



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

FEMINIZAÇÃO DE JUVENIS DE ROBALO-PEVA *Centropomus parallelus* E ROBALO-FLECHA *Centropomus undecimalis*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Aquicultura.

Orientador: Dr. Vinicius Ronzani Cerqueira

Cristina Vaz Avelar de Carvalho

Florianópolis
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Carvalho, Cristina Vaz Avelar de
Feminização de juvenis de robalo-peva *Centropomus parallelus* e robalo-flecha *Centropomus undecimalis* /
Cristina Vaz Avelar de Carvalho ; orientador, Vinicius Ronzani Cerqueira - Florianópolis, SC, 2013.
54 p.

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

Inclui referências

1. Aquicultura. 2. piscicultura marinha. 3. lotes monosexo. 4. estradiol. I. Cerqueira, Vinicius Ronzani. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. III. Título.

**Feminização de juvenis de robalo-peva *Centropomus parallelus* e
robalo-flecha *Centropomus undecimalis***

Por

CRISTINA VAZ AVELAR DE CARVALHO

Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do título de

DOUTOR EM AQUICULTURA

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

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

Banca Examinadora:

Dr. Vinícius Ronzani Cerqueira – *Orientador*

Dra. Anita Rademaker Valença

Dr. Bernardo Baldisserotto

Dr. Eduardo de Medeiros Ferraz

Dr. Hilton Amaral Júnior

AGRADECIMENTOS

A minha família

Ao meu orientador, Dr. Vinicius R. Cerqueira, por todo o ensinamento, apoio e paciência durante todos esses anos

Ao Israel Diniz e aos amigos do LAPMAR, *meus queridos*.

Aos professores e funcionários do Departamento de Aquicultura

Ao MPA e CNPQ pelo apoio financeiro concedido para a realização do projeto que permitiu a execução deste trabalho

A CAPES pela bolsa concedida durante o doutorado

Ao Gabriel, *amor mio*

Ao pessoal da EMA/FURG que trago sempre no coração

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

A manipulação do sexo gonadal em peixes de cultivo é uma importante técnica utilizada na aquicultura, pois permite obter benefícios associados a um dos sexos. Os hormônios esteroides são utilizados para controlar o sexo gonadal. Apesar desta técnica já ser utilizada com várias espécies pouco se sabe a respeito do uso do 17β -estradiol (E_2) com o robalo-peva *Centropomus parallelus* e robalo-flecha *Centropomus undecimalis*. Estas duas espécies são nativas, eurialinas e com alto valor de mercado. Sendo assim, o objetivo desta Tese foi avaliar o efeito de rações com diferentes concentrações de E_2 na proporção dos sexos, na sobrevivência e crescimento dos juvenis de robalo-peva e robalo-flecha. Os experimentos foram divididos em duas etapas: feminização e pós feminização. No final dos experimentos foi possível obter um alto percentual de fêmeas. Também foi possível observar que o crescimento dos peixes só foi reduzido durante o tratamento hormonal. Após o fim da oferta da ração com hormônio os peixes recuperaram o crescimento. Além disso, o hormônio não afetou a sobrevivência dos peixes. Com este trabalho concluiu-se que o uso de E_2 na ração é eficiente na feminização de juvenis de robalo-peva e robalo-flecha.

Palavras-chave: controle do sexo, tratamento hormonal, peixe marinho, diferenciação sexual.

ABSTRACT

The manipulation of gonadal sex in fish farming is an important technique used in aquaculture, since it gives benefits associated with one sex. The steroid hormones are used to control the gonadal sex. Although this technique is already used in several species, little is known about the use of 17β -estradiol (E2) with fat snook *Centropomus parallelus* and common snook *Centropomus undecimalis*. These two species are native, and eurihalines with high market value. Therefore, the aim of these experiments was to evaluate the effect of diets with different concentrations of E2 in the sex ratio, survival and growth of juvenile fat snook and common snook. The experiments were divided into two stages: feminization and post-feminization. At the end of the experiments was to obtain a high percentage of females. The growth of the treated fish was significantly retarded during the period of treatment, while there was no side effect detected post-treatment and the retarded fish caught up after the E2 treatment. Furthermore, the hormone did not affect survival. With this work it was concluded that the use of E2 in the diet is effective in feminization of juvenile fat snook and common snook.

Keywords: control of sex, hormone treatment, marine fish, sex differentiation

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Justificativa.....	18
1.2	Objetivo Geral	19
1.2.1	Objetivos Específicos	19
1.2	Formatação dos Artigos.....	19
2	CAPÍTULO 1	20
2.1	Introdução.....	21
2.2	Material e Métodos.....	23
2.3	Resultados	26
2.4	Discussão.....	29
2.5	Conclusão	31
2.6	Referências	31
3	CAPÍTULO 2	35
3.1	Introdução.....	37
3.2	Material e Métodos.....	38
3.3	Resultados	41
3.4	Discussão.....	44
3.5	Conclusão	46
3.6	Referências	46
4	CONCLUSÕES GERAIS	49
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO ...	50

1 INTRODUÇÃO

Os peixes teleósteos podem ser classificados como gonocoristas diferenciados e não diferenciados, hermafroditas simultâneos, hermafroditas sequenciais protogínicos e protândricos, hermafroditas não funcionais e unissexuais (BEARDMORE et al., 2001; MITCHESON e LIU, 2008). Essa variedade de classificações resulta das diversas formas de determinação e diferenciação sexual e de desenvolvimento gonadal (PIFERRER, 2001; DEVLIN e NAGAHAMA, 2002; STRÜSSMANN e NAKAMURA, 2002).

A determinação do sexo genético nos teleósteos ocorre no momento da fertilização pela combinação de cromossomos, enquanto que a diferenciação sexual (sexo fenotípico ou sexo gonadal) ocorre em etapas mais avançadas do desenvolvimento, sob ação de hormônios ou fatores ambientais e é específica para cada espécie (PIFERRER, 2001). Juntos, esses dois processos, determinação e diferenciação, são responsáveis pela expressão do sexo gonadal: machos ou fêmeas. Entretanto, em alguns organismos a diferenciação da gônada pode ser facilmente perturbada por fatores ambientais ou hormonais resultando em um fenótipo diferente do genótipo (BAROILLER et al., 1999; BEARDMORE, 2001).

O hermafroditismo apresenta uma das mais marcantes expressões de plasticidade no desenvolvimento sexual: a mudança de sexo. O período em que ocorre a mudança de sexo pode levar meses em algumas espécies ou pode acontecer em alguns dias ou semanas em outros organismos (STRÜSSMANN e NAKAMURA, 2002). O processo de inversão é caracterizado pelo decréscimo da atividade gametogênica e regressão do primeiro sexo, enquanto a área do sexo oposto, até então quiescente, inicia seu desenvolvimento (PIFERRER, 2001; DEVLIN e NAGAHAMA, 2002; MITCHESON e LIU, 2008).

São reconhecidos dois tipos principais de hermafroditismo: simultâneo e sequencial. Hermafroditas simultâneos podem se reproduzir como macho ou fêmea ao mesmo tempo ou dentro de um curto período, sendo capazes de produzir ovócitos e esperma viáveis durante o período reprodutivo, por exemplo, nos anguiliformes *Gymnothorax griseus* e *Gymnothorax pictus*. Os hermafroditas sequenciais reproduzem como machos em um período da vida e como fêmeas em outro. Podem ser classificados como: protogínicos, quando primeiro se desenvolvem como fêmea e depois mudam de sexo para macho, como a garoupa *Epinephelus marginatus* ou protândricos, quando o peixe primeiro se desenvolve como macho e depois como

fêmea, por exemplo, *Centropomus undecimalis* e o *Lates calcarifer* (TAYLOR, 2000; DEVLIN e NAGAHAMA, 2002; FRISCH, 2004; MITCHESON e LIU, 2008).

A manipulação do sexo gonadal dos peixes de cultivo é uma das estratégias mais promissoras na aquicultura atual (STRÜSSMANN e NAKAMURA, 2002), pois permite obter benefícios associados ao sexo que apresenta características morfológicas, fisiológicas ou comportamentais de interesse econômico (PARK et al., 2004; FRISCH, 2004, MITCHESON e LIU, 2008). Por exemplo, no bagre *Pseudobagrus fulvidraco*, os machos apresentam maior taxa de crescimento do que as fêmeas, então a masculinização por indução hormonal é interessante para a produção desta espécie (PARK et al., 2004). As fêmeas de robalo europeu, *Dicentrarchus labrax*, exibem taxas de crescimento 30 a 50% maiores que os machos (GORSHKOV, 2004). O macho da espécie *Pagrus major* durante o período reprodutivo apresenta uma coloração escura no corpo que faz com que o seu preço de mercado diminua. Portanto, para essa espécie a preferência é por populações monossexo de fêmeas (KATO et al., 2003).

Para o controle do sexo gonadal, esteróides sexuais vêm sendo utilizados em diversas espécies de peixes (CHANG et al., 1994; PARK et al, 2004; FLYNN e BENFEY 2007; WANG et al., 2008; ARSLAN et al., 2009). O estrógeno 17 β -estradiol é utilizado como hormônio feminizante, enquanto que andrógenos, como o composto sintético 17 α -metiltestosterona, é utilizado como masculinizante, administrado em baixas doses e por curtos períodos de tempo. A esterilização é alcançada quando doses e períodos maiores que os utilizados para masculinização e feminização são administrados nos peixes (CHANG et al., 1995; CONDEÇA e CANARIO, 2001; PIFERRER, 2001;FRISCH, 2004). Portanto, utilizando o hormônio apropriado, na dosagem adequada, durante a fase indiferenciada do desenvolvimento da gônada, é possível alterar o curso normal da diferenciação sexual para o fenótipo desejado.

A fase indiferenciada no desenvolvimento da gônada é conhecida como período lábil, isto é, período em que as gônadas são mais sensíveis à ação de esteroides exógenos (PARK et al., 2004). Durante este período as gônadas estão começando a se desenvolver e as células germinativas primordiais presentes são capazes de se desenvolver em ovogônias ou espermatogônias, dependendo do hormônio utilizado. O período lábil é específico para cada espécie, podendo acontecer durante o desenvolvimento embrionário; na fase de larva (início do alimento exógeno) ou com o organismo na fase de juvenil (várias semanas após o início do alimento exógeno). O tratamento realizado nesse período

requer a mínima combinação de dosagem e duração do tratamento para alcançar o sexo gonadal desejado (PIFERRER, 2001; DEVLIN e NAGAHAMA, 2002; ARSLAN et al., 2009).

Esse período não exclui a possibilidade de mudança do sexo gonadal em outras fases de desenvolvimento (CHANG et al., 1995; GORSHKOV et al., 2004; YEH, 2004). A feminização ou masculinização dos peixes pode acontecer antes, durante ou logo após período de diferenciação sexual enquanto que a inversão sexual é realizada quando o organismo já apresenta um sexo definido.

É importante mencionar que o controle do sexo por hormônio, afeta o processo de diferenciação e não de determinação do sexo. A feminização, a masculinização e a inversão sexual são mudanças do fenótipo sem mudança dos cromossomos sexuais (genotípica) (BLAZQUEZ, 1995, PIFERRER, 2001; DEVLIN e NAGAHAMA, 2002).

A feminização por hormônios pode ser alcançada pelos métodos indireto ou direto. O método indireto primeiro envolve o uso de andrógenos para induzir a inversão sexual das fêmeas geneticamente em machos fenotipicamente (neomachos). Depois de maturarem sexualmente, o sêmen desses peixes é utilizado para fertilizar ovócitos de fêmeas (geneticamente e fenotipicamente). O resultado é uma população 100% de fêmeas. Contudo, este método só é possível com fêmeas homogaméticas (ROUGEOT et al., 2002). Para espécies poligênicas ou com mecanismos de diferenciação sexual influenciado pelo ambiente, o cruzamento entre peixes com sexo invertido e peixes sem tratamento com hormônio produz um número variado de machos e fêmeas (BLAZQUEZ, 1995, PIFERRER, 2001). Para estas espécies o método direto é a única alternativa prática.

No método direto a feminização ou masculinização pode ser alcançada principalmente de duas formas: banhos de imersão ou através do alimento. O banho de imersão (o hormônio é adicionado na água) é mais adequado para espécies em que o período lábil coincide com a embriogênese ou ocorre durante o estágio larval, enquanto os tratamentos com adição do hormônio no alimento vivo ou em rações são mais apropriados para espécies em que o período lábil coincide com a alimentação exógena. A simplicidade do método direto é a principal vantagem que explica porque esse método é mais utilizado (PANDIAN e SHEELA, 1995; BEARDMORE, 2001; PIFERRER, 2001).

Em muitos países utiliza-se o método indireto por pressão do mercado consumidor. A preferência deste método é porque os peixes destinados ao mercado não são diretamente expostos aos hormônios

esteroides. Contudo, este método só é possível com fêmeas homogaméticas (ROUGEOT et al., 2002; HENDRY et al., 2003).

Essa preocupação do peixe no mercado com hormônio não tem muito fundamento porque os esteroides são liberados após serem metabolizados no fígado. Independente da via de administração do hormônio, o metabolismo é feito em alguns dias, além disso, a maioria dos peixes tratados com hormônio vai chegar ao mercado consumidor depois de meses ou até anos. Não há nenhum risco de que o peixe, meses ou anos depois do tratamento, contenha qualquer quantidade significativa do hormônio ou seus metabolitos (PIFERRER, 2001).

Essas metodologias de controle do sexo gonadal têm sido aplicadas em diferentes espécies, como por exemplo: *Acanthopagrus schlegeli* (CHANG et al., 1994), *Odontesthes bonariensis* (STRÜSSMANN, 1996), *D. labrax* (GORSHKOV et al., 2004), *Pseudobagrus fulvidraco* (PARK et al., 2004), *Lepomis macrochirus* (WANG et al., 2008), *Micropterus salmoides* (ARSLAN et al., 2009).

O “black porgy” *Acanthopagrus schlegeli* é um peixe hermafrodita protândrico que muda de sexo a partir do terceiro ano de vida. CHANG et al. (1994) demonstraram que para mudar o sexo dessa espécie no primeiro ano de vida são necessários 4 mg kg⁻¹ de estradiol na ração durante 5 meses. Para o “bluegill sunfish” *Lepomis macrochirus* com 30 dias após a eclosão, 150 mg kg⁻¹ de estradiol na dieta, durante 60 dias é a dose necessária para feminização, observada aos 210 dias de idade (WANG et al., 2008). Para a completa feminização do *D. labrax* aos 11 meses, GORSHKOV et al. (2004) recomendam 12,5 mg kg⁻¹ de estradiol na ração durante 60 dias administrados em peixes com 88 dias.

Os métodos mais apropriados para inversão sexual de macho para fêmea ou vice versa são: administração oral, injeção intramuscular ou implante (YEH, 2003). SARTER et al. (2006) testaram implantes de 17 α -metiltestosterona e conseguiram induzir a completa e permanente mudança de fêmea para macho em juvenis de garoupa, *E. marginatus*, de um ano de idade e aproximadamente 130 g de peso médio.

Em garoupas é muito frequente a mudança de sexo em indivíduos adultos, próximo ao período natural de inversão sexual. Contudo, MURATA (2010) demonstrou que é possível a mudança de sexo da garoupa *E. malabaricus* durante o período de diferenciação sexual (144 dias) utilizando 50 mg de andrógeno sintético 17 α -metiltestosterona por quilo de alimento durante seis meses.

No México, VIDAL-LÓPEZ et al. (2012), trabalhando com robalo-flecha, *C. undecimalis*, com aproximadamente 46 mm, testou o

efeito do esteróide 17β -estradiol (50 mg kg^{-1}) administrado durante 7, 14, 21, 28, 35 ou 42 dias. No final dos 42 dias os peixes estavam com comprimento médio de 81 mm e 3,66 g de peso e não foi possível determinar o sexo gonadal dos organismos, já que as gônadas dos peixes amostrados ainda eram indiferenciadas. Os peixes tratados com hormônio foram mantidos por mais sete meses após o final do experimento, para dar tempo para as gônadas se diferenciarem. Após este período, foi possível verificar histologicamente diferenças entre os tratamentos e foi observado que no grupo controle havia 100% de machos, nos juvenis tratados com hormônio durante diferentes intervalos de tempo o percentual de fêmeas variou entre 13 e 93%. Quanto maior o tempo de ingestão de hormônio (tempo maior que 21 dias) maior o percentual de fêmeas. Neste momento os peixes estavam com aproximadamente 29 g e 193 mm de comprimento.

FERRAZ et al. (2011) testando diferentes temperaturas (20°C , 25°C e 30°C) na proporção de sexos de robalo-peva *C. parallelus*, não identificou o efeito da temperatura na proporção dos sexos visto que, ao final do experimento, os juvenis com 150 dias e comprimento médio de 89 mm, eram todos machos.

O Brasil possui inúmeras espécies marinhas com potencial para aquicultura, dentre elas os peixes da família Centropomidae, o robalo-peva, *C. parallelus*, e o robalo-flecha, *C. undecimalis*. Estas duas espécies vêm se destacando no cenário nacional, tanto em pesquisas dentro das universidades, como em projetos de engorda e de repovoamento, financiados pelo governo e por iniciativas privadas.

Os robalos são peixes teleósteos, carnívoros e possuem diversas características que os qualificam para a piscicultura. Apresentam alto valor de mercado, se adaptam bem ao cativeiro, são eurialinos, aceitam com facilidade alimentos inertes e apresentam boa taxa de conversão alimentar (BARROSO et al., 2002; ALVAREZ-LAJONCHÈRE, 2004; CERQUEIRA, 2010; ALVAREZ-LAJONCHÈRE & TSUZUKI, 2008). Os robalos são encontrados em águas costeiras do Sudeste dos EUA até o Sul do Brasil, em regiões marinhas, estuarinas e lagunares (CERQUEIRA, 2002; CERQUEIRA, 2010).

TAYLOR et al. (2000), durante cinco anos, coletaram exemplares de robalo *C.undecimalis* na costa do sul da Flórida, EUA. Esses peixes foram utilizados para avaliar a idade, crescimento, maturação e inversão sexual. Segundo esses autores, o robalo é uma espécie hermafrodita protândrica. Entre os exemplares amostrados, todos os peixes entre um e dois anos eram machos e a maioria dos peixes entre 12 e 15 anos eram fêmeas. Os dados disponíveis também indicam que entre grupos de

peixes com mesma idade, as fêmeas eram sempre os exemplares maiores que os machos. Para o robalo-peva, *C. parallelus*, não há trabalhos que descrevam se a espécie é hermafrodita protândrica, ou que revelem uma diferença entre os sexos em relação ao crescimento.

Ao longo dos últimos anos, vários estudos sobre a biologia reprodutiva dos peixes da família Centropomidae vêm sendo desenvolvidos no Brasil, Cuba, México, Espanha e Estados Unidos como: frequência e periodicidade da desova (TAYLOR et al., 1998); histologia das gônadas durante maturação e regressão (GRIER e TAYLOR 1998); mudanças endócrinas associadas à maturação (ROBERTS et al., 1999); métodos de biopsia de ovócitos intra-ovariano (ALVAREZ-LAJONCHÈRE et al., 2001); estágios de desenvolvimento gonadal durante um ciclo reprodutivo (MALDONADO-GARCIA et al., 2005); parâmetros hematológicos relacionados à maturação gonadal e ao sexo (SANTOS, 2009). Entretanto, poucas são as informações disponíveis sobre determinação e diferenciação sexual; mudanças no sexo gonadal e vantagens existentes sobre um dos sexos (PETERS et al., 1998; ROBERTS, 1999; ZARZA-MEZA et al., 2006). Portanto, um melhor conhecimento da biologia e fisiologia dessas espécies que possuem interesse econômico, assim como alternativas que permitam aumentar o seu potencial produtivo, é indispensável para o domínio tecnológico e o avanço da piscicultura.

1.2 JUSTIFICATIVA

No Brasil, o robalo-peva *C. parallelus* e o robalo-flecha *C. undecimalis* estão entre as poucas espécies de peixes marinhos sobre as quais existem informações sobre tecnologia de cultivo. Entretanto, informações sobre controle do sexo gonadal, com estas espécies, são escassas.

Dentre os estudos desenvolvidos e atividades realizadas atualmente na aquicultura mundial, o controle do fenótipo do sexo (sexo gonadal) dos peixes de cultivo é uma das estratégias mais promissoras, pois permite obter benefícios associados a um dos sexos, como por exemplo, características morfológicas, fisiológicas ou comportamentais de interesse econômico.

Estudos sobre o controle do fenótipo do sexo ainda não foi realizado com o robalo-peva e com o robalo-flecha recentemente foi publicado um artigo de VIDAL-LÓPEZ et al., 2012 citado na introdução geral. Estes autores testaram um nível de estradiol durante diferentes intervalos de tempo.

No presente trabalho o objetivo foi obter conhecimento sobre a ação de diferentes concentrações de esteroides femininos administrados na ração aos juvenis (indiferenciados ou em diferenciação sexual) de robalo-peva e robalo-flecha durante 45 dias.

1.3 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi induzir a feminização do robalo-peva *Centropomus parallelus* e do robalo-flecha *Centropomus undecimalis* com diferentes concentrações do hormônio 17 β - estradiol na ração.

1.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a eficácia do uso hormônio 17 β -estradiol na ração para a feminização dos juvenis de robalo-peva e robalo-flecha;
- Avaliar o efeito do hormônio 17 β -estradiol no crescimento, sobrevivência e consumo aparente da ração pelos juvenis;
- Avaliar o crescimento pós feminização;
- Avaliar se existe diferença de crescimento entre machos e fêmeas ao final do experimento;
- Definir uma dosagem segura e eficaz com o maior percentual de fêmeas.

1.5 FORMATAÇÃO DOS ARTIGOS

A Tese está dividida em dois capítulos. Cada capítulo corresponde a um artigo. O primeiro está formatado de acordo com as normas da revista “*Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária Zootecnia*” e o segundo artigo está formatado segundo as normas do “*Boletim Instituto de Pesca*”.

CAPÍTULO 1

Feminização e crescimento de juvenis de robalo-peva *Centropomus parallelus* alimentados com rações com diferentes concentrações do hormônio 17 β -estradiol

[Feminization and growth of juvenile fat snook (Centropomus parallelus) fed diets with different concentrations of the hormone 17 β -estradiol]

C. V. A. Carvalho^{1*}, G. Passini¹, W. M. Costa², B. N. Vieira¹, V. R. Cerqueira¹

¹ Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) – Florianópolis - SC

² Fundação Instituto de Pesca do Estado do Rio de Janeiro (FIPERJ)

RESUMO

O robalo-peva *Centropomus parallelus* é uma espécie que possui características que a qualifica para a piscicultura. A manipulação do sexo gonadal em peixes de cultivo é uma das estratégias mais promissoras na aquicultura. Sendo assim, no presente estudo, avaliamos os efeitos de rações com diferentes concentrações de 17 β -estradiol (E₂) na feminização, crescimento e sobrevivência de juvenis de robalo-peva. Durante 45 dias os juvenis foram submetidos a cinco dietas contendo 0, 25, 50, 75 e 100 mg E₂ kg⁻¹ de ração com três repetições cada. Cada unidade experimental era composta por um tanque de 80 L com 40 peixes com peso inicial de 3,39 \pm 0,98 g e comprimento inicial 7,02 \pm 0,68 cm. Após o tratamento hormonal os peixes foram transferidos para tanques redes de 1 m³ onde permaneceram por 12 meses. Nesta etapa foram alimentados com ração comercial sem adição de hormônio. No final do experimento todos os peixes foram amostrados para biometria e avaliação das gônadas e fígado. Durante a feminização os peixes do controle cresceram mais que os dos outros tratamentos. A sobrevivência não foi significativamente diferente entre os tratamentos. No final do experimento não houve diferença de crescimento entre os tratamentos. No tratamento controle, 80,85% dos peixes eram machos e as fêmeas alcançaram comprimento significativamente maior que os machos. Todos os tratamentos com E₂ produziram 100% de fêmeas. Não foi encontrado nenhum peixe intersexo neste trabalho. Com este estudo

concluímos que o uso da ração com 25 mg E₂ kg⁻¹ durante 45 dias é eficiente para a feminização de 100% dos juvenis de robalo-peva.

Palavras-chave: controle do sexo, tratamento hormonal, peixe marinho, diferenciação sexual

ABSTRACT

The fat snook (*Centropomus parallelus*) is a species that has characteristics that qualifies for fish farming. The manipulation of gonadal sex in fish farming is one of the most promising strategies in aquaculture. Thus, in the present study, it was evaluated the effects of diets with different concentrations of 17 β -estradiol (E₂) in feminization, growth and survival of juvenile fat snook. For 45 days the juveniles were subjected to five diets containing 0, 25, 50, 75 and 100 mg E₂ kg⁻¹ feed with three replicates. Each experimental unit consisted of a 80 L tank with 40 fish with an initial weight of 3.39 \pm 0.98 g and initial length 7.02 \pm 0.68 cm. After hormone treatment the fish were transferred to 1 m³ cage nets where they remained for 12 months, and were fed commercial feed without added hormone. At the end of the experiment all fish were sampled for biometry and evaluation of gonads and liver. Through the feminization control fish grew faster than the other treatments. Survival was not significantly different between treatments. At the end of the experiment there was no difference on growth between treatments. In the control treatment, 80,85% of the fish were males and females attained significantly greater length than males. All treatments with E₂ produced 100% females. No intersex fish was found. This study concluded that the use of feed containing 25 mg E₂ kg⁻¹ for 45 days is effective for 100% feminization of juvenile fat snook.

Keywords: sex control, hormonal treatment, marine fish, sex differentiation

INTRODUÇÃO

O robalo-peva *Centropomus parallelus* é um peixe marinho estuarino, carnívoro, encontrado em águas costeiras do Sudeste dos EUA até o Sul do Brasil (Cerqueira, 2010). É uma espécie com potencial para a piscicultura marinha devido ao valor de mercado, por se adaptar bem ao cativeiro, aceitar com facilidade alimentos inertes e

apresentar boa taxa de conversão alimentar (Barroso et al., 2002; Cerqueira, 2010; Cavalli e Hamilton, 2007; Alvarez-Lajonchère e Tsuzuki, 2008).

Relatos sobre o crescimento desta espécie na natureza indicam que as fêmeas apresentam um maior crescimento com relação aos machos da mesma espécie (Cerqueira, 2010). Além deste trabalho, não há nenhum outro que avalie a diferença de crescimento entre os sexos para esta espécie.

Recentemente verificou-se que o uso de diferentes temperaturas (20°C, 25°C e 30°C) durante diferenciação sexual não influenciou a proporção sexual de juvenil de robalo-peva pois todos os juvenis com 150 dias e comprimento médio de 89 mm eram machos (Ferraz et al., 2011).

A manipulação do sexo gonadal em peixes de cultivo é uma das estratégias mais promissoras na aquicultura (Strüssmann e Nakamura, 2002), pois permite obter benefícios associados ao sexo que apresenta características morfológicas, fisiológicas ou comportamentais de interesse econômico (Park et al., 2004; Frisch, 2004; Mitcheson e Liu, 2008). Para o controle do sexo gonadal, esteróides sexuais vêm sendo utilizados em diversas espécies de peixes (Piferrer, 2001; Frisch, 2005). O estrógeno 17 β -estradiol é utilizado como hormônio feminizante (Saillant et al., 2001; Hendry et al., 2003; Park et al., 2004), enquanto que andrógenos, como o composto sintético 17 α -metiltestosterona, é utilizado como masculinizante (Rougeot et al., 2002; Omoto et al., 2002; Arslan et al., 2009).

Os machos da espécie *Pseudobagrus fulvidraco* apresentam maiores taxas de crescimento do que as fêmeas, então a masculinização por indução hormonal é mais interessante para a produção desta espécie (Park et al., 2004). As fêmeas do *Dicentrarchus labrax*, exibem taxas de crescimento 30 a 50% maiores que os machos (Gorshkov et al., 2004). O macho da espécie *Pagrus major* durante o período reprodutivo apresenta uma coloração escura no corpo que faz com que o seu preço de mercado diminua. Portanto, para a produção desta espécie, a preferência é por populações monossexo de fêmeas (Kato et al., 2003).

Sendo assim, devido à importância de estudos sobre controle do sexo gonadal em peixes e a carência de informações disponíveis sobre mudanças no sexo e vantagens existentes sobre um dos sexos para o robalo-peva, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos de diferentes dosagens do hormônio 17 β -estradiol na feminização, no crescimento e na sobrevivência de juvenis de robalo-peva.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Piscicultura Marinha (LAPMAR), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

Os juvenis de robalo-peva foram obtidos por meio de desovas induzidas de reprodutores mantidos em cativeiro, segundo método descrito por Alvarez-Lajonchère et al. (2002). O estudo foi realizado com 555 juvenis de robalo-peva com peso de $3,39 \pm 0,98$ g e comprimento de $7,02 \pm 0,68$ cm.

Este estudo foi dividido em duas etapas. A primeira foi a feminização ou o período de tratamento hormonal. Durante 45 dias (março a abril 2010) foram oferecidas cinco dietas com níveis crescentes de hormônio 17β -estradiol (0, 25, 50, 75 e 100 mg E_2 kg^{-1} de ração). Cada dieta foi considerada um tratamento com três repetições. A segunda etapa começou em maio de 2010 e foi até abril de 2011 (pós feminização), quando os peixes foram alimentados com ração comercial, sem estradiol.

Feminização

Na primeira etapa do experimento os peixes foram distribuídos em quinze tanques de fibra de vidro com volume útil de 80 litros. A densidade de estocagem foi de 0,5 peixes L^{-1} . Os tanques foram mantidos em fluxo contínuo com água salgada (35ups) e renovação de até quatro vezes o seu volume ao dia. A aeração dos tanques foi constante e o fotoperíodo de 12 h luz/12 h escuro. Para manutenção da qualidade da água, os tanques foram sifonados diariamente para retirada de detritos depositados no fundo. Durante o experimento de feminização a temperatura média e o oxigênio dissolvido foram de $24,26 \pm 1,94$ °C e $6,47 \pm 0,50$ mg L^{-1} , respectivamente.

Antes de iniciar esta etapa foi realizada uma biometria (dados de peso e comprimento) de todos os peixes e, destes, quinze foram sacrificados para coleta das gônadas. No fim do tratamento hormonal todos os peixes foram medidos e pesados, seis peixes de cada tratamento (2 peixes de cada tanque) foram sacrificados aleatoriamente para as amostragens.

Preparo das rações

As rações com as diferentes concentrações de estradiol (E_2) foram preparadas uma semana antes do início do experimento. Para a sua incorporação na ração (ração farelada comercial, 50% PB), inicialmente foi preparada uma solução estoque do hormônio 17β -estradiol dissolvido

em álcool absoluto. Uma alíquota dessa solução foi diluída em 800 mL de álcool comercial e misturada uniformemente em um quilo de ração. Para cada dieta foi calculada uma alíquota para se obter a concentração de hormônio desejada na ração. Em seguida a ração foi distribuída em uma bandeja, ao abrigo de luz, durante 48 h para completa evaporação do álcool. Após a secagem, a ração foi peletizada e em seguida seca em estufa a 25°C por aproximadamente 12 h. Depois de pronta, foi armazenada a 5°C. Essa metodologia foi adaptada de Arslan et al (2009).

Durante o experimento estas rações foram oferecidas aos juvenis diariamente, quatro vezes ao dia, até a saciedade aparente.

Pós feminização

Após a biometria realizada no final da primeira etapa do experimento, os peixes foram transferidos para tanques redes de 1m³ fixados em uma balsa flutuante no viveiro do LAPMAR, onde permaneceram por 12 meses. Durante o período em que ficaram nos tanques redes a temperatura da água mínima foi de 15°C e a máxima foi de 30°C durante os meses do verão. O oxigênio dissolvido na água foi em média $5,04 \pm 1,50$ mg L⁻¹. A salinidade da água do viveiro foi de 20 ups. Durante este período os peixes foram alimentados diariamente com ração comercial duas vezes ao dia até a saciedade aparente.

Ao final desta etapa foi realizada uma biometria com todos os peixes e todos foram sacrificados para amostragem das gônadas e do fígado.

Procedimentos de biometria e amostragem

Durante todas as biometrias, os peixes foram anestesiados com benzocaína 50 ppm. Os peixes amostrados para histologia foram sacrificados com uma superdosagem de benzocaína (100 ppm). Na biometria inicial realizada antes do tratamento hormonal foram fixados cortes transversais da região mediana do corpo dos juvenis. Na biometria realizada ao final da primeira etapa, quando possível, foram retiradas as gônadas para histologia e, quando não era possível, foram fixados cortes transversais dos peixes.

Na biometria realizada no final da segunda etapa, cada indivíduo foi dissecado para a retirada das gônadas e fígado que foram pesados em balança analítica digital para a determinação do índice gonadossomático (IGS) e índice hepatossomático (IHS), posteriormente as gônadas foram fixadas (procedimentos aprovados pelo CEUA/UFSC).

As amostras coletadas para histologia, em todas as etapas, foram fixadas em Davidson Marinho por 24h e posteriormente conservadas em álcool 70%. Após desidratação, diafanização e inclusão em parafina, o material foi cortado em micrótomo na espessura entre 5 e 7 μ m. As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina. A caracterização microscópica das gônadas foi feita com auxílio de um microscópio Olympus BX50.

O sexo dos peixes foi determinado segundo Vazzoler (1996), Grier e Taylor (1998) a partir da avaliação das estruturas das gônadas de todos os peixes amostrados.

Parâmetros de crescimento

Para o cálculo dos parâmetros de crescimento foram utilizadas as seguintes fórmulas:

Taxa de crescimento específico (TCE, %. dia^{-1}) = $100 \times [(\ln P_f - \ln P_i)/\text{tempo}]$, onde: P_f = peso final (g), P_i = peso inicial (g);

Ganho em peso (GP) = ($P_f - P_i$);

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

Índice gonadossomático (IGS) = $100 \times (\text{peso da gônada}/\text{peso do peixe})$;

Índice hepatossomático (IHS) = $100 \times (\text{peso do fígado}/\text{peso do peixe})$,

Consumo de ração (CR, g peixe $^{-1}$) = consumo total/número de peixes por tanque,

Consumo de E_2 na ração (CE_2) = CR x (dosagem de E_2).

Análise estatística

O tratamento estatístico dos resultados foi feito através da Análise de Variância (ANOVA uma via) e quando foram encontradas diferenças significativas foi aplicado o teste de Tukey. Os dados em percentual foram transformados utilizando a função arco seno antes de serem analisados. Em cada caso, foi testada a homocedasticidade dos dados utilizando o teste de Levene. Os dados não paramétricos (índice hepatossomático) foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn para comparação das médias. A porcentagem de fêmeas com gônadas mal formadas foi calculada e posteriormente analisada pelo teste qui-quadrado (χ^2). Todas as análises foram realizadas com o auxílio do software Statística 7.0 e com o nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Na primeira etapa do experimento (feminização) os peixes do tratamento controle apresentaram maior peso, comprimento, ganho em peso e taxa de crescimento específico quando comparados com os peixes dos outros tratamentos. Os tratamentos com 25, 50, 75 e 100 mg E₂ kg⁻¹ não apresentaram diferença significativa entre si (Tab. 1). A sobrevivência não foi afetada pelo consumo de hormônio na ração, pois não foram encontradas diferenças significativas entre o controle e os outros tratamentos. O consumo de ração também não apresentou diferença entre os tratamentos apesar dos diferentes níveis de E₂ (CE₂) nas dietas (Tab. 1).

Tabela 1. Efeito das diferentes dosagens do 17-β estradiol (E₂) no crescimento, sobrevivência, consumo de ração (CR), consumo de E₂ (CE₂) dos juvenis de robalo-peva *C. parallelus* após 45 dias de tratamento hormonal.

Concentração de E ₂ (mg kg ⁻¹)	0 (controle)	25	50	75	100
Peso final (g)	6,24 ± 1,41 ^a	5,19 ± 1,24 ^b	4,96 ± 1,21 ^{bc}	4,72 ± 1,13 ^c	4,89 ± 1,03 ^{bc}
Comprimento final (cm)	8,89 ± 0,63 ^a	8,21 ± 0,68 ^b	8,20 ± 0,69 ^b	8,06 ± 0,69 ^b	8,21 ± 0,61 ^b
Sobrevivência (%)	97,37 ± 2,63	98,25 ± 3,04	93,86 ± 4,02	93,86 ± 1,52	96,05 ± 1,86 ^{ns}
GP (g)	2,85 ± 0,11 ^a	1,80 ± 0,13 ^b	1,58 ± 0,36 ^b	1,33 ± 0,23 ^b	1,53 ± 0,16 ^b
TCE (%)	1,35 ± 0,38 ^a	0,95 ± 0,06 ^b	0,84 ± 0,16 ^b	0,73 ± 0,11 ^b	0,82 ± 0,07 ^b
CR (g peixe ⁻¹)	7,04 ± 0,45	6,60 ± 0,36	7,32 ± 0,33	6,58 ± 0,30	7,14 ± 0,10 ^{ns}
CE ₂ (mg peixe ⁻¹)	0,00 ± 0,00	6,15 ± 0,20	13,04 ± 0,04	17,60 ± 0,50	26,07 ± 0,87

Média (± desvio padrão) em uma mesma linha com sobrescritos diferentes indicam diferença estatística (P < 0.05), ns = não significativo.

Macroscopicamente as gônadas são estruturas pares, alongadas, situadas dorsalmente na cavidade corporal, relacionadas láteroventralmente com a bexiga natatória. Na análise histológica das amostras coletadas no início do experimento e ao final do tratamento hormonal não foram encontradas evidências histológicas da completa diferenciação sexual ou não se observou células específicas de ovários ou testículos. Os peixes no início do experimento foram considerados indiferenciados e após o tratamento hormonal foram considerados em diferenciação.

Na segunda etapa do experimento (pós feminização) foi possível determinar a proporção sexual de machos e fêmeas em cada tratamento. No final do experimento, os machos foram caracterizados por apresentarem um par de gônadas alongadas e esbranquiçadas e as fêmeas um par de gônadas mais arredondadas e opacas.

As porcentagens de peixes com má formação gonadal (Tab. 2) encontradas foram significativamente maiores ($P < 0,05$, χ^2) nos tratamentos com 25 e 50 mg E_2 kg^{-1} do que o controle e não foram diferentes significativamente dos tratamentos com 75 e 100 mg E_2 kg^{-1} . Neste trabalho foi considerada má formação problemas como: uma gônada ao invés de duas e gônadas com formatos diferentes. Não foi verificada a presença de animais intersexo neste trabalho.

Tabela 2. Efeito de diferentes concentrações do estradiol na proporção dos sexos de robalo-peva *C. parallelus* e percentual de má formação nas gônadas dos peixes dez meses após o tratamento hormonal.

Concentração de E_2 (mg E_2 kg^{-1})	Fêmeas (%)	Machos (%)	Má formação gonadal (%)
0	19,15	80,85	8,51 ^b
25	100,00	0,00	21,62 ^a
50	100,00	0,00	20,00 ^a
75	100,00	0,00	12,50 ^{ab}
100	100,00	0,00	12,00 ^{ab}

Média (\pm desvio padrão) em uma mesma coluna com sobrescritos diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$, χ^2).

No tratamento controle 80,85% dos peixes eram machos. Nos outros tratamentos só havia fêmeas (Tab. 2). As fêmeas do tratamento controle eram significativamente maiores que os machos (Tab. 3).

Tabela 3. Peso, comprimento, índice hepatossômático (IHS) e índice gonadossômático (IGS) dos machos e fêmeas do robalo-peva do tratamento controle no final do experimento.

Controle	Peso (g)	Comp. (cm)	IHS (%)	IGS (%)
Machos	61,03 \pm 15,78 ^b	18,47 \pm 1,65 ^b	1,62 \pm 0,26 ^a	0,06 \pm 0,03 ^b
Fêmeas	76,59 \pm 16,70 ^a	19,93 \pm 1,55 ^a	1,68 \pm 0,26 ^a	0,32 \pm 0,03 ^a

Média (\pm desvio padrão) em uma mesma coluna com sobrescritos diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$)

Os machos do tratamento controle apresentaram testículos com presença de espermatogônias, espermatócitos, espermatídes e espermatozoides (Fig. 1a). Os ovócitos de todas as fêmeas estavam na fase II de desenvolvimento (ovócito perinucleolar, Fig. 1b) segundo Vazzoler (1996). As únicas exceções foram uma fêmea do tratamento com 50 mg E₂ kg⁻¹ (Fig. 1c) e outra no tratamento 100 mg E₂ kg⁻¹. Estas duas fêmeas apresentaram alguns ovócitos com vitelogênese lipídica (fase III).

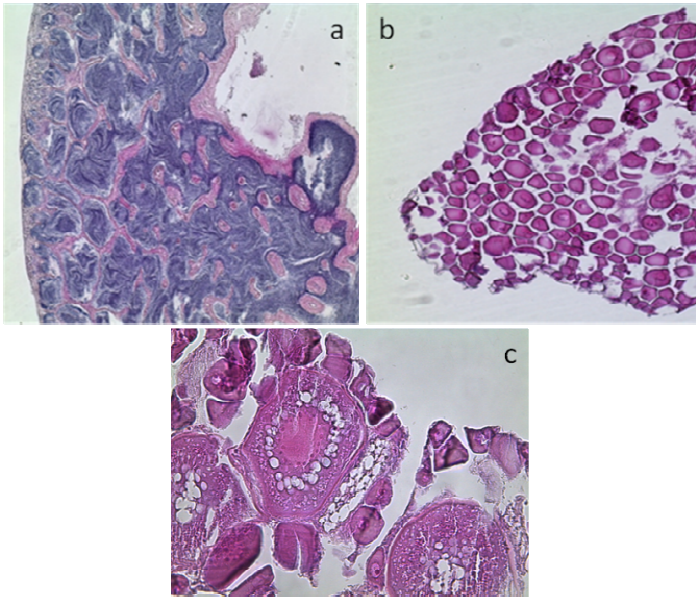


Figura 1. Corte longitudinal das gônadas do robalo-peva *C. parallelus* no final do experimento de pós feminização. (a) testículo, peixe do grupo controle, (b) fêmea do tratamento 50 mg E₂ kg⁻¹ com ovócitos perinucleolares, (c) fêmea do tratamento 50 mg E₂ kg⁻¹ com ovócitos vitelogênicos. (a) e (b) aumento de 10x, (c) aumento de 40x.

Ao final da segunda etapa não foram encontradas diferenças significativas no peso das fêmeas dos diferentes tratamentos. Entretanto, o comprimento no tratamento 75 mg E₂ kg⁻¹ foi significativamente menor que o comprimento nos tratamentos controle, 25 mg E₂ kg⁻¹ e 100 mg E₂ kg⁻¹ (Tab. 4). Os IGS das fêmeas não foram significativamente diferentes entre os tratamentos e o IHS foi significativamente menor no tratamento controle (Tab. 4).

Tabela 4. Efeito das diferentes concentrações de estradiol (E_2) no peso e comprimento final, índice hepatossomático (IHS) e gonadossomático (IGS) das fêmeas de robalo-peva *C. parallelus*.

Concentração de E_2 (mg E_2 Kg ⁻¹)	Peso (g)	Comp. (cm)	IHS (%)	IGS (%)
0 (controle)	76,59 ± 16,70	19,93 ± 1,55 ^a	1,68 ± 0,26 ^c	0,32 ± 0,03
25	73,48 ± 17,10	19,30 ± 1,39 ^a	2,06 ± 0,22 ^a	0,36 ± 0,07
50	64,00 ± 20,69	18,84 ± 1,92 ^{ab}	1,76 ± 0,48 ^b	0,40 ± 0,25
75	61,91 ± 19,33	17,69 ± 2,67 ^b	1,94 ± 0,45 ^a	0,39 ± 0,28
100	72,73 ± 20,94 ^{ns}	19,17 ± 1,87 ^a	1,91 ± 0,29 ^{ab}	0,41 ± 0,16 ^{ns}

Média (± desvio padrão) em uma mesma linhacoluna com sobrescritos diferentes são estatisticamente diferentes ($P < 0.05$), ns = não significativo.

DISCUSSÃO

Este trabalho demonstrou que o hormônio 17β -estradiol é eficiente para a feminização de juvenis de robalo-peva com 7 cm de comprimento. Nos tratamentos com 25, 50, 75 e 100 mg E_2 kg⁻¹ o percentual de fêmeas foi de 100%. Só foram encontrados machos no tratamento controle. Outros trabalhos como de Amaral Jr. et al. (2008) com *Rhamdia quelen*; Flynn e Benfey (2007) com *Acipenser brevirostrum*; Arslan et al. (2009) com *Micropterus salmoides* e Groshkov et al. (2004) com *Dicentrarchus labrax*, também afirmam a eficiência do uso de estradiol na ração para produção de lotes monossexos.

Apesar de ainda não haver estudos que determinem o momento da diferenciação sexual do robalo-peva, o grande percentual de fêmeas obtidas neste trabalho pode ser consequência do desenvolvimento gonadal do peixe utilizado no momento da feminização. A análise histológica indicou que os peixes no início do experimento apresentavam gônadas indiferenciadas ou em diferenciação, ou seja, os peixes ainda não apresentavam um sexo definido. Esse período indiferenciado é conhecido como período lábil e é a fase de maior sensibilidade do peixe ao tratamento hormonal segundo Piferrer (2001) e Devlin e Nagahama (2002). Esse período varia muito de espécie para espécie, podendo ocorrer durante a fertilização, na fase de larva ou ainda em juvenis (Piferrer, 2001) como no caso do *D. labrax* que se diferencia sexualmente a partir de 8 cm de comprimento (Saillant et al., 2003).

O uso do hormônio na ração para os juvenis de robalo-peva não influenciou na sobrevivência. Resultado semelhante foi observado por Wang et al. (2008) em um experimento onde foram testados quatro níveis de estradiol na ração durante 60 dias com juvenis de *Lepomis*

macrochirus. Piferrer (2001) relata a influência do estradiol na sobrevivência e no crescimento. Esta relação está diretamente relacionada à dose utilizada, duração do tratamento, espécie e do estágio de desenvolvimento desse indivíduo (indiferenciado ou diferenciado sexualmente). Em algumas espécies como o *Misgurnos misolepis* e o *A. brevirostrum* se observou um aumento da mortalidade com o aumento da concentração de E₂ ou com a duração do tratamento (Kim et al., 1997; Flynn e Benfey, 2007).

O aumento no IHS nos peixes tratados com estradiol também foi observado para outras espécies como *Oncorhynchus mykiss* (Verslycke et al., 2002) e *Oryzias javanicus* (Imai et al., 2005). O estradiol exógeno estimula a produção hepática de vitelogenina nos peixes imaturos, aumentando o metabolismo do fígado e com isso o tamanho do órgão e consequentemente aumenta o índice hepatossomático (Verslycke et al., 2002; Devlin e Nagahma, 2002).

No presente trabalho o IGS foi menor que 0,5% em todos os tratamentos. O tamanho dos ovários e o estágio de desenvolvimento dos ovócitos foram semelhantes para todas as fêmeas, portanto as diferentes concentrações de E₂ na ração não influenciaram no desenvolvimento das gônadas. Segundo a classificação feita por Taylor et al. (1998) para o *Centropomus undecimalis*, o IGS menor que 0.5% indica que o peixe é imaturo. Juvenis de *Micropetrus salmoides* tratados com estradiol também não apresentaram diferença no desenvolvimento gonadal (Arslan et al., 2009).

O percentual de peixes com gônadas mal formadas pode estar relacionado com a dose inadequada de hormônio ingerido pelo peixe ou com a duração do tratamento (Piferrer, 2001). Contudo, no tratamento controle também foram encontradas má formações nas gônadas, essas alterações podem ser uma característica da espécie em cativeiro, já que não há relatos de má formação gonadal no ambiente natural.

Neste trabalho o estradiol afetou o crescimento no final da primeira etapa do experimento. Após dez meses do fim da oferta da ração com o hormônio, não existia mais diferença de peso entre os peixes do controle e os tratados com estradiol. O mesmo tipo de resultado foi observado em *Lepomis macrochirus*, onde após o tratamento hormonal o menor crescimento observado foi dos peixes tratados com o maior nível de estradiol (200 mg E₂ kg⁻¹). Após 120 dias do fim do tratamento hormonal não havia mais diferença de crescimento entre o grupo controle e os grupos tratados com estradiol (Wang et al., 2008). Esse mesmo trabalho defende a teoria do crescimento compensatório após o fim da oferta da ração com estradiol. O

crescimento compensatório é descrito como uma fase de crescimento acelerado após um período de condições adversas para o os peixes (Ali et al., 2003).

As fêmeas de robalo-peva do tratamento controle eram significativamente maiores que os machos, o que sugere uma possível vantagem de crescimento com relação ao crescimento das fêmeas. Essa diferença de crescimento entre os sexos é observada em várias espécies como, por exemplo, o *D. labrax*, em que as fêmeas crescem de 30 a 40% mais rápido que os machos (Gorshkov et al., 2004). Outras espécies onde um sexo tem alguma vantagem sobre o outro são: *Hippoglossus hippoglossus* (Hendry et al., 2003), *Pseudobagrus fulvidraco* (Park et al., 2004), *L. macrochirus* (Wang et al., 2008) e *Micropterus salmoides* (Arslan 2009).

Seria interessante testar concentrações de E2 menores que as avaliadas no presente estudo para determinar uma concentração mínima para se obter 100% de feminização. Além disso, fazer um trabalho de engorda com lotes monossexo, com temperaturas mais altas, para confirmar se há diferenças de crescimento que justifiquem a produção comercial apenas de fêmeas.

CONCLUSÃO

Considerando todos os efeitos do estradiol na sobrevivência, crescimento (durante e após o tratamento hormonal), percentual de fêmeas obtidas e a concentração de hormônio utilizada, concluímos que o uso de ração com 25 mg E₂ Kg⁻¹ durante 45 dias é eficiente para a feminização dos juvenis de robalo-peva com 7 cm.

REFERÊNCIAS

ALI, M.; NICIEZA, A.; WOOTTON, R. J. Compensatory growth in fishes: a response to growth depression. *Fish and Fisheries* v.4, p.147-190. 2003

ALVAREZ-LAJONCHÈRE, L.; CERQUEIRA, V. R.; SILVA, I. D.; ARAUJO, J.; REIS, M. Mass production of juveniles of the fat snook *Centropomus parallelus* in Brazil. *J. World Aquacul. Soc.*, v.33, p.506-516, 2002.

ALVAREZ-LAJANCHÈRE, L.S.; TSUZUKI, M.Y. A review of methods for *Centropomus* spp. (snooks) aquaculture and recommendations for the establishment of their culture in Latin America. *Aquacul. Res.*, v.39, p.684-700, 2008.

AMARAL Jr., H.A.; NUNES, M.F.S.; GARCIA, S. Análise de diferentes dosagens de hormônio na ração, para definição de um protocolo de feminilização do jundiá *Rhamdia quelen*. REDVET, 2008. Disponível em: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n121208/121212.pdf>. Acessado em: 5 dez 2012.

ARSLAN, T.; PHELPS, R.P.; OSBORNE, J.A. Effects of oestradiol-17 β or 17 α -methyltestosterone administration on gonadal differentiation of largemouth bass *Micropterus salmoides* (Lacepède). *Aquacult. Res.*, v.40, p.1813-1822, 2009.

BARROSO, M. V.; CASTRO, J. C.; AOKI, P. C. M.; HELMER, J. L. Valor nutritivo de alguns ingredientes para o robalo *Centropomus parallelus*. *R. Bras. Zootec.*, v. 31, p.2157–2164, 2002.

CAVALLI, R.O.; HAMILTON, S. 2007. A piscicultura marinha no Brasil - Afinal, quais as espécies boas para cultivar? *Panorama da Aqüicultura*, v.17, p.50-55.

CERQUEIRA, V.R. Cultivo do robalo-peva, *Centropomus parallelus*. In: BALDISSEROTTO, B.; CARVALHO, L. (Org.). Espécies nativas para a piscicultura no Brasil. 2.ed. Santa Maria: EDUFMS, 2010, p. 489-515.

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.

FERRAZ, E.M.; CARVALHO, G.C.S.; SCHAEFER, A.L.C.; NARAHARA, M.Y.; CERQUEIRA, V.R. Influência da temperatura de cultivo sobre crescimento e diferenciação sexual do robalo-peva, *Centropomus parallelus* POEY, 1860. *Rev. Bras. Eng. Pesca*, v.6, p.1-16, 2011.

FLYNN, S.R.; BENFEY, T.J. Sex differentiation and aspects of gametogenesis in shortnose sturgeon *Acipenser brevirostrum* Lesueur. *J. Fish Biol.*, v.70, p.1027-1044, 2007.

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

GORSHKOV, S.; GORSHKOVA, G.; COLORNI, B. Effects of natural estradiol-17 β and synthetic 17 α -ethynylestradiol on direct feminization of European sea bass *Dicentrarchus labrax*. *J. World Aquacult. Soc.*, v.35, p.167-177, 2004.

GRIER, H.J.; TAYLOR, R.G. Testicular maturation and regression in the common snook. *J. Fish Biol.*, v.53, p.521-542, 1998.

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

IMAI, S.; KOYAMA, J.; FUJII, K. Effects of 17 β -estradiol on the reproduction of Java-medaka (*Oryzias javanicus*), a new test fish species. *Mar. Pollut. Bull.*, v.51, p.708-714, 2005.

KATO, K; MIAYASHITA, S.; MURATA, O.; KUMAI, H. Gonadal sex differentiation and sex control in red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Physiol. Biochem.*, v.28, p. 155-156, 2003.

KIM, D.S.; NAM, Y.K.; JO, J-Y. Effect of oestradiol-17 β immersion treatments on sex reversal of mud loach, *Misgurnus mizolepis* (Günther). *Aquac. Res.*, v.28, p.941-946, 1997.

MITCHESON, Y.S.; LIU, M. Functional hermaphroditism in teleosts. *Fish and Fisheries*, v.9, p.1-43, 2008.

OMOTO, N.; MAEBAYASHI, M.; MITSUHASHI, E.; YOSHITOMI, K.; ADACHI, S.; YAMOUCHI, K. Effects of estradiol-17 β and 17 α -methyltestosterone on gonadal sex differentiation in the F2 hybrid sturgeon, the bester. *Fisheries Sci.*, v.68, p.1047-1054, 2002.

- PARK, I.; KIM, J.; CHO, S.H.; KIM, D.S. Sex differentiation and hormonal sex reversal in the bagrid catfish *Pseudobagrus fulvidraco* (Richardson). *Aquaculture*, v. 232, p.183-193, 2004.
- PIFERRER, F. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. *Aquaculture*, v.197, p. 229-281, 2001.
- ROUGEOT, C.; JACOBS, B.; KESTEMONT, P.; MELARD, C. Sex control and sex determinism study in Eurasian perch, *Perca fluviatilis*, by use of hormonally sex-reversed male breeders. *Aquaculture*, v.211, p.81-89, 2002.
- SAILLANT, E.; FOSTIER, A.; MENU, B.; HAFFRAY, P.; CHATAIN, B. Sexual growth dimorphism in sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*, v.202, p.371-387, 2001.
- SAILLANT, E.; CHATAIN, B.; MENU, B. et al. Sexual differentiation and juvenile intersexuality in the european sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *J. Zool. Lond.*, v.260, p.53-63, 2003.
- STRÜSSMANN, C.A.; NAKAMURA, M. Morphology, endocrinology and environmental modulation of gonadal sex differentiation in teleost fishes. *Fish Physiol. Biochem.*, v.26, p.13-29, 2002.
- TAYLOR, R.G.; GRIER, H.J.; WHITTINGTON, J.A. Spawning rhythms of common snook in Florida. *J.Fish Biol.*, v.53, p.502-520, 1998.
- VAZZOLER, A.E.A.M. Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática. Maringá: EDUEM, 1996.196p.
- VERSLYCKE, T.; VANDENBERGH, G.F; VERSONNEN, B. et al. Induction of vitellogenesis in 17 α -ethinylestradiol-exposed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): a method comparison. *Comp. Biochem. Phys. C*, v.132, p.483-492, 2002.
- WANG, H.; GAO, Z.; BERES, B. et al. Effects of estradiol-17 β on survival, growth performance, sex reversal and gonadal structure of bluegill sunfish *Lepomis macrochirus*. *Aquaculture*, v.285, p.216-223, 2008.

CAPÍTULO 2

Efeito do uso de 17 β -estradiol na ração sobre a proporção do sexo, crescimento e sobrevivência de juvenis de robalo-flecha *Centropomus undecimalis*

Cristina Vaz Avelar de CARVALHO¹; Gabriel PASSINI²; Wanessa de Melo COSTA³; Beatriz Nunes VIEIRA⁴; Vinicius Ronzani CERQUEIRA⁵

¹ Laboratório de Piscicultura Marinha (LAPMAR), Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC. email: cvacarvalho@gmail.com

² Laboratório de Piscicultura Marinha (LAPMAR), Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC. email: gabrielpassini@ig.com.br

³ Fundação Instituto de Pesca do Estado do Rio de Janeiro - FIPERJ. email: wanessademelo@gmail.com

⁴ Laboratório de Piscicultura Marinha (LAPMAR), Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC. email: beatriz_nunesvieira@yahoo.com.br

⁵ Laboratório de Piscicultura Marinha (LAPMAR), Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC. email: vinicius.cerqueira@ufsc.br

RESUMO

O controle do sexo dos peixes é uma das técnicas mais promissoras na aquicultura, pois permite obter vantagens associadas a um dos sexos. Hormônios esteroides são utilizados em várias espécies para feminização dos peixes. O robalo-flecha *Centropomus undecimalis* é um importante peixe nativo com grande potencial para piscicultura. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de rações com diferentes concentrações de 17 β -estradiol (E₂) na feminização, crescimento e sobrevivência de juvenis de robalo-flecha. Durante 45 dias os juvenis foram submetidos a três dietas (0, 50, 100 mg E₂ kg⁻¹ de ração) com três repetições cada, sendo cada unidade composta por um tanque-rede de 1m³ com 25 peixes com peso inicial de 14,01 \pm 5,33 g e comprimento inicial de 12,11 \pm 1,47 cm. Após este período os peixes passaram a ser alimentados somente com ração comercial sem adição de hormônio. Durante o período de administração do E₂, os peixes do

controle cresceram mais que os dos outros tratamentos e as sobrevivências não foram diferentes significativamente entre os tratamentos, ficando entre 78 e 89%. No final do experimento no tratamento com 50 mg E₂ kg⁻¹, 26% dos peixes eram machos, 68,42% eram fêmeas e 5,26% eram intersexo. No tratamento com 100 mg E₂ kg⁻¹, 10% dos peixes eram machos e 90% eram fêmeas. Após 11 meses não houve diferença de crescimento entre os tratamentos. Este trabalho mostrou que é possível obter 90% de fêmeas de robalo-flecha utilizando rações com 100 mg E₂ kg⁻¹ durante 45 dias sem danos ao crescimento ou à sobrevivência. Entretanto são necessários mais estudos sobre a concentração de hormônio e o período de administração para gerar um protocolo com 100% de feminização.

Palavras-chave: controle do sexo, tratamento hormonal, peixe marinho, intersexo

Effect of 17β-estradiol levels on the sex ratio, growth and survival of juvenile of common snook *Centropomus undecimalis*

ABSTRACT

Control of the sex of fish is one of the most promising techniques in aquaculture, since it gives advantages associated with one sex. Steroid hormones are used for various species of feminization fish. The common snook *Centropomus undecimalis* is an important native fish with great potential for fish farming. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of diets with different concentrations of 17β-estradiol (E₂) in feminization, growth and survival of juvenile snook. For 45 days the juvenile received three diets (0, 50, 100 mg E₂ kg⁻¹ diet) with three repetitions each, with each unit consisting of a cage net 1m³ with 25 fish with an initial weight of 14.01 ± 5.33 g and initial length of 12.11 ± 1.47 cm. After this period the fish were fed only commercial feed without added hormone. During the administration of E₂, the control fish grew more than the other treatments and survival was not significantly different between treatments, (78 - 89%). At the end of the experiment in the control treatment, 100% of the fish were males. Treatment with 50 mg E₂ kg⁻¹, 26% of fish were males, 68,42% were females and 5,26% were intersex. Treatment with 100 mg kg⁻¹ E₂ 10% of the fish were males and 90% were females. For 11 months there was no difference on growth between treatments. This work showed that it is possible to obtain 90% of female common snook using diets with 100 mg E₂ kg⁻¹ for 45 days without impair growth or survival. However

more studies are needed on the hormone concentration and the administration period to generate a protocol with 100% feminization.

Keywords: control of sex hormone treatment, marine fish, intersex

INTRODUÇÃO

O controle do sexo dos peixes é uma das estratégias mais promissoras na aquicultura. O principal objetivo é incrementar a produtividade a partir de vantagens relacionadas a um dos sexos (BEARDMORE *et al.*, 2001; FRISCH, 2004).

A produção de lotes monossexo da espécie *Lepomis macrochirus* evita problemas com a superpopulação nas fazendas de cultivo (WANG *et al.*, 2008). No caso do *Hippoglossus hippoglossus* a vantagem de produzir somente fêmeas está relacionado ao fato de que elas crescem mais e maturam mais tarde que os machos (HENDRY *et al.*, 2003). O mesmo ocorre com as fêmeas de robalo europeu, *Dicentrarchus labrax*, que exibem taxas de crescimento 30 a 50% maiores que os machos (GORSHKOV *et al.*, 2004). No caso do esturjão *Acipenser brevirostrum*, a principal vantagem na produção desta espécie é o caviar, sendo assim lotes monossexo de fêmeas são muito mais interessantes economicamente (FLYNN and BENFEY, 2007).

Uma das formas de manipular o sexo dos peixes é através do uso de hormônios esteroides exógenos. Vários trabalhos relatam a utilização de andrógenos ou estrógenos administrados em banhos de imersão ou na dieta no início do desenvolvimento gonadal dos peixes (ROUGEOT *et al.*, 2002; FLYNN and BENFEY, 2007; ARSLAN *et al.*, 2009).

O hormônio 17 β -estradiol (E₂) é um estrógeno natural que tem sido utilizado com sucesso com diferentes espécies de peixes: *Pseudobagrus fulvidraco* (PARK *et al.*, 2004), *Rhamdia quelen* (AMARAL Jr. *et al.*, 2008); *L. macrochirus* (WANG *et al.*, 2008) e *Micropterus salmoides* (ARSLAN *et al.*, 2009).

Para que o tratamento seja mais eficiente o ideal é que seja realizado antes da diferenciação sexual, período em que o tecido gonadal é mais sensível à ação dos esteroides exógenos. Além disso, a dose de hormônio utilizada e a duração do tratamento também são fundamentais para seu sucesso (PIFERRER, 2001).

O robalo-flecha *Centropomus undecimalis* é um importante peixe marinho encontrado em regiões tropicais e subtropicais, da Flórida, nos EUA, até o Sul no Brasil (FIGUEIREDO e MENEZES, 1980). É uma espécie hermafrodita protândrica (TAYLOR, 2000) que vem sendo

estudada há algum tempo nos Estados Unidos (YANES ROCCA *et al.*, 2009), México (IBARRA-CASTRO *et al.*, 2011) e no Brasil (SOLIGO *et al.*, 2011). Tem-se destacado como uma espécie com potencial para aquicultura por ser rústica, se adaptar bem em cativeiro, ser eurialina, possuir uma carne branca e saborosa além de ter alto valor de mercado (CAVALLI e HAMILTON, 2007).

Recentemente foi publicado o primeiro estudo de feminização de juvenis selvagens de robalo-flecha no México. Os autores utilizaram 50 mg E₂ kg⁻¹ no alimento (*Artemia* e ração) entre 21 a 42 dias e obtiveram no máximo 90% de fêmeas (VIDAL-LÓPEZ *et al.*, 2012). A partir destes resultados a proposta deste trabalho foi avaliar o efeito de duas concentrações de E₂ na ração durante 45 dias em juvenis de robalo-flecha nascidos em cativeiro e após o tratamento hormonal verificar a proporção de sexo, peixes intersexo, crescimento e sobrevivência.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Piscicultura Marinha (LAPMAR), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) em Florianópolis, SC.

Os 235 juvenis de robalo-flecha *C. undecimalis* utilizados neste experimento foram obtidos a partir de desovas de reprodutores selvagens realizadas pela empresa Danúbio Aquicultura Ltda (Pitz, 2009). No início do experimento os peixes tinham em média 14,01 ± 5,33 g e 12,11 ± 1,47 cm.

O experimento foi realizado em duas etapas. A primeira etapa foi a feminização ou o período de tratamento hormonal. Durante 45 dias (fevereiro a março de 2011) foram oferecidas três dietas com níveis crescentes de hormônio 17β-estradiol (0, 50 e 100 mg E₂ kg⁻¹ de ração). Cada dieta foi considerada um tratamento com três repetições. A segunda etapa (pós feminização) foi de abril de 2011 a março de 2012, quando os peixes foram alimentados com ração comercial, sem hormônio.

Feminização

Os peixes foram distribuídos em nove tanques redes de 1m³ fixados em uma balsa flutuante no viveiro do LAPMAR. Em cada tanque foram estocados 25 juvenis de robalo-flecha. Durante o experimento de feminização a temperatura e o oxigênio dissolvido foram de 28,05 ± 1,05 °C e 4,47 ± 0,85 mg L⁻¹, respectivamente. A salinidade da água do viveiro foi de 20 ups.

Antes de iniciar esta etapa foi realizada uma biometria (dados de peso e comprimento) de todos os peixes e dez foram sacrificados para coleta das gônadas. No fim do tratamento hormonal todos os peixes foram medidos e pesados e seis peixes de cada tratamento (2 peixes por tanque) foram sacrificados aleatoriamente para as amostragens.

Preparo das rações

As rações com as diferentes concentrações de 17β -estradiol (E_2) foram preparadas uma semana antes de o experimento começar. Para a sua incorporação na ração (ração farelada comercial, 50% PB), inicialmente foi preparada uma solução estoque do hormônio E_2 dissolvido em álcool absoluto. Uma alíquota dessa solução foi diluída em 800 mL de álcool comercial e misturada uniformemente em um quilo de ração, para cada dieta foi calculada uma alíquota para se obter a concentração de hormônio desejada. Em seguida a ração foi distribuída em uma bandeja, ao abrigo de luz, durante 48 h, para completa evaporação do álcool. Após a secagem, a ração foi peletizada e em seguida seca em estufa a 25°C por aproximadamente 12 h. Depois de pronta, foi armazenada a 5°C . Essa metodologia foi adaptada de Arslan *et al* (2009).

Durante o experimento a ração foi oferecida diariamente aos juvenis quatro vezes ao dia até a saciedade aparente.

Pós feminização

Nesta etapa os peixes passaram a ser alimentados diariamente com ração comercial (50%PB), sem adição de hormônio, duas vezes ao dia até a saciedade aparente. Durante este período a temperatura mínima chegou a 16°C e a máxima até 30°C . O oxigênio dissolvido na água e a temperatura foram de $5,98 \pm 1,25 \text{ mg L}^{-1}$ e $21,73 \pm 3,69^\circ\text{C}$, respectivamente. Durante esta etapa foram realizadas duas biometrias, uma no início de dezembro de 2011 e outra no início de março de 2012. Na última biometria 75% dos peixes de cada tratamento foram sacrificados para as amostragens das gônadas e fígado.

Procedimentos de biometria e amostragem

Durante todas as biometrias, os peixes foram anestesiados com benzocaína 50 ppm. Os peixes amostrados para histologia foram sacrificados com uma superdosagem de benzocaína (100 ppm). Na biometria inicial realizada antes do tratamento hormonal foram fixados cortes transversais da região mediana do corpo dos juvenis. Na biometria final, realizada na etapa de feminização, quando possível, foram retiradas as gônadas para histologia e, quando não era possível, foram fixados cortes transversais dos peixes.

Na biometria realizada no final do experimento, cada indivíduo foi dissecado para a retirada das gônadas e fígado que foram pesados em balança analítica digital para a determinação do índice gonadossomático (IGS) e índice hepatossomático (IHS) e posteriormente as gônadas foram fixadas (procedimentos aprovados pelo CEUA/UFSC).

As amostras coletadas para histologia, em todas as etapas, foram fixadas em solução de Davidson Marinho por 24h e posteriormente conservadas em álcool 70%. Após desidratação, diafanização e inclusão em parafina, o material foi cortado com micrótomo na espessura entre 5 e 7 μm . As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina.

A caracterização microscópica das gônadas foi feita com auxílio de um microscópio Olympus BX50 e as imagens foram registradas com câmera digital. O sexo dos peixes foi determinado segundo VAZZOLER (1996), GRIER and TAYLOR (1998), TAYLOR *et al* (1998) a partir da avaliação das estruturas das gônadas de todos os peixes amostrados.

Para o cálculo dos parâmetros de crescimento foram utilizadas as seguintes fórmulas:

$$\text{Fator de Condição de Fulton (FC)} = 100 * (\text{peso} / (\text{comprimento}^3))$$

Taxa de crescimento específico (TCE, $\% \cdot \text{dia}^{-1}$) = $100x [(\ln P_f - \ln P_i) / \text{tempo}]$, onde: P_f = peso final (g), P_i = peso inicial (g);

$$\text{Ganho em peso (GP)} = (P_f - P_i);$$

Consumo de ração (CR, g peixe^{-1}) = consumo total/número de peixes por tanque,

$$\text{Consumo de } E_2 \text{ na ração (CE}_2\text{, mg peixe}^{-1}\text{)} = \text{CR} \times (\text{dosagem de } E_2\text{)}.$$

Sobrevivência (S%) = $100 \times (N_i - N_m / N_i)$, onde: N_i é o número inicial de juvenis e N_m é o número de juvenis mortos,

Índice gonadossomático (IGS) = $100 \times (\text{peso da gônada} / \text{peso do peixe})$;

Índice hepatossomático (IHS) = $100x (\text{peso do fígado} / \text{peso do peixe})$,

Análise estatística

Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão. O tratamento estatístico dos dados foi feito através da Análise de Variância (uma via) e quando foram encontradas diferenças significativas foi aplicado o teste de Tukey. Os dados em percentual foram transformados utilizando a função arco seno antes de serem analisados. Em cada caso, foi testada a homocedasticidade dos dados utilizando o teste de Levene. Os dados não paramétricos (índice gonadossomático) foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn para comparação das médias. A proporção entre machos e fêmeas foi

calculada e posteriormente analisada pelo teste qui-quadrado (χ^2). Todas as análises foram realizadas com o software Statística 7.0 e com o nível de significância de 5%.

RESULTADOS

No início do experimento os peixes dos diferentes tratamentos não apresentaram diferenças significativas no peso, comprimento e fator de condição ($P > 0,05$). Após 45 dias de tratamento hormonal, os peixes do tratamento controle eram significativamente maiores ($P < 0,05$) do que os peixes dos demais tratamentos. O ganho em peso e taxa de crescimento específico também foram significativamente maiores ($P < 0,05$) no grupo controle (Tabela 1).

Durante o experimento de feminização, o consumo de ração não foi significativamente diferente ($P > 0,05$) entre os tratamentos 50 e 100 mg E₂ Kg⁻¹ e foi significativamente maior no grupo controle ($P < 0,05$). A sobrevivência dos juvenis foi superior a 78% em todos os tratamentos, sem diferença significativa entre eles ($P > 0,05$) (Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros de crescimento, sobrevivência, consumo de ração (CR) e consumo de estradiol na ração (CE₂) dos juvenis de robalo flecha submetidos a dietas com diferentes níveis de estradiol (E₂) durante o experimento de feminização.

Concentração de E ₂ (mg Kg ⁻¹)	0 (controle)	50	100
Peso inicial (g)	14,53 ± 5,76	13,92 ± 5,24	14,07 ± 5,52 ^{ns}
Peso 45 dias (g)	27,21 ± 11,20 ^a	20,18 ± 6,26 ^b	20,01 ± 6,96 ^b
Comprimento inicial (cm)	12,25 ± 1,68	12,07 ± 1,48	12,12 ± 1,46 ^{ns}
Comprimento 45 dias (cm)	15,10 ± 1,90 ^a	14,26 ± 1,39 ^b	14,10 ± 1,61 ^b
FC inicial (%)	0,766 ± 0,083	0,761 ± 0,063	0,758 ± 0,084 ^{ns}
FC 45 dias (%)	0,7518 ± 0,047 ^a	0,679 ± 0,054 ^b	0,691 ± 0,056 ^b
TCE (%)	1,39 ± 0,10 ^a	0,90 ± 0,06 ^b	0,78 ± 0,14 ^b
Ganho em peso (g)	12,66 ± 1,36 ^a	7,01 ± 0,25 ^b	5,97 ± 1,15 ^b
Consumo ração (g peixe ⁻¹)	20,02 ± 0,58 ^a	15,07 ± 0,31 ^b	15,84 ± 0,41 ^b
Consumo E ₂ (mg peixe ⁻¹)	0,0 ± 0,0	31,16 ± 1,42	67,01 ± 0,75
Sobrevivência (%)	84,00 ± 8,00	78,67 ± 6,11	89,33 ± 6,11 ^{ns}

Média (± desvio padrão) em uma mesma linha com sobrescritos diferentes são estatisticamente diferentes ($P < 0,05$), ns = não significativo. TCE = taxa de crescimento específico, FC = fator de condição

Na segunda etapa do experimento foram realizadas duas biometrias. Uma biometria no início de dezembro de 2011 (Tabela 2) e outra no início de março de 2012 (Tabela 3). Nas duas biometrias não foram encontradas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os tratamentos (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2. Dados de peso, comprimento e fator de condição dos juvenis de robalo flecha na primeira biometria do experimento de pós feminização.

Concentração de E ₂ (mg Kg ⁻¹)	0	50	100
Peso (g)	73,94 ± 23,66	76,78 ± 17,93	80,28 ± 24,35 ^{ns}
Comprimento (cm)	21,36 ± 2,05	21,20 ± 1,77	21,86 ± 2,02 ^{ns}
Fator de condição (%)	0,738 ± 0,076	0,800 ± 0,111	0,745 ± 0,059 ^{ns}

Média (± desvio padrão), ns = não significativo

Entretanto, na última biometria realizada em março de 2012 (biometria final do trabalho) além dos dados de peso, comprimento e fator de condição, foram avaliados também os IHS e IGS (Tabela 3). Apesar do IHS dos peixes tratados com 50 mg E₂ kg⁻¹ ser significativamente maior ($P < 0,05$) que o dos peixes do grupo controle, os valores destes dois tratamentos não foram significativamente diferentes ($P > 0,05$) do IHS dos peixes tratados com 100 mg E₂ kg⁻¹.

Tabela 3. Dados de peso, comprimento, fator de condição (FC), índice hepatossomático (IHS) e índice gonadossomático (IGS) dos juvenis de robalo flecha onze meses após a feminização.

Concentração de E ₂ (mg Kg ⁻¹)	0	50	100
Peso (g)	271,04 ± 70,87	278,64 ± 84,14	258,83 ± 76,67 ^{ns}
Comprimento (cm)	31,91 ± 2,77	31,66 ± 3,19	31,17 ± 3,03 ^{ns}
FC (%)	0,8178 ± 0,0656	0,8574 ± 0,1037	0,8335 ± 0,0871 ^{ns}
IHS (%)	1,73 ± 0,30 ^b	2,10 ± 0,46 ^a	1,82 ± 0,22 ^{ab}
IGS (%)	0,04 ± 0,01 ^b	0,14 ± 0,07 ^a	0,16 ± 0,04 ^a

Média (± desvio padrão) em uma mesma linha com sobrescritos diferentes são estatisticamente diferentes ($P < 0,05$). ns = não significativo.

No final do experimento de pós feminização todos os peixes do tratamento controle eram machos e após massagem abdominal 80% dos peixes liberaram um pouco de sêmen. Os cortes histológicos revelaram

que os testículos apresentavam espermatogônias, espermatócitos, espermátides e espermatozoides (Figura 1a). Não foi observada nenhuma má formação gonadal, entretanto foi observado que 5,26% dos peixes no tratamento com 50 mgE₂ kg⁻¹ eram intersexo, ou seja, apresentavam ovócitos intratesticulares (Figura 1b). As fêmeas encontradas nos tratamentos com 50 e 100 mg E₂ Kg⁻¹ apresentaram ovócitos perinucleolares (Figura 1c), e cerca de 45% delas apresentavam alguns ovócitos com vitelogênese lipídica (Figura 1d).

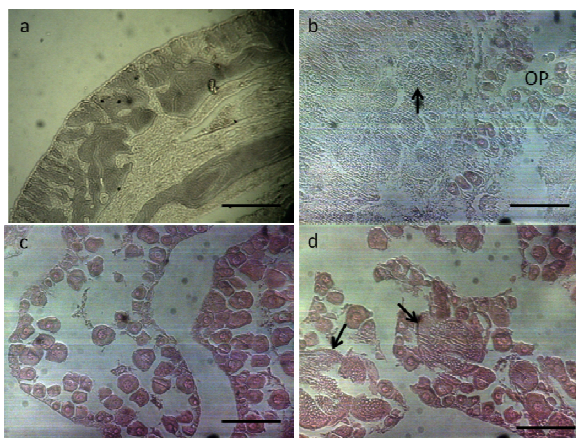


Figura 1. Corte histológico das gônadas do robalo-flecha *C. undecimalis* no final do experimento de pós feminização. (a) corte longitudinal do testículo, peixe do grupo controle, (b) gônada intersexo, ovócitos perinucleolares (OP) e espermatogônias (seta); (c) fêmea do tratamento 50 mg E₂ kg⁻¹ com ovócitos perinucleolares, (d) fêmea do tratamento 100 mg E₂ kg⁻¹ com ovócitos vitelogênicos (setas) e ovócitos perinucleolares. (a), (b), (c) e (d) aumento de 10x, barra=150μm.

Os resultados da proporção dos sexos (Figura 2) determinados pela análise microscópica foram significativamente diferentes entre os tratamentos ($P < 0,05$, χ^2), sendo o maior percentual de machos no controle e o maior percentual de fêmeas no tratamento com 100 mg E₂ kg⁻¹.

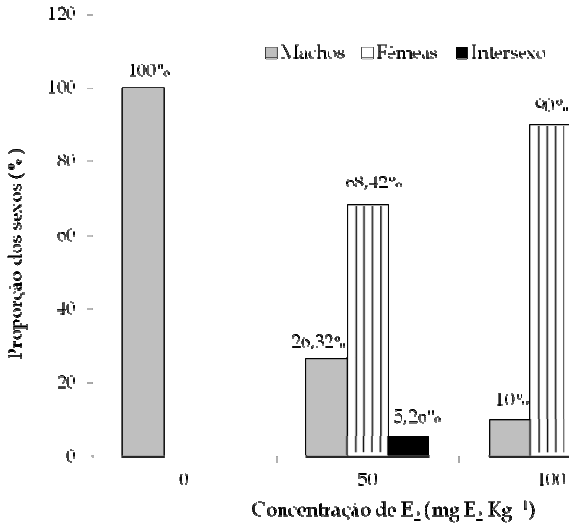


Figura 2. Porcentagem de machos, fêmeas e intersexo de juvenis de robalo-flecha *C. undecimalis* tratados com 17 β -estradiol no final do experimento.

DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo demonstram claramente a influência do hormônio 17 β -estradiol (E₂) na feminização das gônadas dos juvenis de robalo-flecha.

VIDAL-LÓPEZ *et al* (2012) conseguiram 90% de fêmeas de robalo-flecha utilizando 50 mg E₂ kg⁻¹ no alimento (*Artemia* e ração) durante 21 e 42 dias em peixes com comprimento inicial de 4,6 cm, enquanto que no presente trabalho, utilizando 50 mg E₂ kg⁻¹ na ração durante 45 dias em peixes com comprimento inicial de 12 cm, o percentual de fêmeas obtidas foi de apenas 68,42% e ainda foram encontrados alguns indivíduos intersexo. Já no tratamento com 100mg E₂ kg⁻¹ foi possível obter 90% de fêmeas.

Segundo PIFERRER (2001), três fatores são fundamentais para o sucesso no controle do sexo de formas jovens: concentração do hormônio, tratamento hormonal e estágio de desenvolvimento gonadal. Provavelmente, estes resultados divergentes com os de VIDAL-LÓPEZ *et al* (2012) podem ser devido ao estágio de desenvolvimento gonadal em função da diferença de tamanho dos juvenis utilizados nos dois estudos. WANG *et al* (2008) obtiveram 100% de fêmeas *Lepomis macrochirus* e nenhum peixe intersexo após o tratamento hormonal

durante 60 dias com 150 e 200 mg E₂ kg⁻¹. GORSHKOV *et al* (2004) também conseguiram 100% de feminização do *Dicentrarchus labrax* utilizando 12,5 mg E₂ Kg⁻¹ durante 60 dias.

O percentual de machos encontrados no tratamento controle já era esperado, visto que o robalo-flecha é um hermafrodita protândrico segundo TAYLOR *et al* (2000).

O hormônio E₂ além de alterar a proporção dos sexos também pode modificar a morfologia das gônadas, afetar negativamente a sobrevivência e prejudicar o crescimento (PIFERRER, 2001). No presente trabalho o uso do E₂ não influenciou na sobrevivência, mas diminuiu o consumo de ração durante o experimento de feminização. Provavelmente por causa do menor consumo de ração pelos peixes tratados com E₂, o crescimento também tenha sido menor nestes tratamentos quando comparados aos peixes do grupo controle. Esse mesmo efeito do estradiol sobre o crescimento também foi observado em outras espécies como *Hippoglossus hippoglossus* (HENDRY *et al.*, 2003) e o *Micropterus salmoides* (ARSLAN *et al.*, 2009).

Após o fim da oferta de ração com hormônio os juvenis deste trabalho recuperaram o crescimento e ao final do trabalho já não apresentavam diferenças com relação ao grupo controle.

WANG *et al.*, (2008) também avaliaram este mesmo parâmetro no *L. macrochirus* e observaram o mesmo resultado durante e após o tratamento hormonal. Segundo estes autores esta recuperação do crescimento após o tratamento com hormônio pode ser considerado como crescimento compensatório. Este é descrito como uma fase de crescimento acelerado após um período de condições adversas para os peixes (Ali *et al.*, 2003).

O índice hepatossomático (IHS) é utilizado como um biomarcador de estrógenos exógenos para avaliar indiretamente a produção da vitelogenina no organismo. O estradiol exógeno estimula a produção hepática de vitelogenina nos peixes imaturos, aumentando o metabolismo do fígado e com isso o tamanho do órgão e consequentemente aumenta o índice hepatossomático (VERSLYCKE *et al.*, 2002; DEVLIN and NAGAHAMA, 2002). Entretanto, neste trabalho somente o IHS dos peixes tratados com 50mg E₂ kg⁻¹ foi maior que o controle. No presente trabalho o IGS foi menor que 0,5 em todos os tratamentos. Segundo a classificação feita por TAYLOR *et al* (1998) para o *C. undecimalis* selvagem, IGS menor que 0,5 indica um macho imaturo ou regredido e indica uma fêmea apenas com ovócitos não vitelogênicos. No presente estudo, apesar dos IGS serem menores que

0,5 foram encontradas algumas fêmeas com ovócitos vitelogênicos, provavelmente por influência da ação do E₂ nas gonadas.

A partir dos resultados observados neste estudo, ajustes de parâmetros como concentração e duração dos tratamentos, além do tamanho dos juvenis no início do experimento deverão ser avaliados a fim de melhorar a eficiência do tratamento hormonal para feminização de juvenis de robalo-flecha.

CONCLUSÃO

Este trabalho mostrou que é possível obter 90% de fêmeas de robalo-flecha com 12 cm utilizando ração com 100 mg E₂ kg⁻¹ durante 45 dias sem danos ao crescimento ou a sobrevivência. Entretanto são necessários mais estudos para se obter um protocolo para 100% de feminização.

REFERÊNCIAS

ALI, M.; NICIEZA, A.; WOOTTON, R. J. 2003 Compensatory growth in fishes: a response to growth depression. *Fish and Fisheries*, 4:147-190.

AMARAL Jr., H.A.; NUNES, M.F.S.; GARCIA, S. 2008 Análise de diferentes dosagens de hormônio na ração, para definição de um protocolo de feminização do jundiá *Rhamdia quelen*. Disponível em: <<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n121208/121212.pdf>> Acessado em: 5 dez 2012.

ARSLAN, T.; PHELPS, R.P.; OSBORNE, J.A. 2009 Effects of oestradiol-17β or 17α-methyltestosterone administration on gonadal differentiation of largemouth bass *Micropterus salmoides* (Lacepède). *Aquaculture Research*, 40:1813-1822.

BEARDMORE, J.A.; MAIR, G.C.; LEWIS, R.I. 2001 Monosex male production in finfish as exemplified by tilápia: applications, problems and prospects. *Aquaculture*, 197:283-301.

CAVALLI, R.O. e HAMILTON, S. 2007. A piscicultura marinha no Brasil - Afinal, quais as espécies boas para cultivar? *Panorama da Aqüicultura*, 17, 50-55.

- DEVLIN, R. H.; NAGAHAMA, Y. 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological and environmental influences. *Aquaculture*, 208:191-364.
- FIGUEIREDO, J.L. e MENEZES, N.A. 1980 Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. III. Teleostei (2). São Paulo: Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, 90 p.
- FLYNN, S.R.; BENFEY, T.J. 2007 Sex differentiation and aspects of gametogenesis in shortnose sturgeon *Acipenser brevirostrum* Lesueur. *Journal of Fish Biology*, 70:1027-1044.
- FRISCH, A. 2004 Sex-change and gonadal steroids in sequentially-hermaphroditic teleost fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 14:481-499.
- GORSHKOV, S.; GORSHKOVA, G.; COLORNI, B. 2004 Effects of natural estradiol-17 β and synthetic 17 α -ethynylestradiol on direct feminization of European sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 35:167-177.
- GRIER, H.J. and TAYLOR, R.G. 1998 Testicular maturation and regression in the common snook. *Journal of Fish Biology*, 53:521-542.
- HENDRY, C.; MARTIN-ROBICHAUD, D.J.; BENFEY, T.J. 2003 Hormonal sex reversal of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Aquaculture*, 219:769-781.
- IBARRA-CASTRO, L.; ALVAREZ-LAJONCHÈRE, L.; ROSAS, C.; PALOMINO-ALBARRÁN, I.G.; HOLT, G.J.; SANCHEZ-ZAMORA, A. 2011 GnRH α -induced spawning with natural fertilization and pilot-scale juvenile mass production of common snook, *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1792). *Aquaculture*, 319, 479-483.
- PARK, I.; KIM, J.; CHO, S.H.; KIM, D.S. 2004 Sex differentiation and hormonal sex reversal in the bagrid catfish *Pseudobagrus fulvidraco* (Richardson). *Aquaculture*, 232:183-193.
- PIFERRER, F. 2001 Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. *Aquaculture*, 197:229-281.
- ROUGEOT, C.; JACOBS, B.; KESTEMONT, P.; MELARD, C. 2002 Sex control and sex determinism study in Eurasian perch, *Perca fluviatilis*, by use of hormonally sex-reversed male breeders. *Aquaculture*, 211:81-89.

PITZ, S. R. 2009. Especialista produz com sucesso alevinos de robalo-flecha. Peixes estão sendo engordados em viveiros de camarão em Santa Catarina. *Panorama da Aqüicultura*, 19, 58-59.

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

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.

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

VAZZOLER, A.E.A.M. 1996 Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática. Maringá: Editora da Universidade Estadual de Maringá. 196p.

VERSLYCKE, T.; VANDENBERGH, G.F; VERSONNEN, B.; ARIJIS, K.; JANSSEN, C.R. 2002 Induction of vitellogenesis in 17 α -ethinylestradiol-exposed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): a method comparison. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 132:483-492.

VIDAL-LÓPEZ, J.M.; ÁLVAREZ-GONZÁLEZ, C.A.; CONTRERAS-SÁNCHEZ, W.M.; PATIÑO, R.; HERNÁNDEZ-FRANYUTTI, A.A.; HERNÁNDEZ-VIDALL, U.; MARTÍNEZ-GARCIA, R. 2012. Feminización de juveniles del Robalo Blanco *Centropomus undecimalis* (Bloch 1792) usando 17 β -estradiol. *Revista Ciencias Marinas y Costeras*, 4, 83-93.

WANG, H.; GAO, Z.; BERES, B.; OTTOBRE, J.; WALLAT, G.; TIU, L.; RAPP, D.; PAUL 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.

YANES-ROCA, C.; RHODY, N.; NYSTROM, M.; MAIN, K.L. 2009 Effects of fatty acid composition and spawning season patterns on egg quality and larval survival in common snook (*Centropomus undecimalis*). *Aquaculture*, 287:335-340.

7. CONCLUSÕES GERAIS

Este trabalho foi realizado na tentativa de contribuir com a ampliação do conhecimento científico sobre a eficiência do uso do hormônio natural 17β -estradiol na feminização do robalo-peva *C. parallelus* e do robalo-flecha *C. undecimalis*.

Diante dos resultados concluímos:

- As análises histológicas indicaram que o hormônio E_2 foi eficiente na feminização das duas espécies, sendo que no trabalho com o robalo-peva conseguiu-se 100% de feminização e no robalo-flecha o maior percentual de fêmeas obtidas foi de 90%;

- O uso do E_2 na ração não influenciou na sobrevivência das duas espécies;

- O consumo de ração foi menor para os juvenis de robalo-flecha tratados com E_2 durante os 45 dias;

- Foram encontrados juvenis intersexo no tratamento com $50\text{mg } E_2 \text{ Kg}^{-1}$ do robalo-flecha.

- Nas duas espécies foi observado crescimento compensatório após o fim do tratamento hormonal;

- As fêmeas de robalo-peva foram significativamente maiores que os machos no tratamento controle;

- São necessários mais estudos para gerar um protocolo com 100% de feminização para o robalo-flecha.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO

ALVAREZ-LAJONCHÈRE, L.; GUERRERO-TORTOLERO, D.; PEREZ-URBIOLA, J. C. Validation of an ovarian biopsy method in a sea bass, *Centropomus medius* Günther. **Aquaculture Research** 32, 379-384, 2001.

ALVAREZ-LAJONCHÈRE, L.; CERQUEIRA, V. R.; SILVA, I. D.; ARAUJO, J.; REIS, M. Mass production of juveniles of the fat snook *Centropomus parallelus* in Brazil. **Journal of the World Aquaculture Society** 33, 506-516, 2002.

ALVAREZ-LAJONCHÈRE, L. S. Robalos: potencialidades e resultados. **Panorama da aqüicultura** (Brazil) v. 14 (85), p. 15–21, 2004.

ALVAREZ-LAJONCHÈRE, L. S.; TSUZUKI, M. Y. A review of methods for *Centropomus* spp. (snooks) aquaculture and recommendations for the establishment of their culture in Latin America. **Aquaculture Research** v. 39, p. 684-700, 2008.

AMARAL, H. Jr.; NUNES, M. F. S.; SILVANO, G. Análise de diferentes dosagens de hormônio na ração, para definição de um protocolo de feminilização do jundiá *Rhamdia quelen*.

Revista eletrônica de Veterinária 12, 2008.
<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n121208/121212.pdf>

ARSLAN, T.; PHELPS, R. P.; OSBORNE, J. A. Effects of oestradiol-17 β or 17 α -methyltestosterone administration on gonadal differentiation of largemouth bass *Micropterus salmoides* (Lacepède). **Aquaculture Research** 40, 1813-1822, 2009.

BAROILLER, J.-F.; GUIGUEN, Y.; FOSTIER, A. Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. **Cellular and Molecular Life Sciences** 55, 910-931, 1999.

BARROSO, M. V.; CASTRO, J. C.; AOKI, P. C. M.; HELMER, J. L. Valor nutritivo de laguns ingredientes para o robalo *Centropomus parallelus*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, p. 2157–2164, 2002.

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

BLÁZQUES, M.; PIFERRER, F.; ZANUY, S.; CARRILLO, M.; DONALDSON, E. M. Development of sex control techniques for european sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) aquaculture effects of dietary 17 α -methyltestosterone prior to sex differentiation. **Aquaculture** 135, 329-342, 1995.

BOUCHEREAU, J. L.; CHAVES, P. T.; ALBARET, J. L. Selection of candidate fish species for farming in the Bay of Guaratuba, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 43, p. 15–25, 2000.

CERQUEIRA, V.R. **Cultivo do robalo: Aspectos da reprodução, larvicultura e engorda**. Laboratório de Piscicultura Marinha, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil, 2002, 86p.

CERQUEIRA, V.R. Cultivo do robalo-peva, *Centropomus parallelus*. **Espécies nativas para a piscicultura no Brasil**. Ed. Bernardo Baldisserotto e Levy de Carvalho Gomes. Editora Universidade Federal de Santa Maria, 2010, p. 489-515.

CORREIA, A. P.; ALVEZ, A. R. M.; LOPES, J. P.; SANTOS, F. L. B. Reversão sexual em larvas de tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) em diferentes condições ambientais. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca** 1, 54-64, 2006.

CHANG, C. F.; LEE, M. F.; CHEN, G. R. Estradiol 17 β associated with the sex reversal in protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegeli*. **Journal Experimental Zoology** 268, 53-58, 1994.

CHANG, Ching-Fong; LAU, En-Lieng; LIN, Bih-Yun. Stimulation of spermatogenesis or of sex reversal according to the dose of exogenous estradiol-17 β in juvenile males of protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegeli*. **General and Comparative Endocrinology** 100, 35-367, 1995.

CONDEÇA, J. B.; CANARIO, A. V. M. Gonadal steroidogenesis in response to estradiol-17 β administration in the sea bream (*Sparus aurata* L.). **General and Comparative Endocrinology** 124, 82-96, 2001.

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

FERRAZ, E.M.; CARVALHO, G.C.S.; SCHAEFER, A.L.C.; NARAHARA, M.Y.; CERQUEIRA, V.R. Influência da temperatura de cultivo sobre crescimento e diferenciação sexual do robalo-peva, *Centropomus parallelus* POEY, 1860. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, 6, 1-16, 2011.

FLYNN, S. R.; BENFEY, T. J. Effects of dietary estradiol-17 β in juvenile shortnose sturgeon, *Acipenser brevirostrum*, Lesueus. **Aquaculture** 270, 405-412, 2007.

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

GORSHKOV, S.; GORSHKOVA, G.; COLORNI, B. Effects of natural estradiol-17 β and synthetic 17 α -ethynylestradiol on direct feminization of european sea bass *Dicentrarchus labrax*. **Journal of the World Aquaculture Society** 35, 167-177, 2004.

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

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

KATO, K.; MIYASHITA, S.; MURATA, O.; KUMAI, H. Gonadal sex differentiation and sex control in red sea bream *Pagrus major*. **Fish Physiology and Biochemistry** 28, 155-156, 2003.

MALDONADO-GARCÍA, M.; GRACIA-LÓPEZ, V.; CARRILLO, M.; HERNÁNDEZ-HERRERA, A.; RODRÍGUEZ-JARAMILLO, C. Stages of gonad development during the reproductive cycle of the blackfin snook, *Centropomus medius*, Günther. **Aquaculture Research** 36, 554-563, 2005.

MITCHESON, Y. S.; LIU, M. Functional hermaphroditism in teleosts. **Fish and Fisheries** 9, 1-43, 2008.

MURATA, R.; KARIMATA, H.; ALAM, M. A.; NAKAMURA, M. Precocious sex change and spermatogenesis in the underyearling Malabar grouper *Epinephelus malabaricus* by androgen treatment. **Aquaculture Research** 41, 303-308, 2010.

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

PARK, In-Seok; KIM, Jung-Hye; CHO, S. H.; KIM, D. S. Sex differentiation and hormonal sex reversal in the bagrid catfish *Pseudobagrus fulvidraco* (Richardson). **Aquaculture** 232, 183-193, 2004.

PETERS, K. M.; MATHESON, R. E. Jr.; TAYLOR, R. G. Reproduction and early life history of common snook *Centropomus undecimalis* (Bloch), in Florida. **Bulletin of Marine Science** 62, 509-529, 1998.

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

ROBERTS, S. B.; JACKSON, L. F.; KING V, W.; TAYLOR, R. G.; GRIER, H. J.; SULLIVAN, C. V. Annual reproductive cycle of the common snook: endocrine correlates of maturation. **Transactions of the American Fisheries Society** 128, 436-445, 1999.

ROUGEOT, C.; JACOBS, B.; KESTEMONT, P.; MELARD, C. Sex control and sex determinism study in eurasian perch, *Perca fluviatilis*, by use of hormonally sex-reversed male breeders. **Aquaculture** 211, 81-89, 2002.

SANTOS, A. A.; EGAMI, M. I.; RANZANI-PAIVA, M. J.; JULIANO, Y. Hematological parameters and phagocytic activity in fat snook (*Centropomus parallelus*): seasonal variation, sex and gonadal maturation. **Aquaculture** 296, 359-366, 2009.

SARTER, K.; PAPADAKI, M.; ZANUY, S.; MYLONAS, C. C. 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, 2006.

STRÜSSMANN, C. A.; NAKAMURA, M. Morphology, endocrinology and environmental modulation of gonadal sex differentiation in teleost fishes. **Fish Physiology and Biochemistry** 26, 13-29, 2002.

STRÜSSMANN, C. A.; TAKASHIMA, F.; TODA, K. Sex differentiation and hormonal feminization in pejerrey *Odontesthes bonariensis*. **Aquaculture** 139, 31-45, 1996.

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

TAYLOR, R. G.; WHITTINGTON, J. A.; GRIER, H. J.; CRABTREE, R. E.; 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, 2000.

VIDAL-LÓPEZ, J.M.; ÁLVAREZ-GONZÁLEZ, C.A.; CONTRERAS-SÁNCHEZ, W.M.; PATIÑO, R.; HERNÁNDEZ-FRANYUTTI, A.A.; HERNÁNDEZ-VIDALL, U.; MARTÍNEZ-GARCIA, R. Feminización de juveniles del Robalo Blanco *Centropomus undecimalis* (Bloch 1792) usando 17 β -estradiol. **Revista Ciencias Marinas y Costeras**, 4, 83-93, 2012.

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

YEH, Shinn-Lih; KUO, Ching-Ming; TING, Yun-Yuan; CHANG, Ching-Fong. The effects of exogenous androgens on ovarian development and sex change in female orange-spotted protogynous grouper *Epinephelus coioides*. **Aquaculture** 218, 729-739, 2003.

ZARZA-MEZA, E. A.; BERRUECOS-VILLALOBOS, J. M.; VÁSQUEZ-PELÁEZ, C.; ÁLVAREZ-TORRES, P. Experimental culture of snook *Centropomus undecimalis* and chucumite *Centropomus parallelus* (Perciformes: Centropomidae) in artisanal earthen ponds. **Ciencias Marinas** 32, 219-227, 2006.