

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA
CAMPUS DE JABOTICABAL

DESEMPENHO PRODUTIVO E CRESCIMENTO MUSCULAR
DE LINHAGENS DE TILÁPIA-DO-NILO CULTIVADAS
NA FASE INICIAL

Thiago Mendes de Freitas
Biólogo

Jaboticabal, SP, Brasil
Fevereiro de 2011

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**DESEMPENHO PRODUTIVO E CRESCIMENTO MUSCULAR
DE LINHAGENS DE TILÁPIA-DO-NILO CULTIVADAS
NA FASE INICIAL**

Thiago Mendes de Freitas

Orientadora: Profa. Dra. Maria Célia Portella
Co-orientadora: Profa. Dra. Maeli Dal Pai-Silva

Dissertação apresentada ao Centro de Aqüicultura da UNESP, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Aqüicultura – Área de Concentração em Aqüicultura de Águas Continentais.

Jaboticabal, SP, Brasil

Fevereiro de 2011

Freitas, Thiago Mendes de

F866d Desempenho produtivo e crescimento muscular de linhagens de tilápia-do-nilo cultivadas na fase inicial / Thiago Mendes de Freitas. – Jaboticabal, 2011

xv, 75 f. : ie. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aqüicultura, 2011

Orientador: Maria Célia Portella

Co-orientadora: Maeli Dal Pai-Silva

Banca examinadora: Fernanda Antunes Alves da Costa, Vander Bruno dos Santos

Bibliografia

1. *Oreochromis niloticus*. 2. Desempenho produtivo. 3. Crescimento muscular. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aqüicultura.

CDU 639.3.034

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

"As misérias do mundo estão aí, e só há dois modos de reagir diante delas: ou entender que não se tem a culpa e, portanto, encolher os ombros e dizer que não está nas suas mãos remediá-lo — e isto é certo —, ou, melhor, assumir que, ainda quando não está nas nossas mãos resolvê-lo, devemos comportar-nos como se assim fosse."

JOSÉ SARAMAGO

"Porque nada perde ou repete, porque tudo cria e renova"

JOSÉ SARAMAGO

"A vida só é possível reinventada"

CECÍLIA MEIRELES

Dedico este trabalho à
minha mãe Silvana
e aos amigos,
aos verdadeiros amigos,
que ao ler são
tocados no coração.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Maria Célia Portella, pessoa e pesquisadora admirável, pelos ensinamentos e suporte ao longo da minha formação acadêmica, que desde o ano de 2004 me apresentou às larvas de peixes, me ensinando a ser pesquisador, professor e amigo. Não existem palavras que expressem toda minha gratidão e o orgulho de tê-la como minha orientadora. Muito Obrigado.

À Profa. Dra. Maeli Dal Pai Silva, que me proporcionou contato com as ferramentas histológicas e de biologia molecular, mostrando toda a magnitude do trabalho com o tecido muscular. Muito Obrigado.

Aos membros da banca, Fernanda Antunes Alves da Costa e Vander Bruno dos Santos, por aceitarem o convite e pelas contribuições ao trabalho.

Aos membros participantes do exame geral de qualificação, Profa. Dra. Laura Satiko Okada Nakaghi e Profa. Dra. Teresa Cristina Ribeiro Dias Koberstein, pela participação e contribuições.

Ao CNPq, pelo auxílio concedido por meio de bolsa de mestrado.

À Piscicultura Aquabel pela doação das linhagens “Supreme” e Tailandesa.

À Profa. Dra. Teresa Cristina Ribeiro Dias Koberstein, responsável pelo setor de tilapicultura do Caunesp, pelo fornecimento das larvas GIFT.

À toda minha família, meus avós, tios, primos, pela união e carinho presentes na minha criação.

À grande família do Laboratório de Nutrição e Larvicultura de Organismos Aquáticos, que estiveram durante o meu mestrado, ajudando nas coletas, no cuidado com os peixes, na troca de experiências e aprendizado, e pelos momentos de descontração e risadas. Rodrigo Takata (o chefe), Olívia Menossi (Taxinha), Natalia Leitão, Juliana Tomomi, Hellen Buzollo, Rodrigo Gimbo, Gisele Fávero, Lidiane Sandre, Thaís Lopes, Gustavo Squassoni (Vurto), Thiago Nascimento (Strumi) e Sílvia Ligeiro. Obrigado pelo aprendizado e amizade.

Aos estagiários que passaram ou permanecem por aqui, Ellen Nordi (Sagatiba), Larissa Otani e Camila Faria (Cálice). Obrigado por toda ajuda.

À todos do Laboratório do Músculo Estriado Esquelético, em especial à Fernanda Carani, Juliana Giust e Caroline Nebo. Obrigado por tudo.

Aos funcionários do Caunesp e ao Programa de Pós-graduação em Aqüicultura, pelo auxílio concedido. Muito Obrigado.

Aos amigos Carlos Caprio, Danilo Melo, Max Cangani e Rafael Tonussi. Valeu pela amizade, companheirismo e aprendizado. Valeu por estarmos juntos superando as diferenças e dificuldades de morar em república.

Aos amigos Lucas Del Vecchio, Rodolfo Sanches e Leonardo Amarin. Valeu pelos finais de semana jogando imagem e ação e pelos momentos de descontração. Obrigado pelo carinho e amizade.

SUMÁRIO

	Páginas
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
RESUMO	xiii
SUMMARY	xv
CAPÍTULO 1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS	01
1 INTRODUÇÃO	01
2 REVISÃO DE LITERATURA	03
3 REFERÊNCIAS	14
CAPÍTULO 2. DESEMPENHO PRODUTIVO DE TRÊS LINHAGENS DE TILÁPIA-DO-NILO CULTIVADAS DURANTE A FASE DE DIFERENCIAÇÃO SEXUAL	22
1 INTRODUÇÃO	24
2 MATERIAL E MÉTODOS	26
2. 1 Instalações e condições experimentais	26
2. 2 Descrição da dieta comercial	27
2. 3 Avaliação do desempenho produtivo	27
2. 4 Análise estatística	28
2. 5 Avaliação da homogeneidade dos animais	28
2. 6 Verificação da taxa masculinização	29
3 RESULTADOS	30
3. 1 Desempenho e sobrevivência	30
3. 2 Homogeneidade dos animais	37
3. 3 Taxa de masculinização	38
4 DISCUSSÃO	39
5 CONCLUSÕES	44
6 REFERENCIAS	45
CAPÍTULO 3. EFEITO DA 17 α -METILTESTOSTERONA SOBRE AS CARACTERÍSTICAS MORFOMÉTRICAS E DE EXPRESSÃO GÊNICA DE FATORES QUE REGULAM O CRESCIMENTO MUSCULAR EM DUAS LINHAGENS DE TILÁPIA-DO-NILO	50

1 INTRODUÇÃO	52
2 MATERIAL E MÉTODOS	54
2. 1 Avaliação morfológica das fibras musculares	55
2. 2 Avaliação da expressão gênica dos Fatores de Regulação Miogênica (MRFs)	56
3 RESULTADOS	60
3. 1 Morfometria das fibras musculares	61
3. 2 Expressão gênica: Fatores de Regulação Miogênica (MRFs)	67
4 DISCUSSÃO	68
5 CONCLUSÕES	71
6 REFERÊNCIAS	72

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 1. Valores médios (\pm d.p.) de comprimento total (mm) das linhagens de tilápia-do-nilo, no 8º, 15º e 22º dias de experimento.....	31
Tabela 2. Valores médios (\pm d.p.) de comprimento total (mm) das linhagens de tilápia-do-nilo, no 29º dia de experimento, com dieta contendo ou não o hormônio masculinizante.....	31
Tabela 3. Valores médios (\pm d.p.) de peso (mg) das linhagens de tilápia-do-nilo, no 8º, 15º e 22º dias de experimento.....	32
Tabela 4. Valores médios (\pm d.p.) de peso (mg) das linhagens de tilápia-do-nilo, no 29º dia de experimento, com dieta contendo ou não o hormônio masculinizante.....	32
Tabela 5. Valores médios (\pm d.p.) de altura (mm) das linhagens de tilápia-do-nilo, no 8º, 15º e 22º dias de experimento.....	33
Tabela 6. Valores médios (\pm d.p.) de altura (mm) das linhagens de tilápia-do-nilo, no 29º dia de experimento, com dieta contendo ou não o hormônio masculinizante.....	33
Tabela 7. Valores médios (\pm d.p.) de TCE (%.dia ⁻¹) em peso das linhagens de tilápia-do-nilo, no intervalo entre 8-14 dias de experimento, com dieta contendo ou não o hormônio masculinizante.....	34
Tabela 8. Valores médios (\pm d.p.) de TCE (%.dia ⁻¹) em peso das linhagens de tilápia-do-nilo, no intervalo entre 22 e 29 dias de experimento, com dieta contendo ou não o hormônio masculinizante.....	35
Tabela 9. Valores médios (\pm d.p.) de ganho em peso (mg) das linhagens de tilápia-do-nilo que receberam dieta contendo ou não o hormônio masculinizante, durante o experimento (29dias).....	35

LISTA DE TABELAS

Capítulo 3

Tabela 1. Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para reação de amplificação por PCR em tempo real.....	59
Tabela 2. Valores das médias de peso (mg) aos 4, 19 e 33 dias pós-eclosão (dpe) e ganho em peso total (GP) ao fim do experimento.....	60
Tabela 3. Freqüência de fibras musculares (%) nas classes de diâmetro, segundo a linhagem e o tratamento hormonal, aos 19 dpe.....	62
Tabela 4. Freqüência de fibras musculares nas diferentes classes de diâmetro, segundo a linhagem e o tratamento hormonal, aos 33 dpe.....	63
Tabela 5. Valores médios do diâmetro médio, mediana do diâmetro, diâmetro máximo e diâmetro das cinco menores e cinco maiores fibras musculares das duas linhagens de tilápia aos 33 dpe.....	66

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2

- Figura 1.** A) Comprimento total (mm) dos animais referente ao primeiro dia experimental. B) Peso (mg) dos animais no primeiro dia experimental. Peixes das linhagens Tailandesa e “Supreme” com 4 dias pós-eclosão e da linhagem GIFT com 11 dias pós eclosão. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0, 05$)..... 30
- Figura 2.** Taxas médias de sobrevivência dos juvenis de tilápia no fim da fase experimental. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0, 05$)..... 36
- Figura 3.** Freqüência dos animais nas classes de tamanho: PP (<15,9 mm); P (15,9-22,7 mm); M (22,7-36,3 mm); G (36,3-43,1 mm); e GG (>43,1 mm), ao fim da fase experimental. S: “Supreme”, dieta sem hormônio; SM: “Supreme”, dieta com hormônio; G: GIFT, dieta sem hormônio; GM: GIFT, dieta com hormônio; T: Tailandesa, dieta sem hormônio; e TM: Tailandesa, dieta com hormônio..... 37
- Figura 4.** Freqüência de machos verificados em cada classe de tamanho, ao fim da fase experimental. S: “Supreme”, dieta sem hormônio; SM: “Supreme”, dieta com hormônio; G: GIFT, dieta sem hormônio; GM: GIFT, dieta com hormônio; T: Tailandesa, dieta sem hormônio; e TM: Tailandesa, dieta com hormônio..... 38

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 3

Figura 1. Distribuição das fibras nas classes de diâmetro. 10 ($D \leq 10\mu\text{m}$), 20 ($10 < D \leq 20 \mu\text{m}$), 30 ($20 < D \leq 30 \mu\text{m}$), aos 4 dias pós-eclosão. Letras para comparação da frequência de fibras entre as linhagens, em cada classe de diâmetro. S = Linhagem “Supreme”; T = Linhagem Tailandesa..... 61

Figura 2. Distribuição de frequência das fibras musculares em classes de diâmetro, de tilápias de cada linhagem, tratadas ou não com hormônio, aos 19 dpe. Classes: 10 ($D \leq 10\mu\text{m}$), 20 ($10 < D \leq 20 \mu\text{m}$), 30 ($20 < D \leq 30 \mu\text{m}$), 40 ($30 < D \leq 40\mu\text{m}$) e 50 ($D > 40 \mu\text{m}$). A: linhagem “Supreme”. B: linhagem Tailandesa. Comparação feita entre os tratamentos em cada classe separadamente. Médias com letras diferentes entre si diferem pelo teste t ($p > 0, 05$). S: “Supreme” + dieta sem hormônio; SM: “Supreme” + dieta com hormônio; T: “Tailandesa” + dieta sem hormônio; e TM: “Tailandesa” + dieta com hormônio.... 64

Figura 3. Distribuição de frequência das fibras musculares em classes de diâmetro, de tilápias de cada linhagem, tratadas ou não com hormônio, aos 33 dpe. Classes: 10 ($D \leq 10\mu\text{m}$), 20 ($10 < D \leq 20 \mu\text{m}$), 30 ($20 < D \leq 30 \mu\text{m}$), 40 ($30 < D \leq 40\mu\text{m}$) e 50 ($D > 40 \mu\text{m}$). A: linhagem “Supreme”. B: linhagem Tailandesa. Comparação feita entre os tratamentos em cada classe separadamente. Médias com letras diferentes entre si diferem pelo teste t ($p > 0, 05$). S: “Supreme” + dieta sem hormônio; SM: “Supreme” + dieta com hormônio; T: “Tailandesa” + dieta sem hormônio; e TM: “Tailandesa” + dieta com hormônio.... 65

Figura 4. Expressão dos genes da miogenina (A) e MyoD (B) na musculatura de larvas e juvenis de tilápia-do-nilo da linhagem Tailandesa. T: Tailandesa + dieta sem hormônio; e TM: Tailandesa + dieta com hormônio..... 67

DESEMPENHO PRODUTIVO E CRESCIMENTO MUSCULAR DE LINHAGENS DE TILÁPIA-DO-NILO CULTIVADAS NA FASE INICIAL

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo a comparação do desempenho produtivo e do crescimento muscular (morfometria das fibras musculares e expressão gênica dos fatores de regulação miogênica) de três linhagens de tilápia-do-nylo (GIFT, "Supreme" e Tailandesa), alimentadas com dieta comercial contendo ou não o hormônio 17α -metiltestosterona, durante a fase inicial, quando ocorre o processo de diferenciação sexual.

O trabalho foi conduzido em esquema fatorial (2 dietas X 3 linhagens), constituído por seis tratamentos com quatro repetições de cada, por 29 dias. As larvas (com quatro dias pós eclosão) foram estocadas na densidade de 4 larvas.L⁻¹ e receberam dieta comercial farelada, em seis arraçoamentos diários. Foram realizadas cinco avaliações biométricas durante o experimento para verificação dos resultados de desempenho. Além disso, foram calculadas as taxas de sobrevivência, de masculinização e a homogeneidade dos animais no final do experimento. Para a avaliação morfométrica das fibras musculares (n = 8 indivíduos por tratamento) foram realizadas amostragens aos 4, 19 e 33 dias pós-eclosão, para confecção das lâminas de tecido muscular. Mensurou-se o diâmetro e a área de 200 fibras musculares para cada amostra, que foram distribuídas nas seguintes classes de diâmetro (D): classe 10 ($D \leq 10\mu\text{m}$), classe 20 ($10 < D \leq 20\mu\text{m}$), classe 30 ($20 < D \leq 30\mu\text{m}$), classe 40 ($30 < D \leq 40\mu\text{m}$) e classe 50 ($D > 40\mu\text{m}$). As análises de expressão gênica da MyoD e Miogenina foram realizadas por PCR em tempo real, com uma amostragem aos 4 dpe e outra aos 33 dpe.

A linhagem "Supreme" apresentou melhores respostas de desempenho produtivo e de sobrevivência, e menores valores do coeficiente de variação. As taxas de masculinização em todas as linhagens estiveram acima de 97%. A masculinização, por meio da adição de 17α -metiltestosterona, interferiu nas respostas de desempenho produtivo de larvas de tilápia-do-nylo e essas respostas foram diferentes entre as linhagens. A taxa de masculinização foi efetiva e a proporção de machos e fêmeas, em animais que não passaram pela masculinização, sugere certa dependência da linhagem utilizada, necessitando de maiores estudos nesse sentido. O melhor desempenho verificado na linhagem "Supreme" ficou caracterizado tanto pelo crescimento do diâmetro das fibras (hipertrofia) e também pela alta frequência de fibras em formação (diâmetro $< 20\mu\text{m}$). A expressão dos genes da MyoD e miogenina para a linhagem Tailandesa não mostrou

diferença significativa entre os peixes tratados ou não com a 17 α -metiltestosterona. Foi verificada maior frequência de fibras de maior diâmetro nos tratamentos com o hormônio, mas essa tendência não acompanhou o aumento em peso dos animais, não ocorrendo efeito anabolizante detectável. Tal fato sugere um possível efeito prejudicial do hormônio à fisiologia dos peixes.

Palavras chave: *Oreochromis niloticus*, desempenho produtivo, crescimento muscular.

PRODUCTIVE PERFORMANCE AND MUSCLE GROWTH OF STRAINS OF NILE TILAPIA-DURING THE INITIAL PHASE

SUMMARY

This study aimed to compare the performance and muscle growth (muscle fiber morphometry and gene expression of myogenic regulatory factors) from three Nile tilapia strains (GIFT, "Supreme" and Thai), fed commercial diet with or without the hormone 17 α -methyltestosterone (MT) during the initial phase, when does the process of sexual differentiation.

The experiment was conducted in a factorial scheme (3x2), making up six treatments with four replicates each. The larvae (4 days post-hatching, dph) were stocked at 4 larvae.L⁻¹ and were fed a commercial diet six times a day, during 29 days. Fish growth was evaluated along the experiment, as well as the survival rates, masculinization rates and homogeneity of the animals at the end (29 days). For the morphometric analysis of the muscle fibers (n = 8 per treatment), samples were taken at 4, 19 and 33 days post-hatching (dph) and transversal sections of the epiaxial muscle were obtained. The diameter (d) and the area of 200 muscle fibers were measured in each sample, and the diameters were classified as follow: *class 10* = $d \leq 10 \mu\text{m}$, *class 20* = $10 < d \leq 20 \mu\text{m}$, *class 30* = $20 < d \leq 30 \mu\text{m}$, *class 40* = $30 < d \leq 40 \mu\text{m}$, and *class 50* = $d > 40\mu\text{m}$. The analysis of gene expression of MyoD and Myogenin were performed by real time PCR (sampling at 4 and 33 dph).

The "Supreme" strain showed better growth performance, survival rates, and size homogeneity. All strains displayed masculinization rates above 97%. The use of MT affected the productive performance of Nile tilapia larvae, and the effects were different among the strains. The proportion of males and females of the juveniles that did not receive MT suggests a certain dependence on the strain used, requiring further studies in this direction. The "Supreme" strain performed better, characterized by hyperplasia and hypertrophy of the muscle fibers. The expression of MyoD and myogenin showed no effect of MT in juveniles of the Thai strain. In general, tilapia juvenile of the three strains that received the hormone showed higher frequency of fibers of higher diameter classes, indicating intense participation of hypertrophy. However, this trend did not accompany increase in weight, suggesting possible adverse effects on fish's physiology.

Key words: *Oreochromis niloticus*, productive performance, muscle growth.

CAPÍTULO 1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1 INTRODUÇÃO

Dentre as espécies de peixes cultivados no Brasil, a tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*) é a espécie que vem apresentando a maior produção. Tal é o interesse na espécie que nas últimas décadas foram importadas diferentes linhagens de tilápia-do-nylo geneticamente melhoradas, visando ao aumento da eficiência de produção e à diminuição dos custos (BRASIL, 2010).

A intensificação da produção desta espécie no Brasil tem demandado estudos das linhagens geneticamente melhoradas, criadas em nossos ambientes. Algumas pesquisas demonstraram que as linhagens melhoradas apresentaram ganhos em peso mais satisfatórios que as linhagens não melhoradas (ROMANA-EGUIA E DOYLE, 1992; DAN e LITTLE, 2000; BOSCOLO et al., 2001; SIFA et al., 2002; TACHIBANA et al., 2004; RIDHA, 2006; MASSAGO, 2007; NEUMANN et al. 2009).

Diversos fatores devem ser considerados na escolha da linhagem de tilápia-do-nylo a ser cultivada, como, por exemplo, adaptabilidade aos diferentes ambientes e alta taxa de crescimento. A taxa de crescimento em peixes cultivados é um aspecto de capital importância para o sucesso na criação dos animais de produção. Embora os fatores externos que interferem no crescimento muscular de peixes nos estágios iniciais de vida não estejam totalmente elucidados, o conhecimento sobre os mecanismos de hiperplasia e hipertrofia muscular podem indicar a dinâmica do crescimento muscular na fase inicial, que para a maioria dos peixes é o período em que acontece o processo de diferenciação sexual. Como no caso da tilápia-do-nylo existe o interesse de produção de populações monossexo, essa fase também, coincide com o período em que recebem o hormônio andrógeno sintético 17 α -metiltestosterona para masculinização.

Esse é o hormônio que vem sendo rotineiramente usado para a masculinização de tilápia, visando à obtenção de populações monossexo (HIOTT E PHELPS, 1993; MAINARDES-PINTO et al., 2000; TACHIBANA et al., 2004; NEUMANN et al., 2009), e minimizar a reprodução natural nos tanques de criação. Por outro lado, há indicações que esse hormônio possa também promover um efeito anabolizante nos peixes (MOMMSEN e MOON, 2001) ou até mesmo ser prejudicial à saúde destes (GAYÃO, 2009).

Com base no exposto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o desempenho produtivo das linhagens de tilápia-do-nylo, Tailandesa, GIFT e "Supreme", e o crescimento muscular dos animais alimentados com e sem adição do hormônio 17 α -

metiltestosterona, durante a fase inicial, em que acontece o processo de diferenciação sexual.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A aquicultura mundial apresentou aumento considerável nos últimos 50 anos e vem crescendo a uma taxa maior do que outros setores de produção de origem animal (FAO, 2009). Esta teve um papel de destaque no Brasil para o aumento da produção de pescado. Somente a piscicultura teve um crescimento de 60,2% em 2008 e 2009, na comparação com 2007. A criação de tilápia chegou a 132 mil toneladas por ano, sendo o carro chefe da produção aquícola, representando 39% do total de pescado cultivado (BRASIL, 2010).

O Brasil caracteriza-se pelo grande volume de águas represadas com capacidade e potencial para a instalação de criações de peixes, principalmente em tanques-rede. Desde 2009, o país pode contar com as ações do recém criado Ministério da Pesca e Aquicultura, que trazem planos e políticas de geração de renda para pescadores e aquicultores, produção de alimento saudável para a população, estruturação da cadeia produtiva, recuperação de estoques pesqueiros e desenvolvimento da aquicultura brasileira em águas da União (BRASIL, 2010).

Linhagens geneticamente melhoradas.

A tilápia-do-nilo destaca-se como peixe de potencial para a aquicultura devido a sua rusticidade, crescimento rápido e adaptação ao confinamento (HAYASHI, 1995). Além disso, possui hábito alimentar onívoro, e aceita rações com grande facilidade desde o período larval até a fase de terminação (BOSCOLO et al., 2001).

Os programas de melhoramento genético aplicados às espécies de tilápias nas últimas décadas proporcionaram um grande número de linhagens e resultaram em aumento da eficiência de produção e diminuição dos custos. As diferenças entre algumas linhagens foram demonstradas em diversos trabalhos que avaliaram parâmetros como a coloração, a densidade, habilidade de escapar durante a despesca, desempenho, rendimento de filé e adaptação ao ambiente (ROMANA-EGUIA e DOYLE, 1992; TUAN et al., 1998; DAN e LITTLE, 2000; Sifa et al., 2002; RUTTEN et al., 2004; TACHIBANA et al., 2004; VIEIRA et al., 2005; RIDHA, 2006a; RIDHA, 2006b; SANTOS et al., 2008; NEUMANN et al., 2009).

Em 1971 ocorreu a primeira introdução oficial da tilápia-do-nilo no Brasil, mas com o passar do tempo os peixes começaram a apresentar baixo desempenho e anomalias genéticas, causadas possivelmente pela endogamia. No ano de 1996 ocorreu a importação da linhagem Tailandesa ou Chitralada, que passou pelo processo de domesticação desde a década de 40 no Japão e na Tailândia (ZIMMERMANN, 1999).

A linhagem GST (GenoMar Supreme Tilápia), conhecida como “Supreme” no Brasil, foi introduzida no ano de 2002 pela Piscicultura Aquabel, oriunda da GENOMAR, empresa Norueguesa que desde 1999 tem desenvolvido um programa de melhoramento genético e difusão dessa linhagem (ZIMMERMANN, 2003; CYRINO et al., 2004). Posteriormente, no ano de 2005, foi introduzida a linhagem GIFT (*Genetically Improved Farmed Tilapia*), desenvolvida inicialmente pelo ICLARM (*International Center for Living Aquatic Resources Management*, atual *WorldFish Center*), a partir do cruzamento de oito linhagens, sendo quatro linhagens africanas selvagens e quatro linhagens domesticadas na Ásia (ASIAN DEVELOPMENT BANK, 2005). A origem das linhagens “Supreme” e GIFT foi a mesma, mas o desenvolvimento das duas ocorreu de forma independente após o ano de 1999 (ZIMMERMANN, 2003).

A intensificação da produção da espécie no Brasil tem demandado pesquisas das linhagens geneticamente melhoradas, criadas em nossos ambientes. Segundo Santos et al. (2008), vários fatores devem ser considerados na escolha da linhagem de tilápia a ser cultivada, tais como: adaptabilidade e tolerância a diferentes ambientes; facilidade de reprodução em cativeiro; elevada taxa de crescimento; característica da carcaça e de

carne compatíveis com as exigências da indústria de processamento e do consumidor final.

Trabalhos já realizados demonstraram que as linhagens melhoradas apresentam ganhos em peso mais satisfatórios (ROMANA-EGUIA E DOYLE, 1992; DAN E LITTLE, 2000; BOSCOLO et al., 2001; SIFA et al., 2002; TACHIBANA et al., 2004; RIDHA, 2006 b; MASSAGO, 2007; NEUMANN et al. 2009). Em pesquisa de desempenho e características de carcaça de duas linhagens de tilápia na fase inicial e de crescimento, Boscolo et al. (2001) constataram maior ganho em peso, conversão alimentar e sobrevivência da linhagem Tailandesa em relação à comum, porém, o rendimento de filé foi semelhante nas duas linhagens. Além disso, Tuan et al. (1998), e Leonhardt et al. (2006) também obtiveram o melhor ganho em peso da tilápia-do-nylo tailandesa em relação às linhagens locais, do interior do Paraná, nas fases inicial e de crescimento.

Romana-Eguia e Doyle (1992) encontraram diferenças de crescimento quando trabalharam com duas linhagens das Filipinas e uma da Tailândia na fase inicial. Dan e Little (2000), comparando a tilápia-do-nylo GIFT com outras linhagens em cinco países da Ásia, obtiveram peso 18 a 58% maior da GIFT em relação às não-GIFT. Por outro lado, Dan e Little (2000) ainda verificaram que não houve diferença no desempenho produtivo de animais revertidos e não-revertidos em relação às linhagens estudadas (GIFT, Tailandesa e Vietnamita), criadas em viveiros de terra.

Ridha (2006a) comparou o ganho em peso, conversão alimentar e sobrevivência de duas linhagens melhoradas (GIFT e FaST) e uma linhagem não melhorada do Kuwait (Ismaelia) na fase de crescimento entre 20g a 250g, sob condições de cultivo intensivas. Os resultados indicaram que as linhagens GIFT e FaST não apresentaram diferenças significativas entre si, mas ambas tiveram melhores taxas de crescimento e conversão alimentar do que a Ismaelia.

Em um segundo trabalho com as mesmas linhagens, Ridha (2006b) investigou o efeito da densidade de estocagem (125 e 200 peixes.m⁻³) em relação ao desempenho. Com isso, constatou que nas duas densidades as linhagens GIFT e FaST apresentaram maior peso médio, altas taxas de crescimento diário e específico, maior conversão alimentar e rendimento bruto em relação a linhagem não melhorada. Observou também, que o crescimento foi negativamente afetado na maior densidade, embora tenha sido verificado maior conversão alimentar e rendimento bruto neste tratamento.

Ao estudar o desempenho de crescimento das linhagens Chitralada, "Supreme", Bouaké, na fase inicial em caixas d'água e na fase final em viveiros de terra e em tanques de concreto, Vieira et al. (2005) concluíram que a linhagem "Supreme" mostrou-se superior às demais linhagens nas duas fases de criação, apresentando maior

eficiência, comprovando, assim, o efeito do melhoramento genético sobre as características produtivas.

Na avaliação do desempenho de alevinos de quatro linhagens cultivadas com peso inicial de 1g por um período de 112 dias, Massago (2007) também demonstrou no final do seu experimento que a linhagem “Supreme” apresentou ganho em peso 34,8%, 18,0% e 9,7% superior quando comparadas às linhagens Bouaké, Tailandesa e GIFT, respectivamente. Neves et al. (2008) ao avaliar o desempenho produtivo das linhagens Bouaké e Tailandesa em sistemas de cultivo misto observaram que a linhagem de melhor desempenho foi a Tailandesa.

Em relação à tolerância a baixas temperaturas, Sifa et al. (2002) estudaram três linhagens de tilápia-do-nilo (GIFT, Sudan 78, Egypt 88) e verificaram que os animais começaram a morrer quando a temperatura da água atingiu 11°C e pela análise da dose letal (DL_{50}) para baixas temperaturas, verificaram que a linhagem GIFT foi a menos tolerante. Assim, os autores afirmam que isto tem implicações importantes para a aplicação de organismos geneticamente melhorados em climas frios, quando estes são desenvolvidos em regiões mais quentes.

De acordo com Rutten et al. (2004) os programas de melhoramento genético focam principalmente o crescimento dos animais enquanto que informações do melhoramento genético sobre o rendimento de filé é escasso. Os autores então analisaram as relações entre as medidas do corpo e peso/rendimento de filé em três diferentes linhagens de tilápia-do-nilo (GIFT e Tailandesa, de origens diferentes) e verificaram um rendimento de filé médio de 35,7 %, com diferenças entre as linhagens num intervalo de 34,4–38%, que não representou diferença estatística.

Santos et al. (2007) compararam diferentes modelos de crescimento ajustados para medidas morfométricas em função do peso, para as linhagens de tilápias Tailandesa e “Supreme”, e concluíram que os modelos de Gompertz e von Bertalanffy são os mais indicados para as duas linhagens, demonstrando que foram pequenas as diferenças existentes entre elas. Tais autores afirmam que apesar de existirem trabalhos relacionados às características de carcaça, há carência de estudos de crescimento e de como os peixes adquirem as suas formas características. Tais informações são de capital importância para o desenvolvimento e avaliações comparativas de novas linhagens de tilápias que apresentem padrões de crescimento diferenciados.

No estudo sobre desempenho de diferentes linhagens de tilápia-do-nilo na fase de reversão sexual, Tachibana et al. (2004) demonstraram que as linhagens Santa Catarina e Tailandesa apresentaram melhores respostas de desempenho produtivo, e concluíram que a administração da ração com hormônio andrógeno pode determinar diferentes

respostas, relacionadas ao desenvolvimento e taxa de sobrevivência, as quais demonstram uma possível dependência das características genéticas dos indivíduos.

Masculinização pela 17 α -metiltestosterona.

A tilápia-do-nilo apresenta alta precocidade reprodutiva, o que se torna um problema para a piscicultura devido à superpopulação dos viveiros e consequente diminuição do desempenho produtivo. Para resolver este problema, a criação de populações monossexo de tilápias vem sendo praticada e estudada nas últimas décadas (POPMA e GREEN, 1990). Grande parte das criações de tilápias no Brasil e no mundo faz uso de populações monossexo macho, devido aos maiores índices de crescimento e ganho em peso (TACHIBANA et al., 2004; MAKINO, 2005), já que as fêmeas utilizam grande parte de suas reservas energéticas para o desenvolvimento gonadal e reprodução. Além disso, as fêmeas não se alimentam durante o tempo em que incubam os ovos e larvas na boca (GALE et al., 1999; BOSCOLO et al., 2001; CARRILLO, 2004).

Vários métodos foram estudados para a obtenção de populações monossexo, como a hibridação, poliploidia, utilização de hormônios andrógenos (na dieta ou por banhos de imersão) e cultivo em altas temperaturas. Dentre as técnicas mais empregadas está a masculinização por meio da incorporação do hormônio andrógeno sintético 17 α -metiltestosterona na dieta (PEZZATO et al., 1986; CASTAGNOLLI et al., 1992; MACINTOSH e LITTLE, 1995; LEONHARDT, 1997; DAN E LITTLE, 2000; MAINARDES-PINTO et al., 2000; TACHIBANA et al., 2004, NEUMANN et al, 2009). Entretanto, no meio científico há muitas discordâncias sobre suas técnicas de utilização no que se refere à dosagem e duração ideais do tratamento com o hormônio, além da questão da fixação de resíduos hormonais na carcaça dos animais.

Em relação à concentração e a duração do tratamento com o 17 α -metiltestosterona, Hiott e Phelps (1993) verificaram 100% de machos em tilápia-do-nilo fornecendo 60 mg.kg⁻¹ do hormônio por 28 dias. Pezatto (1984) também obteve a mesma taxa de masculinização fornecendo dieta com 30 mg.kg⁻¹ do hormônio, durante 60 dias. Contrariamente, baixas taxas de masculinização foram encontradas por Carvalho e Foresti (1996) utilizando concentrações superiores a 50 mg.kg⁻¹ do hormônio por um período de 40 dias. Os autores sugerem que as baixas taxas podem ter sido resultado do excesso de hormônio, em que a enzima aromatase converte o excesso de andrógeno em estrógeno resultando em indivíduos geneticamente machos e fenotipicamente fêmeas – processo caracterizado pelo nome de feminilização paradoxal.

O mesmo foi observado por Rinchar et al. (1999) que avaliaram a masculinização do salmoniforme *Esox masquinongy* (2,5 \pm 0,6g de peso inicial) tratados com 17 α -metiltestosterona na concentração de 15 mg.kg⁻¹, durante 60 dias. Seis meses após o tratamento, os autores não verificaram nenhum efeito significativo de crescimento e sobrevivência dos peixes. Ao analisarem os níveis do hormônio no plasma sanguíneo

durante e após o tratamento, não verificaram diferenças significativas entre os animais tratados e os do controle. Além disso, a proporção de fêmeas no grupo tratado (66%) foi maior do que no grupo controle (30%), sugerindo que a dosagem e duração do tratamento ocasionou feminilização paradoxal.

Ao avaliar a dosagem mais efetiva do hormônio na masculinização da tilápia-do-nylo, Mainardes-Pinto et al. (2000) verificaram que a incorporação do hormônio na concentração de 60 mg.kg^{-1} durante 30 dias, independente do tipo da ração utilizada no experimento, foi a mais eficiente, obtendo-se 98% de machos. Neumann et al. (2009), trabalhando com três linhagens de tilápia-do-nylo durante o período de masculinização também com doses de 60 mg.kg^{-1} por 30 dias, obtiveram em todas as linhagens frequências acima de 90% de machos.

A pesquisa realizada por Gayão (2009) confirmou os resultados publicados pelos autores citados acima. Ao utilizar doses do hormônio de 30 e 60 mg.kg^{-1} durante 30 dias verificou taxas de masculinização de 98,4 e 100%, respectivamente. Entretanto, o autor condena a adição do 17 α -metiltestosterona por causar danos aos hepatócitos e influenciar na saúde dos peixes, uma vez que verificou alterações histológicas no fígado desses peixes, caracterizando intoxicação pelo hormônio, mais grave na dose de 60 mg.kg^{-1} . Com isso, indicou como ideal a dosagem de 30 mg.kg^{-1} , pois causou menor desorganização na estrutura histológica do fígado desses animais.

Leonhardt e Urbinati (1999) compararam o crescimento de machos sexados com machos masculinizados de tilápia-do-nylo, durante a fase de terminação, em sistema intensivo de cultivo em tanques-rede. Os autores não verificaram diferenças significativas no ganho em peso e no comprimento entre os dois grupos estudados. Thorarensen et al. (1996) verificaram que a aplicação de esteróides anabólicos exógenos favoreceu o crescimento do tecido cardíaco de trutas arco-íris; porém, os autores sugerem que tal efeito está limitado aos juvenis e que não pode ser encontrado nos adultos, relacionando o fato com a maturação dos animais e preparação para a fase reprodutiva.

Um dos aspectos que torna a utilização do hormônio questionável é que a dieta não ingerida ou não metabolizada pode liberar quantidade significativa de 17 α -metiltestosterona nos tanques de cultivo contaminando seus efluentes. Contreras-Sánchez et al. (2000) observaram que o hormônio acumulou-se nos sedimentos dos tanques em níveis de 2 a 6 ng.g^{-1} , 28 dias após o início do tratamento hormonal. Após 84 dias, os níveis de testosterona foram de $2,8 \text{ ng.g}^{-1}$, demonstrando a persistência do hormônio no solo por aproximadamente três meses após cessar o tratamento. Phelps et al. (2000) observaram durante o experimento uma elevação da concentração do hormônio na água até o 14º dia, após isso a curva de crescimento começou a diminuir, aumentando os níveis de testosterona nos sedimentos.

Por outro lado, o hormônio 17 α -metiltestosterona tem sido o mais utilizado no processo de obtenção de populações monossexo por ser facilmente excretado logo após o período da sua incorporação na dieta (POPMA E GREEN, 1990; ROTHBARD et al., 1990; MAINARDES-PINTO et al., 2000). Segundo Curtis et al. (1991), Rothbard et al. (1990) e Zanardi (2007), a eliminação do hormônio acontece em praticamente dez dias após sua última aplicação, sugerindo que o tratamento com o hormônio não apresenta riscos aos consumidores dos peixes tratados.

De acordo com Mommsen e Moon (2001), o melhor desempenho de crescimento está relacionado ao aumento da taxa de síntese protéica no músculo, à acelerada taxa de captação de aminoácidos pela absorção intestinal e à intensificação da proteólise no trato gastro-intestinal. Os autores destacam que em peixes alguns andrógenos podem suprimir a atividade das células inter-renais, podendo, assim, aumentar a síntese protéica muscular por meio da redução da proteólise devido ao cortisol. Santandreu e Díaz (1994) estudaram o efeito do 17 α -metiltestosterona em juvenis de *Oncorhynchus masou* e verificaram que o aumento do crescimento foi acompanhado pelo aumento da retenção de nitrogênio e pela diminuição da amônia excretada.

Lone e Matty (1981) mostraram a atividade dos andrógenos como promotores de crescimento, por injeção ou administração oral, e verificaram que no trato gastro-intestinal ocorreu um aumento da atividade proteolítica. Com truta arco-íris, Habibi e Ince (1983) observaram um aumento no transporte e absorção da L-leucina no intestino dos animais que receberam por perfusão $50\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de 17 α -metiltestosterona. Já com *O. mossambicus*, Hazzard e Ahearn (1992) realizaram experimentos com o intestino dos animais e observaram *in vitro* que o transporte e absorção da D-glucose aumentou na presença do 17 α -metiltestosterona.

Ao estudar o efeito anabolizante da testosterona natural e do sintético 17 α -metiltestosterona em truta arco-íris, Davie e Thorarensen (1997) observaram que em ambos os tratamentos, com implante do hormônio natural e sintético, os peixes apresentaram um crescimento do coração maior do que os animais do controle (sem implante de hormônio), sendo que o tratamento com o hormônio sintético apresentou maior crescimento do coração. Os autores sugeriram que a grande quantidade de receptores de andrógenos no músculo cardíaco apresenta maior afinidade ao andrógeno na forma sintética, ocasionando aumento da massa cardíaca.

Thorarensen et al. (1996), trabalhando com implantes de 11-ketotestosterona e testosterona natural em trutas arco-íris, apesar de não encontrarem crescimento significativo em relação ao tratamento controle (sem implante de hormônio), observaram que houve um aumento da área da musculatura vermelha nos machos e fêmeas tratados com os hormônios. Em relação a área da musculatura branca os autores não verificaram

diferença significativa entre os tratamentos. Ainda com truta arco-íris e em algumas espécies de salmão, Mommsen e Moon (2001) afirmaram que os esteróides sexuais também são conhecidos por modular os níveis de hormônio de crescimento.

Com base no exposto, torna-se importante conhecer o efeito do 17 α -metiltestosterona no crescimento muscular da tilápia-do-nilo, já que este hormônio é amplamente utilizado no período de diferenciação sexual para obtenção de populações monossexo machos de tilápia-do-nilo.

Tecido muscular estriado esquelético: morfometria e expressão dos fatores de regulação miogênica.

O tecido muscular estriado esquelético apresenta alta plasticidade. O conhecimento das características morfológicas, da miogênese e da dinâmica do crescimento deste tecido é importante não apenas para o entendimento, da morfofisiologia, mas também, para a seleção de animais visando a melhoria na produção de carne (DAL PAI-SILVA e CARVALHO, 2007).

O tecido muscular dos peixes corresponde de 40 a 75% da sua massa corporal e suas fibras musculares se distribuem em três compartimentos: vermelho, intermediário e branco; predominando o compartimento branco (KILARSKI, 1990; JOHNSTON, 1999; AGUIAR et al., 2005). A distribuição das fibras musculares nos compartimentos é variável entre as espécies de peixes e entre os diferentes estágios de desenvolvimento desses animais (JOHNSTON, 1980).

O compartimento vermelho é formado por fibras musculares de contração lenta e de metabolismo oxidativo. O compartimento branco é constituído por fibras de contração rápida e de metabolismo glicolítico (JOHNSTON, 1994). Entre os compartimentos vermelho e branco, encontra-se o compartimento intermediário, com fibras que apresentam propriedades morfofisiológicas intermediárias entre as das fibras musculares brancas e vermelhas como contração rápida e metabolismo oxidativo/glicolítico (SÄNGER e STOIBER, 2001).

O estudo da miogênese nos peixes indicou que a formação das primeiras fibras musculares ocorre nas fases iniciais da embriogênese (JOHNSTON, 1980; KIMMEL et al., 1990). O desenvolvimento embrionário dos teleósteos é profundamente afetado por condições ambientais, particularmente de temperatura e concentrações de oxigênio dissolvido. O ambiente determina a taxa de miogênese, composição de organelas celulares, expressão gênica de proteínas e número de fibras musculares (JOHNSTON, 2006). Já o crescimento pós-embrionário do tecido muscular envolve mecanismos de hipertrofia e hiperplasia das fibras, por meio da proliferação das células precursoras miogênicas (MPCs), de origem embrionária (JOHNSTON, 1999; JOHNSTON et al., 2000; DAL PAI-SILVA et al., 2003). Vários autores observaram que o crescimento inicial das larvas de peixes ocorre predominantemente por hiperplasia, quando estas se encontram em condições ótimas para seu desenvolvimento (AGUIAR et al. 2005, ALMEIDA et al. 2008; OSTASZEWSKA et al., 2008 e LEITÃO et al, 2010).

O processo de crescimento das fibras musculares em que as MPCs se fundem com fibras musculares existentes, aumentando o número de núcleos e o tamanho da fibra muscular existente é denominado hipertrofia. A hiperplasia é caracterizada pela

formação de novas fibras musculares (ROWLERSON e VEGGETTI, 2001; JOHNSTON et al., 2004). Nestes processos de crescimento, são observadas as retomadas dos eventos ocorridos durante a miogênese, tendo em vista que os níveis de expressão miogênica estão relacionados com a hiperplasia e a hipertrofia dos mioblastos (JOHANSEN e OVERTURF, 2005).

Assis et al. (2004) observaram que larvas de pacu criadas a 29°C apresentaram maior média de peso e interação dos mecanismos de hiperplasia e hipertrofia muscular. Além disso, Leitão et al. (2010) mostraram o efeito da qualidade do alimento no desenvolvimento muscular e observaram que larvas de pacu alimentadas com náuplios de artêmia apresentaram maior ganho em peso e rápido crescimento inicial por hiperplasia, enquanto que aquelas alimentadas com dieta formulada apresentaram atraso no crescimento e aumento do número de fibras em processo de hipertrofia.

O crescimento do músculo é regulado positivamente e negativamente por uma variedade de fatores de crescimento e de transcrição. Um grupo de fatores transcricionais tem papel fundamental na diferenciação muscular. Desta forma, tais mecanismos de crescimento muscular são regulados pela expressão temporal dos fatores de regulação miogênica (MRFs), envolvidos na iniciação e manutenção da diferenciação muscular, por meio da ação direta ou indireta de proteínas (JOHNSTON, 2006; DAL PAI-SILVA e CARVALHO, 2007). Dentre estes MFRs encontramos a MyoD, que é expressa quando células pluripotentes diferenciam-se em MPCs, e a miogenina, que quando expressas regulam a fusão e diferenciação da fibra muscular (DAL PAI-SILVA e CARVALHO, 2007).

Os níveis de expressão dos MFRs podem variar de acordo com os fatores bióticos e abióticos que interferem no crescimento dos peixes, como foi observado por Galloway et al. (2006) que demonstraram que o aumento da temperatura de incubação de embriões de *Hippoglossus hippoglossus* aumentou a expressão de alguns MRFs.

Considerando o exposto, a presente pesquisa comparou o desempenho produtivo de três linhagens de tilápia-do-nilo mais criadas na região Sudeste do país (GIFT, Tailandesa e "Supreme"), alimentadas com e sem adição do hormônio 17 α -metiltestosterona, durante a fase inicial. Além disso, comparou o crescimento muscular e verificou o efeito do hormônio sobre as características morfométricas e de expressão gênica do tecido muscular.

3 REFERÊNCIAS

AGUIAR, D.H.; BARROS, M. M.; PADOVANI, C. R.; PEZATTO, L. E.; DAL PAI-SILVA, M. Growth characteristics of skeletal muscle tissue in *Oreochromis niloticus* larvae fed on a lysine supplemented diet. **Journal Fish Biology**, London, v. 67, p. 1-12, 2005.

ALMEIDA, F. L. A.; CARVALHO, R. F.; PINHAL, D.; PADOVANI, C. R.; MARTINS, C.; DAL PAI-SILVA, M. Differential expression of myogenic regulatory factor MyoD in pacu skeletal muscle (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887: Serrasalminae, Characidae, Teleostei) during juvenile and adult growth phases. **Micron**, New York, v. 39, p. 1306-1311, 2008.

Asian Development Bank. **An impact evaluation of the development of Genetically Improved Farmed Tilapia: and their dissemination in selected countries.** Mandaluyong: Asian Development Bank, 2005. p. 13-14.

ASSIS, J. M. F. DE; CARVALHO, R. F.; BARBOSA, L.; AGOSTINHO, C. A.; DAL PAI-SILVA, M. Effects of incubation temperature on muscle morphology and growth in the pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 237, p. 251-267, 2004.

BOSCOLO, W. R.; HAYASHI, C.; SOARES, C. M.; FURUYA, W. M.; MEURER, F. Desempenho e características de carcaça de machos revertidos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagens tailandesa e comum, nas fases inicial e de crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 30, n. 5, p. 1391-1396, 2001.

BRASIL. **Planos e Políticas: Mais Pesca e Aquicultura.** Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/#planos_e_politicas/mais-pesca-aquicultura>. Acesso em: 26 out. 2010

CARRILLO, M. A. **Indução à tetraploidia em tilápia nilótica, *Oreochromis niloticus* utilizando-se choque térmico.** 2004. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

CASTAGNOLLI, N. **Piscicultura de água doce.** Jaboticabal: FUNEP, 1992. 189 p.

CONTRERAS-SÁNCHEZ, W. M.; FITZPATRICK, M. S.; MILTON, R. H.; SCHRECK, C. B. Masculinization of Nile tilapia with steroids: Alternative treatments and environmental effects. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON REPRODUCTIVE PHYSIOLOGY OF FISH, 6, 2000, Bergen. **Proceedings**, p. 205-252.

CURTIS, L. R.; DIREN, F. T.; HURLEY, M. D.; SEIM, W. K.; TUBB, R. A. Disposition and elimination of 17 α -methyltestosterone in Nile tilapia. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 99, n. 1, p. 193-201, 1991.

CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALOSSO, D. M.; CASTAGNOLLI, N. **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, 2004.

DAL PAI-SILVA, M.; CARVALHO, R.F.; PELLIZZON, C.H.; DAL PAI, V. Muscle fiber types in tilapia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) from larval to adult: histochemical, ultrastructural and morphometric study. **Tissue Cell**, Essex, v. 35, n. 3, p. 179-187, 2003.

DAL PAI-SILVA, M E CARVALHO, R. F. Mecanismos celulares e moleculares que controlam o desenvolvimento e o crescimento muscular. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, p.21-31, 2007. Suplemento especial

DAN, N. C.; LITTLE, D. C. the culture performance of monosex and mixed-sex newseason and overwintered fry in three strains of nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in northern vietnam. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 184, n. 3-4, p. 221-231, 2000.

DAVIE, P. S.; THORARENSEN, H. Heart growth in rainbow trout in response to exogenous testosterone and 17 α -metilttestosterona, **Compative Biochemistry Physiology**, Birmingham, v. 117, n. 2, p. 227-230, 1997.

FAO. **El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2008**. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, 2009.

GALE, W. L.; FITZPATRICK, M. S.; LUCERO, M.; CONTRERAS-SANCHEZ, W. M.; SCHRECK, C. B. Masculinization of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by immersion in androgens. **Aquaculture**, Amsterdam, v.178, n. 1 p. 349-357, 1999.

GALLOWAY, T. F.; BARDAL, T.; KVAM, S. N.; DAHLE, S. W.; NESSE, G.; RANDØL, M.; KJØRSVIK, E.; ANDERSEN, O. Somite formation and expression of MyoD, myogenin and myosin in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) embryos incubated at different temperatures: transient asymmetric expression of MyoD. **Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v. 209, p. 2432-2441, 2006.

GAYÃO A. L. B. A. **Nutrição e reversão sexual de tilápia-do-nylo: parâmetros produtivos e estrutura do fígado**. 2009. 100 f. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.

HABIBI, H. R; INCE, B. W. Effects of steroids and sex reversal on intestinal absorption of L-[¹⁴C]Leucine in vivo, in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 52, n. 3, p. 438-444, 1983.

HAYASHI, C. Breves considerações sobre as tilápias. In: RIBEIRO, R. P.; HAYASHI, C; FURUYA, W.M. **Curso de piscicultura: Criação racional de tilápias**. Maringá,1. 1995. p.4.

HAZZARD, C. E; AHEARN, G. A. Rapid stimulation of intestinal D-glucose transport in teleosts by 17 α –methyltestosterone. **American Journal Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, Bethesda, v. 262, n. 3, p. 412-418. 1992.

HIOTT, A. E.; PHELPS, R. P. Effects of initial age and size on sex reversal of *Oreochromis niloticus* fry using methyltestosterone. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 112, n. 4, 301-308, 1993.

JOHANSEN, K. A.; OVERTURF, K. Quantitative expression analysis of genes affecting muscle growth during development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Marine Biotechnology**, v. 7, p. 576–587, 2005.

JOHNSTON, I. A. Specialization of fish muscle. In: GOLDSPINK, D. F. “**Development and specializations of muscle**”. Cambridge: University Press, Cambridge, 1980. p.

JOHNSTON, I. A.; HOME, Z. Immunocytochemical investigations of muscle differentiation in the Atlantic herring (*Clupea harengus*, Teleostei). **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, Cambridge, v. 74, p. 79-91, 1994

JOHNSTON, I.A. Muscle development and growth: potential implication for flesh quality in fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 177, p. 99-115, 1999.

JOHNSTON, I.A. et al. Muscle fibre density in relation to colour and texture of smoked Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 189, p. 335-349, 2000.

JOHNSTON, I. A.; HALL, T. E. Mechanisms of muscle development and responses to temperature change in fish larvae. **American Fisheries Society Symposium**, v. 40, p. 85-116, 2004.

JOHNSTON, I. A. Environment and plasticity of myogenesis in teleost fish. **Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v. 209, p. 2249-2264, 2006.

KILARSKI, W. Histochemical characterization of myotomal muscle in the roach, *Rutilus rutilus* (L.) **Journal of Fish Biology**, London, v. 36, p. 353-362, 1990.

KIMMEL, C. B.; Warga, R. M.; Schiling, T. F. Origin and organization of the zebrafish fate map. **Development**, Cambridge, v.108, p.581-584, 1990.

LEITÃO, N. J.; DAL PAI-SILVA, M.; ALMEIDA, F. L. A.; PORTELLA, M. C. Influence of initial feeding on muscle growth and the expression of myogenic regulatory factors in pacu *Piaractus mesopotamicus* larvae. In: **FISH AND SHELLFISH LARVICULTURE SYMPOSIUM**, 5., 2010.

LEONHARDT, J. H. **Efeito da reversão sexual em tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1757)**. 1997. 128 f. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1997.

LEONHARDT, J. H.; FILHO, C. M.; FROSSARD, H.; MORENO, A. M. Características morfométricas, rendimento e composição do filé de tilápia do nilo, *Oreochromis niloticus*, da linhagem tailandesa, local e do cruzamento de ambas. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 27, n. 1, p. 125-132, 2006.

LEONHARDT, J.H. E URBINATI, E.C. Estudo comparativo do crescimento entre machos de tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus*, sexados e revertidos. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 25, p. 19-26, 1998/1999. Número único.

LONE, K. P., AND INCE, B. W. Cellular growth responses of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) fed different levels of dietary protein, and an anabolic steroid, ethylestrenol. **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 49, n. 3, p.32-49,1983.

MACINTOSH, D. J.; LITTLE, D. C. Nile Tilapia *Oreochromis niloticus*. In: BROMAGE, N. R.; ROBERTS, R. J. (Ed.). **Broodstock management and larval quality**. Stirling: Institute of Aquaculture, University of Stirling, 1995, cap. 12, p. 277-320.

MAINARDES-PINTO, C. S. R.; FENERICH-VERANI, N.; DE CAMPOS, B. E. S.; DA SILVA, A. L. Masculinização da Tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, Utilizando Diferentes Rações e Diferentes Doses de 17 α -Metiltestosterona, **Revista Brasileira Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 29, n. 3, p. 654-659, 2000.

MASSAGO, H. **Desempenho de alevinos de quatro linhagens da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e análise da variabilidade genética pelos marcadores RAPD**. 2007. 40f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, Jaboticabal, 2007.

MOMMSEN, T.; MOON, T. W. Hormonal regulation of muscle growth. In: JOHNSTON, I. A. (Ed). **Muscle development and growth**, London: Academic Press, 2001. 318 p.

NEVES, P.R.; RIBEIRO, R.P.; VARGAS, L.; NATALI, M.R.M.; MAEHANA, K. R.; MARENGONI, N.G. Evaluation of the performance of two strains of Nile tilapia (*Oreochromis Niloticus*) in mixed raising systems. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 51, n. 3, p. 531-538. 2008.

OSTASZEWSKA, T.; DABROWSKI, K.; WEGNER, A.; KRAWIEC, M. The effects of feeding on muscle growth dynamics and the proliferation of myogenic progenitor cells during pike perch development (*Sander lucioperca*). **Journal of the World Aquaculture Society**, Baton Rouge, v. 39, n. 2, p. 184-195. 2008

PEZZATO, L. E. **Efeito de níveis de proteína sobre o crescimento da tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* submetida à reversão sexual**. São Paulo, 1984. 90 f. Dissertação (Mestrado), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1984.

PEZZATO, L. E.; PACKER, I. U.; FORESTI, F.; FURLAN, L. R. Ação de hormônios sexuais sobre larvas de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) durante a fase de reversão sexual, mortalidade e frequência de reversão. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, 5, 1986, Cuiabá. **Anais...** p. 63 – 69.

PHELPS, R. P.; POLPMA, T. J. Sex reversal of tilapia. In: COSTA-PIERCE, B. A.; RAKOCY, J.E. (Eds.) Tilapia aquaculture in the Americas. **World Aquaculture Society**, Louisiana, v. 2, n. 1, p.34-59, 2000.

POPMA, T. J.; GREEN, B. W. Reversão sexual de tilápias em tanques de terra. In: **Manual de produção em aquacultura**. Alabama: Auburn University, 1990. 52p.

RIDHA, M. Comparative study of growth performance of three strains of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, L. at two stocking densities. **Aquaculture Research**, Oxford, v.37, p.172-179, 2006b.

RIDHA, M. Evaluation of Growth Performance of Nonimproved and Improved Strains of the Nile Tilapia (L.), *Oreochromis niloticus*. **Journal of the World Aquaculture Society**. Baton Rouge, v. 37, n. 2, p. 218-223, 2006a.

RINCHARD, J.; DABROWSKI, K.; GARCIA-ABIADO, M. A.; OTTOBRE, J. Uptake and depletion of plasma 17 α -methyltestosterone during induction of masculinization in muskellunge (*Esox masquinongy*). **Steroids**, v. 64, n.1, p. 512-525. 1999.

ROMANA-EGUIA, M. R. R.; DOYLE, R. W. Genotype-environment interaction in the response of three strains of Nile tilapia to poor nutrition. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 108, n. 2, p. 1-12, 1992.

ROTHBARD, S.; ZOHAR, Y.; ZMORA, N.; SIVAN, B. L.; MOAV, B.; YARON, Z. Clearance of 17 α -ethynyltestosterone from muscle of sex-inversed tilapia hybrids treated for growth enhancement with two doses of the androgen. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 89, n. 3/4, p. 365-376 1990.

ROWLERSON, A.; VEGGETTI, A. Cellular mechanisms of post-embryonic muscle growth in aquaculture species. In: JOHNSTON, I.A. (Ed.). **Muscle development and growth**. London: Academic Press, 2001. cap. 5, p. 103-140.

RUTTEN, M.J.M.; BOVENHUIS, H.; KOMEN, H. Modeling fillet traits based on body measurements in three Nile tilapia strains (*Oreochromis niloticus* L.) **Aquaculture**, Amsterdam, v. 231, p. 113–122, 2004.

SÄNGER, A. M.; STOIBER, W. Muscle fiber diversity and plasticity. In: JOHNSTON, I.A. (Ed) **Muscle Development and Growth**. London: Academic Press, 2001. cap.

SANTANDREU, I. A., DFAZ, N. F. Effect of 17 α -methyltestosterone on growth and nitrogen excretion in masu salmon (*Oncorhynchus masou* Brevoort). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 124, p. 321-333. 1994.

SANTOS, V. B.; FREITAS, R. T. F.; SILVA, F. F.; FREATO, T. A. Avaliação de curvas de crescimento morfométrico de linhagens de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*). **Ciência Agrotecnica**, Lavras, v. 31, n. 5, p. 1486-1492, 2007

SANTOS, V. B.; YOSHIHARA, E.; FREITAS, R. T. F.; NETO, R. V. R. Exponential growth model of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) strains considering heteroscedastic variance. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 274, p 96–100. 2008.

SIFA, L.; CHENHONG, L.; DEY, M.; Gagalac, F.; Dunham, R. Cold tolerance of three strains of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, in China. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 213, p. 123–129, 2002.

TACHIBANA, L.; CASTAGNOLLI, N.; PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M.; VALLE, J. B.; SIQUEIRA, M. R. Desempenho de diferentes linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) na fase de reversão sexual. **Acta Scientiarum: Animal Sciences**, Maringá, v. 26, n. 3, p. 305-311, 2004.

THORARENSEN, H., YOUNG, G., DAVIE, P. S. 11-Ketotestosterone stimulates growth of heart and red muscle in rainbow trout. **Canadian Journal of Zoology**. Ottawa, v. 74, p. 912-917. 1996.

TUAN, P. A.; LITTLE, D. C.; MAIR, G. C. Genotypic effects on comparative growth performance of all-male tilapia *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 159, n. 3-4, p. 293-302, 1998.

VIEIRA, V. P.; RIBEIRO, R. P.; MOREIRA, H. L. M.; POVH, J. A.; VARGAS, L.; BARRERO, N. M. L. Avaliação do desempenho produtivo de linhagens de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) em Maringá-PR. **Revista Acadêmica**, Curitiba, v.3, n.3, p. 19-26, 2005.

ZANARDI, M. F. **Determinação de resíduo hormonal na carcaça de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) após reversão sexual**. 2007. 66 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, Jaboticabal, 2007.

ZIMMERMANN, S. Incubação artificial: técnica permite a produção de tilápias do Nilo geneticamente superiores. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, v. 9, n. 54, p. 15-21, 1999.

ZIMMERMANN, S. Um moderno instrumental genético no melhoramento e na rastreabilidade de tilápias nilóticas. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 76, p. 69, 2003.

CAPÍTULO 2. DESEMPENHO PRODUTIVO DE TRÊS LINHAGENS DE TILÁPIA-DO-NILO CULTIVADAS DURANTE A FASE DE DIFERENCIAÇÃO SEXUAL.

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo a comparação do desempenho produtivo de três linhagens de tilápia-do-nylo (GIFT, "Supreme" e Tailandesa) alimentadas com dieta comercial contendo ou não o hormônio 17α -metiltestosterona, durante a fase inicial. O trabalho foi conduzido em esquema fatorial (2 dietas X 3 linhagens), constituído por seis tratamentos com quatro repetições de cada, por 29 dias. As larvas foram estocadas na densidade de 4 larvas.L⁻¹ e receberam dieta comercial farelada, em seis arraçoamentos diários. A linhagem "Supreme" apresentou melhores respostas de desempenho produtivo e sobrevivência. O ganho em peso total dos tratamentos da linhagem "Supreme" foi de $769,2 \pm 36,1$ mg (dieta sem hormônio) e $589,4 \pm 92,1$ mg (dieta com hormônio). Com isso, a linhagem "Supreme" apresenta melhores respostas de desempenho produtivo, homogeneidade e sobrevivência durante a fase de masculinização; e o processo de administração do hormônio interfere nas respostas de desempenho produtivo das larvas de tilápia-do-nylo e essas respostas são diferentes entre as linhagens.

Palavras chave: *Oreochromis niloticus*, crescimento, masculinização, 17α -metiltestosterona.

CHAPTER 2. PRODUCTIVE PERFORMANCE OF THREE NILE TILAPIA STRAINS DURING PHASE OF SEXUAL DIFFERENTIATION.

ABSTRACT

This study aimed at comparing the productive performance of three strains of Nile tilapia (GIFT, "Supreme" and Thai) fed a commercial diet contain or not the 17 α -methyltestosterone hormone, during the initial phase. The work was conducted in a factorial scheme (2 diets X 3 strains), using six treatments with four replicates each, for 29 days. Larvae were stocked at a density of 4 larvae.L⁻¹ and were fed a commercial diet, six meals per day. The "Supreme" strain showed better growth performance and survival results. The total weight gain in the treatments with the "Supreme" strain was 769.2 \pm 36.1 mg (diet without the hormone) and 589.4 \pm 92.1 mg (diet with the hormone). Thus, the "Supreme" strain showed the best results of performance, uniformity and survival during the masculinization, and the masculinization interferes with the responses of productive performance of the larvae of Nile tilapia. Such responses are different among the strains.

Key words: *Oreochromis niloticus*, growth, masculinization, 17 α -methyltestosterone.

1 INTRODUÇÃO

O crescimento da aquicultura no Brasil relaciona-se não só com a abundância de água para o seu desenvolvimento como também com as condições favoráveis do clima. Dentre as espécies de peixes cultivados, a tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*) é a espécie que vem apresentando a maior produção (132 mil toneladas em 2009), seguida da carpa comum (*Cyprinus carpio*), do tambaqui (*Colossoma macropomum*) e do pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Observou-se que nas últimas décadas foram importadas diferentes linhagens de tilápia geneticamente melhoradas, visando o aumento da eficiência de produção e a diminuição dos custos (BRASIL, 2010).

A intensificação da produção desta espécie no Brasil tem demandado pesquisas das linhagens geneticamente melhoradas, criadas em nossos ambientes. Segundo Santos et al. (2008), vários fatores devem ser considerados na escolha da linhagem de tilápia a ser cultivada, tais como: adaptabilidade e tolerância a diferentes ambientes; facilidade de reprodução em cativeiro; elevada taxa de crescimento; características de carcaça e de carne compatíveis com as exigências da indústria de processamento e do consumidor final.

A tilápia-do-nylo e algumas tilápias vermelhas híbridas podem ser criadas em diversos sistemas, desde a cultura semi-intensiva em viveiros escavados, como em cultivo intensivos em tanques-rede (BOSCOLO et al., 2001). Tais animais destacam-se como peixe de potencial para a aqüicultura devido a sua rusticidade, crescimento rápido e adaptação ao confinamento (HAYASHI, 1995). Além disso, possuem hábito alimentar onívoro, e aceitam rações com grande facilidade, desde o período larval até a fase de terminação (BOSCOLO et al., 2001).

Trabalhos já realizados demonstraram que as linhagens melhoradas podem apresentar ganhos em peso mais satisfatórios (ROMANA-EGUIA E DOYLE, 1992; DAN e LITTLE, 2000; BOSCOLO et al., 2001; SIFA et al., 2002; TACHIBANA et al., 2004; RIDHA, 2006; MASSAGO, 2007; NEUMANN et al. 2009). Em pesquisa de desempenho e características de carcaça de duas linhagens de tilápia na fase inicial e de crescimento, Boscolo et al. (2001) constataram maior ganho em peso, conversão alimentar e sobrevivência da linhagem Tailandesa (Chitralada) em relação à comum; porém, o rendimento de filé foi semelhante nas duas linhagens. Além disso, Tuan et al. (1998) e Leonhardt et al. (2006) também observaram o melhor ganho em peso da tilápia-do-nylo GIFT em relação às linhagens locais, do interior do Paraná, nas fases inicial e de crescimento.

O hormônio sintético 17α -metiltestosterona vem sendo rotineiramente usado para a masculinização de tilápia, visando à obtenção de populações monossexo (HIOTT E PHELPS, 1993; MAINARDES-PINTO et al., 2000; TACHIBANA et al., 2004; NEUMANN et al., 2009), e minimizar a reprodução natural nos tanques de criação. Por outro lado, há indicações que esse hormônio possa também ter um efeito anabolizante nos peixes (MOMMSEN e MOON, 2001) ou até mesmo prejudicial a saúde destes (GAYÃO, 2009).

Com base no exposto, o presente estudo teve como objetivo a comparação do desempenho produtivo de três linhagens de tilápia-do-nilo mais criadas na região Sudeste do país (Tailandesa, GIFT e “Supreme”), alimentadas com e sem adição do hormônio 17α -metiltestosterona, durante a fase inicial, em que acontece o processo de diferenciação sexual.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Instalações e condições experimentais

O experimento foi realizado no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos (LANOA) no Centro de Aqüicultura (CAUNESP), da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Jaboticabal, SP. O trabalho foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, constituído de seis tratamentos em esquema fatorial, caracterizado por três linhagens de tilápia (“Supreme”, GIFT e Tailandesa) e duas formas de alimentação (dieta comercial com e sem o hormônio andrógeno 17α -metiltestosterona – MT), com quatro réplicas cada. Desta forma, os tratamentos foram denominados pelas seguintes abreviações: S – tilápia “Supreme”, dieta sem 17α -Metiltestosterona; SM – “Supreme”, dieta com 17α -Metiltestosterona; G – GIFT, dieta sem 17α -Metiltestosterona; GM – GIFT, dieta com 17α -Metiltestosterona; T – Tailandesa, dieta sem 17α -Metiltestosterona; e TM – Tailandesa, dieta com 17α -Metiltestosterona.

As larvas das linhagens “Supreme” e Tailandesa foram estocadas em 16 tanques de polietileno com 100 L de água aerada e renovada continuamente, em uma densidade de 4 larvas.L⁻¹. A fase experimental teve duração de 29 dias, com início a partir do quarto dia após a eclosão. Tais linhagens apresentaram as seguintes médias de comprimento inicial e peso: “Supreme” ($9,6 \pm 0,5$ mm e $12,4 \pm 2,2$ mg) e Tailandesa ($10,2 \pm 0,5$ mm e $10,4 \pm 1,9$ mg). As larvas receberam dieta comercial farelada de boa qualidade contendo 56% de PB, seis vezes ao dia (8:00; 10:00; 12:00; 14:00; 16:00 e 18:00), seguindo os ajustes recomendados pelo fabricante em função da biomassa dos animais. A dieta não consumida e as fezes foram retiradas dos tanques por sifonamento diariamente uma hora após a quinta refeição, no final da tarde.

As larvas da linhagem GIFT foram oriundas de matrizes jovens de apenas 183 ± 50 g de peso médio. Por isso, iniciaram o experimento com menor tamanho e no terceiro dia após o início do tratamento, estas larvas apresentaram infestação por helmintos monogenóides o que ocasionou alta mortalidade e baixa ingestão de alimento. Estas larvas foram tratadas com solução de formalina a 10% (1ml.L⁻¹) e os peixes mortos foram substituídos por outros mantidos em estoque. Com isso, o estudo com as larvas da linhagem GIFT só começaram quando estavam com 11 dias de vida, momento em que a infestação pelo parasita foi controlada, e os peixes estavam com tamanho semelhante ($10,6 \pm 1,0$ mm e $14,7 \pm 5,2$ mg) ao das outras duas linhagens.

Durante o período experimental a temperatura da água foi averiguada diariamente às 8:00 e 18:00 horas, com o auxílio de um termômetro de mercúrio. A temperatura

média aferida no período foi de $29,1 \pm 0,5^\circ\text{C}$. A cada três dias monitoraram-se as variáveis de qualidade da água: concentração e porcentagem de saturação do oxigênio dissolvido (oxímetro YSI 550A), pH (peagômetro de campo Corning pH30), e condutividade (condutivímetro digital portátil Corning PS 17). O oxigênio dissolvido apresentou variações de $6,0 \pm 0,4 \text{ mg.L}^{-1}$ e $78,4 \pm 4,9\%$, o pH $8,1 \pm 0,1$, e a condutividade $232,6 \pm 36,6 \mu\text{S.cm}^{-1}$.

A água dos tanques foi coletada a cada sete dias, sempre antes da limpeza dos tanques e após a quinta refeição do dia, para a análise de amônia, nitrito, nitrato, e fósforo total, cujos valores foram $663,8 \pm 283,3 \mu\text{g.L}^{-1}$, $5,0 \pm 4,1 \mu\text{g.L}^{-1}$, $131,6 \pm 6,8 \mu\text{g.L}^{-1}$, $49,4 \pm 7,6 \mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente. Os parâmetros de qualidade da água estavam de acordo com aqueles recomendados para a criação de tilápia (KUBITZA, 2000).

2.2 Descrição da dieta comercial

A dieta comercial (0,8mm) utilizada foi mantida em refrigerador durante sua utilização. Sua composição básica apresentava farelo de glúten de milho, farelo de soja, milho integral moído, cloreto de sódio (sal comum), premix vitamínico mineral e farinha de peixe. De acordo com o fabricante, o conteúdo mínimo de proteína bruta, extrato etéreo e fósforo eram de 56, 5 e 8%, respectivamente. Para cálcio, matéria fibrosa e mineral a concentração máxima presente era de 1,5, 8 e 11%, respectivamente.

Para o acréscimo do hormônio andrôgeno na dieta comercial adicionou-se 60 mg do hormônio 17α -metiltosterona (valor esperado de pureza 97% a 103%) diluído em 0,5 L de álcool etílico ($92,8^\circ$) para cada quilograma da dieta. Em seguida, a mistura foi homogeneizada, seca ao ar livre, e estocada em refrigerador.

2.3 Avaliação do desempenho produtivo

Para avaliação do desempenho foram realizadas coletas no início e ao longo do experimento, no oitavo, 15, 22 e 29 dias, coletando-se 20 (5%) animais de cada réplica experimental, que foram fixadas em formol 10% e preservados em álcool 70%. Os animais amostrados foram eutanaziados com benzocaína, e tiveram o peso úmido, comprimento total, comprimento padrão, e altura mensurados individualmente, utilizando-se de paquímetro digital e balança analítica digital Chyo modelo JS-110 (precisão 0,0001g).

Ao final do experimento foram determinadas as taxas de sobrevivência em cada tratamento. A partir dos dados biométricos, a taxa de crescimento específico (TCE) foi calculada pela seguinte fórmula: $\text{TCE} = (\text{Ln peso final} - \text{Ln peso inicial}) \times 100 / \text{intervalo}$

de tempo (dias) entre biometrias. Também se calculou o ganho em peso total dos peixes durante todo o período experimental ($GP_{total} = P_{final} - P_{inicial}$).

2.4 Análise estatística

Os resultados de comprimento total, peso, altura, sobrevivência, taxa de crescimento específico e ganho em peso total foram analisados estatisticamente por meio da ANOVA (ZAR, 1999), considerando-se os resultados médios das réplicas de cada parcela experimental, usando o programa estatístico SAS versão 9.0 (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA).

Para os resultados que apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$), as médias foram estudadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Os dados de sobrevivência e taxa de crescimento específico foram transformados em $y = \arcsin \sqrt{x/100}$, onde x indica o valor da porcentagem da sobrevivência ou da taxa de crescimento específico, para posterior análise da variância. Todas as variâncias biométricas foram submetidas a testes para a verificação da normalidade (Cramer Von Mises) e homocedasticidade das variâncias (Brown and Forsythe).

2.5 Avaliação da homogeneidade dos animais

No final do experimento a partir dos dados da biometria final foram confeccionadas régua para separar todos os peixes remanescentes em classes de tamanho. O comprimento total foi usado para estabelecer as classes de tamanho, que tiveram amplitude definida com base no coeficiente de variação (CV) dos animais amostrados para a biometria.

A classe M foi resultado do valor médio do comprimento total (mm), com o acréscimo e subtração do valor do CV (em mm). As demais classes tiveram amplitude igual ao valor em mm do CV. Assim, estabeleceram-se cinco classes de tamanho: PP $< 15,9$ mm; $15,9$ mm $\leq P < 22,7$ mm; $22,7$ mm $\leq M < 36,3$ mm; $36,3$ mm $\leq G < 43,1$ mm; e GG $\geq 43,1$ mm. Além disso, foi calculado o coeficiente de variação para o comprimento total e peso dos animais dentro de cada tratamento no final da fase experimental.

2.6 Verificação da taxa de masculinização

Após a fase experimental os animais foram mantidos no laboratório por mais 60 dias, com a finalidade de atingir o tamanho apropriado para a realização da sexagem por meio da técnica do acetato de carmim (GUERRERO e SHELTON, 1974) e adaptada para juvenis de tilápia-do-nylo por Wassermann e Afonso (2002). Desta forma, 10% dos animais de cada classe de tamanho foram eutanaziados em água com gelo e, com auxílio de material cirúrgico, as gônadas foram extraídas e colocadas em lâmina histológica. Em seguida, foi corada com acetato de carmim a 45% e comprimida levemente com uma lamínula para observação direta em microscópio de luz.

Por meio da análise microscópica das lâminas foi determinada a proporção de sexos. Cada lâmina foi examinada sob microscópio de luz, objetiva de 10X e 40x. Segundo Afonso e Lebouté (1993) foram identificados os machos e as fêmeas dos grupos de acordo com a diferenciação morfológica das gônadas. Todos os peixes foram medidos e pesados para constatar que já havia ocorrido diferenciação sexual, pois conforme concluiu Makino (2005) a eficiência do diagnóstico do sexo está relacionada mais ao tamanho e peso das tilápias (acima de 3,0 cm e 0,5 g) do que propriamente à idade avaliada.

3 RESULTADOS

3.1 Desempenho e sobrevivência

A primeira avaliação biométrica foi realizada para verificar os valores médios iniciais de comprimento e peso no primeiro dia experimental. Observou-se que as linhagens apresentaram larvas de tamanhos diferentes e suas médias constituíram diferenças estatísticas significativas conforme demonstrado na Figura 1 A e B.

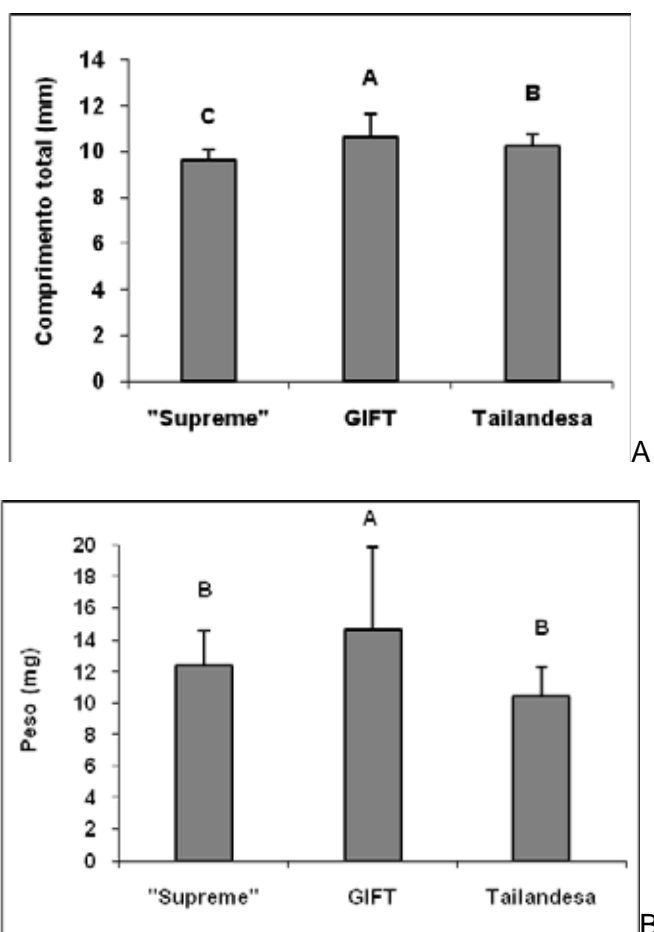


Figura 1. A) Comprimento total (mm) dos animais referente ao primeiro dia experimental. B) Peso (mg) dos animais no primeiro dia experimental. Peixes das linhagens Tailandesa e "Supreme" com 4 dias pós-eclosão e da linhagem GIFT com 11 dias pós eclosão. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0, 05$).

Os resultados das análises estatísticas para o comprimento total dos animais mostraram que após oito dias de experimento as larvas das diferentes linhagens não apresentaram diferença significativa (Tabela 1). Ao decorrer do experimento nota-se que a linhagem “Supreme” se destacou das demais, apresentando melhor resultado de comprimento total. Até o 22^o dia de experimento não houve efeito de interação da linhagem e do tratamento hormonal, assim como não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre animais tratados com e sem hormônio até este período.

Tabela 1. Valores médios (\pm d.p.) de comprimento total (mm) das linhagens de tilápia-do-nilo, no 8^o, 15^o e 22^o dias de experimento.

Estatística	Dias de experimento		
	8 ^o dia	15 ^o dia	22 ^o dia
Médias para linhagens:			
“Supreme”	13,92 \pm 0,63	19,38 \pm 0,75 a	25,23 \pm 1,04 a
GIFT	13,97 \pm 0,70	17,69 \pm 0,99 b	22,86 \pm 0,96 b
Tailandesa	13,52 \pm 0,45	17,97 \pm 0,74 b	21,56 \pm 0,75 c
C.V. (%)	4,39	3,05	4,26

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$). CV = Coeficiente de variação da ANOVA.

Ao final de 29 dias, observou-se interação dos fatores linhagem e tratamento hormonal ($p < 0,05$), em que a linhagem “Supreme” não diferiu da GIFT masculinizada, apresentando as maiores médias de comprimento total (Tabela 2). Observou-se ainda que entre os grupos masculinizados e não masculinizados, apenas dentro da linhagem GIFT houve diferença significativa para tal efeito.

Tabela 2. Valores médios (\pm d.p.) de comprimento total (mm) das linhagens de tilápia-do-nilo, no 29^o dia de experimento, com dieta contendo ou não o hormônio masculinizante.

Linhagens	Dieta	
	Sem hormônio	Com hormônio
“Supreme”	34,43 \pm 1,12 Aa	31,81 \pm 1,95 Aa
GIFT	28,67 \pm 0,58 Bb	31,35 \pm 0,72 Aa
Tailandesa	25,38 \pm 2,65 Ba	26,19 \pm 2,07 Ba

Médias seguidas da mesma letra, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

Diferentemente do comprimento total, o peso dos animais no 8º dia diferiu entre as linhagens “Supreme” e Tailandesa (Tabela 3). Até o 22º dia não se verificou efeito significativo ($p > 0,05$) da interação entre linhagem e tratamento hormonal. Nesse período, a linhagem “Supreme” destacou-se com as maiores médias de peso, seguida pela linhagem GIFT e pela linhagem Tailandesa, com as menores médias.

Tabela 3. Valores médios (\pm d.p.) de peso (mg) das linhagens de tilápia-do-nylo, no 8º, 15º e 22º dias de experimento.

Estatística	Dias de experimento		
	8º dia	15º dia	22º dia
Médias para linhagens:			
“Supreme”	41,2 \pm 4,5 a	122,2 \pm 13,9 a	277,9 \pm 43,1 a
GIFT	42,6 \pm 6,0 ab	91,5 \pm 17,1 b	231,6 \pm 23,3 b
Tailandesa	35,4 \pm 3,0 b	91,5 \pm 11,7 b	176,0 \pm 19,6 c
C.V. (%)	12,22	14,26	14,04

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$). CV = Coeficiente de variação da ANOVA.

Condizendo com os resultados de comprimento total, também no 29º dia houve efeito da interação dos fatores linhagem e tratamento hormonal ($p < 0,05$). A linhagem “Supreme” apresentou médias de peso superiores as médias da linhagem Tailandesa, embora tenha sido semelhante a linhagem GIFT (Tabela 4). As larvas da linhagem “Supreme” não masculinizadas apresentaram as maiores médias de peso, diferindo estatisticamente entre os tratamentos sem e com hormônio na dieta.

Tabela 4. Valores médios (\pm d.p.) de peso (mg) das linhagens de tilápia-do-nylo, no 29º dia de experimento, com dieta contendo ou não o hormônio masculinizante.

Linhagens	Dieta	
	Sem hormônio	Com hormônio
“Supreme”	781,5 \pm 36,1 Aa	601,7 \pm 92,1 Ab
GIFT	469,0 \pm 22,8 Ba	617,4 \pm 59,6 Aa
Tailandesa	344,3 \pm 87,6 Ba	311,4 \pm 68,0 Ba

Médias seguidas da mesma letra, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

Os resultados das análises estatísticas da altura dos animais apresentaram tendência semelhante aos resultados de comprimento total. As larvas das três linhagens estudadas não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) no início do experimento (Tabela 5). Com o decorrer do experimento maiores médias de altura foram observadas na linhagem “Supreme”.

Tabela 5. Valores médios (\pm d.p.) de altura (mm) das linhagens de tilápia-do-nylo, no 8º, 15º e 22º dias de experimento.

Estatística	Dias de experimento		
	8º dia	15º dia	22º dia
Médias para linhagens:			
“Supreme”	3,39 \pm 0,20	6,65 \pm 0,25 a	6,65 \pm 0,35 a
GIFT	3,22 \pm 0,18	6,09 \pm 0,08 b	6,09 \pm 0,28 b
Tailandesa	3,22 \pm 0,15	5,47 \pm 0,17 b	5,46 \pm 0,25 c
C.V. (%)	5,19	3,99	5,19

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$). CV = Coeficiente de variação da ANOVA.

Ao final do experimento (29º dia) observou-se interação dos fatores linhagem e tratamento hormonal ($p < 0,05$), em que a linhagem “Supreme” não diferiu da GIFT masculinizada, apresentando as maiores médias de altura (Tabela 6). Observou-se ainda que dentro da linhagem “Supreme”, os tratamentos sem e com hormônio diferiram significativamente.

Tabela 6. Valores médios (\pm d.p.) de altura (mm) das linhagens de tilápia-do-nylo, no 29º dia de experimento, com dieta contendo ou não o hormônio masculinizante.

Linhagens	Dieta	
	Sem hormônio	Com hormônio
“Supreme”	9,83 \pm 0,8 Aa	8,41 \pm 0,7 Ab
GIFT	7,62 \pm 0,2 Ba	8,25 \pm 0,2 Aa
Tailandesa	6,59 \pm 0,9 Ba	6,65 \pm 0,5 Ba

Médias seguidas da mesma letra, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

A taxa de crescimento específico (TCE) em peso dos animais não apresentou efeito de interação dos fatores linhagem e hormônio ($p > 0,05$) no primeiro intervalo de avaliação (0-7 dias). Nesse período as linhagens “Supreme” e Tailandesa apresentaram médias de TCE superiores, $17,8 \pm 1,1\%.\text{dia}^{-1}$ e $17,7 \pm 0,9\%.\text{dia}^{-1}$, respectivamente, diferindo da linhagem GIFT, $14,4 \pm 1,3\%.\text{dia}^{-1}$. No segundo período avaliado (8-14 dias), as linhagens “Supreme” e Tailandesa apresentaram médias superiores, mas apenas dentro da linhagem Tailandesa houve diferença estatística entre o grupo não masculinizado e masculinizado.

Tabela 7. Valores médios (\pm d.p.) de TCE ($\%.\text{dia}^{-1}$) em peso das linhagens de tilápia-do-nilo, no intervalo entre 8-14 dias de experimento, com dieta contendo ou não o hormônio masculinizante.

Linhagens	Dieta	
	Sem hormônio	Com hormônio
“Supreme”	$15,3 \pm 0,3$ Aa	$16,3 \pm 0,4$ Aa
GIFT	$12,1 \pm 1,7$ Ba	$11,4 \pm 1,4$ Ba
Tailandesa	$11,7 \pm 0,9$ Bb	$15,4 \pm 1,0$ Aa

Médias seguidas da mesma letra, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

Entre 15-21 dias as médias de TCE não apresentaram efeito de interação dos fatores linhagem e hormônio ($p > 0,05$) e as linhagens “Supreme” ($12,2 \pm 0,9\%.\text{dia}^{-1}$) e GIFT ($12,7 \pm 1,0\%.\text{dia}^{-1}$) apresentaram taxas estatisticamente superiores a linhagem Tailandesa ($9,9 \pm 2,1\%.\text{dia}^{-1}$). No período final (22-29 dias) verificou-se que a linhagem “Supreme”, em ambos os tratamentos com e sem hormônio, e as linhagem GIFT e Tailandesa tratadas com hormônio apresentaram médias superiores do que os demais tratamentos (Tabela 8). E, diferentemente do período (8-14 dias), tanto na linhagem Tailandesa quanto na GIFT houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos não masculinizado e masculinizado.

Tabela 8. Valores médios (\pm d.p.) de TCE ($\%.\text{dia}^{-1}$) em peso das linhagens de tilápia-do-nilo, no intervalo entre 22 e 29 dias de experimento, com dieta contendo ou não o hormônio masculinizante.

Linhagens	Dieta	
	Sem hormônio	Com hormônio
“Supreme”	14,5 \pm 2,0 Aa	11,5 \pm 0,6 Aa
GIFT	10,9 \pm 0,6 Ba	12,5 \pm 1,5 Aa
Tailandesa	9,5 \pm 1,7 Bb	10,9 \pm 0,5 Aa

Médias seguidas da mesma letra, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

Ao avaliar o ganho em peso total dos animais, observou-se que os tratamentos com a linhagem “Supreme”, com e sem hormônio, e a linhagem GIFT masculinizada apresentaram médias superiores aos demais. Não se verificou diferença ($p > 0,05$) entre os grupos não masculinizados e masculinizados dentro da linhagem Tailandesa. Por outro lado, na linhagem GIFT, os animais do tratamento com hormônio apresentaram ganho em peso maior do que aqueles que não passaram pela masculinização (Figura 5).

Tabela 9. Valores médios (\pm d.p.) de ganho em peso (mg) das linhagens de tilápia-do-nilo que receberam dieta contendo ou não o hormônio masculinizante, durante o experimento (29dias).

Linhagens	Dieta	
	Sem hormônio	Com hormônio
“Supreme”	769,2 \pm 36,1 Aa	589,4 \pm 92,1 Ab
GIFT	460,3 \pm 22,8 Bb	608,8 \pm 59,6 Aa
Tailandesa	333,9 \pm 87,6 Ba	321,0 \pm 68,0 Ba

Médias seguidas da mesma letra, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

Os resultados das médias de sobrevivência foram influenciados pela linhagem cultivada (Figura 2). Observou-se que a linhagem “Supreme” (90,4 \pm 4,8%) foi a que apresentou maiores médias de sobrevivência, diferindo estatisticamente das demais. Não foi verificado efeito da interação dos fatores linhagem e tratamento hormonal ($p > 0,05$).

para a sobrevivência. As linhagens GIFT ($63,3 \pm 10,8\%$) e Tailandesa ($72,2 \pm 6,0\%$) não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) das médias de sobrevivência.

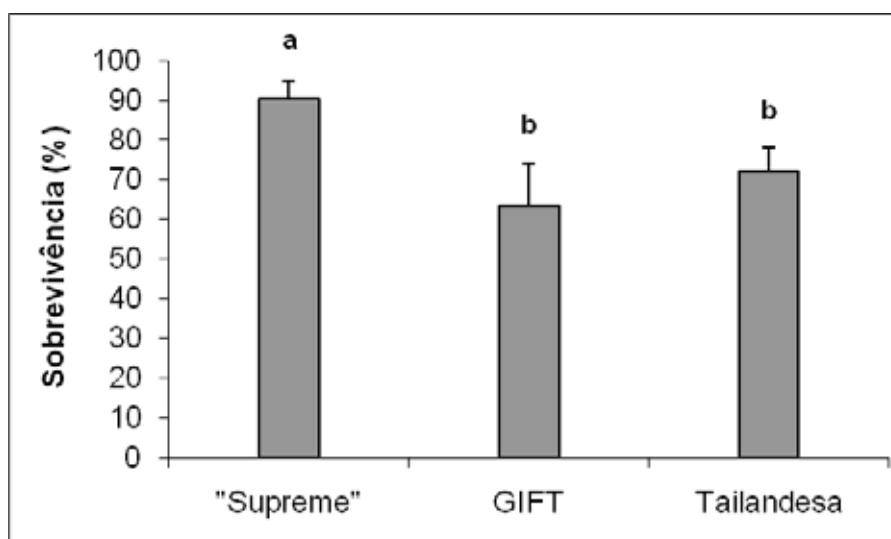


Figura 2. Taxas médias de sobrevivência dos juvenis de tilápia no fim da fase experimental. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Homogeneidade dos animais

A linhagem “Supreme” apresentou, tanto os masculinizados como os não masculinizados, cerca de 90 % dos animais distribuídos nas classes de tamanho M e G (Figura 3). Todos os animais de cada réplica dos tratamentos desta linhagem foram agrupados em apenas quatro classes (P, M, G e GG), diferentemente dos tratamentos com as demais linhagens que tiveram seus animais agrupados em cinco classes de tamanho, com peixes de tamanho PP.

Os peixes da linhagem “Supreme” constituíram um grupo mais uniforme, visto que os tratamentos sem e com hormônio tiveram coeficiente de variação (CV) para comprimento total de 14,9 e 18,6 % e para peso 41,5 e 52,8%, respectivamente. Devido à maior variação, o peso geralmente apresenta elevados valores de CV. Assim, os demais tratamentos apresentaram os seguintes valores de CV para comprimento total e peso: 25,1 e 80,6 % (GIFT, sem hormônio); 27,0 e 88,8 % (GIFT, com hormônio); 22,9 e 63,3 % (Tailandesa, sem hormônio); 21,3 e 71,9 % (Tailandesa, com hormônio).

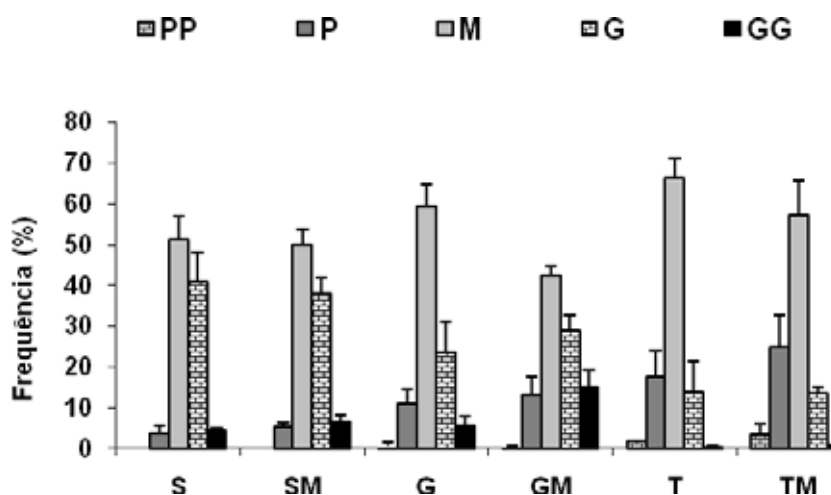


Figura 3. Frequência dos animais nas classes de tamanho: PP (<15,9 mm); P (15,9-22,7 mm); M (22,7-36,3 mm); G (36,3-43,1 mm); e GG (>43,1 mm), ao fim da fase experimental. S: “Supreme”, dieta sem hormônio; SM: “Supreme”, dieta com hormônio; G: GIFT, dieta sem hormônio; GM: GIFT, dieta com hormônio; T: Tailandesa, dieta sem hormônio; e TM: Tailandesa, dieta com hormônio.

Taxa de masculinização

A linhagem “Supreme” teve a maior proporção de machos (Figura 4), apresentando uma taxa de masculinização de 99,2%. A linhagem GIFT apresentou taxa de 98,5% e a Tailandesa 97,3%. A menor taxa de masculinização na linhagem Tailandesa foi encontrada nos animais da classe PP, indica que ao fim da fase experimental estes animais ingeriram menor quantidade da dieta com o hormônio 17α -metiltestosterona. O mesmo pode ser observado com os animais da linhagem GIFT da classe P.

Em relação aos tratamentos que não receberam dieta com o hormônio andrógeno, observou-se que as linhagens GIFT e Tailandesa apresentaram baixa proporção de animais machos nas populações estudadas, 29,2 e 18,5%, respectivamente. Diferentemente, a linhagem “Supreme” apresentou maior proporção de machos (58,5%). Observa-se ainda que, dentro das classes de tamanho maiores (G e GG) mais de 65% dos animais eram machos, enquanto que os animais menores apresentam maior proporção de fêmeas.

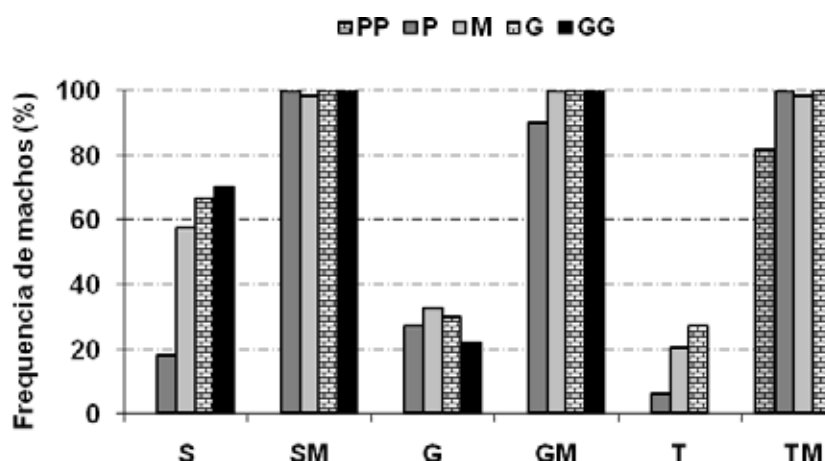


Figura 4. Frequência de machos verificados em cada classe de tamanho, ao fim da fase experimental. S: “Supreme”, dieta sem hormônio; SM: “Supreme”, dieta com hormônio; G: GIFT, dieta sem hormônio; GM: GIFT, dieta com hormônio; T: Tailandesa, dieta sem hormônio; e TM: Tailandesa, dieta com hormônio.

4 DISCUSSÃO

O experimento teve início com larvas de tilápia-do-nilo das linhagens “Supreme”, Tailandesa, com quatro dias pós-eclosão, e GIFT com 11 dias pós-eclosão. Estas apresentaram comprimento e peso que diferiram estatisticamente. Segundo Rana (1990), o tamanho dos ovos e das larvas pós-eclosão varia de acordo com a idade das matrizes. No presente trabalho as matrizes das linhagens “Supreme” e Tailandesa apresentaram médias de peso aproximadas, 656 ± 121 g e 595 ± 193 g, respectivamente. As larvas da linhagem GIFT foram oriundas de matrizes jovens, de apenas 183 ± 50 g de peso médio e, por isso, aos 4 dpe estavam bem menores do que as larvas das outras duas linhagens. Além disso, estas larvas sofreram infestação por parasitos o que causou atraso no seu crescimento inicial, o que forçou a comparação de desempenho com as demais linhagens somente a partir do 11 dpe, quando já se apresentaram sadias e com tamanho aproximado das outras linhagens aos 4 dpe.

Vieira et al. (2005) ao estudar as linhagens “Supreme”, GIFT e “Bouaké” em fase posterior à masculinização, utilizaram animais “Bouaké” com peso inicial significativamente maior que os demais. Mesmo com esta diferença no início do experimento, os autores observaram que esta linhagem apresentou o menor peso final, resultando no menor ganho em peso. As maiores médias de ganho em peso, comprimento total e comprimento padrão foram verificados nos peixes da linhagem “Supreme”.

Já na primeira avaliação após o início do experimento (8^o dia), não se observou diferença significativa do comprimento total das larvas das três linhagens. Mesmo com a variação no tamanho inicial das larvas, no 8^o dia as médias de TCE foram iguais estatisticamente entre as linhagens “Supreme” e Tailandesa. Já os animais da GIFT apresentaram médias de TCE significativamente inferiores, demonstrando um crescimento menor no 8^o dia.

No fim da fase experimental os resultados de comprimento total mostraram interação dos fatores linhagem e tratamento hormonal. Os peixes da linhagem “Supreme” não diferiram da GIFT masculinizada, apresentando as maiores médias de comprimento total. O mesmo efeito de interação dos fatores foi encontrado para as médias de peso e altura no 29^o dia, mas desta vez a linhagem (S e SM) destacou-se com as maiores médias, seguida pela linhagem GIFT. O mesmo foi observado por Massago (2007) com animais acima de 1g, que ao comparar as médias do peso e comprimento padrão, verificou que as linhagens “Supreme” e GIFT apresentaram o peso final maior (133,20g e 121,46g, respectivamente), seguido da Tailandesa (112,89g) e da “Bouaké” (98,83g).

Santos et al. (2006) concluíram que as linhagens “Supreme” e Tailandesa apresentam diferentes padrões de crescimento relativo dos componentes do corpo em relação ao peso corporal para carcaça, pele, filé sem pele e resíduos da filetagem. Com isso tornam-se necessários estudos comparativos entre as linhagens durante a fase de terminação, para avaliações morfométricas e de rendimento de filé. Na fase estudada pela presente pesquisa a altura dos peixes da linhagem “Supreme” foi maior do que os da linhagem Tailandesa, assim como o componente morfométrico do comprimento padrão.

No presente estudo a linhagem Tailandesa apresentou as menores médias de comprimento total, peso e altura, diferente do observado por Boscolo et al. (2001). Porém, os autores compararam o crescimento da linhagem Tailandesa com a tilápia comum (peso inicial acima de 2g), demonstrando que esta linhagem apresenta vantagens em relação à comum, provavelmente devido ao histórico de domesticação que tem passado desde a década de 40. Entretanto, as outras linhagens que passaram por melhoramento genético mais intenso (“Supreme” e GIFT) demonstram claramente vantagens de crescimento em relação à Tailandesa.

Ao comparar o ganho em peso, conversão alimentar e sobrevivência da linhagem GIFT com a “FaST” e “Ismaelia” (original do Kuwait, e não melhorada geneticamente) entre um período de crescimento de 20g a 250g, Ridha (2006) observou que as linhagens GIFT e “FaST” não apresentaram diferenças significativas entre si, mas ambas demonstraram melhores taxas de crescimento e conversão alimentar do que a “Ismaelia”. Estes resultados mostram que o processo de desenvolvimento das linhagens melhoradas geneticamente vem sendo efetivo.

O ganho em peso da linhagem Tailandesa também foi o menor comparado às outras linhagens aqui estudadas. Diferentemente, Tachibana et al. (2004), ao comparar o desempenho das linhagens Tailandesa, “Santa Catarina”, “Cesp”, e “Pernambuco” verificaram que as duas primeiras apresentaram os melhores resultados de comprimento total, TCE e ganho em peso durante o período de masculinização. Nesta mesma linha, comparando a linhagem Tailandesa com outras, Romana-Eguia e Eguia (1999), Zanoni et al. (2000), Boscolo et al. (2001) e Wagner et al. (2004) caracterizaram o melhor desempenho produtivo dessa linhagem. Estes estudos comprovaram o melhor desempenho da linhagem Tailandesa perante as outras que foram mais recentemente domesticadas, ou que ainda são consideradas selvagens.

Dan e Little (2000) compararam o desempenho das linhagens GIFT, Tailandesa e “Vietnamita”. Para isto utilizaram animais masculinizados e não masculinizados com peso inicial a partir de 9 g. Os autores verificaram que a linhagem GIFT, de ambos os tratamentos masculinizados e não masculinizados, atingiu um peso final ($387,7 \pm 21,0$ g em viveiros escavados e $410,6 \pm 35,1$ g em tanques) significativamente superior as

demais. Estes resultados assemelham-se aos obtidos aqui, pois a linhagem GIFT também apresentou melhor desempenho que a linhagem Tailandesa no período de masculinização, fase anterior à estudada pelos autores.

Aprofundando mais os estudos com os animais GIFT, Ng e Hanin (2007) compararam esta linhagem com híbridos da tilápia vermelha alimentados com dois níveis de proteína. Observaram que a linhagem GIFT apresentou maior crescimento, melhor conversão alimentar e maior valor de proteína corporal. Em outro estudo com essa linhagem Sifa et al. (2002) comparou-a com outras duas (“Sudan 78”, “Egypt 88”) e verificaram que os animais começaram a morrer quando a temperatura da água atingiu 11°C. Pelos resultados da dose letal (DL₅₀) para baixas temperaturas os autores sugeriram que a linhagem GIFT foi a menos tolerante, afirmando que isto tem implicações importantes para a aplicação de organismos geneticamente melhorados em climas frios, quando estes são desenvolvidos em regiões mais quentes, evidenciando a diferença de expressão do potencial genético das linhagens em cada ambiente.

Os resultados das médias de sobrevivência foram influenciados pela linhagem cultivada. No trabalho realizado por Wagner et al. (2004), constataram-se taxas de sobrevivência para duas gerações da linhagem Tailandesa que variaram entre 72 e 87% para animais com peso inicial de 310mg até atingirem 9g. Boscolo et al. (2001), trabalhando com animais a partir de 2g, obtiveram altas taxas de sobrevivência para a linhagem Tailandesa (96%).

Verificou-se que os tratamentos com a Tailandesa apresentaram taxas de sobrevivência de $72,2 \pm 6,0\%$. Estes resultados são inferiores às taxas de sobrevivência de 88,1% documentadas por Tachibana et al. (2004) para a linhagem GIFT durante a masculinização. Mesmo assim, os resultados de sobrevivência aqui encontrados estão de acordo com a taxa de sobrevivência de 70% a 80%, proposta como normal para o período de masculinização por Popma e Lovshin (1996).

A linhagem que apresentou as maiores taxas de sobrevivência foi a “Supreme”, tanto para o tratamento sem e com hormônio, com valores semelhantes às linhagens santa Catarina e GIFT estudadas por Tachibana et al. (2004). As menores médias de sobrevivência final foram observadas na linhagem GIFT, mesmo substituindo as larvas que morreram devido a infestação por monogenia. A maior mortalidade no tratamento com a linhagem GIFT masculinizada pode ter influenciado as elevadas médias de comprimento total, peso, TCE e ganho em peso, já que nesse tratamento os animais ficaram menos adensados.

Na mesma linha de pesquisa, Massago (2007) avaliou o desempenho de diferentes linhagens cultivadas após a reversão sexual (> 1 g) por um período de 112 dias. O autor demonstrou no final do seu experimento que a linhagem “Supreme”

apresentou ganho em peso 34,8%, 18,0% e 9,7% superior quando comparadas às linhagens “Bouaké”, Tailandesa e GIFT, respectivamente. Em relação à sobrevivência, seus resultados para a linhagem “Supreme” ($90,1 \pm 7,1$ %) foram semelhantes aos obtidos aqui ($90,2 \pm 4,8$ %).

A origem das linhagens “Supreme” e GIFT foi a mesma, mas a partir de 1999 duas empresas diferentes continuaram o seu melhoramento genético e o desenvolvimento das duas ocorreu de forma independente (ZIMMERMANN, 2003). A GENOMAR desenvolveu a linhagem “Supreme” visando melhora na conversão alimentar, ganho em peso e rendimento de filé. Dessa forma, verificou-se que durante a fase de masculinização o desempenho dessa linhagem foi superior as linhagens GIFT e Tailandesa, tanto nos animais que receberam dieta com e sem o hormônio andrógeno.

No fim do experimento os animais da linhagem “Supreme” foram agrupados em apenas quatro classes, diferentemente dos tratamentos das demais linhagens que tiveram seus animais agrupados em cinco classes de tamanho, incluindo a menor (PP). A classificação dos animais junto com os menores valores do coeficiente de variação (CV) comparados as demais linhagens sugerem que a linhagem “Supreme” constituiu um grupo mais homogêneo, devido à menor variação de tamanho. Segundo Volpato et al. (1989) o crescimento heterogêneo entre larvas e juvenis de tilápia-do-nylo é uma característica comum, relacionada ao estabelecimento de hierarquias entre os peixes, com poucos animais grandes e muitos pequenos. Deste modo, os índices de crescimento das larvas de tilápia ao final do período de masculinização podem apresentar uma grande variação e no caso da linhagem “Supreme” a menor variação de tamanho pode estar relacionado com o melhoramento genético dessa linhagem.

As taxas de masculinização foram de 99,2, 98,5 e 97,3%, nas linhagens “Supreme”, GIFT e Tailandesa, respectivamente. Ao destacar a eficiência do tratamento com 17α -metiltestosterona na indução de masculinização em tilápia-do-nylo, Popma e Green (1990), Popma e Lovshin (1994) e Green et al. (1997) concluíram que a administração oral de 30 a 60 mg.kg^{-1} de metiltestosterona durante um período de 3 a 4 semanas produz populações compostas por mais de 95% de machos. Tais taxas de masculinização aqui obtidas estão de acordo com as usualmente encontradas.

Ainda, observou-se que a menor taxa de masculinização na linhagem Tailandesa foi na classe de tamanho PP, sugerindo que ao fim da fase experimental estes animais ingeriram menor quantidade da dieta com o hormônio 17α -metiltestosterona. O mesmo pode ser observado com os animais da linhagem GIFT classificados como P.

Nos tratamentos em que não foi fornecida dieta com hormônio, observou-se que as linhagens GIFT e Tailandesa apresentaram baixa proporção de animais machos nas populações estudadas, 29,2 e 18,5%, respectivamente. Diferentemente, a linhagem

“Supreme” apresentou no total maior proporção de machos (58,5%). Uma vez que, as condições ambientais foram as mesmas para os animais que foram ou não submetidos à masculinização, pode-se sugerir que a maior proporção de fêmeas nas linhagens GIFT e Tailandesa pode estar relacionada a características intrínsecas das linhagens.

5 CONCLUSÕES

A linhagem “Supreme” apresenta melhores respostas de desempenho produtivo, homogeneidade e sobrevivência durante a fase de masculinização, quando comparada com as linhagens GIFT e Tailandesa;

A masculinização, por meio da adição de 17α -metilttestosterona, interfere nas respostas de desempenho produtivo de larvas de tilápia-do-nilo e essas respostas são diferentes entre as linhagens;

A proporção de machos e fêmeas, em animais que não passaram pela masculinização, pode depender de vários fatores e no caso estudado sugere certa relação com a linhagem utilizada, necessitando de maiores estudos nesse sentido.

6 REFERÊNCIAS

AFONSO, L. O. B.; LEBOUTE, E. M. Método para sexagem visual de alevinos de tilápia nilótica, *Oreochromis niloticus*. In: ENCONTRO RIO GRANDENSE DE TÉCNICOS EM AQUICULTURA, 4, Porto Alegre, RS. **Anais...** p. 100-3. 1993.

BOSCOLO, W. R.; HAYASHI, C.; SOARES, C. M.; FURUYA, W. M.; MEURER F. Desempenho e características de carcaça de machos revertidos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagens “Tailandesa” e comum, nas fases inicial e de crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 30, n. 5, p. 1391-1396, 2001.

BRASIL, 2010. Planos e Políticas: Mais Pesca e Aquicultura. Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/#planos_e_politicas/mais-pesca-aquicultura>. Acesso em: 26 out. 2010.

CARVALHO, E.D.; FORESTI, F. Reversão de sexo em tilápias do Nilo, *Oreochromis niloticus* Trewas, 1983, induzida por 17 α -metiltestosterona: proporção de sexo e histologia das gônadas, **Revista Brasileira de Biologia**, São Carlos, v. 56, n. 2, p. 249-262, 1996.

DAN, N. C.; LITTLE, D. C. The culture performance of monosex and mixed-sex newseason and overwintered fry in three strains of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in northern Vietnam. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 184, n. 3-4, p. 221-231, 2000.

GAYÃO A. L. B. A. **Nutrição e reversão sexual de tilápia-do-nilo: parâmetros produtivos e estrutura do fígado**. 2009. 100 f. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.

GREEN, B.W.; VEVERICA, K.L.; FITZPATRICK, M.S. Fry and fingerling production. In: Eгна, H.S. e Boyd, C.E. (Eds.). **Dynamics of Pond Aquaculture**. Boca Raton: CRC Press, 1997. p. 215–243

GUERRERO, R. D.; SHELTON, W. L. An aceto-carmin squash Method for sexing juvenile fish. **Progressive Fish-Culturist**, Washington, v. 36, n. 1, p. 56, 1974.

HAYASHI, C. Breves considerações sobre as tilápias. In: RIBEIRO, R. P.; HAYASHI, C; FURUYA, W.M. (Eds.). **Curso de piscicultura**. Criação racional de tilápias. Maringá, 1995. p.4.

HIOTT, A. E.; PHELPS, R. P. Effects of initial age and size on sex reversal of *Oreochromis niloticus* fry using methyltestosterone. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 112, n. 4, 301-308, 1993.

KUBITZA, F. **Tilápia: Tecnologia e Planejamento na Produção Comercial**. 1.ed. Jundiaí, SP: F. Kubitza, 2000. 285 p.

LEONHARDT, J. H.; FILHO, C. M.; FROSSARD, H.; MORENO, A. M. Características morfométricas, rendimento e composição do filé de tilápia do nilo, *Oreochromis niloticus*, da linhagem "Tailandesa", local e do cruzamento de ambas. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 27, n. 1, p. 125-132, 2006.

MACINTOSH, D.J., LITTLE, D.C. Nile tilapia - *Oreochromis niloticus*. In: BROMAGE, N.R., ROBERTS, R.J. (Eds.). **Broodstock management and egg and larval quantity**. Stirling: Institute of Aquaculture, University of Stirling, 1995. cap 12. p. 277-320.

MAINARDES-PINTO, C. S. R.; FENERICH-VERANI, N.; DE CAMPOS, B. E. S.; DA SILVA, A. L. Masculinização da Tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, Utilizando Diferentes Rações e Diferentes Doses de 17 α -Metiltestosterona, **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 29, n. 3, p. 654-659, 2000.

MAKINO, L. C. **Validação dos métodos de identificação do sexo em tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1757), Revertidas com rações contendo diferentes granulometrias e de diferentes idades**. 2005. 33 f. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aqüicultura, Jaboticabal, 2005.

MASSAGO, H. **Desempenho de alevinos de quatro linhagens da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e análise da variabilidade genética pelos marcadores RAPD**. 2007. 40 f. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, Jaboticabal, 2007.

MOMMSEN, T.; MOON, T. W. Hormonal regulation of muscle growth. In: JOHNSTON, I. A. (Ed.). **Muscle development and growth**, London: Academic Press, 2001. 318 p.

NEUMANN, E., DIAS-KOBERSTEIN, T. C. R., BRAGA, F. M. S. Desempenho de três linhagens de tilápia submetidas ao tratamento com 17 α -metiltestosterona em condições ambientais não controladas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 38, n. 6, p. 973-979, 2009.

NG, W-K.; HANIN, R. Performance of genetically improved Nile tilapia compared with red hybrid tilapia fed diets containing two protein levels. **Aquaculture Research**. Oxford, v. 38, p.965-972, 2007.

POPMA, T.J.; GREEN, B.W. **Aquacultural production manual: Sex reversal of tilapia in earthen ponds**. Auburn: Auburn University, 1990. p. 15.

POPMA, T.J.; LOVSHIN, L.L. **Worldwide prospects for commercial production of tilapia**. Auburn: Auburn University, 1994. p. 40.

RANA, K. J. The influence of maternal age and delayed initial feeding on the survival and growth of previously unfed *O.niloticus* (L.) and *O. Mossambicus* (Peters) fry. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 91, p. 295-310. 1990.

RIDHA, M. Evaluation of growth performance of nonimproved and improved strains of the Nile tilapia (L.), *Oreochromis niloticus*. **Journal of the World Aquaculture Society**. v. 37, n. 2. 2006.

ROMANA-EGUIA, M. R. R.; DOYLE, R. W. Genotype-environment interaction in the response of three strains of Nile tilapia to poor nutrition. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 108, n. 2, p. 1-12, 1992.

SANTOS, V. B.; FREATO, T. A.; FREITAS, R. T. F.; LOGATO, P. V. R. Crescimento relativo e coeficientes alométricos de componentes do corpo de linhagens de tilápias-domílo (*Oreochromis niloticus*). **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 7, n. 4, p. 357-364, 2006.

SANTOS, V. B.; YOSHIHARA, E.; FREITAS, R. T. F.; NETO, R. V. R. Exponential growth model of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) strains considering heteroscedastic variance. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 274, p 96–100. 2008.

SIFA, L.; CHENHONG, L.; DEY, M.; GAGALAC, F.; DUNHAM, R. Cold tolerance of three strains of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, in China. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 213, p. 123–129, 2002.

TACHIBANA, L.; CASTAGNOLLI, N.; PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M.; VALLE, J. B.; SIQUEIRA, M. R. Desempenho de diferentes linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) na fase de reversão sexual. **Acta Scientiarum: Animal Sciences**, Maringá, v. 26, n. 3, p. 305-311, 2004.

TUAN, P. A.; LITTLE, D. C.; MAIR, G. C. Genotypic effects on comparative growth performance of all-male tilapia *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 159, n. 3-4, p. 293-302, 1998.

VIEIRA, V. P.; RIBEIRO, R. P.; MOREIRA, H. L. M.; POVH, J. A.; VARGAS, L.; BARRERO, N. M. L. Avaliação do desempenho produtivo de linhagens de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) Em Maringá-PR. **Revista Acadêmica**, Curitiba, v.3, n.3, p. 19-26, 2005.

VOLPATO, G.L.; FRIOLI, P.M.A.; CARRIERI, M.P. Heterogeneous growth in fish: some data in the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* and a general view about the causal mechanisms. **Boletim de Fisiologia Animal**, v.13, p.7-22, 1989.

WAGNER, P. M.; RIBEIRO, R. P.; MOREIRA, H. L. M.; VARGAS, L.; POVH, J. A. Avaliação do desempenho produtivo de linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em diferentes fases de criação. **Acta Scientiarum: Animal Sciences**, Maringá, v. 26, n. 2, p. 187-196, 2004.

WASSERMANN, G. J.; AFONSO, L. O. B. Validation of the aceto-carmin technique for evaluating phenotypic sex in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 1, p. 113-139, 2002.

ZANONI M. A.; FILHO, M. C.; LEONHARDT, J. L. Performance de crescimento de diferentes linhagens de tilápia-donilo, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1757), em gaiolas. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 22, n. 3, p. 683-687, 2000.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. Editora prentice - Hall, 1999. 930 p.

ZIMMERMANN, S. Um moderno instrumental genético no melhoramento e na rastreabilidade de tilápias nilóticas. **Panorama da Aqüicultura**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 76, p. 69, 2003.

CAPÍTULO 3. EFEITO DA 17 α -METILTESTOSTERONA SOBRE AS CARACTERÍSTICAS MORFOMÉTRICAS E DE EXPRESSÃO GÊNICA DE FATORES QUE REGULAM O CRESCIMENTO MUSCULAR EM DUAS LINHAGENS DE TILÁPIA-DO-NILO.

RESUMO

Este estudo avaliou o efeito do hormônio andrógeno sintético 17 α -metiltestosterona (MT) sobre as características morfométricas e de expressão gênica do tecido muscular em duas linhagens de tilápia-do-nilo. Além disso, comparou-se o crescimento muscular entre as linhagens (“Supreme”, com peso inicial de 12,4 \pm 2,0 mg, e Tailandesa, com peso inicial de 10,4 \pm 1,9 mg) durante o processo de masculinização. O trabalho foi conduzido em esquema fatorial (duas dietas com e sem hormônio X duas linhagens), constituído por quatro tratamentos com quatro réplicas de cada, por 29 dias. As larvas foram estocadas na densidade de 4 larvas.L⁻¹ e receberam dieta comercial farelada (56% de PB), em seis arraçoamentos diários. Amostras para avaliação morfométrica (n = 8 indivíduos por tratamento) foram coletadas aos 4, 19 e 33 dias pós-eclosão (dpe). Mensurou-se o diâmetro e a área de 200 fibras musculares para cada amostra, que foram distribuídas nas seguintes classes de diâmetro: 10 (D \leq 10 μ m), 20 (10 < D \leq 20 μ m), 30 (20 < D \leq 30 μ m), 40 (30 < D \leq 40 μ m) e 50 (D > 40 μ m). As análises de expressão gênica da MyoD e Miogenina foram realizadas por PCR em tempo real, com uma amostragem aos 4 dpe e outra aos 33 dpe. A linhagem “Supreme” apresentou melhor desempenho, caracterizado tanto pelo crescimento do diâmetro das fibras (hipertrofia) e também pela alta frequência de fibras em formação (diâmetro < 20 μ m). A expressão dos genes da MyoD e miogenina para a linhagem Tailandesa não mostrou diferença significativa entre os peixes tratados ou não com a MT. Foi verificada maior frequência de fibras de maior diâmetro nos tratamentos com MT, mas essa tendência não acompanhou o aumento em peso dos animais. Tal fato sugere um possível efeito prejudicial do hormônio à saúde dos peixes.

Palavras chave: *Oreochromis niloticus*, masculinização, hormônio, fibra muscular, expressão gênica.

CHAPTER 3. EFFECT OF 17 α -METHYLTESTOSTERONE ON THE MUSCLE MORPHOMETRIC CHARACTERISTICS AND GENE EXPRESSION OF MYOGENIC REGULATORY FACTORS IN TWO NILE TILAPIA STRAINS.

ABSTRACT

This study aimed at comparing the growth of skeletal muscle tissue in larvae of two Nile tilapia strains fed a diet supplemented or not with the synthetic androgen hormone 17 α -methyltestosterone (MT). The strains evaluated were: Thai (initial weight of 10.4 ± 1.9 mg) and "Supreme" (initial weight of 12.4 ± 2.0 mg). The work was conducted in a factorial scheme (2 diets X 2 strains), constituting four treatments with four replicates each, lasting 29 days. Larvae were stocked at a density of 4 larvae.L⁻¹ in 16 100-L tanks, and fish of each strain was fed with a commercial diet (56% CP) with and without MT addition, six times a day. Samples for morphometric evaluations (n = 8 individuals of each treatment) were collected three times (at 4, 19 and 33 days post-hatching). The diameter (D) and the area of 200 muscle fibers of each sample were measured and distributed in the following diameter's classes: 10 ($D \leq 10\mu\text{m}$), 20 ($10 < D \leq 20 \mu\text{m}$), 30 ($20 < D \leq 30 \mu\text{m}$), 40 ($30 < D \leq 40\mu\text{m}$) and 50 ($D > 40 \mu\text{m}$). Expression of MyoD and myogenin were performed by RT-qPCR, with two samples (4 e 33 days post-hatching). The "Supreme" strain performed better, characterized by hyperplasia and hypertrophy of the muscle fibers. The expression of MyoD and myogenin of the Thai strain was not affected by the hormonal treatments. The strains received the hormone have shown higher frequency of larger fibers, but this trend did not accompany the increase in weight of the animals. This result suggests a possible adverse effects on fish's health.

Key words: *Oreochromis niloticus*, masculinization, hormone, muscle fibre, gene expression

1 INTRODUÇÃO

O tecido muscular estriado esquelético apresenta alta plasticidade. O conhecimento das características morfológicas, da miogênese e da dinâmica do crescimento é importante para o entendimento não apenas da morfofisiologia, mas também para a seleção de animais visando a melhoria na produção de carne (DAL PAI-SILVA e CARVALHO, 2007). O estudo com peixes fornece oportunidades para a investigação dos mecanismos genéticos fundamentais da plasticidade muscular que posteriormente podem ser aplicados em outras espécies de interesse ecológico e comercial (JOHNSTON, 2006).

Nos peixes, o tecido muscular corresponde 40 a 75% da massa corporal e suas fibras musculares se distribuem nos compartimentos vermelho, intermediário e branco, predominando o compartimento branco (KILARSKI, 1990; JOHNSTON, 1999; AGUIAR, 2005). Entre as espécies de peixes e suas fases de desenvolvimento, a distribuição das fibras musculares nos compartimentos é diferente. É conhecido que o crescimento do músculo é regulado positivamente e negativamente por muitos fatores de crescimento e de transcrição (MOMMSEN e MOON, 2001; JOHNSTON, 2006; DAL PAI-SILVA e CARVALHO, 2007).

Os fatores de regulação miogênica (MRFs) estão envolvidos na iniciação e manutenção da diferenciação muscular (RESCAN, 2001; JOHNSTON, 2006; DAL PAI-SILVA e CARVALHO, 2007). Existem os fatores primários, MyoD e o Myf5, que são expressos em mioblastos na fase de especificação. Outros fatores, como a miogenina e o MRF4 são expressos em células na fase de fusão e diferenciação de mioblastos em fibras musculares imaturas (COLE et al., 2004; GALLOWAY et al., 2006; JOHNSTON, 2006; DAL PAI-SILVA E CARVALHO, 2007).

Durante a fase larval, a plasticidade muscular para o ambiente é geralmente irreversível devido ao rápido ritmo das mudanças ontogênicas (JOHNSTON, 2004 e 2006). Os músculos podem afetar o desempenho e o comportamento locomotor de maneira a interferir na sobrevivência larval (WEST-EBERHARD, 2003). Nesta fase, os fatores externos, que interferem no crescimento muscular dos peixes, não estão totalmente elucidados e o conhecimento sobre os mecanismos de hiperplasia e hipertrofia muscular, incluindo a expressão dos MRFs, podem indicar melhores estratégias para o desenvolvimento e o crescimento muscular de espécies cultivadas para o comércio.

Mommsen e Moon (2001) argumentam que o melhor desempenho de crescimento está relacionado ao aumento da taxa de síntese protéica no músculo, à acelerada taxa de

captação de aminoácidos pela absorção intestinal e à intensificação da proteólise no trato gastrointestinal. Os autores destacam que, em peixes, alguns andrógenos podem suprimir a atividade das células inter-renais, podendo, assim, aumentar a síntese protéica muscular por meio da redução da proteólise devido ao cortisol. Os esteróides sexuais também são conhecidos por modular os níveis de hormônio de crescimento em truta arco-íris e algumas espécies de salmão. Com isso, torna-se importante conhecer o efeito da 17 α -metiltestosterona no crescimento muscular da tilápia, já que este hormônio é amplamente utilizado no período de diferenciação sexual para obtenção de populações monossexo machos.

O presente estudo teve como objetivo verificar o efeito do hormônio andrógeno sintético 17 α -metiltestosterona sobre as características morfométricas e de expressão gênica de fatores que regulam o crescimento muscular em duas linhagens de tilápia-do-nilo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi conduzido no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos, do Centro de Aqüicultura da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Jaboticabal, SP e no Laboratório de Biologia do Músculo Estriado do Instituto de Biociência da UNESP, Botucatu, SP. O trabalho foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, constituído de quatro tratamentos em esquema fatorial, caracterizado por duas linhagens de tilápia (“Supreme” e Tailandesa) e duas formas de alimentação (dieta comercial com e sem o hormônio androgênico 17α -metiltetosterona), com quatro repetições cada. Foram designados os seguintes tratamentos: S: tilápia “Supreme” + dieta sem hormônio; SM: “Supreme” + dieta com hormônio; T: Tailandesa + dieta sem hormônio; e TM: Tailandesa + dieta com hormônio. As larvas de tilápia das linhagens descritas apresentaram peso médio inicial de $12,4 \pm 2,2$ mg e $10,4 \pm 1,9$ mg, respectivamente.

A descrição detalhada das condições experimentais foi apresentada em Freitas et al. (2010 em preparação – Capítulo 1 desta dissertação). Resumidamente, as larvas foram estocadas em tanques de polietileno com 100L de água aerada e renovada continuamente. A fase experimental teve duração de 29 dias, com início a partir do quarto dia após a eclosão das larvas. Estas foram distribuídas em 16 tanques, na densidade de 4 larvas.L⁻¹ e receberam seis refeições ao longo do dia.

Foi fornecida aos animais uma dieta comercial farelada de boa qualidade contendo 56% de PB e granulometria de 0,8 mm, a qual foi mantida em refrigerador durante sua utilização. As quantidades da dieta fornecida foram ajustadas de acordo com o recomendado pelo fabricante em função da biomassa dos animais. Para o acréscimo do hormônio androgênico na dieta comercial adicionou-se 60 mg do hormônio 17α -metiltetosterona (valor esperado de pureza 97% a 103%) diluído em 0,5L de álcool etílico (92,8°) para cada quilograma da dieta. Em seguida, a mistura foi homogeneizada, seca ao ar livre e também estocada em refrigerador.

Durante o período experimental a média de temperatura da água manteve-se em $29,1 \pm 0,5$ °C, o pH $8,1 \pm 0,1$, o oxigênio dissolvido apresentou variações de $6,0 \pm 0,4$ mg.L⁻¹ e $78,4 \pm 4,9$ % e a condutividade $232,6 \pm 36,6$ μ S.cm⁻¹. As médias das concentrações de amônia total, nitrito, nitrato e fósforo total foram de $663,8 \pm 283,3$ μ g.L⁻¹, de $5,0 \pm 4,1$ μ g.L⁻¹, $131,6 \pm 6,8$ μ g.L⁻¹ e $49,4 \pm 7,6$ μ g.L⁻¹, respectivamente.

2. 1 Avaliação morfométrica das fibras musculares

Para avaliação do crescimento foram realizadas coletas no primeiro, 15^o e 29^o dias de experimento, correspondendo respectivamente ao quarto, 19^o e 33^o dias pós-eclosão (dpe). Foram coletados dois peixes de cada réplica experimental para avaliação do crescimento muscular (n=8). Os peixes amostrados foram eutanaziados com benzocaína e tiveram o peso úmido e comprimento total, individualmente mensurados, utilizando-se de paquímetro digital (0,01mm) e balança analítica digital Chyo modelo JS-110 (0,0001g). Cada animal teve a cabeça, vísceras e cauda removidas e a porção medial (musculatura) foi fixada individualmente em solução de Karnovsky por 24 horas, e preservadas em álcool 70%.

Para o estudo histológico, as amostras (n = 8) foram incluídas em Historesina® (Leica, Germany). Para isso, o material foi desidratado em concentrações alcólicas crescentes, até álcool 95° e colocado para infiltração durante quatro horas numa solução contendo 50% de glicol-metacrilato e 50% de álcool 95%. Em seguida as amostras foram transferidas para uma solução contendo glicol-metacrilato pura e ativador, *over-night*. Após isto, o material foi incluído em solução de pré-inclusão (glicol-metacrilato + ativador) com polimerizador, em molde histológico. Depois do endurecimento parcial da solução, os blocos foram colocados em estufa à temperatura de 37°C *over-night*, para polimerização e endurecimento total. Cortes histológicos transversais de 4µm de espessura foram obtidos com a utilização de micrótomo automático LEICA, modelo RM 2155, utilizando-se navalhas de vidro. Posteriormente, foram corados com Hematoxilina-Eosina.

Por meio de sistema de análise de imagens (Leica Qwin, Germany), foram analisadas 200 fibras musculares por animal, no compartimento profundo, localizado na região epiaxial. Para a visualização das lâminas foi utilizado um aumento de 40 X e as 200 fibras foram obtidas em um único campo. Cada fibra muscular teve sua área total mensurada e, posteriormente, a partir dos valores de área foram calculados os diâmetros das fibras considerando a área da fibra igual a área de um círculo, conforme determinado por Alami-Durante et al. (2010).

Os dados de diâmetro (D) foram classificados nas seguintes classes de diâmetro: 10 ($D \leq 10\mu\text{m}$), 20 ($10 < D \leq 20\mu\text{m}$), 30 ($20 < D \leq 30\mu\text{m}$), 40 ($30 < D \leq 40\mu\text{m}$) e 50 ($D > 40\mu\text{m}$), segundo Assis et al. (2004). Além disso, dos peixes de cada tratamento foram determinados a mediana do diâmetro, o diâmetro médio, o diâmetro máximo e os cinco maiores e cinco menores diâmetros. A partir dos resultados obtidos com a classificação dos diâmetros, avaliou-se a celularidade e o grau de crescimento hipertrófico e hiperplásico das fibras musculares, de acordo com o proposto por Alami-Durante et al. (2010).

Os valores de frequência nas classes de diâmetro foram analisados pelo teste de Goodman (GOODMAN, 1964, 1965), para contraste de proporção entre populações multinomiais (Quiquadrado de contingência, $p < 0,05$). Assim, verificou-se a comparação entre as linhagens, fixado o tratamento hormonal, e a comparação do tratamento hormonal, fixada a linhagem.

Para a avaliação do efeito do hormônio sobre a celularidade das fibras musculares foi aplicado o teste t de Student, ao nível de 5% de probabilidade ($n = 8$ indivíduos). Assim este teste foi aplicado aos resultados de diâmetro médio, mediana do diâmetro, diâmetro máximo, média dos cinco menores e cinco maiores diâmetros (aos 33 dpe) e a distribuição de frequência das fibras nas classes de diâmetro (aos 19 e 33 dpe). O teste t de Student aplicado a distribuição de frequência das fibras foi realizado como análise complementar para avaliação exclusiva do tratamento hormonal.

Todas as análises foram realizadas no programa estatístico SAS versão 9.0 (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA). Os dados expressos em porcentagens foram transformados ($y = \arcsin \sqrt{x/100}$) antes das análises de variância. Todas as pressuposições de análises foram atendidas (normalidade dos erros pelo teste de Cramer Von Mises e homocedasticidade das variâncias, pelo teste de Brown and Forsythe).

2. 2 Avaliação da expressão gênica dos Fatores de Regulação Mio gênica (MRFs) por RT-PCR em Tempo Real

A avaliação quantitativa da expressão gênica dos MRFs MyoD, miogenina e do constitutivo 18S ribossômico dos peixes foi realizada por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real após Transcrição Reversa (qRT-PCR).

Duas coletas foram realizadas para a avaliação da expressão gênica, uma no início do experimento e a outra no final. A cabeça, vísceras e cauda dos animais foram retirados após a eutanásia em água com gelo, utilizando-se instrumentos cirúrgicos autoclavados para evitar a ação de RNases. O material coletado foi inserido em tubo criogênico e imerso em nitrogênio líquido para congelamento. Posteriormente, as amostras congeladas foram mantidas em ultrafreezer -80°C até as análises.

De acordo com a metodologia utilizada no Laboratório de Biologia do Músculo Estriado do Instituto de Biociências da UNESP, Botucatu, SP, local onde as análises foram realizadas, adotaram-se os seguintes procedimentos. Para a extração do RNA total, as amostras congeladas foram homogeneizadas com o homogeneizador de tecidos (IKA UltraTurrax/T-25) em 1 mL de TRIzol/100 mg tecido (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). O material insolúvel resultante da homogeneização foi retirado por

centrifugação a 12000 x g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e incubado por 5 minutos à temperatura ambiente, para permitir a completa dissociação dos complexos núcleo-protéicos. Em seguida, 0,2 mL de clorofórmio foi acrescentado e a solução foi incubada por 3 minutos à temperatura ambiente. O material então foi centrifugado a 12000 x g por 10 minutos a 4°C e separada a fase aquosa. O RNA foi precipitado com 0,5 mL de álcool isopropílico por 10 minutos à temperatura ambiente e posteriormente centrifugado a 12000 x g por 10 minutos a 4°C. O pellet de RNA formado foi lavado com 1 mL de etanol 75%, centrifugado a 7500 x g por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante removido cuidadosamente. O pellet de RNA foi seco em temperatura ambiente durante 5 minutos. O RNA total foi dissolvido em água ultra pura (UltraPure™ RNase-Free Distilled Water - Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), incubado por 10 minutos a 60°C (para a inativação de qualquer possível resíduo de RNase) e, finalmente, armazenado à -80°C.

A quantificação do RNA total extraído foi realizada em espectrofotômetro (Thermo Scientific NanoDrop 3300), assim como a absorbância das amostras e a razão 260/280 e 260/230, fornecendo uma estimativa da qualidade das amostras. As amostras utilizadas tinham razão $\geq 1,7$. A integridade do RNA também foi avaliada pela presença das bandas correspondentes aos RNAs ribossomais 28S e 18S, após eletroforese de 1 µg de RNA em gel de agarose 1.5% corado com SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

O tratamento do RNA com DNase foi realizado conforme as instruções do protocolo DNase I - Amplification Grade (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), 1 µg do RNA total destinado à reação de transcrição reversa foi transferido para um microtubo estéril, onde foram adicionados 1 µL de 10X DNase I Reaction Buffer, 1 µL de DNase I Amp Grade (1U/µL) e água ultra pura na quantidade suficiente para completar 10 µL de solução. Essa solução permaneceu à temperatura ambiente durante 15 minutos e, em seguida, foi acrescida de 1 µL de EDTA (25 mM) e incubada a 65°C por 10 minutos, para a total inativação da enzima DNase I.

A reação de transcrição reversa (RT) foi realizada utilizando-se o *High Capacity cDNA archive kit* (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), onde 2 µg de RNA total obtido do músculo esquelético foram acrescidos de 10 µL de tampão de transcriptase reversa (10X RT buffer), 4 µL de dNTP (25X), 10 µL de *Random Primers* (10X), 5 µL de enzima transcriptase reversa (50 unidades/µL), 5 µL de inibidor de ribonuclease recombinante *RNaseOUT* (40 unidades/µL) (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e o volume final da reação ajustado para 100 µL com água livre de RNase. Cada amostra foi incubada a 25°C por 10 minutos, e então a 37°C por 2 horas e 85°C por 5

minutos. Posteriormente, os produtos da reação de RT foram armazenados a -20°C e utilizados nas reações de PCR.

A avaliação quantitativa da expressão gênica dos MRFs MyoD e miogenina na musculatura estriada da tilápia foi realizada pela Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qRT-PCR). Esta foi realizada com *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) utilizando-se 2 µL do produto da RT (equivalente a 60 ng de cDNA total), 12,5 µL de *Power SYBR® Green Mix (2,5X)*, primers “sense” e “anti-sense” (nas concentrações ótimas previamente testadas – 100µM, 500µM e 900µM) e água ultra pura suficiente para um volume final de 25 µL de solução. Os primers (Tabela 1) para os genes 18S, MyoD e Miogenina foram sintetizados pela Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA), de acordo com a sequência obtida por Nebo (2011). As reações para cada gene foram realizadas em duplicatas, no Sistema *Real Time PCR 7300 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA)*. Ao término de cada PCR, foi realizada a análise da curva de dissociação dos fragmentos amplificados e os valores de cada gene foram normalizados pelos valores obtidos para o gene constitutivo RNAr 18S.

Em seguida, a avaliação quantitativa da expressão dos genes MyoD e Miogenina foi realizada pelo método do Ct comparativo, que analisa a expressão gênica de uma determinada amostra alvo em relação a uma amostra de referência. A quantificação relativa do gene alvo é calculada baseando-se na eficiência de amplificação e no ciclo da PCR onde foi detectado o aumento da fluorescência. Foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Expressão relativa} = \frac{E^{\text{gene alvo}}^{(Ct \text{ gene alvo T} - Ct \text{ gene alvo C})}}{E^{\text{gene controle}}^{(Ct \text{ gene controle T} - Ct \text{ gene controle C})}}$$

Onde:

E = eficiência de amplificação do *primer*

Ct (*cycle threshold*) = ciclo de PCR onde foi detectada a fluorescência acima do sinal basal do equipamento.

Para a análise estatística dos resultados da quantificação relativa utilizou-se o teste t, ao nível de 5% de probabilidade (n = 8 indivíduos). As análises foram realizadas no programa estatístico SAS versão 9.0 (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA) e

todas as pressuposições de análises foram atendidas (normalidade dos erros pelo teste de Cramer Von Mises e homocedasticidade das variâncias, pelo teste de Brown and Forsythe).

A expressão gênica dos fatores que regulam o crescimento muscular foi realizada apenas para a linhagem Tailandesa, pois esta teve os genes da MyoD e miogenina seqüenciados recentemente por Nebo (2011). Até o presente momento devido a problemas de seqüenciamento não foi possível obter as seqüências para tais genes para a linhagem “Supreme”. Para tanto, o trabalho de seqüenciamento e expressão está em andamento para a publicação do artigo referente a esta dissertação.

Tabela 1. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para reação de amplificação por PCR em tempo real.

Genes	Oligonucleotídeos (5' → 3')	TA, °C	Tamanho (bp)
MyoD	Forward: TCAGACAACCAGAAGAGGAAGCT Reverse: CCGTTTGGAGTCTCGGAGAA	58	60
Myogenin	Forward: GCAGCCCACTGAGGGAGAA Reverse: AAGCATCGAAGGCCTCGTT	60	58
18S RNAr	Forward: GCAGCCGCGGTAATTCC Reverse: ACGAGCTTTTTAACTGCAGCAA	58	62

TA: temperature de anelamento; bp: pares de base.

3 RESULTADOS

O valor médio de peso dos animais diferiu significativamente aos 33 dpe na linhagem “Supreme”. Nesta linhagem verificou-se que os animais que não receberam dieta com incorporação do hormônio apresentaram médias de peso e de ganho em peso total superiores aos peixes que receberam dieta acrescida da 17 α -metiltestosterona (Tabela 2). Em relação a linhagem Tailandesa não foi encontrada diferença significativa nas medias de peso e ganho em peso total entre os peixes tratados com e sem o hormônio.

Tabela 2. Valores das médias de peso (mg) aos 4, 19 e 33 dias pós-eclosão (dpe) e ganho em peso total (GP) ao fim do experimento.

	Peso úmido em (mg)			GP (mg)	
	4 dpe	19 dpe	33 dpe		
“Supreme”	12,4 \pm 2,0	S	120,7 \pm 18,8 a	781,6 \pm 36,1 a	756,0 \pm 30,0 a
		SM	123,7 \pm 10,8 a	775,1 \pm 70,6 b	625,3 \pm 70,6 b
Tailandesa	10,4 \pm 1,9	T	83,7 \pm 1,3 a	344,3 \pm 87,6 a	333,9 \pm 87,6 a
		TM	93,8 \pm 7,2 a	339,0 \pm 68,0 a	321,0 \pm 68,0 a

Letras para comparação das médias na coluna dentro de cada linhagem. Valores médios com letras diferentes são estatisticamente diferentes (Teste t de Student; $p < 0,05$). S: tilápia “Supreme” + dieta sem hormônio; SM: “Supreme” + dieta com hormônio; T: Tailandesa + dieta sem hormônio; e TM: Tailandesa + dieta com hormônio).

3. 1 Morfometria das fibras musculares

No início do experimento, quatro dias pós-eclosão (4 dpe) a maioria das fibras musculares (mais de 75 %) apresentou diâmetro na classe 20 nas duas linhagens estudadas. Entre 10 e 20 % das fibras tinham menos de 10 μ m. Na linhagem “Supreme” foram encontrados 6,4% do total de fibras na classe 30, e na linhagem Tailandesa essa proporção foi menor, 2,3% de fibras maiores que 20 μ m, porém não foi verificada diferença estatística. Os resultados da comparação entre as linhagens indicaram que a linhagem Tailandesa apresentou frequência superior ($p < 0,05$) de fibras na classe 10 (Figura 1).

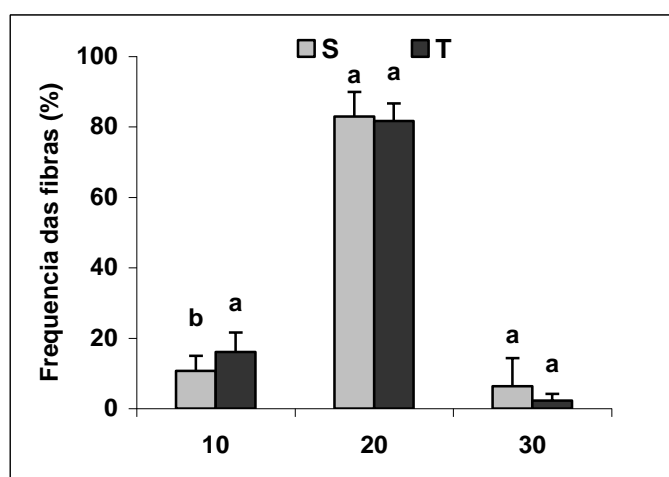


Figura 1. Distribuição das fibras nas classes de diâmetro. 10 ($D \leq 10\mu$ m), 20 ($10 < D \leq 20\mu$ m), 30 ($20 < D \leq 30\mu$ m), aos 4 dias pós-eclosão. Letras para comparação da frequência de fibras entre as linhagens, em cada classe de diâmetro. S = Linhagem “Supreme”; T = Linhagem Tailandesa.

Aos 19 dpe a linhagem “Supreme” sem hormônio apresentou maior frequência de fibras na classe de diâmetro 10 do que a outra linhagem. Na classe de diâmetro 20 não houve diferença significativa de frequência entre as linhagens; porém os peixes da linhagem Tailandesa não tratados com hormônio apresentaram maior frequência de fibras da classe 20 que os peixes tratados. A linhagem Tailandesa apresentou maiores valores de frequência na classe 30 ($p < 0,05$) e, na classe 40, houve diferença significativa dentro da linhagem “Supreme” e dentro da linhagem Tailandesa, entre os peixes tratados ou não com hormônio, apresentando frequência superior nos animais tratados com hormônio.

Tabela 3. Frequência de fibras musculares (%) nas classes de diâmetro, segundo a linhagem e o tratamento hormonal, aos 19 dpe.

Classes de diâmetro	Linhagem	Tratamento hormonal	
		Sem hormônio	Com hormônio
10	“Supreme”	39,1 Aa	34,2 Ba
	Tailandesa	32,3 Ba	31,6 Ba
20	“Supreme”	29,8 Aa	26,1 Aa
	Tailandesa	32,3 Aa	25,7 Ab
30	“Supreme”	21,2 Ba	18,3 Ba
	Tailandesa	29,9 Aa	30,6 Aa
40	“Supreme”	9,9 Bb	20,0 Aa
	Tailandesa	5,4 Bb	11,9 Ba
50	“Supreme”	-	1,4
	Tailandesa	0,1	0,2

Valores de frequência seguidos da mesma letra, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, não diferem entre si pelo teste de Goodman ($p < 0,05$). Classes de diâmetro: 10 ($D \leq 10\mu\text{m}$), 20 ($10 < D \leq 20\mu\text{m}$), 30 ($20 < D \leq 30\mu\text{m}$), 40 ($30 < D \leq 40\mu\text{m}$) e 50 ($D > 40\mu\text{m}$).

No último período estudado (33 dpe) a linhagem Tailandesa apresentou maior frequência de fibras na classe 10 em relação a linhagem “Supreme” (Tabela 4). Na classe 20 não se verificou diferença significativa entre as linhagens estudadas; porém, dentro da linhagem “Supreme” o tratamento sem hormônio apresentou maior frequência de fibras em relação ao tratamento com hormônio ($p < 0,05$). Nas demais classes de diâmetro não foram observadas diferenças significativas na frequência das fibras musculares tanto entre as linhagens como entre os tratamentos com e sem hormônio.

Tabela 4. Frequência de fibras musculares (%) nas diferentes classes de diâmetro, segundo a linhagem e o tratamento hormonal, aos 33 dpe.

Classes de diâmetro	Linhagem	Tratamento hormonal	
		Sem hormônio	Com hormônio
10	“Supreme”	15,3 Ba	16,4 Ba
	Tailandesa	21,3 Aa	20,3 Ba
20	“Supreme”	36,4 Aa	30,6 Ab
	Tailandesa	34,0 Aa	32,9 Aa
30	“Supreme”	27,8	30,0
	Tailandesa	26,1	30,3
40	“Supreme”	13,1	14,3
	Tailandesa	11,9	10,7
50	“Supreme”	7,4	8,8
	Tailandesa	6,8	5,8

Valores de frequência seguidos da mesma letra, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, não diferem entre si pelo teste de Goodman ($p < 0,05$). Classes de diâmetro: 10 ($D \leq 10\mu\text{m}$), 20 ($10 < D \leq 20\mu\text{m}$), 30 ($20 < D \leq 30\mu\text{m}$), 40 ($30 < D \leq 40\mu\text{m}$) e 50 ($D > 40\mu\text{m}$).

A seguir são apresentados os resultados do efeito do hormônio sobre a distribuição das fibras analisadas pelo teste t, somente para comparação entre os peixes dos tratamentos que receberam ou não dieta com hormônio, dentro de cada linhagem. Na coleta intermediária (19 dpe), verificou-se na linhagem “Supreme” que a classe 40 apresentou diferença estatística ($P < 0,05$) entre os tratamentos que receberam dieta com e sem o hormônio 17 α -metilttestosterona (Figura 2). Pode-se observar que os peixes que receberam dieta acrescida do hormônio apresentaram maior proporção de fibras na classe 40. Nas demais classes não houve diferença significativa entre os tratamentos. Na comparação entre os tratamentos dentro da linhagem Tailandesa não houve diferença significativa em nenhuma das classes de diâmetro.

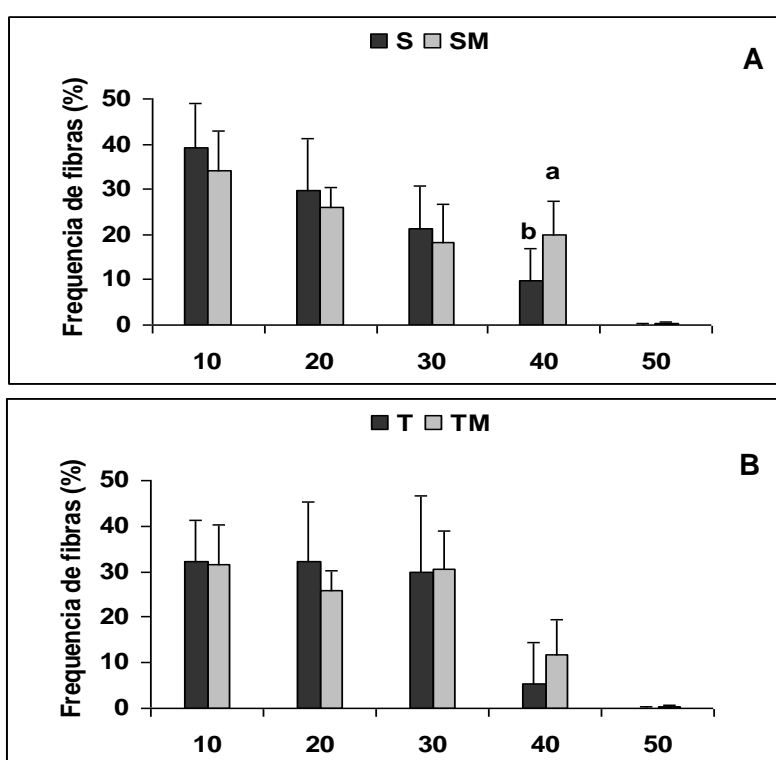


Figura 2. Distribuição de freqüência das fibras musculares em classes de diâmetro, de tilápias de cada linhagem, tratadas ou não com hormônio, aos 19 dpe. Classes: 10 ($D \leq 10 \mu\text{m}$), 20 ($10 < D \leq 20 \mu\text{m}$), 30 ($20 < D \leq 30 \mu\text{m}$), 40 ($30 < D \leq 40 \mu\text{m}$) e 50 ($D > 40 \mu\text{m}$). A: linhagem “Supreme”. B: linhagem Tailandesa. Comparação feita entre os tratamentos em cada classe separadamente. Médias com letras diferentes entre si diferem pelo teste t ($p > 0,05$). S: “Supreme” + dieta sem hormônio; SM: “Supreme” + dieta com hormônio; T: “Tailandesa” + dieta sem hormônio; e TM: “Tailandesa” + dieta com hormônio.

No 29º dia (33 dpe) verificou-se que os peixes da linhagem “Supreme” não tratados com hormônio apresentaram maior ($p < 0,05$) frequência de fibras da classe 20 que os peixes que receberam dieta com hormônio. Em relação à linhagem Tailandesa, não houve diferença significativa em nenhuma das classes de diâmetro de fibras musculares entre os animais que receberam dieta acrescida ou não do hormônio (Figura 3).

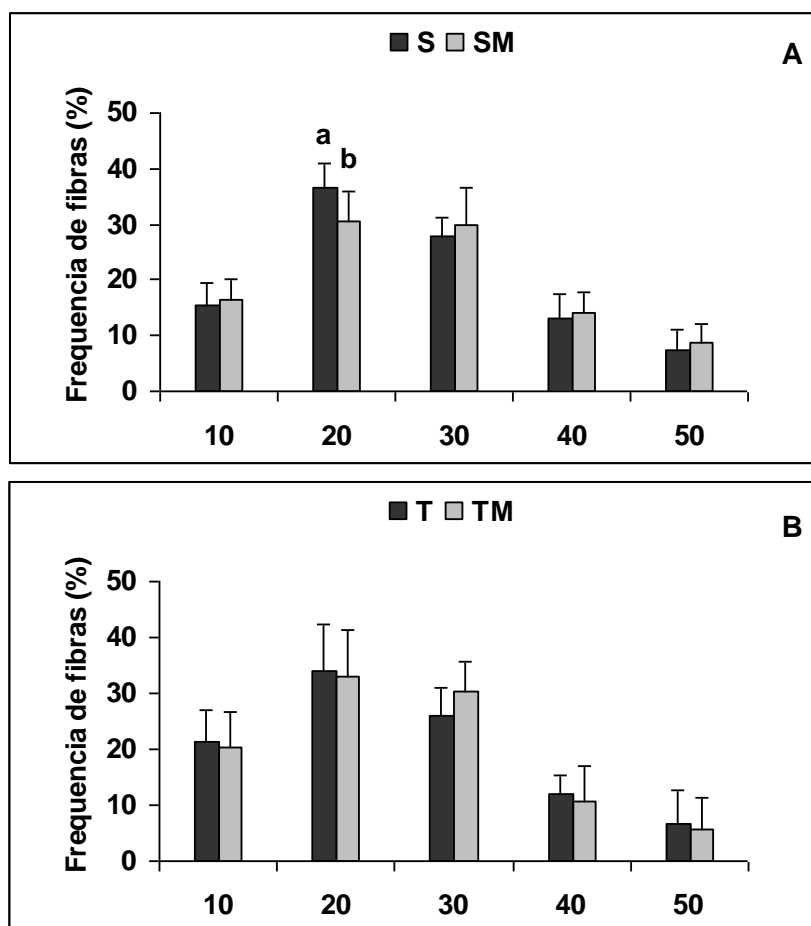


Figura 3. Distribuição de frequência das fibras musculares em classes de diâmetro, de tilápias de cada linhagem, tratadas ou não com hormônio, aos 33 dpe. Classes: 10 ($D \leq 10 \mu\text{m}$), 20 ($10 < D \leq 20 \mu\text{m}$), 30 ($20 < D \leq 30 \mu\text{m}$), 40 ($30 < D \leq 40 \mu\text{m}$) e 50 ($D > 40 \mu\text{m}$). A: linhagem “Supreme”. B: linhagem Tailandesa. Comparação feita entre os tratamentos em cada classe separadamente. Médias com letras diferentes entre si diferem pelo teste t ($p > 0,05$). S: “Supreme” + dieta sem hormônio; SM: “Supreme” + dieta com hormônio; T: “Tailandesa” + dieta sem hormônio; e TM: “Tailandesa” + dieta com hormônio.

O diâmetro médio e a mediana das fibras musculares dos peixes da linhagem “Supreme”, que passaram pela masculinização (SM), foram significativamente maiores que os que não receberam o tratamento hormonal (Tabela 5). Com a linhagem Tailandesa esta diferença não ocorreu. Para a verificação da hipertrofia máxima das fibras, o diâmetro máximo e os diâmetros das cinco maiores fibras de cada tratamento não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os peixes que receberam ou não o tratamento hormonal, nas duas linhagens estudadas.

Tabela 5. Valores médios do diâmetro médio, mediana do diâmetro, diâmetro máximo e diâmetro das cinco menores e cinco maiores fibras musculares das duas linhagens de tilápia aos 33 dpe.

Linhagens	"Supreme"		Tailandesa	
	S	SM	T	TM
Diâmetro (D. μm)				
D. média	21,2 \pm 0,5 b	22,7 \pm 1,0 a	20,2 \pm 2,8	20,6 \pm 2,6
D. mediana	19,5 \pm 0,2 b	20,9 \pm 1,1 a	18,7 \pm 2,5	19,3 \pm 3,5
D. máximo	49,1 \pm 4,4	52,5 \pm 5,8	47,6 \pm 8,7	49,6 \pm 10,1
D. 5 menores	4,5 \pm 0,6	4,2 \pm 0,5	4,4 \pm 0,8	3,9 \pm 0,8
D. 5 maiores	46,3 \pm 3,3	49,7 \pm 5,3	46,0 \pm 8,6	45,8 \pm 7,8

Letras para comparação dos diâmetros nas linhas, dentro de cada linhagem. Valores médios com letras diferentes são estatisticamente diferentes (Teste t; $p < 0,05$). S: “Supreme” + dieta sem hormônio; SM: “Supreme” + dieta com hormônio; T: Tailandesa + dieta sem hormônio; e TM: Tailandesa + dieta com hormônio.

3. 2 Expressão gênica: Fatores de Regulação Miogênica (MRFs)

A expressão relativa dos genes da MyoD e da miogenina não diferiu ($p > 0,05$) nos tratamentos analisados (Figura 4A e B). A quantificação relativa para a miogenina e para a MyoD não diferiu ao fim da fase de masculinização (33dpe) entre os peixes masculinizados e os que não receberam o hormônio dentro da linhagem Tailandesa. Numericamente é possível observar que a quantificação relativa para MyoD e miogenina foi maior nas larvas (4 dpe), porém não diferiu significativamente ($p > 0,05$) dos peixes aos 33 dpe.

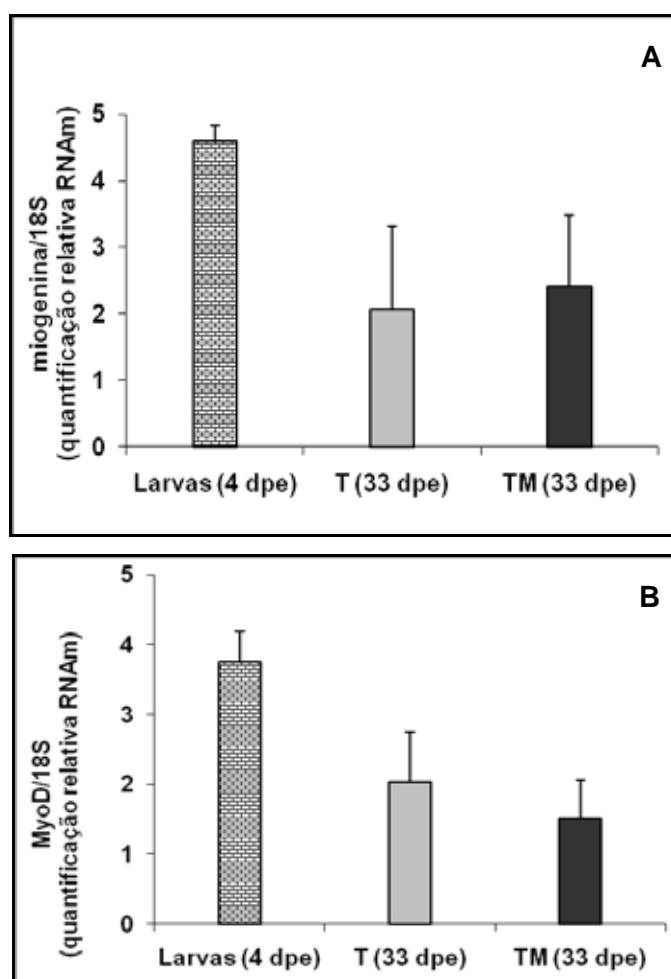


Figura 4. Expressão dos genes da miogenina (A) e MyoD (B) na musculatura de larvas e juvenis de tilápia-do-nilo da linhagem Tailandesa. T: Tailandesa + dieta sem hormônio; e TM: Tailandesa + dieta com hormônio.

4 DISCUSSÃO

O crescimento pós-embrionário do músculo esquelético dos peixes envolve mecanismos de hiperplasia e hipertrofia. A contribuição destes mecanismos durante o crescimento varia de acordo com a espécie e com os fatores ambientais (JOHNSTON, 1999; ROWLERSON e VERGETI, 2001). Os resultados aqui obtidos com a distribuição das fibras em classes de diâmetro mostraram que larvas de tilápia-do-nilo com 4 dpe apresentaram a maioria das fibras com diâmetro inferior a 20 μ m. Estes resultados estão de acordo com os encontrados em diversas pesquisas (DAL PAI-SILVA et al., 2003; AGUIAR et al., 2005; ALMEIDA et al., 2008; OSTASZEWSKA et al., 2008; LEITÃO et al., 2010) em que o crescimento inicial das larvas de diversas espécies ocorre predominantemente por hiperplasia.

Aos 19 dpe verificou-se na linhagem “Supreme” que a classe 40 apresentou maior frequência de fibras no tratamento com hormônio, indicando que as fibras musculares dos peixes que recebiam dieta com hormônio estavam crescendo mais em tamanho do que aqueles que recebiam dieta sem hormônio. De acordo com Dal Pai et al. (2000) e Almeida et al. (2008) as fibras musculares que apresentam diâmetro maior que 50 μ m estão em processo de hipertrofia e são mais frequentes em peixes adultos. Na linhagem Tailandesa houve diferença significativa dos tratamentos na classe 20; e, também, pode-se observar maior frequência das fibras na classe 40 nos peixes que receberam dieta com o hormônio.

Por outro lado, na avaliação seguinte, aos 33 dpe, verificou-se que os peixes “Supreme” sem hormônio apresentaram maior frequência de fibras musculares na classe 20 ($10 < D \leq 20 \mu$ m), sugerindo alta taxa de hiperplasia. Em contraste, também neste período observou-se que o diâmetro das cinco maiores fibras dos peixes “Supreme” masculinizados aproximava-se de 50 μ m, porém, sem diferença significativa entre os tratamentos. Com isso, na linhagem “Supreme” pode-se inferir que houve uma tendência da ocorrência de fibras com maior diâmetro (hipertrofia) nos peixes que passaram pelo processo de masculinização e maior recrutamento de novas fibras (hiperplasia) nos peixes que não receberam o hormônio.

Ao comparar as linhagens “Supreme” e Tailandesa verificou-se melhor desempenho da linhagem “Supreme” que apresentou maiores médias de peso. O crescimento muscular nesta linhagem ficou caracterizado antecipadamente pelo crescimento do diâmetro das fibras e também pela alta frequência de fibras em formação (diâmetro < 20 μ m).

Verificou-se efeito do tratamento hormonal sobre o peso final e ganho em peso dos peixes da linhagem "Supreme", mas não efeito anabolizante. Esse efeito não foi observado na linhagem Tailandesa. Não se pode descartar um possível efeito prejudicial do hormônio à saúde dos animais, como foi verificado por Gayão (2009) utilizando também $60\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de $17\ \alpha$ -metiltestosterona na dieta. O autor observou danos nos hepatócitos e alterações histológicas no fígado dos peixes, caracterizando intoxicação pelo hormônio.

Por outro lado, Lone e Matty (1981) mostraram a atividade dos andrógenos, injetados ou administrados oralmente, como promotores de crescimento de carpa (*Cyprinus carpio*) com aumento da atividade proteolítica no trato gastrointestinal. Com truta arco-íris, Habibi e Ince (1983) observaram um aumento no transporte e absorção da L-leucina no intestino dos animais que receberam por perfusão $50\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de $17\ \alpha$ -metiltestosterona. Já com a tilápia *O. mossambicus*, Hazzard e Ahearn (1992) observaram *in vitro* que o transporte e absorção da D-glucose no intestino aumentou na presença do $17\ \alpha$ -metiltestosterona.

Deve-se considerar também que estas pesquisas e outras que indicam alguns andrógenos como promotores de crescimento foram realizadas com peixes maiores e geralmente com dosagens menos constantes do que as realizadas neste experimento, pelo período de 29 dias. Para ser efetivo, o processo de masculinização deve ser iniciado muito cedo, desde a primeira alimentação das larvas, período de maior fragilidade e de mudanças ontogenéticas significativas, o que justifica a alta mortalidade relatada por alguns autores (RINCHARD et al., 1999; NEUMANN et al., 2009; GAYÃO, 2009).

A expressão dos MRFs dos peixes da linhagem Tailandesa não mostrou diferença significativa entre os animais que receberam ou não hormônio. Outros fatores ambientais ou nutricionais influenciam a expressão dos MRFs. Galloway et al. (2006) verificaram que o aumento da temperatura de incubação de embriões de *Hippoglossus hippoglossus* aumentou a expressão da MyoD e Miogenina. Alami-Durante et al. (2010) já não observaram diferença significativa nos níveis de expressão desses MRFs em trutas alimentadas com diferentes níveis de substituição na dieta de proteína animal por vegetal; no entanto, verificaram diferença substancial no desempenho das trutas. Neste trabalho, os níveis de MyoD e Miogenina não foram afetados pela administração do hormônio andrógeno na dieta, nas fases iniciais de desenvolvimento da tilápia-do-nilo.

A dinâmica de crescimento das fibras musculares dos peixes tratados com o hormônio sugere duas observações interessantes. O menor desempenho dos peixes tratados com o hormônio pode estar relacionado ao efeito prejudicial à sua saúde, uma vez que o aumento do diâmetro das fibras não foi acompanhado de um aumento do peso dos animais. Além disso, a dinâmica de distribuição das fibras mostrou um crescimento

mais lento por hiperplasia. Estes resultados podem ser comparados àqueles encontrados quando as larvas de “pike perch” *Sander lucioperca* (OSTASZEWSKA et al. 2008) e de pacu *Piaractus mesopotamicus* (LEITÃO et al. 2010) não receberam uma alimentação inicial adequada. Nesses trabalhos, a alta taxa de crescimento nos animais bem alimentados foi relacionada a maior contribuição da hiperplasia. Além disso, não se verificou efeito anabolizante do hormônio, o que também pode ser devido a danos causados a saúde dos peixes, mesmo que tenha sido suficiente para o processo de masculinização (FREITAS et al., 2011, em preparação, capítulo 1 da dissertação).

Considerando que o hormônio 17 α -metiltestosterona é amplamente utilizado no processo de masculinização da tilápia-do-nilo para obtenção de animais monossexo, outros aspectos relacionados ao seu uso precisam ser compreendidos e avaliados. A presente pesquisa não verificou efeito anabolizante do hormônio sobre o tecido muscular esquelético branco de larvas das linhagens “Supreme” e Tailandesa, durante o processo de masculinização; pelo contrário, um possível efeito prejudicial a saúde dos peixes não pode ser descartado antes de uma investigação mais profunda.

5 CONCLUSÕES

A adição da 17 α -metiltestosterona na dieta interfere nas respostas morfométricas das fibras musculares das larvas de tilápia-do-nilo e essas respostas são diferentes entre as linhagens “Supreme” e Tailandesa.

Não se verifica efeito anabolizante do hormônio sobre o tecido muscular esquelético branco de larvas das linhagens “Supreme” e Tailandesa, durante o período estudado, porém um possível efeito prejudicial à saúde dos peixes não deve ser descartado antes de uma investigação mais profunda.

6 REFERÊNCIAS

AGUIAR, D.H.; BARROS, M. M.; PADOVANI, C. R.; PEZATTO, L. E.; DAL PAI-SILVA, M. Growth characteristics of skeletal muscle tissue in *Oreochromis niloticus* larvae fed on a lysine supplemented diet. **Journal Fish Biology**, London, v. 67, p. 1-12, 2005.

ALAMI-DURANTE, H.; MÉDALE, F.; CLUZEAUD, M.; KAUSHIK, S.J. Skeletal muscle growth dynamics and expression of related genes in white and red muscles of rainbow trout fed diets with graded levels of a mixture of plant protein sources as substitutes for fishmeal. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 303, p. 50-58, 2010.

ALMEIDA, F. L. A.; CARVALHO, R. F.; PINHAL, D.; PADOVANI, C. R.; MARTINS, C.; DAL PAI-SILVA, M. Differential expression of myogenic regulatory factor MyoD in pacu skeletal muscle (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887: Serrasalminae, Characidae, Teleostei) during juvenile and adult growth phases. **Micron**, New York, v. 39, p. 1306-1311, 2008.

ASSIS, J. M. F. DE; CARVALHO, R. F.; BARBOSA, L.; AGOSTINHO, C. A.; DAL PAI-SILVA, M. Effects of incubation temperature on muscle morphology and growth in the pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 237, p. 251-267, 2004.

COLE, N. J.; HALL, T. E.; MARTIN, C. I.; MARK, A.; CHAPMAN, M. A.; KOBAYAMA, A.; NIHEI, Y.; WATABE, S.; JOHNSTON, I. A. Temperature and the expression of myogenic regulatory factors (MRFs) and myosin heavy chain isoforms during embryogenesis in the common carp *Cyprinus carpio* L. **Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v. 207, p. 4239-4248, 2004.

DAL PAI, V.; DAL PAI-SILVA, M.; CARVALHO, E. D.; FUJIHARA, C. Y.; GREGOARIO, E. A.; CURI, P. R. Morphological, Histochemical and Morphometric Study of the Myotomal Muscle Tissue of the Pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887: Serrasalminae, Characidae, Teleostei). **Anatomia, Histologia e Embryologia**. v.29, p.283±289, 2000.

DAL PAI-SILVA, M.; CARVALHO, R.F.; PELLIZZON, C.H.; DAL PAI, V. Muscle fiber types in tilapia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) from larval to adult: histochemical, ultrastructural and morphometric study. **Tissue Cell**, Essex, v. 35, n. 3, p. 179-187, 2003.

DAL PAI-SILVA, M E CARVALHO, R. F. Mecanismos celulares e moleculares que controlam o desenvolvimento e o crescimento muscular. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, , p.21-31, 2007. Suplemento especial.

GALLOWAY, T. F.; BARDAL, T.; KVAM, S. N.; DAHLE, S. W.; NESSE, G.; RANDØL, M.; KJØRSVIK, E.; ANDERSEN, O. Somite formation and expression of *MyoD*, *myogenin* and *myosin* in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) embryos incubated at different temperatures: transient asymmetric expression of *MyoD*. **Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v.209, p.2432-2441, 2006.

GAYÃO A. L. B. A. **Nutrição e reversão sexual de tilápia-do-nylo: parâmetros produtivos e estrutura do fígado**. 2009. 100 f. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.

GOODMAN, L.A. Simultaneous confidence intervals for contrasts among multinomial populations. **Annals of Mathematical Statistics**, Ann Arbor, v. 35, n. 2, p. 716-725. 1964.

GOODMAN, L.A. On simultaneous confidence intervals for multinomial proportions. **Technometrics**, v. 7, n. 2, p. 247-254. 1965.

HABIBI, H. R; INCE, B. W. Effects of steroids and sex reversal on intestinal absorption of L-[¹⁴C]Leucine in vivo, in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 52, n. 3, p. 438-444, 1983.

HAZZARD, C. E; AHEARN, G. A. Rapid stimulation of intestinal D-glucose transport in teleosts by 17 α -methyltestosterone. **American Journal Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, Bethesda, v. 262, n. 3, p. 412-418. 1992.

JOHNSTON, I.A. Muscle development and growth: potential implication for flesh quality in fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 177, p. 99-115, 1999.

JOHNSTON, I. A.; HALL, T. E. Mechanisms of muscle development and responses to temperature change in fish larvae. **American Fisheries Society Symposium**, v. 40, p. 85-116, 2004.

JOHNSTON, I. A. Environment and plasticity of myogenesis in teleost fish. **Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 209, p. 2249-2264, 2006.

KILARSKI, W. Histochemical characterization of myotomal muscle in the roach, *Rutilus rutilus* (L.) **Journal of Fish Biology**, London, v. 36, p. 353-362, 1990.

LEITÃO, N. J.; DAL PAI-SILVA, M.; ALMEIDA, F. L. A.; PORTELLA, M. C. Influence of initial feeding on muscle growth and the expression of myogenic regulatory factors in pacu *Piaractus mesopotamicus* larvae. In: **Fish and Shellfish Larviculture Symposium**, 5., 2010.

LONE, K. P.; MATTY, A. J. The effect of feeding androgenic hormones on the proteolytic activity of the alimentary canal of carp, *Cyprinus carpio* L. **Journal of Fish Biology**, London, v. 18, p. 353-358. 1981.

NEBO, C. **Expressão de genes relacionados ao crescimento muscular durante a restrição alimentar e realimentação em juvenis de tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus*, linhagem chitralada**. 2011. 87 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2011.

NEUMANN, E., DIAS-KOBERSTEIN, T. C. R., BRAGA, F. M. S. Desempenho de três linhagens de tilápia submetidas ao tratamento com 17 α -metiltestosterona em condições ambientais não controladas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 38, n. 6, p. 973-979, 2009.

OSTASZEWSKA, T.; DABROWSKI, K.; WEGNER, A.; KRAWIEC, M. The effects of feeding on muscle growth dynamics and the proliferation of myogenic progenitor cells during pike perch development (*Sander lucioperca*). **Journal of the World Aquaculture Society**, Baton Rouge, v. 39, n. 2, p. 184-195. 2008

RESCAN, P. Y. Regulation and functions of myogenic regulatory factors in lower vertebrates. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, Oxford, v. 130, p. 01-12, 2001.

RINCHARD, J.; DABROWSKI, K.; GARCIA-ABIADO, M. A.; OTTOBRE, J. Uptake and depletion of plasma 17 α -methyltestosterone during induction of masculinization in muskellunge (*Esox masquinongy*). **Steroids**, v. 64, n. 1, p. 512-525. 1999.

ROWLERSON, A.; VEGGETTI, A. Cellular mechanisms of post-embryonic muscle growth in aquaculture species. In: JOHNSTON, I.A. (Ed.). **Muscle Development and Growth**. London: Academic Press, 2001. cap. 5, p. 103-140.

WEST-EBERHARD, M. J. **Developmental Plasticity and Evolution**, New York: Oxford University Press, 2003.