

EFETIVIDADE DE MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO SEXUAL EM TILÁPIAS-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*) REVERTIDAS SEXUALMENTE COM HORMÔNIO EM RAÇÃO COM DIFERENTES GRANULOMETRIAS

EFFECTIVENESS OF METHODS OF SEXUAL IDENTIFICATION IN NILE TILAPIA (*Oreochromis niloticus*) SEXUALLY REVERTED WITH HORMONE IN DIET WITH DIFFERENT DIAMETERS

Lilian Cristina MAKINO¹; Laura Satiko Okada NAKAGHI²; Maria do Carmo Faria PAES³; Euclides Braga MALHEIROS⁴; Teresa Cristina Ribeiro DIAS-KOBERSTEIN⁵

1. Médica Veterinária, Doutoranda em Aqüicultura, Centro de Aqüicultura - CA, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil. Liliancrism02@yahoo.com.br; 2. Professora, Doutora, Departamento de Fisiologia Animal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - FCAV – UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil; 3. Bióloga, Mestranda em Aqüicultura, CA – UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil; 4. Matemático, Professor, Doutor, Departamento de Ciências Exatas, FCAV – UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil; 5. Zootecnista, Doutora, Pesquisadora do CA - FCAV – UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil.

RESUMO: Foram avaliados três métodos de identificação do sexo em tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*), nas idades de 30, 60 e 90 dias que foram revertidas mediante a administração do hormônio androgênico 17 α -metiltestosterona incorporado às rações fareladas com diferentes granulometrias (0,25, 0,35 e 0,50 mm) na dosagem de 60 mg/kg de ração. As técnicas de sexagem testadas foram: exame macroscópico da papila urogenital, exame microscópico das gônadas coradas a fresco com acetato-carmim e exame microscópico das gônadas pela rotina histológica. Perante os três métodos de sexagem avaliados, a histologia das gônadas obteve o diagnóstico mais seguro. As granulometrias das rações utilizadas não interferiram nas características morfológicas das gônadas, nem nos caracteres sexuais secundários dos peixes.

PALAVRAS-CHAVE: *Oreochromis niloticus*. Histologia. Gônadas. Reversão sexual.

INTRODUÇÃO

A tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*) apresenta qualidades favoráveis para a piscicultura, possuindo grande capacidade adaptativa em condições de cultivo, especialmente em relação ao aspecto nutricional, apresentando amplo espectro alimentar (CARVALHO; FORESTI, 1996). Podem ser acrescentados outros atributos, tais como, rusticidade e precocidade sexual (MACLEAN et al., 2002) além do oferecimento de carne com boas qualidades organolépticas, baixos teores de gordura e ausência de mioespinhas em forma de “Y” no filé (MEURER et al., 2002), sendo também bastante apreciada em atividades de pesca esportiva (“pesque-pagues”) (MEURER et al., 2003).

A precocidade sexual é um complicador para o cultivo desta espécie (CAVALCANTE et al., 2004), pois as fêmeas da tilápia a partir de 30 g de peso podem iniciar sua vida reprodutiva (WASSERMANN; AFONSO, 2002). Leonhardt e Urbinatti (1999) afirmaram que o desvio de elementos plásticos (proteínas) e energéticos (lipídios e carboidratos) para a reprodução em detrimento do crescimento, rapidamente induz a uma superpopulação nos tanques de cultivo.

Segundo atestaram El Gamal et al. (1999) e Ávila e Romagosa (2005) os peixes competem por espaço e alimento, afetando negativamente o rendimento do lote. Para contornar tais problemas, emprega-se já há algum tempo o uso da reversão sexual das larvas de tilápia por meio do fornecimento de rações contendo hormônios androgênicos durante a fase de larvicultura (MACINTOSH; LITTLE, 1995; SANCHEZ; HAYASHI, 2001).

Segundo Phelps e Cerezo (1992) a utilização de hormônios masculinizantes mostrou ser a técnica mais prática e efetiva para a produção de machos fenotípicos. Esta prática, além de eliminar problemas relativos à reprodução descontrolada, proporciona a obtenção de populações constituídas apenas por machos e com maior potencial de crescimento (TACHIBANA et al., 2004). Entre os vários hormônios pesquisados, o andrógeno 17 α -metiltestosterona (MT), tem sido empregado no processo de reversão sexual por apresentar a vantagem de ser facilmente excretado logo após o período do tratamento hormonal (POPMA; GREEN, 1990; GUERRERO III; GUERRERO, 1997; MAINARDES-PINTO et al., 2000).

Cavalcante et al. (2004) atestaram que apesar da difusão da tecnologia da reversão do sexo em peixes, faltam meios eficazes na avaliação da qualidade desta reversão. Geralmente a eficiência do processo de reversão é avaliada por técnicas histológicas das gônadas dos peixes (CARVALHO; FORESTI, 1996; PALLER; GUERRERO III, 2001) e pelo método do acetato-carmim, desenvolvido por Guerrero e Shelton (1974) e validado para a tilápia-do-nilo por Wassermann e Afonso (2002). Além desses, existe o método de sexagem manual das tilápias por meio do exame da papila urogenital (AFONSO; LEBOUTE, 1993; BEARDMORE et al., 2001; TACHIBANA et al., 2004; ÁVILA; ROMAGOSA, 2005).

O presente trabalho desenvolvido com larvas de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) submetidas ao processo de reversão sexual com rações de diferentes granulometrias teve o intuito de validar a idade e o método de sexagem que confirmem o diagnóstico mais seguro.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) e no Setor de Tilapicultura do Centro de Aquicultura (CAUNESP), ambos da Universidade Estadual Paulista (UNESP) de Jaboticabal, SP, durante um período de 90 dias.

As análises laboratoriais foram conduzidas no Laboratório de Histologia de Peixes associado ao CAUNESP e sediado no Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da FCAV/UNESP.

Foram utilizadas 900 larvas de tilápia-do-nilo com dois dias de idade pós-eclosão (DPE), distribuídas em um delineamento inteiramente casualizado (DIC) com três tratamentos e três repetições em um esquema de parcelas subdivididas, tendo como parcelas as três granulometrias de ração e como subparcelas as três idades analisadas. Os tratamentos foram constituídos pelas granulometrias 0,25, 0,35 e 0,50 mm.

Considerou-se como unidade experimental um aquário contendo 100 larvas. Durante o experimento foram ocupados nove aquários com capacidade de 130 L, com volume de 100 L de água, equipados com sistemas de aeração e abastecimento hídrico contínuos. A vazão da mesma foi de 400 mL/min, possibilitando 100% de renovação a cada duas horas. Os aquários foram sifonados diariamente pela manhã e à tarde para eliminação de resíduos, com o intuito de preservação da qualidade aquática. As temperaturas da água (máxima e

mínima) eram registradas diariamente pela manhã, antes da sifonagem dos mesmos. Os outros parâmetros físicos e químicos analisados no início do experimento foram pH, oxigênio dissolvido, alcalinidade, dureza e amônia. A determinação da alcalinidade seguiu a metodologia de Goltermann et al. (1978) e os demais parâmetros foram obtidos por meio o aparelho HORIBA U – 10.

A ração utilizada para o período experimental continha a seguinte composição: 35% PB, 5,19% FB, 6,22% EE e 4130 Kcal EB/Kg, diferindo apenas nos tamanhos das partículas, sendo triturada e peneirada nas três granulometrias testadas que foram 0,25, 0,35 e 0,50 mm. No momento do preparo das rações adicionou-se o andrógeno 17 α -metiltestosterona (Fish-Braz, Botucatu, SP) na dosagem de 60 mg/kg de ração, diluído em 500 mL de álcool etílico. Os animais foram alimentados com ração na forma farelada, fazendo-se o uso do regime de alimentação *ad libitum*, com frequência de arraçoamento de três vezes ao dia, em horários pré-determinados (9h, 14h e 17h30min) durante 30 dias, que é o período usual do processo de reversão sexual. Após este período, utilizou-se ração sem hormônio de granulometria 0,35 mm para crescimento até os 90 dias de idade, com o mesmo regime de alimentação.

Procedeu-se com as amostragens dos peixes aos 30, 60 e 90 dias de idade, sendo os animais anestesiados em solução de benzocaína a 0,1%, sacrificados por aprofundamento do plano anestésico e fixados inteiros em solução de formol tamponado a 10% com pH 7,4, durante 24 horas. Vencido o tempo de fixação os peixes foram colocados em solução de álcool 70%. Para as análises dos métodos de sexagem foram coletados 30 peixes/tratamento de cada idade proposta.

Os métodos de sexagem testados foram: exame macroscópico da papila urogenital, exame microscópico das gônadas pela coloração a fresco com acetato-carmim e exame microscópico das gônadas pela rotina histológica.

O método da identificação macroscópica do sexo foi realizado por meio da evidenciação da papila urogenital com solução de Azul de Metileno a 1%. Tal diagnóstico é possível devido ao fato da tilápia ser sexualmente dimórfica (AFONSO; LEBOUTE, 1993).

Para a execução das técnicas microscópicas de sexagem, as gônadas foram retiradas da cavidade celômica dos peixes seguindo a metodologia de Wassermann e Afonso (2002) e com o auxílio de uma tesoura, cada peixe foi incidido ventralmente, da papila urogenital até a base da nadadeira peitoral. Realizou-se uma abertura lateral no antímero

esquerdo do peixe, por onde as vísceras foram cuidadosamente retiradas, conservando-se as gônadas. Algumas gotas de solução de Bouin foram colocadas topicamente sobre as gônadas, enrijecendo e evidenciando o tecido gonadal, facilitando a sua retirada com o auxílio de uma pinça. A fim de que fosse possível a realização do exame microscópico das gônadas de um mesmo peixe, convencionou-se que uma das gônadas, direita ou esquerda, seria destinada para a técnica do acetato-carmim e a outra para a sexagem histológica.

A gônada (esquerda ou direita) após a retirada foi imediatamente estendida sobre uma lâmina de vidro onde foram instiladas algumas gotas da solução de acetato-carmim. Em seguida, uma lamínula foi colocada sobre este material fazendo-se uma leve pressão e examinada ao microscópio de luz em toda a sua extensão.

A outra gônada (esquerda ou direita) destinada ao processamento histológico foi desidratada em séries de etanol com concentrações crescentes e depois diafanizada em xilol, incluída em parafina, seccionada ao micrótomo em cortes de 5,0 µm de espessura, montada em lâminas de vidro e corada em H-E. Estas foram analisadas em microscópio de luz e os melhores cortes foram fotomicrografados em fotomicroscópio Axioskop – ZEISS.

As análises estatísticas dos dados de granulometrias e proporção entre os sexos foram realizadas utilizando-se o programa estatístico SAS (Statistic Analysis System), versão 8.0 (SAS INSTITUTE, 2004). Nas análises de sexagem utilizou-se a estatística descritiva.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios dos parâmetros físicos e químicos da água nos tanques experimentais foram: $25 \pm 1,36$ °C a $28 \pm 0,62$ °C (temperaturas máxima e mínima), $7,7 \pm 0,1$, $8,8 \pm 0,5$ mg/L (pH), $8,8 \pm 0,5$ mg/L (oxigênio dissolvido), 146 ± 11 mg/L (alcalinidade), 34 ± 5 mg/L (dureza) e $0,12 \pm 0,1$ mg/L (amônia), valores estes preconizados para a prática da aquicultura e para o cultivo da espécie por (POPMA; LOVSHIN, 1996; TACHIBANA et al., 2004).

O exame macroscópico da papila urogenital das tilápias mostrou ser mais eficaz aos 60 e 90 dias de idade, para peixes maiores que 5,0 cm (Figura 1) com elevadas possibilidades de acerto, visto que o aparelho genital externo revelou-se bem formado e distinto nestas idades. Nos peixes com 30 dias de idade, tal método de sexagem não apresentou resultados confiáveis, pois nesta idade, para peixes menores que 3,0 cm e pesando menos que 0,5 g, a papila urogenital apresentou-se pouco visível, mesmo com o auxílio do estereomicroscópio.

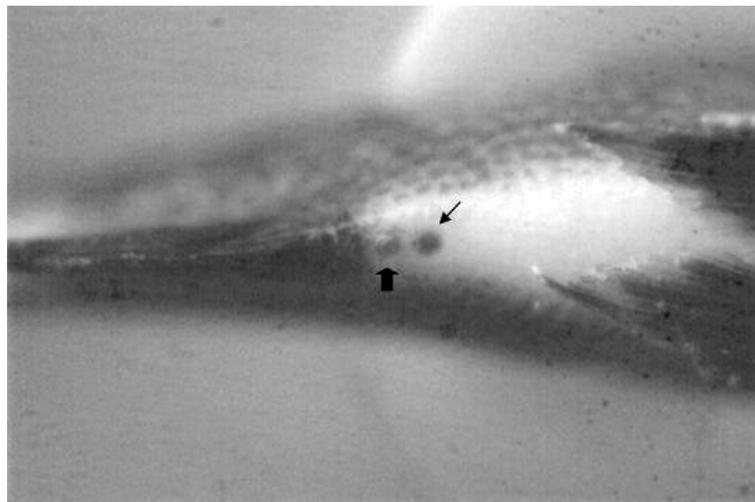


Figura 1. Papila urogenital (seta grossa) e orifício anal (seta fina) de tilápia-do-nilo macho com 60 dias de idade.

Este tipo de sexagem requer certa prática da pessoa que a realiza, pois ela pode induzir a erros de diagnóstico, especialmente para tilápias com proporções corporais reduzidas. Desprez et al. (2003) afirmaram que tal técnica está em processo de desuso, por ser pouco prática e altamente

estressante para os animais durante a captura. Wassermann e Afonso (2002) acrescentaram que a técnica de sexagem macroscópica é adequada para identificar o sexo de tilápias nilóticas com peso corporal acima de 0,5 g, informação que corrobora com os dados obtidos no presente trabalho, pois foi

somente a partir dos 60 dias de idade, que este método obteve sucesso. Nakamura et al. (1998) afirmaram que durante o processo de reversão sexual em peixes, a masculinização da papila urogenital pode acontecer antes da masculinização gonadal. Assim, um peixe pode aparentar ser macho externamente, e internamente apresentar ovários. Nesse experimento houve ocorrência deste tipo, especialmente em peixes com 30 e 60 dias de idade que, ao exame da papila urogenital mostraram

externamente serem machos e ao realizar o exame microscópico das gônadas, resultaram ser fêmeas.

Na análise microscópica das gônadas utilizando-se a técnica de coloração com acetato-carmim, observou-se que nos peixes com 30 dias de idade ($\pm 31,65$ mm de comprimento) estas se mostraram indiferenciadas, sem contornos definidos no parênquima e com a predominante presença do tecido de natureza conjuntivo-fibrosa densa (Figura 2).

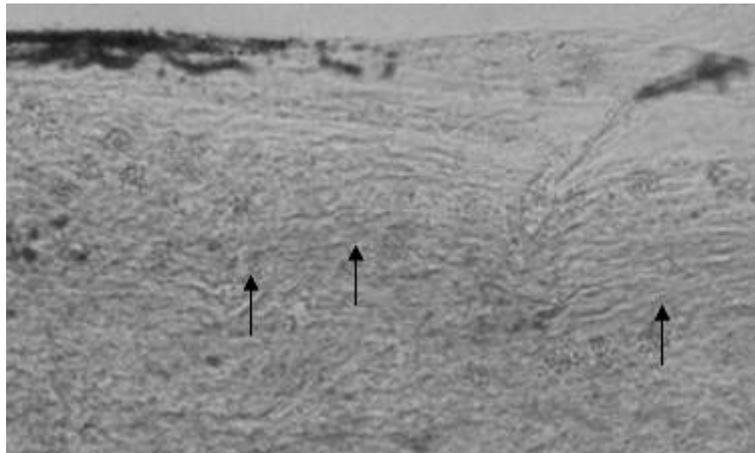


Figura 2. Fotomicrografia de gônada de tilápia-do-nylo com 30 dias de idade (acetato-carmim). Obj= 40x. Sexo: Indiferenciado. As setas indicam a rica presença de tecido fibroso.

Os indivíduos diagnosticados como sendo machos nesta fase, apresentaram estruturas semelhantes a túbulos seminíferos muito rudimentares e pouco característicos enquanto que, aqueles identificados possivelmente como fêmeas exibiram estruturas ovóides que se assemelhavam a ovócitos rudimentares, mergulhados numa matriz altamente fibrosa de natureza conjuntiva. Estes dados concordam com o trabalho de Carvalho e Foresti (1996), onde em *Oreochromis niloticus* somente aos 48 dias pôde ser evidenciada a presença de células germinativas da linhagem feminina em atividade meiótica e a formação da cavidade ovariana, demonstrando que a diferenciação morfológica da gônada para a formação dos ovários ocorre neste período. Concordando com os mesmos autores, a diferenciação morfológica dos testículos é evidenciada aos 68 dias de vida, pela presença de cistos germinativos contendo espermatogônias. Paller e Guerrero III (2001) encontraram resultados semelhantes, onde a diferenciação morfológica dos ovários nas tilápias-do-nylo ocorre mais precocemente que os testículos. Em *Oreochromis mossambicus* o início da diferenciação entre os

sexos morfológicamente visível é mais precoce, ocorrendo aos 37 dias de idade (CHMILEVSKIY, 1995). Babiker e Ibrahim (1979) demonstraram que o desenvolvimento das gônadas em tilápias-do-nylo está associado ao crescimento corporal. Esta afirmação corrobora com os resultados obtidos neste trabalho, pois, nos peixes com 60 e 90 dias de idade, os caracteres sexuais apresentaram-se mais evidentes. Os testículos apresentaram túbulos seminíferos bem caracterizados que continham células da linhagem germinativa isoladas ou agrupadas em cistos (Figura 3).

As fêmeas exibiram ovários contendo ovócitos em diferentes fases de maturação (Figura 4), especialmente nas tilápias com 90 dias de idade. Podendo-se dizer o mesmo dos machos nesta idade (Figura 5).

O método de sexagem da coloração a fresco das gônadas com acetato-carmim mostrou ser mais eficiente nos peixes com idades maiores que 60 dias, pois como foi visto ao término do experimento, tanto os machos quanto as fêmeas estavam bem definidos.

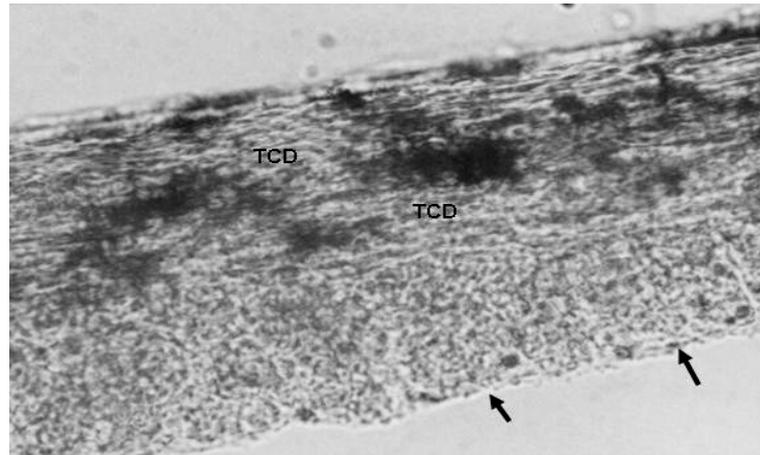


Figura 3. Testículo de tilápia-do-nilo com 60 dias de idade (acetato-carmim). Obj.= 40x. As setas indicam túbulos seminíferos. TCD: tecido conjuntivo denso.

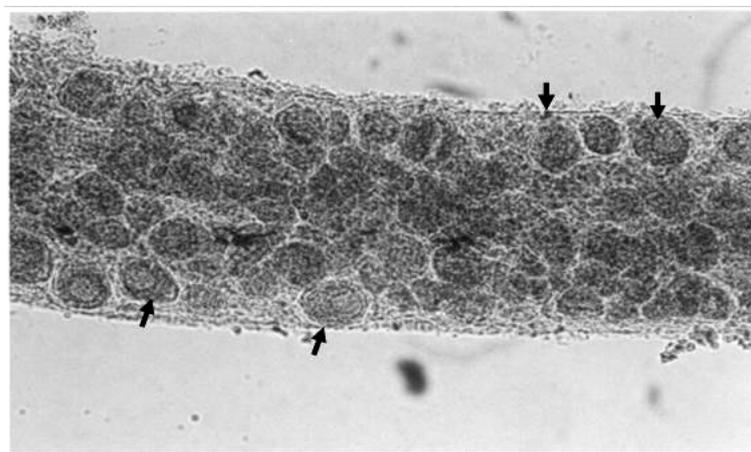


Figura 4. Ovário de tilápia-do-nilo com 90 dias de idade (acetato-carmim). Obj.= 20x. As setas indicam ovócitos.

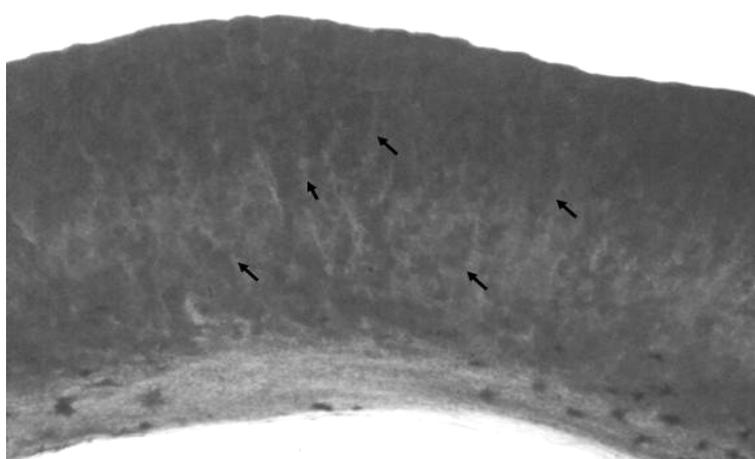


Figura 5. Testículo de tilápia-do-nilo com 90 dias de idade (acetato-carmim). Obj.= 10x. As setas indicam lóbulos seminíferos.

Os indivíduos intersexos foram encontrados com 60 dias, cujas gônadas apresentaram características morfológicas masculinas e femininas coexistindo simultaneamente. Pandian e Sheela (1995); Carvalho e Foresti (1996) e Neumann (2004) relataram que a intersexualidade em tilápias pode ser resultante de altas dosagens de andrógenos (acima de 60 mg/kg de ração), ou pela administração destes por períodos prolongados (acima de 30 dias).

A análise histológica das gônadas em tilápias com 30 dias de idade confirmou a fase de gônadas indiferenciadas, apresentando abundância de tecido conjuntivo denso fibroso, não sendo possível o diagnóstico do sexo (Figura 6). Babiker e Ibrahim (1979), Carvalho e Foresti (1996) e Paller e Guerrero III (2001) também encontraram estas mesmas características em tilápias nilóticas nesta idade.

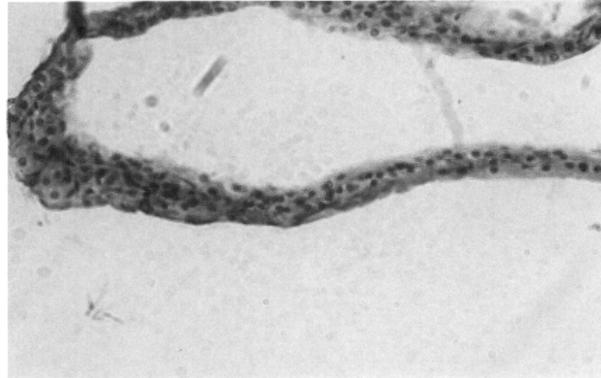


Figura 6. Fotomicrografia de gônada de tilápia-do-nilo com 30 dias de idade. Obj.= 40x (HE). Observar a riqueza de tecido conjuntivo denso e de células germinativas indiferenciadas.

Para os peixes com 60 e 90 dias de idade, a identificação entre machos e fêmeas foi evidente, pois as gônadas apresentaram-se bem definidas, especialmente aos 90 dias. Nos machos, os cortes histológicos longitudinais dos testículos mostraram-se envolvidos por uma delgada cápsula de tecido

conjuntivo contendo em seu interior túbulos seminíferos, onde cada um deles mostrou células da linhagem germinativa isolada ou em cistos, organização morfológica também observada no trabalho de Babiker e Ibrahim (1979) e Paller e Guerrero III (2001) (Figuras 7 e 8).

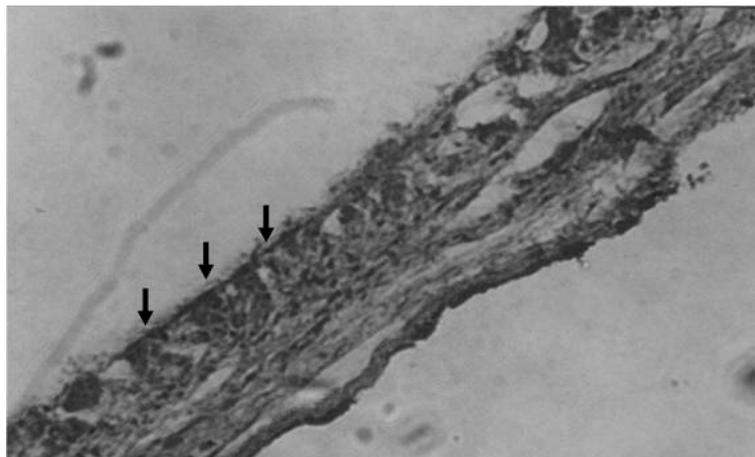


Figura 7. Testículo de tilápia-do-nilo com 60 dias de idade. Obj.= 40x (HE). As setas indicam os túbulos seminíferos.

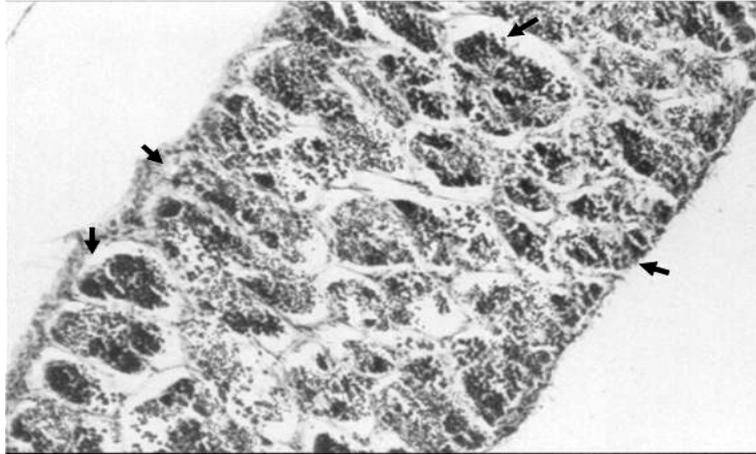


Figura 8. Testículo de tilápia-do-nylo com 90 dias de idade. Obj.= 20x (HE). As setas indicam os túbulos seminíferos com espermatozóides maduros em seu interior.

Nas fêmeas com 60 e 90 dias de idade, os cortes histológicos longitudinais dos ovários exibiram ovários bem diferenciados e característicos e em várias fases de maturação ovocitária (Figuras 9

e 10). Coward e Bromage (1999) também observaram este padrão de organização morfológica dos ovócitos em *Tilapia zilli*.

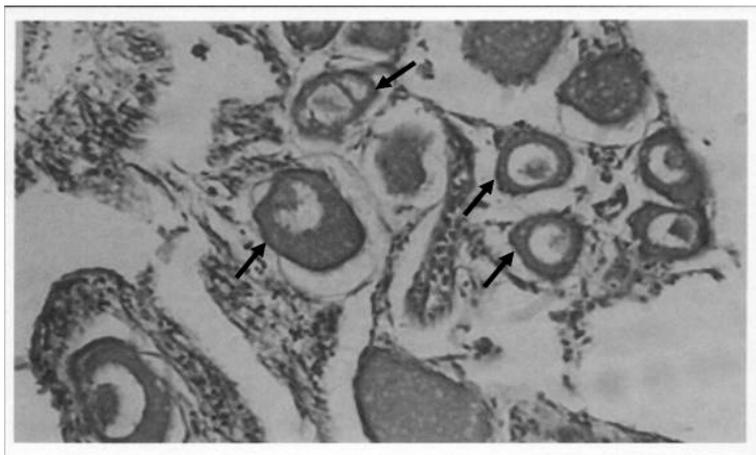


Figura 9. Ovário de tilápia-do-nylo com 60 dias de idade. Obj.= 40x (HE). As setas indicam os ovócitos.

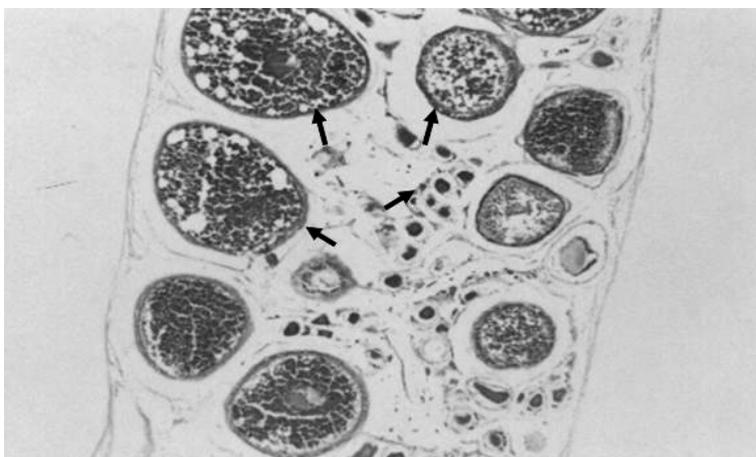


Figura 10. Ovário de tilápia-do-nylo com 90 dias de idade. Obj.= 5x (HE). As setas indicam ovócitos em várias fases de desenvolvimento, desde a fase imatura até a maturação final (vitelogênese).

A presença de intersexos foi notada em peixes analisados com 60 dias. O tipo de intersexo observado foi em sua maioria, composto por testículos contendo alguns ovócitos dispersos no parênquima das gônadas, corroborando com os resultados de Carvalho e Foresti (1996) e Neumann (2004) para peixes desta espécie, que foram submetidos ao processo de reversão do sexo induzida por hormônios androgênicos.

Faz-se necessário considerar que houve muitas dificuldades na dissecação, coleta e análise das gônadas nas tilápias com 30 dias de idade, devido às pequenas dimensões corporais e também ao alto grau de imaturidade do tecido gonadal. A indiferenciação morfológica das gônadas impossibilitou o diagnóstico sexual correto destes animais, especialmente para o método de preparação das gônadas com o acetato-carmin. No processamento histológico das gônadas, devido aos finos cortes realizados (5,0 μm), houve uma melhor identificação do sexo nesta fase. Wassermann e Afonso (2002) e Bombardelli et al. (2004) preconizaram que para a execução da técnica usando o acetato-carmin, os peixes devem apresentar tamanhos maiores que 2,5 cm e pesar mais que meio grama.

A partir dos 60 dias de idade, a identificação do sexo dos peixes tornou-se mais evidente, visto que o desenvolvimento e a maturação gonadal na tilápia-do-nilo estão fortemente relacionados com o desenvolvimento corporal (BABIKER; IBRAHIM, 1979), tanto no aspecto macroscópico, onde a papila

urogenital mostrou-se facilmente distinguível, quanto no aspecto microscópico, pois as gônadas apresentaram-se mais diferenciadas, culminando aos 90 dias com a completa definição do sexo. Nesta idade, houve maiores acertos no processo de sexagem, independentemente do método de análise utilizado.

Como já relatado em trabalhos anteriores, os diâmetros de grão das rações-tratamento utilizadas não interferiram nas características morfológicas das gônadas e nem nos caracteres sexuais secundários dos peixes (MAKINO, 2005).

CONCLUSÃO

Não se recomenda a sexagem das tilápias aos 30 dias de idade (comprimento de $\pm 31,65$ mm) por nenhum dos métodos estudados, estando a eficiência da sexagem relacionada mais ao tamanho e peso dos peixes (acima de 3,0 cm e 0,5 g) do que propriamente à idade avaliada. Tal como era esperado, o método de análise histológica das gônadas permitiu um diagnóstico mais seguro, frente aos outros métodos.

AGRADECIMENTOS

Os autores gentilmente agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de Mestrado e ao Sr. Orandi Mateus pela confecção das lâminas histológicas.

ABSTRACT: Three methods of sexual identification were evaluated in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) at ages of 30, 60 and 90 days that were submitted to sexual reversion under administration of androgen hormone 17 α -methyltestosterone added to crumble diets with different granules sizes (0.25, 0.35 and 0.50 mm) in dosage of 60mg/kg. The techniques of sexual identification employed were: a) Macroscopic examination of urogenital papilla; b) Microscopic examination of gonads through stain with carmine-acetate and c) Microscopic examination of gonads through histological routine. In the presence of three methods of sexual identification evaluated, histology of gonads has shown the most confident diagnosis. The grain diameters of rations did not interfere in morphological characteristics of gonads, neither in secondary sexual characters of fish.

KEYWORDS: *Oreochromis niloticus*. Histology. Gonads. Sex reversal.

REFERÊNCIAS

AFONSO, L. O. B.; LEBOUTE, E. M. Método para a sexagem visual de alevinos de tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*). In: ENCONTRO RIOGRANDENSE DE TÉCNICOS EM AQUICULTURA, 1993, Porto Alegre. **Anais...**, Porto Alegre: UFRGS, 1993. v. 4, p. 100-103.

ÁVILA, M. C.; ROMAGOSA, E. Efeito do choque térmico quente em ovos de tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*): Tempo de pós-fertilização e duração do processo na sobrevivência das larvas. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 31, n. 1, p. 55-64, 2005.

- BABIKER, M. M.; IBRAHIM, H. Studies on the biology of reproduction in the cichlid *Tilapia nilotica* (L.): gonadal maturation and fecundity. **Journal of Fish Biology**, Oxford, v. 14, n. 1, p. 437-448, 1979.
- BEARDMORE, J. A.; MAIR, G. C.; LEWIS, R. I. Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: applications, problems and prospects. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 197, n. 1, p. 283-301, 2001.
- BOMBARDELLI, R. A.; HAYASHI, C.; MEURER, F.; FORNARI, D. C. Masculinização de larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) por banhos de imersão e o andrógeno dissolvido em solução de dimetilsulfóxido (DMSO). **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 26, n. 2, p. 209-215, 2004.
- CARVALHO, E. D.; FORESTI, F. Reversão de sexo em tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*, TREWAVAS, 1983, induzida por 17-alfa-metiltestosterona: proporção de sexo e histologia de gônadas. **Revista Brasileira de Biologia**, São Paulo, v. 56, n. 2, p. 249-262, 1996.
- CAVALCANTE, J. M. M.; FARIAS, J. O.; CAMPELLO, C. C. C.; CARVALHO, M. A. M.; GONDIM, J. M. Avaliação de método alternativo na determinação da proporção sexual de alevinos de tilápia por esmagamento gonadal em lâmina/laminula em comparação ao método do acetato-carmim. In: SEMANA UNIVERSITÁRIA, 9.; ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 13., 2004, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: UECE, 2004. ¹CD – ROM.
- CHMILEVSKYI, D. A. Effect of reduced temperature on oogenesis of the mouthbrooder, *Oreochromis mossambicus*, 2. Effect oh fish twenty – two days after hatching. **Journal of Ichthyology**, Moscow, v. 35, n. 1, p. 72-80, 1995.
- COWARD, K.; BROMAGE, N. R. Spawning frequency, fecundity, egg size and ovarian histology in groups of *Tilapia zilli* maintained upon two distinct food ration sizes from first-feeding to sexual maturity. **Aquatic Living Resource**, Stirling, v. 12, n. 1, p. 11-22, 1999.
- DESPREZ, D.; GÉRAZ, E.; HOAREAU, C. M.; BOSC, P.; BAROILLER, J. F. Production of a high percentage of male offspring with a natural androgen, 11 β -hydroxyandrostenedione (11 β OHA4), in Florida red tilapia. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 216, n. 1, p. 55-65, 2003.
- EL GAMAL, A. A.; DAVIS, K. B.; JENKINS, J. A.; TORRANS, E. L. Induction of triploid and tetraploid in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). **Journal of the World Aquaculture Society**, Oxford, v. 30, n. 3, p. 269-275, 1999.
- GOLTERMANN, H. L.; CLYMO, R. S.; OHNSTAD, M. A. M. **Methods for physical and chemical analysis of freshwaters**. London: Blackwell Science Publication, 1978. 214p.
- GUERRERO, R. D.; SHELTON, W. L. An acetate-carmim squash technique for sexing juveniles fishes. **The progressive Fish-Culturist**, Bethesda, v. 36, n. 1, p. 56, 1974.
- GUERRERO III, R. D.; GUERRERO, L. A. Effects of androstenedione and methyltestosterone on *Oreochromis niloticus* fry treated for sex reversal in outdoor net enclosure. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TILAPIA IN AQUACULTURE, 1997, Orlando. 1997. **Proceedings...** Flórida: University of Florida, v. 2, p. 772-777.
- LEONHARDT, J. H.; URBINATTI, E. C. Estudo comparativo do crescimento entre machos de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, sexados e revertidos. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, n. 1, v. 25, p. 19-26, 1999.
- MACINTOSH, D. J.; LITTLE, D. C. Nile Tilapia *Oreochromis niloticus*. In: BROMAGE, N. R.; ROBERTS, R. J. (Ed.). **Brodstock management and larval quality**. Stirling: Institute of Aquaculture – University of Stirling, 1995. p. 277-320.

- MACLEAN, N.; RAHMAN, M. A.; SOHM, F.; HWANG, G.; IYENGAR, A.; AYAD, H.; SMITH, A.; FARAHMAND, H. Transgenic tilapia and the tilapia genome. **Gene**, Napoli, v. 295, n. 2, p. 265-277, 2002.
- MAINARDES-PINTO, C. S. R.; VERANI, N. F.; CAMPOS, B. E. S.; 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, v. 29, n. 3, p. 654-659, 2000.
- 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. 30f. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura). Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal-SP, 2005.
- MEURER, F.; HAYASHI, C.; BOSCOLO, W. R. Lipídeos na alimentação de alevinos revertidos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*, L.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 31, n. 2, p. 566-573, 2002.
- MEURER, F.; HAYASHI, C.; BOSCOLO, W. R. Influência do processamento da ração no desempenho e sobrevivência da tilápia do Nilo durante a reversão sexual. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 32, n. 2, p. 262-267, 2003.
- NAKAMURA, M.; KOBAYASHI, T.; CHANG, X. T.; NAGAHAMA, Y. Gonadal sex differentiation in teleost fish. **The Journal of Experimental Zoology**, Hoboken, v. 281, p. 362-372, 1998.
- NEUMANN, E.. **Características do desenvolvimento inicial de duas linhagens de tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* e uma híbrida *Oreochromis* sp.** 2004. 63f. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura). Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal – SP, 2004.
- PALLER, V. G. V.; GUERRERO III, R. D. Histological effects of 17 α -methyltestosterone on gonadal sex differentiation of *Oreochromis niloticus* L. fry. **Asia Life Sciences**, Manila, v. 10, n. 1, p. 55-68, 2001.
- PANDIAN, T. J.; SHEELA, S. G. Hormonal induction of sex reversal in fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 138, n. 1, p. 1-22, 1995.
- PHELPS, R. P.; CERESO, G. The effect of confinement in hapas on sex reversal and growth of *Oreochromis niloticus*. **Journal of Applied Aquaculture**, New York, v. 1, n. 4, p. 73-81, 1992.
- POPMA, T. J.; GREEN, B. W. Aquacultural production manual: sex reversal of tilapia in earthen ponds. Auburn: Auburn University, 1990. 15p. **Research and Development**, n. 35.
- POPMA, T. J.; LOVSHIN, L. **Worldwide prospects for commercial production of tilapia**. Auburn: Auburn University., 1996. 23p. **Research and Development**, n. 41.
- SANCHEZ, L. E. F.; HAYASHI, C. Effect of feeding frequency on Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) fries performance during sex reversal in hapas. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 23, n. 4, p. 871-876, 2001. SAS INSTITUTE. **SAS® user's guide: statistics**, versão 8.0. Cary, 2004.
- TACHIBANA, L.; CASTAGNOLLI, N.; PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M.; VALLE, J. B.; SIQUEIRA, M. Desempenho de diferentes linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) na fase de reversão sexual. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 26, n. 3, p. 305-311, 2004.
- WASSERMANN, G. J.; AFONSO, L. O. B. Validação da técnica do acetato-carmim para avaliar o sexo de alevinos de tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 1, p. 133-139, 2002.