



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL**  
**CAMPUS LARANJEIRAS DO SUL**  
**ENGENHARIA DE AQUICULTURA**

**LUIZ VITOR MAXIMOWSKI**

**CARACTERIZAÇÃO MICROSCÓPICA DO DESENVOLVIMENTO DE GÔNADAS  
DE TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*)**

**LARANJEIRAS DO SUL**  
**2022**

**LUIZ VITOR MAXIMOWSKI**

**CARACTERIZAÇÃO MICROSCÓPICA DO DESENVOLVIMENTO DE GÔNADAS  
DE TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*)**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Engenharia de Aquicultura como requisito para **obtenção do título de bacharel em Engenharia de Aquicultura.**

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> PhD Silvia Romão

### **Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS**

Maximowski, Luiz Vitor  
Caracterização Microscópica do desenvolvimento de  
gônadas de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) /  
Luiz Vitor Maximowski. -- 2022.  
28 f.:il.

Orientadora: Pós doutora Silvia Romão

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -  
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de  
Bacharelado em Engenharia de Aquicultura, , 2022.

I. Romão, Silvia, orient. II. Universidade Federal da  
Fronteira Sul. III. Título.

**LUIZ VITOR MAXIMOWSKI**

**CARACTERIZAÇÃO MICROSCÓPICA DO DESENVOLVIMENTO DE GÔNADAS  
DE TILÁPIA DO NILO (*OREOCHROMIS NILOTICUS*)**

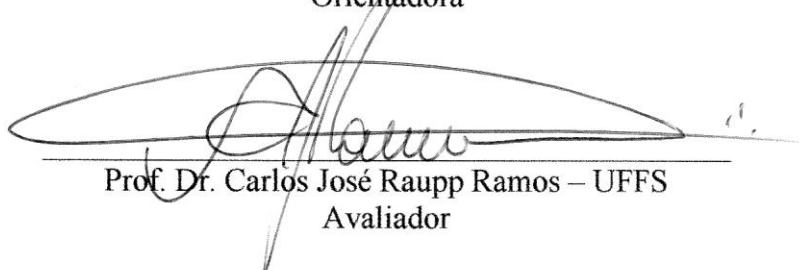
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Engenharia de Aquicultura da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito para obtenção do título de bacharel em Aquicultura.

Este trabalho foi defendido e aprovado pela banca em 07/05/2022.

BANCA EXAMINADORA



Prof.ª PhD Silvia Romão – UFFS  
Orientadora



Prof. Dr. Carlos José Raupp Ramos – UFFS  
Avaliador



Prof. Ms. Alexandre Monkolski – UFFS  
Avaliador

Dedico este trabalho aos meus pais e meus familiares, que não pouparam esforços para que eu pudesse concluir meus estudos, sendo os meus maiores motivos para nunca desistir.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, aos meus pais, Luiz Carlos Maximowski e Eliane Aparecida Psibilski Maximowski por toda ajuda e apoio que recebi durante o período da graduação, e aos meus irmãos que sempre estão presentes em minhas realizações.

A minha orientadora Prof.a Dra. Silvia Romão, que incentivou muito e sempre me apoiou e colaborou nos momentos mais difíceis da graduação, com muita paciência e disponibilidade de seu tempo para construção desse trabalho e demais disciplinas cursadas.

A toda equipe do laboratório de bioquímica e Genética da Universidade Federal da Fronteira Sul, em especial a professora Luisa Helena Cazarolli, que me orientou durante 4 anos em bolsas de iniciação científica e também por ter disponibilizado o espaço para transcorrer as análises, a quais foram muito importantes para a construção do trabalho e também para meu desenvolvimento pessoal e acadêmico.

A toda equipe da Cooperativa agroindustrial Consolata (COPACOL), por ter fornecido os materiais necessários para a realização desse trabalho.

A todos os meus colegas que de alguma forma, marcaram essa caminhada durante esses longos 5 anos de graduação, que foram de muitas batalhas pessoais e amadurecimento.

A todos os amigos que conquistei ao longo desses 5 anos, os quais jamais esquecerei e que sempre terão um lugar especial em meu coração.

A todas as pessoas que de alguma forma participaram direta ou indiretamente para a realização do meu sonho da graduação e para a construção desse trabalho, o meu mais sincero, obrigado.

## RESUMO

A aquicultura, é o setor da produção agropecuária que mais cresce em todo o mundo. A Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), apresenta grande aptidão para a criação em sistemas aquaculturais, sendo que criações monossexo apresentam melhor rendimento devido à ausência de reprodução e maior taxa de crescimento dos machos, sendo obtidos principalmente utilizando hormônios masculinizantes. A identificação da eficiência do procedimento de reversão é de extrema importância para tomada de decisões no próprio processo de reversão, assim como no controle de fases juvenis no sistema de engorda. O presente estudo, objetiva caracterizar visualmente o tecido gonadal em desenvolvimento e desenvolvido pelos animais após período de ingestão de hormônio andrógeno sintético 17 $\alpha$ -Metiltestosterona, assim como produzir kit de lâminas permanentes e documentação fotográfica para a diferenciação dos sexos. O ensaio foi conduzido na Unidade de Produção de Alevinos da Cooperativa Agroindustrial Consolata na cidade de Nova Aurora- PR. Após o desenvolvimento embrionário inicial, larvas de tilápia foram submetidas a alimentação com dieta contendo 17 $\alpha$  – Metiltestosterona em 3 HAPAS contendo um volume de 1.000 L. As análises foram realizadas no laboratório de Bioquímica e Genética da Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Laranjeiras do Sul. O sistema foi instalado em estufa aquícola com aeração constante por meio de aeradores de pás. A ração utilizada, foi do tipo pó e feito a incorporação do hormônio 17 $\alpha$  – Metiltestosterona, na dosagem de 60 mg/kg de ração. Os animais foram alimentados por 55 dias e após coleta, foram anestesiados utilizando benzocaína a 1% e posteriormente, armazenados em solução de formol a 10% e realizado preparação para análise direta, utilizando corante Aceto-Carmim e processamento histológico com inclusão em parafina, corte e coloração com Hematoxilina e eosina. As análises foram realizadas em microscopia de luz. Foi possível a visualização de estruturas características e determinantes dos dois sexos, como ovócitos (caracterização do sexo feminino) e túbulos seminíferos (caracterização do sexo masculino), porém os tecidos gonadais não apresentaram uniformidade no grau de maturação, sendo necessário a realização de análise completa da gônada para identificação de regiões com tecido gonadal característico do sexo.

Palavras-chave: Tilápia; Reversão Sexual; Coloração; *Oreochromis*.

## ABSTRACT

Aquaculture is the fastest growing sector of agriculture worldwide. The Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) shows great aptitude for farming in aquacultural systems, and monosex farming yields better outputs due to the lack of reproduction and higher growth rates of males achieved mainly through masculinizing hormones. Assessing the efficiency of sex reversal procedures is very important for decision making during the process itself and for control of early fattening phases. This study aims to visually characterize developing and developed gonadal tissues of the animals after a period of ingestion of the synthetic androgynous hormone 17 $\alpha$ -methyltestosterone and to produce photographic documentation of sexual differentiation. The essay was conducted at the Fish Seed Production Facility of Consolata Agro-industrial Cooperative located in Nova Aurora, Paraná State, Brazil. After the initial embryony development, tilapia larvae were fed a diet containing 17 $\alpha$ -methyltestosterone in three hapa nets with a volume of one thousand liters (1000 L) each. The analyses were carried out at the Biochemistry and Genetics laboratory of the Federal University of Fronteira Sul (UFFS), on the Laranjeiras do Sul campus. The system was installed in an aquaculture greenhouse with constant aeration provided by paddle aerators. The type of fish feed used was powder, and the hormone 17 $\alpha$  – methyltestosterone was added at the ratio of 60mg/kg of feed. The animals were fed for 55 days and after harvest they were anesthetized with 1% benzocaine and later stored in a 10% formalin solution. Preparations for direct analysis were made with acetocarmine dye, paraffin embedding for histological processing and hematoxyline and eosine staining. Analyses were carried out with light microscope. It was possible to visualize characteristic and determinant structures of both sexes, such as oocytes (female sex characterization) and seminiferous tubules (male sex characterization), but the gonadal tissues did not present uniformity in their degree of maturation, being necessary the complete gonad analysis in order to identify regions with gonadal tissue characteristic of the sex.

Keywords: Tilapia; Sex Reversal; Coloring; *Oreochromis*.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Conjunto de lâminas permanentes de gônadas de Tilápia do Nilo, que servirão como material de apoio, organizadas com os dois métodos empregados (Acetato-Carmim e HE) .....	20
Figura 2 – Fotomicrografia de ovário de Tilápia-do-Nilo com 55 dias de suplementação. Ampliação 100 x (A) e 400 x (B). Coloração: acetato-carmim .....	22
Figura 3 – Fotomicrografia de ovário de Tilápia-do-Nilo com 55 dias de vida. Ampliação: 100 x. Coloração: acetato-carmim .....	23
Figura 4 – Fotomicrografia de ovário de Tilápia-do-Nilo com 55 dias de vida. Ampliação microscópio: 400 x (2x digital). Coloração: acetato-carmim .....	23
Figura 5 – Fotomicrografia de testículo de Tilápia-do-Nilo com 55 dias de vida. Ampliação: 100 x (A) 400 x (B). Coloração: acetato-carmim .....	24
Figura 6 – Fotomicrografia de ovário de Tilápia-do-Nilo com 55 dias de vida. Ampliação: 400 x. Coloração: HE .....	25
Figura 7 – Fotomicrografia de testículo de Tilápia-do-Nilo com 55 dias de suplementação. Ampliação: 400 x. Coloração: HE .....	26

## LISTA DE ABREVIATURAS

FAO	Food and Agriculture Organization of The United Nations
GIFT	Genetic Improvement of Farmed Tilápia
HE	Hematoxilina e Eosina
Kg	Kilograma
L	Litro
Mg	Miligrama
ml	Mililitro
UFFS	Universidade Federal da Fronteira Sul
UPA	Unidade de Produção de Alevinos
COPACOL	Cooperativa Agroindustrial Consolata
µm	Micrometros

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVO .....	14
2.1. OBJETIVO GERAL .....	14
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	14
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>15</b>
3.1. IMPORTÂNCIA DA REVERSÃO SEXUAL NA PRODUÇÃO DE TILÁPIA .....	15
3.2. SEXAGEM X EFICIÊNCIA DE REVERSÃO SEXUAL .....	16
4. METODOLOGIA.....	18
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>19</b>
5.1. ANÁLISE COM ACETATO-CARMIM.....	21
5.2. ANÁLISE HISTOLÓGICA .....	24
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>29</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A aquicultura, é o setor da produção agropecuária que mais cresce em todo o mundo, sendo contabilizado no último censo, cerca de 82 milhões de toneladas de produção (FAO, 2020). Isso nos mostra a sua importância relacionada com a produção de alimentos e geração de empregos. Esse crescimento vem atrelado com questões ambientais de preservação dos estoques naturais, afim de diminuir a captura e aumentar o cultivo.

Com o aumento da produção, foi necessária uma modernização tecnológica para o setor, utilizando meios para que pudesse produzir mais no mesmo espaço. A tecnologia faz seu papel de desenvolvimento de áreas que antes eram primitivas e que dependem de uma modernização para evoluírem. Em sistemas de alta produção, o melhoramento genético de espécies foi fundamental para que se efetivasse tal acontecimento, pois segundo Resende *et al.* (2008), os trabalhos aplicados na tilápia GIFT e demais espécies, mostraram ganhos de 15% em relação a taxa de crescimento por geração, sendo muito superior ao relatado para animais terrestres.

A Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é uma espécie muito apreciada por apresentar carne de ótima qualidade e boa aceitação no mercado, em especial o seu gênero, apresenta grande aptidão para a criação em sistemas aquaculturais, oferecendo características relacionadas com o bom desenvolvimento e a rusticidade ao manejo em geral (PEIXE BR, 2021).

A Tilápia é a espécie mais cultivada no estado do Paraná, fazendo com que o Brasil se torne o quarto maior produtor de peixes de cultivo do mundo, com a produção de 802.930 t. Com isso, é necessário que se obtenha conhecimento e tecnologias para elevar ainda mais os números de produção (PEIXE BR, 2021).

Nakaghi *et al.* (2009) nos diz que a espécie apresenta desenvolvimento precoce do sistema reprodutor, acarretando em altas taxas de reprodução, fazendo com que aflore populações de indivíduos indesejados e com isso disputando recursos essenciais, como espaço, oxigênio e alimento. Na busca de maneiras de contornar tal adversidade, a reversão sexual é amplamente utilizada como alternativa mediadora.

A reversão ou inversão sexual de fêmeas para machos é aplicado diretamente no campo voltado para produção, devido ao melhor desempenho, rendimento de filé e precocidade dos machos em relação as fêmeas, assim como por prejuízos relacionados aos

instintos maternos que levam ao baixo consumo de ração, por fêmeas, em determinadas épocas do ano e o desvio de nutrientes importantes para o crescimento, redirecionados para os ovários (MAKINO, 2009). Segundo Albino (2020), o método de reversão é aplicado em período específico de desenvolvimento do animal, priorizando o momento antecedente a definição do tecido gonadal. É possível realizar tal ação de várias maneiras, como choques de temperatura, imersão em hormônio, e também a aplicação de hormônios na cavidade peritoneal da fêmea, porém a mais confiável e assertiva é a administração de hormônio androgênico por via oral.

O hormônio utilizado para reversão sexual, é o  $17\alpha$ -Metiltestosterona, o qual possui a vantagem de poder ser metabolizado facilmente após período de suplementação, assim não deixando compostos residuais no final do processo. Com a utilização deste hormônio é possível tornar quase que na totalidade, o lote de indivíduos geneticamente fêmeas, fenotipicamente machos, assim desenvolvendo tecido gonadal masculino (testículos) ao invés de tecido gonadal feminino (ovários) (ALBINO, 2020).

Devido a administração do hormônio ser realizada em animais muito jovens, existe a dificuldade de identificação visual precisa dos tecidos formados após o processo de reversão, isso por apresentar-se de pequeno tamanho e não apresentar definição em todas as estruturas. E com isso, segundo Makino (2009), faltam formas de análises que sejam eficazes no processo de distinguir os tecidos gerados, sendo uma necessidade dispor de pessoal capacitado e material de apoio para que a definição do sexo e, portanto, da eficiência do processo de reversão, seja identificada.

Um dos entraves da correta sexagem é o baixo nível de conhecimento dos aspectos morfológicos relacionados com a gônada dos animais em fase precoce de desenvolvimento. O treinamento a nível técnico é de grande importância para a atividade, pois a correta determinação do sexo, e, portanto, de eficiência da reversão sexual garante redução de custos e credibilidade às fazendas de alevinagem. Porém, a necessidade de redução dos custos de produção geralmente leva a baixa valorização dos profissionais relacionados a atividade, causando grande rotatividade de profissionais, com baixo nível de conhecimento técnico relacionado a análise morfológica. Além disso, disponibilização de material fotográfico indicando estruturas que sejam determinantes no momento da identificação, é de grande importância, devido auxiliar no momento da visualização.

Observa-se que há uma lacuna em relação a materiais orientadores para a correta identificação dos tecidos gonadais nas etapas mais precoces do desenvolvimento dos tecidos gonadais. O presente estudo, objetiva caracterizar visualmente o tecido gonadal em

desenvolvimento e desenvolvido pelos animais após período de ingestão de hormônio andrógeno sintético 17 $\alpha$ -Metiltestosterona, assim como produzir documentação fotográfica, avaliando aspectos do desenvolvimento gonadal que sejam importantes para a diferenciação dos sexos.

## **2.OBJETIVO**

### **2.1.OBJETIVO GERAL**

Estudar o desenvolvimento gonadal de tilápias do Nilo *O. niloticus*, após reversão sexual com 17 $\alpha$  – Metiltestosterona.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Descrever os aspectos da diferenciação gônadas de *O. Niloticus*, na presença de procedimento de reversão sexual de larvas com 17 $\alpha$  – Metiltestosterona, utilizando método microscópico após processamento histológico, corte e coloração com Hematoxilina e eosina.

- Descrever os aspectos de diferenciação gonadal de *O. Niloticus* , na presença de procedimento de reversão sexual de larvas com 17 $\alpha$  – Metiltestosterona, utilizando método microscópico após montagem direta e coloração Acetato-Carmim

- Montar Atlas histológico formado de material fotográfico de apoio e uma caixa de 10 lâminas a ser apresentado às empresas produtoras de juvenis de *O. Niloticus*.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1. IMPORTÂNCIA DA REVERSÃO SEXUAL NA PRODUÇÃO DE TILÁPIA

Um dos entraves da tilapicultura é a questão da sua reprodução, devido a maturidade sexual iniciar muito cedo na espécie, tornando-se um problema durante a criação, pois indivíduos de 20 a 30 g e cerca de 4 a 5 meses após eclosão são capazes de se reproduzir, o que ocasiona prejuízos em toda a cadeia do pescado (MAKINO, 2005).

Uma das formas de evitar essa situação, é homogeneizar o lote com apenas um sexo fenotípico, por meio da reversão ou inversão sexual utilizando métodos que se baseiam na temperatura e hormônio. Pode ser feito também a seleção dos indivíduos por meio da diferenciação da papila urogenital. Entre os cuidados relacionados a alevinagem da tilápia, atenção especial deve ser dada ao período de reversão, devido a porcentagem no custo final em que ela participa, podendo chegar a 13,5% (SCHULTER; FILHO, 2017).

A reversão através de hormônio pode ser feita por meio da ingestão ou por banhos em ambiente que contenha o composto diluído. Quando feita pelo método de ingestão ele é incorporado na ração podendo ser com várias concentrações, sendo o nível de 60 mg/kg de ração a mais recomendada na fase larval, pós consumo do saco vitelínico (MAKINO, 2005). Após ele entrar no organismo do animal no tempo correto, ele irá induzir o desenvolvimento de testículos ao invés de ovários. O hormônio masculino testosterona age no organismo como agente masculinizante e também como agente anabolizante, que induz desenvolvimento muscular. O hormônio etiniltesterona também pode ser usado com o mesmo fim, porém, a disponibilidade e a eficácia da testosterona sintética acabaram reduzindo sua importância e fazendo com que não fosse desenvolvido estudos para garantir seu uso em grande escala (RIBEIRO, 1996).

A administração do hormônio deve ser seguida rigorosamente, pois se ultrapassar o tempo e a dosagem pode acontecer o fenômeno do “efeito paradoxal feminilizante”, onde o excesso da testosterona é convertida em estrogênio por meio da enzima aromatase, podendo levar os animais a serem geneticamente machos, porém fenotipicamente fêmeas e até mesmo o hermafroditismo (MAKINO, 2005).

O modo de reversão por banho foi uma das maneiras utilizadas nos primórdios da

técnica, porém seu uso foi sendo deixado de lado conforme foi demonstrado que a ingestão alcança melhores resultados em ambiente comercial. A vantagem em utilizar o método de banho é que com o hormônio dissolvido no ambiente torna-se mais fácil o seu tratamento utilizando compostos químicos, ou carvão ativado para sua degradação (DIAS-KOBERSTEIN, 2007).

### 3.2. SEXAGEM X EFICIÊNCIA DE REVERSÃO SEXUAL

A correta sexagem de uma amostra do lote de juvenis produzidos é de grande importância não só para medir a eficiência do processo de reversão, mas também para definição de metodologia de controle a ser utilizada no período de engorda. A porcentagem de machos e fêmeas no lote define a população de animais predadores que serão introduzidos no ambiente de criação para eventual controle de reproduções (LEONHARDT, 1997).

A sexagem pode ser realizada por diferentes métodos. A sexagem pela papila urogenital é realizada a partir de observação direta. Este método consiste em manipular o animal para que fique evidente qual é a forma de sua papila, assim, selecionando os machos e descartando as fêmeas. O entrave desse método é que não proporciona alta confiabilidade em seus resultados, pois se os animais não forem submetidos ao tempo correto de reversão e a dosagem, ele apresentará papila positiva para macho, porém seu tecido gonadal poderá ser feminino, devido ocorrer somente a modificação externa do animal. E também por necessitar de manipulação, ele acaba elevando os níveis de estresse, deixando os animais com sistema imunológico debilitado (MAKINO, 2005).

Para sexagem por microscopia óptica as amostras devem ser fixadas logo após a coleta, sendo que não podem ser congeladas, devido a criação de cristais de gelo, romper membranas danificando o material. Elas devem ser fixadas em formol a 10% em um período de 10 dias em temperatura ambiente. No momento da inclusão em parafina, as amostras devem ser desidratadas com etanol, e após faz-se a montagem dos blocos, os cortes são realizados em micrótomo a uma espessura de 5µm lamínula e posteriormente distribuídos em lâminas histológicas submetidas a coloração Hematoxilina e Eosina e montagem com resina e lamínula. Para a observação microscópica direta é utilizada a coloração utilizando Acetato-Carmim, em material a fresco ou fixado. As gônadas são esticadas sobre a lâmina, e é feito o gotejamento do corante. Após isso é realizado leve pressão para que se espalhe e possa atingir o maior



número de estruturas possíveis. Esse procedimento é finalizado quando a lâmina é observada em microscópio de luz (MAKINO, 2009)

A identificação microscópica por análise direta é mais utilizada como método de sexagem, sendo mais preciso que o método de identificação das papilas urogenitais, porém apresenta dificuldades relativas a habilidade do analista de identificação das diferenças histológicas das gônadas femininas e masculinas. A análise após processamento histológico é mais precisa, contudo apresenta maior custo e necessidade de equipamentos e profissionais especializados (MAINARDES-PINTO, 2000; MAKINO, 2009; NAKAGHI *et al.*, 2009).

A sexagem das gônadas necessita ser realizada no período mais próximo da reversão sexual pelo fato de que ela determinará quais intervenções serão realizadas no momento em que esses animais passarão pelo período de engorda, para que se tenha controle de reprodução indesejada nos viveiros, aumentando os custos de produção e também desvios relacionados com a padronização do lote (MAINARDES-PINTO, 2000). Devido a isso, a eficiência dessas análises é crucial, necessitando de recursos que auxiliem no diagnóstico determinado.

Na determinação do sexo, a análise microscópica das gônadas será observada células e arranjos característicos de cada sexo. As fêmeas, serão identificados ovócitos em várias fases de desenvolvimento, característico de desova parcelada assincrônica. Os machos têm por característica apresentar formação de numerosos túbulos seminíferos, onde, são encontrados cistos contendo células germinativas e somáticas na borda do lóbulo sendo uma das formações mais relevantes no momento da diferenciação (MAKINO, 2005).

Os métodos existentes para realizar a diferenciação do sexo, são eficazes, porém é necessário que sejam realizados por mão de obra especializada, pois a probabilidade de erros aumenta, devido o material ser muito pequeno, e suas estruturas apresentam baixa definição pela precocidade do tecido, assim como a possibilidade de ocorrência de animais intersexo. Há materiais fotográficos que demonstram tal diferenciação, contudo a maioria traz conteúdos relacionados com tecidos maduros, os quais se tornam diferentes quando comparados as formas jovens, sendo uma lacuna que demanda preenchimento.

Dentre as colorações aplicadas nas gônadas ainda em fase desenvolvimento, a com Acetato-Carmim oferece a vantagem em ser de baixo custo e uma maior facilidade para realizá-la, porém seu nível de confiabilidade é baixo quando utilizadas nos tecidos prematuros. Por outro lado, o método histológico de inclusão em parafina, proporciona um resultado que gera maior segurança na confirmação dos dados encontrados. Seu ônus está no tempo maior para realização do processo, os equipamentos utilizados para confecção do material e o emprego de maior custo, quando comparado a outros métodos.

Como forma de minimizar tais problemas apresentados, é importante a criação e disponibilização de descrição morfológica e documentação fotográfica das gônadas femininas e masculinas e também, organização de documentos com objetivo de informar e orientar os profissionais que realizam tal atividade, como realizar corretamente em seus diagnósticos finais no momento da sexagem, independentemente de quais métodos estão sendo empregados na análise do material.

#### 4. METODOLOGIA

O experimento foi conduzido na Unidade de Produção de Alevinos (UPA) da Cooperativa Agroindustrial Consolata (COPACOL) na cidade de Nova Aurora- PR. As análises que foram realizadas no laboratório de Bioquímica e Genética da Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Laranjeiras do Sul.

Ovos embrionados foram coletados em viveiros utilizados para reprodução e transferidos para incubadoras no interior do laboratório da UPA. Após a eclosão dos ovos, as larvas foram transferidas para hapas de 1000 L, instalados em diferentes estufas aquícolas com aeração constante por meio de aeradores de pás, onde foi realizado tratamento com hormônio para o procedimento de reversão sexual. As 15.000 larvas foram separadas em 6 hapas, sendo 3 controles (sem tratamento hormonal), e 3 submetidas ao tratamento hormonal. Foi realizado a coleta após 55 dias de vida, sendo desses, 28 dias o período de suplementação e, feito a retirada de 40 animais por hapa, totalizando, somando os dois sistemas (0 hormônio e de 60 mg/kg de ração do hormônio 17 $\alpha$  – Metiltestosterona), 240 larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

A ração utilizada, foi do tipo pó e para incorporação do hormônio 17 $\alpha$  – Metiltestosterona, utilizou-se 500 ml de álcool etílico 95% para diluição de 60 mg/kg de ração, devido o composto ser hidrofóbico. Após isso foi adicionado a ração e passou por um processo de mistura em betoneira própria para a função, afim de homogeneizar a mistura. A alimentação foi dividida em 8 vezes ao dia, com o arraçoamento sendo calculado a partir da biomassa estocada, sendo os níveis utilizados 30%, 20%, 10% e 8%. Para verificar desenvolvimento e período de ajustes na quantidade de ração, foi realizado biometrias semanais durante todo o

processo. Após coleta, os animais foram eutanasiados por aprofundamento do estado anestésico utilizando benzocaína a 1% e posteriormente, armazenados em solução de formol a 10%.

Foram realizadas análises do estágio de desenvolvimento gonadal utilizando método direto com coloração Acetato-Carmim, onde o procedimento ocorreu de forma que o tecido passou por etapas contendo próprio corante (Acetato-Carmim), álcool na concentração de 70 e 99%, e para finalização, xilol, sendo organizado em lâmina de forma que fosse possível fazer a fixação com resina histológica e lamínula. O processamento histológico, foi realizado seguindo algumas etapas como a desidratação dos órgãos através de série alcoólica crescente, diafanização em xilol, impregnação e inclusão em parafina (BEÇAK; PAULETE, 1976). Após esta etapa, os blocos de parafina foram cortados em micrótomo, posteriormente desparafinizados com xilol e hidratados com série alcóolica decrescente e corados pela ação combinada de Hematoxilina de Harris e Eosina (HOROBIN; BANCROFT, 1998; SABOTTA; WELSCH, 2002). As lâminas foram analisadas em microscópio e a documentação fotográfica também realizada em microscópio fotográfico.

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

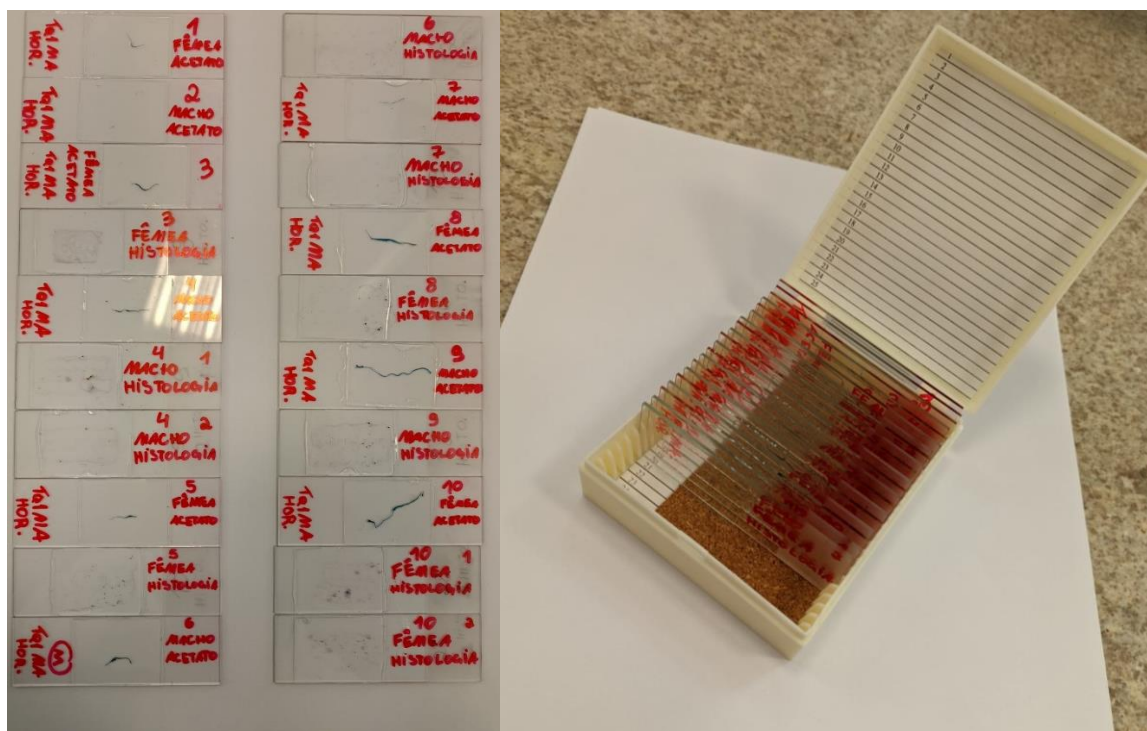
A sexagem de juvenis de tilápia por análises microscópicas de gônadas preparadas por processamento histológico é o método mais preciso utilizado para identificar eficiência do processo de reversão hormonal para produção de cultivos de peixes monosexo. As limitações impostas pelo alto custo desse procedimento aliado a necessidade de profissionais capacitados, determina o uso mais frequente do método de identificação microscópica por análise direta de gônadas inteiras coradas com acetato-carmim (MAINARDES-PINTO, 2000; MAKINO, 2009; NAKAGHI, 2009). Independentemente do método escolhido, existem indicações de dificuldades relativas à habilidade do analista de identificação das diferenças histológicas das gônadas femininas e masculinas.

Com esse trabalho buscou-se comparar os métodos de identificação de tecidos a partir de dois métodos, análise microscópica direta de gônadas inteiras coradas com corante Acetato-Carmim e análise de cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina, apontando dificuldades encontradas e formas de interpretação e diagnóstico para sexagem de animais

submetidos a tratamento hormonal para reversão sexual. Ao final, obteve-se lâminas permanentes de gônadas preparadas a partir dos dois métodos (Figura 1) e material fotográfico foi produzido e preparado para ser utilizado por laboratórios para auxiliar na correta identificação gonadal pelos dois procedimentos executados.

O controle da reversão sexual é otimizado com uma acurada análise dos tecidos gonadais, e por essa razão foram selecionados 80 animais com 55 dias de vida, que passaram por um período de 28 dias de suplementação com hormônio  $17\alpha$  – Metiltestosterona, onde chegou-se a uma reversão sexual de 97,5%, sendo encontrado apenas 1 fêmea no grupo amostral, o que nos mostra que obteve-se um bom índice de reversão, pois segundo Leonhardt (1997), quando utilizado a dosagem de 60 mg/kg de  $17\alpha$ -metiltestosterona, na suplementação de tilápia do Nilo durante 28 dias, deve-se obter taxas de reversão para machos entre 97 a 100%.

Figura 1 – Conjunto de lâminas permanentes de gônadas de Tilápia do Nilo, que servirão como material de apoio, organizadas com os dois métodos empregados (Acetato-Carmim e Hematoxilina e Eosina (HE)).



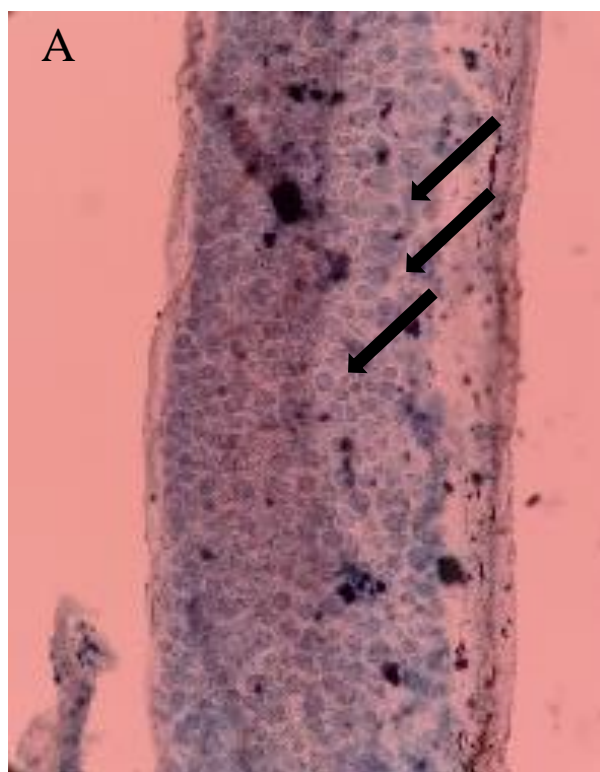
Fonte: Maximowski, 2022

## 5.1. ANÁLISE COM ACETATO-CARMIM

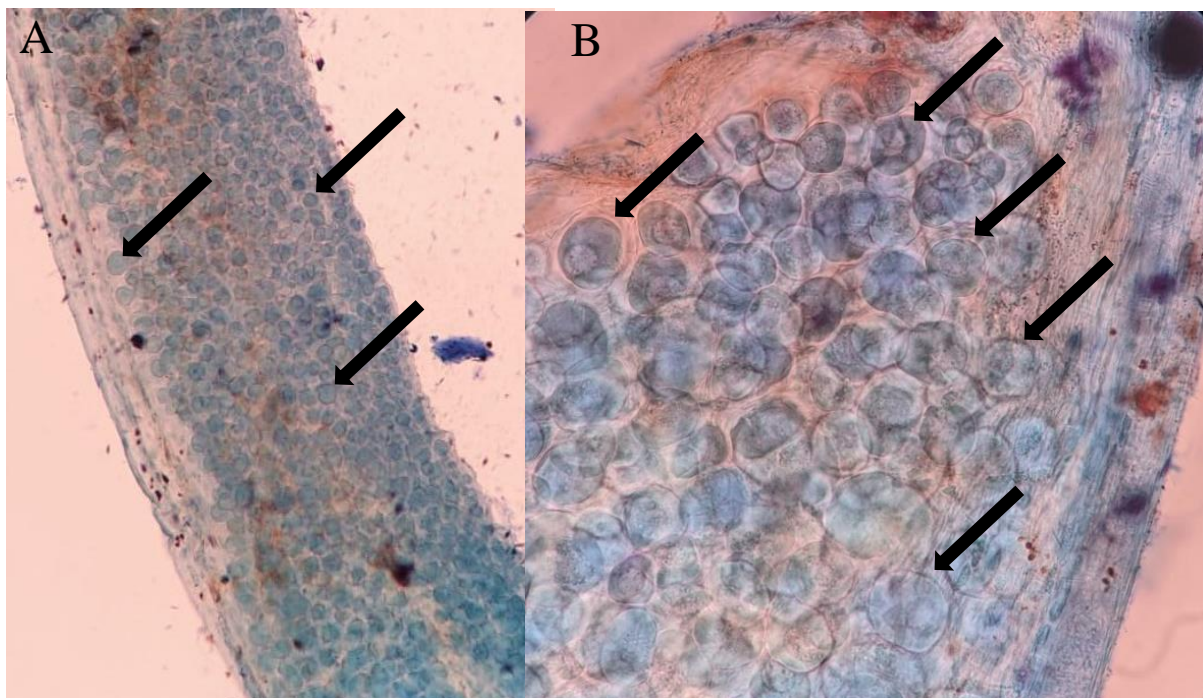
A utilização do Acetato-Carmim para coloração de gônadas inteiras, a fresco ou fixadas, é uma forma econômica e barata de identificação do tecido gonadal. Devido a esse fato, muitas empresas acabam adotando esse método pela praticidade e rapidez no processo. No desenvolvimento desse trabalho, após realizar coloração, foi encontrado estruturas características de diferenciação gonadal.

Em lâmina histológica, com preparação direta no método de coloração Acetato-Carmim, foi observado gônadas femininas identificadas devido a presença de grupos de ovócitos muito bem definidos dispostos em alguns pontos localizados da gônada (Figura 2), separados por tecidos indiferenciados (Figura 3). Os ovócitos apresentam-se volumosos e com núcleo bem evidente, sendo sua localização a principal evidência do sexo fenotípico do animal (Figura 4). Segundo Makino (2009), após 60 dias de idade do animal submetido a reversão sexual hormonal, há evidência muito clara de estruturas sexuais que diferenciam os indivíduos, o que corrobora com os resultados obtidos nesse trabalho. Na gônada masculina foi observado região de túbulos seminíferos contendo células germinativas em diferentes fases de divisão meiótica (Figura 5). O tecido conjuntivo que é construído em meio a gônada, também foi encontrado o que é afirmado no trabalho de Makino, (2009). O autor também indica que não é possível realizar a diferenciação gonadal, quando os animais estão ao 30º dia de ingestão de hormônio andrógeno  $17\alpha$ -Metiltestosterona, devido a imaturidade tecidual.

Figura 2 – Fotomicrografia de ovário de Tilápia-do-Nilo com 55 dias de vida. Ampliação 100 x (A) e 400 x (B). Coloração: Acetato-Carmim. Setas indicam a formação de ovócitos.



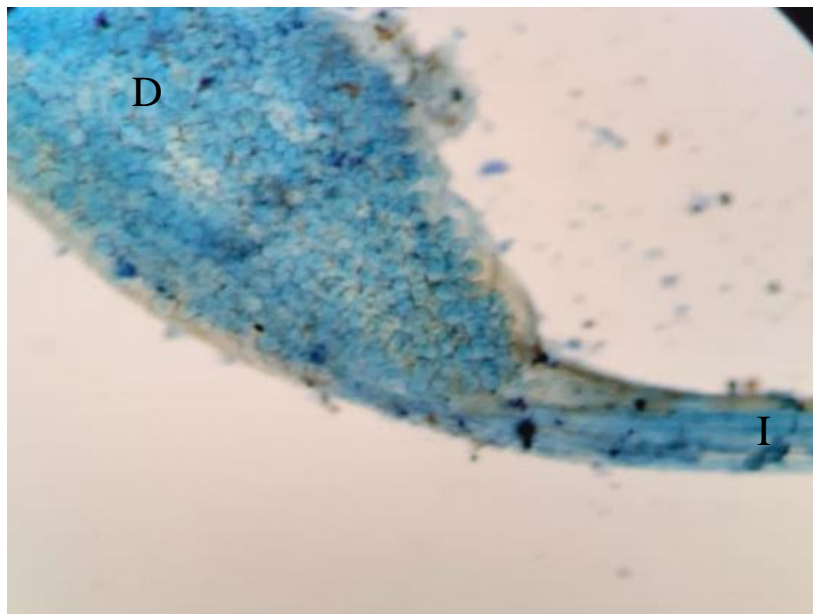
Fonte: Maximowski, 2022



Fonte: Maximowski, 2022

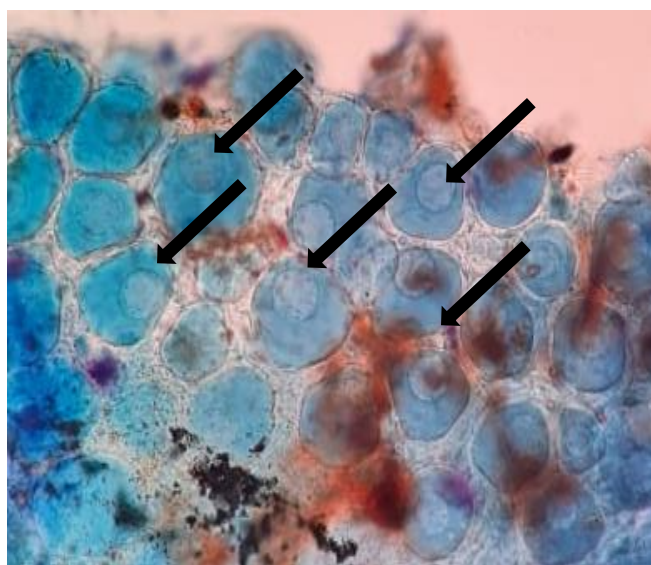
Fonte: Maximowski, 2022

Figura 3 – Fotomicrografia de ovário de Tilápia-do-Nilo com 55 dias de vida. Ampliação: 100 x. Coloração: Acetato-Carmim. Região diferenciada (D) e região indiferenciada (I).



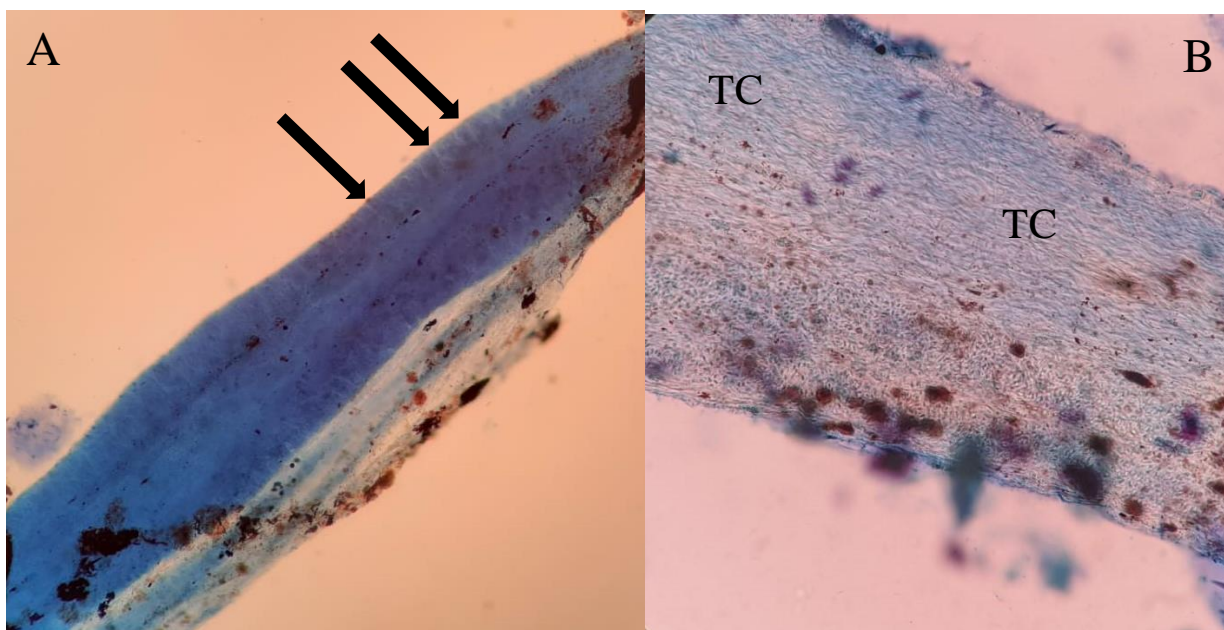
Fonte: Maximowski, 2022

Figura 4– Fotomicrografia de ovário de Tilápia-do-Nilo com 55 dias de vida. Ampliação microscópio: 400 x (2x digital). Coloração: acetato-carmim. Setas indicam núcleos.



Fonte: Maximowski, 2022

Figura 5 – Fotomicrografia de testículo de Tilápia-do-Nilo com 55 dias de vida. Ampliação: 100 x (A) 400 x (B). Coloração: acetato-carmim. Setas indicam túbulos seminíferos. TC: tecido conjuntivo.



Fonte: Maximowski, 2022

## 5.2. ANÁLISE HISTOLÓGICA

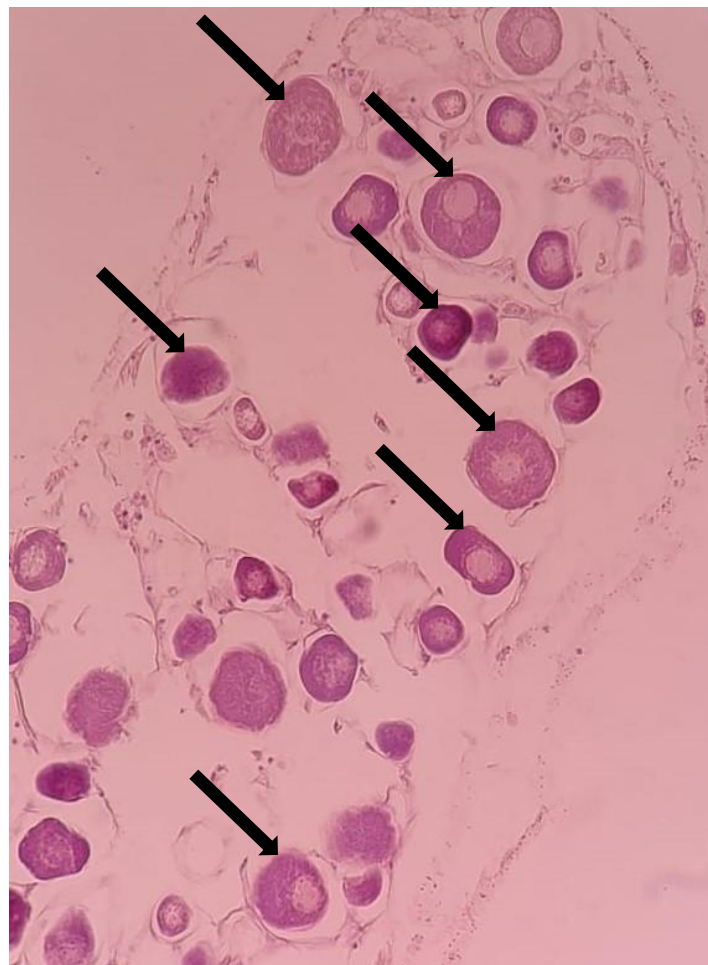
O processamento histológico é utilizado para analisar materiais microscópicos por meio da fixação em parafina histológica e posteriormente corte, desparafinização e coloração, e uma delas é a utilização de Hematoxilina e Eosina, como agente corante. Esse processo, oferece muitas vantagens de evidenciação e diferenciação de tecidos, apesar de maior tempo de preparo.

Os animais que foram submetidos a esse método, possibilitaram a observação e confirmação da formação dos ovócitos em várias fases de desenvolvimento em meio a tecido conjuntivo, porém os canais ovidutos não ficaram evidentes devido a fixação ser feita com os animais inteiros, não somente a gônada, isso prejudicou a fixação da estrutura por meio do formol. Nesta análise os corantes realçam com maior clareza os ovócitos e seus núcleos (Figura 6).



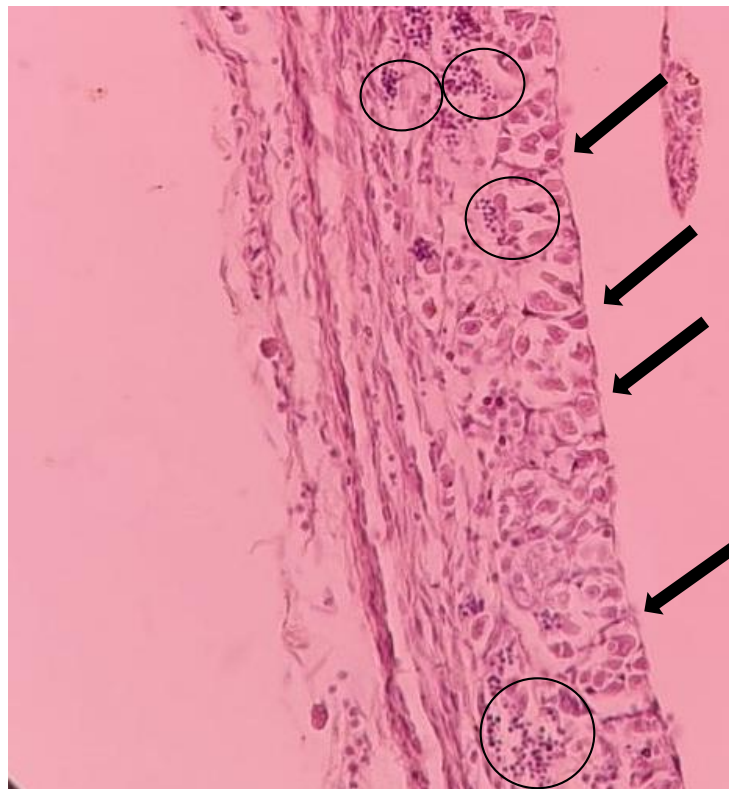
Nos machos, foi encontrado várias fases de desenvolvimento, como espermatócitos e espermatozoides em pleno desenvolvimento, conforme demonstrado na Figura 7. Também foi possível identificar estruturas que se assemelham a túbulos seminíferos e tecido conjuntivo, o que pode ser encontrado no trabalho de Makino, (2009), onde animais com 60 dias de vida continham em seu desenvolvimento dos testículos tecido conjuntivo, junto de células germinativas separadas ou agrupadas em cistos. Isso nos diz que, podemos levar em consideração, aplicar esse método após 55 dias de vida dos animais, devido a maturação de células germinativas, bem como todas as estruturas que fazem parte do sistema reprodutivo dos animais que podem apresentar um maior grau de desenvolvimento, conseqüentemente com mais clareza.

Figura 6 – Fotomicrografia de ovário de Tilápia-do-Nilo com 55 dias de vida. Ampliação: 400 x. Coloração: HE. Setas indicam os ovócitos em várias fases de desenvolvimento.



Fonte: Maximowski, 2022

Figura 7 – Fotomicrografia de testículo de Tilápia-do-Nilo com 55 dias de suplementação. Ampliação: 400 x. Coloração: HE. As setas indicam túbulos seminíferos. Círculos: espermatozoides desenvolvidos.



Fonte: Maximowski, 2022

Nos dois casos foi possível fazer a clara evidenciação e identificação de quais gêneros estavam sendo mostrados nos tecidos fixados, assim podendo diferenciar com clareza qual indivíduo é macho e fêmea, pois a histologia contribuiu com a confirmação dos dados que antes foram obtidos da análise com Acetato-Carmim. Resultados idênticos foram observados no trabalho de Makino (2009), onde animais apresentaram ovários e testículos bem definidos em cortes longitudinais praticados em gônadas de animais com 60 dias de desenvolvimento, sendo possível realizar a sexagem de maneira assertiva, diminuindo a margem de erro que ocorre em análises superficiais de tecidos gonadais.

Nesses tecidos, há possibilidade de acontecer a maturação desuniforme ao longo de toda a gônada como foi observado na análise microscópica do material, isso faz com que se dificulte a interpretação do tecido observado, podendo levantar dúvidas de qual dos gêneros pode-se estar apresentando, pois segundo Queiroz (2020), os gametas possuem várias fases de desenvolvimento ao longo do processo, assim se o analista não obtiver tal atributo ou que se tenha pouco conhecimento relacionado a fisiologia das gônadas desses animais, acaba se

equivocando nos resultados do processo.

Importante que os analistas se empenhem na busca de informações relacionadas a mudanças morfológicas e teciduais durante a etapa reprodutiva de peixes, em especial a Tilápia do Nilo (*O. niloticus*) devido sua importância econômica para o cenário da aquicultura global, pois no mercado de trabalho há uma grande necessidade de profissionais capacitados que possuam conhecimento aprofundado nos aspectos morfológicos das gônadas, que é determinante nos dois processos, mas, principalmente quando aplicado a análise com Acetato-Carmim, devido as suas limitações de estruturas, e também, por ser a forma mais utilizada em ambiente industrial de produção de juvenis por conta de suas vantagens.

As gônadas imaturas dos animais, apresentam uma organização diferente quando estão em um período mais avançado de desenvolvimento ao longo do processo de maturação, fazendo com que o analista possa confundir qual sexo está presente, o que acaba sendo um desserviço para toda a cadeia do pescado, impactando não somente a credibilidade do laboratório para com seu cliente, mas também em gastos futuros, quando esses mesmos animais estiverem presentes em ambiente de engorda. Além disso, segundo Passini (2017), a importância do conhecimento sobre a maturação dos tecidos gonadais é grandioso, devido estar intimamente relacionado com os parâmetros de produção, como a quantidade de ração empregada, desenvolvimento de músculo nos animais e consumo de oxigênio em período de engorda.

A análise feita após o período de reversão dos animais para se certificar da porcentagem de reversão, é dificultada devido necessitar ser realizada com tecidos muito prematuros, o que, nesse trabalho e demais consultados, indica-se que tecidos a partir de 55 dias pode ser encontrado uma maior definição em toda sua estrutura, o que leva a uma maior assertividade com os números conclusivos no término do processo. Isso contribuiria também na agilidade da análise e diminuição da possibilidade de se realizar um segundo procedimento, porém utilizando outro método para confirmar os resultados obtidos.

Os processamentos que são comumente empregados nas gônadas possuem suas vantagens e desvantagens, enquanto a etapas e também, definição de estruturas. O método mais prático, rápido e barato é análise utilizando o corante Acetato-carmim que, possibilita visualizar várias gônadas de uma vez, agilizando o processo, porém limita-se as estruturas que podem ser encontradas. Isso faz com que aumente o nível de dificuldade, exigindo do profissional uma análise refinada e criteriosa para que não se torne errônea. Nesse trabalho, a utilização desse método apresentou uma maior dúvida, devido a sua limitação na definição a qual possui, pois nela, se encontrou uma maior indiferenciação do tecido gonadal.

No que diz respeito ao procedimento histológico, é um processo mais custoso, tanto em

tempo, quanto financeiro, pois os produtos utilizados para a preparação do material necessitam de equipamentos e um maior tempo em contato com o tecido, para que possa realizar o procedimento do material por completo. Com isso, após a finalização do tecido, nos possibilitou um amplo entendimento e confirmação do sexo fenotípico dos animais, devido a sua definição, por conta das estruturas que ficam evidentes, serem maiores e mais claras no momento da visualização. Esse processo, por mais que seja seguro nos seus resultados apresentados, é necessário que se dedique muito mais tempo para executar, o que se torna oneroso quando aplicado em ambiente industrial, sendo indicado apenas em casos específicos para certificação de resultados.

Muitos materiais disponíveis para consulta, relacionado ao processo completo da reversão sexual, trazem consigo muito bem explicitado cada ponto e processo a ser realizado. Porém assuntos relacionados ao controle de qualidade são escassos, os quais tem como intuito em certificar a confiabilidade do processo executado e também assegurar de que o produto final gerado será de ótima qualidade. Necessita-se a construção de metodologias e publicações relacionadas a esses procedimentos específicos após a reversão sexual.

O mercado de reprodução de peixes e produção de juvenis, está em grande crescimento, necessitando de profissionais altamente capacitados em todos os cargos que demandam de mão de obra. O conhecimento técnico é de grande valia quando estamos trabalhando com espécies de valor comercial e que possuem peculiaridades na sua fase de desenvolvimento gonadal. Tal situação, pode ser contornada com iniciativas que propiciem aos analistas, momentos de estudos, como cursos e treinamentos, bem como o incentivo ao enriquecimento do conhecimento por parte do profissional, que sejam voltadas ao aperfeiçoamento nessa importante área da produção. A disponibilização de material físico, como lâminas de microscópio, contendo os tecidos sexuais imaturos devidamente identificados, de ambos os métodos (Acetato-Carmim e Hematoxilina e Eosina), facilita o entendimento por parte do analista, ajudando na interpretação dos dados, fazendo com que haja um desenvolvimento eficiente da análise em ambiente de produção de juvenis sexualmente revertidos.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao longo do desenvolvimento desse trabalho, pôde ser observado que os peixes possuem formações diferenciadas no processo de amadurecimento, aumentando a dificuldade da análise no momento da certificação da reversão sexual. Animais após período de reversão sexual, apresentam maior definição com 55 dias de desenvolvimento, facilitando a sexagem.

A análise executada com Acetato-Carmim é eficiente na apresentação de resultados do sexo fenotípico dos animais, porém exige um maior conhecimento da morfologia por parte do analista. A histologia é um procedimento que apresenta maior confiança na apresentação dos resultados por conta do seu nível de definição, contudo, é recomendada que complemente a análise com Acetato-Carmim e que se aplique em momentos específicos, devido ao tempo que se leva para finalizar e o custos financeiros envolvidos.

O uso de materiais de apoio contendo material fotográfico, bem como lâminas permanentes de microscópio que possuam ambos os tecidos sexuais, podem garantir melhor condição de análise precisa da sexagem dos animais, facilitando a execução da análise e aumentando a eficiência do processo.

## REFERÊNCIAS

ALBINO, Fabiana Ribelatto et al. Reversão sexual de Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) por meio de tratamento hormonal. **PesquisAgro**, [s. l.], v. 3, n. 1, Janeiro/Julho 2020.

BEÇAK, Willy; PAULETE, Jorge. **Técnicas de citologia e histologia**. v.1. Rio de Janeiro: Editora S.A, 1976.

COSTA, Ana M., SILVA, M.C., OLIVEIRA, J. **Guia de Histologia**. 2009. Projecto NeoMav – IPIMAR. Lisboa. 16 p. + XI Anexos.

DIAS-KOBERSTEIN, Teresa Cristina Ribeiro. **Reversão Sexual De Larvas De Tilapia Do Nilo (Oreochromis Niloticus) Por Meio De Banhos De Imersão Em Diferentes Dosagens Hormonais**. Rev. Acad., Curitiba, v. 5, n. 4, p. 391-395, out./dez. 2007.

EL-GREISY, Z.A.; EL-GAMAL, A.E. **Monosex production of tilapia, *Oreochromis niloticus* using different doses of 17 $\alpha$ -methyltestosterone with respect to the degree of sex stability after one year of treatment.** The Egyptian Journal of Aquatic Research, [S. l.], v. 38, p. 59-66, 6 ago. 2012.

FAO, **Food and Agriculture Organization of The United Nations.** 2020. The State of World Fisheries and Aquaculture. Rome, 230p.

HOROBIN, Richard W.; BANCROFT, John D. **Troubleshooting Histology Stains.** London: Churchill Livingstone, 1998.

LEONHARDT, Julio Hermann. **Efeito da Reversão Sexual em Tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1757).** 1997, Pós-graduação em Aquicultura – UNESP, Jaboticabal – SP, 1997.

MAINARDES-PINTO Cleide Schmidt Romeiro *et al.* **Masculinização da Tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, Utilizando Diferentes Rações e Diferentes Doses de 17  $\alpha$ -Metiltestosterona.** Rev. bras. zootec., 29(3):654-659, 2000.

MAKINO, L. C. NAKAGHI, Laura Satiko Okada; PAES, Maria do Carmo Faria; MALHEIROS, Euclides Braga; DIAS-KOBERSTEIN, Teresa Cristina Ribeiro. **Efetividade de Métodos de Identificação Sexual em tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) Revertidas Sexualmente com Hormônio em ração com Diferentes Granulometrias.** Uberlândia, v. 25, n. 2, p. 112-121, Mar./Abr. 2009.

MAKINO, Lilian Cristina. **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, UNESP, Jaboticabal – SP, 47p

NAKAGHI, L.S.O.; PAES, M.C.F.; MAKINO, L.C.; DIAS- KOBERSTEIN, T.C.R.; MALHEIROS, E.B.. **Sexagem histológica e desempenho de *Oreochromis niloticus* testando diâmetros de ração de acordo com o aparato bucal.** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.61, n.3, p.721-727, 2009.

PASSINI, Gabriel. Aspectos reprodutivos do robalo-flecha, *Centropomus undecimalis*, durante a primeira maturação sexual. 2017. Tese (Doutorado em Aquicultura) - Universidade Federal de Santa Catarina, [S. l.], 2017.

PEIXE BR, Associação Brasileira de Piscicultura. **Anuário 2021: Peixe BR da piscicultura.** 2021, Pinheiros – SP, 71p

QUEIROZ, Delaine Ferreira de. **Descrição macroscópica e microscópica de gônadas de híbridos de siluriformes de importância comercial.** 2020. 33 p. Trabalho de Conclusão de

Curso (Bacharel em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Grande Dourados, [S. l.], 2020.

RESENDE, Emiko Kawakami de; RIBEIRO, Ricardo Pereira; LEGAT, Ângela Puchnik; BENITES, Celso. **Melhoramento genéticos em peixes** – uma revolução na aquicultura do Brasil. Corumbá, MS: Embrapa Pantanal, 2008. 4p. ADM – Artigo de Divulgação na Mídia, n.130. Disponível em: <<http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/ADM130>>. Acesso em: 17 set. 2008.

RIBEIRO, Maria Aparecida Guimarães. **Reversão Sexual de Tilápias**. 1996, Estação de Piscicultura de Pindamonhangaba, Instituto de Pesca – SP. Disponível em:<<https://panoramadaaquicultura.com.br/reversao-sexual-de-tilapias/>>. Acesso em: 18/10/2021

SABOTTA, Johannes; WELSCH, Ulrich. **Atlas de Histologia: Citologia, Histologia e Anatomia Microscópica**. 7 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2002.

SCHULTER, Eduardo pickler; FILHO, José Eustáquio Ribeiro Vieira. **Evolução da Piscicultura no Brasil: Diagnóstico e Desenvolvimento da Cadeia Produtiva de Tilápia**. 2017, Rio de Janeiro, 42p, Instituto de Pesquisa Aplicada – IPEA, ISSN 1415-4765.