclimatação, as já então pós-larvas foram alimentadas com ração comercial com 45% de proteína bruta (PB), na taxa de 10% do peso corporal distribuída 4x por dia.

Após a aclimatação, as pós-larvas foram distribuídas aleatoriamente em cinco tanques experimentais de polietileno em uma densidade de 100 larvas/200 L. Em cada tanque houve renovação parcial de água, aeração constante e temperatura mantida na faixa de 28 °C com auxílio de termostatos. Diariamente foram mensurados temperatura, oxigênio e pH da água dos tanques.

## 2.2 Tratamento hormonal

As dietas experimentais foram enriquecidas com quatro diferentes concentrações de 17- $\beta$  estradiol (Sigma®; Tabela 1). A ração utilizada foi previamente triturada e peneirada, obtendo-se uma granulometria de aproximadamente 0,5 mm. O E<sub>2</sub> foi incorporado na ração por meio de solução do hormônio em álcool etílico (EtOH) 90%, que foi adicionada por aspersão para assegurar uma distribuição uniforme do hormônio de acordo com a metodologia descrita por Popma e Green (1990). Para maior praticidade, foi preparada uma solução estoque de E<sub>2</sub> (1g/L EtOH 90%) que posteriormente foi diluída conforme cada tratamento (Tabela 1). Para permitir a total evaporação do etanol (500 ml/kg ração; Tabela 1), as rações ficaram espalhadas em bandejas em temperatura ambiente por 48h. Toda a ração necessária para os tratamentos foi preparada de uma só vez, antes do início do experimento. Como controle, 1 kg de ração foi tratado apenas com 500 ml de EtOH 90%.

As dietas tratamento foram fornecidas durante seis semanas ininterruptamente. Após esse período, cada grupo de peixes foi transferido para um tanque-rede (no total de cinco tanques-rede alocados em um mesmo tanque escavado) onde permaneceram até a realização das amostragens. Esse período nos tanques rede (que variou de 3 a 5 meses) foi necessário para que os peixes alcançassem tamanho suficiente para identificação e coleta das gônadas.

**Tabela 1.** Diluição da solução estoque para preparo das rações.

<b>Tratamento</b>	<b>Solução estoque</b>	<b>Álcool 90%</b>	<b>Ração</b>
<b>Concentração de E<sub>2</sub>/Kg</b>	<b>(ml)</b>	<b>(ml)</b>	<b>(Kg)</b>
0 mg	0	500	1
20 mg	20	480	1
40 mg	40	460	1
80 mg	80	420	1
120 mg	120	380	1

### 2.3 Amostragem

Sessenta dias após o término dos tratamentos foi realizada coleta de sangue por punção da veia caudal em 10 animais de cada tratamento para determinação da concentração plasmática de E<sub>2</sub> nos peixes. As amostras de plasma foram separadas por centrifugação, congeladas e armazenadas em ultrafreezer (-80°C) até a realização das análises.

Quando os peixes estavam com idade entre cinco e sete meses foram sedados com Benzocaína 10% e sacrificados para sexagem. Após sacrifício, as gônadas foram imediatamente dissecadas, fixadas em solução Bouin por 24 horas e então mantidas em EtOH 70% até processamento histológico.

### 2.4 Concentração plasmática de E<sub>2</sub>

A concentração de E<sub>2</sub> circulante foi determinada por diagnóstico imunoenzimático ELISA (KAQ0621, Invitrogen Corporation®), seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, 50 µL de cada amostra (incluindo os controles padrões do kit e branco) e 50 µL de reagente conjugado estradiol-HRP foram pipetadas nos poços apropriados. Em seguida, 50 µL de anticorpo anti-estradiol foi adicionado a cada poço e a placa ficou em um agitador horizontal por 2 h. Após a incubação, os poços foram lavados quatro vezes com tampão de lavagem. Para cada poço, 200 µL de solução cromógena foram adicionados e a placa ficou durante 30 minutos protegida de luz para incubação. A reação foi parada pela adição de 50 µL solução de paragem a cada poço e a placa foi lida a 450 nm utilizando um leitor de microplacas. Para cada padrão e amostra foi determinado os valores das concentrações de E<sub>2</sub> a partir da curva padrão e os resultados foram expressos em pg/mL.

## 2.5 Sexagem

Os fragmentos de gônadas foram desidratados em concentração crescente de álcool, clarificados em xilol, e incluídos em parafina para microtomia. As secções de 5 µm foram montadas em laminas histológicas, coradas com Hematoxilina e contrastadas com Eosina. Foi realizado o estudo morfológico, onde para as fêmeas investigou-se a estrutura de lamelas ovarianas, e/ou a presença de ninhos de oogônias, e/ou o início de meiose. Para a identificação dos machos verificou-se a presença de cistos espermatogoniais iniciais (espermatogônias tipo A em associação com células de Sertoli) dispostos em cordões testiculares. Baseado na identificação histológica das gônadas (ovário, testículo ou intersexo) foi estimada a eficácia de cada tratamento em comparação com o grupo controle, procurando identificar o melhor protocolo para a inversão.

## 2.6 Cloração da água

Antes do início do experimento e logo após término dos tratamentos foram coletadas amostras de água (500 mL) de cada tanque experimental (em ambos ensaios) e posteriormente congeladas. Ao final do tratamento, quando os peixes foram transferidos para os tanques rede, toda a água utilizada nos experimentos foi armazenada em um tanque reservatório único. Como tentativa de promover a degradação do E<sub>2</sub> residual, foi realizada a cloração da água deste reservatório segundo adaptação de Pereira e colaboradores (2013). Em suma, foi utilizada uma dosagem de 150 g de Hipoclorito de cálcio (cloro granulado usado para limpeza de piscinas) dissolvida em dois litros de água (solução de cloro  $75.10^{-3}$  g/mL). Cinco dias após o término do experimento, essa solução de cloro foi cuidadosamente adicionada e homogeneizada no tanque reservatório de 2.000 L. Para confirmar a eficácia da cloração, amostras de água deste tanque foram coletadas antes da cloração e 30 dias após a cloração.

Todas as amostras (individuais dos tanques experimentais e do tanque reservatório) foram enviadas congeladas por Sedex para o Laboratório de Resíduos e Contaminantes da Embrapa Meio Ambiente, Campinas - SP, onde foram realizadas as análises para verificação de resíduos hormonais de E<sub>2</sub>.

## 2.7 Extração e quantificação de E<sub>2</sub> na água

As amostras coletadas antes do início dos tratamentos foram utilizadas como testemunhas em todas as análises, e a amostra inicial da etapa 2 ainda foi utilizada para a verificação do método, com recuperação de 79,2 %. Para a ANVISA (2003), é desejável que os valores de recuperação, na validação dos métodos voltados para análises de traços, sejam próximos a 100%, admitindo-se valores menores desde que não apresentem precisão e exatidão superiores a 20%. Ribani e colaboradores (2004) afirmam que intervalos de recuperação entre 70 e 120% são aceitáveis, informação corroborada por Brito e colaboradores (2003) e Amarante Junior e colaboradores (2005).

Para a extração do hormônio da água foram filtradas alíquotas de 150 mL das amostras de água, com três repetições analíticas, em papel de filtro comum e transferiu-se para erlenmeyer de 250 mL. Adicionaram-se, nas amostras fortificadas (água 2 - 2º LOTE), 0,075 µg do padrão etinilestradiol (referência externa) e 0,015 µg do padrão de estradiol. Em todas as amostras, adicionaram-se 15 mL de metanol P.A. correspondendo a 10% do volume da amostra e ajustou-se o pH para 3 utilizando-se solução de ácido clorídrico 5M (aproximadamente 4 gotas). Acondicionaram-se os cartuchos SPE C18 (OASIS HLB 30 µm, 200 mg, 6 mL) passando-se 10 mL de metanol, seguido de 10 mL de água ultrapura pH 3. As amostras foram percoladas sob vácuo nos cartuchos pré-condicionados e em seguida lavadas com 5 mL de solução metanol:água 50% pH 3 (esse percolado foi descartado). Secou-se os cartuchos por aproximadamente 5 minutos, ainda sob vácuo, e em seguida passou-se 5 mL de metanol e o filtrado foi coletado em frascos de vidro. A solução foi evaporada até a secura com nitrogênio. As amostras foram retomadas em 300 µL ± 30 (0,3 mL) de metanol grau HPLC e transferidas para vials próprios para o amostrador e analisadas por Cromatógrafo Líquido de Alta eficiência (HPLC).

Para a quantificação do hormônio, as análises das amostras foram realizadas em cromatógrafo líquido modelo Class VP, marca Shimadzu, com detector de fluorescência RF-10Ax1. Os extratos foram separados e analisados por meio da coluna ODS hypersil C18 (4,6 mm, 250 mm, 5 µm de tamanho de partícula) e pré-coluna (4,6 mm, 12,5 mm, 5 µm de tamanho de partícula) a temperatura ambiente. A fase móvel consistiu de mistura acetonitrila e água, 48:52 (v/v), isocrático. O fluxo utilizado foi de 0,8 mL/min. No detector de fluorescência utilizou-se a radiação de excitação 230 nm e de emissão de 310 nm. Para as

análises, foram injetadas alíquotas de 10  $\mu$ L do extrato. Nestas condições, o tempo de retenção da substância foi de 11,3 minutos.

## 2.8 Análise estatística

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado. Em ambos ensaios foram testados as mesmas 5 concentrações de E<sub>2</sub> (tratamentos; 0, 20, 40, 80 e 120mg/kg de ração), sob as mesmas condições, e cada peixe foi tratado como uma réplica. De cada tratamento foi realizada a sexagem de 07 a 31 peixes. Essa variação no número de amostras (réplicas) se deu em razão da grande dificuldade de se identificar o sexo de peixes pequenos (embora a coleta das gônadas tenha sido fácil). Cada peixe foi então classificado em macho, fêmea ou intersexo. Para análise da proporção de sexos entre cada tratamento e o controle foi utilizado o teste Qui-Quadrado ( $\chi^2$ ). O mesmo teste foi também utilizado para comparar as proporções de sexo entre os controles de ambos ensaios. As concentrações plasmáticas de E<sub>2</sub> foram avaliadas por análise de variância (ANOVA). Um nível de significância de 5% foi utilizado para todas as análises.

## 3 Resultados

### 3.1 Condições Experimentais

A temperatura média da água em todos os tanques de ambos os ensaios do experimento foi de  $28,4 \pm 0,42^\circ\text{C}$ , o pH teve média de  $5,3 \pm 0,31$  e o oxigênio dissolvido de  $7,2 \pm 0,38$  mg/L (Tabela 2). No início houve grande mortandade dos animais, resultando na taxa de sobrevivência final média de 41% (Tabela 3).

**Tabela 2.** Parâmetros da água durante os tratamentos com E<sub>2</sub>.

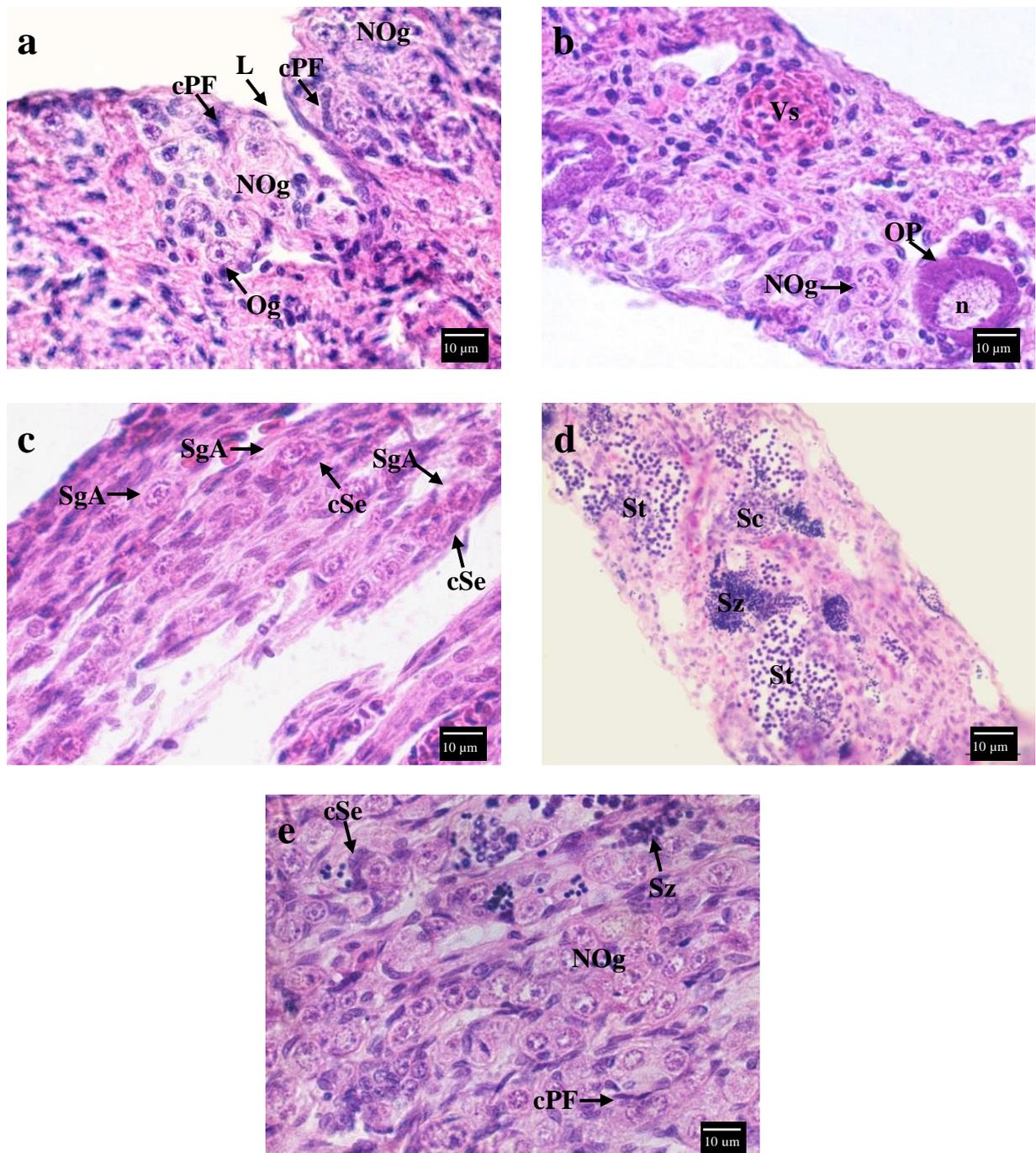
Parâmetro	Ensaio 1					Ensaio 2					Valores médios
	Doses de E <sub>2</sub> (mg/Kg)					Doses de E <sub>2</sub> (mg/Kg)					
	0	20	40	80	120	0	20	40	80	120	
Oxigênio dissolvido	7	6,9	7,2	6,5	7,3	7,4	7,5	7,8	7,2	7,3	$7,2 \pm 0,38$
Temperatura	28	28	28,4	28,8	29,4	28,5	28,3	28,1	28,6	28,3	$28,4 \pm 0,42$
pH	5	4,9	5,5	5,5	5,8	5,3	5,5	5,1	5,8	5	$5,3 \pm 0,31$

**Tabela 3.** Taxa de sobrevivência (%) durante os tratamentos.

Concentração de E <sub>2</sub> /Kg	Ensaio 1	Ensaio 2	Média
0 mg	46	39	43
20 mg	36	38	37
40 mg	41	41	41
80 mg	44	39	42
120 mg	44	40	42
<b>Geral (%)</b>	42	39	41

### 3.2 Sexagem

Nos animais com comprimento padrão (CP)  $\leq 13,96 \pm 1,29$  cm não foi possível a identificação do sexo, devido à falta de evidências histológicas de ovários ou testículos. Ao final do experimento, o comprimento padrão (CP) das fêmeas foi de  $16,91 \pm 2$  cm e seus ovários foram identificados pela presença de oogônias (Ogs) em proliferação (mitose). As Ogs estavam agrupadas em meio ao tecido conjuntivo contornadas pelas células pré-foliculares, formando ninhos de oogônias. A presença destes ninhos de Ogs foi a evidência fundamental para a identificação das fêmeas. Todas as fêmeas identificadas exibiram ninhos de oogônias distribuídos ao longo do epitélio germinativo (Figura 1a). Além desta característica, algumas fêmeas já apresentavam as lamelas ovarianas, típicas do arranjo estrutural deste órgão. Dentre todos os tratamentos, houve uma única fêmea (de 15 cm CP do tratamento 120 mg E<sub>2</sub>/Kg de ração) que além de ninhos de oogônias apresentou grande quantidade de oócitos primários, indicando início precoce da meiose (Figura 1b). Os machos identificados tinham  $14,59 \pm 2,44$  cm CP médio, e todos apresentaram testículos com espermatogônias A envoltas pela célula de Sertoli formando cistos espermatogênicos iniciais, característica marcante de machos imaturos (Figura 1c). Entretanto dois indivíduos (CP  $\approx 16,5$  cm) do tratamento 80 mg E<sub>2</sub>/Kg de ração apresentaram testículos já com a meiose e espermatogênese completas no interior dos cistos. Nesses machos com desenvolvimento mais avançado pode-se observar a presença de espermatócitos e espermátides dentro de cistos, e alguns espermatozóides livres no testículo (Figura 1d). Houveram ainda animais considerados como intersexo, pois apresentavam do tecido conjuntivo de machos com células germinativas características de fêmeas e machos, ou partes do tecido gonadal característico de machos e outras partes totalmente peculiares a fêmeas (Figura 1e).



**Figura 1.** Cortes histológicas de gônadas de tambaqui corados com HE. a) ovário imaturo repleto de NOg; b) ovário imaturo com a presença de OP; c) testículo imaturo com SpA em arranjo de cordões; d) testículo imaturo, mas com a presença de Sc, St e Sz; e) gônada de animal intersexo, tecido conjuntivo característico de ovário com ninho de oogônias, notar espermatozoides livres. cPF – célula pré-folicular; cSe – célula de Sertoli; L – lamelas ovarianas; n – núcleo; NOg – ninho de oogônias; Og – oogônia; OP – oócito primário; Sc – espermatócito; SgA – espermatogônia A; St – espermátide; Sz – espermatozóide; Vs – vaso sanguíneo.

### 3.3 Efeito do E<sub>2</sub> na proporção de machos e fêmeas na população

A percentagem total de fêmeas, machos, intersexos em cada ensaio é apresentada na Tabela 4.

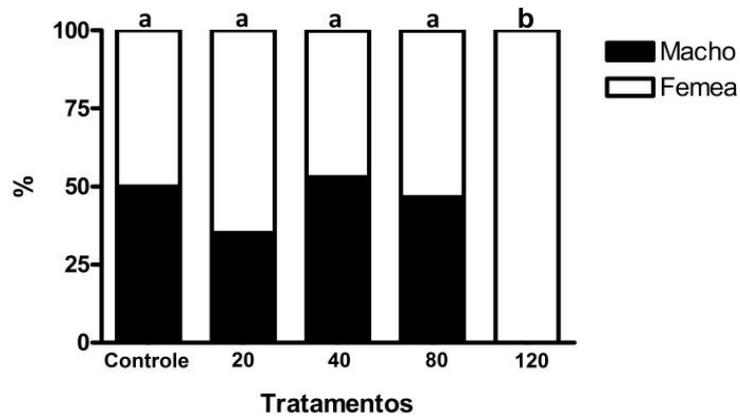
**Tabela 4.** Percentual de fêmeas, machos, intersexos por ensaio e somatório dos ensaios.

Percentual de indivíduos	Ensaio 1					Ensaio 2					Σ Ensaio 1 e 2				
	E <sub>2</sub> (mg/Kg)					E <sub>2</sub> (mg/Kg)					E <sub>2</sub> (mg/Kg)				
	0	20	40	80	120	0	20	40	80	120	0	20	40	80	120
Fêmeas*	45,2	46,2	6,7	28,6	77,8	63,6	77,8	77,8	54,5	87,5	50	59	33	44	84
Machos*	54,8	53,8	53,3	28,6	-	36,4	-	11,1	45,5	-	50	32	38	39	-
Intersexo*	-	-	40	42,8	22,2	-	22,2	11,1	-	12,5	-	9	29	17	16
<b>Total de peixes sexados**</b>	31	13	15	7	9	11	9	9	11	16	42	22	24	18	25

\*Os valores de fêmeas, machos e intersexo estão expressos em percentagem. \*\*Números absolutos.

As duas populações utilizadas nos dois ensaios (controles dos ensaios 1 e 2) apresentaram a mesma proporção de machos e fêmeas ( $\chi^2 = 0,0109$ ). Desta forma, as proporções sexuais obtidas em ambos ensaios foram agrupadas para análise do teste qui-quadrado e somente foram utilizados os peixes devidamente sexados. Isso foi necessário porque em dois tratamentos o número de amostras estava muito reduzido para a realização do qui quadrado. E este agrupamento foi possível uma vez que as duas diferentes populações, mesmo com background genético diferente, apresentaram a mesma proporção original (no controle) de machos e fêmeas. Para análise da proporção sexual nos diferentes tratamentos, não foram contabilizados os animais intersexo, uma vez que essa análise estatística compara a frequência de eventos esperados (proporção sexual 1:1 - controle) com os eventos observados (proporção sexual obtida). As proporções sexuais foram estatisticamente iguais nos tratamentos 20, 40, 80 mg E<sub>2</sub>/Kg de ração e no controle (Figura 2). Diferente dos demais tratamentos, não foram identificados machos no tratamento 120 mg E<sub>2</sub>/Kg de ração. A dosagem mais alta afetou significativamente proporção sexual dos indivíduos (Figura 2), sendo que sua proporção sexual de fêmeas e machos foi de 21:0 (números absolutos). Apesar

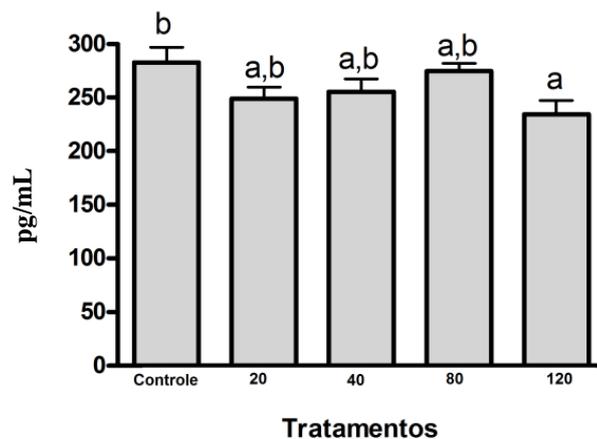
de não apresentar machos em sua população, o tratamento 120 mg E<sub>2</sub>/Kg de ração obteve 16% de animais intersexo.



**Figura 2.** Efeito de diferentes doses de E<sub>2</sub> na proporção de machos e fêmeas de tambaqui. Os valores dos tratamentos estão expressos em mg E<sub>2</sub>/Kg de ração. Letras iguais significam semelhança estatística e letras diferentes significam diferença estatística ( $\chi^2 = 12,03$ ;  $p < 0,005$ ).

### 3.4 Níveis plasmáticos de E<sub>2</sub> após tratamentos

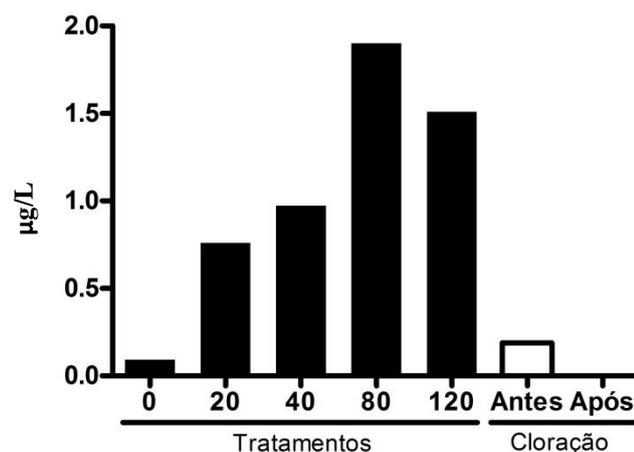
A concentração plasmática de E<sub>2</sub> nos peixes 60 dias após término dos tratamentos foi estatisticamente igual nos tratamentos 20, 40, 80 mg E<sub>2</sub>/Kg de ração (249, 255 e 274 pg/mL, respectivamente) e controle (282 pg/mL). Já no tratamento 120 mg E<sub>2</sub>/Kg de ração a média dos níveis plasmáticos de E<sub>2</sub> foi de 234 pg/mL, semelhante aos demais tratamentos, porém estatisticamente inferior ao do controle (Figura 3).



**Figura 3.** Concentração plasmática de E<sub>2</sub> em tambaquis 60 dias após tratamentos. Nos tratamentos e os valores são expressos em mg E<sub>2</sub>/Kg de ração. Letras iguais significam semelhança estatística e letras diferentes significam diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

### 3.5 Níveis de E<sub>2</sub> residual na água do experimento

Os níveis residuais de E<sub>2</sub> nas amostras de água coletadas logo após término dos tratamentos apresentaram valores bem superiores ao do controle. Na água do tanque reservatório antes da cloração (ambos ensaios) a quantidade de E<sub>2</sub> detectada já era menor que a apresentada logo após o término dos tratamentos. E 30 dias após cloração não foi detectada a presença do hormônio 17β-estradiol na água (Figura 4).



**Figura 4.** Concentração de estradiol na água antes e após a cloração. Para os tratamentos as coletas foram realizadas 3 dias após seu término.

## 4 Discussão

Possuindo cerca de 13% de toda a água doce do mundo e com uma costa marinha superior a 10.000 km, o Brasil é um país com enorme potencial para a aquicultura. A estimativa de potencial de produção de peixes em cativeiro no país é de 20 milhões de toneladas/ano (SIDONIO et al, 2012). Neste cenário, o tambaqui destaca-se por ser a principal espécie nativa com valor econômico, sendo produzida em todas as regiões brasileiras, como puro ou híbrido. Embora o ciclo de produção da espécie já esteja dominado, ainda existe muito espaço para o aumento da produtividade do tambaqui. Baseado na diferença de peso entre machos e fêmeas de tambaqui aos 3 kg (tamanho de mercado na região Amazônica), este trabalho buscou identificar uma dose efetiva de estradiol (E<sub>2</sub>) para a feminização de lotes de tambaqui, com o propósito de contribuir para a validação de um protocolo eficiente e seguro de formação de população monossexo de fêmeas para a espécie.

Durante o experimento, tanto os níveis de oxigênio dissolvido (média acima de 7 mg/L) quanto os valores de pH da água (média de 5,3) atenderam às exigências para o cultivo de tambaqui. Segundo Araújo-Lima e Gomes (2005) e Aride e colaboradores (2004), o tambaqui tem seu crescimento normal em valores de OD superiores a 3 mg/L e o pH entre 4,0 e 6,5. A temperatura também mostrou-se adequada (média de 28,4°C) para uma espécie de clima tropical, que tem seu crescimento ótimo na faixa de 28 a 32°C (KUBITZA, 1999). De qualquer forma, houve uma alta mortalidade em todos os grupos de ambos ensaios (42% ensaio 1 e 39% ensaio 2), que pode ser atribuída às condições de estresse devido à grande frequência de sifonagem para a limpeza dos tanques de polietileno. Na fase de crescimento nos tanques-rede não houve mortalidade relevante. Embora os esteroides sexuais tenham influência no crescimento e sobrevivência dos peixes (BLÁZQUEZ et al, 2001; PIFERRER, 2001), o tratamento com E<sub>2</sub> exógeno não foi o causador das perdas no presente experimento, pois mesmo a maior concentração testada não apresentou diferença da mortalidade observada nos grupos controles de ambas etapas.

Em teleósteos, a diferenciação sexual ocorre primeiro nas fêmeas, com a proliferação de células somáticas para formar a cavidade do ovário acompanhada ou não pela entrada da oogônia em meiose (BRUSLÉ e BRULSÉ, 1983). Nos machos a diferenciação sexual ocorre mais tarde e é caracterizada pela diferenciação das células germinativas primordiais (CGPs) em espermatogônias e pelo arranjo característico destas com as células somáticas em cistos (PIFERRER, 2001). Embora já diferenciados, a identificação do sexo do tambaqui por histologia de fragmentos gonadais não é possível em juvenis com comprimento total inferior a 14 cm. Até este tamanho, as gônadas apresentam as células germinativas envoltas por células somáticas, com difícil distinção entre espermatogônias e oogônias e não há oócitos nos ovários. Por exemplo, no grupo controle não foram observados oócitos nem na maior fêmea analisada, que tinha CP de 20 cm. Desta forma, em tambaqui menores que 20 cm, a identificação de testículos e ovários deve ser realizada somente pela disposição das células germinativas, em cordões testiculares ou em ninhos de oogônias, respectivamente, o que requer um certa experiência do observador. Alguns efeitos secundários da aplicação de esteroides sexuais em peixes, como a esterilidade e o retardo no desenvolvimento sexual (BLÁZQUEZ et al, 1998; DESPREZ e MÉLARD, 1998), poderia explicar esse eventual atraso na diferenciação sexual do tambaqui. A exposição crônica de zebrafish *Danio rerio* ao E<sub>2</sub>, por exemplo, atrasou significativamente o desenvolvimento gonadal na espécie (XU et al,

2008). Porém, a ausência de células meióticas em ovários de tambaqui foi observada tanto em peixes tratados como no controle, excluindo a possibilidade de um eventual efeito do E<sub>2</sub>. Ao contrário do observado em zebrafish, o tratamento com E<sub>2</sub> parece acelerar o desenvolvimento ovariano em tambaqui, pois oócitos primários foram observados em uma fêmea de 15 cm (CP) que recebeu a mais alta concentração de E<sub>2</sub>.

O efetivo sucesso da inversão sexual com a utilização de estrógenos parece ser de difícil alcance quando comparado com a inversão sexual de fêmeas através de andrógenos (PIFERRER e DONALDSON, 1989). Por isso, existe a necessidade de dosagens maiores de estradiol para feminizar efetivamente os peixes se comprado à quantidade de andrógenos para a masculinização (HENDRY et al, 2003). Por outro lado, os estrógenos têm sido utilizados para induzir a diferenciação sexual em pelo menos 56 espécies de teleósteos pertencentes a 24 famílias diferentes (PIFERRER, 2001).

O tratamento hormonal com 120 mg de E<sub>2</sub> por quilograma de ração para larvas a partir de 14 mm efetivamente inverteu o sexo fenotípico de tambaqui, uma vez que nenhum macho foi identificado em ambos ensaios. Entretanto, nesta concentração houve ainda uma pequena percentagem de intersexos (22,2 e 12,5 % nos ensaios 1 e 2, respectivamente) na população. Wang e colaboradores (2008) demonstraram que para bluegill sunfish *Lepomis macrochirus*, doses inferiores a 100 mg E<sub>2</sub>/Kg de ração feminizaram lotes, mas também produziram animais intersexo, ao passo que doses entre 150 a 200 mg E<sub>2</sub>/Kg de ração durante 60 dias produziram 100% de fêmeas. Doses altas (90, 100, 110 mg E<sub>2</sub>/Kg de ração) desse esteroide incorporadas à ração também foram utilizadas para feminizar o jundiá *Rhamdia quelen*, mas nesse caso, além de animais intersexo, a dosagem mais alta ainda apresentou machos (JUNIOR, et al, 2008). Já para a truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss*, o esteroide sintético Valerato de Estradiol em uma dosagem de 20 mg E<sub>2</sub>/Kg de ração durante 56 dias, atingiu uma eficiência de 97% de fêmeas e 3% de intersexo (GUZEL et al, 2008).

Como o período (comprimento) de diferenciação sexual ainda não foi identificado para o tambaqui, a administração precoce (logo ao início da alimentação inerte) do hormônio foi de suma importância para o sucesso da inversão fenotípica. Como os s tratamentos foram iniciados muito precocemente e as análises histológicas foram realizadas cerca de cinco meses após os tratamentos, a alteração do sexo fenotípico do tambaqui pode ser considerada permanente. Em espécies gonocóricas a inversão sexual é geralmente permanente, pois a ação

dos genes determinantes do sexo gonadal é restrita ao período de diferenciação sexual, diferente de espécies hermafroditas onde esses genes podem ser expressos em estágios mais avançados de desenvolvimento gonadal (YAMAZAKI, 1983). A morfologia do tecido gonadal também pode ser afetada pelos esteroides sexuais (BLÁZQUEZ et al, 1998; PIFERRER e DONALDSON, 1992). Peixes com tecidos ovariano e testicular concomitantes (intersexo) têm sido observados frequentemente em experimentos de inversão sexual (LIN et al, 2012). O intersexo pode ser resultado de doses ou períodos de tratamento inadequados (WANG, et al, 2008).

Segundo Piferrer (2001), os resíduos hormonais no peixe desaparecem em menos de um mês após término do tratamento, no caso de uso de esteróides sexuais naturais. A concentração de estradiol no plasma dos animais tratados com doses de 20, 40 e 80 mg E<sub>2</sub>/Kg de ração foi estatisticamente igual ao controle, mostrando que em 60 dias o estradiol exógeno foi totalmente metabolizado pelo organismo dos peixes. Resultados semelhantes foram encontrados para machos de jundiá, que foram submetidos a injeções peritoneais de 0.1 e 1 mg de E<sub>2</sub> por quilograma de peso corporal e após 17 dias apresentaram concentração plasmática semelhante à dos machos não tratados (COSTA et al, 2010). Porém, no tratamento de 120 mg E<sub>2</sub>/Kg de ração os animais apresentaram uma concentração plasmática média de 234 pg/mL, estatisticamente inferior ao controle (282 pg/mL). Esse fato sugere que a maior concentração de E<sub>2</sub> teve um efeito de feed back negativo muito forte e/ou prolongado na produção endógena deste esteróide.

A presença de E<sub>2</sub> em rios e na água para abastecimento humano é cada vez mais frequente, principalmente ao redor de grandes centros urbanos (CHEN et al, 2007; GEROLIN, 2008; MIERZWA et al, 2009). Grande parte dessa contaminação pode vir de compostos químicos sintéticos, empregados nos mais variados usos industriais, comerciais e domésticos (detergentes, resinas, aditivos e monômeros utilizados na produção de plásticos; FERREIRA, 2008; PEREIRA et al, 2011). Apesar de ínfima, quantidade encontrada de E<sub>2</sub> residual no grupo controle não era esperada. Muito provavelmente houve uma contaminação acidental através do uso comum dos equipamentos de limpeza dos tanques experimentais (sifonamento) ou dos equipamentos de aferição da água (oxímetro digital, peagômetros). De qualquer forma, a utilização de 150 g de cloro adicionados a 2 mil litros da água remanescente dos tratamentos, aplicado cinco dias após término da segunda etapa do experimento é 100% eficaz na degradação do E<sub>2</sub>. O cloro, por sua característica oxidante, é conhecido pela

capacidade de remover compostos orgânicos ou converter compostos tóxicos em não tóxicos (PEREIRA et al, 2013).

A produção de população monosexo é um avanço para a cultura de peixes, e já provou ser eficiente para o aumento da produtividade em diversas espécies, tais como a enguia *Anguilla Anguilla* (TZCHORI et al, 2004), carpa comum *Cyprinus carpio* (KOCOUR et al, 2003), robalo *Dicentrarchus labrax* (NAVARRO-MARTÍN et al, 2009), bacalhau do Atlântico *Gadus morhua* (LIN et al, 2012), truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* (KUZMINSKI e DOBOSZ, 2010) e outros salmonídeos. O presente estudo é pioneiro na feminização direta de tambaqui, e apresenta resultados promissores para o desenvolvimento desta técnica para a principal espécie nativa brasileira, uma vez que as fêmeas de tambaqui crescem cerca de 18% a mais que os machos em sistema de cultivo intensivo (dados não publicados). Entretanto, mais estudos se fazem necessários a fim de reduzir o tempo de tratamento, investigar possíveis resíduos de E<sub>2</sub> na carne do peixe (aspectos de segurança alimentar), e principalmente avaliar a viabilidade econômica da população monosexo de fêmeas em tambaqui.

## 5 Conclusão

Considerando efeito do E<sub>2</sub> na feminização de tambaqui, a dose de 120 mg de E<sub>2</sub> por quilograma de ração administrados durante 6 semanas mostrou ser um tratamento eficaz, com uma inversão sexual de 84% da população. E o tratamento da água com cloro na concentração de  $75.10^{-3}$  g/L de água elimina resquícios do estradiol, garantindo a segurança ambiental do procedimento.

## 6 Referências Bibliográficas

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA -ANVISA. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Resolução RE nº 899, de 29/05/2003.

AMARANTE-JÚNIOR, O. P.; BRITO, N. M.; RIBEIRO, M. L. Desenvolvimento de método simples para a determinação de resíduos de Diuron por cromatografia a líquido em amostras de laranja. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 15, p. 15-20, 2005.

ARAÚJO-LIMA, C. A. R. M.; GOMES L. C. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Cap. Tambaqui, p.179. Ed. da UFSM. Santa Maria, 2005, 468 p.

ARIDE, P. H. R., ROUBACH, R. E; VAL, A. L. Water pH in central Amazon and its importance for tambaqui (*Colossoma macropomum*) culture. **World Aquacult.**, v. 35, p. 24-27, 2004.

ATAR, H. H.; BEKCAN, S.; DOGANKAYA, L. Effects of different hormones on sex reversal of rainbow trout (*Oncorhynchus Mykiss* Walbaum) and production of all-female populations. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 23, p. 1509-1514, 2009.

BLÁZQUEZ, M. et al. Critical period of androgen-inducible sex differentiation in a teleost fish, the European sea bass. **Journal of Fish Biology**, v. 58, p. 342-358, 2001.

BLÁZQUEZ, M. et al. Structural and functional effects of early exposure to estradiol-17 $\beta$  and 17 $\alpha$ -ethynylestradiol on the gonads of the gonochoristic teleost *Dicentrarchus labrax*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 18, p. 37-47, 1998.

BRASIL. MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. Boletim estatístico da pesca e aquicultura 2011. 60 p.

BRITO, N. M. et al. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129-146, 2003.

BRUSLÉ, J.; BRUSLÉ, S. La gonadogenèse des Poissons. **Reproduction Nutrition Développement**, v. 23, n. 3, p. 453-491, 1983.

CHATAIN, B.; SAILLANT, E.; PERUZZI, S. Production of monosex male populations of European seabass, *Dicentrarchus labrax* L. by use of the synthetic androgen 17 $\alpha$ -methyldehydrotestosterone. **Aquaculture**, v. 178, n. 3, p. 225-234, 1999.

CHEN, C. Y. et al. Determining estrogenic steroids in Taipei waters and removal in drinking water treatment using highflow solid-phase extraction and liquid chromatography. **Science of the Total Environment**, v. 378, p. 352-365, 2007.

CNAANI, A.; LEVAVI-SIVAN, B. Sexual development in fish, practical applications for aquaculture. **Sexual Development**, v. 3, n. 2-3, p. 164-175, 2009.

COSTA, D. D. M. et al. Vitellogenesis and other physiological responses induced by 17- $\beta$ -estradiol in males of freshwater fish *Rhamdia quelen*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 151, n. 2, p. 248-257, 2010.

DESPREZ, D., MÉLARD, C. Influence of sexual genotype on reproduction traits of females (genotype WZ) and pseudofemales (genotype ZZ) in the tilapia *Oreochromis aureus*. **Aquatic Living Resources**, v. 11, p. 145-153, 1998.

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

DONALDSON, E. M. The integrated development and application of controlled reproduction techniques in Pacific salmonid aquaculture. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 2, p. 9-24, 1986.

FERREIRA, M. G. M. **Remoção da atividade estrogênica de 17 $\beta$ -estradiol e de 17 $\alpha$ -etinilestradiol pelos processos de ozonização e O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**. 2008. 173 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

GEROLIN, E. R. R. **Ocorrência e Remoção de disruptores endócrinos em águas utilizadas para abastecimento público de Campinas e Sumaré – São Paulo**. 2008. 185 f. Tese (Doutorado em Engenharia Civil) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, 2008.

GUZEL, S. et al. Effects of Oral administration of estradiol valerate on gonadal sex differentiation in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 7, p. 1400-1404, 2008.

HENDRY, C. I.; MARTIN-ROBICHAUD, D. J.; BENFEY, T. J. Hormonal sex reversal of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). **Aquaculture**, v. 219, p. 769-781, 2003.

HUNTER, G. A.; DONALDSON, E. M. Hormonal sex control and its application to fish culture. In: HUNTER, G.A.; DONALDSON, E.M. **Fish Physiology**. New York: Academic Press, INC, 1983. Cap. 5. p. 223-303.

JUNIOR, H. A. et al. Análise de diferentes dosagens de hormônio na ração, para definição de um protocolo de feminilização do jundiá *Rhamdia quelen*. **Revista Eletrônica de Veterinária**, v. 9, n. 12, p. 1-7, 2008.

KOCOUR, M.; LINHART, O.; GELA, D. Results of comparative growing test of all-female and bisexual population in two-year-old common carp (*Cyprinus carpio* L. ) . **Aquaculture International**, v. 11, p. 369-378, 2003.

KUBITZA, F. **Qualidade da água na produção de peixes**. 3<sup>a</sup> ed. Jundiaí – SP,

KUZMINSKI, H.; DOBOSZ, S. Effect of sex reversal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using 17 $\alpha$ -methyltestosterone and 11 $\beta$ -hydroxyandrostenedione. **Archives of Polish Fisheries**, v. 18, p.45-49, 2010

LIN, S.; BENFEY, T. J.; MARTIN-ROBICHAUD, D. J. Hormonal sex reversal in Atlantic cod, *Gadus morhua*. **Aquaculture**, v. 364, p. 192-197, 2012.

MIERZWA, J. C.; AQUINO, S. F.; VERAS, L. R. V. **Remoção de desreguladores endócrinos**. In: PÁDUA, V.L.P. (Coord.) Remoção de microrganismos emergentes e microcontaminantes orgânicos no tratamento de água para consumo humano. Belo Horizonte: Ed. ABES, 2009, p. 251-291.

NAVARRO-MARTÍN, L.; BLÁZQUEZ, M.; PIFERRER, F. Masculinization of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) by treatment with an androgen or aromatase inhibitor involves different gene expression and has distinct lasting effects on maturation. **General and Comparative Endocrinology**, v. 160, p. 3-11, 2009.

PEREIRA, R. O. et al. Degradação parcial de 17 $\beta$ -estradiol por cloração aplicada ao tratamento da água. **Eng. Sanit. Ambient.**, v. 18, n. 3, p. 215-222, 2013.

PEREIRA, R. O. et al. Removal of estrogens through water disinfection processes and formation of by-products. **Chemosphere**, v. 82, p. 789-799, 2011.

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

PIFERRER, F., DONALDSON, E. M. The comparative effectiveness of the natural and a synthetic estrogen for the direct feminization of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). **Aquaculture**, v. 106, p. 183-193, 1992.

PIFERRER, F., DONALDSON, E. M. Uptake and clearance of exogenous estradiol-17 $\beta$  and testosterone during the early development of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*), including eggs, alevins and fry. **Fish Physiol. Biochem.**, v. 13, p. 219-232, 1994.

PIFERRER, F.; DONALDSON, E. M. Gonadal differentiation in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, after a single treatment with androgen or estrogen at different stages during ontogenesis. **Aquaculture**, v.77, p. 2-3, 1989.

POPMA, T. J.; GREEN, B. W. **Aquacultural Production Manual: Sex reversal of tilapia in earthen ponds**. Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University Alabama. Research and Development Series, n. 35, set/1990, 15p.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

SIDONIO, L. et al. **Panorama da aquicultura no Brasil: desafios e oportunidades**. BNDES Setorial–Agroindústria, n. 35, p. 421-463, 2012.

SOLAR, I. I.; BAKER, I. J.; DONALDSON, E. M. Experimental use of “female sperm” in the production of monosex female stocks of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) at commercial fish farms. **Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci.**, n. 1552, p. 14, 1987.

TARANGER, G. L. et al. Control of puberty in farmed fish. **General and Comparative Endocrinology**, v. 165, p. 483-515, 2010.

TURRA, E. M et al. Controle reprodutivo em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) por meio de manipulações sexuais e cromossômicas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, p. 21-28, 2010.

TZCHORI, I. et al. The influence of phytoestrogens and estradiol-17 $\beta$  on growth and sex determination in the European eel (*Anguilla anguilla*). **Aquaculture Research**, v. 35, p. 1213-1219, 2004.

WANG, H. P. et al. Effects of estradiol-17 $\beta$  on survival, growth performance, sex reversal and gonadal structure of bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*). **Aquaculture**, v. 285, p. 216-223, 2008.

XU H. et al. Exposure to 17 $\alpha$ -ethynylestradiol impairs reproductive functions of both male and female zebrafish (*Danio rerio*). **Aquat Toxicol.**, v. 88, p. 1-8, 2008.

YAMAMOTO, T. Sex differentiation. **Fish physiology**, v. 3, p. 117-175, 1969.

YAMAZAKI, F. Sex control and manipulation in fish. **Aquaculture**, v. 33, p. 329-354, 1983.

QUEIROZ, J.F.; LOURENÇO, J.N.P.; KITAMURA, P.C. Embrapa e a aquicultura: demandas e prioridades de pesquisa (Embrapa and aquaculture: research demands and priorities). Brasília, Embrapa (Brazilian Agricultural Research Corporation), Brazil, 2002.

## **Considerações Finais**

Capítulo

4

Em muitas espécies de teleósteos, o desempenho zootécnico ou características morfofisiológicas da fêmea a tornam economicamente superior ao macho (HENDRY et al, 2003; JUNIOR et al, 2008; KOCOUR et al, 2003; KUZMINSKI e DOBOSZ, 2010; LEE et al, 2004; LIN et al, 2012; LUCKENBACH et al, 2003; NAVARRO-MARTÍN et al, 2009; TZCHORI et al, 2004). Essa situação pode ser observada em tambaqui, principal espécie nativa cultivada para corte no Brasil. A presente dissertação apresenta o trabalho que objetivou determinar uma concentração efetiva de estrogênio para a feminização de tambaquis machos, com a finalidade de contribuir com informações precisas para o desenvolvimento de um protocolo de formação direta de população monosexo de fêmeas para a espécie. Além disso, contém uma vasta revisão de literatura sobre populações monosexo de peixes de valor comercial, bem como sobre os eventos fisiológicos (determinação e diferenciação sexual) que permitem a inversão sexual fenotípica em teleósteos.

Na presente investigação foi possível constatar que a meiose é um evento muito tardio em fêmeas de tambaqui. Enquanto que na maioria das espécies de teleósteos a meiose nas fêmeas ocorre durante o processo de diferenciação sexual, ou seja, bem no início do desenvolvimento ovariano (revisado em DEVLIN e NAGAHAMA, 2002; MAZONI et al, 2010), em tambaquis não há a presença de oócitos em fêmeas de até 20 cm (comprimento padrão). Esse fato dificulta a identificação do sexo na espécie por histologia de fragmentos de gônadas.

Os resultados obtidos comprovaram a eficiência do hormônio esteroide  $17\beta$ -estradiol na feminização de tambaqui, na concentração de 120 mg  $E_2$ /Kg de ração. Como o tamanho em que ocorre a diferenciação sexual do tambaqui ainda não foi identificado, o tratamento dietético deve ter início tão logo as pós-larvas iniciem sua alimentação exógena (aproximadamente 14 mm de comprimento) e deve ser interrompido por um período de seis semanas. Apesar do sucesso na feminização do tambaqui com 120 mg  $E_2$ /Kg de ração, mais pesquisas se fazem necessárias a fim de verificar o melhor tempo de duração do tratamento, ou seja, se é possível uma redução no tempo de 6 semanas, visto que em outras espécies, o tratamento por uma semana pode ser eficiente. Também a viabilidade econômica desse novo modelo de produção, aplicado na cultura do tambaqui, é outro fator que deverá ser analisado futuramente.

Atenta aos possíveis riscos ambientais da técnica de inversão sexual, a presente investigação utilizou a cloração para tratar a água remanescente das dietas terapêuticas com E<sub>2</sub>. Análises das amostras da água dos tanques experimentais antes e após a cloração foram realizadas na Embrapa Meio ambiente, Campinas, SP, para confirmação da eficiência da cloração na depuração de resíduos hormonais. O uso do cloro eliminou 100% do hormônio residual da água dos experimentos.

Há muito tempo a inversão sexual direta tem sido utilizada em produções de tilápias e salmonídeos, e nessas famílias, os resíduos hormonais desaparecem do organismo do peixe 30 dias após o tratamento (PIFERRER, 2001). Para validação e implementação de um protocolo de inversão sexual direta no cultivo de tambaqui, é importante garantir a biossegurança do produto final, sem riscos de presença residual do E<sub>2</sub>. Já com vistas nesse compromisso com a segurança alimentar, foram coletados filés dos animais utilizados (dos grupos controles e tratados) para análise de possíveis resíduos hormonais. A análise por cromatografia líquida-espectrometria de massa de alta eficiência (HPLC-MS) está sendo realizada no laboratório de Toxicologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp, Campinas. Tão logo os resultados das análises de resquícios hormonais no filé dos peixes estejam prontos, os dados serão analisados e incluídos no artigo apresentado no Capítulo 3. Certamente a inversão sexual pelo método indireto evita os problemas relacionados à segurança alimentar, visto que peixes tratados são utilizados como reprodutores e portanto não são consumidos. Porém sem a identificação do sistema de determinação sexual da espécie em questão, que muito varia entres os teleósteos, essa técnica se torna impossível.

Embora o testes sobre a segurança alimentar da técnica ainda esteja sendo realizado, o presente trabalho representa um grande avanço na feminização direta de tambaqui. O estabelecimento de um protocolo seguro de inversão sexual direta para produção de população monosexo feminina de tambaqui certamente elevará a rentabilidade da atividade, uma vez que permitirá o aumento da produtividade (em kg de peixe produzido) sem precisar aumentar a área de lâmina d'água cultivável, garantindo assim sustentabilidade da cadeia produtiva.

## Referências Bibliográficas

- DEVLIN, R. H., NAGAHAMA, Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. **Aquaculture**, v. 208, p. 191-364, 2002.
- HENDRY, C. I.; MARTIN-ROBICHAUD, D. J.; BENFEY, T. J. Hormonal sex reversal of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). **Aquaculture**, v.219, p.769-781, 2003.
- JUNIOR, H. A. et al. Análise de diferentes dosagens de hormônio na ração, para definição de um protocolo de feminilização do jundiá *Rhamdia quelen*. **Revista Eletrônica de Veterinária**, v. 9, n. 12, p. 1-7, 2008.
- KOCOUR, M.; LINHART, O.; GELA, D. Results of comparative growing test of all-female and bisexual population in two-year-old common carp (*Cyprinus carpio* L. ) . **Aquaculture International**, v.11, p.369-378, 2003.
- KUZMINSKI, H.; DOBOSZ, S. Effect of sex reversal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using 17 $\alpha$ -methyltestosterone and 11 $\beta$ -hydroxyandrostenedione. **Archives of Polish Fisheries**, v. 18, p. 45-49, 2010
- LEE, P; KING, H; PANKHURST, N. Preliminary assessment of sex inversion of farmed Atlantic salmon by dietary and immersion androgen treatments. **North American Journal of Aquaculture**, v. 66, p. 1-7, 2004.
- LIN, S.; BENFEY, J. T; MARTIN-ROBICHAUD, D. Hormonal sex reversal in Atlantic cod, *Gadus morhua*. **Aquaculture**, v.364-365, p.192–197, 2012.
- LUCKENBACH, J. A. et al. Gonadal differentiation and effects of temperature on sex determination in southern flounder (*Paralichthys lethostigma*). **Aquaculture**, v.216, p.315-327, 2003.
- MAZZONI, T. S.; GRIER, H. J.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I. Germline cysts and the formation of the germinal epithelium during the female gonadal morphogenesis in *Cyprinus carpio* (Teleostei: Ostariophysi: Cypriniformes). **The Anatomical Record**, v. 293, n. 9, p. 1581-1606, 2010.
- NAVARRO-MARTÍN, L.; BLÁZQUEZ, M.; PIFERRER, F. Masculinization of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) by treatment with an androgen or aromatase inhibitor involves different gene expression and has distinct lasting effects on maturation. **General and Comparative Endocrinology**, v. 160, p. 3-11, 2009.
- PIFERRER, F. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. **Aquaculture**, v. 197, p. 229-281, 2001.
- TZCHORI, I. et al. The influence of phytoestrogens and estradiol-17 $\beta$  on growth and sex determination in the European eel (*Anguilla anguilla*). **Aquaculture Research**, v. 35, p. 1213-1219, 2004.