



Universidade Estadual Paulista - UNESP
Faculdade de Ciências Agrárias do Vale do Ribeira- FCAVR

**Protocolo de feminilização em Tilápia *Oreochromis niloticus* submetidas ao
tratamento com hormônio estrógeno 17- β -estradiol**

Fabio Augusto Paiva Camisa Nova

REGISTRO-SP

JULHO/2023



Universidade Estadual Paulista - UNESP
Faculdade de Ciências Agrárias do Vale do Ribeira- FCAVR

**Protocolo de feminilização em Tilápia *Oreochromis niloticus* submetidas ao
tratamento com hormônio estrógeno 17- β -estradiol**

Fabio Augusto Paiva Camisa Nova

Orientador: prof. Dr. Rafael Vilhena Reis Neto

Trabalho de Graduação a ser apresentado como
requisito parcial para obtenção do título de
BACHAREL EM ENGENHARIA DE PESCA.

REGISTRO-SP

JULHO/2023

N935p	<p data-bbox="459 1361 842 1391">Nova, Fabio Augusto Paiva Camisa</p> <p data-bbox="459 1402 1214 1509">Protocolo de feminilização em Tilápia <i>Oreochromis niloticus</i> submetidas ao tratamento com hormônio estrógeno 17-β-estradiol / Fabio Augusto Paiva Camisa Nova. -- , 2023</p> <p data-bbox="485 1523 616 1552">24 p. : fotos</p> <p data-bbox="459 1641 1214 1749">Trabalho de conclusão de curso (-) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias do Vale do Ribeira, Registro,</p> <p data-bbox="459 1803 1193 1865">1. População monosexo. 2. Identificação do sexo. 3. Cromossomo Y. I. Título.</p>
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias do Vale do Ribeira, Registro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por me incentivar a enfrentar todas as dificuldades, proporcionar momentos inesquecíveis e por prever essa conquista.

Agradeço a todos os meus familiares que me apoiaram, motivaram e me deram forças para estar realizando essa etapa da minha vida.

Agradeço a minha namorada Yasmim Cristine que impulsionou a terminar o curso, enfrentou diversas dificuldades comigo estando sempre ao meu lado, pelo carinho e afeto.

Aos meus amigos e colegas de graduação que me impulsionaram e auxiliaram em cada momento do curso, cada um fez parte e me motivou durante o período.

Agradeço ao meu grupo de pesquisa de genética que só tenho a agradecer a todos como meu orientador o professor Rafael Vilhena Reis Neto, a Thais Gornati, o Gabriel Latanzi, Woshington Gervaz e a Yasmim Cristine. À Camila Fernandes Corrêa e a toda equipe do APTA regional Pariquera-Açu que me acolheu e proporcionaram ótimas experiências. Ao grupo de Tecnologia do Pescado, Dariane Beatriz Schoffen Enke, Eloisa Tamasia, Liandra Filholino e muitos outros, com suporte, apoio e conhecimentos

Agradeço aos docentes, técnicos e funcionários do câmpus, pela disposição e todo suporte durante o experimento e a jornada.

Agradeço a FAPESP que me proporcionaram mais uma realização em parceria.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo verificar por métodos moleculares e fenotípico, o protocolo de feminilização de Tilápia *Oreochromis niloticus* através da utilização do hormônio estrógeno 17- β -estradiol incluso na ração na fase inicial de produção de neofêmeas XY. O experimento foi conduzido no Campus Agrochá da FCAVR – UNESP Registro e no Laboratório de Genética em Aquicultura e Conservação – LaGeAC do Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP), onde foram realizadas as análises moleculares. Inicialmente um lote de animais selecionados foram submetidos ao processo de feminilização para obtenção das fêmeas XY (neofêmeas), seguindo duas etapas. Na primeira etapa, larvas recém geradas, ainda indiferenciadas, foram submetidas a dietas contendo hormônio estrógeno 17- β -estradiol para produzir neofêmeas, posteriormente foram coletados 105 indivíduos com cerca de 20 g obtidos na 1ª etapa para serem avaliados por técnicas moleculares usando um marcador específico do cromossoma Y, por fim foram identificadas nessa segunda etapa as neofêmeas que foram então mantidas por um tempo para o crescimento até alcançar 200g onde se foi possível verificar as papilas genitálias e assim verificar quanto o sexo. A validação utilizando o marcador específico do cromossomo Y revelou que, dos 105 animais avaliados, 21 apresentavam o genótipo XY em seu código genético e o restante apresentaram o genótipo XX. Na análise fenotípica avaliamos 11 dos 21 animais que apresentaram o Y, e foram identificados 6 machos e 5 fêmeas dentro do plantel.

Palavras chaves: população monosexo; identificação do sexo; cromossomo Y.

ABSTRACT

The present work aimed to verify, by molecular and phenotypic methods, the feminization protocol of Tilapia *Oreochromis niloticus* through the use of estrogen hormones 17- β -estradiol, including in the feed in the initial phase of production of XY pseudofemales. The experiment was carried out at the Agrochá Campus of FCAVR – UNESP Registry and at the Laboratory of Genetics in Aquaculture and Conservation – LaGeAC of the Aquaculture Center of UNESP (CAUNESP), where molecular analyzes were carried out. Initially, a batch of selected animals were selected for the feminization process to obtain XY females (new females), following two steps. In the first stage, newly generated larvae, still undifferentiated, were maintained on diets containing estrogen hormones 17- β -estradiol to produce pseudofemales, subsequently 105 individuals were collected with about 20 g obtained in the 1st stage for results by molecular techniques using a marker specific for the Y chromosome, finally, in this second stage, the pseudofemales were identified, which were then kept for a while for growth until reaching 200g, where it was possible to verify the genital papillae and thus verify the sex. Validation using the Y chromosome specific marker revealed that, of the 105 animals evaluated, 21 had the XY genotype in their genetic code and the rest had the XX genotype. In the phenotypic analysis, we evaluated 11 of the 21 animals that presented the Y, and 6 males and 5 females were identified within the herd.

Keywords: monosex population; gender identification; Y chromosome.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Bandas do PCR através do Run program.....	19
Figura 2- Desenho esquemático da papila urogenital de macho e fêmea de tilápia do Nilo.....	20



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Faculdade de Ciências Agrárias do Vale do Ribeira
Câmpus de Registro

CERTIFICADO

TRABALHO DE GRADUAÇÃO DO CURSO DE ENGENHARIA DE PESCA

TÍTULO: "Protocolo de feminilização em Tilápia *Oreochromis sp* submetidas com o tratamento do hormônio estrógeno 17- β -estradiol".

ACADÊMICO: FABIO AUGUSTO PAIVA CAMISA NOVA

ORIENTADORA: Prof. Dr. RAFAEL VILHENA REIS NETO

PERÍODO: 9º Semestre 5º Ano

Aprovado:

Reprovado:

BANCA EXAMINADORA:

Presidente Prof. Dr. Rafael Vilhena Reis Neto

Membro MSc. Thais Gornati Gonçalves

Membro MSc. Woshington Rocha Gervaz

Registro, 14 / 07 / 2023

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	10
2. REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 Determinação e diferenciação sexual em tilápias	12
2.2 Técnicas de obtenção de populações monosexo em tilápias	13
3. OBJETIVOS.....	14
4. MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1 Localização experimental	14
4.2 Obtenção dos animais	15
4.3 Manejo da inversão.....	15
4.4 Preparo da dieta	15
4.5 Desenvolvimento dos animais	15
4.6 Análises moleculares para identificação das neofêmeas XY	16
4.6.1 Extração do DNA genômico.....	16
4.6.2 Verificação da quantidade e qualidade do DNA extraído	17
4.6.3 PCR com os marcadores do cromossomo Y.....	18
4.6.4 Identificação dos indivíduos XY	18
4.7 Análise fenotípica	19
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
5.1 Análise do marcador molecular Y	20
5.2 Análise Fenotípica	20
6. CONCLUSÃO	21
7. REFERENCIAS	21

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A produção de tilápia no Brasil tem se consolidado anualmente, passando de 320.000 toneladas em 2015 (Peixe BR, 2016) para 550.060 toneladas em 2022 (Peixe BR, 2023), totalizando um crescimento de 71,89% nos últimos 7 anos, sendo ainda responsável por 63,93% da produção total de pescado oriundo de criação. O crescimento da atividade é reflexo de um conjunto de esforços da cadeia produtiva, buscando melhorar os processos envolvidos na produção.

O desempenho zootécnico dos animais pode ser avaliado de forma diferente em relação ao sexo, isso se dá principalmente pelo gasto energético de fêmeas para a reprodução ao atingir a idade da mesma, enquanto os machos tendem a continuar o crescimento. Segundo Kubitza (2015) os machos podem apresentar um crescimento de 1,8 a 2,5 vezes mais rápido que as fêmeas em sistemas de cultivos intensivos.

Na prática, o dimorfismo sexual é notável em aspectos da biologia animal, como forma corporal e crescimento (Rosenthal e Evans, 1998), cor (Casalini et al., 2009), tamanho (Mei e Gui, 2015), e comportamento fisiológico (Ventura, 2018 & Zupanc, 2020). Portanto, a criação de populações monosexo exclusivamente masculinas tem implicações econômicas significativas na tilapicultura, com alto valor econômico devido o rápido crescimento dos machos, tamanho uniforme e baixo desperdício de energia no desenvolvimento gonadal. Além disso, ocorre uma redução no impacto do sexo fenotípico na qualidade do produto devido à ausência da desova (Budd et al., 2015).

A produção de monosexo pode ser obtida por meio de hibridização interespecífica, manipulação da temperatura, manipulação cromossômica, inversão sexual induzida por hormônio direto para o sexo desejado ou inversão sexual para o sexo indesejado, o que produzirá o sexo desejado em sua progênie como praticado para obtenção do supermacho YY (Budd et al., 2015; Bunthawin et al., 2015; Abo-Al-Ela, 2018; Ventura, 2018).

Na tilapicultura, é comum no Brasil e em alguns países, o uso de hormônio andrógeno sintético 17- α -metiltestosterona adicionado à dieta em dosagens de 30 a 60 mg/Kg de ração, durante 21 a 28 dias de alimentação para masculinização (Bardhan et al., 2021), que apresenta a vantagem de ser facilmente excretado logo após o tratamento hormonal, minimizando os efeitos residuais (Makino et al., 2009). Entretanto tem se observado um movimento no mercado consumidor por alternativas mais sustentáveis, devido os desconhecidos potenciais riscos para a saúde humana e contaminação ambiental (Biswas et al., 2005; Hoga et al., 2018; Wang & Lu, 2016).

Alguns dos maiores consumidores de pescado como Estados Unidos e União Europeia, o uso de hormônio andrôgeno sintético em tilápia não são aprovadas e ainda está sob avaliações para uso (Novelo et al., 2020). A agência americana Food and Drug Administration (FDA) e, países como Índia, Costa Rica, Equador, países da União Europeia e alguns países subsaarianos restringiram a venda e a criação de peixes tratados com hormônios (Mlalila et al., 2015; Phelps, 2006). Portanto, faz-se necessário adotar uma técnica que demonstre viabilidade técnica e econômica, permitindo maior sustentabilidade e eficiência na produção de animais exclusivamente machos. Sendo assim, a produção de animais considerados supermachos pela dominância do cromossomo Y, torna-se um meio alternativo sustentável para produção de animais machos, com melhores despenhos zootécnicos e maior segurança alimentar e ambiental. A formação de reprodutores supermachos YY passa basicamente por cinco etapas conforme sugerido por Beardmore et al. (2001) e Kubitzka (2000).

1° - Consiste na feminilização de larvas indiferenciadas submetidas a dietas contendo hormônio estrógeno 17- β -estradiol para produzir fêmeas fenotípicas XY (neofêmeas);

2° - As neofêmeas XY são separadas de fêmeas normais XX por teste de progênie;

3° - As neofêmeas XY são acasaladas com machos normais XY, gerando 25% da progênie com a combinação YY, 50% XY e 25% XX;

4° - Por teste de progênie os machos YY são separados;

5° - Os machos YY são acasalados com fêmeas normais XX para produção de progênie 100% XY.

Embora a técnica de produção de supermacho pareça ser um processo simples, Beardmore et al. (2001) afirmam que a obtenção de peixes machos YY é uma tarefa trabalhosa. Com relação aos dois primeiros passos, o principal entrave se encontra da separação das fêmeas XX das neofêmeas XY. Essa diferenciação pode ser feita por um teste de progênie que demanda tempo e estrutura, pois, só serão reveladas as fêmeas heterogaméticas XY quando sua progênie atingir o tamanho para sexagem, ao ser observada uma proporção de 75% de machos e 25% de fêmeas. Uma opção para acelerar esse processo é o uso de ferramentas moleculares que podem ser aplicadas quando as fêmeas ainda estiverem na fase de juvenis. Li et al (2015), identificou dois genes (*amhy* e *amh Δ -y*) que ocorrem somente no cromossoma Y de tilápias e poderiam ser usados como marcadores sexuais para identificação do sexo para espécie.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Determinação e diferenciação sexual em tilápias

Considerando os fatores determinantes e os mecanismos na contemplação sexual de tilápia, possibilita processo natural ou induzido de reversão sexual. Pisciculturas comerciais produtoras de tilápia tendem a adotar o cultivo de populações monosexo, a fim de evitar desovas indesejadas, agressividade e competição para a reprodução. Sendo possível selecionar reprodutores de alta qualidade e desempenho, melhorando a eficiência reprodutiva da população e características desejáveis como taxa de crescimento, rendimento de carcaça e resistência a doenças (Yamazaki, Fumio 1983).

As fêmeas utilizam energia para a maturação das gônadas e produção de ovócitos, perdendo a efetividade de crescimento em relação aos machos e quando ocorre a desova, incubam os ovos e as pós-larvas na boca, cuidado intensamente, não se alimentando por duas ou mais semanas. O período de reprodução ocorre a partir do 4º mês de vida, ocasionando problemas como superlotação dos tanques, maior competitividade por alimento e heterogeneidade do lote (KUBITZA, 2000).

Os peixes podem ser classificados em gonocóricos, hermafroditas e unissexuados.

Os gonocóricos, o sexo ocorre distintamente masculinos ou femininos, a determinação do sexo ocorre durante o desenvolvimento embrionário ou larval, permanecendo com o mesmo sexo durante toda a vida.

As espécies de tilápia são classificadas como gonocóricas diferenciadas, apresentando um testículo ou um ovário desde o princípio (Lundstedt et al., 1997; Beardmore et al., 2001).

A determinação sexual em peixes, pode ser herança cromossômica, poligênica e interação genótipo ambiente.

Na herança cromossômica, o sexo depende da presença e combinação dos cromossomos sexuais. Foram propostas oito principais bases em análises citogenéticas, podendo ter a combinação XX/XY ou ZZ/ZW e até sistemas complexos envolvendo mais de um par de cromossomos sexuais ou diferentes números de cromossomos dependendo do sexo (Piferrer, 2001).

Na determinação sexual poligênica, múltiplos cromossomos influenciam o desenvolvimento do sexo no indivíduo. Segundo Avtalion e Don (1990) as combinações encontradas em *O. aureus* consistem em WW e WY em fêmeas e YY para macho. As

combinações podem variar e obter resultados diferentes no cruzamento, não seguindo uma relação 1:1 (macho:fêmea).

Para a interação genótipo-ambiente, parâmetros ambientais (temperaturas, fotoperíodos, salinidades) e método de produção como densidades de estocagem, podem ocasionar diferenciação sexual no momento da incubação dos ovos e larvicultura, mesmo já existindo uma composição genética indicativa (Piferrer, 2001; Borges, 2004).

2.2 Técnicas de obtenção de populações monosexo em tilápias

Segundo Popma e Green (1990), os principais métodos utilizados comercialmente para obtenção de populações monosexo de tilápias consistem em:

- i. Sexagem visual é um método simples e de baixo custo, podendo ser o sexo identificado com base em características visuais, como tamanho, cor e formato das nadadeiras.
- ii. Uso de hormônios esteróides sexuais sintéticos como o 17- α -metiltestosterona, que podem ser adicionados à ração ou em banhos de imersão de curta duração, para induzir o desenvolvimento das características sexuais masculinas na maioria dos peixes, permitindo a criação de uma população monosexo, essa técnica é a mais utilizada e sua eficiência pode chegar a 98%.
- iii. A hibridização busca selecionar uma qualidade específica na combinação das espécies. No caso do lote monosexo em tilápias, o cruzamento entre espécies, a fim de constituir um genótipo, com uso de técnicas de manipulação genética ou cruzamento seletivo, proporcionando lotes constituídos por animais machos. Na tilápia do Nilo o sexo é determinado por cromossomos X e Y, sendo a fêmea é XX (homogaméticos) e o macho XY (heterogaméticas). Na Wami tilápia *O. hornorum* ocorre de os machos serem ZZ e as fêmeas ZW, realizando-se um cruzamento entre fêmeas nilóticas XX e machos de tilápia Wami ZZ, a progênie apresenta a combinação de cromossomos sexuais ZX, podendo obter linhagens de 58 a 100% machos (Beardmore et al., 2001).
- iv. A inversão sexual envolve a manipulação ambiental para influenciar a reversão sexual de tilápias. Por se tratar de espécies termosensível, a temperatura intermediária resulta em proporções semelhantes de machos e fêmeas, e em temperaturas elevadas durante o desenvolvimento inicial,

eleva um maior número de machos, como no caso da tilápia *O. niloticus* e *O. aureus* que possuem maior desenvolvimento de machos quando a temperatura da água é superior à 32 °C (Abucay et al., 1999). O método utilizado na produção de monosexos de machos de tilápias, é acondicionando a temperatura da água em 32 a 34 °C, nos 30 a 60 primeiros dias de vida, para que os peixes se desenvolvem como machos.

- v. Supermachos ou tilápia YY é uma variedade de tilápia que tem um cromossomo Y extra, combinando com uma fêmea homogamética XX, irá obter uma população heterogamética XY sendo 100% machos. Segundo Beardmore et al. (2001) esse é um processo demorado e laborioso, consistindo em vários testes de progênie. A fim de otimizar as etapas de identificação, métodos por marcadores do cromossomo Y em reação de cadeia de polimerase (PCR) foram elaborados e permitiu acelerar o processo, otimizando as necessidades de esforços e tempo. Em comparação entre ensaios no cultivo de indivíduos revertidos sexualmente e proles provenientes de supermachos, Mair et al. (1995) constatou que as progênies do supermacho foram melhores para ganho de peso, possibilitando não só a formação de lotes de indivíduos machos, como uma disposição a ampliar o potencial nos rendimentos de desempenho e de carcaça em tilápia.

3. OBJETIVOS

O presente trabalho propõe verificar por métodos moleculares e fenotípico, o protocolo de feminilização através da aplicação do hormônio estrógeno 17- β -estradiol incluso na ração na fase inicial de *Oreochromis sp.*

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Localização experimental

O experimento foi conduzido nas estruturas do Campus Agrochá da Faculdade de Ciências Agrárias do Vale do Ribeira FCAVR – UNESP Registro e no Laboratório de Genética em Aquicultura e Conservação – LaGeAC do Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP)- Jaboticabal, onde foram realizadas as análises moleculares.

4.2 Obtenção dos animais

Os animais avaliados foram obtidos a partir do acasalamento entre machos e fêmeas das variedades de tilápia GIFT. As matrizes foram adquiridas em maio de 2021 da Universidade Estadual do Maringá (UEM), resultante da 11^a geração do programa de melhoramento genético da tilápia GIFT.

As larvas foram obtidas por meio de reprodução natural, usando duas hapas (2x2x2 metros) em um sistema de recirculação (RAS) de 15m³. Conforme a recomendação de alguns autores (Hughes & Behrends, 1983; Siddiqui & Al-Harbi, 1997), a relação machos/fêmeas utilizada na reprodução foi de 1:3, assim, em cada hapa de reprodução foram estocados 2 machos e 6 fêmeas. O controle foi realizado semanalmente, com a verificação da presença de desova nas fêmeas, quando identificada, a mesma era coletada e incubada em sistema de incubação artificial.

4.3 Manejo da inversão

Durante o período de inversão de sexo, foram separados mil animais em fase larval que ficaram alocadas em caixas de 30lts em RAS com filtragem biológica. A dieta contendo hormônio estrógeno 17- β -estradiol foi fornecida aos animais da fase inicial a partir da abertura da boca, numa quantidade estimada de 3% da biomassa, sendo corrigida semanalmente através de biometrias.

4.4 Preparo da dieta

O hormônio estrógeno 17- β -estradiol foi adquirido através da empresa Hoepers Produtos Agropecuários, utilizado a versão em pó. Foi dissolvido 60mg do estrógeno em 1 litro de álcool 92,8°, compondo a solução mãe. A solução foi aspergida em 1Kg ração comercial 32% de proteína bruta (pb) triturada e peneirada. Após a incorporação do hormônio, a dieta foi homogeneizada e dispersa à temperatura ambiente em bandejas, alocada na bancada do laboratório por 48 horas para secar, sendo diariamente homogeneizada.

4.5 Desenvolvimento dos animais

Ao final do processo de inversão sexual, os juvenis foram transferidos para uma caixa de 300l em recirculação de água e filtro biológico, até atingir uma idade de 90 dias ou 5g, quando foram transferidos aos tanques de 15m³ contendo 5 hapas (2 hapas de

1x1x1 metros e 3 de 0,3x0,3x1 metros) destinados a engorda dos mesmos, até atingir o 20g, alimentadas com ração comercial para tilápia 32% de pb.

Para assegurar do sucesso na inversão, foram realizadas a identificação de 105 indivíduos com cerca de 20g. Para serem avaliados por técnicas de PCR com identificação específica do cromossoma Y conforme descrito por Li et. al (2015).

Os animais foram anestesiados com eugenol (50mg.L^{-1}) por 30 segundos e inserido o microchip na região dorsal próximo a sua nadadeira dorsal e verificado quanto ao número em questão do chip.

Com os animais microchipados, foram retiradas amostras das nadadeiras caudais e colocadas em um eppendorf de 0,5mL, com álcool 70% e armazenadas em freezer para evitar a degradação de material genético. Os animais identificados, foram adensados em um tanque circular lonado em sistema RAS de 15m^3 .

4.6 Análises moleculares para identificação das neofêmeas XY

As análises foram realizadas no Laboratório de Genética em Aquicultura e Conservação (LAGeAC) do Caunesp em Jaboticabal-SP.

4.6.1 Extração do DNA genômico

Para a extração do DNA, as amostras de nadadeiras retiradas anteriormente foram fracionadas e acondicionadas em eppendorf 0,5ml. Ao mesmo tempo uma segunda solução contendo 300 μl de isopentanol foi preparada em eppendorf 0,5ml e acondicionada em freezer, sempre mantendo os mesmos identificados.

O segundo passo foi triturar a amostra no eppendorf, através de uma tesoura e adicionar no equipamento Loccus DBH-S para um banho seco seguindo a programação S1 (45°C por 15 minutos), a fim de evaporar o álcool presente ainda na amostra, nessa etapa o eppendorf permaneceu aberto para eficiência do banho seco.

Após o banho seco, foram adicionados 300 μl de TNES (trizma-base, NaCl (cloreto de sódio), EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), dodecil sulfato de sódio) junto com 5 μl de proteinase K, com cuidado para não haver contaminação. Com a junção dos solutos, as amostras foram homogeneizadas com o uso do vórtex (15 segundos).

As soluções homogêneas foram adicionadas novamente no Loccus para outro banho seco, agora na programação S2 (56°C com 900RPM por 3horas), pelo fato de haver movimentação, os eppendorfs foram fechados. A cada 5°C de aquecimento e a cada 30 minutos a solução era novamente homogeneizada com o uso do vórtex.

Ao final dessa etapa, a solução foi deixada a uma temperatura ambiente, por um período de 5 minutos. Em seguida foi adicionado 1,5µl de Ribonuclease (RNase) em cada amostra e homogeneizado, posteriormente as amostras foram novamente para o banho seco, na programação S3 (37°C a 900 RPM por 30 minutos). Nessa etapa as os eppendorf e o loccus estava com a tampa fechada. Ao final do processo, as amostras descansaram por 10 minutos em temperatura ambiente. Após esse período, foram adicionados 200µl de NaCl na solução e homogeneizada.

Na etapa seguinte, as amostras foram colocadas por 10 minutos no freezer. Nesse período, a centrifuga refrigerada foi preparada na programação 54 24R (4 minutos- 4°C- 1300RPM) para receber as amostras. Após 10 minutos as amostras foram homogeneizadas e dispostas na centrífuga de modo que a mesma permaneça em equilíbrio e assim completar essa etapa.

Após a centrifugação, foi retirado o sobrenadante com pipeta, tomando cuidado para que não ocorresse a contaminação com o fundo, em seguida adicionou-se ao isopropanol e a solução foi homogeneizada por inversão 20 vezes para retornar a centrifuga na mesma programação anterior.

Após a centrifugação, descartou-se os sobrenadantes em um béquer e foi acrescentado à amostra 300µl de álcool 70% para em seguida ser centrifugada novamente com a mesma programação feita anteriormente.

Ao final desse processo, descartou-se o sobrenadante e o eppendorf com o precipitado permaneceu virado sobre papel toalha para secar e em seguida realizar um banho seco na programação S4 (50°C por 30 minutos), sem movimentação e com a tampa aberta. Após o banho seco, as amostras foram reidratadas com 30µl do tampão Tris-EDTA (TE), permanecendo por 12 horas em temperatura ambiente.

4.6.2 Verificação da quantidade e qualidade do DNA extraído

O gel de agarose foi constituído misturando 0,5g de agarose com 50ml de Tris Borato EDTA (TBE) (1x) e levando a solução ao micro-ondas, para dissolver e homogeneizar. Após dissolver, adicionamos 1,5µl de Nancy e deixamos esfriar em temperatura ambiente. Para essa etapa, o gel foi adicionado à cuba de eletroforese.

Para a verificação da qualidade do Ácido desoxirribonucleico (DNA) das amostras, foi utilizado um controle com 3µl de Leder 1Kb. Para cada amostra de DNA foi adicionada o indicador Blue Juice na proporção 1,5µl para cada 3µl de amostra e aplicou no molde para dar início na corrida do gel seguindo a programação 1 por 30

minutos. Ao final desse processo o gel foi retirado da cuba com as bandas de DNA e levado ao transiluminador para avaliar quando foi possível verificar a qualidade do DNA das amostras e se houve contaminação.

Não apresentando contaminação as amostras foram submetidas ao Espectrofotômetro para quantificação de DNA e cálculos para diluição com o objetivo de chegar a 20µl de DNA por amostra. As amostras que estavam acima de 20µl de concentração de DNA, foram diluídas com TE, até chegar nesse valor.

4.6.3 PCR com os marcadores do cromossomo Y

Com as amostras prontas, foi preparado a solução com o primer para a PCR. Os *primers* usados resultam na amplificação de regiões dos genes *amhy* e *amhΔ-y* que ocorrem somente no cromossomo Y de tilápias conforme descrito por Li et al (2015). A solução para as reações de PCR continha: H₂O- 7,95 µl; Buffer (tampão de PCR)- 1,2 µl; DNTP (desoxinucleotídeos trifosfatos)- 1,0µl; Mg (MgCl₂ ou MgSO₄, fonte de íons de magnésio)- 0,3 µl; PF (primer forward, primer sentido direto)- 0,5 µl; PR (primer reverse, primer sentido reverso)- 0,5 µl; Taq (enzima Taq DNA polimerase)- 0,05 µl; DNA- 0,5µl (amostra já extraída).

Com a solução pronta, foram adicionados 11,5µl em um eppendorf acondicionado em estante congelada (a fim de se manter em baixas temperaturas), com 0,5µl do DNA como solução estoque.

As soluções prontas com os primers foram adicionadas no termociclador. O termociclador foi programado em 4 estágios que compõem as etapas: desnaturação, anelamento (ou hibridização), extensão e resfriamento.

A desnaturação inicial do DNA ocorre a 94°C por 3 minutos, resultando na quebra das pontes de hidrogênio e separação das fitas duplas do DNA. No anelamento, ocorre a desnaturação a 94°C por 15s e 60°C por 30s. Durante o anelamento, os primers se ligam às sequências alvo complementares ao DNA marcando os pontos de início e término da sequência a ser amplificada. Na extensão ocorre o aquecimento para 72°C por 30s. No resfriamento, a temperatura é resfriada para 15°C por 2 minutos.

4.6.4 Identificação dos indivíduos XY

Após a amplificação, procedemos com a eletroforese. As soluções amplificadas foram adicionadas aos poços da placa de amostras, juntamente com blue Juice na

proporção de 1,5µl de blue Juice e 3µl de cada amostra. Em um dos poços foi preenchido com um marcador de peso molecular. Com o gel preenchido, a cuba foi fechada e ligada por 30 minutos e assim acompanhamos as bandas no microscópio do computador.

Com a finalização dessa etapa, foi utilizado o programa Run program, colocando o gel no transiluminador para avaliar as amostras. O computador gerou imagens das bandas produzidas onde foi possível identificar qual das amostras eram XX (as que não se deslocaram) e XY as que houve deslocação (Figura 1).

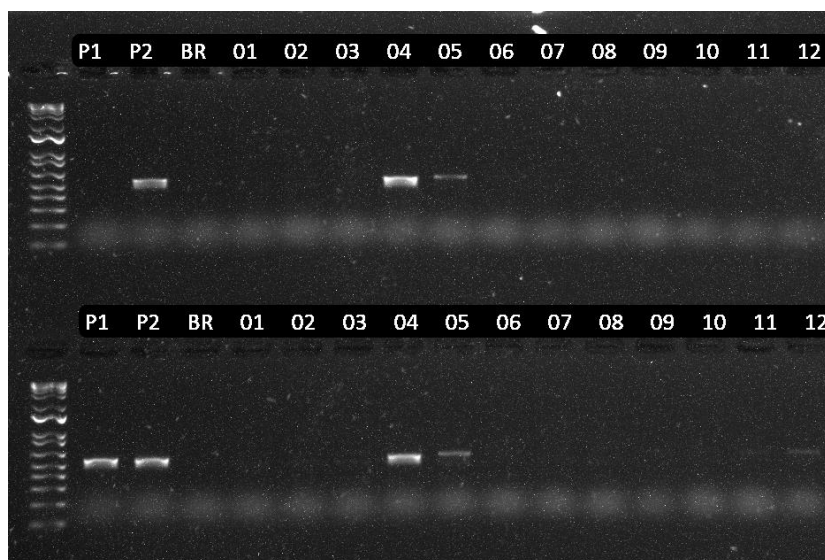


Figura 1- Bandas do PCR através do Run program.

4.7 Análise fenotípica

Segundo os métodos de Mair e Little (1991), os animais foram estocados até atingir uma média de 100g de peso corporal e assim realizar a verificação manual do sexo.

Os animais que apresentaram a presença do cromossomo Y pelo teste PCR, foram analisados quanto a sua papila urogenital seguindo os métodos de Turra et al. (2010) considerando as fêmeas que apresentassem o orifício urinário e a abertura do oviduto (Figura 2).

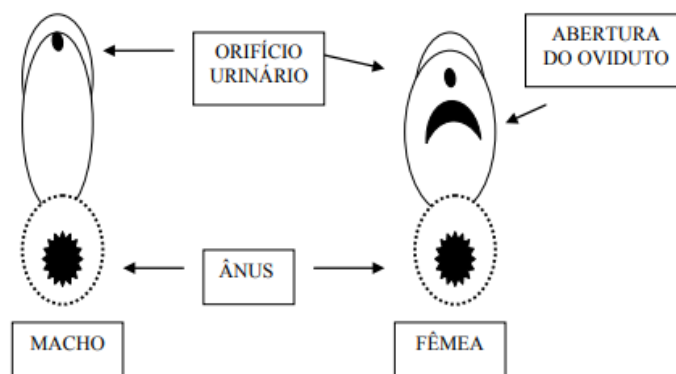


Figura 2- Desenho esquemático da papila urogenital de macho e fêmea de tilápia do Nilo. Fonte adaptado de Turra et al. (2010)

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise do marcador molecular Y

Foram realizadas 105 análises, para a verificação da presença cromossomo Y. Sendo encontradas 21 amostras que mostraram a presença do cromossomo Y em sua composição representando 20% e 84 apresentaram apenas o cromossomo X.

Segundo Almeida (2012) o desenvolvimento de um método rápido e eficaz de sexagem permite a seleção adequada de machos e fêmeas para estabelecimento de plantéis de reprodutores em fase pré-púberes.

A análise do marcador molecular apresentou resultados satisfatórios. Através da análise não foi necessário realizar a identificação do genótipo dos animais, através do método de progênie, otimizando tempo e estruturas.

5.2 Análise Fenotípica

Para a análise fenotípica foram utilizados 11 animais que apresentaram o cromossomo Y segundo o teste de PCR, destes 6 machos e 5 fêmeas. Onde os resultados apontaram que 45% do lote que naturalmente seria macho, ocorreu a feminização.

Em relação ao uso de outros hormônios feminilizantes comerciais em tilápia, os resultados foram similares. Bombardelli e Hayashi (2005) obteve um resultado inferior utilizando banhos de imersão com o estrógeno valerato-de-estradiol em *O. niloticus*, indo de 24,1% a 39,2% de fêmeas no lote. Hopkins et al. (1979) obteve 90% do lote fêmeas utilizando 17- α -etinilestradiol em uma dieta em combinação com metallibure e acetato de ciproterona.

Mélard, (1995) utilizando o hormônio 17- α -etinilestradiol em *O. aureus* obtiveram 94% fêmeas e com estudo de progênes foram obtidos resultados de 18 a 95% de neofêmeas. Mair et al. (1995) observaram variabilidade 8,7 a 93,4% de neofêmeas quando aplicaram um tratamento com esteroides 17- α -etinilestradiol + metallibure.

A feminilização de tilápia através do hormônio estrógeno 17- β -estradiol teve baixo sucesso, no entanto possui o potencial de feminilização em tilápias, demonstrando potencial.

6. CONCLUSÃO

O uso hormônio estrógeno 17- β -estradiol, demonstrou-se promissor na indução de neofêmeas de tilápia, necessitando estudos aprofundados de tempo e quantidade na dieta.

A determinação do sexo genótipo através de *primers* de amplificação de regiões dos genes *amhy* e *amhA-y* demonstraram eficiência, na identificação do cromossomo Y e um potencial na identificação de genótipos em tilápia.

7. REFERENCIAS

Abo-Al-Ela, Haitham G. Hormones and fish monosex farming: A spotlight on immunity. *Fish & Shellfish Immunology*, v. 72, p. 23-30, 2018.

Abucay, Jose S. et al. Environmental sex determination: the effect of temperature and salinity on sex ratio in *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture*, v. 173, n. 1-4, p. 219-234, 1999.

Almeida, Iassudara Garcia de. Prospecção de marcadores moleculares sexo-específicos e análise de estrutura populacional de pirarucu (*Arapaima gigas*) na região de Santarém, Pará. 2012.

Associação Brasileira de Piscicultura – PeixeBR. Anuário PeixeBR da Piscicultura, Brasil 2016.

Associação Brasileira de Piscicultura – PeixeBR. Anuário PeixeBR da Piscicultura, Brasil 2023.

Avtalion, R. R., and J. Don. "Sex-determining genes in tilapia: a model of genetic recombination emerging from sex ratio results of three generations of diploid gynogenetic *Oreochromis aureus*." *Journal of fish biology* 37.1 (1990): 167-173.

Bardhan, A., Sau, S.K., Khatua, S., Bera, M., Paul, B.N. A review on the production and culture techniques of monosex Tilapia *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 10 (1) (2021), pp. 565-577, 10.20546/ijcmas.2021.1001.069.

- Beardmore, J.A., Mair, G.C., Lewis, R.I.** Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: applications, problems and prospects. *Aquaculture*, v.197, p.283-301, 2001.
- Biswas, A.K., Morita, T., Yoshizaki, G., Maita, M., Takeuchi, T.** Control of reproduction in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) by photoperiod manipulation *Aquaculture*, 243 (1–4) (2005), pp. 229-239, 10.1016/j.aquaculture.2004.10.008.
- Bombardelli, Robie Allan; Hayashi, Carmino.** Feminilização de larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) a partir de banhos de imersão com valerato-de-estradiol. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 34, p. 357-364, 2005.
- Borges, Adalmyr Morais.** Efeito da temperatura da água na produção de populações monossexo de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) da linhagem chitralada. 2004. Tese de Doutorado. UnB.
- Budd, A.M., Banh, Q.Q., Domingos, J.A., Jerry, D.R.** Sex control in fish: approaches, challenges and opportunities for aquaculture *J. Mar. Sci. Eng.*, 3 (2) (2015), pp. 329- 355, 10.3390/jmse3020329
- Bunthawin, Sakshin et al.** Monosex-Male Sex Reversal of Nile Tilapia Eggs Using PulseElectric Field Inductions. *Journal of Computational and Theoretical Nanoscience*, v. 12, n. 5, p. 724-728, 2015.
- Casalini, M., Agbali, M., Reichard, M., Konecna, A., Bryjova, C.** Male dominance, female mate choice, and intersexual conflict in the rose bitterling (*Rhodeus ocellatus*) *Evolution*, 63 (2) (2009), pp. 366-376, 10.1111/j.1558-5646.2008.00555.x.
- Hoga, C. A., Almeida, F. L., Reyes, F. G.** A review on the use of hormones in fish farming: Analytical methods to determine their residues *CyTA - Journal of Food*, 16 (1) (2018), pp. 679-691, 10.1080/19476337.2018.1475423.
- HOPKINS, Kevin D.; SHELTON, William L.; ENGLE, Carole R.** Estrogen sex-reversal of *Tilapia aurea*. *Aquaculture*, v. 18, n. 3, p. 263-268, 1979.
- Hughes, D. G.; Behrends, L. L.** Mass production of *Tilapia nilotica* seed in suspended net enclosures. In: *Tilapia Aquaculture. Proceedings of the International Symposium on Tilapia Aquaculture*, Israel Tel Aviv University, Nazareth. 1983. p. 394-401.
- Kubitza, Fernando; CAMPOS, J. L.** Aquicultura no Brasil. Conquistas e Desafios. *Panorama da Aquicultura*, v. 25, n. 150, p. 11-13, 2015.
- Kubitza, Eng Agr Fernando; kubitza, Méd Vet Ludmilla MM.** TILÁPIAS. 2000.
- Li M, Sun Y, Zhao J, Shi H, Zeng S, Ye K, et al.** (2015) A Tandem Duplicate of AntiMüllerian Hormone with a Missense SNP on the Y Chromosome Is Essential for

Male Sex Determination in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. PLoS Genet 11(11): e1005678. doi:10.1371/journal.pgen.1005678

Lundstedt, L. M.; Leonhardt, J. H.; Dias, A. L. Alterações morfológicas induzidas pela reversão sexual em tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1757). Revista Unimar, v. 19, n. 2, p. 461-472, 1997.

Mair, Graham C. et al. Ensaios de desempenho de crescimento de tilápias geneticamente masculinas (GMT) derivadas de machos YY em *Oreochromis niloticus* L.: Comparações em estação com populações de machos mistos e sexo invertido. Aquicultura, v. 137, n. 1-4, pág. 313-323, 1995.

Mair, G. C.; Little, D. C. Population control in farmed tilapias. 1991.

Makino, Lilian Cristina et al. Efetividade de métodos de identificação sexual em tilápiasdo-nilo (*Oreochromis niloticus*) revertidas sexualmente com hormônio em ração com diferentes granulometrias. Bioscience Journal, p. 112-121, 2009.

Mlalila, N., Mahika, C., Kalombo, L., Swai, H., Hilonga, A. Segurança alimentar humana e riscos ambientais associados ao uso de metiltestosterona e outros esteróides na produção de tilápia totalmente masculina. Ciência Ambiental e Poluição Research, 2015, 22, 4922 - 4931.

Mei, Jie; Gui, Jian-Fang. Genetic basis and biotechnological manipulation of sexual dimorphism and sex determination in fish. Science China Life Sciences, v. 58, p. 124-136, 2015.

Mélard, C. Production of a high percentage of male offspring with 17- α -etinilestradiol sex-reversed *Oreochromis aureus*. I – Estrogen Sex-reversal and production of F2 pseudofemales. Aquaculture, v.130, p.25-34, 1995.

Novelo, N. D., Gomelsky, B.; Coyle, S. D., & Kramer, A. G. Evaluation of growth, sex (maleproportion; sexual dimorphism), and color segregation in four cross combinations of different strains of XX female and YY male Nile tilapia. Journal of the World Aquaculture Society, 2020, 52, 445– 456 <https://doi.org/10.1111/jwas.12742>. Phelps, R.P. Manipulação hormonal do sexo . Em CE Lim & CD. Webster (Eds.), Tilapia: Biology, cultura, e nutrição (pp. 211 - 252). Binghamton, 2006, NY: The Haworth Press, Inc.

Piferrer, Francesc. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. Aquaculture, v. 197, n. 1-4, p. 229-281, 2001.

- Phelps, R.P.** Manipulação hormonal do sexo . Em CE Lim & CD. Webster (Eds.), *Tilapia: Biology, cultura, e nutrição* (pp. 211 - 252). Binghamton, 2006, NY: The Haworth Press, Inc.
- Popma, Thomas J.; Green, Bartholomew Wright.** Sex reversal of tilapia in earthen ponds. 1990.
- Rosenthal, G. G., Evans, C.S.** Female preference for swords in *Xiphophorus helleri* reflects a bias for large apparent size. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 95 (8) (1998), pp. 4431-4436, 10.1073/pnas.95.8.4431.
- Siddiqui, A. Q.; Al-Harbi, A. H.** Effects of sex ratio, stocking density and age of hybrid tilapia on seed production in concrete tanks in Saudi Arabia. *Aquaculture International*, v. 5, n. 3, p. 207-216, 1997.
- Turra, E. M. et al.** Controle reprodutivo em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) por meio de manipulações sexuais e cromossômicas. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 34, n. 1, p. 21-28, 2010.
- Ventura, T.** Monosex in aquaculture M. Kloc, J.Z. Kubiak (Eds.), *Marine Organisms as Model Systems in Biology and Medicine*, Springer International Publishing, Cham (2018), pp. 91- 01.
- Wang, M., Lu, M.** Tilapia polyculture: A global review *Aquaculture research*, 47 (8) (2016), pp. 2363-2374, 10.1111/are.12708.
- Yamazaki, Fumio.** Sex control and manipulation in fish. *Aquaculture*, v. 33, n. 1-4, p. 329-354, 1983.