



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

Vanessa Martins da Rocha

**Influência da temperatura na larvicultura e do hormônio  $17\beta$ -estradiol na ração de juvenis na proporção sexual da tainha *Mugil liza***

Florianópolis

2023

Vanessa Martins da Rocha

**Influência da temperatura na larvicultura e do hormônio  $17\beta$ -estradiol na razão de juvenis na proporção sexual da tainha *Mugil liza***

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito obrigatório para a obtenção do título de Doutora em Aquicultura.

Orientador: Prof. Vinicius Ronzani Cerqueira, Dr.  
Coorientador: Caio César França Magnotti, Dr.

Florianópolis

2023

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

Martins da Rocha, Vanessa

Influência da temperatura na larvicultura e do hormônio 17 $\beta$ -estradiol na razão de juvenis na proporção sexual da tainha Mugil liza / Vanessa Martins da Rocha ; orientador, Vinicius Ronzani Cerqueira, coorientador, Caio César França Magnotti, 2023.

86 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. Gônada feminina. Histologia. Monosexo. Peixe marinho. . I. Ronzani Cerqueira, Vinicius . II. César França Magnotti, Caio. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. IV. Título.

Vanessa Martins da Rocha

**Influência da temperatura na larvicultura e do hormônio 17 $\beta$ -estradiol na razão de juvenis na proporção sexual da tainha *Mugil liza***

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado, em 07 de novembro de 2022, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Vinicius Ronzani Cerqueira, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Robson Andrade Rodrigues, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.(a) Fernanda Loureiro Almeida Ossulivan, Dr.(a)  
Embrapa Amazônia Ocidental/Embrapa Pesca e Aquicultura

Prof. Luís André Nassr de Sampaio, Dr.  
Universidade Federal do Rio Grande

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Doutora em Aquicultura.

Insira neste espaço a  
assinatura digital

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Insira neste espaço a  
assinatura digital

Prof. Vinicius Ronzani Cerqueira, Dr.  
Orientador

Florianópolis, 2023

## AGRADECIMENTOS

Os agradecimentos certamente são a parte mais bonita e porque não dizer mais importante de um trabalho acadêmico. Afinal foram anos de trabalho e durante esse tempo, muita gente passa por nós e soma direta e indiretamente para que a nossa pesquisa seja realizada.

Então, são muitos os agradecimentos a serem feitos, mas tentando ser sucinta, quero dizer um muito obrigado a todos que fizeram parte da minha caminhada até aqui.

Porém, não poderia deixar de agradecer especialmente a Deus pela vida, pela força diária e pela certeza de dias melhores. Em qualquer situação será sempre a calma, o refúgio e a certeza. Também agradeço aos meus pais que sempre estiveram presentes durante todos os momentos, sempre atenciosos e amáveis! E ao Sérgio, meu namorado por absolutamente tudo. Tenho a sorte de dividir com ele as experiências da aquicultura e da vida.

Agradeço ao professor Vinicius Cerqueira pela orientação, sou uma das últimas orientadas desse grande profissional que tanto se dedicou à piscicultura marinha!

A toda equipe do Lapmar pela companhia diária, pelas risadas (que foram muitas) e execução deste trabalho.

E em nome do professor Maurício Laterça e do Carlito agradeço a todos os professores e colaboradores da UFSC que ajudaram a executar partes desse trabalho e que contribuíram de alguma forma para a minha vida profissional.

A banca avaliadora.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Gratidão a todos! E que venham os próximos capítulos desta profissão tão linda!

*Avante!*

## RESUMO

A tainha *Mugil liza* é um peixe pelágico, amplamente distribuído na costa Atlântica da América do Sul, desde o Caribe até a Argentina. A tainha possui grande importância na pesca comercial e artesanal na costa brasileira, sendo a espécie mais importante de Mugilídeo para a atividade pesqueira no Brasil. Em relação à biologia reprodutiva, é uma espécie bissexuada que apresenta formação de cardumes e hábitos migratórios. Suas gônadas femininas possuem alto valor e demanda de mercado, o que torna desejável a criação monossexuada de fêmeas. Dessa forma, este estudo teve como objetivo produzir lotes com predominância do sexo feminino da tainha, através da manipulação da temperatura da água na larvicultura e da adição do hormônio esteroide 17 $\beta$ -estradiol na dieta de juvenis avaliando o desempenho zootécnico e a primeira maturação sexual. No experimento com temperatura cada unidade experimental foi composta de um tanque circular de 60 L com 45 ovos embrionados L<sup>-1</sup>. Após a eclosão, as larvas foram submetidas ao cultivo em temperaturas de 21, 24, 27 e 30 °C até transição completa do alimento vivo para o inerte. No experimento com hormônio foram testados cinco tratamentos com 60, 80, 100, 120 e 140 mg de 17 $\beta$ -estradiol por kg de dieta e um controle sem uso de hormônio por 60 dias. Cada unidade experimental foi estocada com 150 peixes, pesando 0,15  $\pm$  0,7 g e medindo 2,1  $\pm$  0,5 cm. Em ambos os estudos a primeira maturação sexual foi observada ao final do segundo ano de vida. No experimento com temperatura, 100% das gônadas analisadas eram masculinas. No experimento com o hormônio estradiol, foram identificadas gônadas masculinas (94,64%), femininas (1,78%) e intersexuais ou ovotestis (3,57%). A faixa de temperatura usada na larvicultura não teve efeito feminizante, mas ao contrário, pode ter causado a masculinização. É possível que outros fatores ambientais, além dos genéticos, estejam atuando nos mecanismos de determinação sexual. Os tratamentos hormonais afetaram as gônadas, mas não houve inversão sexual. Como a diferenciação sexual da espécie ocorre vários meses após o início do estágio juvenil, outros testes devem ser realizados, alterando o tamanho inicial dos indivíduos e a duração do tratamento.

**Palavras-chave:** Aquicultura. Gônada feminina. Histologia. Monosexo. Peixe marinho.

## ABSTRACT

The *Mugil liza* mullet is a pelagic fish, widely distributed on the Atlantic coast of South America, from the Caribbean to Argentina. The mullet is of great importance in commercial and artisanal fishing on the Brazilian coast, being the most important species of Mugilidae for fishing activity in Brazil. In relation to reproductive biology, it is a bisexual species that presents schooling and migratory habits. Its female gonads have high value and market demand, which makes the monosexual breeding of females desirable. Thus, this study aimed to produce lots with a predominance of female mullet, through the manipulation of water temperature in larviculture and the addition of the steroid hormone 17 $\beta$ -estradiol in the diet of juveniles, evaluating the zootechnical performance and the first sexual maturation. In the experiment with temperature, each experimental unit was composed of a circular tank of 60 L with 45 embryonated eggs L<sup>-1</sup>. After hatching, the larvae were submitted to cultivation at temperatures of 21, 24, 27 and 30 °C until the complete transition from live to inert food. In the hormone experiment, five treatments were tested with 60, 80, 100, 120 and 140 mg of 17 $\beta$ -estradiol per kg of diet and a control without hormone use for 60 days. Each experimental unit was stocked with 150 fish, weighing  $0.15 \pm 0.7$  g and measuring  $2.1 \pm 0.5$  cm. In both studies, the first sexual maturation was observed at the end of the second year of life. In the experiment with temperature, 100% of the analyzed gonads were male. In the experiment with the hormone estradiol, male (94.64%), female (1.78%) and intersexual or ovotestis (3.57%) gonads were identified. The temperature range used in larviculture did not have a feminizing effect, but on the contrary, it may have caused masculinization. It is possible that other environmental factors, in addition to genetic ones, are acting on the sex determination mechanisms. Hormonal treatments affected the gonads, but there was no sexual inversion. As the sexual differentiation of the species occurs several months after the onset of the juvenile stage, other tests must be performed, changing the initial size of the individuals and the duration of treatment.

**Keywords:** Aquaculture. Female gonad. Histology. Marine fish. Monosex.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Esquema do procedimento normalmente utilizado para a inversão sexual direta em peixes, através da aplicação de hormônios esteroides. Fonte: Weiss (2017) adaptado de Toledo-Filho et al. (1996). ..... 24
- Figura 2. Análise de regressão de peso e comprimento de juvenis da tainha *Mugil liza* com 35 dias de idade, submetidos a diferentes temperaturas na larvicultura. .... 37
- Figura 3. Cortes longitudinais do testículo de machos de tainha *Mugil liza* com 24 meses de idade. a) imaturo: cordões de espermatogônias (EG); b) maturação: presença de espermatogônias (EG) e espermatócitos (EC); c) presença de espermatócitos (EC) e espermátides (ET) agrupadas nos espermatócitos, além da presença de espermatozoides (EZ); d) maturidade funcional: grande número de espermatozoides presentes na luz dos túbulos, as espermátides (ET) são mais visíveis próximas às paredes dos túbulos. Coloração: Hematoxilina/eosina. .... 40
- Figura 4. Análises de regressão de peso e comprimento da tainha *Mugil liza*, após 60 dias de tratamento com o hormônio  $17\beta$ -estradiol. .... 57
- Figura 5. Cortes longitudinais do testículo de machos de tainha *Mugil liza* com 24 meses de idade. a) imaturo: cordões de espermatogônias (EG); b) maturação: presença de espermatogônias (EG) e espermatócitos (EC); c) presença de espermatócitos (EC) e espermátides (ET) agrupadas nos espermatócitos, além da presença de espermatozoides (EZ); d) maturidade funcional: grande número de espermatozoides presentes na luz dos túbulos, as espermátides (ET) são mais visíveis próximas às paredes dos túbulos. Coloração: Hematoxilina-eosina. .... 60
- Figura 6. Corte longitudinal de ovário maduro de fêmea de tainha *Mugil liza* com 24 meses de idade. a) ovócito pós-vitelogênico (opv), detalhe de um ovócito com núcleo (n) evidente, e presença de grânulos de proteína (gp) e vesículas lipídicas (vl). Membrana vitelínica (mv). Coloração: Hematoxilina-eosina. .... 60
- Figura 7. Morfologia das gônadas masculinas de tainha *Mugil liza* com 24 meses de idade. a) gônada com aspecto normal (controle); b) e c) gônadas com deformações (tratamentos com  $17\beta$ -estradiol). .... 61
- Figura 8. Morfologia da gônada intersexo de tainha *Mugil liza* com 24 meses de idade. A – parte masculina e B – parte feminina. .... 63
- Figura 9. Cortes longitudinais de gônada intersexual da tainha *Mugil liza* com 24 meses de idade. a) presença simultânea de espermatozoides (EZ) e ovócitos pós-vitelogênicos

(opv). b) presença de ovócitos de estoque de reserva (er), ovócitos vitelogênicos (v) e ovócitos de vitelogênese lipídica (ovl). Acúmulos de espermatozoides presentes no espaço intralamelar. Núcleo (n), nucléolo (nc), gota de óleo (go). Coloração: Hematoxilina-eosina. .... 64

Figura 10. Valores do hormônio estradiol no plasma sanguíneo da tainha *Mugil liza* no segundo ano da engorda. As linhas são as médias de cada tratamento e controle (n=8). .... 65

Figura 11. Valores do hormônio testosterona (T) no plasma sanguíneo da tainha *Mugil liza* no segundo da engorda. As linhas são as médias de cada tratamento e controle (n=8). .... 65

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Padrões de determinação do sexo dependente da temperatura em peixes gonocorísticos, adaptado de Ospina-Álvarez e Piferrer (2008). .....	23
Tabela 2. Descrição microscópica da gametogênese na tainha <i>Mugil liza</i> (adaptado de Albieri e Araújo 2010 e Lemos et al. 2014). .....	35
Tabela 3. Variação de peso (P), comprimento (C) e relação gonadossomática (RGS) da tainha <i>Mugil liza</i> submetida a diferentes temperaturas na larvicultura, ao final do primeiro e segundo ano.....	38
Tabela 4. Dados de sobrevivência da tainha <i>Mugil liza</i> durante a larvicultura submetidas a diferentes temperaturas e engorda (primeiro e segundo ano). .....	38
Tabela 5. Número de machos da tainha <i>Mugil liza</i> , com dois anos em diferentes fases do desenvolvimento testicular, submetidos a diferentes temperaturas na larvicultura. ....	39
Tabela 6. Valores de média, desvio padrão ( $\pm$ dp), máximo e mínimo de testosterona e estradiol no plasma sanguíneo da tainha <i>Mugil liza</i> ao final do segundo ano da engorda. Machos total n = 25; Maduro n = 15; Em maturação n = 4; Imaturo n = 6. ....	40
Tabela 7. Descrição microscópica da gametogênese na tainha <i>Mugil liza</i> (adaptado de Albieri e Araújo 2010 e Lemos et al. 2014). .....	56
Tabela 8. Variação de peso (P), comprimento (C), Biomassa final (BF) e relação gonadossomática (RGS) da tainha <i>Mugil liza</i> tratada com o hormônio 17 $\beta$ -estradiol, ao final do primeiro e segundo ano.....	58
Tabela 9. Dados de sobrevivência da tainha <i>Mugil liza</i> tratada com o hormônio 17 $\beta$ -estradiol, após a fase de berçário (tratamento hormonal) e de engorda (primeiro e segundo ano).....	59
Tabela 10. Número de machos da tainha <i>Mugil liza</i> em diferentes fases do desenvolvimento testicular, tratados com o hormônio 17 $\beta$ -estradiol, com 24 meses de idade.....	59
Tabela 11. Nível de deformidades das gônadas masculinas de tainha <i>Mugil liza</i> com 24 meses de idade após tratamento com 17 $\beta$ -estradiol.....	62
Tabela 12. Valores de média, desvio padrão ( $\pm$ dp), máximo e mínimo de testosterona e estradiol no plasma sanguíneo da tainha <i>Mugil liza</i> no segundo da engorda. Machos n = 38; Fêmeas n = 2; Intersexo n = 4; Maduro n = 18; Em maturação n = 11; Imaturo n = 8.....	66

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>13</b>
1.1 REGULAÇÃO ENDÓCRINA NA REPRODUÇÃO DE PEIXES .....	16
1.2 DETERMINAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO SEXUAL EM PEIXES .....	17
1.3 CULTIVO DE LOTES MONOSEXO .....	19
<b>1.3.1 Tratamento com temperatura .....</b>	<b>21</b>
<b>1.3.2 Tratamento com hormônio .....</b>	<b>23</b>
1.4 JUSTIFICATIVA .....	26
1.5 OBJETIVOS .....	27
<b>1.5.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>27</b>
<b>1.5.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>27</b>
1.6 ESTRUTURA DA TESE .....	27
<b>2 ARTIGO 1. USO DA TEMPERATURA NA LARVICULTURA PARA A FEMINIZAÇÃO DE <i>MUGIL LIZA VALENCIENNES</i>, 1836 .....</b>	<b>28</b>
2.1 INTRODUÇÃO .....	30
2.2 METODOLOGIA.....	32
<b>2.2.1 Local do experimento e obtenção dos peixes.....</b>	<b>32</b>
<b>2.2.2 Delineamento e procedimento experimental.....</b>	<b>32</b>
<b>2.2.3 Análise histológica e classificação reprodutiva das gônadas .....</b>	<b>34</b>
<b>2.2.4 Quantificação dos hormônios .....</b>	<b>35</b>
<b>2.2.5 Análise estatística.....</b>	<b>36</b>
2.3 RESULTADOS .....	36
<b>2.3.1 Desempenho zootécnico.....</b>	<b>36</b>
<b>2.3.2 Análise macroscópica e histológica das gônadas .....</b>	<b>38</b>
<b>2.3.3 Análise hormonal.....</b>	<b>39</b>
2.4 DISCUSSÃO .....	41
2.5 CONCLUSÕES .....	43
AGRADECIMENTOS .....	43
2.6 REFERÊNCIA.....	43
<b>3 ARTIGO 2: EFEITO DO 17B-ESTRADIOL VIA ORAL NO DESEMPENHO ZOOTÉCNICO, NA PROPORÇÃO SEXUAL E NA PRIMEIRA MATURAÇÃO DA TAINHA <i>MUGIL LIZA VALENCIENNES</i>, 1836 .....</b>	<b>48</b>
3.1 INTRODUÇÃO.....	50

3.2 METODOLOGIA.....	52
<b>3.2.1 Local do experimento e obtenção dos peixes.....</b>	<b>52</b>
<b>3.2.2 Preparo das dietas .....</b>	<b>53</b>
<b>3.2.3 Procedimento experimental .....</b>	<b>53</b>
<b>3.2.4 Análise histológica e classificação reprodutiva das gônadas .....</b>	<b>55</b>
<b>3.2.5 Quantificação de hormônios sexuais.....</b>	<b>55</b>
<b>3.2.6 Análise estatística.....</b>	<b>56</b>
3.3 RESULTADOS .....	57
<b>3.3.1 Desempenho zootécnico.....</b>	<b>57</b>
<b>3.3.2 Análise macroscópica e histológica das gônadas .....</b>	<b>59</b>
<b>3.3.3 Análise hormonal.....</b>	<b>63</b>
3.4 DISCUSSÃO .....	66
3.5 CONCLUSÃO.....	70
3.6 REFERÊNCIA.....	70
<b>4 CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>76</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>77</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A família Mugilidae é representada por 71 espécies e 20 gêneros, com distribuição em todo o mundo em zonas tropicais, subtropicais e temperadas (ESCHMEYER, 2014; ESCHMEYER e FONG; 2015). Os peixes dessa família são conhecidos popularmente como tainhas ou paratis, e possuem grande importância na pesca comercial em muitas regiões no mundo (GONZÁLEZ-CASTRO e GHASEMZADEH, 2015). A tainha *Mugil liza* Valenciennes, 1836 pode atingir até um metro de comprimento e é encontrada na costa Atlântica da América do Sul, desde o Caribe até a Argentina (MENEZES et al., 2010; DURAND et al., 2012; LEMOS et al., 2014). Segundo dados do MPA/MMA (2015) é a espécie mais importante de Mugilídeo para a atividade pesqueira no Brasil, sendo um importante recurso econômico na região Sul, principalmente para a pesca artesanal.

De acordo com os dados do relatório do SAP/MAPA (2021), Santa Catarina é o estado com a produção anual mais expressiva de tainha, cerca de 8.069 toneladas (t) considerando os anos de 2017 a 2019, com uma supersafra de 10.770 t registrada em 2018. O estado de São Paulo ocupa a segunda posição com 1.304 t. A produção total e a frequência relativa registrada no Sistema de Informações Gerenciais do Serviço de Inspeção Federal – SIGSIF entre os anos de 2016 e 2020, também mostram Santa Catarina como o estado mais produtivo, concentrando aproximadamente 85% da produção anual total de peixe fresco, seguido por São Paulo e Rio Grande do Sul (SAP/MAPA, 2021).

Um dos principais destinos da produção de tainha é a exportação da sua ova, atendendo principalmente os mercados de Taiwan e China. Os estados de Santa Catarina e São Paulo, mais uma vez, se destacam como os maiores produtores apresentando valor estável na casa das 200 toneladas (t) de ovas e chegando a 600 t em 2018, segundo informações registradas pelo Comex Stat, sistema de consulta e extração de dados on-line referentes ao comércio exterior brasileiro (SAP/MAPA, 2021).

Apesar dos dados de produção registrados atualmente, em 2004, a tainha chegou a ingressar na lista das espécies sobre-exploradas ou ameaçadas de sobre-exploração (IN MMA n 5 05/2004), devido à intensificação da pesca industrial sobre este recurso durante a migração reprodutiva, motivada sobretudo pela abundância na região Sul e Sudeste, e principalmente pela valorização da tainha e de sua ova no mercado mundial, tornando-se produto de exportação desde o ano 2000 (IBAMA, 2007). Para tentar amenizar os efeitos da sobre-exploração da espécie, foi dado um prazo de nove a dez anos para organização e execução de um Plano de Gestão para a sua pesca, e foi mantida, desde então, sua

classificação como sobre-explotada (IBAMA, 2007). Posteriormente, uma instrução normativa do IBAMA (nº 171/2008) estabeleceu regras para a exploração deste recurso nas regiões Sudeste e Sul. Porém, baseando-se nos dados do MPA 2008/2009, o que se observou foi uma estabilização da sua produção pela pesca extrativa.

Atualmente, as capturas nas regiões sul e sudeste vêm sendo realizadas por um sistema de cotas de acordo com o tipo de pesca (emalhe anilhado e cerco traineira), e o controle do limite máximo de captura por meio do Sistainha, sistema criado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA, disponibilizado na página da Secretaria de Aquicultura e Pesca – SAP/MAPA, que tem como base os dados constantes nos Mapas de Bordo, Mapas de Produção e no Formulário de Entrada de Tainha em Empresa Pesqueira, registrados em cada temporada de pesca. No entanto, é válido ressaltar que existem outras modalidades não submetidas a cotas de captura, cujo monitoramento é restrito apenas ao período de safra das frotas controladas por cotas de captura, o que não permite conhecer o quanto da produção das modalidades não controladas fora desse período é direcionada às empresas pesqueiras (SAP/MAPA, 2021).

A aquicultura marinha também se mostra como uma alternativa viável para reduzir a pressão extrativa sobre os estoques de peixes e gerar alimento de forma mais sustentável (TAL et al., 2009), uma vez que permite a produção de um volume preciso e constante de pescado.

Do ponto de vista da aquicultura, a tainha *M. liza* é uma espécie com características que a qualificam para o cultivo, tais como: rusticidade, ampla tolerância às diferentes salinidades e temperaturas, adaptação ao cativeiro e fácil manejo alimentar, pois aceita rapidamente a dieta inerte (NETO e SPACH, 1998; SAMPAIO et al., 2001; SAMPAIO et al., 2002; MIRANDA-FILHO et al., 2010). Além disso, apresenta carne saborosa e a gônada feminina (ova) é bastante apreciada no Brasil e em outros países (Taiwan, França, Grécia, Itália e Espanha), sendo conhecida como bottarga, ou “caviar brasileiro” (FERREIRA, 2006; FERREIRA et al., 2011; IBAMA, 2007).

Em relação à biologia reprodutiva é uma espécie bissexuada, que apresenta formação de cardumes e hábitos migratórios, sendo catádroma com recrutamento dos juvenis em lagoas e estuários, seguido de um período de migração ao mar para reprodução (ALBIERI e ARAÚJO, 2010).

Estudos realizados por Lemos et al. (2014) sugerem que a tainha explorada comercialmente desde São Paulo até o Rio Grande do Sul constitui um único estoque pesqueiro, que tem seu habitat de desova associado às águas marinhas com 18-21 °C,

realizando uma migração costeira a partir de estuários do Sul do Brasil, em sentido norte até o local de desova. Segundo os autores, a migração reprodutiva dos cardumes, que inicia em abril e se estende por julho, em águas com profundidade inferior a 50 m, é necessária para que ocorra o término do desenvolvimento das gônadas, e está ligada com as isotermas de 19 a 21 °C. Para esses cardumes o pico de desova ocorre em junho, entre o norte de Santa Catarina e o Paraná.

De acordo com Albieri e Araújo (2010), a tainha apresenta desova total e o desenvolvimento ovocitário ocorre de maneira sincrônica em dois grupos. A presença contínua de recrutas ao longo do ano confirma que a tainha apresenta uma desova sincrônica de dois grupos, conforme também descrito por González-Castro et al. (2011) e Garbin et al. (2014). Em relação à fecundidade, alguns estudos relatam cerca de 3.080.000 ovócitos por fêmea adulta com 590 a 680 mm de comprimento total (CT) (ALBIERI e ARAÚJO, 2010) e de 818.992 a 2.869.767 de ovócitos por fêmea com CT de 426 a 660 mm, indicando que a fecundidade está positivamente correlacionada com o tamanho (LEMOS et al., 2014). Além disso, a alta fecundidade, associada à desova em alto mar e à falta de cuidado parental, é típica de peixes pelágicos como os mugiliformes (ALBIERI e ARAÚJO, 2010). Em condições controladas de cultivo, a fecundidade da espécie varia de 1,0 a 1,5 milhão de ovos kg<sup>-1</sup> de peso corporal em fêmeas com comprimento de 474 mm e peso de 1,2 kg (CERQUEIRA et al., 2017; MAGNOTTI et al., 2020).

No ambiente natural o comprimento de primeira maturação foi descrito por González-Castro et al. (2011) em 450 mm CT para fêmeas e 436 mm para machos, o que se traduz em 5–6 anos de idade, e por Garbin et al. (2014) em 450,6 mm e 436,3 para fêmeas e machos, respectivamente. Em cativeiro, porém, os animais adultos apresentam tamanho de primeira maturação inferior a 380 mm para fêmeas e 330 mm para machos (CERQUEIRA et al., 2017). Por ser uma espécie que migra por longas distâncias para a reprodução, quando mantida em condições de cativeiro exibe disfunções reprodutivas que inibem a liberação espontânea dos gametas, portanto, é necessária a indução hormonal para que ocorra a desova em ambiente controlado (GODINHO et al., 2005).

No Brasil, pesquisas sobre reprodução controlada e larvicultura em laboratório da tainha iniciaram em 1979, no Rio de Janeiro (BENETTI e FAGUNDES NETTO, 1980), em Santa Catarina (ANDREATTA et al., 1981) e, posteriormente, em São Paulo (YAMANAKA et al., 1992; GODINHO et al., 1993). No entanto, o conhecimento mais aprofundado sobre o manejo de reprodutores e o controle da reprodução é recente, com as pesquisas sendo

retomadas em 2014 pelo Laboratório de Piscicultura Marinha – LAPMAR da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC (PASSINI et al., 2015; CERQUEIRA et al., 2017).

Neste laboratório foram realizadas pesquisas relativas à captura, transporte e adaptação de reprodutores selvagens em cativeiro, indução hormonal, desova e larvicultura (PASSINI et al., 2015; CERQUEIRA et al., 2017; CARVALHO et al., 2019), bem como análise da qualidade espermática (MAGNOTTI et al., 2018a; MAGNOTTI et al., 2018b; CASTRO et al., 2019) e desenvolvimento de plantel, maturação e desova de reprodutores nascidos em cativeiro (MAGNOTTI et al., 2020). Esse domínio sobre todo o processo da reprodução e larvicultura, além de inédito para a tainha, facilita a domesticação e abre caminhos para estudos com produção de populações monosexo.

## 1.1 REGULAÇÃO ENDÓCRINA NA REPRODUÇÃO DE PEIXES

Na maioria dos peixes teleósteos o desencadeamento reprodutivo pode ser iniciado a partir do momento em que a idade e o peso mínimo são atingidos e o cérebro, através dos sistemas sensoriais (olhos, glândula pineal, narinas, receptores cutâneos) captura, analisa e converte em sinais eletroquímicos e transmite até o hipotálamo via neurônios sensoriais, as informações que chegam dos estímulos externos (fotoperíodo, temperatura) e dos estímulos sociais (densidade da população, proporção de sexo, entre outros) (CARRILLO et al., 2009; HONJI e MOREIRA, 2017).

No hipotálamo ocorre a síntese e secreção do GnRH (hormônio liberador de gonadotrofinas), que estimula as células gonadotróficas na hipófise a sintetizar e liberar as gonadotrofinas (hormônio folículo estimulante - FSH e o hormônio luteinizante - LH), as quais regulam o processo de gametogênese, estimulando o desenvolvimento de células germinativas, a produção de esteroides sexuais em células somáticas gonadais e liberando fatores de crescimento parácrinos gonadais que controlam o crescimento, desenvolvimento e sobrevivência de células germinativas (TARANGER et al., 2010; LEVAVI-SIVAN et al., 2010; LUBZENS et al., 2010; ZOHAR et al., 2010; HONJI e MOREIRA, 2017).

O GnRH em fêmeas, estimula as células gonadotróficas da hipófise a sintetizar e liberar o FSH, que via corrente sanguínea chega aos folículos ovarianos em desenvolvimento, e nas células da teca, converte o colesterol em testosterona (T), ocorrendo assim, um aumento na produção de hormônios esteroides nas gônadas, justamente pelo desenvolvimento e amadurecimento de células responsáveis por essa produção. A testosterona, então produzida, é transportada às células foliculares, na qual é convertida em  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) através de sua

aromatização pela enzima aromatase (cyp19a), também sob influência do FSH. O E<sub>2</sub> age no fígado via corrente sanguínea, promovendo a síntese de proteínas da zona radiata e vitelogenina (Vtg), que também via corrente sanguínea, é “sequestrada” pelo ovócito por micropinocitose (processo dependente de FSH), promovendo o crescimento do ovócito e incorporação de vitelo, de acordo com a revisão elaborada por Honji e Moreira (2017).

Durante a fase de vitelogênese, processo pelo qual o citoplasma do ovócito acumula substâncias de reserva para posterior utilização pela larva, ocorre um aumento nos níveis plasmáticos de estradiol e testosterona, promovendo a inibição da síntese de FSH através de feedback negativo, e juntamente com a ação do GnRH estimulam a secreção hipofisária do Hormônio Luteinizante (LH) nas fases finais da vitelogênese (PETER; YU, 1997; NAGAHAMA, 1997; LUBZENS et al., 2010).

Nos machos são as células de Leydig, presentes no tecido intersticial dos testículos, as responsáveis pela produção de esteroides produzindo principalmente hormônios andrógenos, que atuam também com função parácrina nas células de Sertoli, células associadas às espermatogônias que regulam a espermatogênese (WELTZIENT et al., 2004; SCHULZ et al., 2010). O andrógeno 11-cetotestosterona (11-KT) é considerado o mais importante para o desenvolvimento dos testículos e a formação dos gametas, possuindo grande importância na rede endócrina que regula a maturação dos testículos e a produção de espermatozoides (MIURA et al., 1991; BORG, 1994). A testosterona (T) é outro andrógeno relevante na maturação do sistema reprodutivo, que além de ser precursora da 11-KT é essencial para estimular estágios iniciais da espermatogênese e o amadurecimento do sistema reprodutivo (BORG, 1994; TOKARZ et al., 2015).

## 1.2 DETERMINAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO SEXUAL EM PEIXES

Os peixes possuem uma grande diversidade de mecanismos de determinação e diferenciação sexual (GUERRERO-ESTEVEZ e MORENO-MENDONZA, 2010). A determinação sexual é um processo geralmente genotípico, do qual se herda o sexo (sexo genético) que estabelece o gênero masculino ou feminino de um indivíduo, sendo definido no momento da fertilização pela combinação dos genes, proveniente do ovócito e do espermatozoide (PIFERRER, 2001). Esses genes relacionados ao sexo podem estar espalhados pelo genoma (sistema poligênico) ou concentrados em um par de cromossomos, os denominados cromossomos sexuais (sistema monogênico) (PIFERRER, 2009). Em algumas espécies, no entanto, a determinação do sexo pode ser ambiental, devido à interação

genótipo com ambiente, em resposta a uma variável abiótica como temperatura, pH, fotoperíodo e salinidade (DEVLIN e NAGAHAMA, 2002).

Por outro lado, a diferenciação sexual é um processo fisiológico que leva as gônadas indiferenciadas a se desenvolverem em ovários ou testículos, dando lugar ao sexo fenotípico (PIFERRER, 2009; BLÁZQUEZ e SOMOZA, 2010). Em peixes gonocóricos, as gônadas se desenvolvem na parte dorsolateral da cavidade peritoneal, tendo origem na cavidade cortical onde são desenvolvidos os ovários ou na cavidade medular na qual se originam os testículos (BAROILLER et al., 1999 e NAKAMURA et al., 1998).

Embora os processos morfológicos e os genes envolvidos na diferenciação sexual sejam evolutivamente conservados, em peixes o processo é muito lábil, e dependendo das condições ambientais o sexo fenotípico pode diferir do sexo genético (PIFERRER, 2009).

Em *Mugil cephalus*, Dor et al. (2016; 2020) identificaram um loci de determinação sexual (SD) e mapearam genes SD no cromossomo LG9, dando mais entendimento sobre os genes que poderiam funcionar como gene de determinação. Já em relação à diferenciação sexual, Chang et al. (1995a), através de análise histológica, encontraram em *M. cephalus* que a diferenciação das gônadas ocorre por volta de 12 meses de idade, com a diferenciação completa ocorrendo após 15 meses. O desenvolvimento gonadal foi então dividido em estágio indiferenciado (<6 meses de idade), estágio diferenciador (7–14 meses) e estágio diferenciado (>15 meses). Chang et al (1995b) da mesma forma, relataram que a diferenciação sexual na tainha cinza ocorre majoritariamente em peixes com 240 a 260 mm.

Também para *M. cephalus* McDonough et al. (2005) descreveram que as gônadas em espécimes com menos de 50 mm têm lóbulos variando de 70 a 100  $\mu\text{m}$  de comprimento, sendo formados por células somáticas e um epitélio germinativo periférico, não apresentando nenhuma característica definidora de macho ou fêmea neste comprimento. Em espécimes de 100 a 150 mm, os lóbulos gonadais são claramente vascularizados e atingem um tamanho de 200 a 300  $\mu\text{m}$  e os primeiros dutos começam a se tornar evidentes. Na classe de 150 a 200 mm, 0,2% das fêmeas e 37,3% dos machos iniciaram a diferenciação sexual, mas a maioria de todos os espécimes (62,5%) permaneceu indiferenciada. As gônadas indiferenciadas tornaram-se maiores com lóbulos medindo de 600 a 800  $\mu\text{m}$ . Apenas na classe de tamanho acima de 200 mm, 83% dos espécimes tornaram-se sexualmente diferenciados. Em alguns casos, os ninhos de células germinativas que são característicos dos precursores femininos, também podiam ser encontrados nas porções centrais dos lóbulos adjacentes às estruturas características dos lóbulos precursores masculinos. O ducto primário estava agora bem formado, no entanto, ainda não havia nenhuma característica morfológica definitiva que

permitisse a determinação do sexo. Os mesmos autores também relataram que a espermatogênese em *M. cephalus* inicia em peixes com comprimento > 250 mm, enquanto a ovogênese em peixes acima de 290 mm.

### 1.3 CULTIVO DE LOTES MONOSEXO

A manipulação de gametas, ovos e embriões pode ser realizada com maior facilidade em peixes, devido à maioria apresentar fecundação e desenvolvimento externos, o que favorece o controle do sexo fenotípico (TOLEDO-FILHO et al., 1996).

Na fase inicial da embriogênese, os embriões não têm o sexo definido fenotipicamente, possuindo apenas as células germinativas primordiais, precursoras biológicas dos ovários e dos testículos. Ao longo do desenvolvimento embrionário, um sinal químico originário de um gene ou de um conjunto de genes será responsável por informar ao tecido totipotente em que direção, macho ou fêmea, se desenvolver (SANTOS e SILVA, 1998).

A fase na qual o animal ainda não passou por processo de diferenciação sexual é conhecida como período lábil, quando o indivíduo se encontra suscetível à definição do sexo (BLÁZQUEZ, 2001; PIFERRER, 2001). O período lábil é específico para cada espécie, podendo acontecer durante o desenvolvimento embrionário ou em diferentes fases do desenvolvimento do animal, como na fase de larva (início do alimento exógeno) ou na fase de juvenil (várias semanas após o início do alimento exógeno) (PIFERRER, 2001; DEVLIN e NAGAHAMA, 2002; ARSLAN et al., 2009). Em salmonídeos, o período lábil na maioria das espécies ocorre normalmente entre o 18º e 28º dia de vida, enquanto em *Salvelinus fontinalis* o período lábil ocorre antes e é mais longo (HAFFRAY et al., 2009). Para *Tachysurus fulvidraco*, uma espécie de siluriforme de água doce, o período lábil ocorre entre o 8º e 30º dia, apresentando maior duração nas fêmeas (PARK et al., 2004).

O cultivo de lotes monosexo de peixes, ou seja, lotes apenas compostos por fêmeas ou machos, é realizado comercialmente no intuito de explorar características associadas ao sexo fenotípico de maior interesse zootécnico, o que proporciona alta rentabilidade na criação das espécies (REIS et al., 2016).

Em tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*), o cultivo monosexo de machos é necessário para o aumento da produção (LIMA, 2011; BOMBARDELLI et al., 2007), visto que as fêmeas apresentam menor crescimento, ganho em peso e conversão alimentar em relação aos machos, por apresentarem maturação sexual precoce e elevada prolificidade

(BOMBARDELLI et al., 2004; ZANONI et al., 2013; REIS et al., 2016). No cultivo de bagre-do-canal (*Ictalurus punctatus*), a produção de lote monosexo masculino também está relacionada ao maior crescimento dos machos em relação às fêmeas (CESAR et al., 2005), que pode ser de 10 a 30% superior (DUNHAM et al., 2001).

Por outro lado, em salmonídeos, são os machos que maturam precocemente e, deste modo, o cultivo monosexo feminino é utilizado pelo seu maior crescimento. Como ao longo do período de maturação sexual também ocorre significativa deterioração da qualidade da carne, as fêmeas tendem a apresentar carne de qualidade superior à dos machos (LEE et al., 2004; TARANGER et al., 2010; REIS, 2015). Da mesma forma, para o robalo-europeu (*Dicentrarchus labrax*), uma população monosexo de fêmeas é interessante por apresentarem taxas de crescimento 30 a 50% maiores que os machos (GORSHKOV, 2004).

Outras características fenotípicas associadas ao sexo também justificam a produção de lotes monosexo (REIS, 2015): para a carpa comum (*Cyprinus carpio*) a produção de fêmeas visa a obtenção de ovas para consumo (KOCOUR et al., 2003; ROTHBARD, 2006), enquanto que em peixes ornamentais, como o beta (*Betta splendens*) e “guppy” (*Poecilia reticulata*), o interesse pela produção de linhagens monosexo de machos deve-se à presença de nadadeiras de visual mais atrativo e/ou de coloração mais intensa (KIRANKUMAR e PANDIAN, 2002; BATISTA et al., 2013). No caso dos mugilídeos, o fator atrativo está no elevado valor de mercado das gônadas femininas maduras, as quais são produto de exportação, consideradas análogas ao caviar (IBAMA, 2007).

Para a produção de lotes monosexo de peixes, diferentes técnicas podem ser utilizadas: manipulação gênica, como ginogênese e androgênese (TEBALDI e AMARAL-JUNIOR, 2009), hibridização (TURRA et al., 2010) e inversão sexual, pelo efeito da temperatura (DRUMMOND, 2007; ZANONI et al., 2013) ou pelo uso de esteroides sexuais (ZANARDI et al., 2011; WEISS et al., 2018). A técnica de inversão sexual utilizando o tratamento com hormônios é a mais utilizada comercialmente, para a qual pode ser utilizado o método direto, realizado em uma única etapa, ou o indireto, que pode ser realizado em duas ou mais etapas (REIS, 2015). Em piscicultura, a inversão sexual tem sido rotineiramente empregada em tilápia-do-nilo (DIAS-KOBERSTEIN et al., 2007), salmão (*Salmo salar*) (LEE et al., 2004), truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (RAZMI et al., 2011) e carpa-comum (*Cyprinus carpio*) (GROZEA et al., 2007), porém para os mugilídeos ainda não é uma ferramenta utilizada.

### 1.3.1 Tratamento com temperatura

Algumas espécies de peixes apresentam a determinação sexual influenciada por fatores ambientais (BAROILLER e D'COTTA, 2001). As primeiras suspeitas de que a determinação sexual de muitos peixes não se dava apenas por caracteres genéticos se deu através da constatação de que a proporção de machos e fêmeas era desigual, em determinadas populações de ambiente natural. Os primeiros experimentos laboratoriais que confirmaram essa hipótese são do final da década de 1960 (YAMAMOTO, 1969), e desde então pesquisas nessa linha estão sendo desenvolvidas.

Segundo Navarro-Martín et al. (2009) e Piferrer (2009), nos vertebrados inferiores gonocorísticos a determinação do sexo ocorre através de dois principais mecanismos: determinação sexual do tipo genotípica (GSD), definida a partir da informação genética, e determinação sexual dependente do ambiente (ESD), sendo a temperatura da água o fator ambiental que mais interfere na determinação do sexo fenotípico no caso dos peixes.

A determinação do sexo dependente da temperatura (TSD) durante períodos sensíveis do desenvolvimento é capaz de determinar o sexo fenotípico de forma irreversível (PIFERRER, 2009). Com isso, tratamentos baseados na temperatura podem ser mais efetivos em indivíduos no período lábil ou período termossensível (BLÁZQUEZ et al., 1998). Strüssmann e Nakamura (2002) comentaram que a temperatura interfere na esteroidogênese nas gônadas, através da modulação da expressão do gene aromatase, e que além da aromatase, outros genes, enzimas e hormônios não esteroides das gônadas, como os produzidos no cérebro e hipófise, também podem ser afetados pela temperatura.

Similar à situação dos répteis, nos peixes são descritos três padrões nas proporções de machos e fêmeas em resposta à temperatura. O número de machos: 1) aumenta com o aumento da temperatura, 2) diminui com o aumento da temperatura e 3) aumenta com os extremos de temperatura e se aproxima a 1:1 nas temperaturas intermediárias (BAROILLER et al., 1999; BAROILLER e D'COTTA, 2001; DEVLIN e NAGAHAMA, 2002). Entre as espécies já pesquisadas, o número de peixes com determinação sexual dependente da temperatura (DST) que seguem os padrões mencionados acima é de 53-55, 2-4 e 2, respectivamente (Tabela 1) (OSPINA-ÁLVAREZ e PIFERRER, 2008).

Entre as espécies de peixes marinhas, vários trabalhos relacionados ao robalo-europeu (BLÁZQUEZ et al., 1998; SAILLANT et al., 2002; MYLONAS et al., 2005; NAVARRO-MARTÍN et al., 2009) mostraram a temperatura como importante fator na diferenciação sexual. Blázquez et al. (1998) verificaram que entre exemplares de 57 a 137 dias após a

fertilização expostos às temperaturas de 25 °C e 15 °C por um período de 80 dias a proporção máxima de fêmeas foi de 27%. Pavlidis et al. (2000), trabalhando com larvas da mesma espécie com idade de 30 dias, sob temperaturas de 13, 15 e 20 °C obtiveram, respectivamente, 72-74%, 67-73% e 24-28% de fêmeas. Enquanto Mylonas et al. (2005), trabalhando com larvas de 11 e 55 dias nas temperaturas de 13, 17 e 21 °C durante 40 dias, verificaram maior porcentagem de fêmeas entre indivíduos com 55 dias nos tratamentos com menores temperaturas.

Outras espécies de peixes também sofrem a influência da temperatura na relação entre machos e fêmeas, como por exemplo o linguado japonês (*Paralichthis olivaceus*) (KITANO et al., 1999) e quatro espécies de peixe-rei (*Menidia menidia*) (CONOVER e KYNARD, 1981), (*Menidia pensinsulae*) (MIDDAUGH e HEMMER, 1987), (*Odonthestes argentinensis*) e (*O. bonariensis*) (STRUSSMANN et al., 1996).

Para os Mugilídeos, não há informações sobre a determinação do sexo por meio da temperatura, porém sabe-se que no ambiente natural, o aumento da salinidade e a queda brusca de temperatura são apontados como “gatilho” para a migração reprodutiva (VIEIRA e SCALABRIN, 1991), indicando uma possível sensibilidade à temperatura.

Tabela 1. Padrões de determinação do sexo dependente da temperatura em peixes gonocorísticos, adaptado de Ospina-Álvarez e Piferrer (2008).

<b>Espécies</b>	<b>Padrão de TSD previamente atribuído</b>
<i>Carassius auratus</i>	(1)
<i>Carassius carassius</i>	1
<i>Danio rerio</i>	(1)
<i>Gnathopogon caeruleus</i>	1
<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	1
<i>Ictalurus punctatus</i>	2
<i>Hoplosternum littorale</i>	1
<i>Oncorhynchus nerka</i>	2
<i>Menidia menidia</i>	1
<i>Menidia peninsulae</i>	1
<i>Odontesthes argentinensis</i>	1
<i>Odontesthes bonariensis</i>	1
<i>Odontesthes hatcheri</i>	1
<i>Oryzias latipes</i>	(1)
<i>Limia melanogaster</i>	1
<i>Poeciliopsis lucida</i>	1
<i>Poecilia sphenops</i>	(1)
<i>Sebastes schlegeli</i>	1
<i>Dicentrarchus labrax</i>	½
<i>Apistogramma spp. (33spp.)</i>	1x33
<i>Oreochromis aureus</i>	1
<i>Oreochromis niloticus</i>	½
<i>Oreochromis mosambicus</i>	1
<i>Paralichthys olivaceus</i>	3
<i>Paralichthys lerhostigma</i>	3
<i>Pseudopleuronectes yokohamae</i>	1
<i>Verasper moseri</i>	1

Padrões de resposta da razão sexual à temperatura: 1) número de machos aumenta com o aumento da temperatura, 2) diminui com o aumento da temperatura e 3) aumenta com os extremos de temperatura.

### 1.3.2 Tratamento com hormônio

O método direto consiste na aplicação de hormônio durante as fases iniciais de desenvolvimento larval de determinadas espécies para a produção do sexo fenotípico desejado (BOMBARDELLI et al., 2004). Assim, se um peixe receber tratamento hormonal durante o período em que o sexo fisiológico pode ser alterado ocorrerá interferência direta no desenvolvimento das células totipotentes (CESAR et al., 2005).

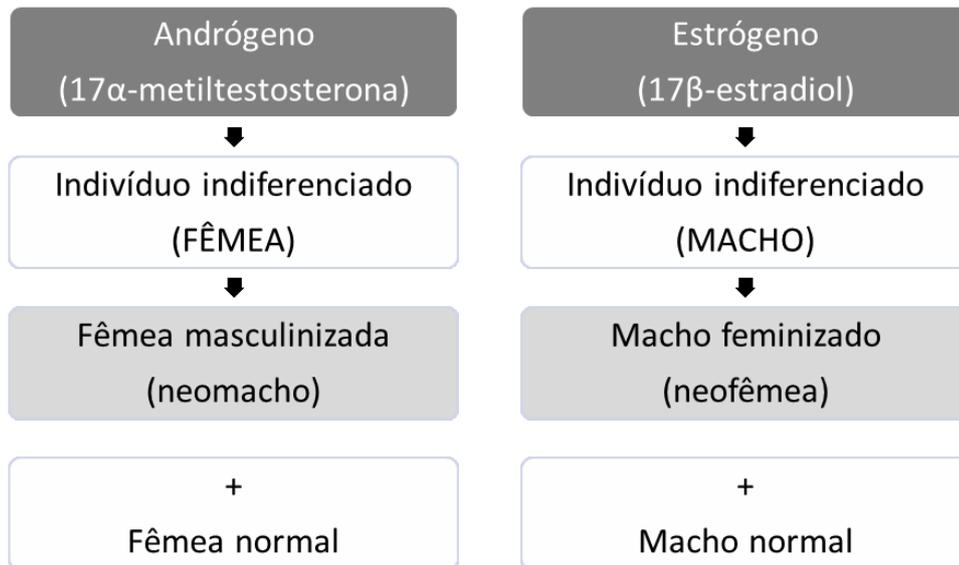
Durante o período lábil as gônadas estão começando a se desenvolver e as células germinativas primordiais presentes são capazes de se transformar em ovogônias ou

espermatogônias, dependendo do hormônio utilizado. Dessa forma, o tratamento realizado nesse período requer a mínima combinação de dosagem e duração do tratamento para alcançar o sexo gonadal desejado (PIFERRER, 2001; DEVLIN e NAGAHAMA, 2002; ARSLAN et al., 2009).

Entre os hormônios mais utilizados na inversão sexual direta estão o andrógeno  $17\alpha$ -metiltestosterona para a masculinização (Figura 1), e o estrógeno  $17\beta$ -estradiol para a feminização (BOMBARDELLI et al., 2004; CNAANI e LEVAVI-SIVAN, 2009), ambos ministrados por via oral pela incorporação na ração (MEURER et al., 2008; LIN et al., 2012), por banho de imersão (BOMBARDELLI et al., 2007; ZANARDI et al., 2011), por injeção ou por implantes (PANDIAN, 2013; PASSINI et al., 2014).

O banho de imersão, que corresponde ao hormônio adicionado na água, é mais adequado para espécies em que o período lábil coincide com a embriogênese ou ocorre durante o estágio larval, enquanto o tratamento com adição do hormônio no alimento vivo ou na ração é mais apropriado para espécies em que o período lábil coincide com a alimentação exógena (PIFERRER, 2001).

Figura 1. Esquema do procedimento normalmente utilizado para a inversão sexual direta em peixes, através da aplicação de hormônios esteroides. Fonte: Weiss (2017) adaptado de Toledo-Filho et al. (1996).



Para o jundiá (*Rhandia quelen*), embora o período lábil não esteja definido, Amaral-Junior et al. (2008a) com o intuito de feminizar, utilizaram doses de 90, 100 e 110 mg kg<sup>-1</sup> do hormônio  $17\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>) incorporado na dieta durante os primeiros 21 dias de larvicultura,

e verificaram que na dose de 100 mg kg<sup>-1</sup> foi encontrada a maior proporção de fêmeas (79,4%). Doses de 105 e 115 mg kg<sup>-1</sup> aplicadas à ração, também foram testadas para o jundiá, tendo sido obtidos, respectivamente, 100% e 87,5% de feminização (AMARAL-JUNIOR et al., 2008b). Weiss et al. (2018), utilizando o mesmo período de tratamento aplicado por Amaral et al. (2008a), obtiveram com 17 $\alpha$ -metiltestosterona nas doses 60, 80 e 100 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente 50, 40 e 20% de machos de jundiá, e observaram na dose mais elevada efeitos inibitórios no desenvolvimento gonadal de machos e fêmeas.

Para o robalo-flecha (*Centropomus undecimalis*), doses de 50 e 100 mg de E<sub>2</sub> por kg de ração, ministrados durante 45 dias em peixes com 14,01  $\pm$  5,33 g resultaram, respectivamente, em 68,42% e 90% de fêmeas (CARVALHO et al., 2014b), enquanto que para o robalo-peva (*Centropomus parallelus*), doses de 25, 50, 75 e 100 mg de E<sub>2</sub> por kg de ração foram testadas em peixes com 3,52  $\pm$  0,98 g, também durante um período de 45 dias, resultando em 100% de fêmeas em todos os tratamentos (CARVALHO et al., 2014a).

Esteroides sexuais (17 $\beta$ -estradiol e 17 $\alpha$ -metiltestosterona) também vêm sendo utilizados em diversas outras espécies de peixes como, por exemplo, pargo (*Acanthopagrus schlegelii*) (CHANG et al., 1994); bagre (*Pseudobagrus fulvidraco*) (PARK et al., 2004); esturjão (*Acipenser brevirostrum*) (FLYNN e BENFEY, 2007); e o “bass” (*Micropterus salmoides*) (ARSLAN et al., 2009).

Em algumas espécies, como é o caso dos peixes hermafroditas sequenciais (protândricos ou protogínicos), a inversão sexual pode ser realizada com sucesso em animais adultos. Para o robalo-flecha Passini et al. (2014) realizaram a feminização após 15 dias, utilizando 0,5 mg kg<sup>-1</sup> de 17- $\beta$ estradiol em implantes de etileno-vinil-acetato em peixes com 383 g. Para a garoupa-verdadeira (*Epinephelus marginatus*) Sanches et al. (2009) obtiveram após 180 dias a masculinização utilizando o 17  $\alpha$ -metiltestosterona de forma oral (1 mg kg<sup>-1</sup> durante 5 dias por semana) e injetável (5 mg kg<sup>-1</sup> semanalmente em dose única) em peixes com 863,9 g.

De forma geral, a simplicidade do método direto utilizando hormônio é a principal vantagem que explica por que é o mais utilizado (BEARDMORE et al., 2001; PIFERRER, 2001; PIFERRER, 2009). No entanto, apesar de ser considerado vantajoso por ser simples e rápido, em alguns países europeus existe restrição para a comercialização e consumo de peixes tratados com esteroides (REIS et al., 2016). Além disso, o método direto aumenta os riscos de contaminação da água e do solo, sendo necessária alta qualificação de funcionários para a manipulação e o manejo do hormônio (REIS, 2015).

Uma solução alternativa para a produção de lotes monosexo livres de hormônio é a inversão sexual indireta, na qual o processo hormonal é realizado apenas no plantel de reprodutores (WEISS, 2017). Para a obtenção de lotes femininos são necessárias duas etapas, sendo a primeira a masculinização de fêmeas genótípicas com hormônio andrógeno, originando neomachos (fêmeas genótípicas apresentando fenótipo masculino) e a segunda a fertilização de ovócitos normais com o sêmen de neomachos (ISLER, 2009; BORGES, 2015). O resultado é uma população 100% de fêmeas. Contudo, este método só é possível com fêmeas homogaméticas (ROUGEOT et al., 2002).

Para espécies poligênicas ou com mecanismo de diferenciação sexual influenciado pelo ambiente, o cruzamento entre peixes com sexo invertido e peixes sem tratamento com hormônio produz um número variado de machos e fêmeas (BLÁZQUEZ et al., 1995; PIFERRER, 2001) e para estas espécies o método direto é a única alternativa prática. Apesar de algumas restrições ao uso de esteroides, Piferrer (2001) descreveu que a administração de hormônios não afeta a qualidade final do produto para o mercado consumidor, pois os tratamentos são realizados nas fases iniciais de cultivo, meses antes da despesca e venda, e os esteroides são liberados após serem metabolizados no fígado em poucos dias.

Dessa forma, levando em consideração que os estudos sobre determinação do sexo ainda são inexistentes para a tainha *Mugil liza*, e nada se conhece sobre o período lábil dessa espécie, torna-se mais garantido o uso do método direto com o uso de hormônios.

#### 1.4 JUSTIFICATIVA

A tainha (*Mugil liza*) é uma espécie de peixe pelágico com grande importância na pesca comercial e artesanal na costa brasileira. Em relação à aquicultura, a tainha apresenta características interessantes para o cultivo como rusticidade e tolerância a diferentes temperaturas e salinidades.

O controle do sexo fenotípico para a produção de lotes monossexos são realizados comercialmente no intuito de obter benefícios relacionados a um dos sexos, como características morfológicas e fisiológicas de maior interesse econômico. No caso dos mugilídeos o interesse está no elevado valor de mercado das gônadas femininas maduras, as quais são produto para exportação considerado análogo ao caviar. Dessa forma, uma maior produção de fêmeas se torna interessante no cultivo da tainha.

Diversos trabalhos já foram realizados com a *M. liza* incluindo formação de reprodutores, reprodução de animais F1 e análise espermática dos machos, porém pesquisas

sobre o controle do sexo gonadal são inexistentes o que motiva e justifica a realização do presente trabalho.

## 1.5 OBJETIVOS

### 1.5.1 Objetivo Geral

Produzir lotes com predominância do sexo feminino da tainha *Mugil liza*, através da manipulação da temperatura da água na larvicultura e da adição do hormônio esteroide 17 $\beta$ -estradiol na dieta de juvenis.

### 1.5.2 Objetivos específicos

Induzir a feminização da tainha por meio da manipulação da temperatura da água de larvicultura e da administração de estradiol na dieta de juvenis;

Verificar se os peixes induzidos à feminização apresentam desempenho zootécnico e desenvolvimento normal das gônadas até o período de primeira maturação sexual.

## 1.6 ESTRUTURA DA TESE

Este trabalho é dividido em dois artigos:

Artigo 1: “Uso da temperatura na larvicultura para a feminização da tainha *Mugil liza* Valenciennes, 1836”, a ser submetido para publicação na revista *Aquaculture International*. Com percentil de 70% em Agronomia e Ciências Agrárias, correspondendo a um qualis A3.

Artigo 2: “Efeito do 17 $\beta$ -estradiol via oral no desempenho zootécnico, na proporção sexual e na primeira maturação da tainha *Mugil liza* Valenciennes, 1836”, a ser submetido para publicação na revista *Aquaculture Research*. Com percentil de 57% em Ciências Aquáticas correspondendo a um qualis A2.

## 2 ARTIGO 1. USO DA TEMPERATURA NA LARVICULTURA PARA A FEMINIZAÇÃO DE *MUGIL LIZA* VALENCIENNES, 1836

Use of temperature in larviculture for the feminization of *Mugil liza* Valenciennes, 1836

Rocha, V. M.<sup>1</sup>; Silva, C. S.<sup>1</sup>; Santos, M., C.<sup>1</sup>; Pilotto, M. R.<sup>1</sup>; Pedrotti, F. S.<sup>1</sup>; Magnotti, C. C. F.<sup>1</sup>; Martins, M. L.<sup>3</sup>; Cerqueira, V. R.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratório de Piscicultura Marinha (LAPMAR) - Universidade Federal de Santa Catarina

<sup>3</sup>Laboratório de Sanidade de Organismos Aquáticos (Aquos) - Universidade Federal de Santa Catarina

### RESUMO

*Mugil liza* é um peixe pelágico, comumente conhecido como tainha. Suas gônadas femininas possuem alto valor e demanda de mercado, o que torna desejável a criação monossexuada das fêmeas. O objetivo deste trabalho foi obter a inversão sexual pelo método direto através do manejo da temperatura durante o estágio larval. Cada unidade experimental foi composta de um tanque circular de 60 L com 45 ovos embrionados L<sup>-1</sup>. Após a eclosão, as larvas foram submetidas ao cultivo em temperaturas de 21, 24, 27 e 30 °C durante 45 dias. Os resultados de peso e comprimento após o período experimental indicam que as temperaturas mais elevadas afetaram positivamente o crescimento sem alterar a sobrevivência. A primeira maturação sexual foi observada ao final do segundo ano de vida e apenas gônadas masculinas foram encontradas. Através da análise histológica, os machos foram classificados em imaturos, em maturação e maduros. A faixa de temperatura usada na larvicultura não teve efeito feminizante para a tainha, podendo ter resultado em masculinização. Temperaturas mais baixas devem ser testadas. Também, é possível que outros fatores ambientais, além dos genéticos, estejam atuando nos mecanismos de determinação sexual.

**Palavras-chave:** Alterações de temperatura. Desempenho zootécnico. Histologia. Mugillidae. Piscicultura marinha.

## ABSTRACT

*Mugil liza* is a pelagic fish, commonly known as mullet. Its female gonads have high value and market demand, which makes the female monosexual breeding desirable. The objective of this work was to obtain sexual inversion by the direct method through temperature management during the larval stage. Each experimental unit consisted of a 60 L circular tank with 45 L<sup>-1</sup> embryonated eggs. After hatching, the larvae were submitted to cultivation at temperatures of 21, 24, 27 and 30 °C for 45 days. The results for weight and length after the experimental period indicate that higher temperatures positively affected growth without altering survival. The first sexual maturation was observed at the end of the second year of life and only male gonads were found. Through histological analysis, males were classified as immature, maturing and mature. The temperature range used in larviculture did not have a feminizing effect on the mullet and may have resulted in masculinization. Lower temperatures should be tested. It is also possible that other environmental factors, in addition to genetics, are acting on the sex determination mechanisms.

**Keywords:** Histology. Marine fish farming. Mugillidae. Temperature changes. Zootechnical performance.

## 2.1 INTRODUÇÃO

A tainha *Mugil liza* Valenciennes, 1836 é um peixe pelágico pertencente à família Mugilidae, espécie amplamente distribuída na costa Atlântica da América do Sul, desde o Caribe até a Argentina (Menezes et al. 2010; Durand et al. 2012). Em relação à biologia reprodutiva é uma espécie bissexuada, que apresenta formação de cardumes e hábitos migratórios, sendo catádroma com recrutamento dos juvenis em lagoas e estuários, seguido de um período de migração no mar para reprodução (Albieri e Araújo 2010). De acordo com Lemos et al. (2014) a migração reprodutiva da tainha explorada comercialmente desde São Paulo até o Rio Grande do Sul inicia em abril e se estende por julho, com o pico de desova em junho, entre o norte de Santa Catarina e o Paraná.

No ambiente natural o comprimento de primeira maturação foi descrito por Garbin et al. (2014) em 450,6 mm para fêmeas e 436,3 para machos. Em cativeiro, porém, os animais adultos apresentam tamanho de primeira maturação inferior a 380 mm para fêmeas e 330 mm para machos (Cerqueira et al. 2017). Embora normalmente as fêmeas adultas de tainha sejam maiores que os machos, a espécie não apresenta dimorfismo sexual, e, portanto, não é possível distinguir visualmente os sexos (González-Castro e Minos 2016). De acordo com Albieri e Araújo (2010), a espécie apresenta desova total e o desenvolvimento ovocitário ocorre de maneira sincrônica em dois grupos. Sua fecundidade gira em torno de 818.992 – 2.869.767 ovócitos por fêmea adulta com 426-660 mm (Lemos et al. 2014), enquanto em condições controladas de cultivo, a fecundidade varia de 1,0 a 1,5 milhão de ovos kg<sup>-1</sup> de peso corporal em fêmeas com comprimento de 474 mm e peso de 1,2 kg (Cerqueira et al. 2017; Magnotti et al. 2020).

A tainha possui grande importância na pesca comercial e artesanal na costa brasileira, sendo a espécie mais importante de Mugilídeo para a atividade pesqueira no Brasil (MPA/MMA 2015). Os estados de Santa Catarina e São Paulo apresentam a produção anual mais expressiva, cerca de 8.069 e 1.304 t respectivamente, destacando-se também, como os maiores produtores de ovas (200 t) dos quais 75% são destinadas à exportação, principalmente para Taiwan e China (SAP/MAPA 2021). Devido ao grande interesse do mercado de exportação das ovas com preços que podem atingir valores elevados, em torno de 20 USD kg<sup>-1</sup> (SAP/MAPA 2021), o cultivo de populações monosexo feminino torna-se bastante desejável.

Comercialmente o cultivo de lotes monosexo de peixes é realizado no intuito de explorar características associadas ao sexo fenotípico de maior interesse zootécnico, o que

proporciona alta rentabilidade na produção das espécies (Reis et al. 2016). Normalmente os lotes monosexo para a piscicultura são obtidos através da aplicação de técnicas de inversão sexual de forma direta por meio da temperatura (Zanoni et al. 2013; Abou El-Fotoh et al. 2014) ou pelo uso de esteroides sexuais (Zanardi et al. 2011; Pandian 2013; Passini et al. 2014; Weiss et al. 2018).

Em alguns países europeus existe restrição para a comercialização e consumo de peixes tratados com esteroides (Reis et al. 2016), colocando em questão os possíveis efeitos adversos para os consumidores, para os peixes e para o meio ambiente. Além disso, estudos apontam a presença de esteroides em efluentes de tratamento de esgoto e águas superficiais em vários países (Desbrow et al. 1998; Isobe et al. 2003) com consequências diretas aos animais que vivem nas áreas estuarinas e costeiras (Aoki et al. 2011), como é o caso da tainha *Mugil cephalus* monitorada na Coreia e no Japão (Aoki et al. 2010) e na Índia (Dhanasekar et al. 2018). A temperatura pode assim, ser uma alternativa para a substituição de hormônios durante o processo de inversão sexual (Zanoni et al. 2013).

Segundo Balloirer e d’Cotta (2001), a temperatura é o fator ambiental que mais interfere na determinação do sexo fenotípico em peixes. Strüssmann e Nakamura (2002) comentam que a temperatura interfere na esteroidogênese nas gônadas, através da modulação da expressão do gene aromatase, e que além da aromatase, outros genes, enzimas e hormônios não esteroides das gônadas, como os produzidos no cérebro e hipófise, também podem ser afetados pela temperatura. No entanto, tratamentos baseados na temperatura são mais efetivos em indivíduos no período lábil (Blázquez et al. 1998), fase na qual o animal ainda não passou por processo de diferenciação sexual e se encontra suscetível à definição do sexo (Blázquez 2001; Piferrer 2001). Em salmonídeos, o período lábil na maioria das espécies ocorre normalmente entre o 18º e 28º dia de vida, enquanto em *Salvelinus fontinalis* o período lábil ocorre antes e é mais longo (Haffray et al. 2009). Para *M. cephalus* Chang et al. (1995) descreveram que células germinativas primordiais foram observadas nas gônadas somente com 3 meses de idade, permanecendo em sua maioria indiferenciadas até 15º mês.

Em peixes termossensíveis, o padrão de mudanças nas proporções de machos e fêmeas em resposta à temperatura mais frequente é a maior proporção de machos com o aumento da temperatura (Baroiller e D’Cotta 2001; Devlin e Nagahama 2002) e consequentemente maior proporção de fêmeas em temperaturas mais baixas. Para o robalo-europeu (*Dicentrarchus labrax* L) Pavlidis et al. (2000), testaram em larvas de 30 dias as temperaturas de 13, 15 e 20 °C e obtiveram, respectivamente, 72-74%, 67-73% e 24-28% de fêmeas. Enquanto Mylonas et al. (2005), trabalhando com larvas de 11-51 dias e 55-95 dias durante 40 dias nas

temperaturas de 13, 17 e 21 °C, verificaram maior porcentagem de fêmeas (aproximadamente 65%) nos indivíduos com 55 dias nos tratamentos com baixas temperaturas.

Para a tainha não há conhecimento sobre a influência da temperatura na modulação do sexo fenotípico, porém sabe-se que fatores ambientais como queda de temperatura e aumento da salinidade são sinalizadores da reprodução, agindo como gatilho para a formação de cardumes e migração reprodutiva (Vieira e Scalabrin 1991). A desova tende a ocorrer quando os cardumes encontram uma condição oceanográfica ideal, principalmente de temperatura superficial do mar, entre 19-21 °C, mais do que um local geográfico determinado (Lemos et al. 2014). Em ambiente controlado, Ângelo et al. (2021) avaliaram ovos de tainha incubados em diferentes temperaturas: 17, 20, 23, 26 e 29 °C e observaram que a temperatura ideal para a eclosão é 23,2 °C e para a sobrevivência das larvas é 23,9 °C, enquanto a temperatura de 16,5 °C causa 70% de mortalidade. Dessa forma, o presente estudo objetivou a feminização da tainha utilizando diferentes temperaturas na larvicultura, partindo do princípio de que o período lábil ocorra nessa fase.

## 2.2 METODOLOGIA

### 2.2.1 Local do experimento e obtenção dos peixes

O experimento foi conduzido no Laboratório de Piscicultura Marinha (LAPMAR) da Estação de Maricultura Elpídio Beltrame (EMEB) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), localizado na Barra da Lagoa, em Florianópolis, Santa Catarina, Brasil (27°34'02"S, 48°25'44"W). Todos os procedimentos utilizados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA, com número de protocolo N° 3102220419.

Para homogeneizar o fornecimento de ovos para o experimento, foi utilizada uma única desova de um casal de reprodutores já aclimatados no LAPMAR, seguindo os procedimentos descritos por Cerqueira et al. (2017). Os reprodutores foram mantidos no laboratório em tanques circulares de lona (diâmetro 3,2 m e profundidade 1,0 m) com volume útil de 8.000 L, em sistema de fluxo contínuo. A salinidade foi de 35, o oxigênio em torno de 6 mg L<sup>-1</sup>, a temperatura variou de 18 °C no inverno a 28 °C no verão e o fotoperíodo natural.

### 2.2.2 Delineamento e procedimento experimental

Após a desova em temperatura de 23,9 °C, os ovos embrionados (45 ovos L<sup>-1</sup>) foram

transferidos para cada unidade experimental, composta de tanques circulares de 60 L. Após a eclosão, as larvas foram submetidas durante 35 dias ao cultivo em temperaturas de 21, 24, 27 e 30 °C (em triplicata), temperaturas que permitem o desenvolvimento das larvas, conforme estudos prévios realizados por Ângelo et al. (2021). Os tanques experimentais foram mantidos em sistema estático de “água verde” com a microalga *Nannochloropsis oculata* numa densidade de 300.000 a 500.000 células mL<sup>-1</sup> até o 18° dia de larvicultura, posteriormente mantidos em fluxo contínuo com renovação inicial de água de 10% dia e final (aos 35 dias) de 100%, com base nos trabalhos de Yousif et al. (2010) e Cerqueira et al. (2017). A sala experimental foi aclimatada com ar-condicionado para a menor temperatura, enquanto as temperaturas mais elevadas foram controladas com aquecedores de 500 W acoplados a termostatos (precisão de ± 1 °C).

Até o 15° dia, as larvas foram alimentadas com rotífero *Brachionus rotundiformis* (2 a 30 mL<sup>-1</sup>). Após o 15° dia foram fornecidos náuplios (0,5 a 1 mL<sup>-1</sup>) e metanáuplios (1,0 a 5,0 mL<sup>-1</sup>) de *Artemia* sp. enriquecidos com ácidos graxos (Red pepper, Bernaqua, BEL) de acordo com o crescimento das larvas. Por fim, foi realizada a transição do alimento vivo para o alimento inerte realizado com dieta seca comercial (Sano S-pak 5/8, Inve, EUA).

Após a completa transição alimentar (aos 35 dias), a avaliação do peso e do comprimento foi realizada com 15 animais de cada tratamento. Para a avaliação da sobrevivência todos os peixes foram contados e em seguida 100 peixes de cada tratamento foram destinados a quatro unidades experimentais de 500 L, com fluxo contínuo de água (100% dia) e temperatura da água de cultivo variando de 20 a 24 °C. Os peixes foram alimentados com dieta comercial de 0,8 mm (Nutripiscis Starter, Presence, Brasil, 45% proteína bruta, 9% lipídio), cinco vezes ao dia até a saciedade aparente (Calixto et al. 2020). Os peixes permaneceram nesses tanques até atingirem cerca de 5 g.

Para a engorda, os peixes foram alocados em quatro tanques externos de 3,2 m de diâmetro e 1,0 m de altura, com volume útil de 8.000 L em sistema de fluxo contínuo de água, com renovação de 200 a 300% dia. A temperatura da água variou de 18 °C (agosto) a 27 °C (janeiro). Os peixes foram alimentados com dieta comercial de 1,3 mm (Nutripiscis Starter, Presence, Brasil, 45% PB), até atingirem cerca de 100 g, sendo a granulometria ajustada para 2-3 mm (Nutripiscis AL, Presence, Brasil, 45% PB), de acordo com o seu crescimento. Ambas as rações foram fornecidas quatro vezes ao dia até a saciedade aparente.

Ao completarem 12 meses de vida, foi realizada uma nova biometria e foi avaliado a proporção sexual e o estágio de maturação gonadal. Para isso, vinte indivíduos de cada unidade experimental foram eutanasiados, utilizando benzocaína (200 mg L<sup>-1</sup>), e as gônadas

extraídas mediante incisão ventral, para facilitar a sua exposição e realização de uma avaliação macroscópica, de acordo com Albieri e Araújo (2010) para *M. liza*. Na sequência as gônadas foram pesadas em balança digital para a determinação da relação gonadossomática (RGS) (Vazzoler 1996). Nesta avaliação não foi possível verificar o sexo dos animais. Dessa forma, 50 indivíduos de cada tratamento foram mantidos nos tanques por mais um ano, para avaliar se os peixes induzidos à feminização apresentavam desempenho zootécnico e desenvolvimento normal das gônadas até a maturação sexual.

Ao completarem 24 meses de vida, durante o início do mês de agosto, com temperaturas mais baixas (cerca de 18 °C), foi realizada uma amostragem em 20 indivíduos por tratamento para avaliação do crescimento, proporção sexual e estágio de maturação gonadal. Os peixes que permaneceram nos tanques foram apenas contados para determinar a sobrevivência final.

As gônadas foram extraídas e pesadas para determinação da RGS. Posteriormente foram fixadas em solução de Davidson por 24 h e depois transferidas para álcool etílico 70%, para conservação até o preparo das lâminas histológicas.

Amostras de sangue dos mesmos indivíduos (n=20) foram coletadas por punção da veia caudal com seringa de 1 mL contendo o anticoagulante ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA 10%) e mantidas em microtubos sobre gelo. Na sequência, as amostras sanguíneas foram centrifugadas para separação do plasma a 2.000 g, durante 10 min a 4 °C, e armazenadas em freezer a -20 °C, para posteriormente quantificar os hormônios testosterona (T) e estradiol (E<sub>2</sub>).

### **2.2.3 Análise histológica e classificação reprodutiva das gônadas**

O processamento histológico foi realizado no Laboratório de Sanidade de Organismos Aquáticos (AQUOS)/UFSC e seguiu as etapas de desidratação em série alcoólica crescente, diafanização em série de xilol, inclusão em parafina, corte longitudinal (5 µm) em micrótomo rotativo (Lupetec, MRP-09, Brasil) coloração com hematoxilina-eosina e montagem final das lâminas. Os estágios de desenvolvimento do epitélio germinativo foram identificados em microscópio de luz (Leica, ICC50 HD, Alemanha), e classificados dentro das fases do ciclo reprodutivo propostas para *M. liza* (Tabela 2).

Tabela 2. Descrição microscópica da gametogênese na tainha *Mugil liza* (adaptado de Albieri e Araújo 2010 e Lemos et al. 2014).

Machos		Fêmeas	
Estágio	Características histológicas	Estágio	Características histológicas
Imaturo A	Presença de espermatogônias, as maiores células da linhagem espermatogênica.	Células germinativas	Predominância de ovócitos jovens. Células organizadas em lamelas ovíferas.
	Todos os estágios de desenvolvimento estão presentes após as divisões mitóticas das espermatogônias. Células espermáticas agrupadas em ninhos.	A	
Maturação B	Túbulos cheios de espermatozoides começam a se acumular nos ductos deferentes. As espermátides são mais visíveis próximas às paredes dos túbulos, mas todos os tipos de células estão presentes.	Vitelogênese lipídica	Iniciada a acumulação de inclusões lipídicas no citoplasma.
		B	
Maturidade funcional C		Vitelogênese de lipídios e proteínas	Citoplasma repleto de proteínas e lipídios. Gotículas de óleo são formadas pela fusão de inclusões lipídicas.
		C	
		Estágio pós-vitelogênico	Ovócitos muito aumentados de tamanho, citoplasma rosa, núcleo ainda presente e fusão de grânulos de proteínas e lipídios.
		D	O diâmetro da membrana vitelínica é maior nessa fase.

#### 2.2.4 Quantificação dos hormônios

As análises hormonais foram realizadas no Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica – LABCAI/UFSC. Os esteroides sexuais

testosterona e estradiol foram quantificados através do ensaio de ELISA utilizando kits comerciais (Testosterona EIA-1559, Estradiol EIA-2693, DRG Instruments GmbH, Alemanha). Os esteroides foram extraídos utilizando o solvente diclorometano a partir de 400  $\mu$ L de plasma sanguíneo de cada indivíduo. Na sequência, o solvente foi evaporado utilizando nitrogênio líquido, e a amostra foi reconstituída em 100  $\mu$ L da solução padrão 0 do kit da DRG contendo 0 ng mL de estradiol e testosterona. A análise foi realizada seguindo orientações do fabricante. As amostras foram lidas no espectrofotômetro (SpectraMax 5, Molecular Devices, Estados Unidos) no comprimento de onda de 450 nm. Os gráficos foram construídos utilizando o software GraphPad Prism 8 (versão 8.0.2).

A recuperação da técnica (“spike and recovery”) para as amostras de plasma de tainha foi de 113,8% para testosterona e 106,0% para estradiol. O coeficiente de variação intraensaio foi de 5,57 para testosterona e 7,74 para estradiol. Já o coeficiente de variação interensaio foi de 6,19 para testosterona e 8,67 para estradiol.

### **2.2.5 Análise estatística**

Para a verificação da existência de diferenças estatísticas do desempenho zootécnico nas diferentes etapas e tratamentos propostos, foi utilizada a análise de regressão, utilizando o programa Statistic 7 ao nível de significância de 5%.

## **2.3 RESULTADOS**

### **2.3.1 Desempenho zootécnico**

Após o período experimental de 35 dias, foi observada diferença significativa para o peso e comprimento em função da temperatura em que os peixes foram mantidos (Figura 2). No entanto, ao final do primeiro e do segundo ano da engorda, não houve mais diferenças significativas de crescimento relacionadas aos tratamentos (Tabela 3).

A relação gonadossomática de todas as temperaturas foi inferior a 0,02% no primeiro ano, e no segundo foi acima de 0,30% (Tabela 3), mas diferenças significativas não foram encontradas.

Figura 2. Análise de regressão de peso e comprimento de juvenis da tainha *Mugil liza* com 35 dias de idade, submetidos a diferentes temperaturas na larvicultura.

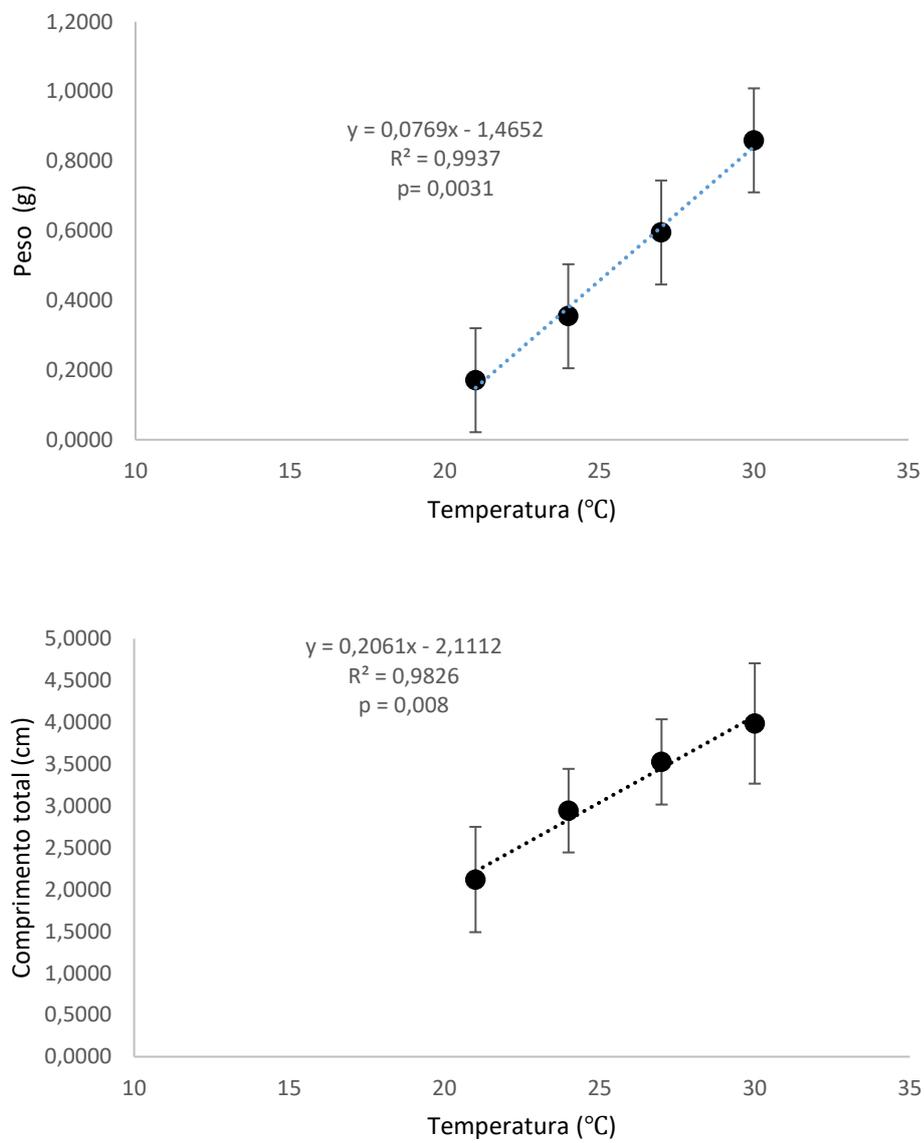


Tabela 3. Variação de peso (P), comprimento (C) e relação gonadossomática (RGS) da tainha *Mugil liza* submetida a diferentes temperaturas na larvicultura, ao final do primeiro e segundo ano.

Temperatura (°C)	P (g)	C (cm)	RGS (%)	1º Ano		2º Ano	
				P (g)	C (cm)	RGS (%)	P (g)
30	157,95 ± 34,06	23,4± 1,64	0,019± 0,01	419,91± 1,81	33,42± 68,90	0,53± 0,70	
27	140,32 ± 20,81	22,9± 1,11	0,021± 0,01	465,61± 1,92	34,77± 83,17	0,32± 0,54	
24	139,77 ± 25,70	22,5± 1,47	0,026± 0,01	463,80± 1,14	34,55± 50,26	0,30± 0,55	
21	154,93 ± 28,84	23,5± 1,37	0,021± 0,01	466,56± 1,77	35,27± 70,09	0,56± 0,67	
Análise de Regressão	NS	NS	NS	NS	NS	NS	

Os valores estão apresentados por média e desvio padrão (±). NS: não significativo.

A sobrevivência foi baixa em todos os tratamentos durante o período experimental (larvicultura), variando de 5 a 12%, mas durante a engorda houve uma maior sobrevivência (Tabela 4). Apenas na temperatura de 24 °C houve sobrevivência em mais de uma repetição e, dessa forma, uma das repetições foi excluída, sendo considerada apenas uma repetição de cada tratamento.

Tabela 4. Dados de sobrevivência da tainha *Mugil liza* durante a larvicultura submetidas a diferentes temperaturas e engorda (primeiro e segundo ano).

Temperatura (°C)	Sobrevivência (%)		
	Larvicultura n <sub>i</sub> = 45	Engorda - 1º Ano n <sub>i</sub> = 100	Engorda - 2º Ano n <sub>i</sub> = 60
30	5,0	77	100
27	6,2	90	98,3
24	12,0	100	98,3
21	7,9	98	100
Análise de Regressão	NS	NS	NS

n<sub>i</sub>: número inicial de indivíduos por unidade experimental (a larvicultura iniciou com ovos embrionados). NS: não significativa.

### 2.3.2 Análise macroscópica e histológica das gônadas

Aos 24 meses de vida foi identificado apenas gônadas masculinas que foram classificadas em três estágios de desenvolvimento testicular: A- Imaturo, B- Maturação, e C- Maturidade funcional (Tabela 5), que macroscopicamente correspondem ao estágio imaturo, em maturação e maduro, respectivamente. Gônadas femininas ou feminizadas não foram

observadas.

Tabela 5. Número de machos da tainha *Mugil liza*, com dois anos em diferentes fases do desenvolvimento testicular, submetidos a diferentes temperaturas na larvicultura.

	Temperaturas (°C)			
	30	27	24	21
Imaturo	8	11	10	9
Maturação	5	6	6	4
Maturidade Funcional	7	3	4	7
<b>Total de machos</b>	20/20	20/20	20/20	20/20

Nos testículos imaturos puderam ser observados apenas espermatogônias, as maiores células da linhagem espermática (Figura 3a). Na fase de maturação foram observados todos os estágios de desenvolvimento celular: agrupamento em ninhos de espermatogônias, espermatócitos e espermatídes. Alguns animais apresentaram espermatozoides no lúmen dos túbulos seminíferos e ductos espermáticos (Figura 3b e c).

Os machos com maturidade funcional tinham espermatozoides acumulados nos túbulos e ductos espermáticos em grande quantidade (Figura 3d), e espermatídes mais visíveis próximas às paredes dos túbulos, embora todos os tipos de célula estivessem presentes (espermatogônias, espermatócitos e espermatídes).

### 2.3.3 Análise hormonal

O valor do estradiol nos machos foi baixo, independente do estágio de maturação. Para testosterona, o maior valor encontrado foi em macho maduro ( $1,29 \pm 0,07$  ng mL<sup>-1</sup>). Não houve diferença significativa na concentração de estradiol e testosterona em função da temperatura (Tabela 6). Entretanto, houve diferença significativa na concentração de testosterona em função do estágio de maturação.

Figura 3. Cortes longitudinais do testículo de machos de tainha *Mugil liza* com 24 meses de idade. a) imaturo: cordões de espermatogônias (EG); b) maturação: presença de espermatogônias (EG) e espermatócitos (EC); c) presença de espermatócitos (EC) e espermatídes (ET) agrupadas nos espermatócitos, além da presença de espermatozoides (EZ); d) maturidade funcional: grande número de espermatozoides presentes na luz dos túbulos, as espermatídes (ET) são mais visíveis próximas às paredes dos túbulos. Coloração: Hematoxilina/eosina.

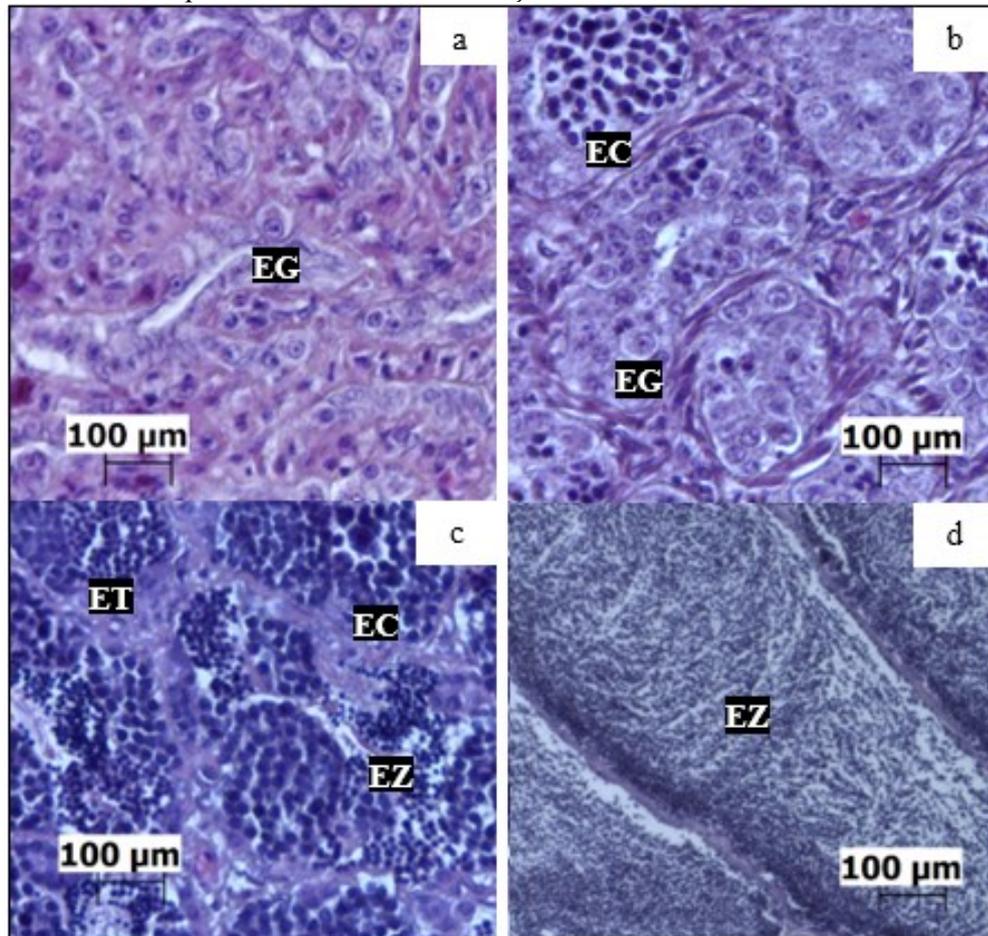


Tabela 6. Valores de média, desvio padrão ( $\pm$  dp), máximo e mínimo de testosterona e estradiol no plasma sanguíneo da tainha *Mugil liza* ao final do segundo ano da engorda. Machos total n = 25; Maduro n = 15; Em maturação n = 4; Imaturo n = 6.

MACHOS						
Temperaturas	Testosterona ( $\text{ng mL}^{-1}$ )			Estradiol ( $\text{pg mL}^{-1}$ )		
	Média $\pm$ dp	Máximo	Mínimo	Média $\pm$ dp	Máximo	Mínimo
30	0,371 $\pm$ 0,397	0,985	0,041	34,77 $\pm$ 10,82	44,63	19,44
27	0,299 $\pm$ 0,355	0,850	0,050	36,58 $\pm$ 15,67	64,86	21,51
24	0,228 $\pm$ 0,132	0,447	0,103	32,12 $\pm$ 7,37	41,09	22,26
21	0,502 $\pm$ 0,460	1,287	0,116	29,69 $\pm$ 11,0	42,29	18,62
Estágio de Maturação	Média $\pm$ dp	Máximo	Mínimo	Média $\pm$ dp	Máximo	Mínimo
Maduro	0,507 $\pm$ 0,364	1,29	0,071	30,44 $\pm$ 9,06	43,14	18,62
Em maturação	0,158 $\pm$ 0,166	0,447	0,050	31,51 $\pm$ 8,73	41,64	21,12
Imaturo	0,091 $\pm$ 0,026	0,113	0,041	36,22 $\pm$ 8,77	44,63	21,51

## 2.4 DISCUSSÃO

Os resultados de peso e comprimento comprovam que as temperaturas mais elevadas durante a larvicultura afetaram positivamente o crescimento sem alterar a sobrevivência. Porém, no primeiro e segundo ano não houve diferença para peso e comprimento, indicando que em condições similares de cultivo, houve uma recuperação no desempenho zootécnico. Para a tainha *Mugil platanus*, Okamoto et al. (2006) utilizando temperaturas de 20, 25 e 30 °C em juvenis, encontraram que o crescimento foi diretamente proporcional ao aumento da temperatura.

No presente trabalho as taxas de sobrevivência durante a larvicultura foram entre 5 e 12%. A baixa sobrevivência pode ser resultado do povoamento com ovos embrionados ao invés de larvas. Cerqueira et al. (2017) relataram taxas de sobrevivência na larvicultura de tainha de no máximo 20%, em temperaturas de 20 a 23 °C. Ângelo et al. (2021) descreveram que a temperatura de 23,9 °C resultou na melhor taxa de sobrevivência ( $75,3 \pm 6,0$ ) para larvas de tainha até 48 horas após a eclosão, enquanto a temperatura de 16,5 °C causou 70% de mortalidade.

Os baixos valores de RGS encontrados em todas as temperaturas ao final do primeiro ano indicam que os peixes estavam sexualmente imaturos, porém com o aumento da RGS ao final do segundo ano foi possível identificar macroscopicamente alguns animais sexualmente maduros ou em maturação, indicando que a condição experimental não interferiu no desenvolvimento das gônadas. Nas tainhas capturadas na natureza, o maior valor observado de RGS nos machos, foi de 4,5% (Lemos et al. 2014), já em cativeiro, o valor encontrado por Castro et al. (2020) foi de  $1,8 \pm 0,4\%$  para indivíduos maduros.

Outro aspecto importante observado no presente trabalho que se relaciona com a maturação sexual foi o perfil hormonal. Os valores para testosterona em machos maduros foram maiores que os de animais imaturos, enquanto os de estradiol foram semelhantes. Em adultos maduros selvagens da espécie congênere *M. cephalus* os valores médios encontrados por Kumar et al. (2015) para testosterona foram superiores ( $182 \text{ ng mL}^{-1}$ ), enquanto os valores de estradiol foram inferiores ( $0,9 \text{ pg mL}^{-1}$ ). Em indivíduos machos, Billard et al. (1982) descrevem que a testosterona tem efeito na espermatogênese, como multiplicação de espermatogônias e formação de espermatozoides, o que torna esperado que o valor desse hormônio seja maior em machos com o avanço da maturação, enquanto o de estradiol seja menor.

No presente estudo, peixes com mais de 20 cm estavam macroscopicamente indiferenciados, e a identificação do sexo foi realizada ao final do segundo ano de vida, quando foi verificado animais nos três estágios de maturação. Para *M. cephalus*, McDonough et al. (2005) descreveram que as gônadas em espécimes com menos de 5 cm não apresentam nenhuma característica definidora de macho ou fêmea, e que na classe de tamanho de 15 a 20 cm 0,2% das fêmeas e 37,3% dos machos iniciam a diferenciação inicial, mas a maioria (62,5%) permanece indiferenciada e somente na classe de tamanho > 20 cm, 83% dos espécimes tornam-se sexualmente diferenciados. Os mesmos autores também relataram que a espermatogênese na tainha inicia em peixes com comprimento > 25 cm, enquanto a ovogênese em peixes acima de 29 cm.

Para *M. liza*, assim como para a maioria das espécies, aceita-se que a proporção sexual seja equilibrada (1:1), mas essa proporção pode ser alterada ao longo do ciclo de vida em função de eventos sucessivos, que atuam de modo distinto sobre os indivíduos de cada sexo (Albieri e Araújo 2010; Vazoller 1996). Nesse estudo, uma frequência 100% masculina foi encontrada em todos os tratamentos, indicando que a faixa de temperatura usada (21 a 30 °C) pode ter resultado em masculinização, sendo necessário testar temperaturas mais baixas. Por outro lado, além dos fatores genéticos, outros fatores ambientais podem estar atuando nos mecanismos de determinação do sexo. Devlin e Nagahama (2002) descreveram que em populações monossexuais verdadeiras são poucas as espécies induzidas pela modificação de um fator ambiental mesmo em valores extremos e que o sexo é provavelmente determinado por fatores genéticos, ambientais e suas interações.

Para o robalo-europeu (*Dicentrarchus labrax*) a temperatura é um importante fator na diferenciação sexual (Navarro-Martín et al. 2009). Pavlidis et al. (2000) mantiveram larvas com 30 dias de idade em temperaturas de 13, 15 e 20 °C, obtendo 72-74%, 67-73% e 24-28% de fêmeas, respectivamente e discutem que a temperatura durante os estágios iniciais de desenvolvimento é o fator crucial que afeta o processo de diferenciação sexual desta espécie. Navarro-Martín et al. (2009), encontraram para a mesma espécie, maior número de fêmeas em larvas submetidas a temperatura de 17 °C durante 55 dias após a eclosão. Já para o robalo-peva (*Centropomus parallelus*), nenhuma das temperaturas testadas (20, 25 e 30 °C) propiciaram a obtenção de fêmeas e de acordo com Ferraz et al. (2011), o fator genético pode ter sido mais importante na definição do sexo.

Strüssmann et al. (1996) avaliaram o efeito da temperatura na proporção sexual em dois peixes aterinídeos comercialmente importantes da América do Sul e encontraram para o *Odontesthes argentinensis* que grupos de peixes criados a 18 °C tiveram significativamente

mais fêmeas do que grupos da mesma progênie mantidos a 25 °C. Porém, para o *Patagonina hatcheri* as razões sexuais em todos os grupos não diferiram significativamente de 1:1 e nenhuma diferença significativa foi encontrada entre grupos da mesma progênie criados em diferentes temperaturas. Esses resultados sugerem a ocorrência de determinação sexual termolábil em *O. argentinensis*, enquanto o sexo gonadal de *P. hatcheri* parece ser fortemente determinado geneticamente.

## 2.5 CONCLUSÕES

Os resultados de peso e comprimento comprovam que as temperaturas mais elevadas durante a larvicultura afetaram positivamente o crescimento sem alterar a sobrevivência. A faixa de temperatura usada na larvicultura não teve efeito feminizante para a tainha *Mugil liza* podendo ter resultado em masculinização. Também é possível que outros fatores ambientais e/ou genéticos, atuem nos mecanismos de determinação sexual, o que ainda necessita ser verificado.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Agência Federal de Apoio e Avaliação de Pós-Graduação em Educação (Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES), que proporcionou a bolsa de pesquisa ao primeiro autor desse estudo. Ao CNPq pela bolsa de produtividade a M.L. Martins (306635/2018-6) e V.R. Cerqueira (309101/2017-4). Este estudo foi parcialmente financiado pela CAPES (código 001 Auxpe 246/2021) e pelo projeto Universal 430770/2018-9.

## 2.6 REFERÊNCIA

Abou El-Fotoh EM, Ayyat MS, Abd El-Rahman GA, Farag ME (2014) Mono sex male production in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* using different water temperatures. Zagazig Journal of Agricultural Research, 41, 1-8.

Albieri RJ, Araújo FG (2010) Reproductive biology of the mullet *Mugil liza* (Teleostei: Mugilidae) in a tropical Brazilian bay. Zoologia, 27(3), 331-340.  
doi: <https://doi.org/10.1590/S1984-46702010000300003>

- Ângelo M, Lisboa MK, Magnotti CCF, Pilotto MR, Mattos JJ, Cerqueira VR (2021) Temperature influence on the embryogenesis, survival and initial development of *Mugil liza* larvae. *Aquaculture Research*, 52(8), 3705-3712. doi: <https://doi.org/10.1111/are.15215>
- Aoki JY, Nagae M, Takao Y, Hara A, Lee YD, Yeo IK, Lim BS, Park CB, Soyano K (2010) Survey of contamination of estrogenic chemicals in Japanese and Korean coastal waters using the wild grey mullet (*Mugil cephalus*). *Science of the Total Environment*, v. 408 (3), p. 660-665. doi: <https://doi.org/10.26028/cybiu/2008-322SP-127>
- Aoki, JY, Hatsuyama, A, Hiramatsu, N, & Soyano, K (2011) Effects of ethynylestradiol on vitellogenin synthesis and sex differentiation in juvenile grey mullet (*Mugil cephalus*) persist after long-term exposure to a clean environment. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 154 (4), p. 346-352. doi <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2011.07.001>
- Baroiller, JF, D'Cotta H (2001) Environment and sex determination in farmed fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 130, n. 4, p. 399-409. doi [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(01\)00267-8](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(01)00267-8)
- Billard R, Fostier A, Weil C, Breton B (1982) Endocrine control of spermatogenesis in teleost fish. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 39(1), 65-79. doi: <https://doi.org/10.1139/f82-009>
- Blázquez M, Zanuy S, Carillo M, Piferrer F (1998) Effects of rearing temperature on sex differentiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Journal of Experimental Zoology*, 281(3), 207-216. doi: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-010X\(19980615\)281:3<207::AID-JEZ6>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-010X(19980615)281:3<207::AID-JEZ6>3.0.CO;2-R)
- Blázquez M (2001) Critical period of androgeninducible sex differentiation in a teleost fish, the European sea bass. *Journal of Fish Biology*, 58(2), 342-358. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2001.tb02257.x>
- Calixto ES, Sterzelecki FC, Musialak LA, Kiyoto JS, Pedrotti FS, Magnotti CCF, Cipriano FS, Cerqueira VR (2020) Effect of feeding frequency on growth performance, blood metabolites, proximate composition and digestive enzymes of Lebranche mullet (*Mugil liza*) juveniles. *Aquaculture Research*, 51(3), 1162-1169. doi: <https://doi.org/10.1111/are.14466>
- Castro J, Magnotti C, Angelo M, Sterzelecki F, Pedrotti F, Oliveira MF, T Soligo, D Fracalossi, Cerqueira VR (2019) Effect of ascorbic acid supplementation on zootechnical performance, haematological parameters and sperm quality of lebranche mullet *Mugil liza*. *Aquaculture Research*, 50(11), 3267-3274. doi: <https://doi.org/10.1111/are.14284>
- Cerqueira VR, Carvalho CVA, Sanches EG, Passini G, Baloi M, Rodrigues RV (2017) Manejo de reprodutores e controle da reprodução de peixes marinhos da costa brasileira. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 41(1), 94-102. Retrieved from <http://cbra.org.br/>
- Chang CF, Lan SC, Chou HY (1995) Gonadal histology and plasma sex steroids during sex differentiation in grey mullet, *Mugil cephalus*. *Journal of Experimental Zoology*, 272(5), 395-406. doi: <https://doi.org/10.1002/jez.1402720509>

- Desbrow CEJR, Routledge EJ, Brighty GC, Sumpter JP, Waldock M (1998) Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening. *Environmental science & technology*, 32(11), 1549-1558. Retrieved from Sharing Guidelines (acs.org)
- Devlin RH, Nagahama Y (2002) Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological and environmental influences. *Aquaculture*, 208(3-4), 191-364. doi: [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00057-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00057-1)
- Dhanasekar K, Selvakumar N, Munuswamy N (2018) Occurrence of Intersex in Grey Mullet, *Mugil cephalus* L. from Kovalam Coast, Tamil Nadu. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 18(4), 603-609. doi: 10.4194/1303-2712-v18\_4\_12
- Durand JD, Shen KN, Chen WJ, Jamandre BW, Blel H, Diop K, Nirchio M, Garcia de León FJ, Whitfield AK, Chang CW, Borsa P (2012) Systematic of the grey mullets (Teleostei: Mugiliformes: Mugilidae): molecular phylogenetic evidence challenges two centuries of morphology-based taxonomy. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 64(1), 79-92. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2012.03.006>
- Ferraz EM, Carvalho GCS, Schafer ALC, Narahara MY, Cerqueira VR (2011) Influência da temperatura de cultivo sobre crescimento e diferenciação sexual de robalo-peva, *Centropomus parallelus* Poey, 1860. *Revista Brasileira de Engenharia de Pesca*, 6(1), 1-16. doi: <https://doi.org/10.18817/repesca.v6i1.334>
- Garbint T, Castello JP, Kinas PG (2014) Age, growth, and mortality of the mullet *Mugil liza* in Brazil's southern and southeastern coastal regions. *Fisheries Research*, 149, 61-68. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2013.09.008>
- González-Castro M, Minos G (2016) Sexuality and reproduction of Mugilidae. *Biology, ecology and culture of grey mullets (Mugilidae)*, 227-263.
- Haffray P, Petit V, Guiguen Y, Quillet E, Rault P, Fostier, A (2009) Successful production of monosex female brook trout *Salvelinus fontinalis* using gynogenetic sex reversed males by a combination of methyltestosterone immersion and oral treatments. *Aquaculture*, 290 (1-2), 47-52.
- Isobe T, Shiraishi H, Yasuda M, Shinoda A, Suzuki H, Morita M (2003) Determination of estrogens and their conjugates in water using solid-phase extraction followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography A*, 984(2), 195-202. doi: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)01851-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)01851-4)
- Kumar P, Arasu AR T, Kailasam M, Sukumarran K, Subburj R, Tyagraj G, Natarajan M (2015) Gonadal development and steroid hormone profile of wild caught grey mullet (*Mugil cephalus*). *Biological Rhythm Research*, 46(4), 601-610. doi: <https://doi.org/10.1080/09291016.2015.1034974>
- Lemos VM, Varela Jr AS, Schwingel PR, Muelbert JH, Vieira JP (2014) Migration and reproductive biology of *Mugil liza* (Teleostei: Mugilidae) in south Brazil. *Journal of fish biology*, 85(3), 671-687. doi: <https://doi.org/10.1111/jfb.12452>

- Magnotti CC, Santos Cipriano F, Pedrotti FS, Cerqueira VR (2020) Advances in reproduction of the lebranche mullet *Mugil liza*: maturation and spawning of fl breeders in captivity. *Boletim do Instituto de Pesca*, 46(3).
- McDonough CJ, Roumillat WA, Wenner CA (2005) Sexual differentiation and gonad development in striped mullet (*Mugil cephalus* L.) from South Carolina estuaries. *Fishery Bulletin*, 103(4), 601-619. Retrieved from <http://hdl.handle.net/1834/25630>
- Menezes NA, Oliveira CD, Nirchio M (2010) An old taxonomic dilemma: the identity of the western south Atlantic lebranche mullet (Teleostei: Perciformes: Mugilidae). *Zootaxa*, 2519(1), 59-68. Retrieved from <https://www.researchgate.net/>
- MPA/MMA (2015) Ministério da Pesca e Aquicultura/Ministério do Meio Ambiente. Plano de Gestão para o uso sustentável da tainha, *Mugil liza* Valenciennes, 1836, no Sudeste e Sul do Brasil. Retrieved from <https://www.gov.br/>
- Mylonas CC, Anezaki L, Divanach P, Zanuy S, Piferrer F, Ron B, Peduel A, Bem Atia I, Gorshkov S, Tandler A (2005) Influence of rearing temperature during the larval and nursery periods on growth and sex differentiation in two Mediterranean strains of *Dicentrarchus labrax*. *Journal of Fish Biology*, 67(3), 652-668. doi: <https://doi.org/10.1111/j.0022-1112.2005.00766.x>
- Navarro-Martín L, Blázquez M, Viñas J, Joly S, Piferrer F (2009) Balancing the effects of rearing at low temperature during early development on sex ratios, growth and maturation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Limitations and opportunities for the production of highly female-biased stocks. *Aquaculture*, 296, 347-358. doi: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.07.022>
- Okamoto MH, Sampaio LA, ND, Maçada ADP (2006) Efeito da temperatura sobre o crescimento e a sobrevivência de juvenis da tainha *Mugil platanus* Günther, 1880. *Atlântica*, 28, 61-66. Retrieved from <http://repositorio.furg.br/handle/1/693>
- Pandian TJ (2013) Sex reversal. In: PANDIAN TJ (Ed.). *Endocrine Sex Differentiation in Fish*. Florida: CRC Press, 175-212. Retrieved from <https://books.google.com.br/>
- Passini G, Carvalho CVA, Sterzelecki FC, Cerqueira VR. (2014) Induction of sex inversion in common snook (*Centropomus undecimalis*) males, using 17- $\beta$ estradiol implants. *Aquaculture Research*, 47, 1090-1099.
- Pavlidis M, Koumoundouros G, Sterioti A, Somarakis S, Divanach P, Kentouri M (2000) Evidence of temperature-dependent sex determination in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) *Journal of Experimental Zoology*, 287(3), 225-232. doi: [https://doi.org/10.1002/1097-010X\(20000801\)287:3<225::AID-JEZ4>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/1097-010X(20000801)287:3<225::AID-JEZ4>3.0.CO;2-D)
- Piferrer F (2001) Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. *Aquaculture*, 197(1-4), 229-281. doi: [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00589-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00589-0)
- Reis VR, Almeida FL, Piferrer F (2016) Produção de populações monossexo em peixes. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 40(1), 22-28. Retrieved from <http://cbra.org.br/>

SAP/MAPA (2021) Secretaria de Aquicultura e Pesca - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. GTT - COTA: Relatório do grupo técnico de trabalho para avaliação das cotas de tainha para a temporada de pesca de 2021. 60 p. Retrieved from <https://www.gov.br/>

Strüssmann CA, Calsina Cota JC, Phonlor G, Higuchi H, Takashima F (1996) Temperature effects on sex differentiation of two South American atherinids, *Odontesthes argentinensis* and *Patagonina hatcheri*. *Environmental Biology of Fishes*, 47(2), 143-154.

Strüssmann CA, Nakamura M (2002) Morphology, endocrinology, and environmental modulation of gonadal sex differentiation in teleost fishes. *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 26(1), 13-29, 2002.

Vazzoler AE (1996) *Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática* (Ed): Anna Emília Amato de Moraes Vazzoler. Maringá: EDUEM; São Paulo: SBI, 169p.

Vieira JP, Scalabrin C (1991) Migração reprodutiva da “tainha” (*Mugil platamus* Gunther, 1980) no sul do Brasil. *Atlântica*, 13(1), 131-141.

Weiss LA, Bernardes-Júnior JJ, Machado C, Oliveira-Nuñez AP (2018) Masculinization of South American catfish (*Rhamdia quelen*) through dietary administration of 17 $\alpha$ -methyltestosterone. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 31(4), 304-314. doi: <https://doi.org/10.17533/udea.rccp.v31n4a07>

Yousif OM, Fatah AA, Krishna Kumar K, Minh DV, Hung BV (2010) Induced spawning and larviculture of grey mullet, *Mugil cephalus* (Linnaeus 1758) in the Emirate of Abu Dhabi. *Aquaculture Asia*, 15(1), 41-43. Retrieved from <http://eprints.cmfri.org.in/id/eprint/11152>

Zanardi MF, Dias-Koberstein TCR, Santos MAD, Malheiro EB (2011) Desempenho produtivo e reversão sexual em tilápias em dois métodos hormonal. *Veterinária e Zootecnia*, 18(1), 45-52. Retrieved from <https://web.archive.org/>

Zanoni MA, Leal TV, Caetano Filho M, Oliveira CAL, Ribeiro RP (2013) Inversão sexual de alevinos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) variedade Supreme, submetidos a diferentes temperaturas durante fase de diferenciação sexual. *Semina: Ciências Agrárias*, 34(1), 455-465. doi: 10.5433/1679-0359.2013v34n1p455

**3 ARTIGO 2: EFEITO DO 17 $\beta$ -ESTRADIOL VIA ORAL NO DESEMPENHO ZOOTÉCNICO, NA PROPORÇÃO SEXUAL E NA PRIMEIRA MATURAÇÃO DA TAINHA *MUGIL LIZA VALENCIENNES*, 1836**

*Effect of oral 17 $\beta$ -estradiol on zootechnical performance, sex ratio and first maturation of mullet *Mugil liza Valenciennes*, 1836*

Rocha, V. M.<sup>1</sup>.; Silva, C. S.<sup>1</sup>.; Freitas, G. L.<sup>1</sup>.; Pilotto, M. R.<sup>1</sup>.; Araújo-Silva, S. L.<sup>2</sup>.; Magnotti, C. C. F.<sup>1</sup>.; Martins, M. L.<sup>3</sup>.; Cerqueira, V. R.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratório de Piscicultura Marinha (LAPMAR) - Universidade Federal de Santa Catarina

<sup>2</sup>Laboratório de Peixes e Ornamentais Marinhos (LAPOM) - Universidade Federal de Santa Catarina

<sup>3</sup>Laboratório de Sanidade de Organismos Aquáticos (Aquos) - Universidade Federal de Santa Catarina

**RESUMO**

A tainha *Mugil liza* é um peixe pelágico, amplamente distribuído na costa Atlântica da América do Sul. Suas gônadas femininas possuem alto valor e demanda de mercado, o que torna desejável a criação monosssexuada das fêmeas. O objetivo deste trabalho foi utilizar o hormônio 17 $\beta$ -estradiol por via oral em juvenis para aumentar a proporção de fêmeas, avaliando o desempenho zootécnico e a primeira maturação sexual. Foram cinco tratamentos: 60, 80, 100, 120 e 140 mg de 17 $\beta$ -estradiol por kg de dieta e um controle sem uso de hormônio por 60 dias. Cada unidade experimental foi estocada com 150 peixes, pesando 0,15  $\pm$  0,7 g e medindo 2,1  $\pm$  0,5 cm. A primeira maturação sexual foi observada ao final do segundo ano de vida. Foram identificadas gônadas masculinas (94,64%), femininas (1,78%), e intersexuais ou ovotestis (3,57%). Na maioria (96,22%) das gônadas masculinas dos peixes que receberam o hormônio houve alteração da morfologia, principalmente nos tratamentos que receberam doses mais elevadas. Os tratamentos hormonais afetaram as gônadas, mas não houve inversão sexual. Como a espécie apresenta diferenciação sexual vários meses após a fertilização, outros testes devem ser realizados, alterando o tamanho inicial dos indivíduos e a duração do tratamento. A frequência superior de machos, indica que além dos fatores genéticos, fatores ambientais, podem estar atuando nos mecanismos de determinação do sexo.

**Palavras-chave:** Administração oral. Hormônios. Maricultura. Produção de fêmeas. Tainha.

## ABSTRACT

The *Mugil liza* mullet is a pelagic fish, widely distributed on the Atlantic coast of South America. Its female gonads have high value and market demand, which makes the female monosexual breeding desirable. The objective of this work was to use the hormone 17 $\beta$ -estradiol orally in juveniles to increase the proportion of females, evaluating the zootechnical performance and the first sexual maturation. There were five treatments: 60, 80, 100, 120 and 140 mg of 17 $\beta$ -estradiol per kg of diet and a control without hormone use for 60 days. Each experimental unit was stocked with 150 fish, weighing  $0.15 \pm 0.7$  g and measuring  $2.1 \pm 0.5$  cm. The first sexual maturation was observed at the end of the second year of life. Male (94.64%), female (1.78%) and intersexual or ovotestis (3.57%) gonads were identified. In the majority (96.22%) of the male gonads of the fish that received the hormone, there was a change in morphology, mainly in the treatments that received higher doses. Hormonal treatments affected the gonads, but there was no sexual inversion. As the species presents sexual differentiation several months after fertilization, other tests must be performed, changing the initial size of individuals and the duration of treatment. The higher frequency of males indicates that, in addition to genetic factors, environmental factors may be acting on sex determination mechanisms.

**Keywords:** Female production. Hormones. Mariculture. Mullet. Oral administration.

### 3.1 INTRODUÇÃO

A tainha *Mugil liza* Valenciennes, 1836 é uma espécie de peixe pelágico, que apresenta ampla distribuição na costa Atlântica da América do Sul, desde o Caribe até a Argentina (Menezes, Oliveira e Nirchio, 2010; Durand et al., 2012). Possui grande importância para a pesca artesanal e industrial no litoral sul-sudeste do Brasil, sendo a sétima espécie mais capturada (MPA/MMA, 2015). Os estados de Santa Catarina e São Paulo se destacam com a produção anual mais expressiva, em torno de 8.069 e 1.304 toneladas (t) respectivamente, sendo também, os maiores produtores brasileiros de ovas (SAP/MAPA, 2021).

Em relação à biologia reprodutiva é uma espécie bissexuada, que apresenta formação de cardumes e hábitos migratórios, sendo catádroma com recrutamento dos juvenis em lagoas e estuários, seguido de um período de migração no mar para reprodução (Albieri e Araújo, 2010). De acordo com Lemos, Varela Jr, Schwingel, Muelbert e Vieira (2014) a migração reprodutiva da tainha explorada comercialmente desde São Paulo até o Rio Grande do Sul inicia em abril e se estende por julho, com o pico de desova em junho, entre o norte de Santa Catarina e o Paraná, quando os cardumes encontram uma condição oceanográfica ideal, principalmente de temperatura superficial do mar, entre 19-21 °C.

A tainha apresenta maturidade sexual tardia para ambos os sexos e os machos maturam mais cedo que as fêmeas. No ambiente natural o comprimento de primeira maturação foi descrito por Garbin, Castello e Kinas (2014) em 450,6 mm para fêmeas e 436,3 para machos. Em cativeiro, porém, os animais adultos apresentam tamanho de primeira maturação inferior a 380 mm para fêmeas e 330 mm para machos (Cerqueira et al., 2017). Embora normalmente as fêmeas adultas de tainha sejam maiores que os machos, não apresenta dimorfismo sexual, e, portanto, não é possível distinguir externamente os sexos (González-Castro e Minos, 2016).

Do ponto de vista da aquicultura, a *M. liza* é uma espécie que apresenta características que a qualificam para o cultivo, tais como: ampla tolerância às diferentes salinidades (Neto e Spach, 1998; Sampaio, Wasielesky e Miranda-Filho, 2002; Lisboa, Barcarolli, Sampaio e Bianchini, 2015a), temperaturas (Okamoto, Sampaio e Maçada, 2006), fácil aclimação ao cativeiro, pois aceita rapidamente a dieta inerte (Sampaio, Ferreira e Tesser, 2001; Silva, Sampaio, Martins, Romano e Tesser, 2013). Além disso, as ovas de tainha são muito apreciadas no Brasil e em outros países (Ferreira, Carbonera e Espírito Santo, 2011). Cerca de 75% da produção brasileira de gônadas de tainha é exportada, principalmente para Taiwan e

China, e o preço pode chegar a 20 dólares por kg (SAP/MAPA, 2021). Devido a essa demanda do mercado, torna-se desejável a criação de populações monossexuais de fêmeas.

Comercialmente, o cultivo de lotes monossexo de peixes é realizado no intuito de explorar características associadas ao sexo fenotípico de maior interesse zootécnico, o que proporciona alta rentabilidade na produção das espécies (Reis, Almeida e Piferrer, 2016). Normalmente, os lotes monossexo para a piscicultura são obtidos através da aplicação de técnicas de inversão sexual de forma direta por meio da temperatura (Zanoni, Leal, Caetano Filho, Oliveira e Ribeiro, 2013) ou pelo uso de esteroides sexuais (Zanardi, Dias-Koberstein, Santos e Malheiro, 2011; Pandian, 2013; Weiss, Bernardes-Júnior, Machado e Oliveira-Nuñez, 2018).

A fase indiferenciada no desenvolvimento da gônada, conhecida como período lábil, é o período em que as gônadas são mais sensíveis à ação de esteroides exógenos (Park, Kim, Cho e Kim, 2004). Durante este período as gônadas estão começando a se desenvolver e as células germinativas primordiais presentes são capazes de se diferenciar em ovogônias ou espermatogônias, dependendo do hormônio utilizado. O período lábil é específico para cada espécie, podendo acontecer durante o desenvolvimento embrionário, na fase de larva (início do alimento exógeno) ou na fase de juvenil (várias semanas após o início do alimento exógeno). O tratamento realizado nesse período requer a mínima combinação de dosagem e duração do tratamento para alcançar o sexo gonadal desejado (Piferrer, 2001; Devlin e Nagahama, 2002; Arslan, Phelps e Osborne, 2009).

Entre os hormônios mais utilizados para a inversão sexual direta estão o andrógeno  $17\alpha$ -metiltestosterona, para masculinização, e o estrogênio  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) para feminização (Bombardelli, Hayashi e Meurer, 2004; Cnaani e Levavi-Sivan, 2009), ambos administrados por via oral por alimentação (Meurer et al., 2008; Lin, Benfey e Martin-Robichaud, 2012), por banho de imersão (Zanardi et al., 2011), por injeção ou por implantes (Pandian, 2013; Passini, Carvalho, Sterzelecki e Cerqueira, 2016). Para o jundiá (*Rhandia quelen*),  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  de  $E_2$  na dieta durante os primeiros 21 dias de incubação resultou em 79,4% de fêmeas (Amaral-Junior, Nunes e Garcia, 2008a). Estudos com robalo (*Centropomus undecimalis* e *C. parallelus*) tiveram inversão sexual de 90 a 100%, utilizando  $100 \text{ mg}$  de  $E_2$  por kg de ração em peixes com  $14,01 \pm 5,33 \text{ g}$  e  $3,52 \pm 0,98 \text{ g}$  em um período de 45 dias (Carvalho, Passini, Melo e Cerqueira, 2014a; Carvalho, Passini, Costa, Vieira e Cerqueira, 2014b).

Para o gênero *Mugil* a inversão sexual foi realizada para *M. cephalus*, por Chang, Lan e Pan (1995) utilizando doses baixas ( $1 \text{ mg } E_2 \text{ kg}^{-1}$  de ração por 4 meses e de  $15 \text{ mg } E_2 \text{ kg}^{-1}$

por mais 4 meses) e doses altas (8 mg E<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> de ração por 4 meses e 120 mg E<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> por mais 4 meses) do hormônio 17β-estradiol em peixes com seis meses e todos os tratamentos estimularam o desenvolvimento de juvenis para fêmeas.

A administração de dieta suplementada com hormônios é um método de baixo custo para inversão sexual, sendo amplamente utilizado em espécies cujo período lábil ocorre após o início da alimentação exógena (Pandian, 2013). Além disso, para espécies poligênicas ou com mecanismos de diferenciação sexual influenciados pelo ambiente, o uso do método direto é inicialmente a alternativa mais prática (Piferrer, 2001).

Considerando que o método direto, através da manipulação da temperatura na fase de larvicultura já foi testada por Rocha et al. (2023, submetido à publicação) obtendo lotes 100% masculinos e para a tainha *M. liza* ainda falta conhecimento sobre a determinação do sexo, o objetivo deste estudo foi utilizar o hormônio 17β-estradiol por via oral em juvenis para aumentar a proporção de fêmeas. Dessa forma, o período e a duração dos tratamentos foram escolhidos para testar a possibilidade de obter a inversão com juvenis logo após a metamorfose, reduzindo a quantidade e o custo de hormônio, além de reduzir riscos ao peixe e ao meio ambiente.

## 3.2 METODOLOGIA

### 3.2.1 Local do experimento e obtenção dos peixes

O experimento foi conduzido no Laboratório de Piscicultura Marinha (LAPMAR) da Estação de Maricultura Elpídio Beltrame (EMEB) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), localizado na Barra da Lagoa, em Florianópolis, Santa Catarina, Brasil (27°34'02"S, 48°25'44"W). Todos os procedimentos utilizados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA, com número de protocolo N° 3102220419.

Para homogeneizar o fornecimento de peixes para o experimento, foi utilizada uma única desova de um casal de reprodutores já aclimatados no LAPMAR, seguindo os procedimentos descritos por Cerqueira et al. (2017). Os reprodutores foram mantidos no laboratório em tanques circulares de lona (diâmetro 3,2 m e profundidade 1,0 m) com volume útil de 8.000 L, em sistema de fluxo contínuo. A salinidade foi de 35, o oxigênio em torno de 6 mg L<sup>-1</sup>, a temperatura variou de 18 °C no inverno a 28 °C no verão e o fotoperíodo foi natural.

A larvicultura foi baseada nos trabalhos de Yousif, Fatah, Kumar, Minh e Hung (2010)

e Cerqueira et al. (2017). Nos primeiros 10 dias o tanque foi mantido em sistema de “água verde”, com a microalga *Nannochloropsis oculata* numa densidade de 300.000 a 500.000 células mL<sup>-1</sup> e temperatura de 24 °C. As larvas foram alimentadas até o 15º dia com o rotífero *Brachionus rotundiformis* (2 a 30 mL<sup>-1</sup>), e após o 15º dia foram fornecidos náuplios (0,5 a 1 mL<sup>-1</sup>) e metanáuplios (1,0 a 5,0 mL<sup>-1</sup>) de *Artemia* sp. enriquecidos com ácidos graxos (Red pepper, Bernaqua, BEL) de acordo com o crescimento das larvas. Por fim foi realizado a transição do alimento vivo para o alimento inerte realizado com dieta seca comercial inicial (Sano S-pak 5/8, Inve, EUA).

### 3.2.2 Preparo das dietas

Dietas com diferentes concentrações: 60, 80, 100, 120 e 140 mg de E<sub>2</sub> (17β-estradiol, E8875-1G, Sigma-Aldrich, Alemanha, com ≥98% de pureza) foram preparadas utilizando as dietas secas comerciais: ração inicial (Sano S-pak 5/8, Inve, EUA) e ração de 0,8 mm (Nutripiscis Starter, Presence, Brasil, 45% PB) fornecidas de acordo com o crescimento dos animais. A aplicação do hormônio ocorreu uma semana antes do início do experimento, seguindo metodologia adaptada de Arslan et al. (2009). O hormônio primeiramente foi dissolvido em álcool absoluto e, em seguida, uma alíquota dessa solução foi diluída em etanol (96%) e misturada uniformemente em um quilograma da dieta seca. Ao final, as dietas foram distribuídas em bandejas protegidas da luz, por 48 h, para completa evaporação do álcool. Na dieta controle também foi adicionado álcool (sem hormônio), seguido dos demais procedimentos.

### 3.2.3 Procedimento experimental

#### Fase 1 – Berçário

O experimento foi realizado em unidades experimentais de 500 L, com fluxo contínuo e fotoperíodo natural. Logo após a completa transição de alimento vivo para alimento inerte (juvenis com 35 dias), foi fornecida a dieta contendo diferentes doses do hormônio. Foram cinco tratamentos: 60, 80, 100, 120 e 140 mg de E<sub>2</sub> por kg de ração e um controle. As seis unidades experimentais continham 150 peixes cada, com peso inicial médio de 0,15 ± 0,7 g e comprimento total de 2,1 ± 0,5 cm (amostra com n=10) e cada peixe foi considerado uma repetição. A alimentação ocorreu cinco vezes ao dia até a saciedade aparente (Calixto et al., 2020), por um período de 60 dias. Ao final do período experimental, 15 peixes de cada

tratamento e do controle foram coletados para determinação do peso e comprimento total. Todos os indivíduos em cada tanque foram contados para avaliação de sobrevivência.

Os parâmetros de qualidade da água foram monitorados a cada 24 horas. A temperatura média durante o experimento foi de 20,5 °C ( $\pm 1,77$ ), oxigênio 6,5 mg L<sup>-1</sup> ( $\pm 0,45$ ), pH 7,5 e salinidade 34, medidos respectivamente, com auxílio de oxímetro digital (YSI 55, Yellow Springs, OH, United Unidos), medidor de pH digital (YSI EcoSense pH 10, Yellow Springs Instruments, OH, Estados Unidos) e refratômetro (SR-028, aiChose Inc., Shenzhen, China).

### **Fase 2 – Engorda**

Os sobreviventes de cada unidade experimental anterior foram transferidos para seis tanques externos com volume útil de 8.000 L, em sistema de fluxo contínuo com renovação de água de 200 a 300% por dia. A alimentação foi com dieta comercial de 1,3 mm (Nutripiscis Starter, Presence, Brasil, 45% PB), até atingirem cerca de 100 g, sendo a granulometria ajustada para 2-3 mm (Nutripiscis AL, Presence, Brasil, 45% PB), de acordo com o seu crescimento. Ambas as rações foram fornecidas quatro vezes ao dia até a saciedade aparente.

Ao completarem 12 meses de idade foi realizada uma nova biometria e foi avaliado a proporção sexual e o estágio de maturação gonadal. Para isso, vinte indivíduos de cada unidade experimental foram eutanasiados, utilizando benzocaína (200 mg L<sup>-1</sup>), e as gônadas extraídas mediante incisão ventral, para facilitar a sua exposição e realização de uma avaliação macroscópica, de acordo com Albieri e Araújo (2010) para *M. liza*. Na sequência as gônadas foram pesadas em balança digital para a determinação da relação gonadosomática (RGS) (Vazzoler, 1996). Nesta avaliação não foi possível verificar o sexo dos animais. Dessa forma, 50 indivíduos de cada tratamento foram mantidos nos tanques por mais um ano para avaliar se os peixes induzidos à feminização apresentavam desempenho zootécnico e desenvolvimento normal das gônadas até a maturação sexual.

Ao completarem 24 meses de vida, no início do mês de agosto, com temperaturas mais baixas (cerca de 18 °C), foi realizada uma amostragem em 20 indivíduos por tratamento para avaliação do crescimento, proporção sexual e estágio de maturação gonadal. Os peixes que permaneceram nos tanques foram apenas contados para determinar a sobrevivência final. As gônadas foram extraídas e pesadas para determinação da RGS. Posteriormente foram fixadas em Bouin por 24 h e depois transferidas para álcool etílico 70%, para conservação até o início do preparo das lâminas histológicas.

Amostras de sangue dos mesmos indivíduos (n=20) foram coletadas por punção da veia caudal com seringa de 1 mL contendo o anticoagulante ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA 10%) e mantidas em *eppendorfs* sobre gelo. Na sequência, as amostras sanguíneas foram centrifugadas para separação do plasma a 2.000 g, durante 10 min a 4 °C, e armazenadas em freezer a -20 °C, para posteriormente quantificação dos hormônios testosterona e estradiol.

### **3.2.4 Análise histológica e classificação reprodutiva das gônadas**

O processamento histológico foi realizado no Núcleo de Estudos em Patologia Aquícola – NEPAQ/UFSC e seguiu as etapas de desidratação em série alcoólica crescente, diafanização em série de xilol, inclusão em parafina, corte longitudinal (5 µm) em micrótomo rotativo (Lupetec, MRP-09, Brasil) coloração com hematoxilina-eosina e montagem final das lâminas. Os estágios de desenvolvimento do epitélio germinativo foram identificados em microscópio de luz (Leica, ICC50 HD, Alemanha), e classificados dentro das fases do ciclo reprodutivo propostas para *M. liza* (Tabela 7).

### **3.2.5 Quantificação de hormônios sexuais**

As análises hormonais foram realizadas no Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica – LABCAI/UFSC. Os esteroides sexuais testosterona e estradiol foram quantificados através do ensaio de ELISA utilizando kits comerciais (Testosterona EIA-1559, Estradiol EIA-2693, DRG Instruments GmbH, Alemanha). Os hormônios esteroides foram extraídos utilizando o solvente diclorometano a partir de 400 µL de plasma sanguíneo de cada indivíduo. Na sequência, o solvente foi evaporado utilizando nitrogênio líquido, e a amostra foi reconstituída em 100 µL da solução padrão 0 do kit da DRG contendo 0 ng mL de estradiol e testosterona. A análise foi realizada seguindo orientações do fabricante. As amostras foram lidas no espectrofotômetro (SpectraMax 5, Molecular Devices, Estados Unidos) no comprimento de onda de 450 nm. Os gráficos foram construídos utilizando o software GraphPad Prism 8 (versão 8.0.2).

A recuperação da técnica (“spike and recovery”) para as amostras de plasma de tainha foi de 113,8% para testosterona e 106,0% para estradiol. O coeficiente de variação intraensaio foi de 5,57 para testosterona e 7,74 para estradiol. Já o coeficiente de variação interensaio foi de 6,19 para testosterona e 8,67 para estradiol.

Tabela 7. Descrição microscópica da gametogênese na tainha *Mugil liza* (adaptado de Albieri e Araújo 2010 e Lemos et al., 2014).

	Machos		Fêmeas
Estágio	Características histológicas	Estágio	Características histológicas
Imaturo A	Presença de espermatogônias, as maiores células da linhagem espermatogênica. Todos os estágios de desenvolvimento estão presentes após as divisões mitóticas das espermatogônias. Células espermáticas agrupadas em ninhos.	Células germinativas A	Predominância de ovócitos jovens. Células organizadas em lamelas ovígeras.
Maturação B	Túbulos cheios de espermatozoides começam a se acumular nos ductos deferentes. As espermátides são mais visíveis próximas às paredes dos túbulos, mas todos os tipos de células estão presentes.	Vitelogênese lipídica B	Iniciada a acumulação de inclusões lipídicas no citoplasma.
Maturidade funcional C		Vitelogênese de lipídios e proteínas C	Citoplasma repleto de proteínas e lipídios. Gotículas de óleo são formadas pela fusão de inclusões lipídicas.
		Estágio pós-vitelogênico D	Ovócitos muito aumentados de tamanho, citoplasma rosa, núcleo ainda presente e fusão de grânulos de proteínas e lipídios. O diâmetro da membrana vitelínica é maior nessa fase.

### 3.2.6 Análise estatística

Para a verificação da existência de diferenças estatísticas do desempenho zootécnico nas diferentes etapas e tratamentos propostos, foi utilizada a análise de regressão, utilizando o

programa Statistic 7 ao nível de significância de 5%.

### 3.3 RESULTADOS

#### 3.3.1 Desempenho zootécnico

Após o período experimental de 60 dias (Fase 1) os peixes do controle diferiram significativamente dos tratamentos para peso e comprimento (Figura 4). No primeiro ano da engorda (Fase 2), houve diferença significativa do controle para os tratamentos apenas para peso (Tabela 8). No segundo ano da engorda não houve diferenças significativas.

A relação gonadossomática de todos os tratamentos e do controle foi inferior a 0,02% no primeiro ano, e no segundo foi acima de 1,0% (Tabela 8), mas diferenças significativas não foram encontradas.

Figura 4. Análises de regressão de peso e comprimento da tainha *Mugil liza*, após 60 dias de tratamento com o hormônio  $17\beta$ -estradiol.

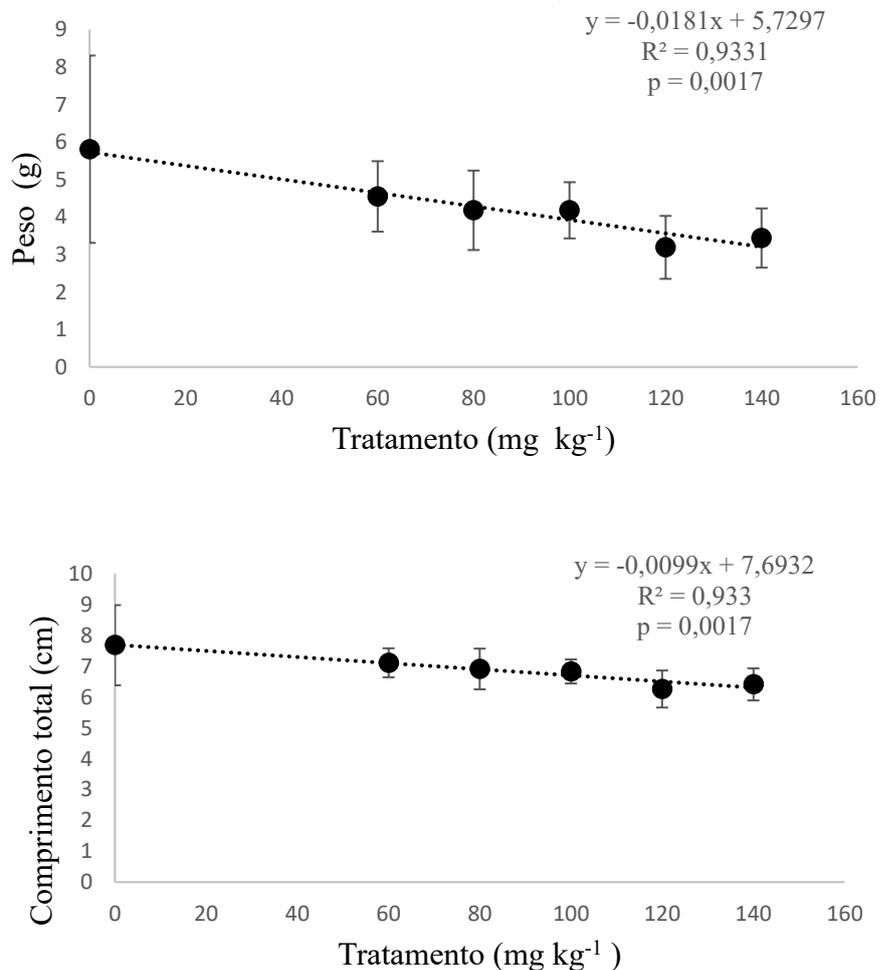


Tabela 8. Variação de peso (P), comprimento (C), Biomassa final (BF) e relação gonadosomática (RGS) da tainha *Mugil liza* tratada com o hormônio 17 $\beta$ -estradiol, ao final do primeiro e segundo ano.

Hormônio (mg kg <sup>-1</sup> )	1º ano				2º ano			
	P (g)	C (cm)	BF (kg)	RGS (%)	P (g)	C (cm)	RGS (%)	BF (kg)
Controle (0)	153,86 ± 26,01	23,85 ± 1,43	15,74	0,01629 ± 0,0	598,70 ± 90,98	37,38 ± 1,56	1,45 ± 2,20	14,71
60	136,03 ± 20,04	23,16 ± 1,12	9,50	0,00767 ± 0,0	553,03 ± 81,97	36,63 ± 1,53	1,71 ± 3,53	11,74
80	136,80 ± 17,40	23,58 ± 1,11	14,14	0,01623 ± 0,0	745,29 ± 113,90	39,71 ± 1,57	1,06 ± 1,13	0,73
100	138,39 ± 24,46	23,51 ± 1,33	10,47	0,01810 ± 0,02	544,67 ± 64,47	36,48 ± 1,57	1,63 ± 0,90	17,29
120	139,78 ± 17,67	23,75 ± 1,01	14,24	0,01267 ± 0,0	463,80 ± 50,27	34,55 ± 1,14	1,26 ± 1,15	18,97
140	125,11 ± 17,93	23,13 ± 1,22	14,10	0,01359 ± 0,01	454,06 ± 74,68	34,97 ± 1,91	1,09 ± 1,20	19,28
	y = -0,1565 *							
Análise de Regressão	x + 151,3714 R <sup>2</sup> = 0,7098 p = 0,0353	NS		NS	NS	NS	NS	

Os valores estão apresentados por média e desvio padrão ( $\pm$ ). NS: não significativo.

Ao final do segundo ano foram identificadas apenas duas fêmeas (1,78%), uma no controle (831,02 g e 40 cm) outra no tratamento de 60 mg kg<sup>-1</sup> (516,34 g e 37,6 cm), com RGS de 10,22% e 15,98%, respectivamente.

A sobrevivência foi alta durante o período experimental (berçário), porém nas fases de engorda foram mais baixas, principalmente no tratamento de 80 mg kg<sup>-1</sup> no segundo ano (Tabela 9) o que afetou a biomassa final (Tabela 8). As perdas de peixes foram acidentais devido a algumas transferências de tanque para limpeza.

Tabela 9. Dados de sobrevivência da tainha *Mugil liza* tratada com o hormônio  $17\beta$ -estradiol, após a fase de berçário (tratamento hormonal) e de engorda (primeiro e segundo ano).

Hormônio (mg kg <sup>-1</sup> )	Sobrevivência (%)		
	Berçário (ni= 150)	Engorda - 1º Ano (ni = 100)	Engorda – 2º Ano (ni = 60)
Controle (0)	95,4	70,4	66,7
60	100	48,7	60,0
80	95,0	71,1	20,0
100	98,6	55,9	78,3
120	97,3	58,9	98,3
140	97,0	61,5	98,3

ni: número inicial de indivíduos por tratamento.

### 3.3.2 Análise macroscópica e histológica das gônadas

Ao final do segundo ano foi possível identificar gônadas masculinas, femininas, e intersexuais ou ovotestis, com a presença simultânea de células masculinas e femininas. Gônadas feminizadas não foram observadas.

As gônadas masculinas foram a maioria das avaliadas (94,64%) e foram classificadas em três estágios de desenvolvimento testicular: A- Imaturo, B- Maturação, e C- Maturidade funcional (Tabela 10), que macroscopicamente correspondem ao estágio imaturo, em maturação e maduro, respectivamente.

Tabela 10. Número de machos da tainha *Mugil liza* em diferentes fases do desenvolvimento testicular, tratados com o hormônio  $17\beta$ -estradiol, com 24 meses de idade.

	Doses de $17\beta$ -estradiol (mg kg <sup>-1</sup> )					
	Controle (0)	60	80	100	120	140
Imaturo	1	1	1	0	3	3
Maturação	5	8	3	4	6	8
Maturidade Funcional	13	9	7	16	11	8
<b>Total de machos</b>	19/20	18/20	11/12	20/20	20/20	19/20

Nos testículos imaturos puderam ser observados apenas espermatogônias, as maiores células da linhagem espermática (Figura 5a). Na fase de maturação foram observados todos os estágios de desenvolvimento celular: agrupamento em ninhos de espermatogônias,

espermatócitos e espermatídes. Alguns animais apresentaram espermatozoides no lúmen dos túbulos seminíferos e ductos espermáticos (Figura 5b e c).

Os machos com maturidade funcional tinham espermatozoides acumulados nos túbulos e ductos espermáticos em grande quantidade (Figura 5d), e espermatídes mais visíveis próximas às paredes dos túbulos, embora todos os tipos de célula estivessem presentes (espermatogônias, espermatócitos e espermatídes).

As gônadas das fêmeas estavam na fase madura que corresponde microscopicamente ao estágio pós-vitelogênico (Figura 6). Nessa fase, as células apresentavam um grande tamanho, e presença de muitas vesículas lipídicas e de grânulos de proteína.

Figura 5. Cortes longitudinais do testículo de machos de tainha *Mugil liza* com 24 meses de idade. a) imaturo: cordões de espermatogônias (EG); b) maturação: presença de espermatogônias (EG) e espermatócitos (EC); c) presença de espermatócitos (EC) e espermatídes (ET) agrupadas nos espermatócitos, além da presença de espermatozoides (EZ); d) maturidade funcional: grande número de espermatozoides presentes na luz dos túbulos, as espermatídes (ET) são mais visíveis próximas às paredes dos túbulos. Coloração: Hematoxilina-eosina.

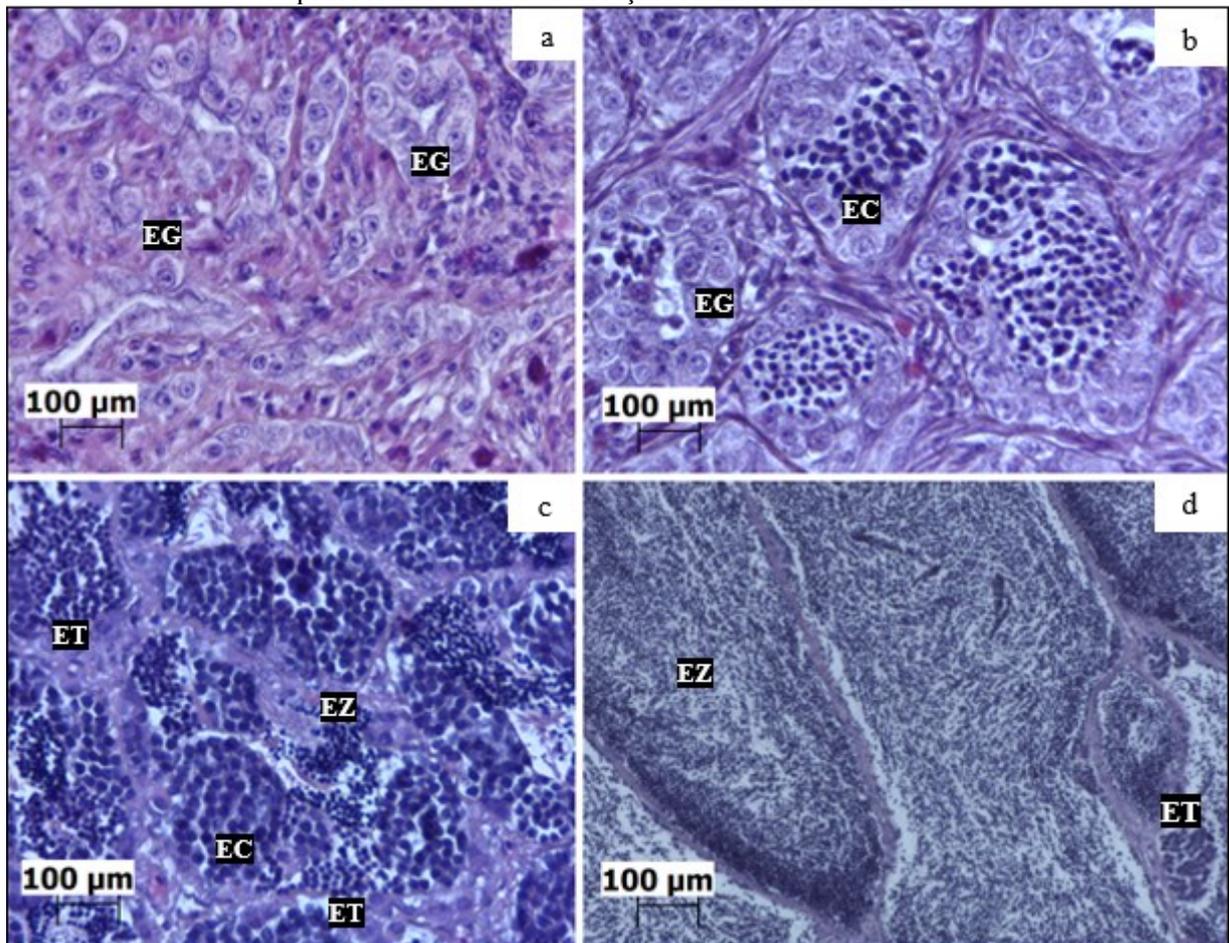


Figura 6. Corte longitudinal de ovário maduro de fêmea de tainha *Mugil liza* com 24 meses de idade. a) ovócito pós-vitelogênico (opv), detalhe de um ovócito com núcleo (n) evidente, e presença de grânulos de proteína (gp) e vesículas lipídicas (vl). Membrana vitelínica (mv). Coloração: Hematoxilina-eosina.



Na maioria (96,22%) das gônadas masculinas dos peixes que receberam o hormônio houve alteração da morfologia, principalmente nos tratamentos que receberam doses mais elevadas, causando grandes deformações em algumas partes (Figura 7b) ou em toda a gônada (Figura 7c). Apesar das deformações nas gônadas, os machos alcançaram a primeira maturação sexual.

Figura 7. Morfologia das gônadas masculinas de tainha *Mugil liza* com 24 meses de idade. a) gônada com aspecto normal (controle); b) e c) gônadas com deformações (tratamentos com  $17\beta$ -estradiol).



De acordo com as deformidades encontradas nas gônadas dos machos foi possível classificar as deformidades em severa, moderada ou leve (Tabela 11).

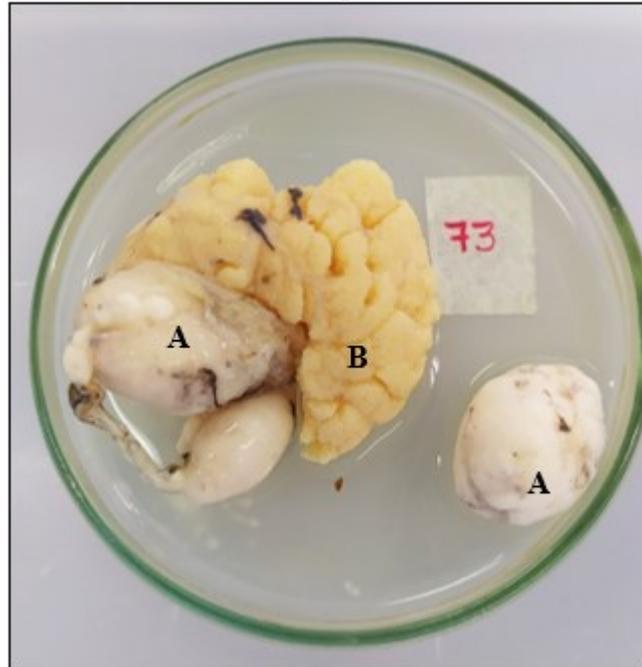
Tabela 11. Nível de deformidades das gônadas masculinas de tainha *Mugil liza* com 24 meses de idade após tratamento com  $17\beta$ -estradiol.

Hormônio (mg kg <sup>-1</sup> )	Nível de deformidades			
	Severa	Moderada	Leve	Sem deformidade
140	9	6	4	0
120	6	7	7	0
100	5	7	6	1
80	1	5	4	1
60	2	5	9	2

Quatro indivíduos (3,57%) tinham gônadas intersexos. Uma dessas gônadas ocorreu na dose mais alta de hormônio (140 mg kg<sup>-1</sup>) e as alterações morfológicas foram macroscopicamente bem evidentes, com uma metade totalmente feminina conectada à outra metade masculina (Figura 8). Microscopicamente, a porção feminina estava madura, no estágio pós-vitelogênico e o lado masculino também estava maduro, embora apresentasse partes em maturação. Ao analisar a porção da gônada em que estavam conectadas foi possível ver simultaneamente ovócitos e espermatozoides (Figura 9a).

Os outros três indivíduos com gônada intersexo ocorreram nas doses de 60, 80 e 100 mg kg<sup>-1</sup>, e apesar de morfológicamente bem diferente de uma gônada normal, apenas na histologia foi possível observar a presença simultânea de células femininas e masculinas (Figura 9b).

Figura 8. Morfologia da gônada intersexo de tainha *Mugil liza* com 24 meses de idade. A – parte masculina e B – parte feminina



### 3.3.3 Análise hormonal

Os valores de estradiol foram altos nas duas fêmeas (903,21 e 666,18  $\text{pg mL}^{-1}$ ) e no intersexo maduro (465,55  $\text{pg mL}^{-1}$ ) (Figura 10). Nos machos o valor do estradiol foi baixo, independente do estágio de maturação (Tabela 12). Para testosterona, os maiores valores encontrados foram em machos maduros, entre 1,39 e 4,24  $\text{ng mL}^{-1}$  (Figura 11), e em fêmeas maduras (2,64 e 1,88  $\text{ng mL}^{-1}$ ). Em relação ao tratamento hormonal não houve diferença significativa na concentração de estradiol e testosterona (Tabela 12).

Figura 9. Cortes longitudinais de gônada intersexual da tainha *Mugil liza* com 24 meses de idade. a) presença simultânea de espermatozoides (EZ) e ovócitos pós-vitelogênicos (opv). b) presença de ovócitos de estoque de reserva (er), ovócitos vitelogênicos (v) e ovócitos de vitelogênese lipídica (ovl). Acúmulos de espermatozoides presentes no espaço intralamelar. Núcleo (n), nucléolo (nc), gota de óleo (go). Coloração: Hematoxilina-eosina.

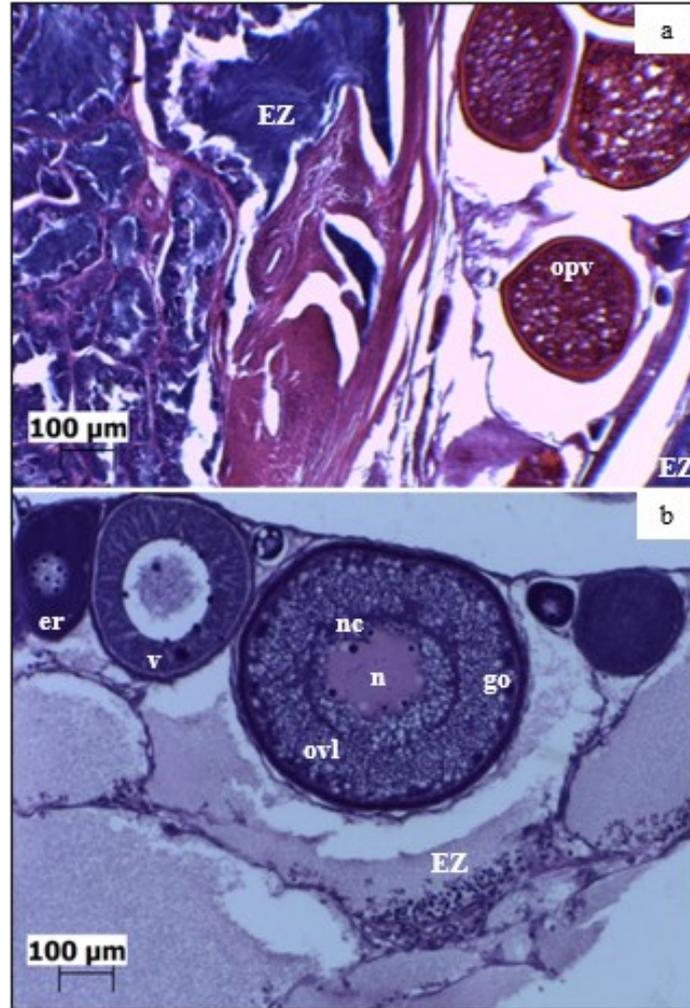


Figura 10. Valores do hormônio estradiol no plasma sanguíneo da tainha *Mugil liza* no segundo ano da engorda. As linhas são as médias de cada tratamento e controle (n= 8).

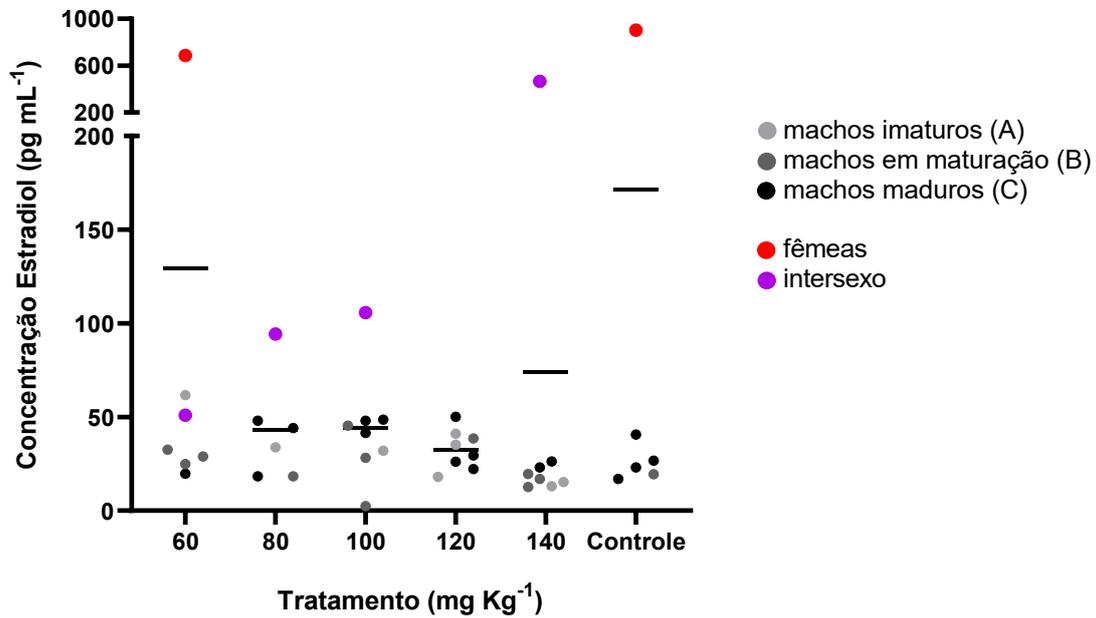


Figura 11. Valores do hormônio testosterona (T) no plasma sanguíneo da tainha *Mugil liza* no segundo da engorda. As linhas são as médias de cada tratamento e controle (n=8).

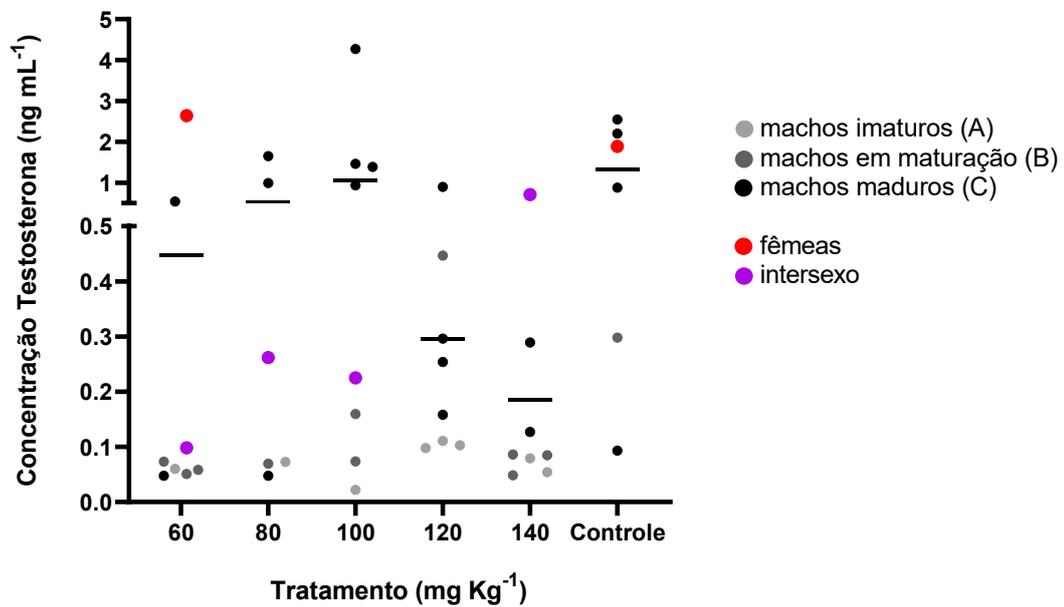


Tabela 12. Valores de média, desvio padrão ( $\pm$  dp), máximo e mínimo de testosterona e estradiol no plasma sanguíneo da tainha *Mugil liza* no segundo da engorda. Machos n = 38; Fêmeas n = 2; Intersexo n = 4; Maduro n = 18; Em maturação n = 11; Imaturo n = 8.

MACHOS						
Tratamentos	Testosterona (ng mL <sup>-1</sup> )			Estradiol (pg mL <sup>-1</sup> )		
	Média $\pm$ dp	Máximo	Mínimo	Média $\pm$ dp	Máximo	Mínimo
<b>Controle (0)</b>	1,2031 $\pm$ 1,1130	2,5440	0,0934	25,3386 $\pm$ 9,3062	40,5955	16,8824
<b>60</b>	0,1570 $\pm$ 0,2155	0,5423	0,0511	33,5347 $\pm$ 16,4310	61,6676	19,6985
<b>80</b>	0,5665 $\pm$ 0,7277	1,6517	0,0476	32,5247 $\pm$ 13,9536	48,0162	18,3101
<b>100</b>	1,1879 $\pm$ 1,4919	4,2729	0,0222	35,1557 $\pm$ 16,3919	48,5338	2,5079
<b>120</b>	0,2960 $\pm$ 0,2726	0,9009	0,0980	32,6060 $\pm$ 10,6316	50,0974	18,0425
<b>140</b>	0,1099 $\pm$ 0,0830	0,2891	0,0486	18,0930 $\pm$ 5,1516	26,2234	12,5957
<b>Estágio de Maturação</b>	<b>Média <math>\pm</math> dp</b>	<b>Máximo</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Média <math>\pm</math> dp</b>	<b>Máximo</b>	<b>Mínimo</b>
<b>Maduro</b>	1,0576 $\pm$ 1,0919	4,2729	0,0476	30,8470 $\pm$ 13,7033	50,0974	2,5079
<b>Em maturação</b>	0,1318 $\pm$ 0,1271	0,4469	0,0486	25,9290 $\pm$ 9,9742	45,3604	12,5957
<b>Imaturo</b>	0,075 $\pm$ 0,0294	0,1109	0,0223	31,2642 $\pm$ 16,0734	61,6676	12,9773
FÊMEAS						
Tratamentos	Testosterona (ng mL <sup>-1</sup> )			Estradiol (pg mL <sup>-1</sup> )		
<b>Controle (0)</b>	1,8871			903,2105		
<b>60</b>	2,6432			686,1875		
<b>80</b>	-			-		
<b>100</b>	-			-		
<b>120</b>	-			-		
<b>140</b>	-			-		
INTERSEXO						
Tratamentos	Testosterona (ng mL <sup>-1</sup> )			Estradiol (pg mL <sup>-1</sup> )		
<b>Controle (0)</b>	-			-		
<b>60</b>	0,0985			50,9569		
<b>80</b>	0,2618			94,2271		
<b>100</b>	0,2250			105,6983		
<b>120</b>	-			-		
<b>140</b>	0,7111			465,5522		

### 3.4 DISCUSSÃO

Os resultados de peso e comprimento, após fase de berçário, sugerem que o hormônio estradiol afetou negativamente o crescimento, embora a sobrevivência não tenha se diferenciado entre os tratamentos e o controle. No entanto, ao fim do primeiro ano, as diferenças de crescimento foram mais uma consequência das variações de sobrevivência, e consequentemente da biomassa de cada tanque, do que do tratamento hormonal. Isso foi observado de forma mais clara no segundo ano, quando o tratamento de 80 mg kg<sup>-1</sup> de estradiol teve o maior ganho de peso, acima do próprio controle, provavelmente como consequência da menor densidade.

De acordo com Piferrer (2001), o hormônio 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>), além de alterar a

proporção dos sexos, também pode modificar a morfologia das gônadas, afetar negativamente a sobrevivência e prejudicar o crescimento. No presente estudo foi possível observar que em condições favoráveis de cultivo houve uma recuperação no desempenho zootécnico das tainhas, 24 meses após o tratamento com hormônio. Carvalho et al. (2014a e b), também verificaram para os robalos (*Centropomus paralelus* e *C. undecimalis*) um menor crescimento dos peixes durante o fornecimento da ração com estradiol, porém, após o período experimental, os peixes recuperaram o crescimento, não havendo mais diferença em relação ao controle depois de 8 meses.

Para *M. liza*, assim como para a maioria das espécies, aceita-se que a proporção sexual seja equilibrada (1:1), mas essa proporção pode ser alterada ao longo do ciclo de vida em função de eventos sucessivos, que atuam de modo distinto sobre os indivíduos de cada sexo (Albieri e Araújo, 2010; Vazoller, 1996). Para as tainhas desse estudo houve uma frequência muito superior de machos (94,64% das gônadas analisadas), indicando que além dos fatores genéticos, fatores ambientais, podem estar atuando nos mecanismos de determinação do sexo. Rocha et al. (2023, submetido à publicação) também observaram uma frequência 100% masculina em tainhas submetidas a diferentes temperaturas na larvicultura. Para o jundiá criado em cativeiro, Weiss et al. (2018) e Sulis-Costa, Jimenez Weingartner e Nuñez (2013) também relataram uma maior frequência de machos (mais de 70%), sendo ambos trabalhos realizados com a mesma linhagem de jundiá.

Os baixos valores de RGS encontrados em todos os tratamentos e no controle no primeiro ano de engorda indicam que os peixes eram sexualmente imaturos. No segundo ano, houve aumento do RGS, e observamos macroscopicamente que os animais estavam sexualmente maduros ou em maturação. As duas fêmeas encontradas apresentavam alto RGS e estavam na fase madura com ovócitos pós-vitelogênicos. Nas tainhas capturadas na natureza, o maior valor observado de RGS foi de 11,5% nas fêmeas e nos machos, que são comumente menores, foi de 4,5% (Lemos et al., 2014). No presente trabalho, as duas fêmeas apresentaram valores de RGS de 10,2 e 15,9%, enquanto nos machos os valores variaram entre 1,0 e 1,7%. Esses resultados indicam que a condição experimental, incluindo o tratamento hormonal, não interferiu no pleno desenvolvimento das gônadas.

O período em que os peixes estão sexualmente indiferenciados é quando estão mais sensíveis ao tratamento hormonal para a inversão, e difere de uma espécie para outra, podendo ser na fertilização, na fase larval ou juvenil (Piferrer, 2001). Nas espécies que apresentam diferenciação sexual logo após a eclosão, a duração desse período é curta, de 10 a

40 dias, e nas que se diferenciam na fase de juvenil, a duração é mais longa, de 100 a 500 dias (Pandian e Sheela, 1995).

Em algumas espécies, como a tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*), a diferenciação morfológica das gônadas ocorre cedo, entre 23-26 dias após a fertilização (Giusti et al., 2016), e a maturação sexual entre 90 e 120 dias (Bhatta et al. 2012). No robalo-europeu (*Dicentrarchus labrax*), as gônadas permanecem indiferenciadas por um período relativamente longo (Blázquez, Piferrer, Zanuy, Carrillo e Donaldson, 1995), com a diferenciação sexual ocorrendo por volta de 168 dias após a fertilização (machos com 8,3–9,5 cm e fêmeas com 7,9-9,0 cm) e a maturação sexual iniciando a partir de 12 meses em machos e mais tarde em fêmeas (Saillant et al., 2003).

No presente estudo, peixes com mais de 20 cm estavam macroscopicamente indiferenciados e a identificação do sexo foi verificada apenas ao final do segundo ano de vida, quando os peixes tinham de 34,97 a 39,71 cm com a presença de animais imaturos, em maturação e maduros. Para *M. cephalus*, McDonough, Roumillat e Wenner (2005) descreveram que as gônadas em espécimes com menos de 5 cm não apresenta nenhuma característica definidora de macho ou fêmea, e que na classe de tamanho de 15 a 20 cm 0,2% das fêmeas e 37,3% dos machos iniciam a diferenciação inicial, mas a maioria (62,5%) permanece indiferenciada e somente na classe de tamanho > 20 cm, 83% dos espécimes tornam-se sexualmente diferenciados. Os mesmos autores também relatam que a espermatogênese na tainha inicia em peixes com comprimento > 25 cm, enquanto a ovogênese em peixes acima de 29 cm. Dessa forma, é possível que a administração do hormônio em juvenis com apenas 33 dias após a eclosão (0,15 g e 2,1 cm), tenha iniciado numa fase muito inicial do ciclo de vida, e por isso não houve efeito feminizante.

No robalo-flecha, a administração do hormônio estradiol foi em peixes com 14 g e 12 cm (Carvalho et al., 2014b), resultando em altos índices de inversão do sexo. Passini et al. (2016) usando implantes de etileno-vinil-acetato (EVAc) em robalos com peso inicial de  $383 \pm 83$  g (média  $\pm$  SD), também encontraram maior número de fêmeas em todos os tratamentos. Para a tainha *Mugil cephalus* o uso do hormônio sintético  $17\alpha$ -ethinylestradiol ( $EE_2$ ) na dieta quando os juvenis selvagens tinham 11 meses, com 8,10 g e 7,4 cm (Aoki, Hatsuyama, Hiramatsu e Soyano, 2011) e 30 meses com 70,0 g e 15,9 cm (Mushirobira et al., 2021) teve um forte efeito sobre a feminização.

Além do período mais sensível dos peixes para alcançar o sexo gonadal desejado, a combinação de dosagem e duração do tratamento deve ser levada em consideração. Para o jundiá, doses altas de 105 e 115 mg kg<sup>-1</sup> de estradiol aplicadas à ração por 21 dias após a

eclosão, obtiveram respectivamente, 100% e 87,5% de feminização (Amaral-Junior et al., 2008b). Enquanto para o barramundi (*Lates calcarifer*) uma dose mais baixa de 20 mg durante 4 semanas foi suficiente para obter 83% de fêmeas (Banh, Domingos, Pinto, Nguyen e Jerry, 2021). Para *M. cephalus*, Chang et al. (1995) testaram por um período longo doses baixas de hormônio (1 mg E<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> de ração por 4 meses e de 15 mg E<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> por mais 4 meses) e doses altas (8 mg E<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> de ração por 4 meses e 120 mg E<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> por mais 4 meses), e observaram que todos os tratamentos estimularam o desenvolvimento de juvenis para fêmeas. No entanto, para *M. liza* os tratamentos realizados com juvenis logo após a metamorfose com duração de 2 meses, não foram suficientes para a inversão sexual, sendo necessário um período maior de exposição ao estradiol.

As deformações observadas no presente estudo e a ocorrência de indivíduos com gônadas intersexo em diferentes doses hormonais indicam que a administração do hormônio agiu na formação das gônadas, porém não foi suficiente para estimular a inversão sexual. De acordo com Wang et al. (2008) e Piferrer (2001), a presença de gônadas intersexo, assim como as deformações, pode ser o resultado de doses subótimas ou muito altas de hormônio, de períodos ou duração do tratamento inadequados. Indivíduos intersexo também foram relatados para a tainha (*M. cephalus*) por Dhanasekar, Selvakumar e Munuswamy (2018) e Mushirobira et al. (2021) e para o bacalhau (*Gadus morhua*) por Lin et al. (2012), e gônadas com deformações foram encontradas para o robalo-peva (Carvalho et al., 2014a), e para o barramundi (Banh et al., 2021) após exposição ao hormônio feminino.

No presente trabalho, os valores encontrados para estradiol e testosterona nas fêmeas maduras da tainha foram maiores que os encontrados por Yelghi, Shirangi, Ghorbani e Khoshbavar Rostami (2012) para *M. curema* de cativeiro (estradiol, 420 pg mL<sup>-1</sup> e testosterona, 0,37 ng mL<sup>-1</sup>), sendo esses valores maiores com o avanço da maturação. De forma similar, Kumar et al. (2015) avaliaram para fêmeas de *M. cephalus* selvagens, níveis de estradiol e testosterona maiores com o avanço da maturação com pico de estradiol (323 pg mL<sup>-1</sup>) e testosterona (93,8 ng mL<sup>-1</sup>) no estágio maduro. De acordo com Honji e Moreira (2017), o hormônio 17β-estradiol é convertido a partir da testosterona, e o E<sub>2</sub> por sua vez, age no fígado via corrente sanguínea, promovendo a síntese de proteínas da zona radiata e vitelogenina, o crescimento do ovócito e a incorporação de vitelo, o que explica os níveis de estradiol maiores em fêmeas maduras e superiores aos de testosterona.

Nos indivíduos do sexo masculino, a T influencia a espermatogênese, como a multiplicação das espermatogônias e a formação dos espermatozoides (Billard, Fostier, Weil e Breton, 1982), o que explica valores maiores em machos com maturação avançada, enquanto

E<sub>2</sub> é menor. Para machos maduros de tainha, os valores de T foram maiores que os imaturos, mas muito inferiores aos (182 ng mL<sup>-1</sup>), encontrados na tainha (Kumar et al., 2015). Nos indivíduos intersexuais, encontramos o mesmo padrão hormonal observado nas fêmeas, com maior valor de E<sub>2</sub> e T nos peixes maduros e menor nos imaturos.

### 3.5 CONCLUSÃO

Os tratamentos hormonais afetaram as gônadas da tainha *Mugil liza*, porém nenhum teve efeito feminizante. Como a espécie apresenta diferenciação sexual vários meses após o início do estágio juvenil, outros testes devem ser realizados, alterando o tamanho inicial dos indivíduos e a duração do tratamento. A frequência superior de machos, indica que além dos fatores genéticos, fatores ambientais, podem estar atuando nos mecanismos de determinação do sexo.

### CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Agência Federal de Apoio e Avaliação de Pós-Graduação em Educação (Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES), que proporcionou a bolsa de pesquisa ao primeiro autor deste estudo. Ao CNPq pela bolsa de produtividade a M.L. Martins (306635/2018-6) e V.R. Cerqueira (309101/2017-4). Este estudo foi parcialmente financiado pela CAPES (código 001 Auxpe 246/2021) e pelo projeto Universal 430770/2018-9.

### 3.6 REFERÊNCIA

Albieri, R. J., & Araújo, F. G. (2010). Reproductive biology of the mullet *Mugil liza* (Teleostei: Mugilidae) in a tropical Brazilian bay. *Zoologia*, 27(3), 331-340. doi: <https://doi.org/10.1590/S1984-46702010000300003>

Amaral-Junior, H., Nunes, M. F. S., & Garcia, S. (2008a). Análise de diferentes dosagens de hormônio na ração, para definição de um protocolo de feminilização do jundiá *Rhamdia quelen*. Revista Eletrônica de Veterinária, 9(12), 1-7. Retrieved from <https://www.redalyc.org/>

Amaral-Junior, H., Cancellier, K. C., Garcia, S., Mello, G. L., Silva, F. M., Graeff, A., Serafini, R. L. & Liebl, F. (2008b). Otimização da produção de monosexo de Jundiá *Rhamdia quelen*, através do uso de estrógenos para a feminilização no sul do Brasil. EPAGRI/CEDAP/CEPC.

Aoki, J. Y., Hatsuyama, A., Hiramatsu, N., & Soyano, K. (2011). Effects of ethynylestradiol on vitellogenin synthesis and sex differentiation in juvenile grey mullet (*Mugil cephalus*) persist after long-term exposure to a clean environment. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 154(4), 346-352. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2011.07.001>

Arslan, T. Phelps, R. P., & Osborne, J. A. (2009). Effects of estradiol- 17 $\beta$  or 17 $\alpha$ -methyltestosterone administration on gonadal differentiation of largemouth bass *Micropterus salmoides* (Lacepède). Aquaculture Research, 40(16), 813-1822. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02286.x>

Banh, Q. Q., Domingos, J. A., Pinto, R. C., Nguyen, K. T., & Jerry, D. R. (2021). Dietary 17 $\beta$ -estradiol and 17 $\alpha$ -ethinyloestradiol alter gonadal morphology and gene expression of the two sex-related genes, dmrt1 and cyp19a1a, in juvenile barramundi (*Lates calcarifer* Bloch). Aquaculture Research, 52(4), 414-1430. doi: <https://doi.org/10.1111/are.14996>

Billard, R., Fostier, A., Weil, C., & Breton, B. (1982). Endocrine control of spermatogenesis in teleost fish. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 39(1), 65-79. doi: <https://doi.org/10.1139/f82-009>

Blázquez, M., Piferrer, F., Zanuy, S., Carrillo, M., & Donaldson, E. M. (1995). Development of sex control techniques for European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) aquaculture: effects of dietary 17 $\alpha$ -methyltestosterone prior to sex differentiation. Aquaculture, 135(4), 329-342. doi: [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(95\)01030-0](https://doi.org/10.1016/0044-8486(95)01030-0)

Bhatta, S., Iwai, T., Miura, C., Higuchi, M., Shimizu-Yamaguchi, S., Fukada, H., & Miura, T. (2012). Gonads directly regulate growth in teleosts. Proceedings of the National Academy of Sciences, 109(28), 11408-11412. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.1118704109>

Bombardelli, R. A., Hayashi, C., & Meurer, F. (2004). Aplicação de métodos diretos e indiretos para a produção de populações monossexuais na tilapicultura. Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia, 7(1), 57-68. Retrieved from <https://pesquisa.bvsalud.org/>

Calixto, E. S., Sterzelecki, F. C., Musialak, L. A., Kiyoto, J. S., Pedrotti, F. S., Magnotti, C. C. F., Cipriano, F. S., & Cerqueira, V. R. (2020). Effect of feeding frequency on growth performance, blood metabolites, proximate composition and digestive enzymes of Lebranche mullet (*Mugil liza*) juveniles. Aquaculture Research, 51(3), 1162-1169. doi: <https://doi.org/10.1111/are.14466>

Carvalho, C. V. A., Passini, G., Melo, W. M., & Cerqueira, V. R. (2014a). Feminization and growth of juvenile fat snook *Centropomus parallelus* fed diets with different concentrations

of estradiol-17 $\beta$ . *Aquaculture International*, 22(4), 1391-1401. doi: 10.1007/s10499-014-9754-x

Carvalho, C. V. A., Passini, G., Costa, W. M., Vieira, B. N., & Cerqueira, V. R. (2014b). Effect of estradiol-17 $\beta$  on the sex ratio, growth and survival of juvenile common snook (*Centropomus undecimalis*). *Acta Scientiarum Animal Science*, 36(3), 239-245. doi: <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v36i3.22839>

Cerqueira, V. R., Carvalho, C. V. A., Sanches, E. G., Passini, G., Baloi, M., & Rodrigues, R. V. (2017). Manejo de reprodutores e controle da reprodução de peixes marinhos da costa brasileira. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 41(1), 94-102. Retrieved from <http://cbra.org.br/>

Chang, C. F., Lan, S. C., & Pan, B. S. (1995). Feed administration of estradiol-17 $\beta$  stimulates female differentiation in juvenile grey mullet *Mugil cephalus*. *Zoological Studies*, 34(4), 257-264. Retrieved from <https://www.airitilibrary.com>

Cnaani, A., & Levavi-Sivan, B. (2009). Sexual development in fish, practical applications for aquaculture. *Sexual Development in Aquaculture*, 3(2-3), 164-175. doi: <https://doi.org/10.1159/000223080>

Devlin, R. H., & Nagahama, Y. (2002). Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological and environmental influences. *Aquaculture*, 208(3-4), 191-364. doi: [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00057-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00057-1)

Dhanasekar, K., Selvakumar, N., & Munuswamy, N. (2018). Occurrence of Intersex in Grey Mullet, *Mugil cephalus* L. from Kovalam Coast, Tamil Nadu. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 18(4), 603-609. doi: 10.4194/1303-2712-v18\_4\_12

Durand, J. D., Shen, K. N., Chen, W. J., Jamandre, B. W., Blel, H., Diop, K., Nirchio, M., Garcia de León, F. J., Whitfield, A. K., Chang, C. W., & Borsa, P. (2012). Systematic of the grey mullets (Teleostei: Mugiliformes: Mugilidae): molecular phylogenetic evidence challenges two centuries of morphology-based taxonomy. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 64(1), 79-92. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2012.03.006>

Ferreira, F. D. A., Carbonera, N., & Espírito Santo, M. L. P. (2011). Influência do teor de NaCl no caviar à base de ovos de tainha (*Mugil platanus*). *Revista Instituto Adolfo Lutz*, 70(1), 35-40. Retrieved from <http://repositorio.furg.br/handle/1/1968>

Garbint, T., Castello, J. P., & Kinas, P. G. (2014). Age, growth, and mortality of the mullet *Mugil liza* in Brazil's southern and southeastern coastal regions. *Fisheries Research*, 149, 61-68. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2013.09.008>

Giusti, J., Pinhal, D., Moxon, S., Campos, C. L., Münsterberg, A., & Martins, C. (2016). MicroRNA-10 modulates Hox genes expression during Nile tilapia embryonic development. *Mechanisms of development*, 140, 12-18. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mod.2016.03.002>

González-Castro, M., & Minos, G. (2016). Sexuality and reproduction of Mugilidae. *Biology, ecology and culture of grey mullets (Mugilidae)*, 227-263.

Honji, R. M., & Moreira, R. G. (2017). Controle neuroendócrino da ovogênese em peixes teleósteos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 41(1), 86-93. Retrieved from <http://cbra.org.br/>

Kumar, P., Arasu, A. R. T., Kailasam, M., Sukumarran, K., Subburj, R., Tyagraj, G., & Natarajan, M. (2015). Gonadal development and steroid hormone profile of wild caught grey mullet (*Mugil cephalus*). *Biological Rhythm Research*, 46(4), 601-610. doi: <https://doi.org/10.1080/09291016.2015.1034974>

Lemos, V. M., Varela Jr., A. S, Schwingel, P. R, Muelbert, J. H., & Vieira, J. P. (2014). Migration and reproductive biology of *Mugil liza* (Teleostei: Mugilidae) in south Brazil. *Journal of fish biology*, 85(3), 671-687. doi: <https://doi.org/10.1111/jfb.12452>

Lin, S., Benfey, T. J., & Martin-Robichaud, D. J. (2012). Hormonal sex reversal in Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Aquaculture*, 364, 192-197. doi: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.08.023>

Lisboa, V., Barcarolli, I. F., Sampaio, L. A., & Bianchini, A. (2015a). Effect of salinity on survival, growth and biochemical parameters in juvenile Lebranch mullet *Mugil liza* (Perciformes: Mugilidae). *Neotropical Ichthyology*, 13, 447-452. doi: <https://doi.org/10.1590/1982-0224-20140122>

Magnotti, C. C., Santos Cipriano, F., Pedrotti, F. S., & Cerqueira, V. R. (2020). Advances in reproduction of the lebranche mullet *Mugil liza*: maturation and spawning of fl breeders in captivity. *Boletim do Instituto de Pesca*, 46(3).

McDonough, C. J., Roumillat, W. A., & Wenner, C. A. (2005). Sexual differentiation and gonad development in striped mullet (*Mugil cephalus* L.) from South Carolina estuaries. *Fishery Bulletin*, 103(4), 601-619.

Menezes, N. A., Oliveira, C. D., & Nirchio, M. (2010). An old taxonomic dilemma: the identity of the western south Atlantic lebranche mullet (Teleostei: Perciformes: Mugilidae). *Zootaxa*, 2519(1), 59-68. Retrieved from <https://www.researchgate.net/>

Meurer, F., Hayashi, C., Barbero, L. M., Santos, L. D. D., Bombardelli, R. A., & Colpini, L. M. S. (2008). Farelo de soja na alimentação de tilápias-do-nilo durante o período de reversão sexual. *Revista brasileira de zootecnia*, 37, 791-794. doi: <https://doi.org/10.1590/S1516-35982008000500002>

MPA/MMA. (2015). Ministério da Pesca e Aquicultura/Ministério do Meio Ambiente. Plano de Gestão para o uso sustentável da tainha, *Mugil liza* Valenciennes, 1836, no Sudeste e Sul do Brasil. Retrieved from <https://www.gov.br/>

Mushirobira, Y., Kamegai, K., Amagai, T., Murata, R., Nagae, M., & Soyano, K. (2021). Expression profiles of hepatic vitellogenin and gonadal zona pellucida subtypes in gray mullet (*Mugil cephalus*) with 17 $\alpha$ -ethinylestradiol-induced gonadal abnormality. *Aquatic Toxicology*, 23, 105863. doi: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2021.105863>

- Neto, J. C. F., & Spach, H. L. (1998). Sobrevivência de juvenis de *Mugil platanus* Günther, 1880 (Pisces, Mugilidae) em diferentes salinidades. Boletim do Instituto de Pesca, 25, 13-17. Retrieved from <https://www.researchgate.net/>
- Okamoto, M. H., Sampaio, L. A. N. D., & Maçada, A. D. P. (2006). Efeito da temperatura sobre o crescimento e a sobrevivência de juvenis da tainha *Mugil platanus* Günther, 1880. Atlântica, 28, 61-66. Retrieved from <http://repositorio.furg.br/handle/1/693>
- Pandian, T. J., & Sheela, S. G. (1995). Hormonal induction of sex reversal in fish. Aquaculture, 138 (1-4), 1-22. doi: [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(95\)01075-0](https://doi.org/10.1016/0044-8486(95)01075-0)
- Pandian, T. J. (2013). Sex reversal. In: PANDIAN, T. J. (Ed.). Endocrine Sex Differentiation in Fish. Florida: CRC Press, 175-212. Retrieved from <https://books.google.com.br/>
- Park, I. S., Kim, J. H., Cho, S. H., & Kim, D. S. (2004). Sex differentiation and hormonal sex reversal in the bagrid catfish *Pseudobagrus fulvidraco* (Richardson). Aquaculture, 232 (1-4), 183-193. doi: [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00481-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00481-2)
- Passini, G., Carvalho, C. V. A., Sterzelecki, F. C., & Cerqueira, V. R. (2016). Induction of sex inversion in common snook (*Centropomus undecimalis*) males, using 17- $\beta$ estradiol implants. Aquaculture Research, 47(4), 1090-1099. doi: <https://doi.org/10.1111/are.12565>
- Piferrer, F. (2001). Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. Aquaculture, 197(1-4), 229-281. doi: [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00589-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00589-0)
- Reis, V. R., Almeida, F. L., & Piferrer, F. (2016). Produção de populações monossexo em peixes. Revista Brasileira de Reprodução Animal, 40(1), 22-28. Retrieved from <http://cbra.org.br/>
- Rocha, V. M. Silva, C. S., Santos, M., C., Pilotto, M. R., Pedrotti, F. S., Magnotti, C. C. F., Martins, M. L., & Cerqueira, V. R. (2023). Uso da temperatura na larvicultura para a feminização de *Mugil liza* Valenciennes, 1836. Aquaculture International. *Em submissão*.
- Saillant, E., Chatain, B., Menu, B., Fauvel, C., Vidal, M. O., & Fostier, A. (2003). Sexual differentiation and juvenile intersexuality in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Journal of Zoology, 260(1), 53-63. doi: <https://doi.org/10.1017/S0952836903003467>
- Sampaio, L. A., Ferreira, A. H., & Tesser, M. B. (2001). Effect of stocking density on laboratory rearing of mullet fingerlings, *Mugil platanus* (Günther, 1880). Acta Scientiarum, 23(2), 471-475. Retrieved from <http://repositorio.furg.br/handle/1/5827>
- Sampaio, L. A., Wasielesky, W., & Miranda-Filho, K. C. (2002). Effect of salinity on acuity toxicity of ammonia and nitrite to juvenile *Mugil platanus*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 68(5), 668-674. doi: [10.1007/s00128-001-0306-5](https://doi.org/10.1007/s00128-001-0306-5)
- SAP/MAPA. (2021). Secretaria de Aquicultura e Pesca - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. GTT - COTA: Relatório do grupo técnico de trabalho para avaliação das cotas de tainha para a temporada de pesca de 2021. 60 p. Retrieved from <https://www.gov.br/>

- Silva, E. M. D., Sampaio, L. A., Martins, G. B., Romano, L. A., & Tesser, M. B. (2013). Desempenho zootécnico e custos de alimentação de juvenis de tainha submetidos à restrição alimentar. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 48, 906-912. doi: <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2013000800014>
- 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(4), 379-388. doi: <http://orcid.org/0000-0002-4682-3307>
- Vazzoler, A. E. (1996). *Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática* (Ed): Anna Emília Amato de Moraes Vazzoler. Maringá: EDUEM; São Paulo: SBI, 169p.
- Wang, H. P., Gao, Z., Beres, B., Ottobre, J., Wallat, G., Tiu, L., Rapp, D., O'Bryant, P., & Yao, H. (2008). Effects of estradiol-17 $\beta$  on survival, growth performance, sex reversal and gonadal structure of bluegill sunfish *Lepomis macrochirus*. *Aquaculture*, 285(1-4), 216-223. doi: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.08.041>
- Weiss, L. A., Bernardes-Júnior, J. J., Machado, C., & Oliveira-Nuñez, A. P. (2018). Masculinization of South American catfish (*Rhamdia quelen*) through dietary administration of 17 $\alpha$ -methyltestosterone. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 31(4), 304-314. doi: <https://doi.org/10.17533/udea.rccp.v31n4a07>
- Yelghi, S., Shirangi, S. A., Ghorbani, R., & Khoshbavar Rostami, H. A. (2012). Annual cycle of ovarian development and sex hormones of grey mullet (*Mugil cephalus*) in captivity. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 11(3), 693-703. Retrieved from <https://jifro.areeo.ac.ir/>
- Yousif, O. M., Fatah, A. A., Krishna Kumar, K., Minh, D. V., & Hung, B. V. (2010). Induced spawning and larviculture of grey mullet, *Mugil cephalus* (Linnaeus 1758) in the Emirate of Abu Dhabi. *Aquaculture Asia*, 15(1), 41-43. Retrieved from <http://eprints.cmfri.org.in/id/eprint/11152>
- Zanardi, M. F., Dias-Koberstein, T. C. R., Santos, M. A. D., & Malheiro, E. B. (2011). Desempenho produtivo e reversão sexual em tilápias em dois métodos hormonal. *Veterinária e Zootecnia*, 18(1), 45-52. Retrieved from <https://web.archive.org/>
- Zanoni, M. A., Leal, T. V., Caetano Filho, M., Oliveira, C. A. L., & Ribeiro, R. P. (2013). Inversão sexual de alevinos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) variedade Supreme, submetidos a diferentes temperaturas durante fase de diferenciação sexual. *Semina: Ciências Agrárias*, 34(1), 455-465. doi: 10.5433/1679-0359.2013v34n1p455

#### 4 CONCLUSÕES GERAIS

A primeira maturação sexual da tainha *Mugil liza* ocorreu ao final do segundo ano nos dois experimentos. As temperaturas utilizadas na larvicultura não causaram nenhum efeito feminizante para a tainha. Já os tratamentos hormonais, apesar de afetarem o desenvolvimento das gônadas, também não apresentaram efeito feminizante. Outros estudos devem ser realizados alterando o tamanho inicial dos indivíduos e a duração do tratamento, bem como averiguando os fatores ambientais e/ou genéticos que podem atuar nos mecanismos de determinação sexual desta espécie.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL

- ALBIERI, R. J.; ARAÚJO, F. G. Reproductive biology of the mullet *Mugil liza* (Teleostei: Mugilidae) in a tropical Brazilian bay. **Zoologia**, v. 27, n. 3, p. 331-340, 2010.
- AMARAL-JUNIOR, H. et al. Análise de diferentes dosagens de hormônio na ração, para definição de um protocolo de feminilização do jundiá *Rhamdia quelen*. **Revista Eletrônica de Veterinária**, v. 9, n. 12, 2008a.
- AMARAL-JUNIOR, H. et al. **Otimização da produção de monosexo de Jundiá *Rhamdia quelen*, através do uso de estrógenos para a feminilização no sul do Brasil.** EPAGRI/CEDAP/CEPC. Camboriú, 2008b.
- ANDREATTA, E. R. et al. Ensaio sobre desova induzida da tainha, *Mugil brasiliensis* Spix et Agassiz (1831). In: **Anais do II Congresso Brasileiro de Engenharia de Pesca**, p. 463-468, 1981.
- ARSLAN, T. et al. Effects of estradiol- 17 $\beta$  or 17 $\alpha$ -methyltestosterone administration on gonadal differentiation of largemouth bass *Micropterus salmoides* (Lacepède). **Aquaculture Research**, v. 40, n. 16, 1813-1822, 2009.
- BAROILLER, J. F. et al. Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. **Cell Mol Life Sci**, v. 55, p. 910– 931, 1999.
- BAROILLER, J. F; D'COTTA, H. Environment and sex determination in farmed fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 130, n. 4, p. 399-409, 2001.
- 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, n.1-4, p. 283-301, 2001.
- BENETTI, D. D.; FAGUNDES NETTO, E. B. **Considerações sobre desova e alevinagem da tainha (*Mugil liza* valenciennes, 1836) em laboratório [Brasil].** 1980.
- BLÁZQUEZ, M. et al. Development of sex control techniques for european sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) aquaculture effects of dietary 17  $\alpha$ -methyltestosterone prior to sex differentiation. **Aquaculture**, v. 135, n. 4, p. 329-342, 1995.
- BLÁZQUEZ, M. et al. Effects of rearing temperature on sex differentiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). **Journal of Experimental Zoology**, v. 281, n. 3, p. 207-216, 1998.
- BLÁZQUEZ, M. Critical period of androgeninducible sex differentiation in a teleost fish, the European sea bass. **Journal of Fish Biology**, v. 58, n. 2, p. 342-358, 2001.
- BLÁZQUEZ M.; SOMOZA G. M. Fish with thermolabile sex determination (TSD) as models to study brain sex differentiation. **General and Comparative Endocrinology**, v.166, p. 470–477, 2010.

- BOMBARDELLI, R. A. et al. Aplicação de métodos diretos e indiretos para a produção de populações monosssexuais na tilapicultura. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia**, v. 7, n. 1, p. 57-68, 2004.
- BOMBARDELLI, R. A. et al. Idade de maior sensibilidade de tilápias-do-Nilo aos tratamentos de masculinização por banhos de imersão. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 1, p. 1-6, 2007.
- BORG, B. Androgens in teleost fishes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, v. 109, n. 3, p. 219-245, 1994.
- BORGES, B. A. A. **Identificação de neomacho de Jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy e Gaimard, 1824) através do teste de progênie**. 2015. 21 p. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia de Aquicultura, Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.
- CARVALHO, C. V. A. D. et al. Feminization and growth of juvenile fat snook *Centropomus parallelus* fed diets with different concentrations of estradiol-17 $\beta$ . **Aquaculture International**, v. 22, n. 4, p. 1391-1401, 2014a.
- CARVALHO, C. V. A. D. et al. Effect of estradiol-17B on the sex ratio, growth and survival of juvenile common snook (*Centropomus undecimalis*). **Acta Scientiarum Animal Science**, v. 36, n. 3, 2014b.
- CARVALHO, C. V. A. D. et al. Maturation, spawning and larviculture of the mullet *Mugil liza* under laboratory conditions. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 43, n. 1, p. 31-36, 2019.
- CASTRO, J. et al. Effect of ascorbic acid supplementation on zootechnical performance, haematological parameters and sperm quality of lebranche mullet *Mugil liza*. **Aquaculture Research**, v.50, n. 11, p. 3267-3274, 2019.
- CERQUEIRA, V. R. et al. Broodstock management and control of reproduction in marine fishes of the Brazilian coast. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 41, n. 1, p. 94-102, 2017.
- CESAR, M. P. et al. Métodos para obtenção de população monossexo na piscicultura. Boletim Agropecuário. 2005. 27 f. Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.
- CHANG, C. F.; LEE, M. F.; CHEN, G. R. Estradiol 17 $\beta$  associated with the sex reversal in protandrous balck porgy, *Acanthopagrus schlegeli*. **Journal Experimental Zoology**, v. 268, n. 1, p. 53-58, 1994.
- CHANG, C. F.; LAN, S. C.; CHOU, H. Y. Gonadal histology and plasma sex steroids during sex differentiation in grey mullet, *Mugil cephalus*. **Journal of Experimental Zoology**, v. 272, n. 5, p.395-406, 1995a.
- CHANG, C. F.; LAN, S. C.; PAN, B. S. Feed administration of estradiol-17 $\beta$  stimulates female differentiation in juvenile grey mullet *Mugil cephalus*. **Zoological Studies**, n. 34, v.4, p. 257-264, 1995b.

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

CONOVER, D. O., KYNARD, B. E. Environmental sex determination: interaction of temperature and genotype in a fish. **Science**, v. 213, n. 4507, p. 577-579, 1981.

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

DIAS-KOBERSTEIN, T. C. R. et al. Reversão sexual de larvas de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) por meio de banhos de imersão em diferentes dosagens hormonais. **Revista Acadêmica**, v. 5, n. 4, p. 391-395, 2007.

DOR, L. et al. Identification of the sex-determining region in flathead grey mullet (*Mugil cephalus*). **Animal Genetics**, v. 47, n. 6, 2016.

DOR, L. et al. Preferential mapping of sex-biased differentially expressed genes of larvae to the sex-determining region of flathead grey mullet (*Mugil cephalus*). **Frontiers in Genetics**, v. 11, p.839, 2020.

DRUMMOND, C. D. **Níveis de 17 $\alpha$ -Metiltestosterona em diferentes temperaturas na inversão sexual de Tilápias *Oreochromis niloticus***. 2007. 107 p. Tese (Doutorado em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal), Universidade Federal de Lavras, 2007.

DURAND, J. D. et al. Systematic of the grey mullets (Teleostei: Mugiliformes: Mugilidae): molecular phylogenetic evidence challenges two centuries of morphology-based taxonomy. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 64, n. 1, p. 79-92, 2012.

DUNHAM, R. A. et al. Review of the status of aquaculture genetic. In: Aquaculture in the Third Millennium (NACA and FAO, Bangkok 2001). Technical Proceedings of the **Conference on Aquaculture in the Third Millennium**, p. 137-166, 2001.

ESCHMEYER, W. N. (ed.). **Catalog of Fishes: Genera, Species**, 2014. References. (<http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>). Electronic version accessed 17/10/2022.

ESCHMEYER, W. N.; FONG, J. D. (eds.). 2015. Species by family/subfamily in the Catalog of Fishes. **California Academy of Sciences**. Electronic version accessed 17/10/2022

FERREIRA, F. A. **Desenvolvimento do produto tipo caviar a base de ovas de tainha (*Mugil platanus*)**. 2006. 77p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos). Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Departamento Química, Brasil, 2006.

FERREIRA, F. A. et al., Influência do teor de NaCl no caviar à base de ovas de tainha (*Mugil platanus*). **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.70, p.35-40, 2011.

FLYNN, S. R.; BENFEY, T. J. Effects of dietary estradiol-17 $\beta$  in juvenile shortnose sturgeon, *Acipenser brevirostrum*, Lesueus. **Aquaculture**, v. 270, n. 1-4, p. 405-412, 2007.

GARBIN, T. et al. Age, growth, and mortality of the mullet *Mugil liza* in Brazil's southern and southeastern coastal regions. **Fisheries Research**, v. 149, p. 61-68, 2014.

GODINHO, H. M. et al. Induced spawning of the mullet *Mugil platanus* Gunther, 1880, in Cananéia, São Paulo, Brazil. **Boletim do Instituto de Pesca**, 20: 59-66, 1993.

GODINHO, H. M. et al. (Org). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. UFSM, Santa Maria, p. 433-441, 2005.

GONZÁLEZ-CASTRO, M. et al. Studies on reproduction of the mullet *Mugil platanus* Günther, 1880 (Actinopterygii, Mugilidae) from the Mar Chiquita coastal lagoon, Argentina: similarities and differences with related species. **Italian Journal of Zoology**, v. 78, n. 3, p. 343-353, 2011.

GONZÁLEZ-CASTRO, M.; J. GHASEMZADEH, J. Morphology and morphometry based taxonomy of Mugilidae. In: D. Crosetti and S.J.M. Blaber (eds.). **Biology, Ecology and Culture of Grey Mullet (Mugilidae)**. CRC Press, Boca Raton, USA (this book). 2015.

GROZEA, A. et al. Attempts of induction of sex-reversal in carp (*Cyprinus carpio* Var. Koi) using testosterone. **Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies**, v. 40, p. 17-22, 2007.

GUERRERO-ESTÉVEZ, S.; MORENO-MENDOZA, N. Sexual determination and differentiation in teleost fish. **Review in Fish Biology and Fisheries**, v.20, n.1, p.101–121, 2010.

HAFFRAY, P. et al. Successful production of monosex female brook trout *Salvelinus fontinalis* using gynogenetic sex reversed males by a combination of methyltestosterone immersion and oral treatments. **Aquaculture**, v. 290, n. 1-2, p. 47-52, 2009.

IBAMA, **Relatório de reunião Técnica para ordenamento da pesca da tainha (*Mugil platanus*, *M. liza*) na região Sudeste/Sul do Brasil**, in: IBAMA (Ed.). p. 85. Instituto brasileiro do meio ambiente e dos recursos naturais renováveis, Itajaí, 2007.

IBAMA, **Instrução Normativa: Estabelecer normas, critérios e padrões para o exercício da pesca em áreas determinadas e, especificamente, para a captura de tainha (*Mugil platanus* e *M. liza*), no litoral das regiões sudeste e sul do Brasil**. IBAMA (Ed.). Instituto brasileiro do meio ambiente e dos recursos naturais renováveis. 2008.

ISLER, I. V. Biotechnology applied to salmoniculture. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p. 36-42, 2009.

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.

- KITANO, T. K. et al. Supression of P450 aromatase gene expression in sex-reversed males produced by rearing genetically female larvae at a high wáter temperatura during a period of sex differentiation in the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceous*). **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 23, p. 167-176, 1999.
- KOCOUR, M. et al. Results of comparative growing test of all-female and bissexual population in two-year-old common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Aquaculture International**, v. 11, p. 369-378, 2003.
- LEE, P. et al. Preliminary assessment of sex inversion of farmed Atlantic salmon by dietary and immersion androgen treatments. **North American Journal of Aquaculture**, v. 66, p. 1-7, 2004.
- LEMOS, V. M. et al. Migration and reproductive biology of *Mugil liza* (Teleostei: Mugilidae) in south Brazil. **Journal of Fish Biology**, v. 85, n. 3, p. 671-687, 2014.
- LIMA, F. P. C. **Reversão sexual em tilápias (*Oreochromis niloticus*)**. UNIFOR, Minas Gerais, 6. 2011.
- LIN, S. et al. Hormonal sex reversal in Atlantic cod, *Gadus morhua*. **Aquaculture**, v. 364, p. 192-197, 2012.
- LUBZENS, E. et al. Oogenesis in teleost: how fish eggs are formed. **Gen Comp Endocrinol**, v.165, p.367-389, 2010.
- MAGNOTTI, C. C. F. et al. Short-term storage of lebranche mullet *Mugil liza* (Valenciennes, 1836) semen in natura and diluted with CF-HBSS. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 40, p. 1-6, 2018a.
- MAGNOTTI, C. C. F. et al. Sperm characteristics of wild and captive lebranche mullet *Mugil liza* (Valenciennes, 1836), subjected to sperm activation in different pH and salinity conditions. **Animal Reproduction Science**, v. 92, p. 164-170, 2018b.
- MAGNOTTI, C. C. F. et al. Advances in reproduction of the lebranche mullet *Mugil liza*: maturation and spawning of F1 breeders in captivity. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 46, n. 3, 2020.
- McDONOUGH, C. J. et al. Sexual differentiation and gonad development in striped mullet (*Mugil cephalus* L.) from South Carolina estuaries. **Fishery Bulletin**, v. 103, 4, p. 601-619, 2005.
- MENEZES, N. A.; OLIVEIRA, C.; NIRCHIO, M. An old taxonomic dilemma: the identity of the western South atlantic lebranche mullet (Teleostei: Perciformes: Mugilidae). **Zootaxa**, v. 25, p. 59-68, 2010.
- MEURER, F. et al. Farelo de soja na alimentação de tilápias-do-nilo durante o período de reversão sexual. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 5, p.791-794, 2008.

- MIDDAUGH, D. P., HEMMER, M. J. Influence of environmental temperature on sex-ratios in the tidewater silverside, *Menidia peninsulae* Pisces: Atherinidae. **Copeia**, v. 1987, n. 4, p. 958-964, 1987.
- MIRANDA-FILHO, K. C. et al. TAINHA. IN: BALDISSEROTO, B. e GOMES, L.C. (Org.). Espécies nativas para a piscicultura no Brasil. UFSM, Santa Maria, p. 541-552, 2010.
- MPA. Ministério da Pesca e Aquicultura, **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura** (ed MPA), 60p. Brasília, 2008.
- MPA/MMA. Ministério da Pesca e Aquicultura/Ministério do Meio Ambiente. **Plano de Gestão para o uso sustentável da tainha, *Mugil liza* Valenciennes, 1836, no Sudeste e Sul do Brasil**, 2015.
- MYLONAS, C. C. et al. Influence of rearing temperature during the larval and nursery periods on growth and sex differentiation in two Mediterranean strains of *Dicentrarchus labrax*. **Journal of Fish Biology**, v. 67, n. 3, p. 652-668, 2005.
- NAKAMURA M. et al. Gonadal sex differentiation in teleost fish. **The journal of Experimental Zoology**, v. 281, p. 362- 372, 1998.
- NAVARRO-MARTÍN, L. et al. Balancing the effects of rearing at low temperature during early development on sex ratios, growth and maturation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Limitations and opportunities for the production of highly female-biased stocks. **Aquaculture**, v. 296, p. 347-358, 2009.
- NETO, J. C. F.; SPACH, H. L. Sobrevivência de juvenis de *Mugil platanus* Günther, 1880 (Pisces, Mugilidae) em diferentes salinidades. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 25, p. 13-17, 1998.
- OSPINA-ÁLVAREZ, N.; PIFERRER, F. Temperature-dependent sex determination in fish revisited. Prevalence, existence of a single sex ratio response pattern, and possible effects of climate change. **PLoS One**, v. 3, n. 7, p. 2837, 2008.
- PANDIAN, T. J. Sex reversal. In: PANDIAN, T. J. (Ed.). **Endocrine Sex Differentiation in Fish**. Florida: CRC Press, p. 175-212, 2013.
- PARK, I. et al. Sex differentiation and hormonal sex reversal in the bagrid catfish *Pdobagrus fulvidraco* (Richardson). **Aquaculture**, v. 232, n. 1-4, p. 183-193, 2004.
- PASSINI, G. et al. Induction of sex inversion in common snook (*Centropomus undecimalis*) males, using 17- $\beta$  estradiol implants. **Aquaculture Research**, v.47, p.1090-1099, 2014.
- PASSINI, G. et al. Reprodução e larvicultura da tainha *Mugil liza* no Estado de Santa Catarina. In: **Feira Nacional do Camarão**, 12, Latin American and Caribbean Aquaculture, Fortaleza. Abstract Book. Fortaleza: ABCC, p. 410, 2015. Resumo.
- PAVLIDIS, M. et al. Evidence of temperature-dependent sex determination in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) **Journal of Experimental Zoology**, v. 287, n. 3, p. 225–232, 2000.

PETER, R. E.; YU, K. L. Neuroendocrine regulation of ovulation in fishes: basic and applied aspects. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 7, n. 2, p. 173-197, 1997.

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

PIFERRER, F. Determinación y Diferenciación sexual en los peces. In: **La reproducción de los peces: aspectos básicos y sus aplicaciones en acuicultura**. CARRILLO ESTÉVEZ, M. A. 2009

RAZMI, K. et al. Hormonal sex reversal of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by ethnylestradiol-17 $\alpha$  (EE2). **Iranian Journal of Fisheries Sciences**, v. 10, p.304-315, 2011.

REIS, V. R. **Feminização de tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) com administração de 17 $\beta$ -estradiol na dieta**. 2015. 78p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Ciências Pesqueiras nos Trópicos, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2015.

REIS, V. R. et al. Produção de populações monossexo em peixes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 40, n. 1, p. 22-28, 2016.

ROUGEOT, C. et al. Sex control and sex determinism study in eurasian perch, *Perca fluviatilis*, by use of hormonally sex-reversed male breeders. **Aquaculture**, v. 211, n. 1-4, p. 81- 89, 2002.

ROTHBARD, S. A. A review of ploidy manipulations in aquaculture: the Israeli experience. Israeli Journal of **Aquaculture-Bamidgeh**, v. 58, p. 266-279, 2006.

SAILLANT, E. et al. Temperature effects and genotype-temperature interactions on sex determination in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*). **Journal of Experimental Zoology**, v. 292, n. 5, p. 494-505, 2002.

SANCHES, E. G. et al. Sex inversion of dusky grouper" *Epinephelus marginatus*". **Revista Brasileira de Saude e Producao Animal**, v. 10, n. 1, p. 198-209, 2009.

SANTOS, A. J. G.; SILVA, A. L. N. Biotecnologia em Aquicultura: Processos, riscos e cuidados. Ênfase à produção de tilápias. **Panorama da Aquicultura**, v. 45, p. 22-26, 1998.

SAMPAIO, L. A.; FERREIRA, A. H.; TESSER, M. B. Effect of stocking density on laboratory rearing of mullet fingerlings, *Mugil platanus* (Günther, 1880). **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 2, p. 471-475, 2001.

SAMPAIO, L. A.; WASIELESKY, W.; MIRANDA-FILHO, K. C. Effect of salinity on acuty toxicity of ammonia and nitrite to juvenile *Mugil platanus*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 68, n. 5, p. 668-674, 2002.

SAP/MAPA. Secretaria de Aquicultura e Pesca - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **GTT - COTA: Relatório do grupo técnico de trabalho para avaliação das cotas de tainha para a temporada de pesca de 2021**, p. 60, 2021.

- STRUSSMANN, C. A. et al. Temperature effects on sex differentiation of two South American atherinids, *Odontesthes argentinensis* and *Patagonina hatcheri*. **Environmental Biology Fishes**, v. 47, n. 2, p. 143-154, 1996.
- TAL, Y. et al. Environmentally sustainable land-based marine aquaculture. **Aquaculture**, v. 286, n. 1-2, p. 28-35, 2009.
- TARANGER, G. L. et al. Control of puberty in farmed fish. **General and Comparative Endocrinology**, v. 165, p. 483-515, 2010.
- TEBALDI, P. C. e AMARAL JUNIOR, H. Produção de tetraplóides de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) através da aplicação de choque térmico. **Revista Eletrônica de Veterinária**, v. 10, n. 10, p. 1-13, 2009.
- TOKARZ, J. et al. Steroids in teleost fishes: A functional point of view. **Steroids**, v. 103, p. 123-144, 2015.
- TOLEDO-FILHO, S. A. et al. Biotecnologia genética aplicada à piscicultura. **Cadernos de Ictiogenética III**, Universidade de São Paulo, p. 27, 1996.
- TURRA, E. M. et al. Controle reprodutivo em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) por meio de manipulações sexuais e cromossômicas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, n. 1, p.21-28, 2010.
- VALENTIN, F. N. Processo de diferenciação gonadal em *Pseudoplatystoma fasciatum* e tentativa de feminilização com 17 $\beta$ -estradiol. 2013. 38p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Aquicultura, UNESP, Jaboticabal, 2013.
- VIEIRA, J. P; SCALABRIN, C. Migração reprodutiva da “tainha” (*Mugil platanus* Gunther, 1980) no sul do Brasil. **Atlântica**, v. 13, n. 1, p. 131-141, 1991.
- WEISS, L. A. **Inversão sexual em jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824): masculinização com 17 $\alpha$ -metilttestosterona e feminilização indireta**. 2016. 117 p. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Aquicultura - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.
- WEISS, L. A. et al. Masculinization of South American catfish (*Rhamdia quelen*) through dietary administration of 17 $\alpha$ -methyltestosterone. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v. 31, n. 4, p. 304-314, 2018.
- YAMAMOTO, T. Sex differentiation. In: Hoar, W.S., Randall, D.J. Eds., **Fish Physiology**, v. 3, p. 117-175, 1969.
- YAMANAKA, N. et al. Larvicultura e observações sobre o crescimento da tainha *Mugil sp.* em cativeiro (Cananéia, SP). In: **Encontro Nacional de Aquicultura - VII SIMBRAQ e II ABRAPOA**, 22-26. Anais. Academia de Ciências do Estado de São Paulo, SP, p.124, 1992.
- ZANARDI, M. F. et al. Desempenho produtivo e reversão sexual em tilápias em dois métodos hormonal. **Veterinária e Zootecnia**, v. 18, n. 1, p. 45-52, 2011.

ZANONI, M. A. Inversão sexual de alevinos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) variedade Supreme, submetidos a diferentes a temperaturas durante fase de diferenciação sexual. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 1, p. 455-466, 2013.