

Luciano Augusto Weiss

**Inversão sexual em jundiá *Rhamdia quelen*
(Quoy & Gaimard, 1824): masculinização com
17 α -metiltestosterona e feminilização indireta**

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: Alex Pires de Oliveira Nuñez, Dr.

Florianópolis
2016

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

Weiss, Luciano Augusto

Inversão sexual em jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824): masculinização com 17α -metiltestosterona e feminilização indireta / Luciano Augusto Weiss ; orientador, Alex Pires de Oliveira Nuñez - Florianópolis, SC, 2016.

117 p.

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

Inclui referências

1. Aquicultura. 2. Fêmeas masculinizadas. 3. Histologia. 4. Neomacho. 5. Testes de progênie. I. Nuñez, Alex Pires de Oliveira. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. III. Título.

**Inversão sexual em jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824):
masculinização com 17 α -metiltestosterona e feminilização indireta**

Por

LUCIANO AUGUSTO WEISS

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 Programa

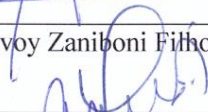
Banca Examinadora:



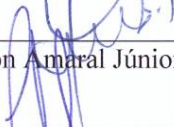
Dr. Alex Pires de Oliveira Nuñez – *Orientador*



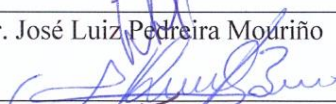
Dr. Evoy Zaniboni Filho



Dr. Hilton Amaral Júnior



Dr. José Luiz Pedreira Mourão



Dr. Robie Allan Bombardelli



Dr. Vinicius Ronzani Cerqueira

Dedico este trabalho à minha família, Fabiana minha esposa (sem esquecer a nossa pequena Ana Clara), Augusto meu pai e Marly minha mãe, pelo apoio incondicional durante todo o período de doutoramento.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus... Obrigado “meu senhor” por me permitir chegar até aqui!

À minha iluminada vovó Fillipa... pela sua gigantesca paciência em me educar para a vida, pela sua incondicional proteção, amor, incentivo, além de seus valiosos ensinamentos... e acima de tudo, por acreditar em mim!

À minha amada companheira Fabiana Widmann Weiss pelo brilho em minha vida, além da paciência, compreensão, incentivo, apoio, por aguentar minhas angústias quando tudo parecia conspirar contra... enfim, pelo amor claro e evidente durante todo este árduo período de doutorado.

Ao professor e orientador Dr Alex Pires de Oliveira Nuñer pela ética profissional, pela amizade, pela sua confiança, pela dinâmica de trabalho, pelo conhecimento transmitido, pelas correções necessárias à minha formação, pelo alto nível das reuniões de direcionamento da pesquisa, pelo empenho em fazer deste projeto uma fonte de trabalho para os imprescindíveis estagiários que nos acompanharam durante todo este período... e por aí vai. Foi uma honra tê-lo como orientador!

Ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Carina (UFSC), que através do Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce (LAPAD) possibilitou a execução do trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do estudo através do projeto universal (486868/2013-3) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo concedida durante todo o doutorado.

Aos estagiários que me acompanharam durante a pesquisa: Clara Luna de Bem, Jonatas Joel Pires, Fernando Bueno Reis, Carolina Hoppe de Oliveira, Fernanda Michele da Luz e Bruno Augusto Amato Borges Podem ter certeza de que foram fundamentais para a execução adequada do trabalho. Desejo muito sucesso a todos!

Aos meus estimados colegas de artigos, Jurandir Joaquim Bernardes Júnior e Claudia Machado. Sem estas parcerias as tempestades não teriam fim... Agradeço pela paciência, dedicação, tempo e por “emprestarem” os conhecimentos!

Aos colegas de LAPAD pela pronta ajuda e compreensão durante as diferentes fases do doutorado, em especial ao Professor Dr. Evoy Zaniboni Filho, coordenador do laboratório e grande mentor durante a minha jornada acadêmica.

Aos colegas Giuliano Huergo e Maurício Machado, pela ajuda com as desovas de jundiá.

À Dr^a Aimê R. M. Magalhães, que na função de coordenadora, permitiu realizarmos os procedimentos histológicos no Laboratório de Malacologia Experimental (LAMEX) do Departamento de Aquicultura do Centro de Ciências Agrárias da UFSC.

À Dr^a Irani Quagio-Grassiotto e à Dr^a Talita Sarah Mazzoni, do Laboratório de Imunocitoquímica da Reprodução do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Campus de Botucatu/SP), por compartilharem o conhecimento que estava faltando para a classificação das gônadas intersexuais e masculinizadas de *Rhamdia quelen*.

Aos que não estão citados aqui e que de alguma forma contribuíram na execução e conclusão desta tese.

“A gratidão é uma forma singular de reconhecimento, e o reconhecimento é uma forma sincera de gratidão.”

(Alan Vaszatte)

“Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer”.

(Mahatma Gandhi)

RESUMO

O cultivo monosexo feminino pode aumentar a produtividade do jundiá *Rhamdia quelen*, tendo em vista o maior crescimento das fêmeas e a maturação precoce dos machos desta espécie durante o ciclo de produção. Quando se pretende produzir um lote monosexo, a inversão sexual, de forma direta ou indireta, é uma ferramenta amplamente difundida na piscicultura. A inversão sexual em peixes pode ser induzida de forma direta através da administração de hormônios, porém o uso de esteroides evoca controvérsias relacionadas ao desenvolvimento dos peixes, à saúde humana e aos possíveis danos ao meio ambiente. Por outro lado, progênies femininas podem ser geradas através da inversão sexual indireta, envolvendo inicialmente a masculinização das fêmeas genotípicas para originar reprodutores neomachos, que são capazes de gerar descendências femininas livres da adição exógena de hormônio ao serem cruzados com fêmeas normais (fêmeas fenotípicas e genotípicas). Desta forma, o objetivo deste estudo foi aplicar a técnica de inversão sexual indireta em *R. quelen*, masculinizando inicialmente as fêmeas normais com 17α -metiltestosterona (MT) por via oral para posterior identificação dos neomachos através das técnicas histológicas e realização de testes de progênie. Após o ensaio masculinizante verificou-se através de histologia que a administração oral de MT foi eficaz para masculinizar fêmeas normais de *R. quelen*. Com a realização dos testes de progênie foram identificados três neomachos, os quais estavam maduros a partir dos oito meses de vida e geraram progênies compostas, em média (\pm dp), por $80,06 \pm 7,46\%$ de fêmeas.

Palavras-chave: Aquicultura. Fêmeas masculinizadas. Histologia. Neomacho. Testes de progênie.

ABSTRACT

Sex reversal in jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824): masculinization with 17α -methyltestosterone and indirect feminization

Female monosex culture can improve the productivity of jundiá *Rhamdia quelen* due to the higher growth of females and early maturation of males during the production cycle. When the production of a monosex group of fish it is intended, direct or indirect sex reversal is a widespread tool used in fish farming. Although the sex reversal in fish is normally induced directly by the administration of hormones, the use of steroid evokes controversy regarding fish development, human health and potential damage to the environment. On the other hand, hormone-free female progeny can be generated by indirect sex reversal, which initially involves the masculinization of females to yield neomales breeders that are able to produce all-female offspring when crossed with normal females (phenotypic and genotypic female). Thus, the aim of this study was to apply the indirect sex reversal technique in *R. quelen* to obtain hormone-free female progeny through the masculinization of normal females with 17α -methyltestosterone (MT) incorporated into feed and further identification of neomales by using histological techniques and progeny tests. In the masculinizing trial the administration of MT into feed was effective to induce masculinization in normal *R. quelen* females. The progeny tests identified three neomales, which were ripe at eight months and generated progeny composed, on average (\pm sd), by $80,06 \pm 7,46\%$ of females.

Keywords: Aquaculture. Histology. Masculinized females. Neomale. Progeny tests.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Destino final da produção piscícola dulcícola oriunda do estado de Santa Catarina.....27
- Figura 2. Espécies de peixes cultivadas em água doce no estado de Santa Catarina em 2014, totalizando 40.324 t produzidas. Outras espécies: *Hypostomus* sp., *Prochilodus* sp., *Astyanax* sp., *Micropterus salmoides*, *Geophagus* sp., *Leporinus* sp., *Acestrorhamphus* sp., *Piaractus mesopotamicus*, *Colossoma macropomum*, tambacu (*Colossoma* sp. ♀ x *Piaractus* sp. ♂), *Hoplias malabaricus*.....28
- Figura 3. Esquema da técnica de inversão sexual indireta para a obtenção de lote monosexo feminino de peixes com reprodutor neomacho XX.35
- Figura 4. Esquema da obtenção de descendência feminina com reprodutor superfêmea WW através da inversão sexual indireta.36
- Figura 5. Corte longitudinal de gônada indiferenciada de *Rhamdia quelen*, mostrando os vasos sanguíneos (VS) e as células germinativas primordiais (CGP). Coloração: Ácido Periódico de Schiff + Hematoxilina Férrica + Metanil Yellow (MY). Peixes com 150 dias após eclosão. Barra: 20 µm.57
- Figura 6. Corte longitudinal de testículo de *Rhamdia quelen* na fase imaturo: áreas basófilas (coloração mais roxa) com os cordões de espermatogônias (EG), início da organização celular precursora do ducto espermático (CPDE) e as projeções digitiformes (PD) ou “franjas” (a). Corte transversal de testículo de *R. quelen* na fase desenvolvimento: espermatogônias (EG), espermatócitos (EC) e espermatídes (ET) agrupadas nos espermatocistos, além da presença de espermatozoides (EZ) (b). Corte longitudinal de testículo de *R. quelen* apto a liberar sêmen: epitélio germinativo contínuo na periferia e descontínuo próximo ao ducto espermático (DE), com um grande número de espermatozoides presentes na luz dos túbulos e ductos espermáticos (c). Corte longitudinal de testículo de *R. quelen* em regressão: espermatozoides (EZ) residuais no ducto espermático (DE) e no lúmen dos túbulos seminíferos (d). Coloração: Hematoxilina / Eosina (HE). Peixes com 150 dias após eclosão. Barras: 500 µm (c), 200 µm (a, d) e 50 µm (b).59
- Figura 7. Corte longitudinal de ovário de *Rhamdia quelen* na fase imatura: ovócitos em crescimento primário (OCP) (a). Corte longitudinal de ovário de *R. quelen* na fase desenvolvimento: ovogônias (OG), ovócitos em crescimento primário (OCP), ovócitos atrésicos (AO) e ovócitos em crescimento secundário (OCS) (b). Peixes com 150 dias após eclosão. Coloração: Hematoxilina / Eosina (HE). Barras: 200 µm.....61

Figura 8. Corte longitudinal de gônada intersexual de *Rhamdia quelen*: espaço intralamelar com espermatogônias (EG) e ovócitos de crescimento primário (OCP) (a), espaço intralamelar com espermatozoides (EZ), áreas de reabsorção (ARA) e reorganização (ARO) celular e ovócitos de crescimento primário (OCP) (b). Corte longitudinal de gônada masculinizada de *R. quelen* (neomachos): lamelas ovarianas contendo exclusivamente células da linhagem germinativa masculina (c), detalhes das espermatogônias (EG) e dos espermatócitos (EC) presentes nas lamelas (d). Coloração: Hematoxilina / Eosina (HE) (a, b) e Ácido Periódico de Schiff + Hematoxilina Férrica + Metanil Yellow (MY) (c, d). Peixes com 150 dias após eclosão. Barras: 200 μm (c), 50 μm (a, b) e 20 μm (d).....62

Figura 9. Corte longitudinal de ovário de *Rhamdia quelen* demonstrando efeito inibitório causado pelo hormônio masculinizante 17 α -metiltestosterona (MT): áreas de reabsorção (ARA) e de reorganização (ARO) celular, presença de ovócitos atresícos (OA) e “liquefação” (L) do citoplasma dos ovócitos (a). Corte longitudinal de testículo de *R. quelen* demonstrando efeito inibitório de desenvolvimento causado pela MT: áreas em fases distintas de desenvolvimento, sendo observadas espermatogônias (EG) e espermatozoides (EZ) (b). Coloração: Hematoxilina / Eosina (HE) (a) e Ácido Periódico de Schiff + Hematoxilina Férrica + Metanil Yellow (MY) (b). Peixes com 150 dias após eclosão. Barras: 50 μm63

Figura 10. Visualização das gônadas para a classificação do sexo das progênes de *Rhamdia quelen* geradas durante o estudo. (a) Gônada feminina com estruturas pares saculiformes de coloração amarelada translúcida. (b) Gônada masculina com estruturas pares alongadas de coloração esbranquiçada. (c) Ovócitos aparentes quando aplicada a técnica do *imprint*. (d) Projeções digitiformes das gônadas masculinas quando aplicada a técnica do *imprint*. Barras: 200 μm79

Figura 11. Proporção sexual das descendências de *Rhamdia quelen* geradas no teste de progênie II, realizado com os machos provenientes das doses de MT 60 (M60), 90 (M90) e 120 mg kg⁻¹ de ração (M120). A linha contínua indica maior proporção de machos ou de fêmeas e a linha pontilhada indica menor proporção sexual ou equilíbrio pelo teste do qui-quadrado ($P < 0,05$), considerando-se a proporção esperada de 1:1.* Probabilidade do teste de heterogeneidade do qui-quadrado.....83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição da produção mundial e brasileira proveniente da aquicultura em 2012.	26
Tabela 2. Emulsão nutritiva preparada para o banho de imersão dos náuplios recém-eclodidos de <i>Artemia</i> sp. fornecidos às larvas de <i>Rhamdia quelen</i> geradas durante os testes de progênie.	46
Tabela 3. Número de machos de <i>Rhamdia quelen</i> nas diferentes fases do desenvolvimento testicular, provenientes das doses masculinizantes 0, 60, 80 e 100 mg de 17 α -metiltestosterona (MT) por kg de ração.	58
Tabela 4. Número de fêmeas de <i>Rhamdia quelen</i> , nas diferentes fases do desenvolvimento gonadal, provenientes de doses masculinizantes 0, 60, 80 e 100 mg de 17 α -metiltestosterona (MT) por kg de ração.	60
Tabela 5. Classificação das gônadas de <i>Rhamdia quelen</i> (150 dias pós-eclosão) alimentados durante 21 dias com dieta comercial suplementada com diferentes doses de 17 α -metiltestosterona (MT).	64
Tabela 6. Proporções sexuais das descendências de <i>Rhamdia quelen</i> do teste de progênie I, resultantes dos cruzamentos entre os machos fenotípicos provenientes das diferentes doses masculinizantes de 17 α -metiltestosterona (MT) e o pool de ovos provenientes de duas fêmeas do plantel de reprodutores selvagens.	81

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Esquema do procedimento normalmente utilizado para a inversão sexual direta em peixes através da aplicação de hormônios.	34
---	----

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	25
O JUNDIÁ.....	30
INVERSÃO SEXUAL EM PEIXES	32
JUSTIFICATIVA	38
OBJETIVOS	39
Objetivo Geral	39
Objetivos Específicos	39
METODOLOGIA GERAL	41
LOCAL DO ESTUDO.....	41
CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	41
MASCULINIZAÇÃO DO JUNDIÁ	42
PROCEDIMENTOS HISTOLÓGICOS	44
TESTES DE PROGÊNIE	45
ARTIGOS ELABORADOS	49
ARTIGO I	
Masculinização de <i>Rhamdia quelen</i> (Quoy & Gaimard, 1824) com 17 α -metiltestosterona administrado via oral	51
Resumo	51
Summary	52
Introdução	52
Material e Métodos	54
Considerações éticas	54
Peixes.....	54
Ensaio masculinizante.....	54
Procedimentos histológicos	55
Análise estatística	56
Resultados	56
Análise histológica das gônadas	57
Efeitos histomorfológicos da 17 α -metiltestosterona nas gônadas.....	60
Ensaio masculinizante.....	63
Discussão	65
Agradecimentos	68
Referências	68

ARTIGO II	
Neomachos do bagre Sul-Americano <i>Rhamdia quelen</i> (Quoy & Gaimard, 1824) identificados através de testes de progênie	73
Resumo	73
Abstract	74
Introdução	74
Material e Métodos	76
Material biológico.....	76
Masculinização	77
Testes de progênie	77
<i>Teste I</i>	78
<i>Teste II</i>	80
Análise estatística	80
Resultados	81
Teste I.....	81
Teste II.....	82
Discussão	83
Agradecimentos	86
Referências	86
CONCLUSÕES GERAIS	91
CONSIDERAÇÕES FINAIS	93
REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO E METODOLOGIA	
GERAL	95
ANEXO A	
Aprovação do protocolo CEUA PP00788.....	105
ANEXO B	
Menção honrosa ao resumo expandido apresentado na forma de pôster no XIX CONBEP, São Luís do Maranhão, 2015.	107
APÊNDICE A	
Registro fotográfico da desova inicial dos reprodutores selvagens de <i>Rhamdia quelen</i>	109
APÊNDICE B	
Registro fotográfico do ensaio masculinizante.	111

APÊNDICE C

Registro fotográfico da biometria final e retirada das gônadas ao término do ensaio masculinizante. 113

APÊNDICE D

Registro fotográfico dos testes de progênie..... 115

APÊNDICE E

Pôster apresentado no XIX CONBEP. 117

INTRODUÇÃO

No triênio 2008, 2009 e 2010, o Brasil apresentou um incremento de aproximadamente 40% na sua produção aquícola de origem continental. Na transição de 2009 para 2010, apesar de ter sido menor, o crescimento da produção também foi observado, registrando-se um acréscimo em torno de 17%, com a produção passando de 337.353 t em 2009 para 394.340 t no ano seguinte (MPA, 2012). Dados recentes da FAO indicaram que houve uma retomada de 55% no crescimento de 2010 até 2012, quando foram produzidas 611.343 t deste tipo de pescado no país (FAO, 2014).

Este aumento da produção pode ser atribuído ao desenvolvimento do setor, que por sua vez, esteve atrelado à ampliação de políticas públicas que facilitaram o acesso aos programas governamentais existentes para o crescimento da atividade.

Entre essas políticas encontra-se o estímulo à piscicultura de água doce em tanques-rede, que vinha sendo progressivamente incentivado pelo extinto, em 2015, Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA) por meio de ações específicas de fomento à atividade e pelas demarcações de parques aquícolas nos corpos d'água de domínio da União, conforme o Decreto nº 4.895/2003, regulamentado pela Instrução Normativa Interministerial (INI) nº 06/2004.

Considerando-se que o Brasil apresenta enorme potencial hídrico para desenvolver a criação de peixes de água doce em tanques-rede, visto que seu território apresenta mais de cinco milhões de hectares de lâmina d'água distribuídos entre lagos naturais e lagos artificiais, formados pelos reservatórios de usinas hidrelétricas (AYROZA *et al.*, 2006), até o ano de 2009, 42 parques aquícolas foram demarcados em seis reservatórios brasileiros: Furnas (MG), Três Marias (MG), Ilha Solteira (SP/MS), Tucuruí (PA), Castanhão (CE) e Itaipu Binacional (Brasil/Paraguai).

Estes parques aquícolas, em conjunto, somam uma lâmina d'água de 28.500 hectares, apresentando uma capacidade de produção outorgada pela Agência Nacional de Águas (ANA) de aproximadamente 269.000 t de peixes por ano (MPA, 2009), representando mais de 70% da produção brasileira registrada no ano de 2010. Até o fim de 2016 existe a previsão de que estarão concluídos os estudos para demarcação de parques aquícolas em outros 31 reservatórios, cuja capacidade de produção conjunta está estimada em 800.000 t anuais (MPA, 2014).

Ainda que a piscicultura de águas interiores tenha representado 86,4% da produção aquícola nacional em 2012, a sua participação na produção mundial foi inferior a 2,0% (Tabela 1), neste setor que representou 57,9% da aquicultura mundial, gerando receitas aproximadas de US\$ 65 bilhões (FAO, 2014).

As espécies não nativas *Oreochromis niloticus* e *Cyprinus carpio* são as mais cultivadas no território brasileiro por apresentarem algumas vantagens competitivas de produção em relação às espécies nativas. Entretanto, as vantagens que influenciam essa escolha não estão somente atreladas à rusticidade que caracteriza tais espécies, mas à abundância de informações existentes na literatura sobre suas principais características zootécnicas (OSTRENSKY *et al.*, 2008).

Os estados brasileiros que mais produzem peixes em água doce atualmente são Rondônia, Mato Grosso, Paraná, Ceará, Santa Catarina e São Paulo, com destaque para o estado de Rondônia, que em 2014 produziu aproximadamente 75.000 t baseadas em espécies nativas, principalmente *Colossoma macropomum* e *Arapaima gigas* (IBGE/SIDRA, 2015).

Tabela 1. Composição da produção mundial e brasileira proveniente da aquicultura em 2012.

Aquicultura	Produção mundial		Produção brasileira		Participação brasileira na produção mundial
	Toneladas	(%)	Toneladas	(%)	
<i>Piscicultura água interiores</i>	38.599.250	57,9	611.343	86,4	1,6%
<i>Piscicultura marinha</i>	5.551.905	8,3	--	--	--
<i>Crustáceos</i>	6.446.818	9,7	74.415	10,5	1,2%
<i>Moluscos</i>	15.170.738	22,8	20.699	2,9	0,1%
<i>Outras espécies</i>	864.542	1,3	1.005	0,1	0,1%
TOTAL	66.633.253		707.462		1,1%

Fonte: FAO (2014).

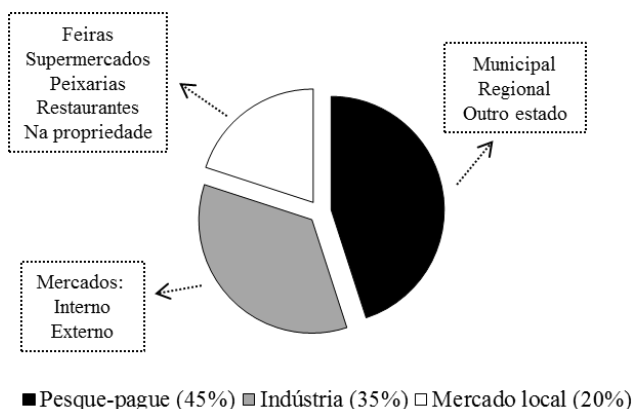
No estado de Santa Catarina existem 26.493 produtores rurais, para os quais a piscicultura é uma das fontes de renda, e 3.433 piscicultores que se sustentam exclusivamente da atividade. Em 2014 o estado produziu 40.324 t de peixes dulcícolas, sendo 61% provenientes dos piscicultores, movimentando receitas que giraram em torno de R\$ 180 milhões (EPAGRI/CEDAP, 2015). Os principais destinos dessa produção praticada no estado catarinense são os pesque-pague, as indústrias e o mercado local (Figura 1).

Apesar das receitas geradas, os grupos de peixes mais cultivados no estado catarinense, as carpas e as tilápias, apresentam baixo valor comercial quando comparadas com as espécies nobres, nativas, capturadas na natureza e comercializadas nos mercados locais.

Mesmo com a elevada produção, as baixas temperaturas do inverno, principalmente nas regiões mais altas do estado catarinense, limita o cultivo de algumas espécies, como as variedades de *Oreochromis niloticus*, que acabam sendo cultivadas em outros locais do estado com temperaturas mais elevadas.

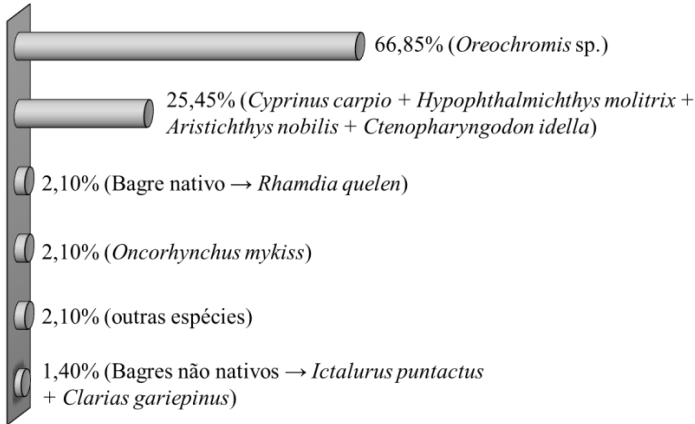
Quando o número de ciclos de produção de peixes em Santa Catarina é comparado ao de outras regiões mais quentes do Brasil, verifica-se que naquelas regiões são produzidos dois ou mais ciclos por ano, enquanto em Santa Catarina normalmente é possível realizar somente um (EPAGRI/CEDAP, 2015). Ainda assim, no estado catarinense são cultivadas variadas espécies de peixes (Figura 2).

Figura 1. Destino final da produção piscícola dulcícola oriunda do estado de Santa Catarina.



Fonte: EPAGRI/CEDAP (2015).

Figura 2. Espécies de peixes cultivadas em água doce no estado de Santa Catarina em 2014, totalizando 40.324 t produzidas. Outras espécies: *Hypostomus* sp., *Prochilodus* sp., *Astyanax* sp., *Micropterus salmoides*, *Geophagus* sp., *Leporinus* sp., *Acestrorhamphus* sp., *Piaractus mesopotamicus*, *Colossoma macropomum*, tambacu (*Colossoma* sp. ♀ x *Piaractus* sp. ♂), *Hoplias malabaricus*.



Fonte: EPAGRI/CEDAP (2015).

Em função da importância da piscicultura na região Sul do Brasil e do crescente número de usinas hidroelétricas que nela estão em operação ou em planejamento, a produção de peixes em tanques-rede em reservatórios também tem despertado o interesse do setor aquícola catarinense, por ser uma alternativa aos sistemas tradicionais e pela produtividade mais elevada que apresenta.

As barragens das usinas hidroelétricas transformam um ambiente impróprio para a criação de peixes em tanques-rede em um ambiente com boas características para a atividade, uma vez que certas regiões, que antes apresentavam corredeiras e variação de nível entre as épocas secas e de cheias, foram transformadas em ambientes totalmente diferentes, ou seja, transformaram-se em lagos imensos de águas calmas e profundas, passíveis de serem aproveitados para a criação de peixes em tanques-rede.

Embora o Brasil apresente a maior diversidade ictiofaunística do mundo, aproximadamente 90% da cadeia produtiva nacional de piscicultura de água doce é composta por espécies não nativas de seu continente. A produção destas espécies pode trazer problemas ambientais irreversíveis, uma vez que a introdução, acidental ou não, de espécies não nativas de peixes produz alterações nos ecossistemas que as recebem, por criar novos tipos de interações populacionais em relação à predação, competição, herbivoria, parasitismo e mutualismo (FULLER *et al.*, 1999).

Estudos indicam que os efeitos originados com a introdução de espécies não nativas são variados, podendo inclusive levar ao desaparecimento das espécies nativas de peixes (BØHN *et al.*, 2008; PELICICE e AGOSTINHO, 2008). Portanto, como invariavelmente ocorrem escapes na criação de peixes, criar espécies não nativas representa uma grande ameaça aos estoques nativos (AGOSTINHO *et al.*, 1999).

Com o intuito de contribuir para a mudança deste cenário, e considerando-se que as espécies nativas se adaptam melhor às condições climáticas e ambientais do Sul do Brasil, o grupo de pesquisadores do Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce (LAPAD) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) desenvolvem estudos para avaliar o potencial zootécnico de algumas destas espécies da região hidrográfica do rio Uruguai e o possível impacto no ambiente quando cultivadas em tanques-rede (ZANIBONI-FILHO *et al.*, 2005; BROL, 2006; BEUX *et al.*, 2008; ALMEIDA e NUÑER, 2009; NUNES, 2009; CAVALCANTE, 2010; BEZ, 2011; COSTA, 2012).

Dentre as espécies testadas, se encontra o jundiá, *Rhamdia quelen*, que apresenta características interessantes para o cultivo na região Sul, como por exemplo, facilidade na obtenção das larvas através da reprodução induzida, por consumir ração comercial desde as fases iniciais, por tolerar temperaturas mais baixas durante o cultivo e pela boa aceitação nos mercados locais.

Além disso, desde 2007 o cultivo de *R. quelen* começou a figurar, em termos de importância de produção, no cenário da atividade aquícola dulcícola do estado de Santa Catarina, contando com um grande suporte técnico por parte da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI).

O JUNDIÁ

O jundiá *Rhamdia quelen* (Heptapteridae, Siluriformes) é uma espécie nativa gonocorística com distribuição na região Neotropical, sendo encontrada desde a região central da Argentina até a parte sul do México, que apresenta hábito bentônico e realiza migração lateral, habitando lagos, reservatórios e rios (GOMES *et al.*, 2000; ZANIBONI-FILHO e SHULZ, 2003; SCHULZ e LEUCHTENBERGER, 2006).

Esta espécie vem sendo cultivada pelos piscicultores do Sul do Brasil pela sua resistência ao manejo, facilidade na reprodução induzida e larvicultura, crescimento acelerado, inclusive nos meses mais frios, boa eficiência alimentar e carne saborosa (CARNEIRO *et al.*, 2002; FRACALOSSO *et al.*, 2002; 2004; AMARAL-JUNIOR, 2013). Adicionalmente, Silveira *et al.* (2013) verificaram que *R. quelen* apresenta estômago funcional antes mesmo de consumir completamente suas reservas vitelínicas, o que possibilita alimentá-lo desde as fases iniciais com dietas fabricadas.

No ambiente natural o período reprodutivo do *R. quelen* pode variar a cada ano, assim como de um local para outro (GOMES *et al.*, 2000). No entanto, a literatura mostra que o seu período reprodutivo é longo, ocorrendo principalmente entre a primavera e o outono, com menor atividade reprodutiva nos meses mais frios, durante o inverno. Além disso, o jundiá apresenta desenvolvimento assíncrono dos ovócitos, característica das espécies que apresentam desova parcelada, ou seja, os óvulos amadurecem em lotes e são eliminados em intervalos regulares, durante todo o ano ou parte do mesmo (NARAHA *et al.*, 1985; CASSINI, 1998; WOEHL, 2001; GHIRALDELLI *et al.*, 2007).

Em condições artificiais o crescimento larval inicial do *R. quelen* é acentuado, atingindo 5 cm em trinta dias (GOMES *et al.*, 2000). As larvas e juvenis demonstram certa aversão aos ambientes claros, apresentando melhor desenvolvimento em ambientes mais escuros (PIAIA *et al.*, 1999). O melhor desempenho das larvas de *R. quelen* ocorre com pH entre 8,0 e 8,5 (LOPES *et al.*, 2001) e dureza entre 30 e 70 mg/L CaCO₃ (TOWNSEND *et al.*, 2003), embora apresente sobrevivência semelhante quando expostas por 96 horas em pH entre 4,0 e 9,5 e dureza até 600 mg/L CaCO₃ (TOWNSEND *et al.*, 2001).

No ano de 2000, começou a despontar a produção de *R. quelen* no Brasil, com 2.546 t produzidas (BORGHETTI *et al.*, 2003). Naquele ano Barcellos *et al.* (2004) realizaram estudo para desenvolver tecnologia de cultivo intensivo de *R. quelen* em tanques-rede e obtiveram resultados interessantes e promissores, com crescimento de 600 a 800 g em apenas oito meses de cultivo. Além disso, Souza *et al.* (2005) verificaram que esta espécie apresentou melhor desempenho produtivo durante os períodos de outono e inverno no extremo sul do Rio Grande do Sul, quando comparada com o Siluriformes não nativo *Ictalurus punctatus*.

A importância atribuída ao seu cultivo nos últimos anos resultou, em 2011, na criação de uma rede de pesquisa composta por instituições do sul do Brasil, denominada de “Rede Jundiá”, com o objetivo de gerar conhecimentos e tecnologia para o cultivo (AMARAL-JUNIOR, 2013). Desta forma, e também por ser uma espécie que se adaptou muito bem às condições ambientais de cultivo (BARCELLOS *et al.*, 2001), nos últimos anos tem sido registrado um aumento constante da sua produção na região sul brasileira (SILVEIRA *et al.*, 2014).

O cultivo de *R. quelen* começou a apresentar importância na produção aquícola dulcícola catarinense em 2007, justamente com o avanço das técnicas de cultivo aplicadas (EPAGRI/CEDAP, 2012). Em 2012 foram produzidos 644.739 kg de *R. quelen* no estado (EPAGRI/CEDAP, 2013). No ano de 2014 a produção saltou para 846.804 kg, superando a soma da produção obtida com os outros dois bagres não nativos cultivados em Santa Catarina, *Ictalurus punctatus* (462.920 kg) e *Clarias gariepinus* (101.616 kg) (EPAGRI/CEDAP, 2015).

Apesar de atualmente existir uma ampla gama de estudos para desenvolver o cultivo do *R. quelen*, alguns entraves ainda não foram superados, com destaque para a maturação mais precoce por parte dos machos e o crescimento heterogêneo durante a engorda (FRACALOSSO *et al.*, 2002). Quando em cativeiro, os machos apresentam um menor ganho em peso comparado ao das fêmeas, sendo que ambos os sexos desviam energia metabólica para a produção de gametas durante o ciclo de produção (FRACALOSSO *et al.*, 2004).

Durante o cultivo as fêmeas crescem até 30% a mais do que os machos em menos de um ano (BALDISSEROTTO e RADÜNZ, 2004). Nos primeiros meses de criação ambos os sexos apresentam taxas de crescimento similares, mas com o passar do tempo o crescimento das fêmeas se destaca devido à maturação mais precoce por parte dos machos (FRACALOSSO *et al.*, 2002; GHIRALDELLI *et al.*, 2007). Já os exemplares selvagens masculinos de *R. quelen*, na natureza, apresentam crescimento superior ao das fêmeas até o primeiro ou segundo ano de vida, quando a situação se inverte e as fêmeas passam a crescer mais (GOMES *et al.*, 2000).

Na piscicultura comercial, quando se pretende eliminar os efeitos adversos do crescimento heterogêneo entre os sexos, aplicam-se técnicas de inversão sexual para a realização de cultivo monosexo. Esta condição é altamente desejada principalmente devido a diferenças no desempenho de crescimento entre machos e fêmeas, ou pela reprodução indesejada durante o ciclo de produção (DUNHAN, 2004).

As vantagens do cultivo monosexo são variadas e de acordo com as características de cada espécie, pois além de permitir cultivar apenas um determinado sexo, pode influir na uniformidade de tamanho da despesca, na redução dos efeitos da maturação sexual e na qualidade da carne (BEARDMORE *et al.*, 2001).

INVERSÃO SEXUAL EM PEIXES

Com relação ao sexo, os peixes podem ser classificados como gonocóricos, nos quais os sexos ocorrem individualmente de forma separada, hermafroditas, quando ambos os sexos estão presentes no mesmo indivíduo ou unissexuados, nos quais ocorre apenas um sexo, feminino ou masculino (YAMAMOTO, 1969).

As espécies gonocóricas são divididas em indiferenciadas, quando a gônada primordial desenvolve assemelhando-se a um ovário e depois parte dos indivíduos torna-se macho e outra parte fêmea, ou diferenciadas, quando a gônada diferencia-se em testículo ou ovário.

O hermafroditismo é dividido em sincrônico, quando os ovos e os espermatozoides maturam ao mesmo tempo, protogínico, quando desenvolvem inicialmente um ovário e depois há inversão para testículo, e protandrômico quando desenvolvem inicialmente um testículo e depois há inversão para ovário.

Nos unissexuais a reprodução natural ocorre por ginogênese, onde o espermatozoide contribui apenas para ativar o desenvolvimento do ovócito, sem ocorrer singamia (YAMAZAKI, 1983).

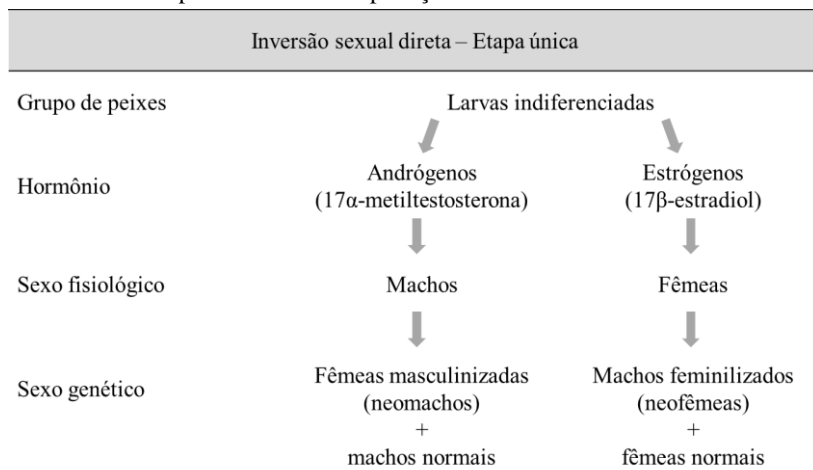
De acordo com Piferrer (2001), o sexo genético em peixes é definido no momento da fertilização pela combinação dos genes, provenientes do ovócito e do espermatozoide, envolvidos na determinação sexual. Esses genes podem estar espalhados pelo genoma ou concentrados em um par de cromossomos, os denominados cromossomos sexuais, fazendo com que a determinação sexual em peixes possa ser cromossômica, poligênica e/ou pela interação genótipo-ambiente.

Com base em análises citogenéticas, aplicação de técnicas de inversão sexual e cruzamentos controlados, alguns sistemas cromossômicos já foram descritos, variando desde mecanismos ♀/♂ simples, como os modelos XX/XY (fêmeas homogaméticas) ou ZW/ZZ (machos homogaméticos), até os complexos, que envolvem mais do que um par de cromossomos sexuais ou diferentes números de cromossomos, dependendo da espécie (PIFERRER, 2001).

Por outro lado, o controle do sexo fisiológico em peixes é possível pelo fato da diferenciação fenotípica do sexo ser mais tardia, enquanto o sexo genético é determinado no momento da fecundação. Na fase inicial da embriogênese o embrião de peixe não é macho e nem fêmea, pois não apresenta ovário, testículo ou qualquer característica associada ao sistema reprodutor. No entanto, o embrião apresenta precursores embriológicos de ovário e de testículo, as chamadas células germinativas primordiais e, neste estágio do desenvolvimento, o embrião pode se desenvolver em macho ou em fêmea (TOLEDO-FILHO *et al.*, 1996).

Então, em um determinado momento do desenvolvimento, específico para cada espécie, no qual as larvas estão indiferenciadas quanto ao sexo, um sinal químico originado de um gene ou de um conjunto de genes é enviado para as células germinativas primordiais informando à direção que elas devem se desenvolver. Desta forma, no espaço de tempo que antecede o envio deste sinal químico, o sexo fisiológico pode ser alterado se o animal ingerir ou absorver esteroides anabolizantes que direcionem a expressão das células germinativas primordiais (Quadro 1).

Quadro 1. Esquema do procedimento normalmente utilizado para a inversão sexual direta em peixes através da aplicação de hormônios.



Fonte: Adaptado de Toledo-Filho *et al.* (1996).

Apesar de ser espécie-específico, a diferenciação do sexo fenotípico em peixes geralmente inicia após o período final de absorção do saco vitelínico e do início da alimentação exógena. Diferentes hormônios naturais ou sintéticos têm sido utilizados na inversão sexual de peixes, sendo que o mais utilizado entre os andrógenos é a 17 α -metiltestosterona e entre os estrógenos o 17 β -estradiol (TOLEDO-FILHO *et al.*, 1996).

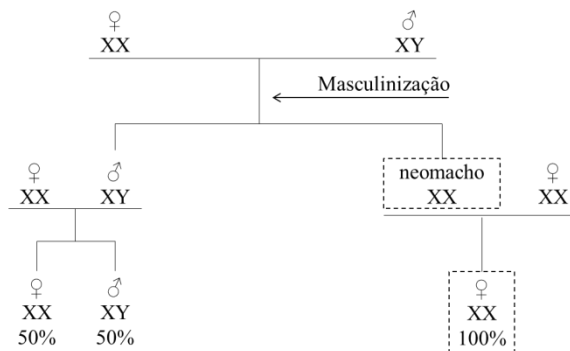
A inversão sexual pode ser induzida de forma direta, seja pela temperatura (BAROILLER *et al.*, 1999) ou pela administração de hormônios via suplementação dietética, banho de imersão, injeção ou por implantes (PANDIAN, 2013), sendo a realizada com esteroides a mais utilizada para a aplicação do método direto de inversão.

Por outro lado, a inversão sexual pode ser realizada de forma indireta, combinando aplicações de esteroides juntamente com estratégias de cruzamentos no plantel de reprodutores. Este método indireto tem sido aplicado na produção comercial de *Oreochromis niloticus* (CALHOUN e SHELTON, 1983) e de salmonídeos (FEIST *et al.*, 1995; HUNTER *et al.*, 1983; PIFERRER e DONALDSON, 1989), evitando a aplicação de hormônios nos peixes destinados ao consumo humano.

A aplicação da técnica de inversão sexual indireta, para a obtenção de lotes monosexo femininos, consiste inicialmente na masculinização de fêmeas genotípicas com hormônio androgênico, originando os chamados neomachos, e posterior fertilização dos ovócitos de fêmeas normais (fêmeas fenotípicas e genotípicas) com o sêmen de neomachos, o que produziria teoricamente progênie com 100% de fêmeas fenotípicas e genotípicas, uma vez que os neomachos seriam fenotipicamente machos, porém genotipicamente seriam fêmeas (Figura 3).

A obtenção de progênie feminina utilizando reprodutores neomachos depende dos mecanismos de determinação sexual. Considerando os sistemas clássicos de determinação sexual, fêmeas homogaméticas em relação ao cromossomo sexual (modelo: fêmeas XX e machos XY) produzem teoricamente 100% de fêmeas ao cruzarem com neomachos (fêmeas XX masculinizadas) (GOMELSKY, 2003; KAVUMPURATH e PANDIAN, 1994).

Figura 3. Esquema da técnica de inversão sexual indireta para a obtenção de lote monosexo feminino de peixes com reprodutor neomacho XX.

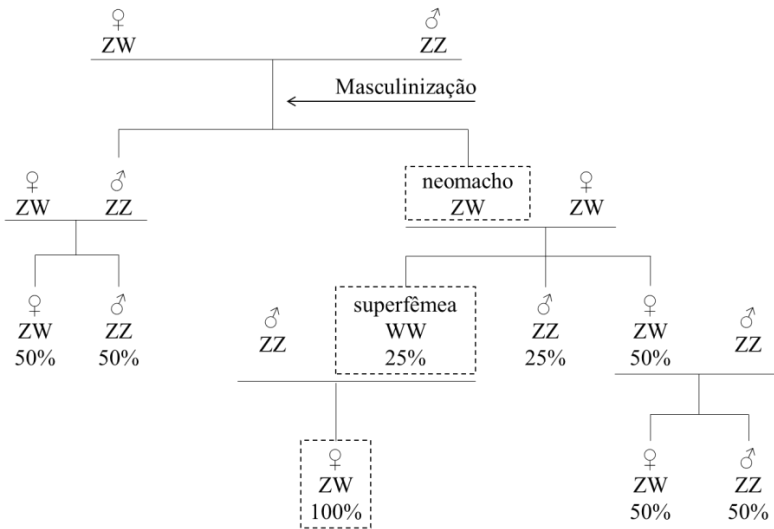


Fonte: Adaptado de Toledo-Filho *et al.* (1996).

Por outro lado, se as fêmeas forem heterogaméticas em relação ao cromossomo sexual (modelo: fêmeas ZW e machos ZZ), a obtenção de descendência 100% feminina será alcançada pelo método indireto de inversão, através da realização de uma etapa complementar de testes de progênie para identificação das superfêmeas WW. Neste caso o reprodutor neomacho ZW gera 75% de fêmeas, das quais 25% são superfêmeas WW, e 25% de machos ZZ na sua descendência, existindo, portanto a necessidade da realização de dois testes de progênie para encontrar e separar o reprodutor desejado (Figura 4) (TOLEDO-FILHO *et al.*, 1996).

Porém, existem espécies que na determinação do sexo, além dos cromossomos sexuais, apresentam a participação de genes autossômicos influenciados por outros fatores (genéticos ou ambientais), tornando teórica a obtenção de descendência 100% feminina através de reprodutores neomachos ou superfêmeas (KIRANKUMAR e PANDIAN, 2002; DEVLIN e NAGAHAMA, 2002; DESPREZ *et al.*, 2006).

Figura 4. Esquema da obtenção de descendência feminina com reprodutor superfêmea WW através da inversão sexual indireta.



Fonte: Adaptado de Foresti e Foresti (2004).

Para a primeira etapa do método indireto de inversão sexual normalmente é utilizado o hormônio 17α -metilttestosterona (MT) para a masculinização das fêmeas (PANDIAN e SHEELA, 1995). A MT é um produto sintético, disponível comercialmente, utilizado na medicina para suprir a deficiência de testosterona e o tratamento da andropausa nos homens (BEJMA *et al.*, 2005). Considerado um desregulador endócrino em peixes, a MT incrementa as concentrações de vitelogenina e a intersexualidade gonadal, podendo causar efeitos androgênicos ou efeitos estrogênicos (efeito paradoxal) em algumas espécies (ZERULLA *et al.*, 2002; MOENS *et al.*, 2006).

Existe uma preocupação recente com o uso da MT incorporado na ração para piscicultura, devido ao possível impacto no meio ambiente causado por este hormônio (HOMKLIN *et al.*, 2011). O cuidado é válido, pois a MT pode ser a causa de formação de tumores, sendo que já foi provada a sua influência na indução de tumores benignos em fígado de humanos (SOE *et al.*, 1992). Entretanto, como o processamento é mais lento no organismo do peixe, a eficácia da MT se torna muito maior, produzindo melhores resultados de inversão sexual (DONALDSON *et al.*, 1979).

Para *R. quelen*, não existem informações sobre a presença de cromossomos sexuais ou o tipo de sistema de determinação do sexo. Contudo, a inversão sexual e os testes de progênie são normalmente utilizados no entendimento dos mecanismos de determinação do sexo em peixes (CLEMENS e INSLEE, 1968; HUNTER e DONALDSON, 1983), auxiliando inclusive na detecção dos efeitos genéticos autossômicos em espécies com cromossomos sexuais definidos (CAMPOS-RAMOS *et al.*, 2003).

Como as larvas de *R. quelen* conseguem digerir dietas fabricadas antes mesmo de consumirem o vitelo (SILVEIRA *et al.*, 2013), a inversão sexual por via oral pode ser considerada viável para a espécie. Amaral *et al.* (2008) estudaram a inversão sexual de *R. quelen* utilizando o método direto de feminilização através da administração de 17β -estradiol incorporado nas dietas fornecidas para as larvas durante 21 dias, obtendo 79% de fêmeas na dose de 100 mg/kg de ração.

Além disso, apesar da temperatura da água ser um dos principais fatores que podem influenciar no processo de diferenciação sexual fisiológica em peixes (NAKAMURA *et al.*, 1998; OSPINA-ALVAREZ e PIFERRER, 2008), diferentes temperaturas (19, 25 e 30°C) de fertilização e incubação dos ovos (LONGO e NUÑER, 2010), assim como diferentes temperaturas (19, 24 e 29°C) durante a fase inicial de desenvolvimento (SULIS-COSTA *et al.*, 2013), não alteraram a proporção sexual do *R. quelen*. Desta forma, a inversão sexual indireta pode ser uma alternativa interessante para a obtenção de descendências femininas livres de hormônio para o cultivo de *R. quelen*.

JUSTIFICATIVA

Rhamdia quelen apresenta maturação precoce e crescimento heterogêneo durante a engorda, sendo que quando cultivados os machos apresentam menor crescimento, em comparação ao das fêmeas. Este menor crescimento dos machos possivelmente está atrelado à sua maturação sexual mais precoce.

Como existe um custo de produção associado ao fornecimento de ração, esta característica é altamente indesejável num cultivo em que a espécie atinge a maturidade gonadal antes do tamanho comercial, pois ocorre um desvio de proteína e energia da dieta consumida para a produção dos gametas em prejuízo do crescimento corporal.

Uma alternativa disponível para contornar esta situação seria a aplicação da técnica de inversão sexual para cultivar apenas fêmeas de *R. quelen*, com o intuito de aproveitar o maior crescimento das fêmeas, além de obter animais com tamanho mais homogêneo na despesca.

A inversão sexual é realizada comumente através da aplicação de hormônios diretamente na progênie que irá compor o cultivo. Porém, o uso de hormônios para a inversão é uma questão polêmica, uma vez que existem controvérsias sobre suas vantagens e sobre os efeitos adversos para os peixes, para os consumidores e para o meio ambiente, sendo que em muitos países da Europa esta prática é proibida (EL-SAYED, 2006).

Por outro lado, existe a possibilidade de se realizar a inversão sexual de forma indireta, combinando a manipulação de esteroides com estratégias reprodutivas apenas no plantel de reprodutores. Ou seja, as descendências geradas por estes reprodutores manipulados serão livres da adição exógena de hormônios.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Aplicar a técnica de inversão sexual indireta em *Rhamdia quelen* para a obtenção de descendências femininas livres da adição exógena de hormônio através de reprodutores neomachos.

Objetivos Específicos

- Masculinizar fêmeas genóticas de *R. quelen* através de dieta suplementada com 17α -metiltestosterona (MT);
- Avaliar os efeitos da MT na diferenciação gonadal do *R. quelen*;
- Identificar neomachos de *R. quelen* através de testes de progênie.

METODOLOGIA GERAL

LOCAL DO ESTUDO

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce (LAPAD) do Departamento de Aquicultura (AQI) do Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), localizado no sul da ilha, em Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

O LAPAD apresenta três sistemas independentes de recirculação de água, com capacidade aproximada de 20 m³ cada. Estes sistemas possuem filtros mecânicos e biológicos, além de trocadores de calor para a manutenção da temperatura e compressores de ar para suprir a demanda de oxigênio. Estrategicamente, conta com um grupo gerador a diesel para garantir o funcionamento normal em casos de falta de energia elétrica.

CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

A partir do ano 2000, a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC iniciou suas atividades para cumprir e fazer cumprir, o disposto na legislação aplicável à criação e/ou utilização de animais no ensino e na pesquisa, caracterizando sua atuação como educativa, consultiva, de assessoria e de fiscalização.

Atualmente a CEUA é composta por:

- Quinze membros representantes dos Centros de Ensino e Pesquisa da UFSC que utilizam animais, incluindo o CCA;
- Um representante do campus de Araranguá,
- Dois médicos veterinários, um representando a UFSC e outro o Conselho Regional de Medicina Veterinária;
- Um representante da direção do Biotério Central da UFSC;
- Um representante da Associação Catarinense de Proteção aos Animais (ACAPRA).

Todos os procedimentos experimentais adotados durante o desenvolvimento desta tese seguiram o protocolo (PP00788 - Anexo A) aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSC.

MASCULINIZAÇÃO DO JUNDIÁ

Para a geração das larvas, utilizadas na primeira etapa de masculinização, foram utilizados reprodutores selvagens de *Rhamdia quelen* capturados na região hidrográfica do alto rio Uruguai, que compõem o plantel de reprodutores do LAPAD. Um espécime testemunho da espécie está depositado no Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina (MZUEL 10549).

Utilizando-se os critérios de maturação das gônadas descritos por Woynarovich e Horvath (1980), foram selecionados machos e fêmeas para serem induzidos à maturação final e desova através da aplicação de extrato pituitário de carpa (EPC). As fêmeas receberam duas doses de EPC (0,5 mg/kg e 5,0 mg/kg), em intervalo de 12 horas, e os machos receberam apenas uma dose (4,0 mg/kg.) no momento da segunda dose aplicada nas fêmeas.

A coleta dos gametas ocorreu 215 horas-grau após a aplicação da segunda dose, com a temperatura da água próxima aos 25°C. Os óvulos e espermatozoides foram recolhidos separadamente e um “pool” do sêmen de dois machos foi adicionado a um “pool” de óvulos de duas fêmeas. Após a fertilização os ovos foram transferidos para incubadoras cilindro-cônicas de 60 L abastecidas por um sistema controlado de recirculação de água com temperatura em torno de 25°C.

Com 2 dias após a eclosão as larvas de *R. quelen*, no início da alimentação exógena, foram distribuídas aleatoriamente em tanques circulares contendo 60 L de água na densidade de 6 larvas/L.

Durante 21 dias, grupos de larvas foram alimentados separadamente cinco vezes ao dia com dieta artificial suplementada com diferentes doses de 17 α -metiltestosterona (MT). A incorporação de MT foi realizada pelo método da evaporação de álcool etílico (SHELTON *et al.*, 1981) em ração comercial contendo 55% de proteína bruta (GUABI Pirá alevinos 55[®]). As alimentações preparadas com cada dose de MT foram peneiradas (0-250, 250-650 e 650-850 μ m), embaladas individualmente, refrigeradas até o momento de serem oferecidas e fornecidas na primeira (0-250 μ m), segunda (250-650 μ m) e terceira semana (650-850 μ m).

Num primeiro teste de masculinização foram utilizadas as doses de 60, 90 ou 120 mg de MT por kg de ração. Entretanto uma alta mortalidade ocorreu devido a uma severa infestação do ectoparasita *Ichthyophthirius multifiliis*. Como o evento de mortalidade ocorreu aos 65 dias após a eclosão, ou seja, após o tratamento masculinizante, os exemplares sobreviventes foram mantidos separados de acordo com cada dose de MT para a identificação dos neomachos através de testes de progênie.

Um novo teste de masculinização foi conduzido, utilizando doses de 60, 80 ou 100 mg de MT por kg de ração. Este teste não apresentou problemas por mortalidades e foi utilizado na avaliação dos efeitos do hormônio na diferenciação gonadal, assim como para a identificação das fêmeas masculinizadas (neomachos) através das técnicas histológicas de rotina.

Após o período de tratamento masculinizante, o volume de água dos tanques foi aumentado para 100 L, nos quais os peixes permaneceram por cinco meses, até atingirem o tamanho necessário para a retirada das gônadas e realização da sexagem.

Para os testes de progênie, os peixes (futuros reprodutores) foram estocados em tanques circulares de 800 L para favorecer o crescimento e a maturação sexual dos machos fenotípicos. Os grupos de peixes provenientes de cada dose de MT foram mantidos em tanques separados ou foram marcados com marcas do tipo PIT-tags (marcas com transponder passivo integrado, do inglês *Passive Integrated Transponder*).

Os principais parâmetros de qualidade de água (temperatura, oxigênio dissolvido, pH, salinidade e condutividade elétrica) foram monitorados diariamente durante os cultivos, com o auxílio de uma sonda multi-parâmetros (YSI Professional Plus, Yellow Springs, OH, USA) e a amônia tóxica, o nitrito, a alcalinidade total e a dureza total foram quantificados a cada cinco dias através de um foto-colorímetro (Alfakit AT 10P).

A análise estatística aplicada aos resultados obtidos será descrita com detalhes e discutida nos dois artigos originados durante o desenvolvimento da tese.

PROCEDIMENTOS HISTOLÓGICOS

Para a avaliação dos efeitos do hormônio na diferenciação gonadal, amostras do terço médio de ovários e testículos foram submetidas à avaliação microscópica, utilizando-se as técnicas histológicas de rotina: inclusão em parafina ou resina, cortes (5,0-7,0 μm), coloração com Hematoxilina-Eosina ou Ácido Periódico de Schiff + Hematoxilina Férrica + Metanil Yellow e montagem das lâminas.

Para isso, os peixes foram eutanasiados com eugenol (60 ppm) e deles foram retiradas as gônadas por meio de incisão ventral, que foram prontamente fixadas em solução de Karnovsky (Paraformol 2,0%; Glutaraldeído 2,0% e Tampão Fosfato 0,1 M; pH 7,4).

Após a fixação com a solução de Karnovsky os tecidos foram desidratados para que a inclusão fosse realizada em parafina. A desidratação ocorreu através de imersão em baterias de soluções alcoólicas com concentrações graduais e crescentes. A inclusão em parafina foi precedida pelo uso de xilol, que é miscível tanto em álcool quanto em parafina. Após a remoção do álcool, o tecido passou por uma infiltração de parafina líquida mantida em ponto de fusão (56°C) e posteriormente foi transferido para o molde contendo ainda parafina líquida. Em pouco tempo a parafina endureceu e obteve-se o bloco de parafina contendo a amostra do tecido gonadal em seu interior.

Os blocos de parafina seguiram para a etapa da microtomia, onde secções de 5,0 μm foram obtidas em lâminas de vidro. Como o tecido estava incluído em parafina, após a microtomia o tecido foi tratado novamente com xilol, para a remoção completa da parafina, e reidratado, para então ser submetido à coloração.

A coloração foi feita com a utilização de corantes ácido (hematoxilina) e básico (eosina). A hematoxilina cora as estruturas em azul, reagindo com componentes catiônicos das células e tecidos, que incluem o citoplasma, os filamentos citoplasmáticos e as fibras extracelulares. A eosina cora as estruturas em vermelho ou rosa, reagindo com os componentes aniônicos das células e tecidos, incluindo os grupos fosfatos, ácidos nucleicos, grupos sulfatos de glicosaminoglicanas e grupos carboxila das proteínas.

Após a coloração, as lâminas foram montadas, sendo que as amostras das gônadas foram protegidas com lamínulas de vidro como cobertura, as quais foram coladas na lâmina com o selante Entellan.

Todo o procedimento após a fixação das gônadas em solução Karnovsky (realizada no LAPAD), foi desenvolvido no Laboratório de Malacologia Experimental (LAMEX) do Departamento de Aquicultura do Centro de Ciências Agrárias da UFSC.

A avaliação microscópica das gônadas foi realizada no próprio LAPAD, em microscópio de luz (Leica[®] DM 3000 LED) com câmera acoplada (Leica[®] ICC50 HD).

Como algumas lâminas geraram dúvidas quanto à classificação, buscou-se o apoio da Prof^ª Dr^ª Irani Quagio-Grassiotto, coordenadora do Laboratório de Imunocitoquímica da Reprodução do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Campus de Botucatu/SP), que juntamente com a Dr^ª Talita Sarah Mazzoni, garantiu a classificação correta das gônadas. Entretanto, foi necessária a desmontagem do bloco de parafina para uma nova inclusão em resina sintética para possibilitar cortes mais finos. Neste caso, a coloração das lâminas foi realizada com Ácido Periódico de Schiff + Hematoxilina Férrica + Metanil Yellow.

A escala de diferenciação gonadal, bem como a classificação de inversão sexual, será descrita com detalhes no primeiro artigo científico elaborado para esta tese.

TESTES DE PROGÊNIE

Para a realização dos testes de progênie foram selecionados machos fenotípicos com oito meses de idade em cada grupo de *R. quelen* previamente submetidos à masculinização por ingestão de ração contendo as diferentes doses de MT. A aptidão dos machos à reprodução foi verificada de forma visual através da liberação do sêmen com uma leve pressão no abdômen e testes de motilidade espermática.

Os machos selecionados de cada dose masculinizante de MT foram marcados individualmente com PIT-tags para posterior cruzamento com fêmeas selecionadas no plantel de reprodutores selvagens do LAPAD, seguindo a metodologia de reprodução induzida descrita por Woynarovich e Horváth (1980).

Os lotes de larvas (2 DAE) gerados a partir dos diferentes cruzamentos foram distribuídos aleatoriamente, com densidade de 6 larvas/L, em tanques circulares contendo 60 L de água. Durante 15 dias a alimentação foi realizada exclusivamente com náuplios de *Artemia* sp., previamente submetidos à um banho de imersão por 30 minutos em solução enriquecida com o objetivo de fortalecer nutricionalmente as larvas. Os ingredientes e as quantidades da solução enriquecedora foram adaptados de acordo com Dias *et al.* (2011) e Cardoso *et al.* (2004) (Tabela 2).

Os náuplios de *Artemia* sp. foram obtidos pela incubação de cistos na proporção de 5,0 g por 1,5 L de água, em água salinizada (28-30 mg/L), tamponada com $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ (1,0 g), com pH 8-8,5, com alcalinidade 90-100 mg/L de CaCO_3 , oxigênio dissolvido entre 7,0 e 8,0 mg/L e temperatura entre 24 e 26°C. Nestas condições, a taxa de eclosão foi superior a 85%, ocorrendo após 16-18 horas de incubação.

Antes da realização do banho de imersão na solução enriquecida, todo o meio de cultivo onde ocorreu a eclosão dos náuplios de *Artemia* sp. foi substituído por meio com salinidade 5,0 mg/L. Passado o período estipulado de 30 minutos para o banho de imersão, a solução contendo os náuplios recém eclodidos de *Artemia* sp. e a solução enriquecida foi oferecida de forma integral às larvas de *R. quelen*.

Tabela 2. Emulsão nutritiva preparada para o banho de imersão dos náuplios recém-eclodidos de *Artemia* sp. fornecidos às larvas de *Rhamdia quelen* geradas durante os testes de progênie.

Componente	Quantidade
Água destilada	1 L
Leite em pó suplementado*	8 g
Farinha de fígado bovino (< 200 µm)	12 g
Caseína	6 g
Cloreto de colina	2 g
PREMIX vitamínico e mineral	10 g
Óleo de peixe bruto	40 mL
Óleo de girassol	60 mL

* Leite NINHO[®] Fases 1+ (Nestlé).

Do 15° ao 30° dia as larvas passaram a receber simultaneamente com a *Artemia* sp. enriquecida, uma mistura (1:1) peneirada (650-850 µm) de farinha de fígado e ração micro floculada para alevinos de peixes ornamentais com 44% PB (Alcon alevinos®). Após este período, a *Artemia* sp. foi retirada da alimentação e somente a mistura da farinha de fígado com a ração micro floculada foi fornecida até os juvenis completarem 2 meses de vida, quando passaram a receber ração comercial (pellets de 2-4 mm) com 40% PB (Guabi Pirá 40®).

Este cuidado com a alimentação foi motivado pela ocorrência de mortalidade massiva nesta fase, fazendo com que os testes de progênie fossem repetidos algumas vezes durante o desenvolvimento da pesquisa. Depois de adotar estas estratégias de alimentação, as larvas e os juvenis apresentaram maior resistência, que produziram um número suficiente de exemplares para a realização dos testes.

Os peixes foram sexados com cinco meses de idade. Excluindo-se a sexagem realizada para a masculinização, que utilizou técnicas histológicas de rotina, as demais descendências produzidas durante o estudo foram sexadas visualmente macroscopicamente ou, em caso de necessidade, a definição do sexo foi realizada através da técnica do *imprint* (impressão tecidual em lâmina), utilizando-se um microscópio Leica® DM 3000.

Os resultados, com a análise estatística aplicada, serão apresentados e discutidos no segundo artigo científico produzido nesta tese.

ARTIGOS ELABORADOS

Foram escritos dois artigos referentes à inversão sexual indireta em *Rhamdia quelen*:

- I. Masculinização de *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) com 17 α -metiltestosterona administrado via oral.

Artigo que será submetido à Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias (Qualis B2 e fator de impacto 0,165).

<http://rccp.udea.edu.co/DocsRCCP/AuthorGuidelines.pdf>

- II. Neomachos do bagre Sul-Americano *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) identificados através de testes de progênie.

Este artigo será submetido à Revista Aquaculture (Qualis A2 e fator de impacto 1,878).

https://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/503302?generatepdf=true

ARTIGO I

Masculinização de *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) com 17 α -metiltestosterona administrado via oral

Resumo

Antecedentes: O cultivo monosexo feminino é indicado para *Rhamdia quelen* devido ao maior crescimento das fêmeas. Proles femininas livres de hormônio exógeno podem ser geradas através da inversão sexual indireta, envolvendo inicialmente a masculinização das fêmeas para originar reprodutores neomachos, os quais são capazes de gerar descendências femininas ao serem cruzados com fêmeas normais. Objetivo: Masculinizar fêmeas de *R. quelen* por via oral, com 17 α -metiltestosterona (MT) incorporado em ração. Métodos: Grupos de larvas receberam dietas suplementadas com MT nas doses de 60, 80 ou 100 mg/kg de ração durante 21 dias. Um grupo controle foi alimentado com dieta similar livre de hormônio. Aos 150 dias pós-eclosão (DPE), 30 peixes de cada dose foram eutanasiados para avaliação das gônadas através de técnicas histológicas. Resultados: A MT afetou significativamente a diferenciação das gônadas femininas nas doses 60 e 80 mg/kg de ração. A inversão sexual foi observada em todas as doses, gerando 50, 40 e 20% de neomachos nas doses 60, 80 e 100 mg/kg de ração, respectivamente. Gônadas intersexuais foram observadas em todas as doses masculinizantes. As maiores doses de MT provocaram efeitos inibitórios de desenvolvimento nas gônadas femininas e masculinas. Conclusões: A administração oral de MT foi eficaz para masculinizar fêmeas de *R. quelen*, sendo indicada a menor dose testada devido aos efeitos inibitórios de desenvolvimento causados nas gônadas de ambos os sexos pelas maiores doses. Entretanto, faz-se necessário um ajuste no período de alimentação para aumentar a eficiência deste processo de masculinização em *R. quelen*.

Palavras chave: cultivo monosexo, histologia, inversão sexual neomacho.

Summary

Background: The female monosex fish culture is indicated for *Rhamdia quelen* due to their higher growth. Hormone-free offspring can be generated by indirect sex reversal, which initially involves the masculinization of females to yield neomales breeders that are able to produce all-female offspring when crossed with normal females. **Objective:** Masculinize *R. quelen* female by oral administration using 17 α -methyltestosterone (MT) incorporated into feed. **Methods:** Groups of larvae were fed diets supplemented with MT at doses of 60, 80 or 100 mg/kg diet for 21 days. A control group was fed a similar hormone-free diet. At 150 days post-hatching (DPH) 30 fish from each dose were euthanized to gonadal evaluation through histological techniques. **Results:** MT significantly affected the differentiation of normal female gonads at doses of 60 and 80 mg/kg. Sex reversal was observed at all MT doses that produced 50, 40 and 20% neomales at 60, 80 and 100 mg/kg, respectively. Intersex fish were observed at all masculinizing doses. Higher MT doses caused inhibitory effects of development in the female and male gonads. **Conclusions:** Oral administration of MT was effective to induce *R. quelen* masculinization; being indicated the lowest dose tested due to the inhibitory effects of development caused by higher doses in the gonads of both sex. However, an adjustment in the feeding period is necessary to improve the efficiency of this process of masculinization in *R. quelen*.

Keywords: Histology, monosex culture, neomales, sex reversal.

Introdução

O cultivo de *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824), espécie gonocórica, vem apresentando um aumento constante na região sul do Brasil nos últimos anos (Silveira *et al.*, 2014).

Para esta espécie, ambos os sexos apresentam taxas de crescimento similares no início do cultivo, no entanto as fêmeas alcançam maior tamanho no momento da despesca (Fracalossi *et al.*, 2002; 2004; Ghiraldelli *et al.*, 2007). Deste modo, a produção de *R. quelen* poderia ser otimizada com o cultivo monosexo feminino.

O cultivo monosexo é uma condição altamente desejada para muitas espécies de interesse comercial, como por exemplo, do gênero *Oreochromis* sp. e em salmónídeos e ciprinídeos, principalmente devido às diferenças de crescimento entre os sexos, ou pela reprodução indesejada durante o ciclo de produção (Dunhan, 2004).

Normalmente os lotes monosexo para a piscicultura são obtidos através da aplicação de técnicas de inversão sexual. A inversão do sexo pode ser induzida por temperatura (Baroiller *et al.*, 1999) ou pela administração de hormônios por via oral, por banho de imersão, por injeção ou implantes (Pandian, 2013).

A administração de dieta suplementada com hormônio é um método de baixo custo para a inversão sexual, sendo amplamente utilizado em espécies cujo período lábil, ou seja, o período no qual as células ainda são totipotentes em relação ao sexo, ocorre após o início da alimentação exógena (Pandian, 2013). Considerando-se que as larvas de *R. quelen* são capazes de digerir dietas artificiais antes mesmo de consumirem o vitelo (Silveira *et al.*, 2013), a inversão sexual por via oral apresenta-se como um método viável para a espécie.

Populações monosexo também podem ser originadas combinando-se a utilização de esteroides com estratégias de acasalamento. Este método indireto de inversão sexual tem sido aplicado em cultivos comerciais, como os de salmónídeos (Hunter *et al.*, 1983; Feist *et al.*, 1995), evitando a aplicação de hormônios nos peixes destinados ao consumo. Como o uso de esteroides suscita controvérsias relacionadas à saúde humana e ao meio ambiente, muitos países europeus proibiram sua utilização direta nos peixes cultivados (Desprez *et al.*, 2003; El-Sayed, 2006).

Em salmónídeos as fêmeas são utilizadas para a engorda, sendo que a obtenção de proles femininas livres do hormônio feminilizante envolve inicialmente a masculinização direta, seguida pela realização de testes de progênie para identificação das fêmeas masculinizadas, conhecidas como neomachos, sendo que do cruzamento entre reprodutores neomachos e fêmeas normais obtém-se uma descendência 100% feminina (Donaldson e Devlin, 1996).

Neste estudo relatamos a masculinização do *R. quelen* por via oral com 17α -metiltestosterona, como o passo inicial para a geração de descendência feminina livre da adição exógena de hormônio, que será obtida com a utilização de reprodutores neomachos.

Material e Métodos

Considerações éticas

O estudo foi conduzido no Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce (LAPAD) do Departamento de Aquicultura do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), utilizando os procedimentos experimentais do protocolo PP00788, aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSC.

Peixes

As larvas de *R. quelen* foram obtidas através da reprodução artificial de exemplares selvagens capturados na Bacia do Rio Uruguai e mantidos pelo LAPAD no seu plantel de reprodutores. Um espécime comprovante da espécie foi depositado no Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina (MZUEL 10549).

A desova foi induzida de acordo com o protocolo descrito por Woynarovich e Horváth (1980). Um pool contendo volumes iguais de sêmen proveniente de dois machos foi utilizado para fertilizar um pool de ovos provenientes de duas fêmeas. Os ovos fertilizados foram incubados em incubadoras (tipo cilindro-cônicas) abastecidas por um sistema controlado de recirculação de água, com temperatura em $24,84 \pm 0,35^{\circ}\text{C}$ (média \pm dp).

Ensaio masculinizante

Larvas de *R. quelen* em início de alimentação exógena, com 2 dias pós-eclosão (DPE), foram distribuídas aleatoriamente na densidade de 6 larvas/L em tanques circulares (60 L) abastecidos por um sistema controlado de recirculação de água com taxa de renovação de 800% ao dia e qualidade da água com as seguintes características: temperatura: $24,80 \pm 0,85^{\circ}\text{C}$; pH: $7,77 \pm 0,15$; condutividade eléctrica: $242,63 \pm 27,69 \mu\text{S}/\text{cm}$; oxigênio dissolvido: $7,54 \pm 0,52 \text{ mg}/\text{L}$; amônia não ionizada: $0,17 \pm 0,09 \text{ mg}/\text{L}$ de NH_3 ; nitrito: $0,11 \pm 0,09 \text{ mg}/\text{L}$ de NO_2 ; alcalinidade total: $31,50 \pm 5,08 \text{ mg}/\text{L}$ de CaCO_3 ; dureza total: $152,50 \pm 23,95 \text{ mg}/\text{L}$ de CaCO_3 .

Durante 21 dias grupos de larvas de *R. quelen* foram alimentados até a saciedade aparente cinco vezes ao dia com dieta artificial suplementada com 17 α -metiltestosterona (MT), nas doses 0 (controle), 60, 80 ou 100 mg/kg de ração.

A incorporação de MT foi realizada pelo método da evaporação de álcool etílico (Shelton *et al.*, 1981) em ração comercial contendo 55% de proteína bruta (PB). As alimentações preparadas com cada dose de MT foram peneiradas (0-250, 250-650 e 650-850 μ m), embaladas individualmente, refrigeradas até o momento de serem oferecidas e fornecidas na primeira (0-250 μ m), segunda (250-650 μ m) e terceira semana (650-850 μ m). Diariamente, antes da primeira alimentação, os restos de ração e as fezes foram retirados em todas as unidades experimentais através da sifonagem de fundo.

Ao final do tratamento masculinizante, o volume de água de cada tanque foi aumentado para 100 L para favorecer o crescimento, e neste momento todos os peixes passaram a ser alimentados com uma dieta livre de hormônio (45% PB) até completarem 150 DPE, quando foi realizada a biometria (peso e comprimento) e retirada das gônadas para a avaliação histológica.

Procedimentos histológicos

Para a avaliação microscópica dos efeitos do hormônio na diferenciação gonadal do *R. quelen*, trinta animais de cada tratamento masculinizante com MT foram eutanasiados com eugenol e deles foram retiradas amostras do terço médio das gônadas por meio de incisão ventral, as quais foram prontamente fixadas em solução de Karnovsky (Paraformol 2,0%; Glutaraldeído 2,0% e Tampão Fosfato 0,1 M; pH 7,4) para a aplicação das técnicas histológicas: inclusão em parafina, microtomia (cortes seriados de 5,0 μ m), coloração e montagem das lâminas.

As secções de 5,0 μ m foram coradas com Hematoxilina / Eosina (HE) ou Ácido Periódico de Schiff + Hematoxilina Férrica + Metanil Yellow (MY) (Quintero-Hunter *et al.*, 1991), para serem analisadas em microscópio de luz (LED Leica[®] DM 3000, Bannockburn, IL, EUA).

Nos peixes em que as gônadas não puderam ser separadas devido ao tamanho diminuto, uma amostra do corpo próxima ao possível local do tecido gonadal foi retirada e fixada para a análise histológica.

Os ovários e testículos foram classificados de acordo com Brown-Peterson *et al.* (2011) e Quagio-Grassiotto *et al.* (2013).

Análise estatística

Para o ensaio masculinizante, tabelas de contingência (2 x 2) da frequência entre os sexos foram analisadas pelo teste exato de Fisher ao nível de significância de 5,0% (Zar, 2010), aplicado para testar se a proporção entre machos e o total de fêmeas genóticas (gônadas femininas + gônadas intersexuais + gônadas masculinizadas) para cada dose masculinizante e controle diferiu da proporção equilibrada 1:1, e para testar entre os tratamentos masculinizantes a proporção entre fêmeas com gônada exclusivamente feminina (gônada feminina) e neomachos (gônada masculinizada).

Para avaliar se houve efeito do hormônio, uma hipótese unilateral foi testada para avaliar se a proporção entre fêmeas masculinizadas + peixes intersexuais (gônadas masculinizadas + gônadas intersexuais) e fêmeas com gônada exclusivamente feminina (gônada feminina) foi maior nos tratamentos do que no controle.

Os peixes com gônadas indiferenciadas foram excluídos de todas as análises estatísticas.

Resultados

Aos 150 DPE os peixes apresentaram crescimento similar em todos os tratamentos, com $10,09 \pm 1,70$ g (média \pm dp) de peso corporal e $8,47 \pm 4,39$ cm de comprimento total.

Através da análise histológica as gônadas foram classificadas em gônadas indiferenciadas, onde a presença das células germinativas primordiais não possibilitou a sexagem; gônadas masculinas, caracterizando os machos; gônadas femininas, caracterizando as fêmeas; gônadas intersexuais, com a presença simultânea de tecido masculino e feminino; e as gônadas masculinizadas, onde as lamelas ovarianas contendo exclusivamente células da linhagem germinativa masculina caracterizaram as gônadas femininas masculinizadas dos neomachos de *R. quelen*. Além disso, foram registrados outros efeitos, que não induziram a intersexualidade e/ou masculinização nas gônadas de ambos os sexos, que neste estudo foram denominados de efeitos inibitórios do desenvolvimento gonadal.

Análise histológica das gônadas

Nas gônadas indiferenciadas foram encontradas células germinativas primordiais (CGP) distribuídas isoladamente entre células do tecido conectivo e células somáticas. As CGP apresentaram formato elíptico-arredondado com núcleo menos basófilo e volumoso, sendo observados alguns vasos sanguíneos (VS) nas proximidades (Figura 5).

As gônadas dos machos apresentaram quatro fases de desenvolvimento testicular: I – imaturo, II – desenvolvimento, III – apto a liberar sêmen e IV – regressão (Tabela 3). Machos que apresentaram efeitos inibitórios de desenvolvimento gonadal não foram classificados.

Nos testículos imaturos puderam ser observados apenas cordões de espermatogônias (EG). Alguns testículos ainda apresentaram o início da organização celular precursora do ducto espermático (CPDE) (Figura 6a).

Na fase desenvolvimento, foi observado o agrupamento de espermatogônias (EG), espermatócitos (EC) e espermatídes (ET) nos espermatocistos, indicando o início da espermatogênese. Alguns indivíduos apresentaram espermatozoides no lúmen dos túbulos seminíferos e ductos espermáticos. A maturação das células germinativas ocorreu no sentido das projeções digitiformes ou “franjas” para o ducto, com epitélio contínuo ao longo do testículo (Figura 6b).

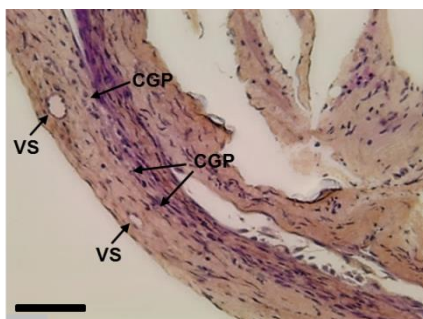


Figura 5. Corte longitudinal de gônada indiferenciada de *Rhamdia quelen*, mostrando os vasos sanguíneos (VS) e as células germinativas primordiais (CGP). Coloração: Ácido Periódico de Schiff + Hematoxilina Férrica + Metanil Yellow (MY). Peixes com 150 dias após eclosão. Barra: 20 μ m.

Em machos aptos a liberar sêmen, todos os estágios da espermatogênese estavam presentes nos espermatocistos (EG, EC e ET) ao longo do epitélio germinativo, que se apresentou contínuo na periferia e descontínuo próximo ao ducto espermático (DE). Os espermatozoides estavam presentes na luz dos túbulos e ductos espermáticos em grande quantidade (Figura 6c).

Os machos em regressão caracterizaram-se por testículos “esvaziados”, com espermatozoides residuais no lúmen dos túbulos seminíferos e/ou ductos espermáticos. Notou-se, ao mesmo tempo, a regeneração do epitélio germinativo, havendo proliferação das espermatogônias e espermatocistos com espermatozoides não liberados (Figura 6d).

Tabela 3. Número de machos de *Rhamdia quelen* nas diferentes fases do desenvolvimento testicular, provenientes das doses masculinizantes 0, 60, 80 e 100 mg de 17 α -metiltestosterona (MT) por kg de ração.

	Doses de MT (mg/kg de ração)			
	0 (controle)	60	80	100
Imaturo	14	13	8	8
Desenvolvimento	3	6	7	0
Apto a liberar sêmen	2	2	3	5
Regressão	1	0	0	3
Efeito inibitório	0	0	2	4

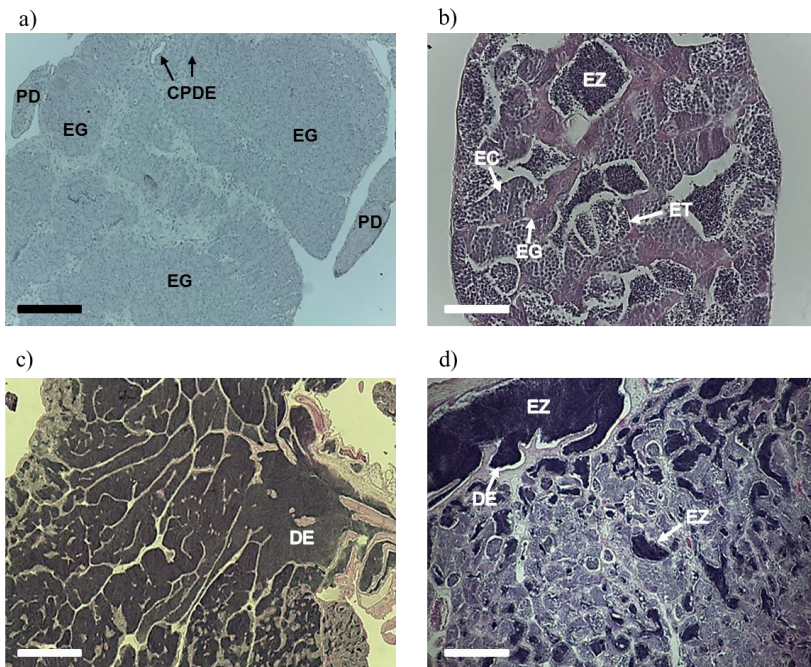


Figura 6. Corte longitudinal de testículo de *Rhamdia quelen* na fase imaturo: áreas basófilas (coloração mais roxa) com os cordões de espermatogônias (EG), início da organização celular precursora do ducto espermático (CPDE) e as projeções digitiformes (PD) ou “franjas” (a). Corte transversal de testículo de *R. quelen* na fase desenvolvimento: espermatogônias (EG), espermatócitos (EC) e espermatídes (ET) agrupadas nos espermatocistos, além da presença de espermatozoides (EZ) (b). Corte longitudinal de testículo de *R. quelen* apto a liberar sêmen: epitélio germinativo contínuo na periferia e descontínuo próximo ao ducto espermático (DE), com um grande número de espermatozoides presentes na luz dos túbulos e ductos espermáticos (c). Corte longitudinal de testículo de *R. quelen* em regressão: espermatozoides (EZ) residuais no ducto espermático (DE) e no lúmen dos túbulos seminíferos (d). Coloração: Hematoxilina / Eosina (HE). Peixes com 150 dias após eclosão. Barras: 500 μm (c), 200 μm (a, d) e 50 μm (b).

Nas análises histológicas foram encontradas fêmeas em apenas duas fases do desenvolvimento gonadal: I – imatura; II – desenvolvimento (Tabela 4). A fêmea que apresentou efeito inibitório de desenvolvimento gonadal, causado pela maior dose de MT, foi desconsiderada para a classificação de desenvolvimento das gônadas.

A fase imatura foi caracterizada pela presença de ovogônias (OG) e ovócitos em crescimento primário (OCP) (ovócitos pré-vitelogênicos), sendo que as lamelas ovarianas estavam próximas entre si (Figura 7a).

Na fase desenvolvimento foram observados OCP em vários estágios, inclusive na fase final, onde aparecem os ovócitos em crescimento secundário (OCS) e alguns ovócitos atrésicos (OA) (Figura 7b). Esta fase caracteriza-se pelo início da vitelogênese, onde puderam ser observados também OCS em várias fases (alvéolo-corticais), assim como ovogônias, principalmente na base das lamelas.

Efeitos histomorfológicos da 17α -metiltestosterona nas gônadas

A MT produziu alterações histomorfológicas importantes em ambos os sexos, resultando em fêmeas genótípicas com gônadas masculinizadas (neomachos) ou gônadas intersexuais, além de efeitos inibitórios de desenvolvimento causados pelas maiores doses nas gônadas de machos e fêmeas normais (genotípicos e fenotípicos). Nenhum peixe do grupo controle, alimentado com dieta livre de hormônio, apresentou tais alterações.

Tabela 4. Número de fêmeas de *Rhamdia quelen*, nas diferentes fases do desenvolvimento gonadal, provenientes de doses masculinizantes 0, 60, 80 e 100 mg de 17α -metiltestosterona (MT) por kg de ração.

	Doses de MT (mg/kg de ração)			
	0 (controle)	60	80	100
Imatura	2	0	0	1
Desenvolvimento	3	1	1	1
Efeito inibitório	0	0	0	1

Nos peixes em que as gônadas foram classificadas como intersexuais foram observadas lamelas ovígeras contendo células germinativas da linhagem masculina juntamente com ovócitos de crescimento primário, além de áreas de reabsorção e reorganização celular (Figura 8a,b).

Já nos peixes neomachos foram observadas gônadas com lamelas ovarianas contendo apenas células da linhagem masculina (Figura 8c,d).

Em uma fêmea da dose 100 mg de MT/kg de ração, foram observadas áreas com maior presença de ovócitos atrésicos, áreas de reabsorção e reorganização celular semelhante a uma regressão ovariana, além de um fenômeno similar a uma “liquefação” do citoplasma dos ovócitos, sugerindo um efeito inibitório de desenvolvimento ocasionado pela MT apesar da inversão sexual não ter sido induzida (Figura 9a).

Dois machos que receberam a dose de MT 80 e quatro que receberam a dose de MT 100 mg/kg de ração apresentaram desenvolvimento anômalo dos testículos, nos quais foram encontradas áreas em fases distintas, isto é, áreas de desenvolvimento com células germinativas iniciais (característica da fase imaturo) e áreas onde o lúmen dos túbulos seminíferos e ductos espermáticos estavam repletos de espermatozoides (característica da fase apto a liberar sêmen) (Figura 9b).

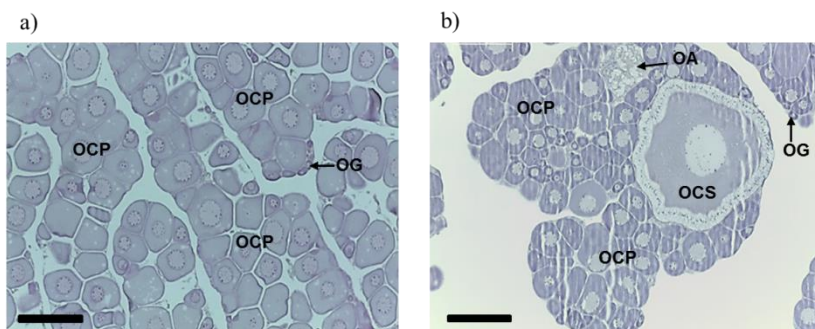


Figura 7. Corte longitudinal de ovário de *Rhamdia quelen* na fase imatura: ovócitos em crescimento primário (OCP) (a). Corte longitudinal de ovário de *R. quelen* na fase desenvolvimento: ovogônias (OG), ovócitos em crescimento primário (OCP), ovócitos atrésicos (AO) e ovócitos em crescimento secundário (OCS) (b). Peixes com 150 dias após eclosão. Coloração: Hematoxilina / Eosina (HE). Barras: 200 µm.

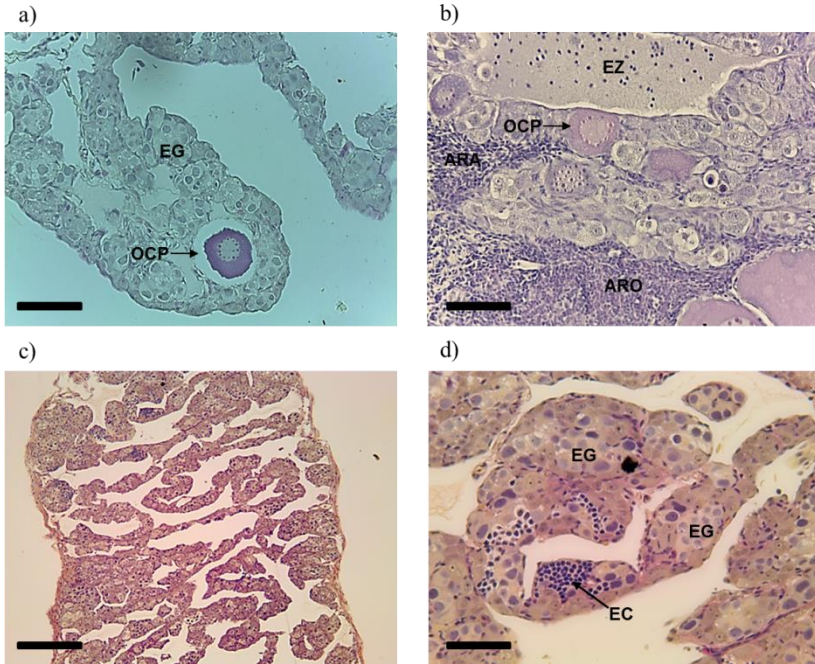


Figura 8. Corte longitudinal de gônada intersexual de *Rhamdia quelen*: espaço intralamelar com espermatogônias (EG) e ovócitos de crescimento primário (OCP) (a), espaço intralamelar com espermatozoides (EZ), áreas de reabsorção (ARA) e reorganização (ARO) celular e ovócitos de crescimento primário (OCP) (b). Corte longitudinal de gônada masculinizada de *R. quelen* (neomachos): lamelas ovarianas contendo exclusivamente células da linhagem germinativa masculina (c), detalhes das espermatogônias (EG) e dos espermatócitos (EC) presentes nas lamelas (d). Coloração: Hematoxilina / Eosina (HE) (a, b) e Ácido Periódico de Schiff + Hematoxilina Férrica + Metanil Yellow (MY) (c, d). Peixes com 150 dias após eclosão. Barras: 200 μm (c), 50 μm (a, b) e 20 μm (d).

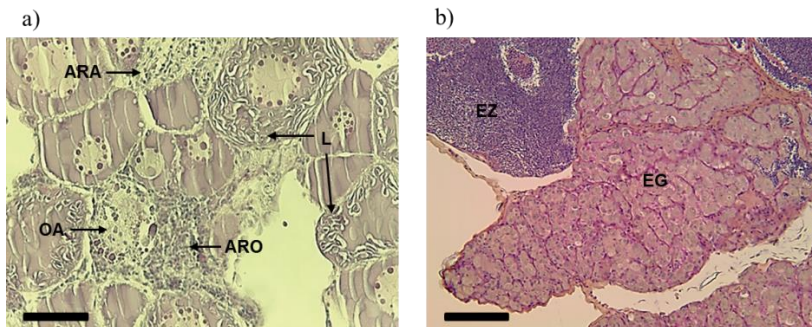


Figura 9. Corte longitudinal de ovário de *Rhamdia quelen* demonstrando efeito inibitório causado pelo hormônio masculinizante 17α -metiltestosterona (MT): áreas de reabsorção (ARA) e de reorganização (ARO) celular, presença de ovócitos atrécicos (OA) e “liquefação” (L) do citoplasma dos ovócitos (a). Corte longitudinal de testículo de *R. quelen* demonstrando efeito inibitório de desenvolvimento causado pela MT: áreas em fases distintas de desenvolvimento, sendo observadas espermatogônias (EG) e espermatozoides (EZ) (b). Coloração: Hematoxilina / Eosina (HE) (a) e Ácido Periódico de Schiff + Hematoxilina Férrica + Metanil Yellow (MY) (b). Peixes com 150 dias após eclosão. Barras: 50 μ m.

Ensaio masculinizante

Um desvio significativo ($P < 0,05$) na proporção sexual foi observado em favor dos machos, tanto no controle quanto nos grupos tratados com MT (Tabela 5).

Independentemente do tratamento masculinizante, as fêmeas genóticas (gônadas femininas + gônadas intersexuais + gônadas masculinizadas) ocorreram em baixa frequência ($\leq 20\%$), limitando o número de peixes passíveis de inversão. Entretanto, foi possível verificar que a MT influenciou significativamente ($P < 0,05$) a diferenciação gonadal das fêmeas genóticas nas doses de 60 e 80 mg/kg de ração (Tabela 5) em relação ao controle, com inversão sexual ocorrendo em todas as doses testadas.

Tabela 5. Classificação das gônadas de *Rhamdia quelen* (150 dias pós-eclosão) alimentados durante 21 dias com dieta comercial suplementada com diferentes doses de 17 α -metiltestosterona (MT).

Classificação das gônadas	Doses de MT (mg/kg de ração)			
	0 (Controle)	60	80	100
Masculina	20*	21*	20*	20*
Feminina	5	1	1	3
Intersexual	0	2	2	1
Masculinizada	0	3 ^a	2 ^a	1 ^a
Indiferenciada**	5	3	5	5
Fisher***		0,046	0,024	0,222

* Desvio significativo ($P < 0,05$) em favor dos machos (gônadas masculinas), considerando uma proporção esperada de 1:1 entre machos (gônadas masculinas) e fêmeas genotípicas (gônadas femininas + gônadas intersexuais + gônadas masculinizadas).

Letras sobrescritas idênticas indicam que a proporção de gônadas femininas masculinizadas não diferiu significativamente ($P > 0,05$) entre as doses pelo teste exato de Fisher.

** Peixes com gônadas indiferenciadas foram excluídos de todas as análises estatísticas.

*** Probabilidade do teste exato de Fisher aplicado para testar se a proporção das gônadas intersexuais + masculinizadas foi maior que a proporção de gônadas exclusivamente femininas do controle ($\alpha = 0,05$).

A produção de neomachos (fêmeas masculinizadas) foi de 20, 40 e 50%, respectivamente da menor para a maior dose de MT testadas, valores que representaram a porcentagem de fêmeas genotípicas (gônada feminina + gônada intersexual + gônada masculinizada) passíveis de serem masculinizadas, no entanto, diferenças significativas não foram observadas entre as doses (Tabela 5). Peixes intersexuais foram observados em todos os grupos tratados com MT.

Discussão

Ainda que em populações selvagens de *R. quelen* a proporção sexual normalmente esteja balanceada (1:1) (Baldisseroto *et al.*, 2010), no presente estudo uma maior frequência de machos (72% das gônadas sexadas) foi observada na descendência proveniente dos reprodutores selvagens, condição também registrada por Sulis-Costa *et al.* (2013) com a mesma linhagem de reprodutores.

Como a descendência utilizada para o ensaio masculinizante apresentou fêmeas em menor frequência, um número menor de animais foi alvo efetivo do processo de inversão sexual. Apesar disso, a masculinização ocorreu em todas as doses de MT testadas, sendo que as doses 60 e 80 mg/kg de ração causaram uma maior influência na diferenciação gonadal, apresentando um número maior de peixes com gônadas intersexuais e masculinizadas (neomachos).

Aspectos ambientais que causam estresse em reprodutores de peixes podem causar desequilíbrio na proporção entre os sexos de suas descendências (Haines, 1983). Neste sentido observou-se que o Siluriformes *Silurus meridionalis* apresenta proporção sexual equilibrada (1:1) na natureza, mas quando sua reprodução em cativeiro é realizada a descendência é sempre 100% feminina. Apesar dos estudos baseados em inversão sexual, na determinação do sexo e na diferenciação gonadal levantarem a hipótese de que o estrogênio possa ser determinante na diferenciação do ovário e na feminilização das larvas desta espécie, o mecanismo envolvido ainda não foi definido (Liu *et al.*, 2010).

De modo geral a expressão do sexo em peixes depende de dois eventos, a determinação sexual genética, que ocorre no momento da fecundação e a diferenciação sexual posterior, que determina o sexo fenotípico, sendo que o tempo total para diferenciação completa das gônadas em testículos ou ovários é espécie-específico (Piferrer, 2001).

Para teleósteos existem dois grandes grupos distintos quanto ao tempo necessário para a definição do sexo fenotípico, as espécies que apresentam período curto de diferenciação sexual, que ocorre logo após a eclosão, de 10 a 40 dias, e as espécies cuja diferenciação sexual ocorre na fase de juvenil, com duração mais longa, de 100 a 500 dias (Pandian e Sheela, 1995). Além disso, na maioria das famílias gonocorísticas de teleósteos estudadas, as fêmeas apresentam diferenciação sexual precoce, que antecede a dos machos (Strüssmann e Nakamura, 2002).

O conhecimento do período lábil de diferenciação sexual, no qual as gônadas indiferenciadas apresentam capacidade de resposta à ação de esteroides (Piferrer, 2001), se torna fundamental para uma aplicação mais eficiente dos protocolos de inversão sexual hormonal.

Davis *et al.* (1990) mostraram que a duração eficiente para a inversão sexual foi de 21 dias após o início da alimentação exógena em *Ictalurus punctatus*, uma outra espécie de Siluriformes. Para *Tachysurus fulvidraco* o período lábil ocorre entre o 8° e 30° DPE, apresentando maior duração nas fêmeas (Park *et al.*, 2004). Em *Salvelinus fontinalis* o período lábil ocorre antes e é mais longo quando comparado com a maioria dos salmonídeos, que normalmente apresentam este período do 18° ao 28° DPE (Haffray *et al.*, 2009).

Como o período lábil para *R. quelen* não está identificado, uma menor frequência de peixes invertidos poderia ser esperada, entre outros fatores, se a administração da dieta suplementada com MT não abrangesse todo este período. No entanto, neste ensaio masculinizante foi utilizado o mesmo período de tratamento aplicado por Amaral *et al.* (2008) na feminilização direta de *R. quelen* por suplementação dietética com 17 β -estradiol (21 dias a partir da primeira alimentação exógena), no qual foram produzidas 79% de fêmeas na melhor dose testada (100 mg/kg de ração).

As diferentes fases de desenvolvimento gonadal caracterizadas através da histologia para machos (de imaturos até regressão) e para as fêmeas (imaturas e em desenvolvimento) durante o mesmo tempo de criação, mostraram que os machos apresentaram maturação sexual precoce em relação às fêmeas, condição característica de *R. quelen*, quando em cativeiro (Fracalossi *et al.*, 2002; 2004; Ghiraldelli *et al.*, 2007).

Nas gônadas indiferenciadas de *R. quelen*, que representaram 15% do total de peixes analisados, a presença das células germinativas primordiais (CGP) caracteriza o epitélio germinativo que dará origem as lamelas ovarianas ou aos túbulos seminíferos, delimitando o lúmen ovariano e testicular, respectivamente (Grier e Lo Nostro, 2000; Mazzoni, 2010). A presença de peixes com gônadas indiferenciadas aos 150 DPE sugere que seria necessário um período ainda maior para que todos os peixes apresentassem o sexo fenotípico definido. Entretanto, o fato desta condição também ocorrer no tratamento controle, no qual os peixes não foram expostos a MT, demonstra que não há relação com as doses de MT testadas.

A ocorrência de peixes com gônadas intersexuais em todas as doses masculinizantes pode ser um indicativo de que o período lábil do *R. quelen* não foi completamente abrangido com a administração do hormônio. Por outro lado, as gônadas poderiam estar no meio do processo de inversão, ou seja, seria necessário um período maior do que 150 DPE para que a inversão sexual fosse completada nas condições experimentais utilizadas.

Além disso, a presença de gônadas intersexuais pode ser decorrente de doses abaixo do ideal ou de doses muito elevadas de hormônio, sendo que no último caso normalmente observa-se a presença simultânea de indivíduos estéreis (Pandian e Sheela, 1995), o que não ocorreu neste estudo.

Apesar de a intersexualidade gonadal ser observada também em machos expostos a MT (Kang *et al.*, 2008), no presente estudo as análises histológicas das gônadas de *R. quelen* demonstraram que o tecido gonadal intersexual era proveniente de gônadas femininas devido a presença de lamelas ovarianas, semelhante ao que foi reportado para *Morone saxatilis* (Schutz e Harrell, 1999).

Da mesma forma, as gônadas masculinizadas apresentaram lamelas ovarianas com tecido masculino. Como os peixes estavam com 150 DPE no momento da análise das gônadas, existe a dúvida se esta seria a morfologia definitiva, ou se os neomachos apresentariam gônadas semelhantes às dos machos aptos a liberarem sêmen quando atingirem a maturação sexual, caso fossem reprodutores funcionais.

A observação de efeitos inibitórios de desenvolvimento gonadal causados pelas maiores doses de MT, tanto em gônada feminina quanto masculina de *R. quelen*, podem ser indicativos de doses muito elevadas para a espécie. Não é surpreendente a MT causar anomalias em ambos os sexos de peixes (Ankley *et al.*, 2001; Kang *et al.*, 2008). Rivero-Wendt *et al.* (2013), utilizando alimentação suplementada com 60 mg de MT/kg de ração durante 28 dias, identificaram um decréscimo considerável da espermatogênese em *Astyanax bimaculatus* e uma degeneração anormal do tecido ovariano em *Oreochromis niloticus*.

Embora a MT por administração oral tenha sido capaz de induzir a masculinização em *R. quelen*, a eficácia das doses testadas foi menor do que a encontrada para outras espécies de interesse comercial, como por exemplo, *Oreochromis niloticus* (Shelton *et al.*, 1981).

Devido aos efeitos inibitórios de desenvolvimento gonadal produzidos em ambos os sexos pelas maiores doses de MT, a dose de 60 mg/kg de ração seria a mais indicada para a masculinização das fêmeas de *R. quelen* nas condições experimentais utilizadas. Os resultados sugerem ainda a necessidade de um ajuste no período de alimentação do *R. quelen* com MT para garantir melhores taxas de inversão sexual, bem como um período acima dos 150 DPE para que toda a descendência apresentasse diferenciação sexual completa.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelas bolsas de estudo e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento (Projeto Universal 486868/2013-3).

Referências

Amaral Junior H, Nunes MFS, Garcia S. Análise de diferentes dosagens de hormônio na ração, para definição de um protocolo de feminilização do jundiá *Rhamdia quelen*. Rev Electrón Vet 2008; 25 (12): 1-7.

Ankley GT, Jensen KM, Kahl MD, Korte JJ, Makynen EA. Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). Environ Toxicol Chem 2001; 20: 1276-1290.

Baldisseroto B, Radünz Neto J, Barcellos LG. Jundiá (*Rhamdia* sp.). In Baldisseroto B, Gomes LC, editors. Espécies nativas para piscicultura no Brasil. Santa Maria: UFSM; 2010. p.301-333.

Baroiller JF, Guiguen Y, Fostier A. Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. Cell Mol Life 1999; 55: 910-931.

Beardmore JA, Mair GC, Lewis RI. Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: applications, problems and prospects. Aquaculture 2001, 197: 283-301.

Bradley KM, Breyer JP, Melville DB, Broman KW, Knapik EW, Smith JR. An SNP-Based linkage map for zebrafish reveals sex determination loci. *G3 - Genes Genom Genet* 2011; 1: 3-9.

Brown-Peterson NJ, Wyanski DM, Saborido-Rey F, Macewicz BJ, Lowerre-Barbieri SK. A standardized terminology for describing reproductive development in fishes. *Mar Coast Fish Dynam Manag Ecosys Sci* 2011; 3:52-70.

Calhoun WE, Shelton WL. Sex ratios of progeny from mass spawning of sex reversed broodstock of *Tilapia nilotica*. *Aquaculture* 1983; 33: 365-371.

Davis KB, Simco BA, Goudie CA, Parker NC, Cauldwell W, Snellgrove R. Hormonal sex manipulation and evidence for female homogamety in channel catfish. *Gen Comp Endocrinol* 1990; 78: 218-223.

Desprez D, Géraz E, Hoareau MC, Mélard C, Bosc P, Baroiller JF. Production of a high percentage of male offspring with a natural androgen, 11h-hydroxyandrostenedione (11hOHA4), in Florida red tilapia. *Aquaculture* 2003; 216: 55-65.

Devlin RH, Nagahama Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* 2002; 208: 191-364.

Donaldson EM, Devlin RH. Uses of biotechnology to enhance production. In Pennell W, Barton BA, editors. *Developments in Aquaculture and Fisheries Science: Principles of Salmonid Culture*. Amsterdam: Elsevier; 1996. p.969-1020.

Dunhan RA. *Aquaculture and Fisheries Biotechnology: Genetic Approaches*. Wallingford: CABI; 2004.

El-sayed AFM. *Tilapia culture*. Cambridge: CABI Publishing; 2006.

Feist G, Yeoh C, Fitzpatrick MS, Schreck CB. The production of functional sex-reversed male rainbow trout with 17 α -methyltestosterone and 11 β -hydroxyandrostenedione. *Aquaculture* 1995; 13: 145-152.

Fracalossi DM, Meyer G, Santamaria FM, Weingartner M, Zaniboni-Filho E. Desempenho do jundiá, *Rhamdia quelen*, e do dourado, *Salminus brasiliensis*, em viveiros de terra na região sul do Brasil. Acta Sci Anim Sci 2004; 26: 345-352.

Fracalossi DM, Zaniboni-Filho E, Meurer S. No rastro das espécies nativas. Panorama da Aquicultura 2002; 12: 43-49.

Ghiraldelli L, Machado C, Fracalossi DM, Zaniboni-Filho E. Desenvolvimento gonadal do jundiá, *Rhamdia quelen* (Teleostei, Siluriformes), em viveiros de terra, na região Sul do Brasil. Acta Sci Biol Sci 2007; 29 (4): 349-356.

Grier H, Lo Nostro F. The germinal epithelium in fish gonads: the unifying concept. In Norberg B, Kjesbu OS, Taranger GL, Andersson E, Stefansson SO, editors. Proceedings of the sixth international symposium on the reproductive physiology of fish. The University of Bergen (Bergen, Norway); 2000. p. 233-236.

Haffray P, Petit V, Guiguen Y, Quillet E, Rault P, Fostier A. Successful production of monosex female brook trout *Salvelinus fontinalis* using gynogenetic sex reversed males by a combination of methyltestosterone immersion and oral treatments. Aquaculture 2009; 290: 47-52.

Haines AK. Fish fauna and ecology. In: Petr T, editor. The Purari, tropical environment of a high rainfall river basin. Springer Netherlands; 1983. p.367-384.

Hunter GA, Donaldson EM, Stoss J, Baker I. Production of monosex female groups of chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*, by the fertilization of normal ova with sperm from sex reversed females. Aquaculture 1983; 33: 335-364.

Kang IJ, Yokota H, Oshima Y, Tsuruda Y, Shimasaki Y, Honjo T. The effects of methyltestosterone on the sexual development and reproduction of adult medaka (*Oryzias latipes*). Aquat Toxicol 2008; 87: 37-46.

Liu ZH, Zhang YG, Wang DS. Studies on feminization, sex determination, and differentiation of the Southern catfish, *Silurus meridionalis* – a review. Fish Physiol Biochem 2010; 36: 223-235.

- Mazzoni TS, Grier HJ, Quagio-Grassiotto I. Germline cysts and the formation of the germinal epithelium during the female gonadal morphogenesis in *Cyprinus carpio* (Teleostei: Ostariophysi: Cypriniformes). *Anat Rec* 2010; 293: 1581-1606.
- Pandian TJ, Sheela SG. Hormonal induction of sex reversal in fish. *Aquaculture* 1995; 138: 1-22.
- Pandian TJ. Sex Reversal. In Pandian TJ, editor. *Endocrine sex differentiation in fish*. Florida: CRC Press; 2013. p.175-212.
- Park IS, Kim JH, Cho SH, Kim DS. Sex differentiation and hormonal sex reversal in the bagrid catfish *Pseudobagrus fulvidraco* (Richardson). *Aquaculture* 2004; 232: 183-193.
- Piferrer F. Endocrine sex control strategies for the feminilization of teleost fish. *Aquaculture* 2001; 197: 229-281.
- Quagio-Grassiotto I, Wildner DD, Ishiba R. Gametogênese de peixes: aspectos relevantes para o manejo reprodutivo. *Rev Bras Reprod Anim* 2013; 37 (2):181-191.
- Quintero-Hunter I, Grier H, Muscato M. Enhancement of histological detail using metanil yellow as a counterstain in periodic acid/Schiff's hematoxylin staining of glycol methacrylate tissue sections. *Biotech Histochem* 1991; 66: 169-172.
- Rivero-Wendt CLG, Miranda-Vilela AL, Ferreira MFN, Borges AM, Grisolia CK. Cytogenetic toxicity and gonadal effects of 17 α -methyltestosterone in *Astyanax bimaculatus* (Characidae) and *Oreochromis niloticus* (Cichlidae). *Genet Mol Res* 2013; 12 (3): 3862-3870.
- Schutz JR, Harrell RM. Use of sex reversal in striped bass to create an all-male population. *N Am J Aquac* 1999; 61 (2): 97-106.
- Shelton WL, Rodrigues-Guerrero D, Lopes-Macias J. Factors affecting androgen sex reversal of *Tilapia aurea*. *Aquaculture* 1981; 25 (1): 59-65.
- Silveira FS, Silva FM, Casaca JM. Desempenho catarinense na piscicultura de água doce 2014. Florianópolis: EPAGRI/CEDAP; 2014.

Silveira J, Silva CP, Carginin-Ferreira E, Alexandre D, Elias MA, Fracalossi DM. Freshwater catfish jundiá (*Rhamdia quelen*) larvae are prepared to digest inert feed at the exogenous feeding onset: physiological and histological assessments. *Fish Physiol Biochem* 2013; 39: 1581-1590.

Strüssmann CA, Nakamura M. Morphology, endocrinology, and environmental modulation of gonadal sex differentiation in teleost fishes. *Fish Physiol Biochem* 2002; 26:13-29.

Sulis-Costa R, Jimenez JE, Weingartner M, Nuñez APO. Efeito da temperatura da água na fase inicial de vida e na proporção sexual do jundiá. *Bol Inst Pesca* 2013; 39 (4): 379-388.

Woynarovich E, Horváth L. The artificial propagation of warm-water finfishes: a manual for extension. *FAO Fisheries Technical Paper*, n.201; 1980.

Zar JH. *Biostatistical analysis*. New Jersey: Prentice Hall; 2010.

ARTIGO II

Neomachos do bagre Sul-Americano *Rhamdia quelen*
(Quoy & Gaimard, 1824) identificados através de testes de progênie

Resumo

Testes de progênie foram realizados para identificar reprodutores neomachos (fêmeas masculinizadas) de *Rhamdia quelen*, animais teoricamente capazes de gerar progênies 100% femininas livres de hormônio ao serem cruzados com fêmeas normais (fêmeas fenotípicas e genotípicas). Machos fenotípicos foram selecionados dentro de grupos de *R. quelen* submetidos a tratamentos masculinizantes por via oral com 17 α -metiltestosterona (MT) incorporado em dieta comercial nas doses de 60, 90 ou 120 mg kg⁻¹ de ração. Inicialmente, cinco machos fenotípicos provenientes de cada dose de MT foram cruzados com fêmeas normais e aos 150 dias pós-eclosão (DPE) suas progênies foram sexadas macroscopicamente ou, caso necessário, através da técnica do *imprint* (impressão tecidual em lâmina) em microscópio de luz. O teste do qui-quadrado evidenciou que pelo menos um macho de cada dose originou progênie com maior proporção de fêmeas ($P<0,05$): 76, 73 e 87%, respectivamente da menor para a maior dose. Num segundo teste, esses machos, denominados M60, M90 e M120, foram cruzados com outras três fêmeas diferentes para reavaliar a proporção sexual das suas progênies, sendo que um macho livre de tratamento masculinizante foi utilizado como controle. Novamente o teste do qui-quadrado ($P<0,05$) confirmou a maior presença de fêmeas nas progênies geradas por estes reprodutores, independente da fêmea reprodutora utilizada na reprodução, com porcentagem média (\pm dp) de 73,4 \pm 4,2; 84,2 \pm 1,2 e 82,5 \pm 10,2% de fêmeas geradas pelo M60, M90 e M120, respectivamente. O macho controle produziu duas progênies balanceadas e uma com maior presença de machos (66%) ($P<0,05$). Apesar destes reprodutores não gerarem progênies 100% femininas, M60, M90 e M120 podem ser considerados neomachos de *R. quelen*.

Palavras-chave: fêmeas masculinizadas, jundiá, 17 α -metiltestosterona, inversão sexual indireta.

Abstract

Progeny tests were performed to identify possible neomales (masculinized females) of *Rhamdia quelen*, breeding animals theoretically able to generate all-female offspring free of hormone when crossed with normal females (phenotypic and genotypic female). Phenotypic males were selected from groups submitted to masculinization by ingestion of 17 α -methyltestosterone (MT) incorporated in diet, at doses 60, 90 or 120 mg kg⁻¹ diet. Initially five males of each MT dose were crossed with a normal female and the resulting progeny were grown up for 150 days post-hatching when fish were sexed macroscopically or by the *imprint* technique (tissue printing in microscope slide) under a light microscope when necessary. Chi-square test showed that at least one male from each dose produced progeny with a greater proportion of females ($P < 0.05$): 76, 73, and 87%, from the lowest to the highest dose respectively. In a second test these males, referred as M60, M90 and M120, were crossed with three different females to a new evaluation of their progenies sex ratio, and one male that did not receive the masculinizing treatment was used as control. The chi-square test ($P < 0.05$) confirmed again the higher frequency of females in the sex ratio of the progenies generated by these breeding animals, independent of the female used in the breeding process, with mean percentage (\pm dp) of females of 73.4 \pm 4.2, 84.2 \pm 1.2 and 82.5 \pm 10.2% generated from M60, M90, and M120, respectively. The control male produced two balanced progenies and one with greater presence of males (66%) ($P < 0.05$). Although all-female progenies were not produced, M60, M90 e M120 can be considered neomales of *R. quelen*.

Keywords: Females masculinized, jundiá, 17 α -methyltestosterone, indirect sex reversal.

Introdução

Progênes femininas livres de hormônio podem ser obtidas através do cruzamento de fêmeas genóticas masculinizadas, os denominados reprodutores neomachos, com fêmeas normais (fêmeas fenóticas e genóticas). Este método indireto de inversão sexual tem sido aplicado com sucesso no cultivo comercial de salmonídeos (Feist et al., 1995; Hunter et al., 1983; Piferrer e Donaldson, 1989), evitando a aplicação de hormônios nos peixes destinados ao consumo humano.

Apesar da inversão sexual em peixes ser induzida normalmente de forma direta através da administração de esteroides nas fases iniciais do desenvolvimento (Pandian, 2013), o uso de esteroides evoca controvérsias relacionadas ao desenvolvimento dos peixes, à saúde humana e aos possíveis danos ao meio ambiente, sendo que em muitos países da Europa esta prática é proibida (Desprez et al., 2003; El-Sayed, 2006).

A aplicação da técnica de inversão sexual indireta consiste inicialmente na masculinização de fêmeas genótípicas com hormônio androgênico para obtenção de neomachos, e posterior fertilização dos ovócitos de fêmeas normais (fêmeas fenótípicas e genótípicas) com o sêmen de neomachos, o que produziria teoricamente progênie com 100% de fêmeas fenótípicas e genótípicas livres de hormônios, uma vez que genotipicamente os neomachos seriam fêmeas, ainda que fenotipicamente machos.

Rhamdia quelen (Siluriformes, Heptapteridae) é uma espécie gonocórica com ampla distribuição na região Neotropical que se adaptou muito bem às condições de cultivo (Barcellos et al., 2001), sendo que nos últimos anos sua produção comercial tem aumentado de forma significativa na região sul do Brasil (Silveira et al., 2014). Devido ao maior crescimento das fêmeas e à maturação precoce dos machos durante o ciclo de produção (Fracalossi et al., 2002; Ghiraldelli et al., 2007; Gomes et al., 2000), o uso de lotes monossexo de fêmeas poderia aumentar o volume de produção desta espécie.

Para *R. quelen* não existem relatos sobre a existência de cromossomos sexuais ou sobre o tipo de sistema de determinação do sexo. No entanto, considerando os sistemas clássicos de determinação sexual, fêmeas homogaméticas em relação ao cromossomo sexual (modelo XX/XY) produziriam, em teoria, 100% de fêmeas ao cruzarem com neomachos (XX) (Gomelsky, 2003; Kavumpurath e Pandian, 1994). Para espécies em que as fêmeas são heterogaméticas (modelo ZW/ZZ), uma progênie 100% feminina seria gerada pelo cruzamento entre macho normal (ZZ) e uma superfêmea (WW), a qual descenderia de um reprodutor neomacho (ZW) (Toledo-Filho et al., 1996).

Porém, existem espécies que na determinação do sexo, além dos cromossomos sexuais, apresentam a participação de genes autossômicos influenciados por outros fatores (genéticos ou ambientais), tornando teórica a obtenção de descendência 100% feminina através de reprodutores neomachos ou superfêmeas (Kirankumar e Pandian, 2002; Devlin e Nagahama, 2002; Desprez et al., 2006).

A sobrevivência de peixes submetidos à inversão sexual e que carregam o genótipo desejado até a maturação sexual normalmente é muito baixa (George e Pandian, 1996; Pandian, 2013), o que demanda grande investimento de recursos e tempo quando se pretende formar um plantel de reprodutores invertidos. Portanto, o número final de peixes produzidos limita a utilização de métodos que envolvam a eutanásia de vários exemplares para determinar a eficácia da inversão sexual.

Tendo em vista estas limitações, os testes de progênie, que podem ser utilizados para comparar a proporção sexual das progênies de diferentes reprodutores, permitem avaliar a composição sexual das progênies geradas pelos peixes submetidos à masculinização, além de possibilitar a formação de um plantel de reprodutores neomachos. Desta forma, o objetivo deste estudo foi identificar, através de testes de progênie, reprodutores neomachos de *R. quelen*.

Material e Métodos

Material biológico

O estudo foi realizado no Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce (LAPAD; 27°43'44.4"S 48°30'32.8"W) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), em Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. Os procedimentos experimentais adotados seguiram o protocolo aprovado (PP00788) pela Comissão de Ética no Uso de Animais desta instituição.

As larvas de *R. quelen* utilizadas nos tratamentos masculinizantes, foram obtidas pela reprodução artificial de exemplares selvagens capturados na região do alto rio Uruguai, mantidos no banco de reprodutores do LAPAD. Um espécime testemunho da espécie está depositado no Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina (MZUEL 10549).

A reprodução foi induzida por hipofisacção (Woynarovich e Horváth, 1980), sendo utilizado um pool de ovos proveniente de duas fêmeas e um pool de sêmen de dois machos. Os ovos fertilizados foram incubados em incubadoras (cilindro-cônicas), abastecidas por um sistema controlado de recirculação de água com temperatura média (\pm dp) de $25,2 \pm 0,2^\circ\text{C}$.

Masculinização

Durante 21 dias, grupos de larvas no início da alimentação exógena, com 2 dias pós-eclosão (DPE) foram alimentados separadamente cinco vezes ao dia com dieta artificial contendo 17α -metiltestosterona (MT) nas dosagens de 60, 90 ou 120 mg kg^{-1} de ração.

A incorporação de MT foi realizada de acordo com o método da evaporação de álcool etílico (Shelton et al., 1981) em ração comercial contendo 55% de proteína bruta. As dietas preparadas com cada dose de MT foram peneiradas (0-250, 250-650 e 650-850 μm), embaladas individualmente e refrigeradas até o momento de serem oferecidas na primeira (0-250 μm), segunda (250-650 μm) e terceira semana (650-850 μm) de alimentação.

Após o período de tratamento masculinizante, os peixes foram cultivados até a maturação sexual dentro de um sistema controlado de recirculação de água com temperatura média (\pm dp) de $25,3 \pm 1,4^\circ\text{C}$.

Machos fenotípicos com oito meses de idade, provenientes de cada dose masculinizante de MT, que liberaram sêmen por leve pressão no abdômen foram marcados individualmente com PIT-tags para a realização dos testes de progênie.

Testes de progênie

Para identificação dos neomachos foram realizados dois testes de progênie. No primeiro o sêmen de cada macho proveniente dos diferentes tratamentos masculinizantes foi utilizado para fertilizar um pool contendo ovos de duas fêmeas selvagens, sendo selecionados os machos que produziram progênies com predomínio de fêmeas. No segundo teste, os machos selecionados foram utilizados para fertilizar alíquotas individualizadas de ovos coletados manualmente de outras três fêmeas selvagens diferentes daquelas utilizadas no teste inicial, para confirmação do predomínio de fêmeas em suas progênies.

Teste I

Neste teste foram utilizados cinco machos fenotípicos provenientes das doses masculinizante de MT 60, 90 e 120 mg kg⁻¹ de ração, que apresentavam peso médio (\pm dp) de 156,54 \pm 46,11 g, 316,20 \pm 98,67 g e 277,18 \pm 59,08 g, respectivamente, e duas fêmeas do plantel de reprodutores, que apresentavam peso de 650,20 \pm 212,06 g, com abdômen inchado e papila genital avermelhada, condição característica de fêmeas aptas à reprodução artificial.

A desova foi induzida por hipofiseação de todos os peixes (Woynarovich e Horváth, 1980). As fêmeas receberam duas doses (0,5 e 5,0 mg kg⁻¹) de extrato pituitário de carpa (EPC) com intervalo de 12 horas entre as doses e os machos receberam uma dose (4,0 mg kg⁻¹) no momento da segunda dose aplicada na fêmea.

Após a coleta dos ovócitos das duas fêmeas e posterior mistura para a formação de um pool, alíquotas de 5,0 g foram fertilizadas individualmente com cada amostra de sêmen. Os ovos fertilizados foram incubados separadamente em incubadoras (cilíndrico-cônicas) abastecidas por um sistema controlado de recirculação de água, com temperatura de 24,9 \pm 0,4°C.

As progênies de cada um dos machos foram cultivadas separadamente por 150 dias em tanques circulares (60 L) abastecidos por um sistema controlado de recirculação de água, com densidade inicial de 6 larvas L⁻¹. Durante 15 dias a alimentação foi realizada exclusivamente com náuplios de *Artemia* sp., previamente submetidos à um banho de imersão por 30 minutos em solução enriquecida (Leite em pó suplementado + Farinha de fígado bovino + Caseína + Cloreto de colina + PREMIX vitamínico e mineral + Óleo de peixe bruto + Óleo de girassol) com o objetivo de fortalecer nutricionalmente as larvas. Os ingredientes e as quantidades da solução enriquecedora foram adaptados de acordo com Dias *et al.* (2011) e Cardoso *et al.* (2004). Do 15º ao 30º dia as larvas passaram a ser alimentadas simultaneamente com a *Artemia* sp. enriquecida, uma mistura (1:1) peneirada (650-850 μ m) de farinha de fígado bovino e ração micro floculada com 44% de proteína bruta (PB). Após este período, a *Artemia* sp. foi retirada da alimentação e somente a mistura da farinha de fígado bovino com a ração micro floculada foi fornecida até os juvenis completarem 2 meses de vida, quando passaram a receber ração comercial (pellets de 2-4 mm) com 40% PB.

Após este período, 30 peixes de cada prole foram amostrados aleatoriamente e eutanasiados com eugenol (60 ppm) para determinação do sexo. Para as progênes que apresentaram um desvio significativo em favor das fêmeas ($P < 0,05$), a amostragem foi estendida para 90 peixes, ou a totalidade presente na unidade experimental quando o número de peixes era inferior a 90.

As gônadas foram removidas por meio de incisão ventral e o sexo foi determinado macroscopicamente (Figs 10a, 10b). Nos peixes que apresentavam gônadas diminutas, dificultando a sexagem por visualização macroscópica, a definição do sexo foi realizada através da técnica do *imprint* (impressão tecidual em lâmina) utilizando microscópio de luz (Leica[®] DM 3000) (Figs. 10c, 10d). Os peixes com gônadas indiferenciadas foram excluídos, ou seja, somente os peixes com gônadas passíveis de serem sexadas foram considerados para a avaliação da proporção sexual.

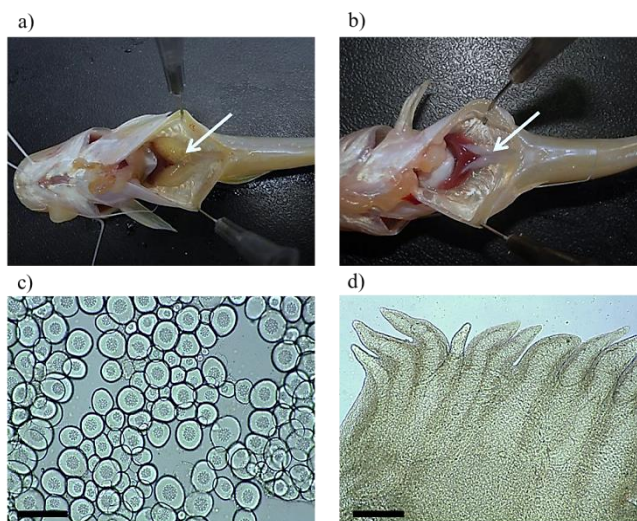


Figura 10. Visualização das gônadas para a classificação do sexo das progênes de *Rhamdia quelen* geradas durante o estudo. (a) Gônada feminina com estruturas pares saculiformes de coloração amarelada translúcida. (b) Gônada masculina com estruturas pares alongadas de coloração esbranquiçada. (c) Ovócitos aparentes quando aplicada a técnica do *imprint*. (d) Projeções digitiformes das gônadas masculinas quando aplicada a técnica do *imprint*. Barras: 200 μ m.

No momento da sexagem foi realizada uma biometria individual, na qual foram obtidos o peso (g) e o comprimento (cm) dos animais.

Teste II

Os machos fenotípicos que geraram progênes com maior proporção de fêmeas no primeiro teste de progênie foram utilizados em uma nova reprodução seis meses após o início do primeiro teste. O sêmen de cada macho foi utilizado para fertilizar alíquotas individualizadas de três fêmeas selvagens maduras ($733,49 \pm 94,48$ g) do plantel de reprodutores, diferentes daquelas utilizadas no teste inicial.

Todos os peixes foram submetidos à reprodução induzida conforme descrito anteriormente. Neste teste de progênie o sêmen de um macho (310,0 g) proveniente do plantel de reprodutores selvagens, que não recebeu tratamento masculinizante, foi utilizado como controle.

O cultivo das progênes e a identificação do sexo foram realizados conforme descrito no primeiro teste. Entretanto, no teste II, todos os peixes presentes das unidades experimentais foram amostrados, sendo 50 o número mínimo de animais analisados.

Análise estatística

A proporção entre machos e fêmeas foi avaliada através do teste do qui-quadrado, considerando-se a proporção sexual esperada de 1:1 (Zar, 2010).

No primeiro teste de progênie, as proporções sexuais de todas as progênes foram submetidas ao teste de heterogeneidade do qui-quadrado ($\alpha = 0,05$), testando-se a hipótese (H_0) de que a proporção de machos e fêmeas independe do macho reprodutor (Zar, 2010).

Como houve heterogeneidade o teste foi aplicado novamente, comparando-se as progênes combinadas em dois grupos: I – composto por progênes com proporção sexual maior de machos ou balanceada (1:1); II – progênes com frequência maior de fêmeas.

No segundo teste de progênie, as progênes de cada macho reprodutor foram submetidas ao teste de heterogeneidade, avaliando a hipótese de que as proporções sexuais entre as progênes são semelhantes, independentemente das fêmeas reprodutoras.

Como não houve heterogeneidade, as proporções sexuais das progênes de cada macho foram combinadas e comparadas entre os machos provenientes de cada dose de MT através do teste binomial ($\alpha = 0,05$) para duas proporções (Zar, 2010), testando-se a hipótese de que a dose hormonal utilizada para masculinizar o *R. quelen* não influencia a proporção sexual da progênie resultante do cruzamento do neomacho com cada fêmea reprodutora.

Resultados

Teste I

O peso e o comprimento médios (\pm dp) de todas as progênes geradas foram similares: $6,56 \pm 4,17$ g e $9,89 \pm 1,81$ cm.

Um macho fenotípico proveniente de cada dose masculinizante de MT originou progênie com maior proporção sexual de fêmeas ($P < 0,05$), sendo que nas demais progênes a proporção sexual foi balanceada (1:1) ($P > 0,05$) ou com maior presença de machos ($P < 0,05$) (Tabela 6). Somente um macho do tratamento masculinizante com a dose de MT 60 mg kg^{-1} de ração não respondeu à indução com EPC e não liberou sêmen para a fertilização.

Tabela 6. Proporções sexuais das descendências de *Rhamdia quelen* do teste de progênie I, resultantes dos cruzamentos entre os machos fenotípicos provenientes das diferentes doses masculinizantes de 17α -metiltestosterona (MT) e o pool de ovos provenientes de duas fêmeas do plantel de reprodutores selvagens.

Machos reprodutores	MT kg de ração^{-1}					
	60 mg kg^{-1}		90 mg kg^{-1}		120 mg kg^{-1}	
	♂ (%)	♀ (%)	♂ (%)	♀ (%)	♂ (%)	♀ (%)
1	16 (53)	14 (47)	18 (60)	12 (40)	13 (43)	17 (57)
2	23*(77)	07 (23)	18 (60)	12 (40)	18 (60)	12 (40)
3	22 (24)	68*(76)	18 (60)	12 (40)	12 (13)	78*(87)
4	21*(70)	09 (30)	24*(80)	06 (20)	23*(77)	07 (23)
5	--	--	24 (27)	64*(73)	12 (48)	13 (52)

* Diferença significativa na proporção sexual pelo teste do qui-quadrado ($P < 0,05$), considerando uma proporção esperada de 1:1.

-- exemplar que não respondeu a indução hormonal com EPC para a liberação de sêmen.

O teste de heterogeneidade evidenciou influência do macho reprodutor na proporção sexual da progênie ($\chi^2 = 68,92$; $gl = 13$; $P < 0,05$). Quando as progênies foram combinadas e as proporções foram comparadas dentro de cada grupo, a influência do macho reprodutor não foi observada entre as progênies com proporção sexual balanceada ou com predomínio de machos ($\chi^2 = 9,62$; $gl = 10$; $P = 0,47$), bem como entre as progênies com predomínio de fêmeas ($\chi^2 = 3,25$; $gl = 2$; $P = 0,20$). A heterogeneidade resultante da combinação de todas as progênies pode então ser atribuída ao predomínio de fêmeas na progênie gerada por três machos, sendo um de cada dose masculinizante, que foram denominados M60, M90 e M120.

Teste II

Neste teste o peso e o comprimento médio ($\pm dp$) de todos os peixes foram semelhantes: $10,14 \pm 3,46$ g e $10,74 \pm 1,29$ cm, respectivamente.

As proporções de fêmeas nas progênies de cada um dos três machos fenotípicos, M60, M90 e M120, foram significativamente maiores ($P < 0,05$), corroborando com os resultados encontrados no primeiro teste de progênie (Fig. 11). Independentemente da fêmea reprodutora, o predomínio de fêmeas, evidenciado pelo teste de heterogeneidade, foi consistente entre as progênies de cada macho, com uma proporção que variou entre 70 e 90%, o que demonstra que estes exemplares são neomachos de *R. quelen*.

Nos cruzamentos entre o macho controle e as fêmeas reprodutoras, duas progênies apresentaram proporção sexual balanceada (1:1) e em uma progênie predominaram machos, resultando em heterogeneidade das proporções ($\chi^2 = 9,99$; $gl = 2$; $P < 0,05$).

Quando combinadas as progênies de cada neomacho e comparadas às proporções sexuais entre eles, verificou-se que o peixe masculinizado com a dose de MT 60 mg kg^{-1} de ração produziu uma proporção de fêmeas ($73,4 \pm 4,2\%$) significativamente menor ($P < 0,05$) que os peixes masculinizados com 80 ($84,2 \pm 1,2\%$) ou 100 mg kg^{-1} de ração ($82,5 \pm 10,2\%$), não havendo diferenças entre as maiores doses ($P > 0,05$).

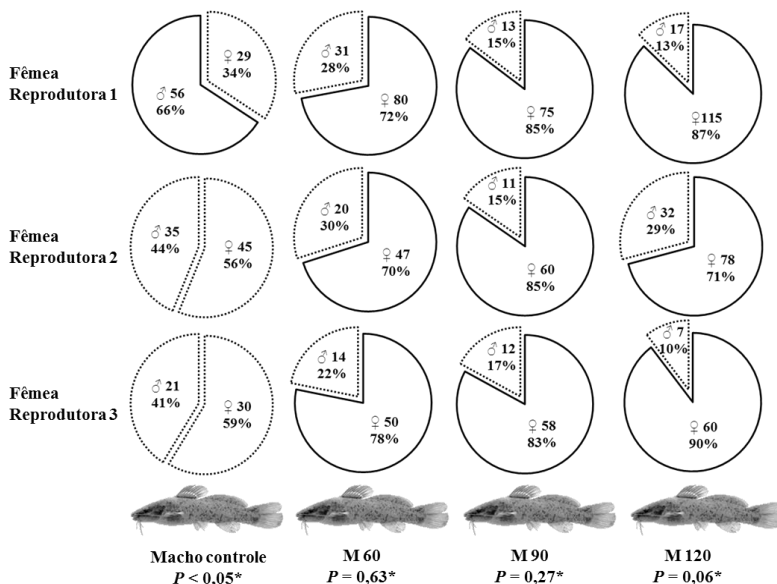


Figura 11. Proporção sexual das descendências de *Rhamdia quelen* geradas no teste de progênie II, realizado com os machos provenientes das doses de MT 60 (M60), 90 (M90) e 120 mg kg⁻¹ de ração (M120). A linha contínua indica maior proporção de machos ou de fêmeas e a linha pontilhada indica menor proporção sexual ou equilíbrio pelo teste do qui-quadrado ($P < 0,05$), considerando-se a proporção esperada de 1:1.* Probabilidade do teste de heterogeneidade do qui-quadrado.

Discussão

Os machos fenotípicos, provenientes das diferentes doses masculinizantes de MT e avaliados nos testes de progênie, permaneceram desde as fases iniciais de vida em um sistema de recirculação de água com temperatura ($25,3 \pm 1,4^{\circ}\text{C}$) e foto período (12 horas de luz) controlado. Nestas condições, os machos estavam maduros aos oito meses de idade, semelhante ao registrado para *R. quelen* cultivado em viveiros de terra na região Sul do Brasil (Ghiraldelli *et al.*, 2007).

Ao contrário do que ocorre na feminilização do *Betta splendens* na qual a maturação sexual das neofêmeas (machos feminilizados) é postergada quando comparada com fêmeas normais (fêmeas fenotípicas e genotípicas) (Pandian et al., 1994), o desenvolvimento testicular dos neomachos de *R. quelen* acompanha o do macho normal (fenotípico e genotípico), pois ambos liberaram sêmen na mesma época. Aparentemente, a formação do ducto espermático em fêmeas masculinizadas de *R. quelen* ocorre sem anormalidades, diferente do encontrado para *Oncorhynchus mykiss*, cujos neomachos não possuem ducto espermático e precisam ser eutanasiados para a coleta do sêmen (Kowalski et al., 2011), o que é outra característica importante dos neomachos de *R. quelen*.

Somente 8% de todos os peixes sexados durante os testes de progênie apresentaram gônadas indiferenciadas. Ou seja, com 150 dias de idade a maioria dos peixes apresentou gônadas passíveis de identificação macroscópica ou com a técnica do *imprint*, caso fosse necessário.

Em *Oreochromis niloticus* a sexagem segura das gônadas ocorre a partir dos 90 dias de vida, independentemente do método utilizado: exame macroscópico da papila urogenital, exame microscópico das gônadas coradas a fresco com acetato-carmim ou exame microscópico das gônadas pela rotina histológica (Makino et al., 2009).

As progênies geradas no Teste I que apresentaram proporção sexual balanceada ou com predomínio de machos foram semelhantes às proporções resultantes do cruzamento com macho livre de hormônio (controle) no segundo teste de progênie, demonstrando que os cruzamentos ocorreram com machos fenotípicos e genotípicos.

Em contrapartida, o predomínio de fêmeas nas progênies dos machos fenotípicos M60, M90 e M120 nos dois testes de progênie demonstra que eles são reprodutores neomachos. Embora nenhuma progênie 100% feminina tenha sido produzida, cada um destes neomachos participou de quatro reproduções e independentemente da fêmea reprodutora utilizada, o predomínio de fêmeas foi significativo nas suas progênies.

Uma progênie 100% feminina esperada no cruzamento de fêmeas normais homogaméticas (XX) com neomachos (XX), como ocorre em salmonídeos (Donaldson e Devlin, 1996), nem sempre é produzida em algumas espécies devido à participação de outros fatores genéticos e ambientais (principalmente temperatura) na determinação do sexo, além da presença de cromossomos sexuais (Desprez et al., 2006; Devlin e Nagahama, 2002; Kirankumar e Pandian, 2002).

Testes de progênie com neomachos XX de *Betta splendens* produziram 13% de machos nas suas progênies, indicando a possível participação de genes autossômicos na determinação do sexo (Kirankumar e Pandian, 2002). Em *Perca fluviatilis*, os cruzamentos com neomachos resultaram em progênies com 95 a 100% de fêmeas, enquanto que os reprodutores normais geraram progênies desbalanceadas em favor de ambos os sexos (Rougeot et al., 2002). Os autores do estudo sugeriram um modelo com fêmeas homogaméticas (XX) sob a influência de fatores autossômicos ou poligênicos na determinação do sexo.

A temperatura da água é um dos principais fatores que podem influenciar o processo de diferenciação sexual fisiológica em peixes (Nakamura et al., 1998; Ospina-Alvarez e Piferrer, 2008). Entretanto, diferentes temperaturas (19, 25 e 30°C) de fertilização e incubação dos ovos (Longo e Nuñez, 2010), bem como diferentes temperaturas (19, 24 e 29°C) durante a fase inicial de desenvolvimento (Sulis-Costa et al., 2013), não alteraram a proporção sexual do *R. quelen*.

Uma vez que a determinação do sexo envolve vias complexas, não é surpreendente a participação de genes autossômicos quando a proporção sexual da progênie é desbalanceada (Devlin e Nagahama, 2002). Como a presença de cromossomos sexuais não está relatada para *R. quelen*, além de não estar claro o sistema de determinação sexual da espécie, a definição do sexo pode estar atrelada a um conjunto de cromossomos autossômicos, como ocorre em *Pseudoplatystoma corruscans*, outra espécie de Siluriformes (Piferrer, 2001).

Por outro lado, pertencer a uma mesma ordem ou gênero não garante semelhanças quanto ao mecanismo envolvido na determinação do sexo. O gênero *Oreochromis* apresenta dois modelos de determinação do sexo, machos homogaméticos (ZZ/WZ) e fêmeas homogaméticas (XX/XY) (Mair et al., 1991; Müller-Belecke e Hörstgen-Schwark, 1995). Mesmo com dois sistemas definidos, desvios nas proporções sexuais das progênies sugerem a influência de outros fatores na determinação do sexo neste gênero (Baroiller e D'Cotta, 2001; Desprez et al., 2003; Mair et al., 1991).

Alguns estudos tratam como fundamental a identificação dos genes envolvidos na diferenciação gonadal de cada sexo para uma melhor compreensão do mecanismo de determinação sexual em peixes (Siegfried, 2010), sendo que para poucas espécies estes genes já foram encontrados (Kamiya et al., 2012; Matsuda et al., 2002; Yano et al., 2012), e são utilizados como marcadores cromossômicos para a distinção dos pares de cromossomos sexuais (Okutsu et al., 2015).

Além disso, pesquisas de genômica funcional atualmente aplicada a peixes são capazes de identificar os genes complementares que se somam aos genes-chave envolvidos na determinação do sexo, através de técnica transcriptoma (reflexo das expressões gênicas) (Lu et al., 2014; Sun et al., 2013; Tao et al., 2013; Yano et al., 2012; Zhang et al., 2011).

Os cruzamentos com os neomachos produziram, em média (\pm dp), progênies com $80,06 \pm 7,46\%$ de fêmeas. Como essas progênies não foram 100% femininas, é possível que exista a participação de genes autossômicos ou interações poligênicas na determinação sexual de *R. quelen*.

Com a proporção feminina obtida, o cultivo da espécie se tornaria ainda mais interessante, uma vez que as fêmeas apresentam crescimento 30% superior ao dos machos (Baldisserotto e Radünz, 2004), propiciando um acréscimo considerável de biomassa ao final do ciclo de produção.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do estudo através do Projeto Universal (Processo 486868/2013-3). À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudo do autor.

Referências

- Amaral Junior, H., Nunes, M.F.S., Garcia, S., 2008. Análise de diferentes dosagens de hormônio na ração, para definição de um protocolo de feminilização do jundiá *Rhamdia quelen*. Revista Electrónica de Veterinaria 25, 1-7.
- Baldisserotto, B., Radünz, J., 2004. Criação de jundiá. UFSM, Santa Maria, RS, Brazil.
- Barcellos, L.J.G., Woehl, V.M., Wassermann, G.F., Quevedo, R.M., Itzès, I., Krieger, M.H., 2001. Plasma levels of cortisol and glucose in response to capture and tank transference in *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard), a South American catfish. Aquac Res. 32, 121-123.

- Baroiller, J.F., D'Cotta, H., 2001. Environment and sex determination in farmed fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 130, 399-409.
- Cardoso, A.P., Radünz Neto, J., Medeiros, T.S., Knöpker, M.A., Lazzari, R., 2004. Criação de larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*) alimentadas com rações granuladas contendo fígados ou hidrolisados. *Acta. Sci. Anim. Sci.* 26(4), 457-462.
- Clemens, H.P., Inslee, T., 1968. The production of unisexual broods by *Tilapia mossambica* sex-reversed with methyltestosterone. *T Am Fish Soc.* 97, 18-21.
- Desprez, D., Briand, C., Hoareau, M.C., Mélard, C., Bosc, P., Baroiller, J.F., 2006. Study of sex ratio in progeny of a complex *Oreochromis* hybrid, the Florida red tilapia. *Aquaculture*. 251, 231-237.
- Desprez, D., Gérard, E., Hoareau, M.C., Mélard, C., Bosc, P., Baroiller, J.F., 2003. Production of a high percentage of male offspring with a natural androgen, 11 β -hydroxyandrostenedione (11 β OHA4), in Florida red tilapia. *Aquaculture*. 216, 55-65.
- 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.
- Dias, D.C., Corrêa, C.F., Leonardo, A.F., Tachibana, L., Romagosa, E., Ranzani-Paiva, M.J.T., 2011. Probiótico na larvicultura de matrinxã, *Brycon amazonicus*. *Acta Sci Anim Sci.* 33(4), 365-368.
- Donaldson, E.M., Devlin, R.H., 1996. Uses of Biotechnology to Enhance Production. in: William, P., Bruce, A.B. (Eds.), *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*. Elsevier, pp. 969-1020.
- El-Sayed, A.F.M., 2006. *Tilapia culture*. CABI Publishing, Cambridge.
- Feist, G., Yeoh, C.-G., Fitzpatrick, M.S., Schreck, C.B., 1995. The production of functional sex-reversed male rainbow trout with 17 α -methyltestosterone and 11 β -hydroxyandrostenedione. *Aquaculture*. 131, 145-152.
- Fracalossi, D.M., Zaniboni-Filho, E., Meurer, S., 2002. No rastro das espécies nativas. *Panorama da Aquicultura*. 12, 43-49.

- George, T., Pandian, T.J., 1996. Hormonal induction of sex reversal and progeny testing in the zebra cichlid *Cichlasoma nigrofasciatum*. *J Exp Zool.* 275, 374-382.
- Ghiraldelli, L., Machado, C., Fracalossi, D.M., Zaniboni-Filho, E., 2007. Desenvolvimento gonadal do jundiá, *Rhamdia quelen* (Teleostei, Siluriformes), em viveiros de terra, na região Sul do Brasil. *Acta Sci Biol Sci.* 29, 349-356.
- Gomelsky, B., 2003. Chromosome set manipulation and sex control in common carp: a review. *Aquat Living Resour.* 16, 408-415.
- Gomes, L.C., Golombieski, J.I., Chippari, A.R., Baldisserotto, B., 2000. Biologia do Jundiá (Teleostei, Pimelodidae). *Cienc Rural.* 30, 179-185.
- Hunter, G.A., Donaldson, E.M., Stoss, J., Baker, I., 1983. Genetics in Aquaculture Production of monosex female groups of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) by the fertilization of normal ova with sperm from sex-reversed females. *Aquaculture.* 33, 355-364.
- Kavumpurath, S., Pandian, T.J., 1994. Masculinization of fighting fish, *Betta splendens* Regan, using synthetic or natural androgens. *Aquac Res.* 25, 373-381.
- Kirankumar, S., Pandian, T.J., 2002. Effect on growth and reproduction of hormone immersed and masculinized fighting fish *Betta splendens*. *J Exp Zool.* 293, 606-616.
- Kowalski, R.K., Sarosiek, B., Demianowicz, W., Judek, J., Goryczko, K., Dobosz, S., Kuźmiński, H., Demska-Zakęś, K., Babiak, I., Glogowski, J., 2011. Quantitative characteristics of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, neo-males (XX genotype) and super-males (YY genotype) sperm. *International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering.* 5, 315-322.
- Longo, R.S., Nuñez, A.P.O., 2010. Temperatures for fertilization and hatching and their influence on determining the sex ratio of the silver catfish, *Rhamdia quelen*. *Acta Scientiarum Biological Sciences.* 32, 107-111.

- Mair, G.C., Scott, A.G., Penman, D.J., Beardmore, J.A., Skibinski, D.O.F., 1991. Sex determination in the genus *Oreochromis*. Theoret. Appl. Genetics. 82, 144-152.
- Müller-Belecke, A., Hörstgen-Schwark, G., 1995. Sex determination in tilapia (*Oreochromis niloticus*) sex ratios in homozygous gynogenetic progeny and their offspring. Aquaculture. 137, 57-65.
- Nakamura, M., Kobayashi, T., Chang, X.-T., Nagahama, Y., 1998. Gonadal sex differentiation in teleost fish. J Exp Zool. 281, 362-372.
- Ospina-Álvarez, N., Piferrer, F., 2008. Temperature-Dependent Sex Determination in Fish Revisited: Prevalence, a Single Sex Ratio Response Pattern, and Possible Effects of Climate Change. Plos One. 3, e2837.
- Pandian, T.J., 2013. Sex Reversal. in: Pandian, T.J. (Ed.), Endocrine Sex Differentiation in Fish. CRC Press, Florida, pp. 175-212.
- Pandian, T.J., Sheela, S.G., Kavumpurath, S., 1994. Endocrine sex reversal in fishes: Masculinization evokes greater stress and mortality. Current Science. 66, 240-243.
- Piferrer, F., 2001. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. Aquaculture. 197, 229-281.
- Piferrer, F., Donaldson, E.M., 1989. Gonadal differentiation in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, after a single treatment with androgen or estrogen at different stages during ontogenesis. Aquaculture. 77, 251-262.
- 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.
- Silveira, F.S., Silva, F.M., Casaca, J.M., 2014. Desempenho Catarinense na Piscicultura de Água Doce. EPAGRI - CEDAP, Florianópolis.
- Sulis-Costa, R., Jimenez, J.E., Weingartner, M., Nuñez, A.P.O., 2013. Efeito da temperatura da água na fase inicial de vida e na proporção sexual do jundiá. Boletim do Instituto de Pesca. 39, 379-388.

- Toledo-Filho, S. A., Forest, F., Almeida-Toledo, L. F. 1996. Biotecnologia genética aplicada à piscicultura. Caderno de Ictiogenética III. USP, São Paulo, SP, Brazil.
- Woynarovich, E., Horváth, L., 1983. A propagação artificial de peixes de águas tropicais. FAO/CODEVASF/CNPq, Brasília, Brazil.
- Zar, J.H., 2010. Biostatistical analysis, 5 ed. Prentice Hall, New Jersey.

CONCLUSÕES GERAIS

- I. A administração oral de 17 α -metiltestosterona (MT) incorporado em ração foi eficaz para masculinizar fêmeas de *Rhamdia quelen*;
- II. Gônadas intersexuais foram encontradas em peixes submetidos a todas as doses de MT testadas no ensaio de masculinização;
- III. Efeitos inibitórios de desenvolvimento gonadal causados pelas maiores doses testadas de MT foram observados em gônadas femininas e masculinas de *R. quelen*;
- IV. Os resultados obtidos no ensaio de masculinização indicaram a necessidade de um ajuste no período de alimentação com MT para melhorar as taxas de inversão sexual, assim como a necessidade de um período superior a 150 dias pós-eclosão para que toda a descendência apresentasse diferenciação sexual completa nas condições ambientais utilizadas;
- V. Três neomachos de *R. quelen* foram identificados pelos testes de progênie; em conjunto esses neomachos produziram, em média (\pm dp), progênies com $80,06 \pm 7,46\%$ de fêmeas;
- VI. Como os neomachos não produziram progênies 100% femininas, é provável que a definição do sexo em *R. quelen* esteja atrelada a um conjunto de cromossomos autossômicos e/ou a interações poligênicas com possíveis influências ambientais.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar dos cruzamentos com os neomachos de *Rhamdia quelen* não terem produzido descendências 100% femininas os resultados foram animadores, uma vez que estes animais produziram descendências livres de hormônios compostas, em média (\pm dp), por $80,06 \pm 7,46\%$ de fêmeas. Com esta proporção feminina o cultivo se tornaria ainda mais produtivo, pois como as fêmeas apresentam crescimento 30% superior ao dos machos, haveria um acréscimo considerável de biomassa ao final do ciclo de produção.

A aplicação da técnica de inversão sexual indireta, garantindo a obtenção de descendências femininas livres de hormônio através de reprodutores neomachos foi um grande desafio, uma vez que não havia nenhuma garantia de que isto fosse possível, ou seja, se a masculinização iria ocorrer e se estas fêmeas masculinizadas iriam ser funcionais reprodutivamente. Este desafio se intensificou em alguns momentos, com a ocorrência inesperada de mortalidades no meio do período experimental e a necessidade de recomeçar os experimentos seguidas vezes. Vale destacar que a melhoria na qualidade da alimentação oferecida aos peixes foi determinante para contornar os eventos de mortandades, tendo sido utilizada uma emulsão nutritiva junto com a *Artemia* sp. durante a larvicultura e uma ração para peixes ornamentais misturada com farinha de fígado bovino durante a fase juvenil.

Este projeto está sendo financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) através do Projeto Universal 486868/2013-3, que tem prazo de conclusão em dezembro/2016, e devido ao atraso ocorrido pelos eventos de mortalidades massivas, a realização de cultivos experimentais em tanques-rede para comparação do crescimento do lote de peixes produzido pelos neomachos com lote produzido por casais normais e a avaliação da composição proximal das dietas utilizadas e da composição corporal dos peixes cultivados nos tanques-rede será desenvolvida até o final do projeto.

Por fim, destaca-se que a primeira etapa dos testes de progênie, descrita no resumo expandido intitulado “Identificação de neomachos de jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824)”, apresentado na forma de painel, foi agraciado com menção honrosa (Anexo B) no XIX Congresso Brasileiro de Engenharia de Pesca, que aconteceu no período de 04 a 08 de outubro de 2015 na Universidade Federal do Maranhão.

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO E METODOLOGIA GERAL

AGOSTINHO, A.A.; GOMES, L.C.; SUZUKI, H.I.; JÚLIO JR, H.F. Riscos da implantação de cultivos de espécies exóticas em tanques-rede em reservatórios do Rio Iguaçu. **Caderno da biodiversidade**, v.2(2), p.1-9, 1999.

ALMEIDA, S.C.A.; NUÑER, A.P.O. Crescimento de *Pimelodus maculatus* (Actinopterygii, Pimelodidae) estocados em diferentes densidades em tanques-rede. **Biotemas**, v.22, p.113-119, 2009.

AMARAL JUNIOR, H.; 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*. **Revista Electrónica de Veterinaria**, v.25, p.1-7, 2008.

AMARAL-JUNIOR, H. **Influência da rede jundiá na piscicultura do estado de Santa Catarina** – Workshop sobre jundiá. Passo Fundo: Editora da Universidade de Passo Fundo, 2013.

AYROZA, D.M.M.R.; FURLANETO, F.P.B.; AYROZA, L.M.S. Regularização dos projetos de tanques-rede em águas públicas continentais de domínio da união no estado de São Paulo. **Boletim Técnico do Instituto de Pesca**, v.36, p.1-32, 2006.

BALDISSEROTTO, B.; RADÜNZ, J. **Criação de jundiá**. Santa Maria: Editora da UFSM, 2004. 232p.

BARCELLOS, L.J.; KREUTZ, L.C.; QUEVEDO, R.M.; FIOREZE, I.; CERICATO, L.; SOSO, A.B.; FAGUNDES, M.; CONRAD, J.; BALDISSERA, R.K.; BRUSCHI, A.; RITTER, F. Nursery rearing of jundia, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard) in cages: cage type, stocking density and stress response to confinement. **Aquaculture**, v.232, p.383-394, 2004.

BARCELLOS, L.J.G.; WOEHL, V.M.; WASSERMANN, G.F.; QUEVEDO, R.M., ITTZÉS, I.; KRIEGER, M.H.. Plasma levels of cortisol and glucose in response to capture and tank transference in *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard), a South American catfish. **Aquaculture Resarch**, v.32, p.121-123, 2001.

- BAROILLER, J.F.; GUIGUEN, Y.; FOSTIER, A. Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. **Cellular and Molecular Life**, v.55, p.910-931, 1999.
- BEARDMORE, J.A.; MAIR, G.C.; LEWIS, R.I. Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: applications, problems and prospects. **Aquaculture**, v.197, p.283-301, 2001.
- BEJMA, J.; WALSH, D.; KENDIRCI, M.; HELLSTROM, W. Controversies regarding testosterone supplementation in the prostate cancer patient. **Current Sexual Health Reports**, v.2, p.41-44, 2005.
- BEUX, L.F.; FRACALOSSO, D.M.; ZANIBONI-FILHO, E.; NUÑER, A.P.O.; WEINGARTNER, M. Tecnologia de produção de peixes nativos em tanques-rede nos reservatórios de Machadinho e Itá, Rio Uruguai. In: CYRINO, J.E.P.; SCORVO FILHO, J.D.; SAMPAIO, L.A.; CAVALLI, R.O. (Org.). **Tópicos Especiais em Biologia Aquática e Aqüicultura II**. 1ª ed. Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Aqüicultura e Biologia Aquática, v.2, p.53-68. 2008.
- BEZ, M.F. **Proposição de índice de qualidade de água para o zoneamento de parques aquícolas no reservatório da Usina Hidrelétrica de Barra Grande**. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Programa de Pós-graduação em Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2011.
- BØHN, T.; AMUNDSEN, P.; SPARROW, A. Competitive exclusion after invasion? **Biological Invasion**, v.10, p.359-368, 2008.
- BORGHETTI, N.R.B.; OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J.R. Aqüicultura: **Uma Visão Geral Sobre a Produção de Organismos Aquáticos no Brasil e no Mundo**. Curitiba: Grupo integrado de aqüicultura e estudos ambientais. 2003. 128p.
- BROL, F.F. **Influência do cultivo de *Brycon orbignyanus* em tanques-rede sobre a qualidade de água do reservatório da usina hidroelétrica Machadinho**. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Programa de Pós-graduação em Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2006.

CALHOUN, W.E.; SHELTON, W.L. Sex ratios of progeny from mass spawning of sex reversed broodstock of *Tilapia nilotica*. **Aquaculture**, v.33, p.365-371, 1983.

CAMPOS-RAMOS, R.; HARVEY, S.C.; MCANDREW, B.J.; PENMAN D.J. An investigation of sex determination in the Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus*, using synaptonemal complex analysis, FISH, sex reversal and gynogenesis. **Aquaculture**, v.221, p.125-140, 2003.

CARDOSO, A.P.; RADÜNZ NETO, J.; MEDEIROS, T.S.; KNÖPKER, M.A.; LAZZARI, R. Criação de larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*) alimentadas com rações granuladas contendo fígados ou hidrolisados. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v.26(4), p.457-462, 2004.

CARNEIRO, P.C.F.; BENDHACK, F.; MIKOS, J.D.; SCHORER, M.; OLIVEIRA FILHO, P.; BALDISSEROTTO, B.; GOLOMBIESKI, J.I. Jundiá: um grande peixe para a região do sul. **Panorama da Aqüicultura**, v.12(69), p.41-46, 2002.

CASSINI, C.A. **Estrutura da população e distribuição espacial de *Pimelodus maculatus* Lacépède, 1803 (Siluriformes, Pimelodidae), *Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard, 1824 (Siluriformes, Pimelodidae) e *Schizodon aff nasutus* Kner, 1859 (Characiformes, Anostomidae), no Alto rio Uruguai, Brasil.** Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Programa de Pós-graduação em Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 1998.

CAVALCANTE, D.P. **Criação de peixes nativos em tanques-rede: influência sobre a qualidade da água e sobre as populações planctônicas do reservatório da Usina Hidrelétrica Itá.** Tese (Doutorado em Aquicultura) – Programa de Pós-graduação em Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2010.

CLEMENS, H.P.; INSLEE, T. The production of unisexual broods by *Tilapia mossambica* sex-reversed with methyltestosterone. **Transactions of the American Fisheries Society**, v.97, p.18-21, 1968.

COSTA, R.S. **Criação de piavas, *Leporinus obtusidens* (Valenciennes, 1837) em tanques-rede no reservatório da usina hidrelétrica de Itá, rio Uruguai, Santa Catarina.** Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Programa de Pós-graduação em Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2012.

DESPREZ, D.; BRIAND, C.; HOAREAU, M.C.; MÉLARD, C.; BOSC, P.; BAROILLER, J.F. Study of sex ratio in progeny of a complex *Oreochromis* hybrid, the Florida red tilapia. **Aquaculture**, v.251, p.231-237, 2006.

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.

DIAS, D.C.; CORRÊA, C.F.; LEONARDO, A.F.; TACHIBANA, L.; ROMAGOSA, E.; RANZANI-PAIVA, M.J.T. Probiótico na larvicultura de matrinxã, *Brycon amazonicus*. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v.33(4), p.365-368, 2011.

DONALDSON, E.M.; FAGERLUND, U.H.M.; HIGGS, D.A.; MCBRIDE, J.R. Hormonal enhancement of growth. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.8, p.456-578, 1979.

DUNHAN, R.A. **Aquaculture and Fisheries Biotechnology: Genetic Approaches.** Wallingford: CABI Publishing, 2004. 372p.

EL-SAYED, A. F. M. **Tilapia culture.** Cambridge: CABI Publishing, 2006. 277p.

EPAGRI/CEDAP (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina / Centro de Desenvolvimento em Aquicultura e Pesca), 2015. **Desempenho da piscicultura de água doce: 2014.**

Disponível em:

http://www.epagri.sc.gov.br/wcontent/uploads/2013/08/Desempenho_da_Piscicultura_de_Agua_Doce_2015.pdf . Acesso em: 22/12/2015.

EPAGRI/CEDAP (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina / Centro de Desenvolvimento em Aquicultura e Pesca), 2013. **Síntese da produção da piscicultura catarinense em 2012**. Disponível em: <http://www.epagri.sc.gov.br/wp-content/uploads/2013/08/A-PRODU%C3%87%C3%83O-E-A-EVOLU%C3%87%C3%83O-DA-PISCICULTURA-CATARINENSE-EM-2012.pdf>. Acesso em: 21/12/2015.

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS). **The State of World Fisheries and Aquaculture - Opportunities and challenges**. Rome: 2014. 243p.

FEIST, G.; YEOH, C.; FITZPATRICK, M.S.; SCHRECK, C.B. The production of functional sex-reversed male rainbow trout with 17 α -methyltestosterone and 11 β -hydroxyandrostenedione. **Aquaculture**, v.13, p.145-152, 1995.

FORESTI, F.P.; FORESTI, F. Genética e biotecnologia em piscicultura: usos na produção, manejo e conservação dos estoques de peixes. In: CYRINO, J.E.P. et al. (Eds.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, cap.7, p.195-215, 2004.

FRACALOSSO, D.M.; MEYER, G.; SANTAMARIA, F.M.; WEINGARTNER, M.; ZANIBONI-FILHO, E. Desempenho do jundiá, *Rhamdia quelen*, e do dourado, *Salminus brasiliensis*, em viveiros de terra na região sul do Brasil. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v.26, p.345-352, 2004.

FRACALOSSO, D.M.; ZANIBONI-FILHO, E.; MEURER, S. No rastro das espécies nativas. **Panorama da Aquicultura**, v.12, p.43-49, 2002.

FULLER, P.L.; NICO, L.G.; WILLIAMS, J.D. **Nonindigenous Fishes Introduced into Inland Waters of the United States**. Special Publication 27. American Fisheries Society, Bethesda, MD, EEUU, 1999. 613 p.

GHIRALDELLI, L.; MACHADO, C.; FRACALOSSO, D.M.; ZANIBONI-FILHO, E. Desenvolvimento gonadal do jundiá, *Rhamdia quelen* (Teleostei, Siluriformes), em viveiros de terra, na região Sul do Brasil. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v.29, p.349-356, 2007.

GOMELSKY, B. Chromosome set manipulation and sex control in common carp: a review. **Aquatic Living Resources**, v.16, p.408-415, 2003.

GOMES, L.C.; GOLOMBIESKI, J.I.; CHIPPARI, A.R.; BALDISSEROTTO, B. Biologia do Jundiá (Teleostei, Pimelodidae). **Ciência Rural**, v.30, p.179-185, 2000.

HOMKLIN, S.; ONG, S.K.; LIMPIYAKORN, T. Biotransformation of 17alpha-methyltestosterone in sediment under different electron acceptor conditions. **Chemosphere**, v.82, p.1401-1407, 2011.

HUNTER, G.A.; DONALDSON, E.M. Hormonal sex control and its application to fish culture. In: HOAR, W.S.; RANDALL, D.J.; DONALDSON, E.M. (Eds.). **Fish Physiology**. New York: Academic Press, v.9, pp.223-291, 1983.

HUNTER, G.A.; DONALDSON, E.M.; STOSS, J.; BAKER, I. Production of monosex female groups of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) by the fertilization of normal ova with sperm from sex-reversed female. **Aquaculture**, v.33, p.355-64. 1983.

IBGE (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA), 2015. **Sistema IBGE de Recuperação Eletrônica (SIDRA)**. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br>. Acesso em: 21/11/2015.

KAVUMPURATH, S.; PANDIAN, T.J. Masculinization of fighting fish, *Betta splendens* Regan, using synthetic or natural androgens. **Aquaculture Research**, v.25, p.373-381, 1994.

KIRANKUMAR, S.; PANDIAN, T.J. Effect on growth and reproduction of hormone immersed and masculinized fighting fish *Betta splendens*. **Journal of Experimental Zoology**, v.293, p.606-616, 2002.

LONGO, R.S.; NUÑER, A.P.O. Temperatures for fertilization and hatching and their influence on determining the sex ratio of the silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v.32, p.107-111, 2010.

LOPES, J.M.; SILVA, L.V.F.; BALDISSEROTTO, B. Survival and growth of silver catfish larvae exposed to different water pH. **Aquaculture**, v.9, p.73-80, 2001.

MOENS, L.N.; VAN DER VEN, K.; VAN REMORTEL, P.; DELFAVERO, J.; DE COEN, W.M. Expression Profiling of Endocrine-Disrupting Compounds Using a Customized *Cyprinus carpio* cDNA Microarray. **Toxicological Sciences**, v.93, p.298-310, 2006.

MPA (MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA), 2012. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura - Brasil 2010**. Disponível em: http://sinpesq.mpa.gov.br/preps_cms/download/boletim_2010/boletim_e_statistico_mpa_2010.pdf. Acesso em: 04/01/2016.

MPA (MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA), 2014. **Parques Aquícolas Continentais**. Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/aquicultura/aguas-da-uniao/parques-aquicolas/parques-aquicolas-continentais>. Acesso em: 20/12/2015.

MPA (MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA). **Mais Pesca e Aquicultura – Plano de Desenvolvimento Sustentável (2008 –2011)**. Brasília: MPA, 2009. 74p.

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

NUNES, M.C. **Ictiofauna associada ao cultivo de peixes em tanques-rede no reservatório da Itá, alto rio Uruguai, Brasil**. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Programa de Pós-graduação em Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2009.

OSPINA-ÁLVAREZ, N.; PIFERRER, F. Temperature-Dependent Sex Determination in Fish Revisited: Prevalence, a Single Sex Ratio Response Pattern, and Possible Effects of Climate Change. **Plos One**. 3, e2837, 2008.

OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J.R.; SOTO D. **Aqüicultura no Brasil: o desafio é crescer**. Brasília: Secretaria Especial de Aqüicultura e Pesca / FAO, 2008. 276p.

- PANDIAN, T.J. Sex Reversal. In: PANDIAN, T.J. (Ed.). **Endocrine Sex Differentiation in Fish**. Florida: CRC Press, 2013. pp.175-212.
- PANDIAN, T.J.; SHEELA, S.G. Hormonal induction of sex reversal in fish. **Aquaculture**, v.138, p.1-22, 1995.
- PELICICE, M.F.; AGOSTINHO, A.A. Fish fauna destruction after the introduction of non-native predator (*Cichla kelberi*) in a Neotropical reservoir. **Biological Invasion**, v.11(8), p.1789-1801, 2008.
- PIAIA, R.; TOWNSEND, C.R.; BALDISSEROTTO, B. Growth and survival of fingerlings of silver catfish exposed to different photoperiods. **Aquaculture**, v.7, p.201-205, 1999.
- PIFERRER, F. Endocrine sex control strategies for the feminilization of teleost fish. **Aquaculture**, v.197, p.229-281, 2001.
- PIFERRER, F.; DONALDSON, E.M. Gonadal differentiation in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, after a single treatment with androgen or estrogen at different stages during ontogenesis. **Aquaculture**, v.77, p.251-63, 1989.
- SCHULZ, U.H.; LEUCHTENBERGER, C. Activity patterns of South American silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Brazilian Journal of Biology**, v.66(2A), p.565-574, 2006.
- SHELTON, W.L.; RODRIGUES-GUERRERO, D.; LOPES-MACIAS, J. Factors affecting androgen sex reversal of tilápia aurea. **Aquaculture**, v.25(1), p.59-65, 1981.
- SILVEIRA, F.S.; SILVA, F.M.; CASACA, J.M. **Desempenho Catarinense na Piscicultura de Água Doce**. Florianópolis: EPAGRI - CEDAP, 2014.
- SILVEIRA, J.; SILVA, C.P.; CARGNIN-FERREIRA, E.; ALEXANDRE, D.; ELIAS, M.A.; FRACALLOSSI, D.M. Freshwater catfish jundiá (*Rhamdia quelen*) larvae are prepared to digest inert feed at the exogenous feeding onset: physiological and histological assessments. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.39, p.1581-1590, 2013.

SOE, K.L.; SOE, M.; GLUUD, C. Liver pathology associated with the use of anabolic-androgenic steroids. **Liver**, v.12, p.73-79, 1992.

SOUZA, L.S.; POUHEY, J.L.O.F.; CAMARGO, S.O.; VAZ, B.S. Crescimento e sobrevivência do catfish de canal (*Ictalurus punctatus*) e jundiá (*Rhamdia sp*) no outono–inverno do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, v.35(4), p.891-896, 2005.

SULIS-COSTA, R.; JIMENEZ, J.E.; WEINGARTNER, M.; NUÑER, A.P.O. Efeito da temperatura da água na fase inicial de vida e na proporção sexual do jundiá. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.39, p.379-388, 2013.

TOLEDO-FILHO, S.A.; FOREST, F.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. **Biotecnologia genética aplicada à piscicultura**. Caderno de Ictiogenética III, Universidade de São Paulo, 1996. 27 p.

TOWNSEND, C.R.; BALDISSEROTTO, B. Survival of silver catfish fingerlings exposed to acute changes of water pH and hardness. **Aquaculture**, v.9, p.413-419, 2001.

TOWNSEND, C.R.; SILVA, L.V.; BALDISSEROTTO, B. Growth and survival of *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Pimelodidae) larvae exposed to different levels of water hardness. **Aquaculture**, v.215, p.103-108, 2003.

WOEHL, V.M. **Estudo da histofisiologia das gônadas, hipófise e interrenal de fêmeas e machos de *Rhamdia quelen* (Quoy e Gaimard, Pisces, Teleostei) durante o ciclo reprodutivo**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2001.

WOYNAROVICH, E.; HORVÁTH, L. The artificial propagation of warm-water finfishes - a manual for extension. **FAO Fisheries Technical Paper**, n.201, 1980.

YAMAMOTO, T. Sex differentiation. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J. (Eds.). **Fish Physiology**. New York: Academic, 1969, v.3, p.58-117.

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

ZANIBONI-FILHO, E.; NUÑER, A.P.O.; GUERESCHI, R.M.; SILVA, S.H. Cultivo de peixes em tanques-rede e impactos ambientais. In: CARDOSO, E.L.; FERREIRA, R.M.A. (Orgs.). **Cultivo de Peixes em Tanques-rede: desafios e oportunidades para um desenvolvimento sustentável**. 1ª ed. Belo Horizonte: EPAMIG, p.57-80. 2005.

ZANIBONI-FILHO, E.; SCHULZ, U.H. Migratory fishes of the Uruguay river, p. 135-168. In: CAROLSFELD, J.; HARVEY, B.; BAER, A.; ROSS, C. (eds.). **Migratory fishes of the South America: biology, social importance and conservation status**. Canada: IDRC / World Bank / World Fisheries Trust, 2003. 372p.

ZERULLA, M.; LÄNGE, R.; STEGER-HARTMANN, T.; PANTER, G.; HUTCHINSON, T.; DIETRICH, D.R. Morphological sex reversal upon short-term exposure to endocrine modulators in juvenile fathead minnow (*Pimephales promelas*). **Toxicology Letters**, v.131, p.51-63, 2002.

ANEXO A – Aprovação do protocolo CEUA PP00788.

Página 1 de 1

Resultado de Solicitação de Protocolo

Protocolo

PP00788

Título

Desenvolvimento de Tecnologia de Cultivo de Peixes Nativos pelo LAPAD/UFSC.

Data de Entrada

14/08/2013

Resultado:

Aprovado

Data/Prazo

04/10/2013

Considerações

Ofício nº 105/CEUA/PROPEAQ/2013

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Evoy Zaniboni Filho, Departamento de Aquicultura - CCA

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO, por quatro anos, para a utilização de dez mil peixes: Jundiá (Rhamdia quelen); Dourado (Salminus brasiliensis); Suruvi (Steindachneridion scriptum); Piava (Leporinus obtusidens), Piracanjuba (Brycon orbignyanus); Curimba (Prochilodus lineatus) e Pintado (Pseudoplatystoma corruscans).

- Procedência do animal: Bacia do rio Uruguai e produção própria.

Por ocasião do término desse protocolo, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais no Projeto desenvolvido aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

Atenciosamente,

Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)

Data 07/01/2017

Data 07/10/2013

Parecer(es):


Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC
PRESIDENTE

[Abrir Solicitação](#) [Criar Relatório](#)



[Parecer01_PP00788.pdf](#)



[Parecer02_PP00788.pdf](#)



[Parecer01_PP00788.pdf](#)



[Parecer02_PP00788.pdf](#)

ANEXO B – Menção honrosa ao resumo expandido apresentado na forma de pôster no XIX CONBEP, São Luís do Maranhão, 2015.

XIX CONBEP
SÃO LUÍS
2015

XIX CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA DE PESCA
SÃO LUÍS - MARANHÃO 2015

CERTIFICADO

Certificamos que o resumo expandido "IDENTIFICAÇÃO DE NEOMACHOS DE JUNDIÁ RHAMIDIA QUELEN (QUOY & GAIMARD, 1824)", de autoria de "LUCIANO AUGUSTO WEISS; CAROLINA HOPPE DE OLIVEIRA; JURANDIR JOAQUIM BERNARDES JUNIOR; FERNANDA MICHELE DA LUZ; BRUNO AUGUSTO AMANTO BORGES; ALEX PIRES DE OLIVEIRA NUNER" recebeu a **MENÇÃO HONROSA** das apresentações na modalidade PÔSTER durante o XIX CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA DE PESCA, realizado no período de 04 a 08 de outubro de 2015, em São Luís/MA – Brasil.

José Benigno Viana Pestela
Presidente da AEP/IMA

Igor da Mata Oliveira
Presidente da ABEP

Elizeu Augusto da Brito
Presidente da FAEP/IBR

FAPENIA
Faculdade de Engenharia e Arquitetura
Universidade Federal do Maranhão

CAPES
Coordenação Nacional de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CNPq
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

APÊNDICE A – Registro fotográfico da desova inicial dos reprodutores selvagens de *Rhamdia quelen*.

A)



B)



C)



A) Aplicação de extrato pituitário de carpa.

B) Extrusão de ovos de jundiá.

C) Extrusão de sêmen de jundiá.

APÊNDICE B – Registro fotográfico do ensaio masculinizante.

A)



B)



C)



A) Bandejas contendo a ração recém suplementada com diferentes doses de 17α -metiltestosterona através do método da evaporação de álcool etílico.

B) Unidades experimentais utilizadas para a masculinização do jundiá.

C) Rotina diária de limpeza das unidades experimentais.

APÊNDICE C – Registro fotográfico da biometria final e retirada das gônadas ao término do ensaio masculinizante.

A)



B)



D)



C)



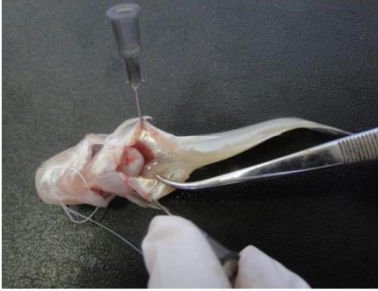
A) Bancada de trabalho preparada com ictímetro, balança, microscópio de luz, além de outros materiais utilizados.

B) Eutanásia em eugenol.

C) Registro do peso (g).

D) Registro do comprimento (cm).

D)



E)



D) Retirando a gônada de uma fêmea de *Rhamdia quelen*.

E) Gônada retirada de um exemplar macho de *R. quelen*.

APÊNDICE D – Registro fotográfico dos testes de progênie.

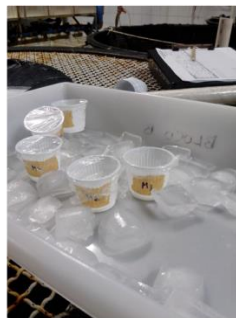
A)



B)



C)



D)



E)



F)



A) Seleção dos machos fenotípicos de *Rhamdia quelen*.

B) Extrusão de sêmen do macho fenotípico selecionado para os testes.

C) Bandeja com gelo para acondicionar as amostras de sêmen até a fertilização.

D) Distribuição das alíquotas iguais de ovos de *R. quelen*.

E) Fertilização dos ovos de *R. quelen* com cada amostra de sêmen dos machos fenotípicos utilizados para os testes de progênie.

F) Incubadoras de 10 L utilizadas para a incubação de cada lote de ovos fertilizados.

G)



H)



G) Incubadoras de garrafa pet utilizadas para a eclosão dos náuplios de *Artemia* sp.

H) Unidade experimental com a progênie de um dos machos fenotípicos avaliado nos testes de progênie.

APÊNDICE E – Pôster apresentado no XIX CONBEP.



IDENTIFICAÇÃO DE NEOMACHOS DE JUNDIÁ *RHAMDIA QUELEN* (QUOY & GAIMARD, 1824)

Luciano Augusto WEISS^{1,2}, Carolina Hoppe de OLIVEIRA¹, Jurandir Joaquim BERNARDES JÚNIOR¹, Fernanda Michele da LUZ¹, Bruno Augusto Amato BORGES¹, Alex Pires de Oliveira NUNER¹

¹ Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce, Departamento de Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina. Rodovia Francisco Thomaz dos Santos, nº 3532, Armação do Pântano do Sul, Florianópolis, SC.

² Autor para correspondência, e-mail: luciano@lapad.ufsc.br

INTRODUÇÃO

No cultivo de *Rhamdia quelen* as fêmeas são preferíveis pelo maior crescimento e maturação sexual tardia (Ghiraldelli *et al.*, 2007). Para a obtenção de lotes monosexo femininos pode-se utilizar a inversão sexual indireta, que em uma primeira etapa envolve a masculinização direta das larvas para obtenção de reprodutores denominados neomachos (fenotipicamente machos e genotipicamente fêmeas). O cruzamento entre neomachos e fêmeas normais (fêmeas fenotípicas e genotípicas) faria com que a progênie resultante apresentasse, teoricamente, 100% de fêmeas normais (Piferrer & Donaldson, 1989).

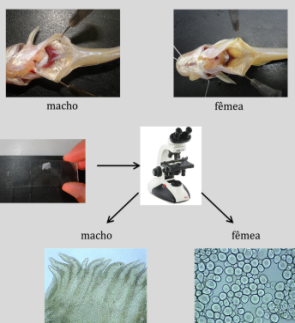
OBJETIVO

Identificar, através de testes de progênie, possíveis neomachos de *R. quelen* capazes de produzir proles femininas para o cultivo.

METODOLOGIA

Para os testes de progênie, machos fenotípicos cultivados por oito meses foram selecionados de um lote submetido à masculinização por 17 α -metil testosterona (MT) incorporado em ração comercial nas doses de 60, 90 e 120 mg/kg.

Cinco machos de cada tratamento foram cruzados com fêmeas normais e as proles resultantes de cada cruzamento foram cultivadas por 150 dias para que a sexagem das gônadas pudesse ser realizada através da técnica do *imprint* (impressão tecidual em lâminas para observação em microscópio).



As proporções entre machos e fêmeas obtidas na sexagem foram comparadas com o teste do χ^2 , considerando-se 1:1 a proporção sexual esperada. Em seguida as proporções sexuais de todas as progênies foram combinadas e submetidas ao teste de heterogeneidade do χ^2 , para avaliar se a proporção de machos ou fêmeas foi independente do macho utilizado na reprodução (macho reprodutor)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 1. Sexagem da prole resultante do cruzamento entre fêmeas normais e machos reprodutores provenientes dos tratamentos de masculinização com 17 α -metil testosterona (MT) incorporado na ração (60, 90 e 120 mg/kg).

Doses (mg/kg MT)	Macho reprodutor	Machos (%)	Fêmeas (%)
60	1	53,33	46,67
	2	76,67*	23,33
	3	24,44	75,56*
	4	70,00*	30,00
	5	--	--
90	1	60,00	40,00
	2	60,00	40,00
	3	60,00	40,00
	4	80,00*	20,00
	5	27,27	72,73*
120	1	43,33	56,67
	2	60,00	40,00
	3	13,33	86,67*
	4	76,67*	23,33
	5	48,00	52,00

Todas as proles apresentaram pesos ($6,56 \pm 4,17$ g), comprimentos ($9,89 \pm 1,81$ cm) e índices gonadosomáticos ($1,33 \pm 1,98$ g) semelhantes. * Diferença significativa na proporção sexual pelo teste do χ^2 ($p < 0,05$). -- Exemplar que não respondeu à indução hormonal.

Foi registrada dependência entre a proporção sexual e o macho reprodutor. Como a presença de cromossomos sexuais não está relatada para *R. quelen*, assim como não está claro o seu sistema de determinação do sexo, a definição do sexo nesta espécie pode estar atrelada a um conjunto de cromossomos autossômicos, como ocorre em outros Siluriformes (Piferrer, 2001), o que poderia explicar este desbalançamento da proporção sexual das progênies e a não obtenção de proles 100% femininas pelos possíveis neomachos (Desprez *et al.*, 2006).

CONCLUSÃO

O predomínio de fêmeas nas proles geradas por três machos, um de cada dose de masculinização, é um forte indicativo de que estes animais são neomachos, embora não tenham sido geradas progênies 100% femininas.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelo financiamento do estudo através do Projeto Universal (Processo 486868/2013-3) e a CAPES pelas bolsas de estudo.

BIBLIOGRAFIA

- Desprez, D.; Cédric, B.; Haereux, M.C.; Mélard, C.; Bosc, P.; Barollier, J.F. 2006. Study of sex ratio in progeny of a complex Oreochromis hybrid, the Florida red tilapia. *Aquaculture* 251: 231-237.
- Ghiraldelli, L.; Machado, C.; Fracalossi, D.M.; Zamboni-Filho, E. 2007. Desenvolvimento gonadal do jundiá, *Rhamdia quelen* (Pisces, Siluriformes), em viveiros de terra, na região Sul do Brasil. *Acta Scientiarum, Biological Sciences* 29 (4): 349-356.
- Piferrer, E. 2001. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. *Aquaculture* 197: 229-281.
- Piferrer, E.; Donaldson, E.M. 1989. Gonadal differentiation in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, after a single treatment with androgen or estrogen at different stages during ontogenesis. *Aquaculture* 77: 251-262.