



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE AQUICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

**INDUÇÃO DA INVERSÃO SEXUAL DE MACHOS DO
ROBALO-FLECHA, *Centropomus undecimalis*, COM
IMPLANTES DO HORMÔNIO 17- β ESTRADIOL**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Aquicultura da
Universidade Federal de Santa Catarina
para a obtenção do Grau de Mestre em
Aquicultura

Orientador: Vinicius Ronzani Cerqueira

Gabriel Passini

Florianópolis – SC
2013

Catálogo na fonte elaborada pela biblioteca da
Universidade Federal de Santa Catarina

Passini, Gabriel

Indução da inversão sexual de machos de robalo-flecha, *Centropomus undecimalis*, com implantes do hormônio 17-B estradiol [dissertação] / Gabriel Passini ; orientador, Vinicius Ronzani Cerqueira - Florianópolis, SC, 2013.

47 p. ; 21cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura.

Inclui referências

1. Aquicultura. 2. Inversão Sexual. 3. Hormônios esteróides. 4. Reprodução de peixes. I. Cerqueira, Vinicius Ronzani. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. III. Título.

Indução da inversão sexual de machos do robalo-flecha, *Centropomus undecimalis*, com implantes do hormônio 17- β estradiol

Por

GABRIEL PASSINI

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM AQUICULTURA

e aprovada em sua forma final pelo Programa de
Pós-Graduação em Aqüicultura.

Prof. Alex Pires de Oliveira Nuñez, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Dr. Vinícius Ronzani Cerqueira – *Orientador*

Dr. Evoy Zaniboni Filho

Dr. Hilton Amaral Júnior

Dr. Ricardo Berteaux Robaldo

Este trabalho é dedicado a minha
família e amigos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família por terem me apoiado na escolha acadêmica.

Agradeço ao professor Vinicius por passar sabedoria e amizade.

Agradeço a minha namorada Cristina por sempre estar ao meu lado.

Agradeço todos os amigos de LAPMAR: Salete, Vaicão, Israel (Eterno), Cebola, Sayão, Fabio Fialho, Marco, Lucas Gabriel, Virgínia, Scheila, Bia, Atan, Dudu, Luís Paulo, Gabriel Bail, João Henrique, Lucas Guinle, Andressa, Wanessa, Felipe Landuci, Guto, Marcella, Ricardo Takeuchi, Thaís, Herdras, Fabio Sterzelecki por terem tornado este mestrado tão divertido.

Agradeço aos professores e técnicos: Afonso Celso Dias Bainy e Jacó (LABCAI), Aimê Rachel Magenta Magalhães e Ana Lúcia (LABPAQ), Vildes Maria Scussel e Giovana (LABMICO), José Luiz Pedreira Mouriño (LCM) por cederem conhecimento, estruturas e equipamentos para realização deste estudo.

Aos colegas de pós-graduação pela amizade durante o período de disciplinas.

A todos os amigos extra laboratório.

Aos colegas da EPAGRI: Fabiano e Zero pela ajuda no transporte peixes.

Aos membros Titulares e Suplentes da banca: Evoy Zaniboni Filho, Iilton Amaral Jr., Ricardo Berteaux Robaldo, Anita Rademaker e Eduardo Medeiros Ferraz por aceitarem participar e contribuir nesta dissertação.

Ao Carlito por sempre ser prestativo.

Ao Sergio Pitz por além de ceder os peixes para esta pesquisa ser um entusiasta da piscicultura marinha.

Ao CNPq pela bolsa de mestrado.

RESUMO

O robalo-flecha (*Centropomus undecimalis*) é um hermafrodita protândrico e um dos entraves para a reprodução em laboratório é a captura e manutenção das fêmeas. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de implantes do hormônio 17- β estradiol (E2) para induzir a mudança de sexo em machos adultos. Foram utilizados 39 peixes com peso inicial de 383 ± 83 g. Cada peixe foi marcado com um “transponder” e recebeu um implante. Foram testadas quatro dosagens (0,5; 1,0; 4,0 e 8,0 mg kg⁻¹) de E2 em implantes EVAc mais um grupo controle. Os parâmetros avaliados foram: crescimento, sobrevivência, IGS, IHS, morfologia das gônadas e fígado e a dosagem de esteroides (T e E2) no plasma sanguíneo. A sobrevivência foi de 100 % no controle, 0,5 e 1,0 mg kg⁻¹, de 57 % no 4 mg kg⁻¹ e nenhum sobreviveu no 8 mg kg⁻¹. O ganho de peso nos tratamentos controle e 0,5 mg kg⁻¹ foi significativamente maior que 4 mg kg⁻¹ e não diferiu de 1 mg kg⁻¹. Todos os peixes tratados com E2 tiveram desenvolvimento dos ovários enquanto que os do controle continuaram machos. Com 15 dias, os níveis de E2 no plasma aumentaram diretamente com a dosagem de hormônio. Os níveis de T no controle foram maiores em todos os tempos amostrais em relação aos tratados com E2. Os resultados demonstram que a dosagem de 0,5 mg kg⁻¹ de E2 em implantes EVAc é eficiente para induzir a mudança de sexo em machos do robalo flecha.

Palavras-chave: esteroide, protândrico, mudança de sexo, reprodução, estrógeno.

ABSTRACT

The common snook (*Centropomus undecimalis*) is a hermaphrodite protandric and one of the barriers to reproduction in the laboratory is the capture and maintenance of females. The aim of this study was to evaluate the effect of hormone 17- β estradiol (E2) in implants to induce sex change in adult males. The study used 39 fishes with an initial body weight of 383 ± 83 g. Each fish was marked with a "transponder" and received an implant. Four dosages (0,5; 1,0; 4,0 e 8,0 mg kg⁻¹) of E2 were tested in EVAc implants and control group. The parameters evaluated were: growth, survival, GSI, HSI, liver and gonad morphology and dosage of steroids (T and E2) in blood plasma. Survival was 100% in control, 0.5 and 1.0 mg kg⁻¹, 57% at 4 mg kg⁻¹ and none survived at 8 mg kg⁻¹. The weight gain in the group control and 0.5 mg kg⁻¹ was significantly higher than 4 mg kg⁻¹ and had no difference between 1 mg kg⁻¹. All fish treated with E2 had ovarian development while control remained males. At 15 days, the plasma levels of E2 directly increased with the dosage of hormone. T levels were higher in control at all times in relation to fish treated with E2. The results demonstrate that the dosage of 0.5 mg kg⁻¹ of E2 in EVAc implant is effective for inducing male sex changes in common snook.

Keywords: steroids, protandrous, sex change, reproduction, estrogens.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
2.	OBJETIVO GERAL	18
2.1.	<i>Objetivos específicos</i>	18
3.	ARTIGO CIENTÍFICO	19
	Indução da inversão sexual de macho de robalo-flecha, <i>Centropomus undecimalis</i> , com implantes de hormônio 17- β estradiol.	
3.1.	INTRODUÇÃO	22
3.2.	MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.2.1.	<i>Material biológico e desenho experimental</i>	23
3.2.2.	<i>Implantes com 17-β estradiol</i>	24
3.2.3.	<i>Amostragens de gônadas e fígado</i>	24
3.2.4.	<i>Amostragens e análises das concentrações de estradiol e testosterona no plasma</i>	25
3.2.5.	<i>Cálculos dos dados e análises estatísticas</i>	25
3.3.	RESULTADOS	26
3.3.1.	<i>Avaliações dos índices zootécnicos</i>	26
3.3.2.	<i>Observações macroscópica e microscópica das gônadas</i>	29
3.3.3.	<i>Concentrações de esteroides no plasma sanguíneo</i>	31
3.3.3.1.	<i>Estradiol (E2)</i>	31
3.3.3.2.	<i>Testosterona (T)</i>	31
3.4.	DISCUSSÃO	32
3.5.	REFERÊNCIAS	36
4.	REFERÊNCIAS da INTRODUÇÃO	42

1. INTRODUÇÃO

Os peixes estão entre os vertebrados com maior plasticidade em relação à expressão do sexo: apresentam gonocorismo, partenogênese, determinação do sexo dependente da temperatura, hermafroditismo simultâneo ou sequencial (GODWIN, 2010). Dentre os hermafroditas sequenciais encontram-se os protogínicos, peixes que maturam primeiro como fêmeas, os protândricos, peixes que maturam primeiro como machos e os bidirecionais, que podem mudar de sexo várias vezes (GARDNER et al., 2005). Segundo MUNDAY et al. (2006), essa flexibilidade para mudança de sexo é parte de uma estratégia reprodutiva com grande sucesso entre os peixes teleosteos.

Os hormônios esteroides atuam no eixo hipotálamo-pituitária-gônada e estão envolvidos diretamente nos processos naturais de diferenciação sexual, mudança de sexo e maturação gonadal nos peixes. Os principais hormônios esteroides são Testosterona e 11-Cetotestosterona, para machos, e estradiol, para fêmeas (PIFERRER, 2001; FRISCH, 2004; GUIGUEN et al., 2010).

Um dos pré-requisitos para domesticação e estabelecimento de uma produção confiável na aquicultura é a capacidade de controle dos processos reprodutivos em peixes em cativeiro (MYLONAS et al., 2010). Como por exemplo, o controle do sexo dos peixes visa obter alguma vantagem relacionada há um dos sexos (PANDIAN e SHEELA, 1995).

Vários autores tem demonstrado a viabilidade da inversão sexual de peixes em cativeiro com diversas espécies protogínicas: *Epinephelus marginatus* (CABRITA et al., 2009) *Epinephelus coioides* (YEH et al., 2003a) *Epinephelus merra* (BHANDARI et al., 2004) *Halichoeres trimaculatus* (NOZU et al., 2009) e com espécies protândricas: *Lates calcarifer* (ANDERSON e FORRESTER, 2001), *Sparus aurata* (CONDEÇA e CANÁRIO, 1999), *Acanthopagrus schlegeli* (DU et al., 2003).

Em espécies protogínicas, como a garoupa *Epinephelus sp.*, a inversão sexual em cativeiro é realizada geralmente com hormônios andrógenos (YEH et al., 2003a; YEH et al., 2003b; SANCHES et al., 2008). No ambiente natural os machos das espécies *Epinephelus tauvira* e *E. marginatus* são encontrados somente a partir dos 10 e 14 anos, respectivamente. Com essa idade os peixes têm mais de 20 kg o que dificulta a captura e manutenção dos peixes em cativeiro (YEH et al., 2003b). Por isso, a mudança do sexo de fêmeas para macho é necessária para o controle da reprodução em cativeiro (CABRITA et al., 2009).

Existem poucos estudos sobre a inversão sexual de espécies protândricas visando a reprodução em cativeiro. Grande parte dos estudos foi realizada para obter informações sobre os processos endócrinos e fisiológicos dos organismos (CHANG et al., 1995; CONDEÇA e CANÁRIO, 1999; ATHAUDA et al., 2012; KIM et al., 2012). Em geral, para mudança de sexo em espécies protândricas utilizam-se estrógenos. O estradiol E2 é um estrógeno que naturalmente é produzido no ovócito e atua na diferenciação sexual e mudança de sexo, estimulando desenvolvimento do tecido ovariano (NAKAMURA et al., 2003).

Em um estudo com o robalo asiático *Lates calcarifer*, uma espécie hermafrodita protândrica, foi administrada o hormônio estradiol em implantes de colesterol nas dosagens de 0,2; 1,5; 8,4 e 44 mg kg⁻¹, obtendo fêmeas nas dosagens de 8,4 e 44 mg kg⁻¹ (ANDERSON e FORRESTER, 2001).

As formas de administração mais comuns de hormônios esteroides para peixes adultos são na dieta (CONDEÇA e CANÁRIO, 1999; CHANG et al., 1995) e com implantes de liberação gradativa (PANKHURST et al., 1986; YEH et al., 2003b; SARTER et al., 2006). Os implantes mais comuns utilizados com hormônios esteroides são de colesterol/manteiga (YEH et al., 2003a; ANDERSON e FORRESTER, 2001), implantes silásticos (CABRITA et al., 2009; YAMAGUTI et al., 2004) e implantes Etileno Vinil Acetato (EVAc) (SARTER et al., 2006). Dentre estes implantes destaca-se o EVAc que são simples de serem manufaturados e as proporções dos componentes aglutinantes (inulina e soro da albumina bovina) participam ativamente da cinética de liberação por terem diferentes tamanhos e composição química (MYLONAS e ZOHAR, 2001). Os implantes EVAc são amplamente utilizados tanto para a maturação das gônadas (AIZEN et al., 2005 ; RAINIS et al., 2005; GUZMÁN et al., 2011) quanto para indução a desova (DUNCAN et al., 2003; MARINO et al., 2003; GUZMÁN et al., 2009).

Em um único estudo de inversão sexual com a garoupa verdadeira, *E. marginatus*, utilizando implantes EVAc com o hormônio 17 α -metil-testosterona foi avaliado que após 32 dias da implantação somente 45 % da carga total do hormônio tinha sido liberada (SARTER et al., 2006).

O robalo flecha, *Centropomus undecimalis*, é um peixe da família Centropomidae que possui potencial para a piscicultura marinha e estuarina além de ter boa aceitação e valor de mercado (TUCKER, 2005; CERQUEIRA e TSUZUKI, 2009). Possui ampla distribuição geográfica no Atlântico, da Flórida até o Sul de Santa Catarina (RIVAS,

1986). A espécie foi recentemente incluída entre as que possuem maior potencial para a piscicultura marinha no Brasil (CAVALLI e HAMILTON, 2007).

Esta espécie foi amplamente estudada no México, Estados Unidos e Brasil, possuindo diversos estudos sobre a sua biologia reprodutiva (TAYLOR et al., 1998; GRIER e TAYLOR, 1998; ROBERTS et al., 1999; TAYLOR et al., 2000; PERERA-GÁRCIA et al., 2011), maturação e reprodução em cativeiro (NEIDIG et al., 2000; SOLIGO et al., 2008; FERRAZ e CERQUEIRA, 2010; IBARRA-CASTRO et al., 2011) e ovos e larvas (YANES-ROCA et al., 2009; WITTENRICH et al., 2009; RHODY et al., 2010; SOLIGO et al., 2011).

Dentre os estudos sobre a biologia reprodutiva do robalo flecha, destaca-se TAYLOR et al., (2000) que definiu a espécie como hermafrodita protândrica. Os mesmos autores constataram que a transição de macho para fêmea, em populações na Flórida, começa com aproximadamente 515 mm e 3,4 anos, sendo rara ocorrência de fêmeas menores de 500 mm (TAYLOR et al. 2000).

Em um estudo recente sobre indução a desova e larvicultura em laboratório, IBARRA-CASTRO et al., (2011) discutem que o maior obstáculo para criação desta espécie em escala comercial é uma forma confiável e estável para produção de formas jovens.

Em estudos anteriores realizados no Laboratório de Piscicultura Marinha (LAPMAR) foi constatado dificuldade para se obter fêmeas a partir de juvenis mantidos em laboratório (FERRAZ e CERQUEIRA, 2010). Além disso, a dificuldade de captura e manejo de fêmeas para obtenção de desovas artificiais é um limitante à reprodução desta espécie (SOLIGO et al., 2008). Uma alternativa a este problema seria a mudança de sexo de machos visando à obtenção de fêmeas menores. Recentemente, foi publicado um trabalho sobre a feminização de juvenis do robalo flecha com o hormônio estradiol (VIDAL-LÓPEZ et al., 2012), entretanto, ainda não existem estudos sobre a inversão sexual de peixes adultos.

Sendo assim, a proposta deste trabalho foi avaliar o efeito de implantes do hormônio 17- β estradiol para inversão do sexo de machos adultos de robalo-flecha, *Centropomus undecimalis*. Além disso, avaliar a morfologia das gônadas e análise de estradiol e testosterona no plasma em diferentes tempos amostrais.

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito de implantes de Etileno-Vinil-Acetato (EVAc) do hormônio 17- β estradiol na inversão do sexo de machos adultos de robalo-flecha, *Centropomus undecimalis*.

2.1. *Objetivos Específicos*

- Determinar uma dosagem segura e eficaz para obter a inversão sexual;
- Avaliar as concentrações dos esteroides sexuais (testosterona e estradiol) no plasma sanguíneo ao longo do período experimental;
- Avaliar o desenvolvimento gonadal de peixes tratados e não tratados hormonalmente.

3. ARTIGO CIENTÍFICO

Indução da inversão sexual de machos do robalo-flecha, *Centropomus undecimalis*, com implantes do hormônio 17- β estradiol.

**Gabriel Passini^{1*}, Cristina Vaz Avelar de Carvalho¹, Fabio Carneiro
Sterzelecki¹, Vinicius Ronzani Cerqueira¹**

¹Laboratório de Piscicultura Marinha – LAPMAR/CCA/UFSC

* Autor para correspondência: gabrielpassini@ig.com.br

RESUMO

O robalo-flecha (*Centropomus undecimalis*) é um hermafrodita protândrico que possui potencial para piscicultura marinha e estuarina por possuir alto valor e aceitação de mercado. Um dos entraves para a reprodução em laboratório é a dificuldade de captura e manutenção das fêmeas. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de implantes do hormônio 17- β estradiol (E2), para mudança de sexo, em machos adultos de robalo-flecha. Foram utilizados 35 peixes com peso inicial de 383 ± 83 g. Cada peixe foi marcado com um “transponder” e recebeu um implante. Foram testadas quatro dosagens (0,5; 1,0; 4,0 e 8,0 mg kg⁻¹) de E2 em implantes Etileno-Vinil-Acetato (EVAc) mais um grupo controle. Os parâmetros avaliados no fim do experimento foram: ganho de peso, sobrevivência, os índices gonadossomático e hepatossomático (IGS e IHS), morfologia das gônadas e fígado e dosagem dos esteroides sexuais (testosterona = T e estradiol = E2) no plasma no início, 15, 45 e 90 dias. A sobrevivência foi de 100 % no controle, 0,5 e 1,0 mg kg⁻¹, de 57 % no 4 mg kg⁻¹ e nenhum sobreviveu no tratamento 8 mg kg⁻¹. O fígado dos peixes que morreram apresentavam dano e desarranjo celular. O ganho de peso no controle e 0,5 mg kg⁻¹ foi significativamente maior do que 4 mg kg⁻¹ e não diferiu de 1 mg kg⁻¹. O IGS foi maior ($p > 0,05$) nos peixes tratados com E2 e não houve diferença no IHS. Todos os peixes tratados com E2 tiveram desenvolvimento completo dos ovários, com ovócitos no estágio perinucleolar, enquanto todos os peixes do controle continuaram com morfologia gonadal de exemplares macho. Os

níveis iniciais de E2 e T no plasma foram $146,90 \pm 40,46 \text{ pg ml}^{-1}$ e $202,75 \pm 27,92 \text{ pg ml}^{-1}$, respectivamente. Com 15 dias, os níveis de E2 no plasma aumentaram diretamente com a dosagem de hormônio, sendo maior no tratamento 8 mg kg^{-1} ($728,37 \pm 147,54 \text{ pg ml}^{-1}$). Os níveis de testosterona no grupo controle foram maiores ($p > 0,05$) em todos os tempos amostrais em relação aos peixes tratados com E2. Os resultados demonstram que a dosagem de $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$ de E2 em implantes de EVAc é eficiente para induzir a inversão sexual em machos do robalo flecha. A mudança de sexo precoce nesta espécie pode reduzir dramaticamente o tempo para obtenção de fêmeas melhorando o controle da reprodução em cativeiro.

Palavras chave: protândrico, esteróides, mudança de sexo, reprodução, estrógeno.

ABSTRACT

The common snook (*Centropomus undecimalis*) is a protandrous hermaphrodite that has potential for marine and estuarine fish culture due to the high value and market acceptance. One of the barriers for reproduction in laboratory is the capture and maintenance of females. The aim of this study was to evaluate the effect of the hormone 17- β estradiol (E2) in implants, for sex change in male adults of common snook. The study used 35 fish with an initial body weight of $383 \pm 83 \text{ g}$. Each fish was marked with a transponder and received one implant. Four doses were tested ($0,5$, $1,0$, $4,0$ and $8,0 \text{ mg kg}^{-1}$) of E2 in Ethylene-vinyl acetate (EVAC) implants plus a control group. The parameters evaluated at the end of the experiment were: weight gain, survival, gonadosomatic and hepatosomatic index (GSI and HSI), histology of the gonads and liver and dosage sex steroids (testosterone=T and estradiol=E2) in plasma at the beginning, 15, 45 e 90 days. The survival was 100% in the control, $0,5$ and $1,0 \text{ mg kg}^{-1}$, 57% at 4 mg kg^{-1} and none survived on 8 mg kg^{-1} . The liver of the fish that died had damage and cellular disarray. The weight gain in the control and $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$ was significantly higher than 4 mg kg^{-1} and had no difference between 1 mg kg^{-1} . The GSI was higher ($p > 0,05$) in fish treated with E2 and no differences were found in HSI. All fish treated with E2 had complete development of the ovaries with oocytes at perinucleolar stage, while all fish in control remained gonadal morphology of males. Initial levels of T and E2 in plasma were $146,90 \pm$

115.28 pg ml⁻¹ and 202,75 ± 40,46 pg ml⁻¹, respectively. At 15 days, the levels of plasma E2 increased directly with the dosage of hormone and were higher in the 8 mg kg⁻¹ (728.37 ± 147.54 pg ml⁻¹). Testosterone levels were higher in control group ($p > 0.05$) at all sampling times compared to fish treated with E2. The results demonstrate that the dosage of 0.5 mg kg⁻¹ E2 in EVAc implants is effective for inducing male sex inversion in common snook. Early sex change in this species can dramatically reduce the time to obtain females improving reproduction in captivity.

Keywords: protandrous, steroids, sex change, reproduction, estrogen.

3.1. INTRODUÇÃO

Os peixes da família *Centropomidae* possuem potencial para a piscicultura marinha e estuarina além de terem boa aceitação e valor de mercado (CERQUEIRA e TSUZUKI, 2009). O robalo flecha, *Centropomus undecimalis*, possui ampla distribuição geográfica no Atlântico, da Flórida até o Sul de Santa Catarina (RIVAS, 1986). É um hermafrodita protândrico e em ambiente natural, a transição de macho para fêmea começa com aproximadamente 550 mm e 3,4 anos (TAYLOR et al., 2000). Segundo IBARRA-CASTRO et al., (2011) o maior obstáculo para criação desta espécie em escala comercial é uma forma confiável e estável para produção formas jovens.

Em estudos anteriores realizados no Laboratório de Piscicultura Marinha (LAPMAR) foi constatado dificuldade para se obter fêmeas a partir de juvenis mantidos em laboratório (FERRAZ e CERQUEIRA, 2010). Além disso, a dificuldade de captura e manejo de fêmeas para obtenção de desovas artificiais também é um limitante à reprodução desta espécie (SOLIGO et al., 2008). Uma alternativa a este problema seria a mudança de sexo de machos visando à obtenção de fêmeas menores.

Uma das técnicas utilizadas para controle da reprodução de hermafroditas sequenciais é a indução a mudança de sexo de indivíduos adultos com hormônios esteróides (FRISCH, 2004; GUIGUEN et al., 2010). Em peixes protogínicos a inversão sexual em cativeiro é realizada com hormônios andrógenos (YEH et al., 2003a; YEH et al., 2003b; CABRITA et al., 2009) e em espécies protândricas com hormônios estrógenos (CHANG et al 1995; ANDERSON e FORRESTER, 2001). Estes hormônios são reguladores-chave para mudança de sexo e são muito utilizados na piscicultura (PIFERRER, 2001). O estradiol E2 é um estrógeno que naturalmente é produzido no ovócito e atua na diferenciação sexual e mudança de sexo, estimulando desenvolvimento do tecido ovariano (NAKAMURA et al., 2003).

As formas de administração mais comuns dos hormônios esteróides são a inclusão na dieta (CONDEÇA e CANÁRIO, 1999; WANG et al., 2008; NAVARRO-MARTÍN et al., 2009) e em implantes de liberação prolongada (PANKHURST et al., 1986; YEH et al., 2003a; SARTER et al., 2006). Dentre os implantes recentemente utilizados destacam-se os implantes de Etileno-Vinil-Acetato (EVAc). Estes implantes são simples de serem manufaturados e os componentes aglutinantes (inulina e soro de albumina bovina) participam ativamente

da cinética de liberação (MYLONAS e ZOHAR, 2001). Em um único estudo com implantes EVAc contendo hormônio esteroide, o 17 α metil-testosterona, foi possível obter inversão sexual de machos da garoupa *Epinephelus marginatus* utilizando apenas inulina como agente aglutinante (SARTER et al., 2006).

Em um estudo com o robalo asiático, *Lates calcarifer*, que possui parentesco próximo com o robalo flecha, foram testadas 4 dosagens do hormônio E2 em implantes de colesterol em machos, obtendo inversão em até 28 dias (ANDERSON e FORESTER, 2001). Em outra espécie protândrica, o pargo negro, *Acanthopagrus schlegeli*, diversos estudos demonstraram que o aumento dos níveis de E2 está associado com a mudança de sexo e que sua administração induz precocemente esta mudança (CHANG et al., 1995; DU et al., 2000; WU et al., 2010). Recentemente, foi publicado um trabalho sobre a feminização de juvenis do robalo flecha com o hormônio E2 (VIDAL-LÓPEZ et al., 2012), entretanto, não há registros na literatura de trabalhos utilizando implantes com 17- β estradiol em adultos de robalo flecha.

Tendo em vista estas informações, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de diferentes dosagens em implantes EVAc do hormônio 17- β estradiol para inversão de sexo de machos adultos de robalo-flecha, *Centropomus undecimalis*.

3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1. Material biológico e desenho experimental

Os indivíduos utilizados neste trabalho resultaram de reprodução artificial realizada em janeiro de 2009 (PITZ, 2009). Os peixes, total 39, tinham peso inicial de 383 ± 83 g e comprimento total de 350 ± 30 mm e marcação individual com um “transponder” (PIT-TAG) (Korth, Animal Tag, Brasil). Eles foram alimentados duas vezes ao dia à saciedade com ração semi-úmida formulada à base de lula e sardinha moída (FERRAZ e CERQUEIRA, 2010). As unidades experimentais utilizadas foram dois tanques de 6 m³ (2x 2x 1,5m), dentro de um viveiro estuarino do Laboratório de Piscicultura Marinha (LAPMAR) de outubro de 2011 a fevereiro de 2012.

Foram testadas quatro dosagens do hormônio E2 (0,5; 1,0; 4,0 e 8,0 mg kg⁻¹) mais um grupo controle (implante sem hormônio). Para cada tratamento foram separados aleatoriamente sete peixes. Foram realizadas quatro amostragens, a inicial e após 45, 90 e 120 dias. Em cada amostragem todos os peixes foram anestesiados (benzocaína a 60 mg L⁻¹), medidos e pesados. Na amostragem inicial os implantes com as

diferentes concentrações de E2 foram inseridos na cavidade abdominal, através de um pequeno corte feito com auxílio de uma lâmina de bisturi, abaixo da nadadeira peitoral. Sobre o corte foi aplicada uma pomada cicatrizante contendo Sulfato de Gentamicina.

No início do experimento a temperatura da água era de 20.2 °C e no final do experimento a temperatura era 29.8 °C, as médias mensais foram: 21,24 ± 1,13 °C, 24,16 ± 1,04 °C, 27,54 ± 2,44 °C, 28,45 ± 0,85 °C e 29,18 ± 0,64 °C nos meses de outubro, novembro, dezembro, janeiro e fevereiro, respectivamente. Neste período o oxigênio dissolvido foi 5,82 ± 0,56 mg L⁻¹, salinidade 25 ± 2,40. Após cada amostragem as redes dos tanques foram trocadas.

3.2.2. *Implantes com 17-β estradiol*

Para cada tratamento foi feita uma solução com diferentes concentrações de E2, com base no peso dos peixes. Os Implantes foram produzidos com Etileno-vinil-acetato (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), contendo 17-β estradiol (Sigma, Aldrich, Estados Unidos). Uma solução contendo 15 % de EVAC e 85 % de MeCl₂ foi adicionada a uma segunda contendo 55% de inulina e 45% de E2. Após homogeneização, a solução final foi posta sobre uma placa de alumínio com uma fina camada (± 2 mm) permanecendo durante 48 h em congelador a -20 °C para evaporação do MeCl₂ e mais 24 h e em uma estufa a 20 °C para eliminar a umidade. Os implantes foram obtidos desta matriz com um faca dermatológica com diâmetro 2 mm (ABC instrumentos, Keyes Punch, Brasil) e armazenados a -20°C até o início do experimento. A metodologia de fabricação dos implantes foi adaptada do estudo com 17-α metil testosterona (SARTER et al., 2006).

3.2.3. *Amostragens de gônadas e fígado para análise histológica*

No início do período experimental, quatro peixes foram sacrificados para avaliação inicial das gônadas. Ao final do experimento, 120 dias após colocação dos implantes, todos os peixes foram sacrificados, pesados e coletados o fígado e as gônadas para avaliação histológica. Para as gônadas e fígado, após pesagem, foram calculados os Índices gonadossomático (IGS) e hepatossomático (IHS). Todos os peixes foram sacrificados com uma superdosagem de benzocaína (100 mg L⁻¹). Os tecidos foram fixados em solução de Davidson marinho durante 24 h, com posterior conservação em álcool 70%. Após desidratação, diafanização e inclusão em parafina, foram feitos cortes transversais de 5 µm de espessura. As lâminas foram coradas com hematoxilina de Harris e Eosina (HE) para posterior

identificação dos tecidos em microscópio. A determinação do estágio microscópica de maturação dos ovários foi feita segundo VAZZOLER (1996) e os testículos segundo GRIER e TAYLOR, (1998).

3.2.4. Amostragens e análises das concentrações de estradiol e testosterona no plasma

Foram avaliadas as concentrações dos esteróides estradiol e testosterona nos dias 0, 15, 45 e 90, com exceção de estradiol com 45 dias. No início (t=0) foram amostrados 10 peixes (n=10) aleatoriamente dentre todos os tratamentos. Nos demais tempos amostrais foram utilizados 4 peixes de cada tratamento (n=4). As amostras de sangue foram retiradas por punção da veia caudal com seringa de 1 mL contendo anticoagulante (EDTA 10 %) e mantidas em eppendorfs sobre o gelo. Ao final da coleta o sangue foi centrifugado para separação do plasma a 3500 RPM, durante 5 min. a 4°C (Centrifuge 5810 R, Eppendorf, Germany).

Os esteróides foram extraídos de 200 µL de plasma de cada indivíduo. Em cada amostra foram efetuadas três lavagens de 1 mL com o solvente diclorometano, sendo descartado o sobrenadante. Em seguida, o solvente foi evaporado com vapor de nitrogênio e o resíduo ressuspenso com 200 µL de solução padrão do Kit DRG contendo 0 ng mL⁻¹ de hormônio Estradiol/Testosterona (0,03% Proclina 300; 0,005% sulfato de gentamicina). As amostras foram então congeladas a -80 °C até o início do ensaio enzimático.

Os kits da DRG (DRG Instruments GmbH, Alemanha) de testosterona e estradiol foram validados para o plasma de *Centropomus undecimalis* através das análises do paralelismo entre a curva padrão e a do plasma diluído em série, da acurácia do spike and recovery e da precisão do inter e intraensaio. Não houve diferença significativa entre as curvas (Regressão linear; T, $P=0,09$; E, $P=0,22$). Foi observada alta precisão nos ensaios, com coeficiente de variação intra e interensaio, respectivamente, de 1,23% e 9,66% para testosterona; 4,50% e 3,20% para estradiol. A acurácia do spike and recovery foi de 129% para testosterona e 104% para a estradiol. As amostras foram lidas no espectrofotômetro (Molecular Devices, SpectraMax M5, Estados Unidos) com o comprimento de onda de 450 nm.

3.2.5. Cálculos dos dados e análises estatísticas

Foram calculados IGS = (peso gônada/peso total) / 100; IHS = (peso do fígado/peso total) / 100; ganho em peso (peso final – peso

inicial); sobrevivência ($S\%$) = $(N_i - N_m / N_i) \times 100$, onde: N_i é o número inicial de peixes e N_m é o número de peixes mortos.

O tratamento estatístico dos dados de peso, comprimento, ganho de peso, IGS e IGH foi feito através da análise de variância (ANOVA uni-fatorial) ao nível de significância de 5% e quando encontradas diferenças significativas foi aplicado o Teste de Tukey. Para avaliar as concentrações de E2 e T no plasma os dados foram submetidos à ANOVA duas vias (tempo e tratamento), seguido pelo teste de Duncan. As análises estatísticas foram realizadas utilizando um software estatístico (Statistica 7.0, Stat Soft Inc., EUA) em um nível de significância de 5 %. Todos os dados são apresentados em Média e Desvio Padrão.

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Avaliações dos índices zootécnicos

A sobrevivência foi de 100 % nos tratamentos controle, 0,5 e 1,0 mg kg⁻¹ E2. No tratamento 4 mg kg⁻¹ E2 a sobrevivência foi de 57 % e no tratamento com 8 mg kg⁻¹ E2 nenhum peixe sobreviveu. No tratamento 8 mg kg⁻¹ E2, a primeira morte foi observada no 18º dia após o início do experimento e a última foi no 28º dia. No tratamento 4 mg kg⁻¹ E2 o primeiro peixe morreu no 22º dia e o último no 27º dia. Antes de morrer os peixes perdiam a orientação de natação e se isolavam do cardume, nadando próximo da superfície. Quando foi observado este comportamento, os peixes eram sacrificados para coleta dos tecidos.

Nos peixes dos tratamentos 4,0 e 8,0 mg kg⁻¹ E2 que foram sacrificados durante o experimento havia inchaço e coloração rosada no poro urogenital. A avaliação morfológica do fígado destes peixes revelou dano e desarranjo celular nos tecidos, vacúolos devido à perda do material lipídico e necrose (figura 1B). Ao final de 120 dias, o fígado dos peixes que dos tratamentos controle; 0,5; 1,0 e 4,0 mg kg⁻¹ E2 não apresentavam sinais de lesão (figura 1A).

Os dados de crescimento e sobrevivência além de IGS e IHS são apresentados na Tabela 1. Houve diferença significativa ($p < 0.05$) entre os tratamentos em relação ao peso final. O comprimento médio ao final do experimento foi de $415,56 \pm 31,58$ mm e não diferiu entre os tratamentos. O ganho de peso apresentou diferença significativa, sendo o controle e 0,5 mg kg⁻¹ E2 superior ao tratamento com 4 mg kg⁻¹ E2, não houve diferença entre os demais.

Ao final do experimento, o IGS foi significativamente superior nos peixes tratados com E2 em relação aos peixes do controle. Não

houve diferença significativa no índice hepatossomático ao final do experimento entre todos os tratamentos. A média do IHS de todos os peixes que morreram no decorrer do experimento foi de $2,993 \pm 0,25$.

Tabela 1. Peso inicial, peso final, ganho em peso, índice gonadossomático (IGS) e índice hepatossomático (IHS) nos robalos-flecha, *C. undecimalis*, implantados com estradiol após 120 dias.

Tratamentos (mg kg ⁻¹ E2)	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Ganho em peso (g)	IGS (%)	IHS (%)
Controle	390 ± 83	614 ± 100	224,36 ± 61,36 ^a	0,032 ± 0,01 ^b	0,737 ± 0,09
0,5	400 ± 79	618 ± 113	218 ± 56,44 ^a	0,170 ± 0,05 ^a	0,871 ± 0,16
1	424 ± 128	589 ± 111	165 ± 51,29 ^{ab}	0,157 ± 0,04 ^a	0,806 ± 0,14
4	387 ± 75	476 ± 42	88 ± 19,97 ^b	0,175 ± 0,02 ^a	0,933 ± 0,08

Média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($P < 0,05$). * As informações foram coletadas após a morte dos peixes.

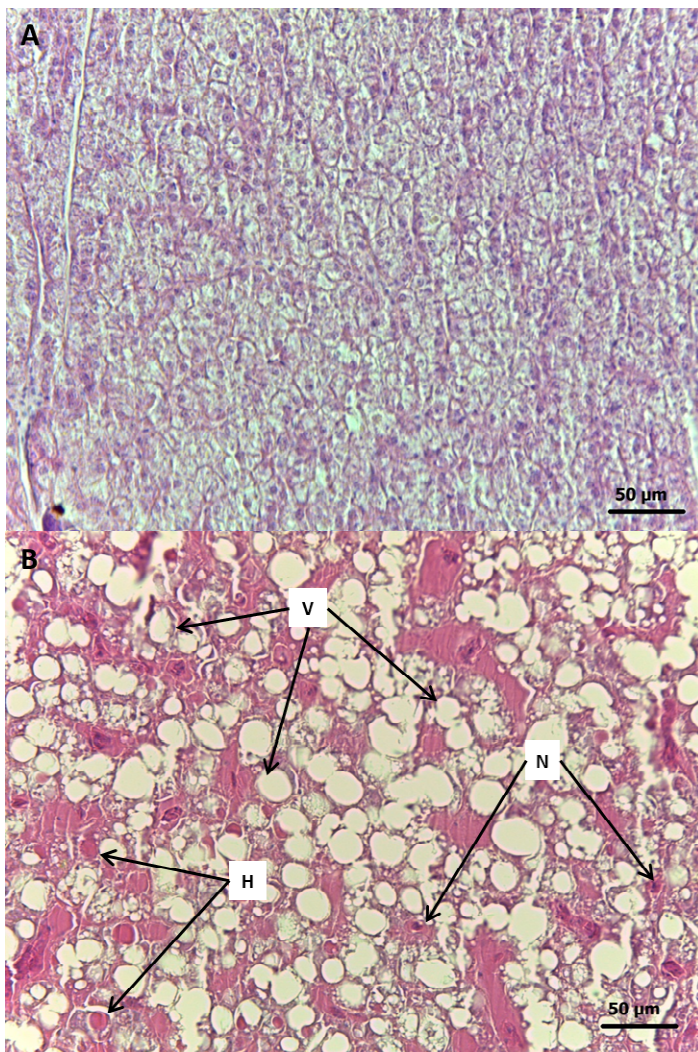


Figura 1 – Fotomicrografia (A) de corte do fígado (5µm) de *Centropomus undecimalis* do tratamento 1 mg kg⁻¹ E2 120 dias após início do experimento. Fotomicrografia (B) de corte do fígado (5µm) de *Centropomus undecimalis* tratado com 17-β estradiol por 19 dias do tratamento 8 mg kg⁻¹ E2: material hialino (H), vacúolos devido à perda de lipídeo (V) e necrose (N). HE. Barra indica 50 µm.

3.3.2. *Observações macroscópica e microscópica das gônadas*

No início do período experimental os peixes apresentavam testículos imaturos, sendo possível observar espermatogônias. No final foram observadas fêmeas apenas nos peixes tratados com hormônio, sendo possível a distinção de fêmeas e machos macroscopicamente. As fêmeas possuíam gônadas arredondadas com coloração rosada, enquanto que os machos possuíam gônadas com coloração esbranquiçada, quase opaca. Todas as gônadas das fêmeas apresentavam ovócitos na fase II de desenvolvimento (VAZZOLER, 1996), apresentando ovócitos perinucleolares (Figura 2A) com diâmetro médio, em todos os tratamentos, de $61,7 \pm 7,41 \mu\text{m}$. Todos os peixes do tratamento controle permaneceram machos, apresentando algum sêmen no fim do experimento, sendo possível identificar espermatogônias, espermatócitos, espermatides e espermatozóides (Figura 2B).

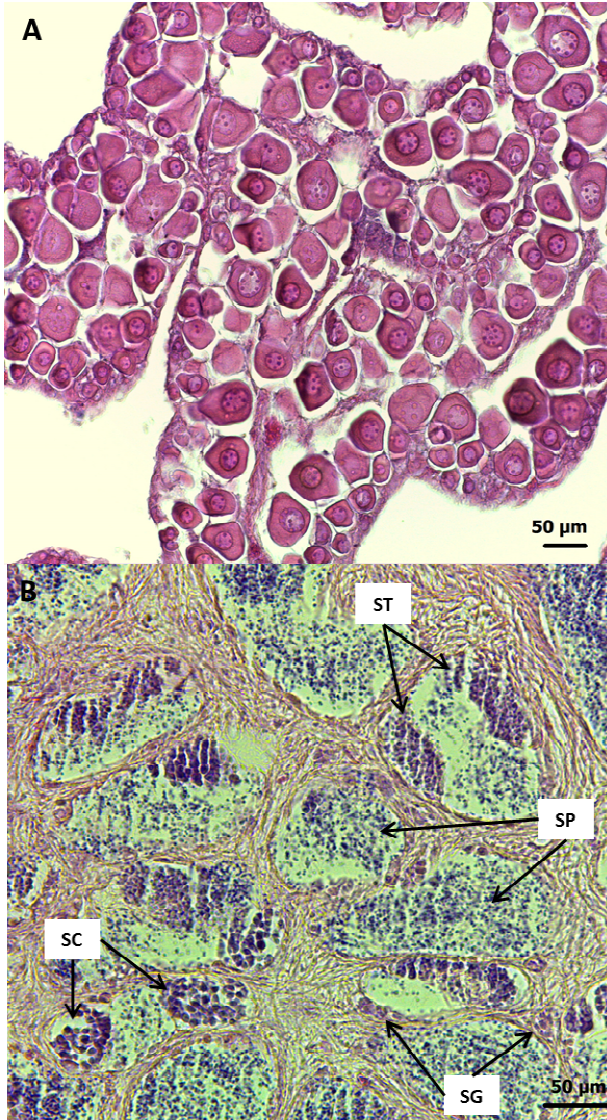


Figura 2 – Fotomicrografia (A) de corte (5 µm) de ovário com ovócitos de *Centropomus undecimalis* do tratamento 1 mg kg⁻¹ E2 120 dias após início do experimento com ovócitos no estágio perinucleolar. Fotomicrografia (B) de corte (5 µm) de testículo de *Centropomus undecimalis* do tratamento controle 120 dias após início do experimento contendo diferentes estágios de espermatogênese: espermatogônia (SG), espermatócitos (SC), espermatíde (ST) e espermatozoides (SP). HE. Barra indica 50 µm.

3.3.3. Concentrações de esteroides no plasma sanguíneo

3.3.3.1. Estradiol (E2)

A concentração inicial (n=10) de estradiol foi de $146,90 \pm 40,46$ pg ml⁻¹ (Figura 3). Houve um aumento significativo nas concentrações de E2, entre os tratamentos, nos peixes tratados com estradiol 15 dias após início do experimento. No 15º dia foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) entre o tratamento controle e os demais tratamentos, entre os demais não houve diferença significativa. Com 90 dias o nível mais alto encontrado foi no tratamento 4 mg kg⁻¹ ($277,33 \pm 47,57$ pg ml⁻¹) diferindo do tratamento controle ($117,09 \pm 16,40$ pg ml⁻¹), entre os demais tratamentos não houve diferença significativa.

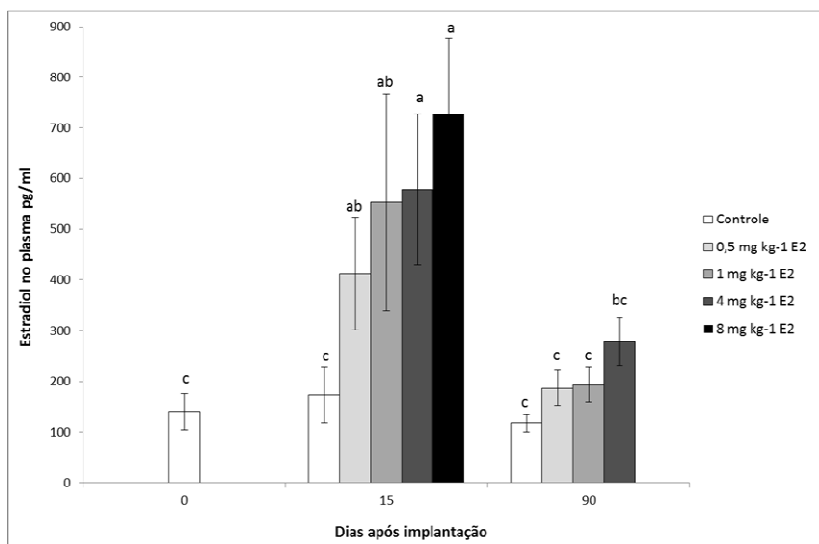


Figura 3 - Concentrações de estradiol no plasma (Média ± desvio padrão) de *Centropomus undecimalis* implantados com diferentes dosagens de 17-β estradiol, no início, em 15 e 90 dias. Foram amostrados 10 peixes no início do experimento (n=10). Nos demais tempos foram amostrados 4 peixes por tratamento (n=4). Letras diferentes nas colunas indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

3.3.3.2. Testosterona (T)

A concentração inicial (n=10) de testosterona foi de $202,75 \pm 27,92$ pg ml⁻¹. Nos tempos 15, 45 e 90 dias houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o controle e os tratados com estradiol

(Figura 4). Em 15, 45 e 90 dias as concentrações de testosterona nos tratados com E2 foram significativamente inferiores aos valores encontrados no início do experimento.

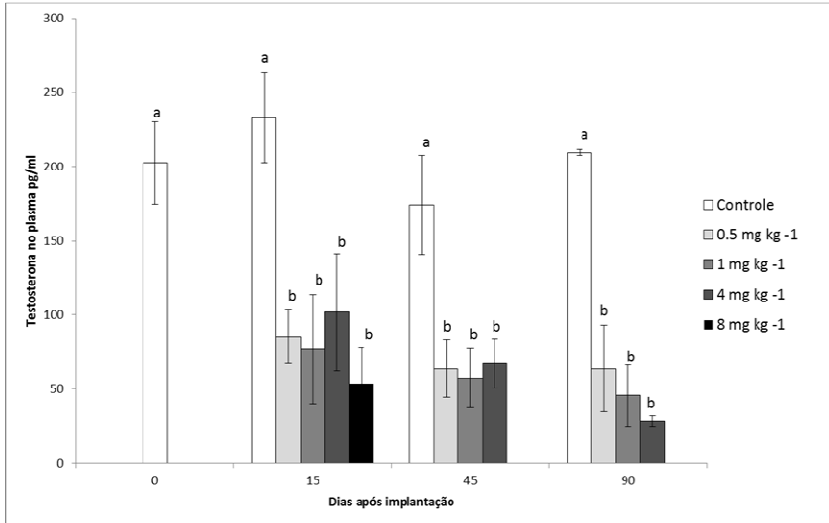


Figura 4 - Concentrações de testosterona no plasma (Média \pm desvio padrão) de *Centropomus undecimalis* implantados com diferentes dosagens de 17- β estradiol, no início, com 15, 45 e 90 dias. Foram amostrados 4 peixes por tratamento por tempo amostral. Letras diferentes na mesma coluna em cada tempo amostral indicam diferença significativa ($P < 0.05$).

3.4. DISCUSSÃO

No presente estudo, os peixes submetidos às dosagens mais altas do hormônio (4 e 8 mg kg⁻¹ E2) morreram em decorrência pelo estradiol. Isto pôde ser comprovado pelos danos causados no tecido hepático. Outro fato que reforça esta hipótese são os altos índices hepatossomático, acima de 2,9 %, que correspondeu a mais de 3 vezes o valor encontrado nos peixes no fim do período experimental. Em um estudo de toxicologia com etinil-estradiol na água utilizando machos de *rainbow darter*, *Etheostoma caeruleum*, foi observado que, em altas concentrações desenvolveu inchaço no poro urogenital (ELIAS et al., 2007). Isto também foi observado nos peixes que morreram nas dosagens de 4 e 8 mg kg⁻¹.

Lesões no fígado também foram observadas por outros autores em estudos envolvendo estrógenos (BOGERS et al., 2006; WEBER et al., 2003; MONCAUT et al., 2003). A presença de alteração lipídica e lesão no tecido do fígado de machos do linguado, *Paralichthys dentatus* foi observada após intoxicação por E2 com injeção de óleo de coco. Entretanto, 30 dias após a exposição ao hormônio estrógeno o fígado tinha voltado à normalidade (ZAROOGIAN et al., 2001). No presente estudo, o fígado dos peixes tratados com estradiol, no fim do experimento não apresentavam desarranjo celular ou dano ao tecido, indicando uma possível recuperação pela ação do hormônio.

Segundo HINTON e COUCH, (1998), o fígado é um órgão sensível a alterações bioquímicas, fisiológicas e estruturais quando submetidos à exposição de químicos e poluentes. PIFERRER (2001) discute que a administração de hormônios estrógenos em processos de manipulação do sexo influencia diretamente na redução de crescimento em peixes. Inclusive, no presente estudo a diferença de ganho em peso entre os tratamentos controle e $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$ e $4,0 \text{ mg kg}^{-1}$ deve ter sido decorrente a ação do hormônio E2. Em um estudo de feminização com E2, na ração, da espécie *Lepomis macrochirus* foi observado redução nas respostas de crescimento diretamente relacionados com as maiores dosagens de hormônio na ração (WANG et al., 2008).

Cento e vinte dias após o início do experimento, todos os indivíduos que receberam o hormônio estradiol, em todas as dosagens, possuíam ovários imaturos, com presença de ovócitos perinucleolares. Este resultado indica que este esteroide induz a regressão do tecido testicular e o desenvolvimento ovariano para mudança de sexo em machos adultos de robalo flecha.

Em estudos sobre hormônios esteroides, em espécies protândricas, foi constatado que o aumento dos níveis de E2 no plasma está associado com a mudança de sexo, como no caso do robalo asiático, *Lates calcarifer* (GUIGUEN et al., 1993), do pargo negro, *Acanthopagrus schlegeli* (CHANG et al., 1994) e do peixe palhaço, *Amphiprion melanopus* (GODWIN e THOMAS, 1993; KIM et al., 2012).

Um estudo de inversão sexual com o robalo asiático resultou em 100 % de fêmeas 28 dias após aplicação de implantes de colesterol com $8,4$ e 44 mg kg^{-1} de estradiol (ANDERSON e FORRESTER, 2001). Apesar das dosagens de 4 e 8 mg kg^{-1} E2 utilizadas no presente estudo terem ocasionado mortalidade com o robalo flecha, já com o robalo asiático as dosagens toleradas com implantes de colesterol foram mais altas, até 48 mg kg^{-1} E2. Isto pode ser em decorrência a maior tolerância

ao E2 pelo robalo asiático em relação ao robalo flecha ou até mesmo o tipo de implante utilizado.

Em um estudo de inversão sexual com o pargo negro, foi possível observar que a utilização de E2 na ração na concentração de 1 e 4 mg kg⁻¹, por 7 meses, houve regressão do tecido testicular e desenvolvimento do tecido ovariano com ovócitos primários (CHANG et al, 1995). CONDEÇA e CANÁRIO (1999) avaliaram a influência de estrógenos nas gônadas de machos do protândrico pargo europeu, *Sparus aurata*, e verificaram que 15 mg kg⁻¹ de E2, na ração, induz o desenvolvimento de tecido ovariano em 14 semanas após início do tratamento. Nestes dois estudos nota-se que a quantidade de E2 e o tempo de tratamento com foram bem maiores do que o utilizado no presente estudo, isto reforça que a utilização de implantes de liberação para peixes adultos é menos custosa além de reduzir o manejo.

Em um estudo recente de feminização com juvenis de robalo-flecha, foi observado que a administração do hormônio E2 na ração por 21 dias, 50 mg kg⁻¹, resultou em até 93 % de fêmeas (VIDAL-LOPEZ et al., 2012). Estes resultados, junto com o presente estudo demonstram que o E2 pode induzir tanto a mudança em peixes indiferenciados (feminização) quanto à inversão de sexo em adultos de robalo-flecha.

No presente estudo, os ovócitos estavam no estágio perinucleolar, com diâmetro médio de $61,7 \pm 3,35 \mu\text{m}$ e índice gonadossomático abaixo de 0,170, indicando que o indivíduo é imaturo ou está em repouso (TAYLOR et al., 1998). A presença de somente machos no tratamento controle já era esperada, já que a espécie possui hermafroditismo protândrico e em geral o tamanho de inversão é em média acima de 515 mm (TAYLOR et al., 2000; PERERA-GÁRCIA et al., 2011). O fato de alguns machos do tratamento controle estarem liberando sêmen, após massagem abdominal, está de acordo com o período reprodutivo desta espécie que é de dezembro a fevereiro no Sul do Brasil (FERRAZ e CERQUEIRA, 2010).

Os valores de estradiol e testosterona encontrados nos peixes implantados do presente trabalho correspondem aos que foram observados em um estudo sobre hormônios do robalo flecha no ambiente natural, relacionando períodos do ano e maturação das gônadas. (ROBERTS et al., 1999). As médias dos níveis de estradiol, com 90 dias, nos peixes implantados ficaram abaixo de 300 pg mL⁻¹, o que corresponde a fêmeas imaturas ou fora do período reprodutivo na natureza. A média níveis de testosterona se mantiveram inferiores a 250 pg mL⁻¹, no fim do experimento, o que corresponde a machos imaturos ou fora do período reprodutivo.

Os níveis de testosterona foram maiores nos peixes do tratamento controle em todos os tempos amostrais e semelhantes ao valor inicial. O decréscimo dos níveis de T em machos tratados com E2 também foi observado nos estudos de mudança de sexo das espécies protândricas *Lates calcarifer* (ANDERSON e FORRESTER, 2001) e *Acanthopagrus schlegeli* (CHANG et al., 1995). Esta diminuição dos níveis de T pode ser consequência do decréscimo da espermatogênese dos machos implantados com E2.

Estudos prévios de mudança de sexo utilizaram diferentes veículos de liberação com hormônios esteroides. Em um estudo com a garoupa, *Epinephelus coioides*, foram testados implantes de manteiga de cacau e α -celulose com uma mistura de andrógenos, variando de 0,001 a 20 mg kg⁻¹, conseguindo machos viáveis somente nas dosagens mais altas (YEH et al., 2003). PANKHURST et al. (1986) investigaram quatro técnicas de administração de E2: solução salina, solução com óleo, manteiga de cacau e implantes de tubo silástico no peixe dourado, *Carassius auratus*. O maior período de liberação do hormônio e de forma mais contínua foi obtido com implante de tubo silástico. Um estudo com o pargo japonês, *Pagrus major* avaliando implantes de tubos silásticos com E2, foi observado que a liberação está também relacionada com o solvente, influenciando diretamente no tempo de liberação (YAMAGUCHI et al., 2004).

O presente estudo se baseou na metodologia de fabricação de implantes EVAc contendo 17 α -metil-testosterona de SARTER et al., (2006) para inversão de sexo de fêmeas da garoupa verdadeira, *Epinephelus marginatus*, que obteve resultados positivos de mudança de sexo e constatou que o tempo de liberação, utilizando somente inulina como agente aglutinante, foi de 45 % do total carregado de hormônio em 32 dias. No presente trabalho foi demonstrado que o E2 também pode ser utilizado com EVAc, já que as moléculas de estradiol e testosterona possuem características parecidas. A utilização de implantes de liberação lenta com hormônios é uma técnica aplicável para a Aquicultura, pois além de diminuir o dano aos peixes por excesso de manejo, libera o produto desejado de forma gradativa (MYLONAS e ZOHAR, 2001).

Concluindo, o implante EVAc contendo 17- β estradiol foi eficiente na inversão sexual de machos adultos de robalo-flecha e a dosagem mínima testada em que se obteve 100 % de fêmeas foi 0,5 mg kg⁻¹ E2. Os resultados de estradiol e testosterona no plasma dos peixes implantados estão de acordo com outros estudos de inversão sexual em espécies protândricas. A partir dos resultados obtidos neste estudo são

recomendados outros trabalhos para avaliar a viabilidade das fêmeas invertidas, visto que a maturação de fêmeas desta espécie ainda é um entrave para reprodução em cativeiro.

3.5. REFERÊNCIAS

ANDERSON, T., FORRESTER, J. 2001. Administration of oestradiol to barramundi, *Lates calcarifer*, induces protandrous sex change. Perspective in Comparative Endocrinology Monduzzi Editore, Bologna, 155–164.

BHANDARI R.K., HIGA M., NAKAMURA S., NAKAMURA M. 2004. Aromatase Inhibitor Induces Complete Sex Change in the Protogynous Honeycomb Grouper (*Epinephelus merra*). Molecular Reproduction and Development 67, 303–307.

BOGERS, R., MUTSAERDS, E., DRUKE, J., ROODE, D.F., MURK, A.J., BURG, B.V.D., LEGLER, J. 2006. Estrogenic endpoints in fish early life-stage tests: luciferase and vitellogenin induction in estrogen-responsive transgenic zebrafish. Environmental Toxicology and Chemistry 25 241–247.

CABRITA, E.; ENGROLA, S.; CONCEIÇÃO, L.E.C.; POUÇÃO-FERREIRA, P.; DINIS, M.T. 2009. Successful Cryopreservation of sperm from sex-reversed dusky grouper, *Epinephelus marginatus*. Aquaculture 287, 152–157.

CERQUEIRA, V.R.; TSUZUKI, M.Y. 2009. A review of spawning induction, larviculture, and juvenile rearing of the fat snook, *Centropomus parallelus*. Fish Physiology and Biochemistry 35, 17–28.

CHANG, C.F., LEE, M.F., CHEN, G.R. 1994. Estradiol-17b associated with the sex reversal in Protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegeli*. J. Exp. Zool. 268, 53–58.

CHANG, C.F., LAU, E.L., LIN, B.Y. 1995. Stimulation of spermatogenesis or of Sex Reversal according to the doses of exogenous estradiol 17- β in juvenil males of protandrous Black porgy, *Acanthopagrus schlegeli*. General and comparative endocrinology 100, 355-367.

CONDECA, J.B., CANARIO, A.V.M. 1999. The Effect of Estrogen on the Gonads and on *In Vitro* Conversion of Androstenedione to Testosterone, 11-Ketotestosterone, and Estradiol-17 β in *Sparus aurata* (Teleostei, Sparidae). *General and Comparative Endocrinology* 116, 59–72.

DU, J. L., LEE, C. Y., TACON, P. LEE, Y. H. YEN, F. P. TANAKA, H. DUFOUR, S. CHANG, C. F. 2001. Estradiol-17 β Stimulates Gonadotropin II Expression and Release in the Protandrous Male Black Porgy *Acanthopagrus schlegeli* Bleeker: A Possible Role in Sex Change. *General and Comparative Endocrinology* 121, 135–145.

ELIAS, S.E., KALOMBO, E., MERCURIO, S.D. 2007. Tamoxifen protects against 17-ethynylestradiol-induced liver damage and the development of urogenital papillae in the rainbow darter (*Etheostoma caeruleum*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 26 (9), p. 1879–1889.

FERRAZ, E.M., CERQUEIRA, V.R. 2010. Influência da temperatura na maturação gonadal de machos de robalo flecha, *Centropomus undecimalis*. *Boletim Instituto de Pesca* 36, 73-83.

FRISCH, A. 2004. Sex-change and gonadal steroids in sequentially-hermaphroditic teleost fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 14, 481–499.

GODWIN, J.R., THOMAS, P. 1993. Sex Change and Steroid Profiles in the protandrous Anemone fish, *Amphiprion melanopus* (Pomacentridae, Teleostei). *General and Comparative endocrinology* 91, 144-157.

GRIER, H.J., TAYLOR, R.G. 1998. Testicular maturation and regression in the common snook. *Journal of Fish Biology* 53, 521–542.

GUIGUEN, Y., FOSTIER A., PIFERRER F., CHANG C.F. 2010. Ovarian aromatase and estrogens: A pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish. *General and Comparative Endocrinology* 165, 352–366.

GUIGUEN, Y., JALABERT, B., THOUARD, E., FOSTIER, A. 1993. Changes in Plasma and Gonadal Steroid Hormones In relation to Reproductive Cycle and the Sex Inversion Process in the Protandrous

Sea Bass, *Lates calcarifer*. General and Comparative Endocrinology 92, 327-338.

HINTON, D.E., COUCH, J.A. 1998. Architectural pattern, tissue and cellular morphology in livers of fishes: relationship to experimentally-induced neoplastic responses. Fish ecotoxicology 86, 141-166.

IBARRA-CASTRO, L., ALVAREZ-LAJONCHERE, L., ROSAS, C., PALOMINO-ALBARRAN, I.G., HOLT, J.G., SANCHEZ-ZAMORA, A. 2011. GnRH α -induced spawning with natural fertilization and a pilot-scale juvenile mass production of common snook, *Centropomus undecimalis* (BLOCH, 1792). Aquaculture 319, 479-483.

KIM, N.N., SHIN, H.S., HABIBI H.R., LEE, J., CHOI, C.Y. 2012. Expression profiles of three types of GnRH during sex-change in the protandrous cinnamon clownfish, *Amphiprion melanopus*: Effects of exogenous GnRHs. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B 161, 124-133.

KOJIMA, Y., BHANDARI, R.K., KOBAYASHI, Y., NAKAMURA, M. 2008. Sex change of adult initial-phase male wrasse, *Halichoeres trimaculatus* by estradiol-17 β treatment. General and Comparative Endocrinology 156, 628-632.

MONCAUT, N., NOSTRO, F., MAGGESE, M.C. 2003. Vitellogenin detection in surface mucus of the South American cichlid fish *Cichlasoma dimerus* (Heckel, 1840) induced by estradiol-17 β . Effects on liver and gonads. Aquatic Toxicology 63, 127-137.

MYLONAS, C. C., ZOHAR, Y. 2001. Use of GnRH α -delivery systems for the control of reproduction in fish. Reviews in Fish Biology and Fisheries 10, 463-491.

NAKAMURA, M., BHANDARI, R.K., HIGA, M. 2003. The role estrogens play in sex differentiation and sex changes of fish. Fish Physiology and Biochemistry 28, 113-117.

NAVARRO-MARTÍN, L. BLÁZQUEZ, M., PIFERRER, F. 2009. 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* 160, 3–11.

PANKHURST, N.W., STACEY, N.E., PETER, R.E. 1986. An evaluation of techniques for the administration of 17- β estradiol for teleosts. *Aquaculture* 52, 145-155.

PERERA-GARCÍA, M.A., MENDOZA-CARRANZA, M., CONTRERAS-SÁNCHEZ, W.M., HUERTA-ORTÍZ, M., PÉREZ-SÁNCHEZ, E. 2011. Reproductive biology of common snook *Centropomus undecimalis* (Perciformes: Centropomidae) in two tropical habitats. *Rev. Biol. Trop.* 59 (2), 669-681.

PITZ, S. 2009. Especialista produz com sucesso alevinos de robalo flecha. *Panorama da Aquicultura* 114, 58-59.

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

KROON, F.J., MUNDAY, P.L., WESTCOTT, D.A., HOBBS, J.P.A., LILEY, N.R. 2005. Aromatase pathway mediates sex change in each direction. *Proceedings of Royal Society* 272, 1399–1405.

RIVAS, L.R. 1986. Systematic review of perciform fishes of the genus *Centropomus*. *Copeia* 6, 576–611.

ROBERTS, S.B., JACKSON, L.F., KING, W., TAYLOR, R.G., GRIER H. J., SULLIVAN, S.V. 1999. Annual Reproductive Cycle of the Common Snook: Endocrine Correlates of Maturation. *Transactions of the American Fisheries Society* 128, 436–445.

SARTER, K., PAPADAKI, M., ZANUY S., MYLONAS, C.C. 2006. Permanent sex inversion in 1-year-old juveniles of the protogynous dusky grouper (*Epinephelus marginatus*) using controlled-release 17 α -methyltestosterone implants. *Aquaculture* 256, 443–456.

SOLIGO, T.A., FERRAZ, E.M., CERQUEIRA, V.R., TSUZUKI, M.Y. 2008. Primeira experiência de indução hormonal, desova e larvicultura do robalo-flecha, *Centropomus undecimalis* no Brasil. In: CYRINO, J.E.P. SCORVO, F.J.D., SAMPAIO, L.A., CAVALLI, R. Tópicos

especiais em biologia aquática e aquicultura. 2ª Ed. Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática 2, 143-152.

TAYLOR, R.G., GRIER, H.J., WHITTINGTON, J.A. 1998. Spawning rhythms of common snook in Florida. *Journal of Fish Biology* 53, 502-520.

TAYLOR, R.G., WHITTINGTON, J.A., GRIER, H.J., CRABTREE, R.E. 2000. Age, growth, maturation and protandric sex reversal in common snook, *Centropomus undecimalis*, from the east and west coasts of South Florida. *Fishery Bulletin* 98, 612-624.

VAZZOLER, A.E.A.M. 1996. Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática. Maringá: Editora da Universidade Estadual de Maringá 1, 169.

VIDAL-LÓPEZ, J.M., ÁLVAREZ-GONZÁLEZ, C.A., CONTRERAS-SÁNCHEZ, W.M., PATIÑO, R., HERNÁNDEZ-FRANYUTTI, A.A., HERNÁNDEZ-VIDAL, U., MARTÍNEZ-GARCÍA, R. 2012. Feminización de juveniles del Robalo Blanco *Centropomus Undecimalis* (Bloch 1792) usando 17 β -Estradiol. *Rev. Mar. Cost.* 4, 83-93.

WANG, H.P., GAO, Z., BERES, B., OTTOBRE, J., WALLAT, G., TIU, L., RAPP, D., O'BRYANT, P., YAO, H. 2008. Effects of estradiol-17 β on survival, growth performance, sex reversal and gonadal structure of bluegill sunfish *Lepomis macrochirus*. *Aquaculture* 285, 216–223.

WEBER, L.P., HILL, R.L., JANZ, D.M. 2003. Developmental estrogenic exposure in zebrafish (*Danio rerio*): II. Histological evaluation of gametogenesis and organ toxicity. *Aquatic Toxicology* 63, 431-446.

WU, G.C., TOMY, S., LEE, M.F., LEE, Y.H., YUEH, W.S., LIN, C.J., LAU, E.L., CHANG, C.F. 2010. Sex differentiation and sex change in the protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegeli*. *General and Comparative Endocrinology* 167, 417–421.

YAMAGUCHI, S., KAGAWA, H., GEN, K., OKUZAWA, K., MATSUYAMA, M. 2004. Silicone implants for delivery of estradiol-17 β and 11-ketotestosterone to red seabream *Pagrus major*. *Aquaculture* 239, 485–496.

YEH, S.L., KUO, C.M., TING, Y.Y., CHANG, C.F. 2003. Androgens stimulate sex change in protogynous grouper, *Epinephelus coioides*: spawning performance in sex-changed males. *Comparative Biochemistry and Physiology* 135, 375–382a.

YEH, S.L., KUO, C.M., TING, Y.Y., CHANG, C.F. 2003. The effects of exogenous androgens on ovarian development and sex change in female orange-spotted protogynous grouper, *Epinephelus coioides*. *Aquaculture* 218, 729–739b.

ZAROOGIAN, G., GARDNER, G., HOROWITZ, D.B., GUTJAHR-GOBELL, R., HAEBLER, R., MILLS, L. 2001. Effect of 17β -estradiol, *o,p'*-DDT, octylphenol and *p,p'*-DDE on gonadal development and liver and kidney pathology in juvenile male summer flounder (*Paralichthys dentatus*). *Aquatic Toxicology* 54, 101–112.

4. REFERÊNCIAS da INTRODUÇÃO

AIZEN, J. Enhancing spawning in the grey mullet (*Mugil cephalus*) by removal of dopaminergic inhibition. **General and Comparative Endocrinology**, v. 142, p. 212–221, 2005.

ANDERSON, T., FORRESTER, J. Administration of oestradiol to barramundi, *Lates calcarifer*, induces protandrous sex change. **Perspective in Comparative Endocrinology**, Bologna, p. 155–164, 2001.

ATHAUDA, S., ANDERSON, T., NYS, R. Effect of rearing water temperature on protandrous sex inversion in cultured Asian Seabass (*Lates calcarifer*) **General and Comparative Endocrinology**, v. 175, p. 416–423, 2012.

BHANDARI, R.K. et al. Aromatase Inhibitor Induces Complete Sex Change in the Protogynous Honeycomb Grouper (*Epinephelus merra*) **Molecular Reproduction and Development**, v. 67, p. 303–307, 2004.

CABRITA, E., et al. Successful Cryopreservation of sperm from sex-reversed dusky grouper, *Epinephelus marginatus*. **Aquaculture**, v. 287, p. 152–157, 2009.

CAVALLI, R.O., HAMILTON, S. Piscicultura marinha no Brasil: Afinal, quais as espécies boas para cultivar? **Revista Panorama da Aquicultura**, v. 17, p. 50-55, 2007.

CERQUEIRA, V.R., TSUZUKI, M.Y. A review of spawning induction, larviculture, and juvenile rearing of the fat snook, *Centropomus parallelus*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 35, p. 17–28, 2009.

CHANG, C.F., LAU, E.L., LIN, B.Y. Stimulation of spermatogenesis or of Sex Reversal according to the doses of exogenous estradiol 17- β in juvenil males of protandrous Black porgy, *Acanthopagrus schlegeli*. **General and comparative endocrinology**, v. 100, p. 355-367, 1995.

CONDECA, J.B., CANARIO, A.V.M. The Effect of Estrogen on the Gonads and on *In Vitro* Conversion of Androstenedione to Testosterone, 11-Ketotestosterone, and Estradiol-17b in *Sparus aurata* (Teleostei,

Sparidae) **General and Comparative Endocrinology**, v. 116, p. 59–72, 1999.

DU, J.L., et al. Estradiol-17 β Stimulates Gonadotropin II Expression and Release in the Protandrous Male Black Porgy *Acanthopagrus schlegelii* Bleeker: A Possible Role in Sex Change. **General and Comparative Endocrinology**, v. 121, p. 135–145, 2001.

DUNCAN, N.J. et al. Effects of controlled delivery and acute injections of LHRHa on bullseye puffer fish (*Sphoeroides annulatus*) spawning. **Aquaculture**, v. 218, p. 625 – 635, 2003.

FERRAZ, E. M. ,CERQUEIRA, V.R. Influência da temperatura na maturação gonadal de machos de robalo flecha, *Centropomus undecimalis*. **Boletim Instituto de Pesca**, v. 36, p. 73-83, 2010.

FRISCH, A. Sex-change and gonadal steroids in sequentially-hermaphroditic teleost fish. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 14, p. 481–499. 2004.

GARDNER, L., et al. Sex change strategy and the aromatase genes. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 94, p. 395–404, 2005.

GODWIN, J. Neuroendocrinology of sexual plasticity in teleost fishes. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v.31, p. 203–216. 2010.

GRIER, H.J., TAYLOR , R.G. Testicular maturation and regression in the common snook. **Journal of Fish Biology**, v. 53, p. 521–542, 1998.

GUIGUEN Y., et al. Ovarian aromatase and estrogens: A pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish. **General and Comparative Endocrinology**, v.165, p.352–366, 2010.

GUZMÁN, J.M, et al. Spawning performance and plasma levels of GnRH α and sex steroids in cultured female Senegalese sole (*Solea senegalensis*) treated with different GnRH α -delivery systems. **Aquaculture**, v. 291, p. 200–209, 2009.

GUZMÁN, J.M., et al. Comparative effects of human chorionic gonadotropin (hCG) and gonadotropin-releasing hormone agonist

(GnRH α) treatments on the stimulation of male Senegalese sole (*Solea senegalensis*) reproduction. **Aquaculture**, v. 316, p. 121–128, 2011.

IBARRA-CASTRO, L., et al. GnRH α -induced spawning with natural fertilization and a pilot-scale juvenile mass production of common snook, *Centropomus undecimalis* (BLOCH, 1792). **Aquaculture**, v. 319, p.479-483. 2011.

MARINO, G. et al. Induction of ovulation in captive-reared dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834), with a sustained-release GnRH α implant. **Aquaculture**, v. 219, p. 841–858,2003.

MUNDAY P.L., BUSTON P.M., WARNER R.R. Diversity and flexibility of sex-change strategies in animals. **Trends in Ecology and Evolution**, v.21, p. 89-95, 2006.

MYLONAS, C.C., ZOHAR, Y. Use of GnRH α -delivery systems for the control of reproduction in fish. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v.10, p. 463–491, 2001.

MYLONAS, C.C., FOSTIER, A., ZANUY, S. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. **General and Comparative Endocrinology**, v. 165, p. 516–534, 2010.

NAKAMURA, M., BHANDARI, R.K., HIGA, M. The role estrogens play in sex differentiation and sex changes of fish. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 28, p. 113–117, 2003.

NEIDIG, C.L., et al.. Techniques for spawning common snook: broodstock handling, oocyte staging, and egg quality. **North American Journal of Aquaculture**, v. 62, p. 103–113, 2000.

NOZU, R., KOJIMA, Y., NAKAMURA, M. Short term treatment with aromatase inhibitor induces sex change in the protogynous wrasse, *Halichoeres trimaculatus*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 161, p. 360–364, 2009.

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

PANKHURST, N.W., STACEY, N.E., PETER, R. E. An evaluation of techniques for the administration of 17- β estradiol for teleosts. **Aquaculture**, v. 52, p. 145-155, 1986.

PERERA-GARCÍA, M.A., et al. Reproductive biology of common snook *Centropomus undecimalis* (Perciformes: Centropomidae) in two tropical habitats. **Rev. Biol. Trop.**, v. 59 (2), p. 669-681, 2011.

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

KIM, N.N., et al. Expression profiles of three types of GnRH during sex-change in the protandrous cinnamon clownfish, *Amphiprion melanopus*: Effects of exogenous GnRHs. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, v. 161, p. 124–133, 2012.

RAINIS, S. et al. Enhancement of spermiation in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) at the end of the reproductive season using GnRH α implants. **Aquaculture**, v. 219, p. 873 – 890, 2003.

RHODY, N.R., NASSIF, N.A., MAIN, K.L. Effects of salinity on growth and survival of common snook *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1792) larvae. **Aquaculture Research**, vol. 41, p. 357-360, 2010.

ROBERTS, S.B., et al. Annual Reproductive Cycle of the Common Snook: Endocrine Correlates of Maturation **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 128, p. 436–445, 1999.

RIVAS, L.R. Systematic review of perciform fishes of the genus *Centropomus*. **Copeia**, v. 6, p. 576–611, 1986.

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.

SARTER K., et al. Permanent sex inversion in 1-year-old juveniles of the protogynous dusky grouper (*Epinephelus marginatus*) using controlled-release 17 α -methyltestosterone implants. **Aquaculture**, v.256, p.443–456, 2006.

SOLIGO, T.A.; et al. Primeira experiência de indução hormonal, desova e larvicultura do robalo-flecha, *Centropomus undecimalis* no Brasil. In: CYRINO, J.E.P.; SCORVO F., J.D.; SAMPAIO, L.A.; CAVALLI, R. **Tópicos especiais em biologia aquática e aquicultura. 2ª Ed. Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática**, p. 143-152, 2008.

SOLIGO, T.A., GARCIA, A.S., CERQUEIRA, V.R. Weaning of the common snook (*Centropomus undecimalis*) early juveniles reared in laboratory using commercial and experimental diets. **Boletim Instituto de Pesca**, v. 37(4), p. 367–374, 2011.

TAYLOR, R.G.; GRIER, H.J.; WHITTINGTON, J.A. Spawning rhythms of common snook in Florida. **Journal of Fish Biology**, v.53, p. 502-520, 1998.

TAYLOR, R.G.; et al. Age, growth, maturation and protandric sex reversal in common snook, *Centropomus undecimalis*, from the east and west coasts of South Florida. **Fishery Bulletin**, v. 98, p. 612-624, 2000.

TUCKER., J.W. Snook culture. **American Fisheries Society Symposium**, v. 46, p. 297–305, 2005.

VIDAL-LÓPEZ, J.M., et al. Feminización de juveniles del Robalo Blanco *Centropomus Undecimalis* (Bloch 1792) usando 17β-Estradiol. **Rev. Mar. Cost**, v. 4, p. 83-93, 2012.

WITTENRICH, M.L., et al. Coupling osteological development of the feeding apparatus with feeding performance in common snook, *Centropomus undecimalis*, larvae: Identifying morphological constraints to feeding. **Aquaculture**, v. 294, p. 221–227, 2009.

YAMAGUCHI, S., et al. Silicone implants for delivery of estradiol-17β and 11-ketotestosterone to red seabream *Pagrus major*. **Aquaculture**, v. 239, p. 485–496, 2004.

YANES-ROCA, C., et al. Effects of fatty acid composition and spawning season patterns on egg quality and larval survival in common snook (*Centropomus undecimalis*) **Aquaculture**, v. 287, p. 335–340, 2009.

YEH, S.L., et al. Androgens stimulate sex change in protogynous grouper, *Epinephelus coioides*: spawning performance in sex-changed males. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 135, p. 375–382, 2003a.

YEH, S.L., et al. The effects of exogenous androgens on ovarian development and sex change in female orange-spotted protogynous grouper, *Epinephelus coioides*. **Aquaculture**, v. 218, p. 729–739, 2003b.