

Universidade Federal do Rio Grande – FURG

Programa de Pós-Graduação em Aquicultura

**Efeito da temperatura sobre a determinação do sexo e o crescimento de juvenis do
linguado *Paralichthys orbignyanus***

MARCELO HIDEO OKAMOTO

Tese apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do grau de doutor em
Aquicultura no Programa de Pós-Graduação
em Aquicultura da Universidade Federal do
Rio Grande

Orientador: Prof. Dr. Luís André Sampaio

Co-orientador: Prof. Dr. Luis Fernando Marins

Rio Grande - RS

Novembro 2011

Sumário

Dedicatória.....	iv
Agradecimentos.....	v
Resumo Geral.....	1
Abstract.....	2
Introdução Geral.....	3
Referências.....	8
Capítulo 1: Crescimento e sobrevivência de juvenis do linguado <i>Paralichthys orbignyanus</i> criados em diferentes temperaturas.....	15
Resumo.....	16
Abstract.....	17
1.1. Introdução.....	18
1.2. Material e Métodos.....	19
1.3. Resultados.....	21
1.4. Discussão.....	23
Referências.....	26
Capítulo 2: Determinação termolábil do sexo em linguado <i>Paralichthys orbignyanus</i>	29
Resumo.....	30
Abstract.....	31
2.1. Introdução.....	32
2.2. Material e Métodos.....	34
2.3. Resultados.....	36
2.4. Discussão.....	39
Referências.....	43

Capítulo 3: Expressão gênica do hormônio do crescimento (GH) e do fator de crescimento tipo insulina I hepático e muscular (IGF-I) em juvenis do linguado <i>Paralichthys orbignyanus</i> criados em diferentes temperaturas.....	47
Resumo.....	48
Abstract.....	49
3.1. Introdução.....	50
3.2. Material e Métodos.....	52
3.2.1. Peixes utilizados.....	52
3.2.2. Exposição às diferentes temperaturas.....	52
3.2.3. Síntese do DNA complementar (cDNA).....	54
3.2.4. Expressões gênicas.....	54
3.2.5. Análises estatísticas.....	55
3.3. Resultados.....	55
3.3.1. Crescimento.....	55
3.3.2. Expressões gênicas.....	57
3.4. Discussão.....	59
Referências.....	62
Discussão Geral.....	68
Referências.....	71

Aos meus pais

Agradecimentos

Ao Dr. Luís André Sampaio, pela orientação, ensinamento e ajuda em todas as questões técnico-científicas.

Aos membros da banca examinadora, Dra. Mônica Yumi Tsuzuki, Dr. Luciano de Oliveira Garcia e Dr. Luis Fernandes Marins, pela revisão e contribuições para a melhoria dessa tese.

Aos professores Romano e Luf por disponibilizarem seus laboratórios e aos amigos Marta e Márcio pela ajuda valiosa nas análises.

Aos meus amigos e colegas da EMA (estudantes, funcionários e professores) que, direta ou indiretamente, colaboraram para que a conclusão dessa jornada fosse possível.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo suporte financeiro.

Aos amigos do Laboratório de Piscicultura Estuarina e Marinha, Prof. Tesser, Ricardo, Cintia, Janaína, Shei, Adriana, Eduardo e Gabriel, que estiveram presentes durante o trabalho do dia-a-dia, reuniões, festas e inúmeros churrascos.

A minha família, pelo apoio e respeito pelas minhas escolhas.

A todos, muito obrigado!

Resumo Geral

O presente estudo analisou a influência da temperatura na determinação do sexo e no crescimento de juvenis do linguado *Paralichthys orbignyanus*. Logo após a metamorfose, juvenis ($32,3 \pm 1,6$ mg) foram distribuídos em tanques de 15 L (30 peixes por tanque), onde foram criados a 17, 20, 23 e 26°C. Ao atingirem aproximadamente 8 cm de comprimento total, os peixes foram coletados para análise histológica das gônadas e cálculo do percentual de machos e fêmeas. No 56º dia de experimento atingiram $608,8 \pm 76,3$ mg (23°C), $498,1 \pm 88,1$ mg (26°C), $443,7 \pm 50,4$ mg (20°C) e $318,7 \pm 22,1$ mg (17°C), havendo diferença significativa apenas entre 17 e 23°C. A proporção entre machos e fêmeas obtida a 20 e 23°C ficou próxima da frequência esperada de 1:1. Por outro lado, o percentual de fêmeas foi de 24% a 17°C e apenas 8% para os linguados criados a 26°C. Um segundo experimento, com juvenis de $127,6 \pm 31,9$ mg, foi realizado durante 20 dias com as mesmas condições do primeiro. Foram analisadas as expressões gênicas do GH (hormônio do crescimento) produzido pela adeno-hipófise, IGF-I (fator de crescimento tipo insulina I) hepático e muscular. As expressões gênicas do GH e do IGF-I hepático foram similares, exceto pela maior expressão do primeiro a 26°C e pela menor expressão do segundo a 23°C. A expressão do gene IGF-I muscular nos peixes mantidos a 17°C foi inferior em relação aos demais tratamentos, enquanto que os mantidos a 23°C expressaram mais que os mantidos a 20°C e em ambos a expressão foi similar aos mantidos a 26°C, indicando a importância do IGF-I autócrino no crescimento de juvenis de linguado. Logo após a metamorfose, o crescimento é otimizado a 23 e 26°C. Devido ao maior crescimento das fêmeas de linguado, sugere-se que os juvenis sejam criados a 23°C. Por outro lado, se o objetivo for a produção de neomachos, a temperatura utilizada deve ser 26°C.

Abstract

This study analyzed the influence of temperature on sex determination and growth of juvenile flounder *Paralichthys orbignyanus*. Early juveniles (32.3 ± 1.6 mg) were reared in 15 L tanks (30 fish per tank) at 17, 20, 23 and 26°C. When they reached approximately 8 cm in total length, the fish were collected, gonads were assessed by histology and the sex ratio at each temperature was calculated. On the 56th day, the fish reached 608.8 ± 76.3 mg (23°C), 498.1 ± 88.1 mg (26°C), 443.7 ± 50.4 mg (20°C) and 318.7 ± 22.1 mg (17°C), with significant difference only between 23 and 17°C. The proportion among males and females obtained at 20 and 23°C were close to the expected frequency of 1:1. On the other hand, at 17°C the percentage of females was 24% and it dropped to 8% at 26°C. A second experiment, with juveniles weighing 127.6 ± 31.9 mg, was conducted for 20 days with the same conditions as the first. There were analyzed the GH (growth hormone) from the anterior pituitary, liver IGF-I (insulin like growth factor I) and muscle IGF-I gene expression. The GH and liver IGF-I gene expression remained at the same levels, except for the higher expression of the first at 26°C and the lower expression of the latter at 23°C. The muscle IGF-I gene expression in fish reared at 17°C was lower compared to the other temperatures, whereas flounder reared at 23°C expressed more than those reared at 20°C, and both were similar compared to those reared at 26°C, indicating the importance of autocrine IGF-I on growth of juvenile flounder. Soon after metamorphosis, growth is optimized at 23 and 26°C. Therefore, due to the faster growth of females, it is suggested that after metamorphosis, juveniles should be reared at 23°C. However, if the aim is to produce neomales, than the rearing temperature should be 26°C.

Introdução Geral

Os linguados são peixes planos que pertencem à Ordem Pleuronectiformes (Figueiredo e Menezes, 2000). Eles são caracterizados por sofrerem uma profunda metamorfose durante o estágio larval, envolvendo a transição da simetria bilateral do corpo para um formato assimétrico e comprimido dorso-ventralmente, acompanhado pela migração de um dos olhos para o lado oposto da cabeça, além da mudança do comportamento pelágico para demersal (Nelson, 2006).

Algumas espécies de linguado são consideradas recursos pesqueiros importantes devido ao elevado valor comercial, o que despertou o interesse na sua criação. De 2000 para 2008, a produção mundial de linguado em cativeiro aumentou aproximadamente seis vezes, de 26.300 para 148.800 t. O turbot *Psetta maxima*, o linguado japonês *Paralichthys olivaceus* e a solha *Cynoglossus semilaevis* são as principais espécies produzidas (FAO, 2010).

O linguado *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes 1839) habita águas da plataforma continental do Oceano Atlântico Sul Ocidental, desde a costa até aproximadamente 20 m de profundidade. Sua distribuição se estende do estado do Rio de Janeiro (Brasil) até Mar del Plata (Argentina), sendo comum sua ocorrência associada a regiões estuarinas (Figueiredo e Menezes, 2000). Seu valor comercial é elevado e é um importante item da pesca na costa do Rio Grande do Sul, Uruguai e Argentina (Díaz de Astarloa, 2002). Alguns exemplares podem atingir mais de 100 cm de comprimento total e peso de aproximadamente 10 kg (Bianchini et al., 2010).

Além do elevado valor comercial, o linguado tem capacidade de tolerar ampla faixa de pH (Wasielesky et al., 1997), temperatura (Wasielesky et al., 1998) e salinidade (Sampaio e Bianchini, 2002), bem como concentrações elevadas de compostos

nitrogenados (Bianchini et al., 1996), que o caracteriza como um peixe rústico. Essas características fazem do linguado uma espécie promissora para o desenvolvimento da piscicultura marinha na América do Sul. Pesquisas relacionadas ao manejo de reprodutores, larvicultura e engorda vem sendo realizadas com o objetivo de viabilizar a sua criação (Bianchini et al., 2010).

A temperatura da água é considerada um dos fatores ambientais que mais afeta os processos fisiológicos e o comportamento de peixes (Crawshaw e Podrabsky, 2011). Por esse motivo, é necessário um controle apropriado da temperatura em sistemas de criação intensiva no sentido de otimizar a produção. Muitos estudos vêm sendo realizados para investigar, principalmente, os efeitos da temperatura sobre o crescimento e a sobrevivência de peixes (Martínez-Palacios et al., 2002; Okamoto et al., 2006; Streit et al., 2010; Sunde et al., 1998).

Também há estudos que mostram a influência da temperatura da água na determinação do sexo de algumas espécies de peixes (Baroiller e D’Cotta, 2001; Luckenbach et al., 2009). O modo mais comum de determinação do sexo em peixes está ligado a fatores genéticos, quando o sexo fenotípico é determinado pela combinação herdada de genes geralmente contidos nos cromossomos sexuais. A enzima citocromo P450 aromatase (P450arom) desempenha um papel fundamental nesse processo (Devlin e Nagahama, 2002). Essa enzima é responsável pela conversão de andrógenos em estrógenos (Luckenbach et al., 2009) e estudos sugerem que, em condições normais, níveis elevados de P450arom resultam na formação de ovários, enquanto que níveis baixos levam à formação de testículos (Baroiller et al., 1999; Devlin e Nagahama, 2002; Piferrer e Blázquez, 2005). Porém, em algumas espécies ocorre um fenômeno conhecido como determinação termolábil do sexo (DTS), quando determinada

temperatura se sobrepõe aos fatores genéticos e direciona o sexo fenotípico de um organismo (Ospina-Álvarez e Piferrer, 2008; Yamamoto, 1999).

Foram descritos três padrões de DTS em peixes: (1) na maioria dos casos, temperaturas baixas levam à formação de fêmeas, enquanto que temperaturas altas induzem à formação de machos; (2) o contrário ocorre em algumas espécies, com o desenvolvimento de fêmeas em temperaturas altas e de machos em temperaturas baixas; (3) há também o caso em que temperaturas baixas e altas induzem o predomínio de machos, enquanto que em temperaturas intermediárias a proporção entre machos e fêmeas é de 1:1 (Luckenbach et al., 2009; Ospina-Álvarez e Piferrer, 2008).

Entre as espécies reportadas por apresentarem DTS, estão os linguados *Paralichthys lethostigma* e *Paralichthys olivaceus* (Luckenbach et al., 2003; Yamamoto, 1999), sendo que até o momento, esses linguados são os únicos peixes conhecidos por exibirem o padrão 3 de DTS.

O controle do sexo na aquicultura é desejado em algumas espécies pela possibilidade de se produzir apenas indivíduos do sexo que apresenta mais vantagens zootécnicas e econômicas (Pandian e Koteeswaran, 1998). A criação exclusiva de fêmeas em salmonídeos é desejada devido à maturação sexual tardia em relação aos machos, resultando em crescimento mais acelerado, além da melhor qualidade e maior valor comercial de sua carne (Azuma et al., 2004). No caso das tilápias, a criação monossexo de machos evita, principalmente, problemas com a reprodução precoce e mantém a uniformidade do tamanho dos peixes no momento da despesca (Beardmore et al., 2001). O controle do sexo também é realizado em peixes ornamentais que apresentam dimorfismo sexual para a produção de indivíduos mais atraentes economicamente (Pandian e Koteeswaran, 1998).

Assim, a produção de lotes monossexo através do controle da DTS pode ser uma ferramenta interessante para a aquicultura. No Japão, a criação monossexo de fêmeas do linguado *P. olivaceus* vem sendo realizada para fins comerciais desde 1990, já que os indivíduos desse sexo apresentam um crescimento mais acelerado do que os machos. Uma técnica bastante eficaz para a produção de fêmeas é o cruzamento entre machos XX, conhecidos como neomachos (resultado da manipulação da temperatura) e fêmeas normais (XX), que resultam em proles constituídas exclusivamente por fêmeas (Yamamoto, 1999).

Devido à semelhança externa entre os neomachos e os machos normais, é praticamente impossível separar esses grupos (Yamamoto, 1999). Por isso, a reversão sexual pela temperatura tem sido realizada em proles ginogenéticas para garantir que todos os peixes submetidos ao tratamento possuam genótipo feminino (Hulata, 2001). A indução da ginogênese consiste na fertilização dos ovócitos por espermatozoides geneticamente inativados (geralmente por radiação ultravioleta) seguido pela retenção do segundo corpúsculo polar ou pela supressão da primeira clivagem celular (por choque térmico ou hiperbárico), resultando em indivíduos com herança genética exclusivamente materna (Pandian e Koteeswaran, 1998).

Foi verificado em populações selvagens de *P. orbignyanus* que as fêmeas também crescem mais rápido que os machos (Cazorla, 2005). Portanto, a criação exclusiva de fêmeas dessa espécie pode ser economicamente interessante.

Assim como em mamíferos, o eixo somatotrófico, composto pelo hormônio do crescimento (GH) e pelo fator de crescimento tipo insulina I (IGF-I), desempenha um papel importante no controle endócrino do crescimento de peixes (Le Bail et al., 1998; Moriyama et al., 2000). O GH é produzido pela adeno-hipófise e secretado na corrente sanguínea até atingir os tecidos alvos, onde se associa com receptores específicos

(GHR), dando início às ações relacionadas ao crescimento (Walters et al., 2006). O estímulo do GH provoca a síntese e a secreção do IGF-I, que está envolvido na regulação de proteínas, lipídeos, carboidratos, diferenciação e proliferação das células (Moriyama et al., 2000).

O principal sítio produtor de IGF-I dos vertebrados é o fígado (Reinecke et al., 2005; Wood et al., 2005; Yakar et al., 1999). Porém outros tecidos, como o ósseo e o muscular, também expressam o gene IGF-I, atuando de maneira autócrina e parácrina (Wood et al., 2005), exercendo também um papel importante no crescimento (Butler e Le Roith, 2001; Eppler et al., 2007; Yakar et al., 1999). Estudos com alguns peixes demonstram uma correlação positiva da expressão do gene IGF-I e da concentração de IGF-I presente no plasma, com a taxa de crescimento (Kajimura et al., 2001; Luckenbach et al., 2007; Uchida et al., 2003).

A ação da temperatura da água sobre o crescimento de peixes pode ocorrer sobre o eixo somatotrófico (Canosa et al., 2007; Wood et al., 2005). Estudos mostram que em algumas espécies como o salmão do Atlântico *Salmo salar*, o salmão japonês *Oncorhynchus masou ishikawai* e o salmão-real *Oncorhynchus tshawytscha* existe uma relação entre temperaturas sazonais ou de aclimação com variações na concentração de GH no plasma (Handeland et al., 2000; Moriyama et al. 1997; Pierce et al., 2001) ou na expressão de seu gene, como visto em dourada *Sparus sarba* e em carpa-comum *Cyprinus carpio* (Deane e Woo, 2006; Figueroa et al., 2005). Porém, o mesmo não ocorreu em truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* (Gabillard et al., 2003a). Estudos semelhantes foram realizados com IGF-I, tanto o hepático quanto o muscular, e também foram encontradas diferenças nos padrões de sua concentração no plasma ou na expressão do seu gene (Gabillard et al., 2003b; Imsland et al., 2007; Luckenbach et al.,

2007). Isso sugere que a temperatura atua sobre o eixo somatotrófico de forma distinta em diferentes espécies de peixes.

Objetivo Geral

O objetivo principal desse estudo foi investigar a influência da temperatura sobre a determinação do sexo, crescimento e sobrevivência de juvenis de *Paralichthys orbignyanus* logo após a metamorfose.

Objetivos Específicos

- Avaliar o crescimento e a sobrevivência de juvenis de *P. orbignyanus* em diferentes temperaturas.
- Verificar a ocorrência da determinação termolábil do sexo no linguado *P. orbignyanus*.
- Estudar o efeito da temperatura sobre a expressão dos genes GH produzido pela adeno-hipófise, IGF-I hepático e IGF-I muscular.

Referências

- Azuma, T., Takeda, K., Doi, T., Muto, K., Akutsu, M., Sawada, M., Adachi, S., 2004. The influence of temperature on sex determination in sockeye salmon *Oncorhynchus nerka*. *Aquaculture* 234: 461-473.
- Baroiller, J.F., D’Cotta, H., 2001. Environment and sex determination in farmed fish. *Comp. Biochem. Physiol. C*. 130: 399-409.

- Baroiller, J.F., Guiguen, Y., Fostier, A., 1999. Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. *Cell. Mol. Life Sci.* 55 :910-931.
- Beardmore, J.A., Mair, G.C., Lewis, R.I., 2001. Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: applications, problems, and prospects. *Aquaculture* 197: 283-301.
- Bianchini, A., Robaldo, R.B., Sampaio, L.A., 2010. Cultivo do linguado (*Paralichthys orbignyanus*), in: Baldisserotto, B., Gomes, L.C. (Eds.), *Espécies nativas para piscicultura no Brasil*, segunda ed. Editora UFSM, Santa Maria, pp. 559-587.
- Bianchini, A., Wasielesky, W., Miranda, K.C., 1996. Toxicity of nitrogenous compounds to juveniles of flatfish *Paralichthys orbignyanus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 56: 453-459.
- Butler, A.A., Le Roith, D., 2001. Control of growth by the somatotropic axis: growth hormone and insulin-like growth factors have related and independent roles. *Annu. Rev. Physiol.* 63: 141-164.
- Canosa, L.F., Chang, J.P., Peter, R.E., 2007. Neuroendocrine control of growth hormone in fish. *Gen. Comp. Endocr.* 151: 1-26.
- Cazorla, A.L., 2005. On the age and growth of flounder *Paralichthys orbignyanus* (Jenins, 1842) in Bahía Blanca Estuary, Argentina. *Hidrobiologia* 537: 81-87.
- Crawshaw, L.I., Podrabsky, J.E., 2011. Temperature preference: behavioral responses to temperature in fishes, in: Farrell, A.P., Don Stevens, E., Cech Jr, J.J., Richards, J.G. (Eds.), *Encyclopedia of fish physiology: from genome to environment*. Academic Press, New York, pp. 758-764.
- Deane, E.E., Woo, N.Y.S., 2006. Molecular cloning of growth hormone from silver sea bream: effects of abiotic and biotic stress on transcriptional and translational expression. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 342: 1077-1082.

- Devlin, R.H., Nagahama, Y., 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological and environmental influences. *Aquaculture* 208: 191-364.
- Díaz de Astarloa, J.M., 2002. A review of the flatfish fisheries of the South Atlantic Ocean. *Rev. Biol. Mar. Oceanog.* 37(2): 113-125.
- Eppler, E., Caellers, A., Shved, N., Hwang, G., Rahman, A.M., Maclean, N., Zapf, J., Reinecke, M., 2007. Insulin-like growth factor I (IGF-I) in a growth-enhanced transgenic (GH overexpressing) bony fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*): indication for a higher impact of endocrine IGF-I. *Transgenic Res.* 16: 479-489.
- FAO, 2010. The state of world fisheries and aquaculture. Sales and Marketing Group, Roma.
- Figueiredo, J.L., Menezes, N.A., 2000. Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. Museu de Zoologia / USP, São Paulo.
- Figuerola, J., San Martín, R., Flores, C., Grothusen, H., Kausel, G., 2005. Seasonal modulation of growth hormone mRNA and protein levels in carp pituitary: evidence for two expressed genes. *J. Comp. Physiol. B* 175: 185-192.
- Gabillard, J-C., Weil, C., Rescan, P-Y., Navarro, I., Gutiérrez, J., Le Bail, P-Y., 2003a. Environmental temperature increases plasma GH levels independently of nutritional status in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen. Comp. Endocr.* 133: 17-26.
- Gabillard, J-C., Weil, C., Rescan, P-Y., Navarro, I., Gutiérrez, J., Le Bail, P-Y., 2003b. Effects of environmental temperature on IGF1, IGF2, and IGF type I receptor expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen. Comp. Endocr.* 133: 233-242.

- Handeland, S.O., Berge, A., Björnsson, B.T., Lie, O., Stefansson, S.O., 2000 Seawater adaptation by out of season Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts at different temperatures. *Aquaculture* 181: 377-396.
- Hulata, G., 2001. Genetic manipulations in aquaculture: a review of stock improvement by classical and modern technologies. *Genetica* 111: 155-173.
- Imslund, A.K., Björnsson, B.T., Gunnarsson, S., Foss, A., Stefansson, S.O., 2007. Temperature and salinity effects on plasma insulin-like growth factor-I concentrations and growth in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture* 271: 546-552.
- Kajimura, S., Uchida, K., Yada, T., Riley, L.G., Byatt, J.C., Collier, R.J., Ainda, K., Hirano, T., Grau, E.G., 2001. Stimulation of insulin-like growth factor-I production by recombinant bovine growth hormone in Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Fish Physiol. Biochem.* 25: 221-230.
- Le Bail, P-Y., Gentil, V., Noel, O., Gomez, J.M., Carre, F., Le Goff, P., Weil, C., 1998. Structure, function, and regulation of insulin-like growth factors in fish. *Ann. NY. Acad. Sci.* 839: 157-161.
- Luckenbach, J.A., Borski, R.J., Daniels, H.V., Godwin, J., 2009. Sex determination in flatfishes: mechanisms and environmental influences. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 20: 256-263.
- Luckenbach, J.A., Godwin, J., Daniels, H.V., Borski, R.J., 2003. Gonadal differentiation and effects of temperature on sex determination in southern flounder (*Paralichthys lethostigma*). *Aquaculture* 216: 315-327.
- Luckenbach, J.A., Murashige, R., Daniels, H.V., Godwin, J., Borski, R.J., 2007. Temperature affects insulin-like growth factor I and growth of juvenile southern flounder, *Paralichthys lethostigma*. *Comp. Biochem. Phys. A* 146: 95-104.

- Martínez-Palacios, C.A., Tovar, E.B., Taylor, J.F., Durán, G.R., Ross, L.G., 2002. Effect of temperature on growth and survival of *Chirostoma estor estor*, Jordan 1879, monitored using a simple video technique for remote measurement of length and mass of larval and juvenile fishes. *Aquaculture* 209: 369-377.
- Moriyama, S., Ayson, F.G., Kawauchi, H., 2000. Growth regulation by insulin-like growth factor-I in fish. *Biosci. Biotech. Bioch.* 64: 1553-1562.
- Moriyama, S., Shimma, H., Tagawa, M., Kagawa, H., 1997. Changes in plasma insulin-like growth factor-I in the precociously maturing amago salmon *Oncorhynchus masou ishikawai*. *Fish Physiol. Biochem.* 17: 253–259.
- Nelson, J.S., 2006. *Fishes of the world*, quarta ed. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken.
- Okamoto, M.H., Sampaio, L.A., Maçada, A.P., 2006. Efeito da temperatura sobre o crescimento e a sobrevivência de juvenis da tainha *Mugil platanus* Günther, 1880. *Atlantica* 28(1): 61-66.
- Ospina-Álvarez, N., Piferrer, F., 2008. Temperature-dependent sex determination in fish revisited: prevalence, a single sex ratio response pattern, and possible effects of climate change. *PloS ONE* 3(7): e2837.
- Pandian, T.J., Koteeswaran, R., 1998. Ploidy induction and sex control in fish. *Hydrobiologia* 384: 167-243.
- Pierce, A.L., Shearer, K.D., Baker, D.M., Dickhoff, W.W., 2001. An autumn profile of growth regulatory hormones in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Fish Physiol. Biochem.* 25: 83-88.
- Piferrer, F., Blázquez, M., 2005. Aromatase distribution and regulation in fish. *Fish Physiol. Biochem.* 31: 215-226.

- Reinecke, M., Björnsson, B.T., Dickhoff, W.W., McCormick, S.D., Navarro, I., Power, D.M., Gutiérrez, J., 2005. Growth hormone and insulin-like growth factors in fish: where we are and where to go. *Gen. Comp. Endocr.* 42: 20-24.
- Sampaio, L.A., Bianchini, A., 2002. Salinity effects on osmoregulation and growth of the euryhaline flounder *Paralichthys orbignyanus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 269: 187-196.
- Streit, D.P., Tesser, M.B., Burkert, D., Sanchez, C.C., Sampaio, L.A., 2010. Survival and growth of juvenile marine pejerrey, *Odontesthes argentinensis*, reared at different temperatures. *J. World Aquacult. Soc.* 41(6): 931-935.
- Sunde, L.M., Imsland, A.K., Folkvord, A., Stefansson, S.O., 1998. Effects of size grading on growth and survival of juvenile turbot at two temperatures. *Aquacult. Int.* 6: 19-32.
- Uchida, K., Kajimura, S., Riley, L.G., Hirano, T., Aida, K., Grau, E.G., 2003. Effects of fasting on growth hormone/ insulin-like growth factor I axis in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Comp. Biochem. Phys. A.* 134: 429-433.
- Walters, M.J., Hoang, H.N., Fairlie, D.P., Pelekanos, R.A., Brown., 2006. New insights into growth hormone action. *J. Mol. Endocrinol.* 36: 1-7.
- Wasielesky, W., Bianchini, A., Miranda, K., 1998. Tolerancia a la temperatura de juveniles de lenguado *Paralichthys orbignyanus*. *Frente Marítimo* 17(A): 43-48.
- Wasielesky, W., Bianchini, A., Santos, M.H.S., Poersch, L.H., 1997. Tolerance of juvenile flatfish *Paralichthys orbignyanus* to acid stress. *J. World Aquacult. Soc.* 28: 202-204.
- Wood, A.W., Duan, C., Bern, H.A., 2005. Insulin-like growth factor signaling in fish. *Int. Rev. Cytol.* 243: 215-285.

Yakar, S., Liu, J., Stannard, B., Butler, A., Accili, D., Sauer, B., & Le Roith, D., 1999.

Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 7324-7329.

Yamamoto, E., 1999. Studies on sex-manipulation and production of cloned populations in hirame, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel). *Aquaculture* 173: 235-246.

Capítulo 1

Crescimento e sobrevivência de juvenis do linguado *Paralichthys orbignyanus* criados
em diferentes temperaturas

Marcelo Hideo Okamoto e Luís André Sampaio

Resumo

O linguado *Paralichthys orbignyanus* é um importante recurso pesqueiro que está despertando o interesse de sua produção em cativeiro. O presente estudo avaliou o efeito da temperatura sobre o crescimento e a sobrevivência de juvenis de linguado. Juvenis ($32,3 \pm 1,6$ mg) foram mantidos nas temperaturas de 17, 20, 23 e 26°C, todas com duas repetições. A cada duas semanas, durante 56 dias, todos os peixes foram medidos e pesados. A sobrevivência foi de 100% em todos os tratamentos, sugerindo que logo após a metamorfose o linguado já é euritérmico. A taxa de crescimento específico diário foi de $5,25 \pm 0,06\%$ (23°C), $4,87 \pm 0,23\%$ (26°C), $4,66 \pm 0,21\%$ (20°C) e $4,07 \pm 0,14\%$ (17°C), havendo diferença significativa apenas entre 23 e 17°C. Também foi observada diferença significativa apenas no peso final dos linguados criados a 23°C ($608,8 \pm 76,3$ mg) e 17°C ($318,7 \pm 22,1$ mg). De acordo com os resultados obtidos nesse trabalho, sugere-se que o berçário de *P. orbignyanus* seja realizado entre 20 e 26°C.

Palavras-chave: berçário, piscicultura, Pleuronectiformes

Abstract

The Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* is an important fisheries resource that has sparked the interest of its production in captivity. This study evaluated the effect of temperature on growth and survival of juvenile flounder. Juveniles (32.3 ± 1.6 mg) were reared at 17, 20, 23 and 26°C, with duplicate tanks for each temperature. Every two weeks, during 56 days, all fish were measured and weighed. Survival was 100% in all treatments, suggesting that Brazilian flounder becomes eurythermic soon after completing metamorphosis. The daily specific growth rate was $5.25 \pm 0.06\%$ (23°C), $4.87 \pm 0.23\%$ (26°C), $4.66 \pm 0.21\%$ (20°C) and $4.07 \pm 0.14\%$ (17°C) with significant difference only between 23 and 17°C. Significant difference was also observed only in the final weight of flounders reared at 23°C (608.8 ± 76.3 mg) and 17°C (318.7 ± 22.1 mg). According to the results obtained in this study, it is suggested that the nursery of *P. orbignyanus* be held between 20 and 26°C.

Key words: fish culture, nursery, Pleuronectiformes

1.1. Introdução

O linguado *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes 1839) habita águas da plataforma continental do Oceano Atlântico Sul Ocidental, desde a costa até aproximadamente 20 m de profundidade. Sua distribuição se estende do estado do Rio de Janeiro (Brasil) até Mar del Plata (Argentina), sendo comum sua ocorrência associada a regiões estuarinas (Figueiredo e Menezes, 2000). Seu elevado valor comercial o faz um importante item da pesca na costa sul do Brasil, Uruguai e Argentina (Díaz de Astarloa, 2002).

Além do elevado valor comercial, o linguado tem capacidade de tolerar ampla faixa de pH (Wasielesky et al., 1997), temperatura (Wasielesky et al., 1998) e salinidade (Sampaio e Bianchini, 2002), bem como concentrações elevadas de compostos nitrogenados (Bianchini et al., 1996), que o caracteriza como uma espécie promissora para piscicultura marinha.

A desova de linguado pode ser obtida de forma espontânea em cativeiro, pela manipulação do fotoperíodo e da temperatura ou pode ser induzida, com a aplicação de hormônios (Sampaio et al., 2008). Estudos realizados sobre a reprodução e a larvicultura permitiram a elaboração de um protocolo para a produção de juvenis de linguado (Sampaio et al., 2007; 2008).

A temperatura da água é um dos fatores ambientais mais importantes que afetam o crescimento de peixes. Para organismos ectotérmicos como os peixes, existem faixas de temperatura em que o crescimento é favorecido. Em temperaturas inferiores, a queda do metabolismo reduz o crescimento, enquanto que em temperaturas acima da faixa considerada ideal também ocorre redução do crescimento devido ao maior gasto energético (Brett e Groves, 1979). Por esse motivo, é necessário um controle apropriado

da temperatura em sistemas de criação intensiva no sentido de otimizar a produção e muitos estudos vêm sendo realizados para investigar, principalmente, os efeitos da temperatura sobre o crescimento e a sobrevivência de peixes (Martínez-Palacios et al., 2002; Okamoto et al., 2006; Streit et al., 2010; Sunde et al., 1998).

O presente estudo avaliou o crescimento e a sobrevivência de juvenis de *P. orbignyana* criados, na fase de berçário, em diferentes temperaturas.

1.2. Material e Métodos

Linguados adultos, capturados com rede de arrasto na Praia do Cassino (Rio Grande - RS) durante sua época reprodutiva, foram levados para o Laboratório de Piscicultura Estuarina e Marinha (FURG), onde foram condicionados ao cativeiro. As fêmeas foram submetidas à biópsia por punção gonadal com seringa e agulha (16 G) para a verificação do estágio de maturação gonadal, aquelas que se apresentaram aptas à indução hormonal (oócitos com diâmetro aproximadamente de 400 μm), receberam uma única injeção intramuscular de extrato de pituitária de carpa na dose de 5 mg kg⁻¹ (Sampaio et al., 2008). Posteriormente, as fêmeas foram isoladas individualmente em tanques de 300 L com água do mar a 21°C e 30‰. Aproximadamente 32 h após a indução hormonal, ovócitos e sêmen foram coletados por meio de extrusão manual e os espermatozoides foram ativados com água do mar (30‰) para a realização da fertilização artificial.

A larvicultura durou 30 dias e foi realizada em um tanque de 1000 L contendo água do mar (30‰) constantemente aerada, mantida a 23,4 \pm 0,3°C e sob um fotoperíodo de 24 h de luz (Sampaio et al., 2006; 2007). Durante o estágio larval, rotíferos e náuplios de *Artemia* sp. (INVE) foram oferecidos como alimento.

Ao final da metamorfose, juvenis ($32,3 \pm 1,6$ mg e $14,8 \pm 0,3$ mm) foram distribuídos aleatoriamente em oito tanques de 15 L (30 peixes por tanque) mantidos em banho termostatizado. No momento da transferência todos os tanques continham água a 23°C e 30%. Posteriormente, as temperaturas foram ajustadas (exceto para 23°C) a uma taxa de 3°C h^{-1} para 17, 20 e 26°C , todas com duas repetições.

O experimento foi realizado em uma sala climatizada (17°C) para a manutenção da menor temperatura. As demais temperaturas foram mantidas com aquecedores submersíveis de 300 W equipados com termostato. Para evitar que os peixes sofressem choque térmico, a renovação foi realizada com água na mesma temperatura dos tanques.

Durante o experimento os peixes foram alimentados *ad libitum*, sendo que até o 23º dia, a alimentação foi realizada com náuplios de *Artemia* sp. (INVE). A partir desse dia teve início o desmame, quando os peixes foram co-alimentados com ração comercial (INVE NRD) durante dois dias e posteriormente somente com ração. Restos de alimento e fezes acumulados no fundo dos tanques foram retirados diariamente com sifão. Cerca de 80% do volume d'água foi renovado uma vez ao dia, durante o período de alimentação com *Artemia* sp. e duas vezes ao dia (08:00 h e 17:00 h) a partir do oferecimento de ração.

O experimento teve duração de 56 dias e a cada duas semanas todos os peixes foram anestesiados com benzocaína (25 ppm), medidos e pesados para o acompanhamento do crescimento. Com os dados obtidos foram calculados o coeficiente de variação do peso: $CV = (\sigma / pf) \times 100$, onde pf é o peso (g) dos juvenis ao final do experimento e σ é o desvio padrão do peso; e a taxa de crescimento específico diário: $TCE = [(\ln pf - \ln pi) / t] \times 100$, onde pi e pf são os pesos (g) dos juvenis no início e no final do experimento, respectivamente, e t é o tempo de experimento em dias.

A temperatura e a concentração de oxigênio dissolvido ao longo do experimento foram $17,2 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ e $6,94 \pm 0,10 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$; $20,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ e $6,49 \pm 0,08 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$; $22,7 \pm 0,0^{\circ}\text{C}$ e $6,06 \pm 0,06 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$; e $26,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ e $5,69 \pm 0,08 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$. A salinidade permaneceu em $32,4 \pm 0,3\text{‰}$ em todos os tratamentos.

O tratamento estatístico dos resultados (média \pm EP) foi realizado por Análise de Variância (uma via) ao nível de significância de 95% e as diferenças identificadas com o Teste de Tukey (Sokal e Rohlf, 1995). Todas as análises foram realizadas com o programa Statistica 7.0.

1.3. Resultados

A sobrevivência foi de 100% em todas as temperaturas testadas ($P>0,05$). Logo na primeira biometria, os peixes criados a 23°C apresentaram peso significativamente superior aos demais ($P<0,05$). Também houve diferença significativa entre o peso dos peixes criados a 26 e 17°C ($P<0,05$), porém ambos não diferiram do peso dos peixes criados a 20°C ($P>0,05$). Entretanto, essas diferenças foram desaparecendo ao longo do tempo e ao final do experimento foi observada diferença significativa ($P<0,05$) apenas entre os pesos dos linguados criados a 23°C ($608,8 \pm 76,6 \text{ g}$) e 17°C ($318,7 \pm 22,1 \text{ g}$) (Figura 1).

O coeficiente de variação do peso no início do experimento foi de 19% para todos os tratamentos. Este coeficiente aumentou ao longo do tempo e, ao final do experimento, atingiu $51 \pm 10\%$ (17°C), $86 \pm 5\%$ (20°C), $98 \pm 3\%$ (23°C) e $125 \pm 30\%$ (26°C), não havendo diferença significativa entre os tratamentos ($P>0,05$).

Os juvenis criados em 17, 20 e 26°C apresentaram taxas de crescimento específico diário acima de $4\% \text{ dia}^{-1}$, enquanto que para aqueles criados a 23°C a taxa de

crescimento específico foi superior a $5\% \text{ dia}^{-1}$ (Figura 2), havendo diferença significativa apenas entre os tratamentos 17 e 23°C ($P < 0,05$).

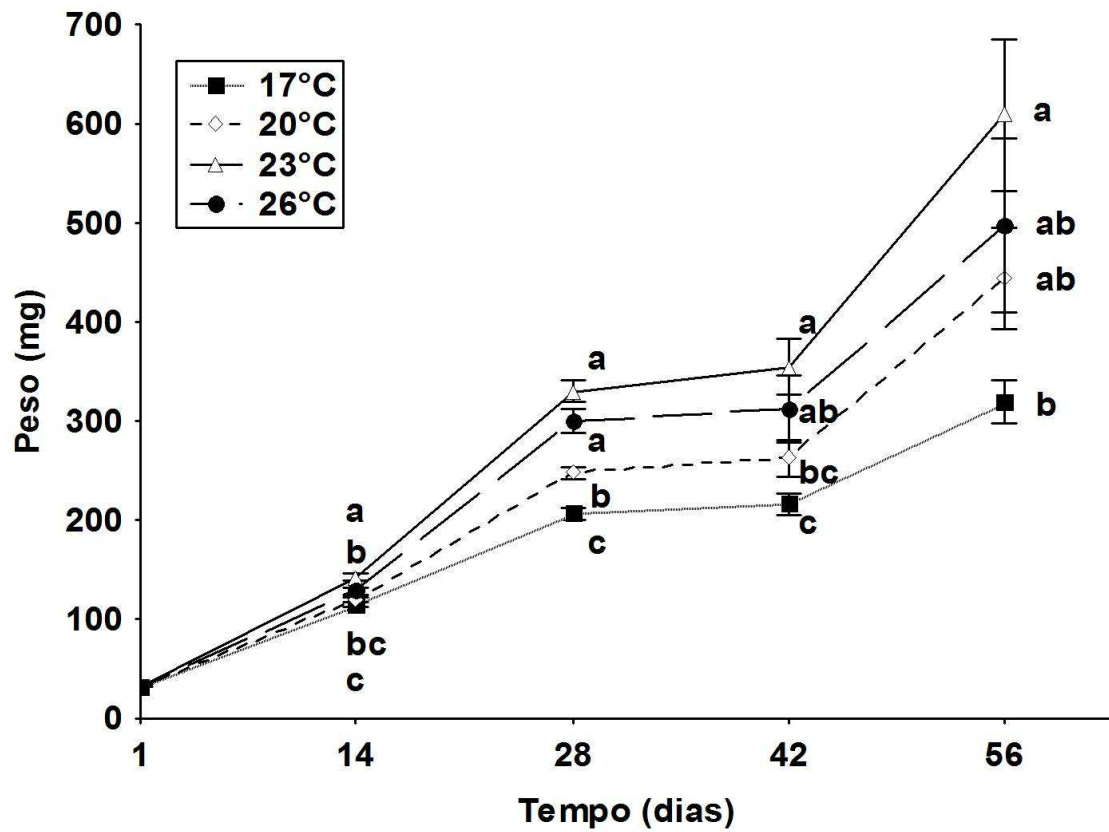


Figura 1. Peso (média \pm EP) de juvenis do linguado *Paralichthys orbignyanus* criados em diferentes temperaturas. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos em cada intervalo de tempo.

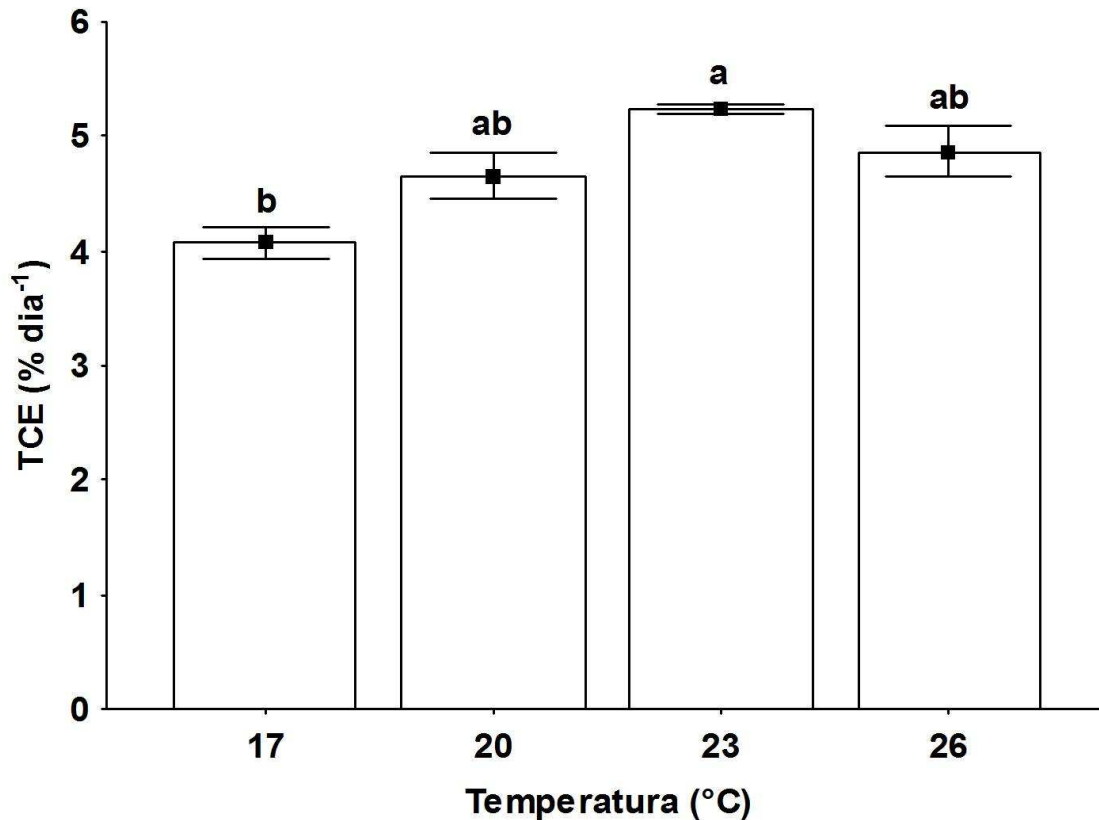


Figura 2. Taxa de crescimento específico diário (média \pm EP) de juvenis do linguado *Paralichthys orbignyanus* criados em diferentes temperaturas. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$).

1.4. Discussão

Em ensaios de tolerância à temperatura, foi observado que juvenis de *P. orbignyanus* (109 ± 11 g) são euritérmicos, pois sobrevivem entre 10 e 27°C. Em temperaturas abaixo ou acima dessa faixa, a digestão é prejudicada, provocando regurgitação do alimento e resultando posteriormente em morte (Wasiolesky et al., 1998). No presente trabalho foi avaliada uma faixa de temperatura menor (17 – 26°C). A ausência de mortalidade, aliada à procura por alimento observada em todas as temperaturas, mostram que logo após a metamorfose o linguado já é euritérmico.

Juvenis de tainha *Mugil liza* (870 ± 250 mg) e de peixe-rei *Odontesthes argentinensis* (161 ± 3 mg) também apresentaram elevada sobrevivência, quando criados entre 20 – 30°C e 20 – 26°C, respectivamente (Okamoto et al., 2006; Streit et al., 2010). Estas duas espécies, assim como *P. orbignyanus*, habitam regiões costeiras e estuarinas e são interessantes para a criação em áreas como o Estuário da Lagoa dos Patos e região costeira adjacente, onde podem ocorrer variações sazonais de temperatura entre 9 e 28°C (Baumgarten e Niencheski, 1990).

Foi observado um crescimento heterogêneo dos juvenis ao longo do tempo, independentemente da temperatura testada, resultando em peixes de diferentes classes de tamanho no mesmo tanque. Apesar de não ter havido diferença significativa, a tendência de aumento do coeficiente de variação do peso com a elevação da temperatura mostra que essa heterogeneidade fica mais acentuada nas temperaturas mais altas. O crescimento heterogêneo é indesejado em sistemas de criação de peixes carnívoros por estimular canibalismo, como observado em juvenis do linguado japonês *Paralichthys olivaceus* (Dou et al., 2000) e do próprio *P. orbignyanus* (Sampaio et al., 2008). No presente estudo não houve canibalismo, porém foi observado um comportamento agressivo dos peixes maiores sobre os menores.

Podemos observar na Figura 1 que entre o 28° e o 42° dias houve uma desaceleração no crescimento dos linguados em todos os tratamentos. Essa desaceleração pode estar associada ao processo de desmame, período em que os peixes tiveram que se adaptar à alimentação exclusivamente com ração. A partir do 42° dia houve uma recuperação no crescimento dos linguados.

A TCE e o peso ao final do experimento apresentados pelos peixes criados a 23°C foram superiores aos dos criados a 17°C. Juvenis do linguado *Paralichthys lethostigma* (280 ± 20 mg) criados a 23 e 28°C não apresentaram diferença significativa

na TCE, porém o peso médio final foi maior naqueles criados na temperatura mais baixa (Luckenbach et al., 2007). Essa diferença de tamanho foi explicada pela maior expressão do gene do fator de crescimento tipo insulina I (IGF-I) produzida no músculo, além da maior quantidade de IGF-I hepático presente no sangue dos peixes criados a 23°C, já que o IGF-I é o principal mediador da ação fisiológica do hormônio do crescimento (Moriyama et al., 2000).

A temperatura possui forte influência na determinação do sexo em algumas espécies de peixes, podendo provocar alterações na proporção entre machos e fêmeas (Devlin e Nagahama, 2002). Já foi reportado que a determinação do sexo do linguado japonês *P. olivaceus* é dependente da temperatura. Quando juvenis dessa espécie, ainda com as gônadas indiferenciadas, são criados em temperatura baixa (15°C) ou alta (25°C), ocorre um maior percentual de machos, enquanto que em temperaturas intermediárias a proporção entre machos e fêmeas fica próxima de 1:1 (Yamamoto, 1999). Luckenbach et al. (2003) observaram que a determinação do sexo de *P. lethostigma* também segue esse padrão.

A heterogeneidade do crescimento mencionada acima pode estar parcialmente ligada ao sexo, já que estudos em populações selvagens demonstram que fêmeas de *P. orbignyanus* crescem mais rápido que machos (Cazorla, 2005). Portanto, a produção monossexo de fêmeas poderia ser um meio de minimizar esse problema.

Pelos resultados obtidos no presente estudo, sugere-se que o berçário de juvenis de *P. orbignyanus* seja realizado entre 20 e 26°C.

Referências

- Baumgarten, M.G.Z., Niencheski, L.F., 1990. Estuário da Laguna dos Patos: variações de alguns parâmetros físico-químicos da água e metais associados ao material em suspensão. *Cienc. Cult.*, 42(5/6): 390-396.
- Bianchini, A., Wasielesky, W., Miranda, K.C., 1996. Toxicity of nitrogenous compounds to juveniles of flatfish *Paralichthys orbignyanus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 56: 453-459.
- Brett, J.R., Groves, T.D.D., 1979. Physiological energetic, in: Hoar, W.S., Randall, D.J., Brett, J.R. (Eds.). *Fish physiology*, vol. 8. Academic Press, New York, pp. 280-352.
- Cazorla, A.L., 2005. On the age and growth of flounder *Paralichthys orbignyanus* (Jenins, 1842) in Bahía Blanca Estuary, Argentina. *Hidrobiologia* 537: 81-87.
- Devlin, R.H., Nagahama, Y., 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological and environmental influences. *Aquaculture* 208: 191-364.
- Díaz de Astarloa, J.M., 2002. A review of the flatfish fisheries of the South Atlantic Ocean. *Rev. Biol. Mar. Oceanog.* 37(2): 113-125.
- Dou, S., Seikai, T., Tsukamoto, K., 2000. Cannibalism in Japanese flounder juveniles, *Paralichthys olivaceus*, reared under controlled conditions. *Aquaculture* 182: 149-159.
- Figueiredo, J.L., Menezes, N.A., 2000. Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. Museu de Zoologia / USP, São Paulo.

- Luckenbach, J.A., Godwin, J., Daniels, H.V., Borski, R.J., 2003. Gonadal differentiation and effects of temperature on sex determination in southern flounder (*Paralichthys lethostigma*). *Aquaculture* 216: 315-327.
- Luckenbach, J.A., Murashige, R., Daniels, H.V., Godwin, J., Borski, R.J., 2007. Temperature affects insulin-like growth factor I and growth of juvenile southern flounder, *Paralichthys lethostigma*. *Comp. Biochem. Phys. A* 146: 95-104.
- Martínez-Palacios, C.A., Tovar, E.B., Taylor, J.F., Durán, G.R., Ross, L.G., 2002. Effect of temperature on growth and survival of *Chirostoma estor estor*, Jordan 1879, monitored using a simple video technique for remote measurement of length and mass of larval and juvenile fishes. *Aquaculture* 209: 369-377.
- Moriyama, S, Ayson, F.G., Kawauchi, H., 2000. Growth regulation by insulin-like growth factor-I in fish. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64: 1553-1562.
- Okamoto, M.H., Sampaio, L.A., Maçada, A.P., 2006. Efeito da temperatura sobre o crescimento e a sobrevivência de juvenis da tainha *Mugil platanus* Günther, 1880. *Atlântica* 28(1): 61-66.
- Sampaio, L.A., Bianchini, A., 2002. Salinity effects on osmoregulation and growth of the euryhaline flounder *Paralichthys orbignyanus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 269: 187-196.
- Sampaio, L.A., Freitas, L.S., Okamoto, M.H., Louzada, L.R., Rodrigues, R.V., Robaldo, R.B., 2007. Effects of salinity on Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* from fertilization to juvenile settlement. *Aquaculture* 262: 340-346.
- Sampaio, L.A., Robaldo, R.B., Bianchini, A., 2008. Hormone induced ovulation, natural spawning and larviculture of Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839). *Aquac. Res.* 39: 712-717.
- Sokal, R.R., Rohlf, E.J., 1995. *Biometry*, third ed. Freeman and Company, New York.

- Streit, D.P., Tesser, M.B., Burkert, D., Sanchez, C.C., Sampaio, L.A., 2010. Survival and growth of juvenile marine pejerrey, *Odontesthes argentinensis*, reared at different temperatures. *J. World Aquac. Soc.* 41(6): 931-935.
- Sunde, L.M., Imsland, A.K., Folkvord, A., Stefansson, S.O., 1998. Effects of size grading on growth and survival of juvenile turbot at two temperatures. *Aquacult. Int.* 6: 19-32.
- Wasielesky, W., Bianchini, A., Miranda, K., 1998. Tolerancia a la temperatura de juveniles de lenguado *Paralichthys orbignyanus*. *Frente Marítimo* 17(A): 43-48.
- Wasielesky, W., Bianchini, A., Santos, M.H.S., Poersch, L.H., 1997. Tolerance of juvenile flatfish *Paralichthys orbignyanus* to acid stress. *J. World Aquacult. Soc.* 28: 202-204.
- Yamamoto, E., 1999. Studies on sex-manipulation and production of cloned populations in hirame, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel). *Aquaculture* 173: 235-246.

Capítulo 2

Determinação termolábil do sexo em linguado *Paralichthys orbignyanus*

Marcelo Hideo Okamoto, Luis Alberto Romano, Luís André Sampaio

Resumo

O sexo fenotípico de alguns peixes pode ser fortemente influenciado pela temperatura da água e manipulado durante as fases iniciais de desenvolvimento sem a utilização de hormônios esteróides. O objetivo desse estudo foi verificar se a temperatura da água influencia a determinação do sexo do linguado *Paralichthys orbignyanus*. Juvenis ($32,3 \pm 1,6$ mg e $14,8 \pm 0,3$ mm) foram criados em tanques de 15 L nas temperaturas de 17, 20, 23 e 26°C, até atingirem aproximadamente 8,0 cm de comprimento total. As gônadas foram acessadas por procedimento histológico e posteriormente a proporção entre machos e fêmeas foi calculada em cada temperatura e analisada pelo teste qui-quadrado (χ^2) com a frequência esperada entre machos e fêmeas de 1:1, sem considerar a temperatura da água. Os percentuais de fêmeas obtidos a 20 e 23°C foram de $44,0 \pm 9,4$ e $58,3 \pm 6,1\%$, respectivamente, próximos da frequência esperada de 1:1 ($P > 0,05$). Por outro lado, foi observado que a 17°C o percentual de fêmeas foi de $24,1 \pm 1,9\%$ ($P < 0,01$), enquanto que a 26°C este percentual caiu para $7,9 \pm 0,8\%$ ($P < 0,001$). Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) na sobrevivência dos linguados criados nas diferentes temperaturas, variando entre 82% a 23°C e 93% a 26°C. Esses resultados mostram que juvenis de linguado *P. orbignyanus*, delineados geneticamente para serem fêmeas, são sensíveis a temperatura da água, transformando-se em machos fenotípicos a 17 e 26°C, com resultado mais nítido na temperatura mais elevada.

Palavras-chave: controle do sexo, criação monossexo, gônada, temperatura

Abstract

The phenotypic sex of some fish can be strongly influenced by water temperature and manipulated during the early stages of development without using steroid hormones. The aim of this study was to verify whether water temperature influences sex determination in Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus*. Early juveniles (weight 32.3 ± 1.6 mg and total length 14.8 ± 0.3 mm) were reared in 15 L tanks at 17, 20, 23 and 26°C until they reached approximately 8.0 cm. Gonads were assessed by histology and then the sex ratio at each temperature was calculated and statistically analyzed using chi-square test (χ^2), with the expected frequency between males and females of 1:1, regardless of water temperature. The percentage of females obtained at 20 and 23°C were 44.0 ± 9.4 and $58.3 \pm 6.1\%$, respectively, close to the expected frequency of 1:1 ($P > 0.05$). On the other hand, it was observed that at 17°C the percentage of females was $24.1 \pm 1.9\%$ ($P < 0.01$), whereas at 26°C this percentage dropped to $7.9 \pm 0.8\%$ ($P < 0.001$). There was no significant difference ($P > 0.05$) in survival among flounder reared at different temperatures, ranging from 82% at 23°C to 93% at 26°C. These results show that juvenile Brazilian flounder, genetically designed to be females, are sensitive to water temperature, turning into phenotypic males at 17 and 26°C, with a more pronounced response at the higher temperature.

Keywords: flatfish, gonad, monosex culture, sex control, temperature

2.1. Introdução

O linguado *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes 1839) habita a plataforma continental do Oceano Atlântico Ocidental até aproximadamente 20 m de profundidade, distribuindo-se do estado do Rio de Janeiro – Brasil até Mar del Plata – Argentina, sendo comum sua ocorrência associada a regiões estuarinas (Figueiredo e Menezes, 2000). Seu valor comercial é elevado, sendo um importante item da pesca artesanal e industrial na costa da Região Sul do Brasil. Somando-se a isso, o linguado tem capacidade de tolerar uma ampla faixa de pH (Wasielesky et al., 1997), temperatura (Wasielesky et al., 1998) e salinidade (Sampaio e Bianchini, 2002), bem como concentrações elevadas de compostos nitrogenados (Bianchini et al., 1996), o que o caracteriza como uma espécie promissora para piscicultura marinha.

Estudos realizados sobre a reprodução e a larvicultura permitiram a elaboração de um protocolo para a produção de juvenis de linguado. Porém, após a metamorfose, os juvenis apresentam um crescimento heterogêneo, ocasionando problemas com canibalismo (Sampaio et al., 2007; 2008).

A produção de lotes monossexo pode minimizar o problema de crescimento heterogêneo (Beardmore et al., 2001). Lotes de peixes que apresentam crescimento mais homogêneo reduzem a necessidade de classificação e separação por tamanho, e conseqüentemente diminui o estresse causado pela manipulação. A utilização de lotes monossexo proporciona ainda outros benefícios, como a criação de indivíduos do sexo mais vantajoso economicamente (Pandian e Koteeswaran, 1998). Lotes monossexo podem ser obtidos por tratamentos hormonais (Piferrer, 2001). Porém, o uso de hormônios esteróides ainda causa preocupação quanto sua liberação no ambiente, assim

como a desconfiança dos consumidores em relação aos peixes que são submetidos ao tratamento (Beardmore et al., 2001).

Alguns fatores ambientais influenciam a determinação do sexo de algumas espécies de peixes, sendo a temperatura da água o principal deles (Baroiller e D’Cotta, 2001; Luckenbach et al., 2009; Strüssmann et al., 1996; 1997). A determinação termolábil do sexo (DTS) pode ser explorada de forma vantajosa para a aquicultura pela possibilidade de se produzir lotes monossexo sem a utilização de hormônios.

Entre as espécies reportadas por apresentarem DTS, estão os linguados *Paralichthys lethostigma* e *Paralichthys olivaceus* (Luckenbach et al., 2003; Yamamoto, 1999). Foram verificados que quando esses dois linguados são criados em temperaturas baixas ou elevadas, durante o período crítico de diferenciação sexual, predomina a formação de machos, enquanto que em temperaturas intermediárias, a proporção entre machos e fêmeas fica próxima de 1:1.

No Japão, a criação monossexo de fêmeas do linguado *P. olivaceus* vem sendo realizada para fins comerciais desde 1990, e uma técnica bastante efetiva é o cruzamentos entre machos XX, conhecidos como neomachos (resultado da manipulação da temperatura), e fêmeas normais (XX), que resultam em proles formadas exclusivamente por fêmeas, que apresentam um crescimento mais acelerado que os machos (Yamamoto, 1999). Foi verificado em populações selvagens de *P. orbignyanus* que as fêmeas também crescem mais rápido que os machos (Cazorla, 2005). Portanto, a criação exclusiva de fêmeas dessa espécie pode ser economicamente interessante.

O objetivo desse estudo foi verificar a ocorrência de DTS no linguado *P. orbignyanus*.

2.2. Material e Métodos

Linguados adultos, capturados com rede de arrasto na Praia do Cassino (Rio Grande – RS) durante sua época reprodutiva, foram levados para o Laboratório de Piscicultura Estuarina e Marinha (LAPEM). As fêmeas foram induzidas à desova com uma única injeção intramuscular de extrato de pituitária de carpa (5 mg kg^{-1}) para realização de fertilizações artificiais. A larvicultura foi realizada em um tanque de 1000 L contendo água do mar (30‰) constantemente aerada, mantida a $23,4 \pm 0,3^\circ\text{C}$ e sob um fotoperíodo de 24 h de luz. As larvas foram alimentadas inicialmente com rotíferos *Brachionus plicatilis* e posteriormente com náuplios de *Artemia* sp. (Sampaio et al., 2008).

Após a metamorfose, juvenis de $32,3 \pm 1,6 \text{ mg}$ e $14,8 \pm 0,3 \text{ mm}$ foram distribuídos aleatoriamente em oito tanques pretos de 15 L (30 peixes por tanque) mantidos em banho termostaticado. No momento da transferência todos os tanques continham água a 23°C e 30‰. Posteriormente as temperaturas foram ajustadas (exceto 23°C) a uma taxa de 3°C h^{-1} para 17, 20 e 26°C , todas com duas repetições.

O experimento foi realizado em uma sala climatizada (17°C) para a manutenção da menor temperatura. As demais temperaturas foram mantidas por aquecedores submersíveis de 300 W equipados com termostato. Para evitar que os peixes sofressem choque térmico, no momento da renovação foi utilizada água na mesma temperatura dos tanques.

Os peixes foram alimentados *ad libitum* durante todo o experimento, sendo que até o 23º dia de experimento, a alimentação foi realizada com náuplios de *Artemia* sp. (INVE). A partir deste dia teve início o desmame e os peixes foram co-alimentados com ração comercial (INVE NRD) durante dois dias e posteriormente, apenas com ração. Os

restos de alimento e fezes acumulados no fundo dos tanques foram retirados diariamente com sifão. Cerca de 80% do volume d'água foi renovado uma vez ao dia, durante o período de alimentação com *Artemia* sp. e duas vezes ao dia (08:00 h e 17:00 h) a partir do oferecimento de ração.

Durante o experimento as temperaturas foram mantidas em $17,2 \pm 0,1$; $20,1 \pm 0,0$; $22,8 \pm 0,0$ e $26,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. A concentração de oxigênio dissolvido permaneceu em $6,21 \pm 0,24 \text{ mg L}^{-1}$ e a salinidade permaneceu $31,9 \pm 0,2\text{‰}$ em todos os tratamentos. O fotoperíodo da sala foi mantido em 24 h de luz com intensidade luminosa de $223,6 \pm 5,2$ lux.

Os peixes foram retirados dos tanques ao longo do experimento à medida que atingiam aproximadamente 8,0 cm de comprimento total (CT), comprimento em que o sexo já está definido (Radonic e Macchi, 2009). Devido à diferença de crescimento nas diferentes temperaturas, as coletas foram encerradas nos dias 221 (26°C), 326 (23°C), 368 (20°C) e 457 (17°C) após o início do experimento. Os peixes foram anestesiados com benzocaína (50 ppm) e submetidos à eutanásia. A região abdominal foi separada, fixada em solução de Bouin durante 48 h e preservada em álcool 70%. Os tecidos foram desidratados em álcool, impregnados e incluídos em Paraplast[®]. Foram realizados cortes longitudinais de 4 - 5 μm de espessura e as lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina. As gônadas foram observadas em um microscópio binocular e os estádios celulares foram identificados segundo Radonic e Macchi (2009). Devido a problemas durante os processos histológicos ou ao pequeno tamanho dos peixes, as gônadas foram acessadas em 54, 41, 37 e 36 peixes criados a 17, 20, 23 e 26°C , respectivamente.

A sobrevivência foi analisada por ANOVA (uma via) ao nível de significância de 95%. A proporção entre machos e fêmeas foi calculada em cada temperatura e posteriormente analisada pelo teste qui-quadrado (χ^2) com a frequência esperada entre

machos e fêmeas de 1:1, sem considerar a temperatura da água (Sokal e Rohlf, 1995). Todas as análises foram realizadas com o software Statistica 7.0.

2.3. Resultados

Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre a sobrevivência dos linguados criados nas diferentes temperaturas, sendo de 92% (17°C), 90% (20°C), 82% (23°C) e 93% (26°C).

A proporção de sexo foi similar entre as repetições de cada temperatura. Os linguados criados a 20 e 23°C apresentaram a proporção de sexo próxima da frequência esperada de 1:1 ($P > 0,05$) (Figura 1). Porém, foi observado um baixo percentual de fêmeas nas temperaturas extremas, onde a 17°C ocorreu um percentual de fêmeas abaixo de 25% ($P < 0,01$), enquanto que a 26°C este percentual caiu para 8% ($P < 0,001$).

Alguns peixes apresentaram testículos com presença de espermatogônias, espermatócitos primários e secundários, espermátides e espermatozóides, ou ovários compostos por oócitos primários perinucleares (Figura 2).

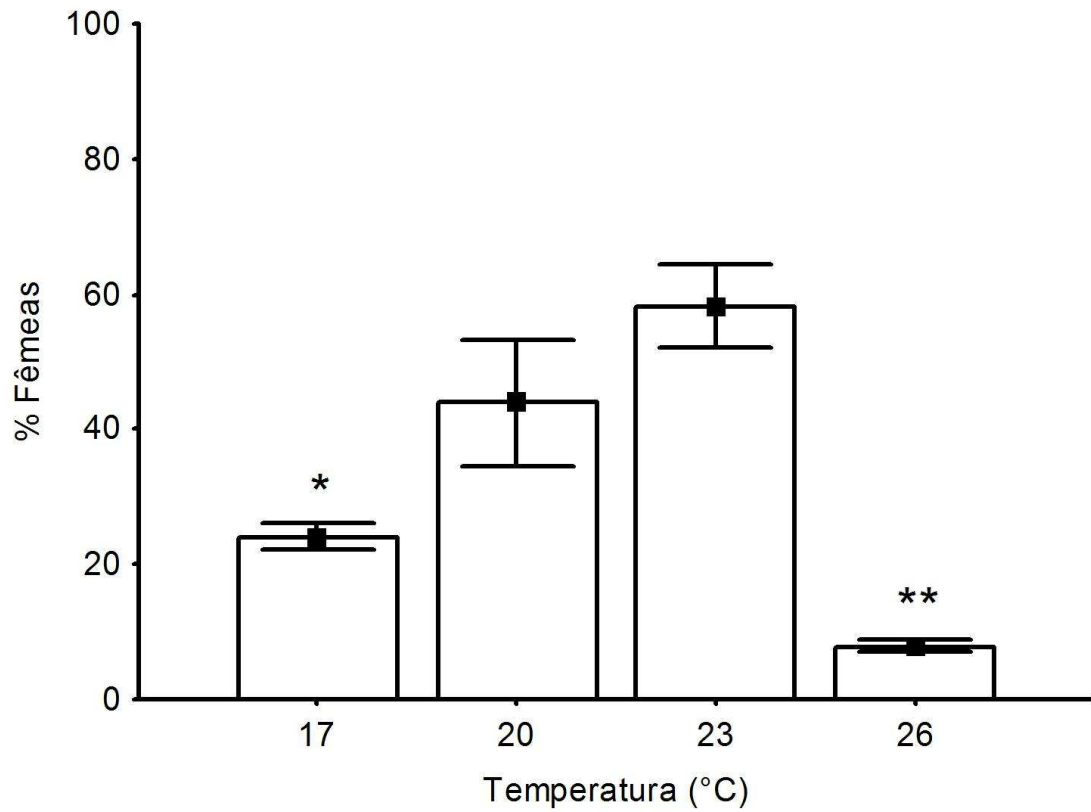


Figura 1. Percentual (média \pm EP) de fêmeas de linguado *Paralichthys orbignyanus* criados a 17, 20, 23 e 26°C (N = 54, 41, 37 e 36, respectivamente; * $P < 0,01$ e ** $P < 0,001$ representam diferença significativa da proporção entre machos e fêmeas de 1:1).

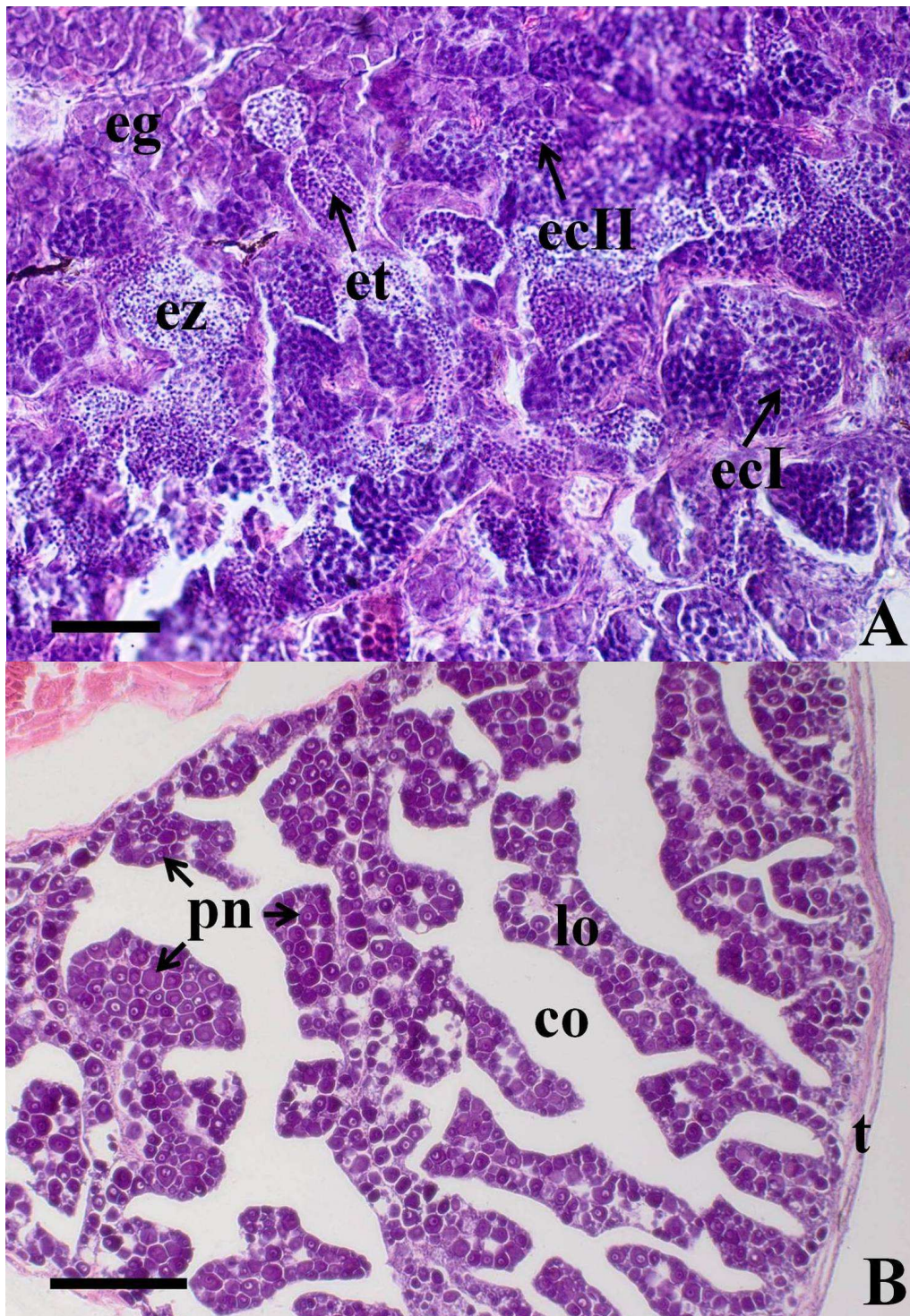


Figura 2. Gônadas de juvenis de *Paralichthys orbignyanus*. (A) Testículo: corte longitudinal de um peixe de 8,5 cm CT (barra = 40 μ m). (B) Ovário: corte longitudinal de um peixe de 8,0 cm CT (barra = 200 μ m). eg, espermatogônias; ecI, espermatócitos primários; ecII, espermatócitos secundários; et, espermátides; ez, espermatozóides; co, cavidade ovariana; pn, oócitos primários perinucleares; lo, lamela ovariana; t, túnica.

2.4. Discussão

Os resultados desse estudo mostram claramente que a temperatura influencia a determinação do sexo do linguado *P. orbignyanus*. Foi observado um padrão de DTS muito semelhante aos apresentados pelos linguados *P. olivaceus* e *P. lethostigma*. Temperatura baixa (15°C) ou alta (25 – 27,5°C) leva a formação de testículos em juvenis de *P. olivaceus* (Yamamoto, 1999). Luckenbach et al. (2003) também verificaram que há um maior percentual de machos quando juvenis de *P. lethostigma* são criados em temperaturas extremas (18 ou 28°C) durante o período de diferenciação sexual. Em ambos os casos, temperaturas intermediárias (20°C para *P. olivaceus* e 23°C para *P. lethostigma*) proporcionam uma relação entre machos e fêmeas próxima a 1:1. O linguado *Verasper moseri* e a solha *Limanda yokohamae* também apresentam DTS. Quando esses peixes são criados entre 14 - 15°C, a proporção entre machos e fêmeas é de aproximadamente 1:1. Porém, o aumento da temperatura para 18°C resulta em 100% de machos de *V. moseri*, enquanto que em 25°C o percentual de machos de *L. yokohamae* sobe para 82% (Goto et al., 1999; 2000).

A enzima citocromo P450 aromatase (P450arom) é responsável pela conversão de andrógenos em estrógenos e desempenha um papel fundamental na diferenciação sexual em peixes (Luckenbach et al., 2009). Estudos sugerem que, em condições normais, níveis elevados dessa enzima, resultam na formação de ovários, enquanto que níveis baixos levam à formação de testículos (Baroiller et al., 1999; Devlin e Nagahama, 2002; Piferrer e Blázquez, 2005).

Devlin e Nagahama (2002) mencionam que a temperatura pode afetar o mecanismo fisiológico da determinação do sexo em algumas espécies de peixes, alterando o sexo fenotípico e a proporção entre machos e fêmeas. Foi verificado que

temperaturas elevadas estão associadas à redução nos níveis de RNAm de P450arom e baixos níveis de estradiol, levando ao processo de masculinização em juvenis de *P. olivaceus* (Kitano et al., 1999). Posteriormente, Yamaguchi et al. (2010) demonstraram que níveis elevados de cortisol suprimem a expressão de RNAm de P450arom e que a mudança do sexo fenotípico no linguado japonês está relacionado ao estresse causado por tais temperaturas.

O conhecimento do período de diferenciação sexual é fundamental quando se trabalha com controle do sexo. Baroiller e D’Cotta (2001) alertam que o tratamento com temperatura deve ser iniciado antes e mantido durante esse período. Juvenis que já se encontram sexualmente diferenciados, dificilmente respondem aos tratamentos, mesmo com a utilização de hormônios esteróides (Piferrer, 2001). Isso foi observado quando dois grupos de juvenis de *L. yokohamae*, um com aproximadamente 25 mm e outro com 35 mm CT, foram transferidos de 15°C para 25°C e a temperatura afetou apenas o sexo dos peixes menores, pois os maiores já estavam com o sexo fenotípico determinado (Goto et al., 2000). O período crítico de diferenciação sexual é espécie-específica, ocorrendo entre a embriogênese e o estágio larval em algumas espécies ou somente durante o estágio juvenil, em outras (Piferrer, 2001). Mesmo em espécies do mesmo gênero a diferenciação sexual pode ocorrer em momentos distintos. Baseados em critérios histológicos, Yamamoto (1999) definiu que o período de diferenciação sexual de *P. olivaceus* ocorre em indivíduos entre 27 – 37 mm CT, enquanto que em *P. lethostigma* a diferenciação sexual ocorre entre 75 – 120 mm CT (Luckenbach et al., 2003) e em *P. orbignyianus* entre 41 – 75 mm CT (Radonic e Macchi, 2009). No início desse experimento os peixes mediam $14,8 \pm 0,3$ mm CT, e pelos resultados de Radonic e Macchi (2009), estavam aptos ao tratamento pela temperatura.

De acordo com os resultados do presente estudo e dos Pleuronectiformes citados, apenas indivíduos geneticamente fêmeas são sensíveis a temperatura, transformando-se em machos fenotípicos (neomachos). Porém, fêmeas de *P. orbignyana* crescem mais rápido que os machos (Cazorla, 2005), e apesar da criação exclusiva de fêmeas ser mais interessante, a feminização direta pela temperatura não é apropriada.

A feminização indireta de *P. olivaceus* é realizada com o cruzamento de neomachos (XX) obtidos pela manipulação da temperatura com fêmeas normais (Yamamoto, 1999). Além disso, para assegurar que os lotes sejam compostos exclusivamente por fêmeas, os juvenis são criados a 20°C, temperatura que não afeta o sexo fenotípico. Porém, é praticamente impossível separar neomachos dos machos normais, pois não há diferenças externas entre os dois (Yamamoto, 1999). Como o linguado japonês não possui cromossomos sexuais heteromórficos (Fujiwara et al., 2007), também não é possível identificar os neomachos por análise do cariótipo. Neomachos podem ser identificados pela análise de suas progênes com fêmeas normais, porém essa técnica é dispendiosa e demorada (Piferrer, 2001). Por isso, a reversão sexual pela temperatura tem sido realizada em proles ginogênicas (herança genética exclusivamente materna) para garantir que todos os peixes submetidos ao tratamento possuam genótipo feminino (Hulata, 2001). Como o linguado *P. orbignyana* também não possui cromossomos sexuais heteromórficos (Azevedo et al., 2007), estudos futuros relacionados à ginogênese são necessários para almejar a produção monossexo de fêmeas dessa espécie.

Das temperaturas testadas, 17 e 26°C alteraram a proporção de 1:1 entre machos e fêmeas de *P. orbignyana*. Porém, a temperatura mais elevada se mostrou mais potente, gerando um percentual de machos superior a 90%. Temperaturas elevadas

também se mostraram mais eficientes para a produção de machos de *P. lethostigma* e *P. olivaceus* (Luckenbach et al., 2003; Yamamoto, 1999). Em criações anteriores realizadas no LAPEM, já se tinha observado um alto percentual de machos em temperaturas próximas de 26°C (dados não publicados) reforçando os resultados desse estudo.

Foi observado nesse estudo que alguns peixes com aproximadamente 8,0 cm CT, apresentaram testículos com presença de espermatogônias, espermatócitos primários e secundários, espermátides e espermatozóides, ou ovários compostos por oócitos primários perinucleares. Esses mesmos estádios de desenvolvimento gonadal só foram observados por Radonic e Macchi (2009) em *P. orbignyanus* a partir de 13,0 cm CT, aproximadamente.

Não se sabe se em ambiente natural ocorre DTS em *P. orbignyanus*, o que abre um campo interessante para novas pesquisas. Por outro lado, está bem estabelecido que em laboratório com temperatura constantemente controlada, o sexo fenotípico do linguado pode ser alterado de fêmea para macho e a produção de neomachos pode ser alcançada com sucesso criando juvenis a 17 e 26°C.

Outro aspecto que deve ser levado em consideração é como a temperatura da água afeta o crescimento dos peixes (Brett, 1979). Foi visto no Capítulo 1 que logo após a metamorfose, juvenis de *P. orbignyanus* apresentaram melhor crescimento e elevado percentual de sobrevivência quando criados a 23 e 26°C. Portanto, devido ao crescimento mais acelerado das fêmeas, sugere-se que após a metamorfose, juvenis sejam criados a 23°C. Por outro lado, se o objetivo for a produção de neomachos, a temperatura utilizada deve ser 26°C.

Referências

- Azevedo, M.F.C., Oliveira, C., Pardo, B.G., Martínez, P., Foresti, F. 2007., Cytogenetic characterization of six species of flatfishes with comments to karyotype differentiation patterns in Pleuronectiformes (Teleostei). *J. Fish Biol.* 70(A): 1-15.
- Baroiller, J.F., D’Cotta, H., 2001. Environment and sex determination in farmed fish. *Comp. Biochem. Physiol. C* 130: 399-409.
- Baroiller, J.F., Guiguen, Y., Fostier, A., 1999. Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. *Cell. Mol. Life Sci.* 55 :910-931.
- Beardmore, J.A., Mair, C.G., Lewis, R.I., 2001. Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: applications, problems and prospects. *Aquaculture* 197: 283-301.
- Bianchini, A., Wasielesky, W., Miranda, K.C., 1996. Toxicity of nitrogenous compounds to juveniles of flatfish *Paralichthys orbignyanus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 56: 453-459.
- Brett, J.R., 1979. Environmental factors and growth, in: Hoar, W.S., Randall, D.J., Brett, J.R. (Eds.), *Fish physiology*, vol. 8. Academic Press, New York, pp. 599-675.
- Cazorla, A.L., 2005. On the age and growth of flounder *Paralichthys orbignyanus* (Jenins, 1842) in Bahía Blanca Estuary, Argentina. *Hidrobiologia* 537: 81-87.
- Devlin, R.H., Nagahama, Y., 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* 208: 191-364.
- Figueiredo, J.L., Menezes, N.A., 2000. *Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil*. Museu de Zoologia / USP, São Paulo.

- Fujiwara, A., Fujiwara, M., Nishida-Umehara, C., Abe, S., Masaoka, T., 2007. Characterization of Japanese flounder karyotype by chromosome bandings and fluorescence in situ hybridization with DNA markers. *Genetica* 131: 267-274.
- Goto, R., Kayaba, T., Adachi, S., Yamauchi, K., 2000. Effects of temperature on sex determination in marbled sole *Limanda yokohamae*. *Fisheries Sci.* 66: 400-402.
- Goto, R., Tatsunari, M., Kawamata, K., Matsubara, T., Mizuno, S., Adachi, S., Yamauchi, K., 1999. Effects of temperature on gonadal sex determination in barfin flounder (*Verasper moseri*). *Fisheries Sci.* 65(6): 884-887.
- Hulata, G., 2001. Genetic manipulations in aquaculture: a review of stock improvement by classical and modern technologies. *Genetica* 111: 155-173.
- Kitano, T., Takamune, K., Kobayashi, T., Nagahama, Y., Abe, S-I., 1999. Suppression of P450 aromatase gene expression in sex-reversed males produced by rearing genetically female larvae at a high water temperature during a period of a sex differentiation in the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *J. Mol. Endocrinol.* 23: 167-176.
- Luckenbach, J.A., Borski, R.J., Daniels, H.V., Godwin, J., 2009. Sex determination in flatfishes: mechanisms and environmental influences. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 20: 256-263.
- Luckenbach, J.A., Godwin, J., Daniels, H.V., Borski, R.J., 2003. Gonadal differentiation and effects of temperature on sex determination in southern flounder (*Paralichthys lethostigma*). *Aquaculture* 216: 315-327.
- Pandian, T.J., Koteeswaran, R., 1998. Ploidy induction and sex control in fish. *Hydrobiologia* 384: 167-243.
- Piferrer, F., 2001. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. *Aquaculture* 197: 229-281.

- Piferrer, F., Blázquez, M., 2005. Aromatase distribution and regulation in fish. *Fish Physiol. Biochem.* 31: 215-226.
- Radonic, M., Macchi, G.J., 2009. Gonadal sex differentiation in cultured juvenile flounder, *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839). *J. World Aquacult. Soc.* 40: 129-133.
- Sampaio, L.A., Bianchini, A., 2002. Salinity effects on osmoregulation and growth of the euryhaline flounder *Paralichthys orbignyanus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 269: 187-196.
- Sampaio, L.A., Freitas, L.S., Okamoto, M.H., Louzada, L.R., Rodrigues, R.V., Robaldo, R.B., 2007. Effects of salinity on Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* from fertilization to juvenile settlement. *Aquaculture* 262: 340-346.
- Sampaio, L.A., Robaldo, R.B., Bianchini, A., 2008. Hormone induced ovulation, natural spawning and larviculture of Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839). *Aquac. Res.* 39: 712-717.
- Sokal, R.R., Rohlf, E.J., 1995. *Biometry*, terceira ed. Freeman and Company, New York.
- Strüssmann, C.A., Calsina Cota, J.C., Phonlor, G., Higuchi, H., Takashima, F., 1996. Temperature effects on sex differentiation of two South American atherinids, *Odontesthes argentinensis* and *Patagonina hatcheri*. *Environ. Biol. Fish.* 47: 143-154.
- Strüssmann, C.A., Saito, T., Usui, M., Yamada, H., Takashima, F., 1997. Thermal thresholds and critical period of thermolabile sex determination in two atherinid fishes, *Odontesthes bonariensis* and *Patagonina hatcheri*. *J. Exp. Zool.* 278: 167-177.

- Wasielesky, W., Bianchini, A., Miranda, K., 1998. Tolerancia a la temperatura de juveniles de lenguado *Paralichthys orbignyanus*. Frente Marítimo 17(A): 43-48.
- Wasielesky, W., Bianchini, A., Santos, M.H.S., Poersch, L.H., 1997. Tolerance of juvenile flatfish *Paralichthys orbignyanus* to acid stress. J. World Aquacult. Soc. 28: 202-204.
- Yamaguchi, T., Yoshinaga, N., Yazawa, T., Gen, K., Kitano, T., 2010. Cortisol is involved in temperature-dependent sex determination in the Japanese flounder. Endocrinology 151(8): 3900-3908.
- Yamamoto, E., 1999. Studies on sex-manipulation and production of cloned populations in hirame, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel). Aquaculture 173: 235-246.

Capítulo 3

Expressão gênica do hormônio do crescimento (GH) e do fator de crescimento tipo insulina I hepático e muscular (IGF-I) em juvenis do linguado *Paralichthys orbignyanus* criados em diferentes temperaturas

Marcelo Hideo Okamoto, Márcio de Azevedo Figueiredo, Cintia Labussière Nakayama,
Luis Fernando Marins, Luís André Sampaio

Resumo

O hormônio do crescimento (GH), considerado o principal fator do crescimento em vertebrados, é produzido pela pituitária e secretado na corrente sanguínea, atuando nos tecidos alvos e mediado pelo fator de crescimento tipo insulina I (IGF-I). O objetivo deste trabalho foi verificar como a temperatura atua sobre o eixo somatotrófico em juvenis de linguado *Paralichthys orbignyanus*. Juvenis ($23,1 \pm 1,6$ mm e $127,6 \pm 31,9$ mg) foram mantidos por 20 dias em tanques de 15 L ($n = 30$) com temperaturas ajustadas para 17, 20, 23 e 26°C, todas com três repetições. Ao final do experimento, todos os peixes foram medidos e pesados. Foram analisadas as expressões gênicas do GH, IGF-I hepático, IGF-I muscular e neuropeptídeo Y (NPY). A taxa de crescimento específico diário e o peso final dos peixes mantidos a 26°C ($4,55 \pm 0,05\%$ dia⁻¹ e $322,0 \pm 12,2$ mg) foram similares aos dos mantidos a 23°C ($4,13 \pm 0,15\%$ dia⁻¹ e $296,7 \pm 11,7$ mg) e maiores que os dos peixes mantidos a 20°C ($3,70 \pm 0,23\%$ dia⁻¹ e $271,3 \pm 13,7$ mg) e 17°C ($1,82 \pm 0,32\%$ dia⁻¹ e $188,8 \pm 9,7$ mg). Não houve diferença na expressão gênica do NPY, indicando que os peixes foram mantidos saciados em todos os tratamentos. As expressões gênicas do GH e do IGF-I hepático mantiveram-se nos mesmos níveis, exceto pela maior expressão do primeiro a 26°C e pela menor expressão do segundo a 23°C. Nos peixes mantidos a 17°C a expressão do gene IGF-I muscular foi inferior em relação aos demais tratamentos, enquanto que os mantidos a 23°C expressaram mais que os mantidos a 20°C e em ambos a expressão foi similar aos mantidos a 26°C. Os resultados sugerem que o IGF-I muscular compensou o baixo nível do IGF-I hepático e promoveu o crescimento dos peixes mantidos a 23 e 26°C.

Palavras-chave: eixo somatotrófico, Pleuronectiformes, piscicultura

Abstract

Growth hormone (GH), considered the primary growth factor in vertebrates, is produced by the anterior pituitary and secreted into the bloodstream, acting on target tissues and mediated by insulin-like growth factor-I (IGF-I). The aim of this study was verify how temperature acts on somatotropic axis of juvenile Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus*. Juveniles (23.1 ± 1.6 mm and 127.6 ± 31.9 mg) were reared for 20 days in 15 L tanks ($n = 30$) with temperatures set to 17, 20, 23 and 26°C, with three replicates. At the end of the experiment, all fish were measured and weighed. There were analyzed the GH, liver IGF-I, muscle IGF-I and neuropeptide Y (NPY) gene expression. The daily specific growth rate and final weight of fish reared at 26°C ($4.55 \pm 0.05\%$ day⁻¹ and 322.0 ± 12.2 mg) were similar to those reared at 23°C ($4.13 \pm 0.15\%$ day⁻¹ and 296.7 ± 11.7 mg) and higher when compared to fish reared at 20°C ($3.70 \pm 0.23\%$ day⁻¹ and 271.3 ± 13.7 mg) and 17°C ($1.82 \pm 0.32\%$ day⁻¹ and 188.8 ± 9.7 mg). There was no difference in NPY gene expression, indicating that the fish were kept satiated in all treatments. The GH and liver IGF-I gene expression remained at the same levels, except for the higher expression of the first at 26°C and the lower expression of the hinder at 23°C. In fish reared at 17°C the muscle IGF-I gene expression of was lower compared to other treatments, while flounder reared at 23°C expressed more than those reared at 20°C and both expressions were similar to those reared at 26°C. The results suggest that muscle IGF-I compensated the low level of liver IGF-I and promoted the growth of the fish reared at 23 and 26°C.

Keywords: fish culture, Pleuronectiformes, somatotropic axis

3.1. Introdução

O linguado *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes 1839) encontra-se distribuído desde o estado do Rio de Janeiro, Brasil até Mar del Plata, Argentina, habitando águas até aproximadamente 20 m de profundidade, sendo comum sua ocorrência em regiões estuarinas (Figueiredo e Menezes, 2000). Seu elevado valor comercial o faz um importante item da pesca na costa sul do Brasil, Uruguai e Argentina (Díaz de Astarloa, 2002). A capacidade de tolerar uma ampla faixa de pH (Wasielesky et al., 1997), temperatura (Wasielesky et al., 1998) e salinidade (Sampaio e Bianchini, 2002), bem como concentrações elevadas de compostos nitrogenados (Bianchini et al., 1996), mostram que o linguado é um peixe rústico, característica interessante para aquicultura.

Assim como em mamíferos, o eixo somatotrófico, composto pelo hormônio do crescimento (GH) e pelo fator de crescimento tipo insulina I (IGF-I), desempenha um papel importante no controle endócrino do crescimento de peixes (Le Bail et al., 1998; Moriyama et al., 2000). O GH é produzido pela adeno-hipófise e secretado na corrente sanguínea até atingir os tecidos alvos, onde se associa com receptores específicos (GHR), dando início às ações relacionadas ao crescimento (Walters et al., 2006). O estímulo do GH provoca a síntese e a secreção do IGF-I, o qual está envolvido na síntese protéica, metabolismo de lipídeos e carboidratos, diferenciação e proliferação das células (Moriyama et al., 2000).

O principal sítio produtor de IGF-I dos vertebrados é o fígado (Reinecke et al., 2005; Wood et al., 2005; Yakar et al., 1999). Porém, outros tecidos como o ósseo e o muscular, também expressam o gene IGF-I, atuando de maneira autócrina e parácrina (Wood et al., 2005), e que também exerce um papel importante no crescimento (Butler e

Le Roith, 2001; Eppler et al., 2007; Yakar et al., 1999). Estudos com alguns peixes demonstram uma correlação positiva entre a expressão do gene IGF-I e sua concentração plasmática com a taxa de crescimento (Kajimura et al., 2001; Luckenbach et al., 2007; Uchida et al., 2003).

É importante lembrar que o estado nutricional interfere no funcionamento do eixo somatotrófico e, conseqüentemente, no crescimento de um organismo (Le Roith et al., 2001; Moriyama et al., 2000). O neuropeptídeo Y (NPY) é considerado o principal estimulador de apetite em vertebrados (Volkoff et al., 2005) e o aumento na expressão do gene NPY no cérebro de alguns peixes mantidos em jejum foram reportados (MacDonald e Volkoff, 2009; Silverstein e Plisetskaya, 2000). De acordo com estas afirmações, foi proposto que o aumento da expressão do gene NPY é considerado um sinal de fome em peixes (Kehoe e Volkoff, 2007). Além disso, o NPY estimula a secreção do GH em peixes (Peng e Peter, 1997), porém é necessária a disponibilidade suficiente de alimento para que ocorra crescimento (Volkoff et al., 2005).

A temperatura da água é um dos fatores ambientais que mais influencia o crescimento de peixes (Brett e Groves, 1979), e esta influência pode ocorrer sobre o eixo somatotrófico (Canosa et al., 2007; Wood et al., 2005). Estudos mostram que em algumas espécies como o salmão do Atlântico *Salmo salar*, o salmão japonês *Oncorhynchus masou ishikawai* e o salmão-real *Oncorhynchus tshawytscha* existe uma relação entre temperaturas sazonais ou de aclimatação com variações na concentração de GH no plasma (Handeland et al., 2000; Moriyama et al. 1997; Pierce et al., 2001) ou na expressão de seu gene, como visto em dourada *Sparus sarba* e em carpa-comum *Cyprinus carpio* (Deane e Woo, 2006; Figueroa et al., 2005). Porém, o mesmo não ocorreu em truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* (Gabillard et al., 2003a). Estudos semelhantes foram realizados com IGF-I, tanto o hepático quanto o muscular, e também

foram encontradas diferenças nos padrões de concentração ou expressão (Gabillard et al., 2003b; Imsland et al., 2007; Luckenbach et al., 2007), sugerindo que a temperatura atue sobre o eixo somatotrófico de forma distinta em diferentes espécies. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento e verificar a influência da temperatura sobre a expressão dos genes GH, IGF-I hepático e IGF-I muscular de juvenis de *P. orbignyana*.

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Peixes

O experimento foi realizado com juvenis de *P. orbignyana* produzidos no Laboratório de Piscicultura Estuarina e Marinha (LAPEM - FURG) a partir de desova induzida com extrato de pituitária de carpa (5 mg kg^{-1}) (Sampaio et al., 2008). Logo após a metamorfose, os juvenis foram aclimatados em um tanque de 1000 L contendo água do mar constantemente aerada, mantida a $23,4 \pm 0,4^\circ\text{C}$, salinidade de 30‰ e fotoperíodo de 24 h de luz. Durante este período a alimentação foi realizada com náuplios de *Artemia* sp.

3.2.2. Exposição às diferentes temperaturas

Juvenis ($23,1 \pm 1,6 \text{ mm}$ e $127,6 \pm 31,9 \text{ mg}$) foram distribuídos aleatoriamente em 12 tanques de 15 L (30 peixes por tanque) mantidos em banho termostatizado. No momento da transferência todos os tanques continham água do mar a 23°C , salinidade de 30‰ e aeração constante. Posteriormente a temperatura de cada tanque foi ajustada a uma taxa de 3°C h^{-1} (exceto 23°C) para 17, 20 e 26°C , todas em três repetições.

O experimento foi realizado em uma sala climatizada com a temperatura ajustada a 17°C para a manutenção da menor temperatura testada. As demais temperaturas foram mantidas com aquecedores submersíveis de 300 W equipados com termostato. Para evitar que os peixes sofressem choque térmico, foi utilizada água na mesma temperatura dos tanques no momento da renovação.

Durante os 20 dias de experimento, os juvenis foram alimentados *ad libitum* com náuplios de *Artemia* sp. (INVE). A mesma quantidade de náuplios foi oferecida em todos os tratamentos. Diariamente, as fezes foram retiradas do fundo dos tanques com a utilização de um sifão e cerca de 80% do volume de água foi renovada, procurando-se retirar a maior quantidade de náuplios possível. O alimento residual foi contado sempre antes e após a troca de água para o cálculo do alimento consumido e reposição dos náuplios. Baseado no peso seco de um náuplio de *Artemia* sp. igual a 2,42 µg (Van Stappen et al., 1996), foi feito o cálculo da conversão alimentar: $CA = AC / GP$, onde AC é o alimento consumido (g) e GP é o ganho de peso (g).

As temperaturas ao longo do experimento foram mantidas em $17,7 \pm 0,9$, $20,0 \pm 0,6$, $22,9 \pm 0,8$ e $25,6 \pm 1,6$ °C. A salinidade foi igual a 29‰ em todos os tratamentos e o fotoperíodo foi mantido em 24 h de luz com intensidade luminosa de 220 ± 5 lux.

No último dia de experimento, todos os peixes foram medidos e pesados para avaliação do crescimento em cada temperatura. Com estes dados foi calculada a taxa de crescimento específico diário: $TCE = [(\ln pf - \ln pi) / t] \times 100$, onde pi é o peso inicial e pf é o peso final (g), e t é o tempo de experimento (dias). Posteriormente, nove peixes de cada tanque foram aleatoriamente amostrados, anestesiados profundamente com benzocaína (50 ppm) e submetidos a eutanásia. Foi feita a separação da cabeça (sem os olhos) para análise da expressão dos genes GH e NPY produzidos pela adeno-hipófise, da região abdominal para análise da expressão do gene IGF-I produzido pelo fígado e da

parte muscular para análise da expressão do gene IGF-I muscular. Dos nove peixes de cada tanque foram feitos três pools de cada tecido, preservados em TRIzol (Invitrogen, Brasil) para posterior extração do RNA total, segundo protocolo sugerido pelo fabricante.

3.2.3. Síntese do DNA complementar (cDNA)

O RNA total foi tratado com o kit RNase free DNase I (Invitrogen, Brasil) e quantificado em fluorímetro (Qubit[®], Invitrogen, Brasil) utilizando o kit Quant iT[®]-RNA Assay (Invitrogen, Brasil). A integridade do RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% e o cDNA foi confeccionado com o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Brasil), de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante.

3.2.4. Expressões gênicas

As expressões gênicas do GH, IGF-I hepático, IGF-I muscular e NPY foram analisadas quantitativamente por PCR em tempo real (qRT-PCR), cada amostra em três repetições. Os primers gene-específicos (Tabela 1) foram desenhados utilizando o programa Primer Express[®] 3.0 (Applied Biosystems, Brasil), com base em sequências disponíveis no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). As PCRs foram realizadas com o equipamento 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Brasil) com o kit Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen, Brasil) seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante. Foram realizadas PCRs com diluições seriadas de todos os primers para testar a eficiência da reação. As condições da reação da PCR foram 50°C por 2 min., 95°C por 2 min., seguido por 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 30 s. A expressão dos genes alvos foi normalizada utilizando o gene β -actina, que

não apresentou diferenças significativas entre os grupos experimentais (dados não mostrados).

Tabela 1. Primers desenhados para a qRT-PCR com base nas sequências disponíveis no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Genes	Forward primers	Reverse primers	GenBank
NPY	5'-cacgtcatttcctcctcat-3'	5'-gcatagcggctcgtagaggta-3'	ACN56580.1
GH	5'-tgtgggcgtgtcctctca-3'	5'-gaccaacaggcatcgagaaca-3'	AAZ16489.1
IGF-I	5'-aacaggttatggcccaatg-3'	5'-agcagcactcgtccacaatg-3'	ACB37316.1
β -actina	5'-ccaagctgtgctgtccctgta-3'	5'-acaccatcaccggagtccat-3'	ACB37317.1

3.2.5. Análises estatísticas

A comparação dos dados de crescimento dos juvenis criados em diferentes temperaturas foi realizada com Análise de Variância (uma via) seguido do Teste de Tukey para identificar as diferenças significativas. As análises foram realizadas com nível de significância de 95% (Sokal e Rohlf, 1995). Para análise das expressões gênicas, foi aplicado o método de quantificação relativa utilizando o software REST[®] (Pfaffl et al., 2002), com comparações pareadas entre os tratamentos 17°C x 20°C, 17°C x 23°C, 17°C x 26°C, 20°C x 23°C, 20°C x 26°C e 23°C x 26°C.

3.3. Resultados

3.3.1. Crescimento

A menor TCE foi registrada para os peixes criados a 17°C ($1,82 \pm 0,08\%$ dia⁻¹) em relação aos mantidos nas demais temperaturas ($P < 0,05$). A TCE dos peixes

mantidos a 26°C ($4,55 \pm 0,05\%$ dia⁻¹) foi significativamente maior ($P < 0,05$) que a dos mantidos a 20°C ($3,70 \pm 0,23\%$ dia⁻¹). Porém, em ambos a TCE foi similar ($P > 0,05$) a dos peixes mantidos a 23°C ($4,13 \pm 0,15\%$ dia⁻¹) (Figura 1A). Os valores de TCE refletiram no peso dos peixes ao final do experimento, com peixes menores a 17°C ($P < 0,05$) e diferença significativa ($P < 0,05$) entre o peso dos peixes mantidos a 20 e 26°C, que não diferiram ($P > 0,05$) do peso dos peixes mantidos a 23°C (Figura 1B).

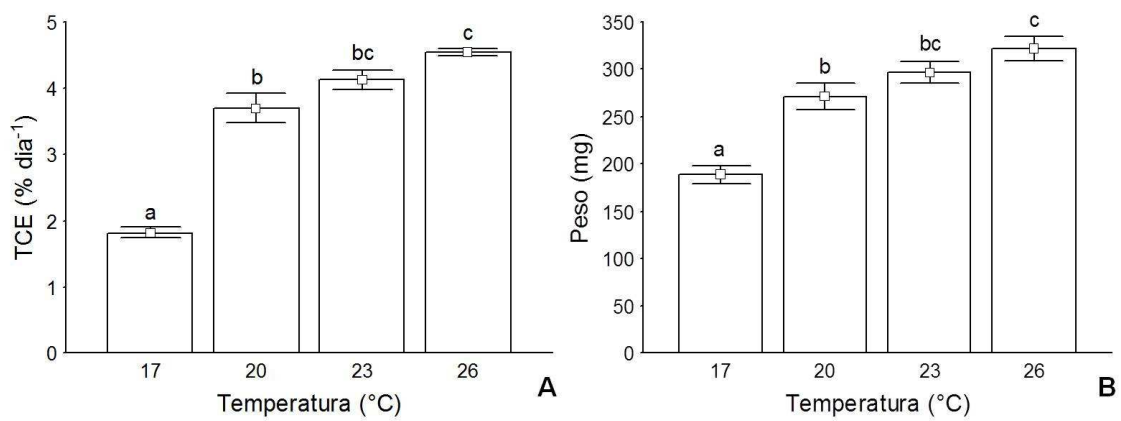


Figura 1. Taxa de crescimento específico diário (A) e peso final (B) (média ± EP) de juvenis de linguado *Paralichthys orbignyanus* criados em diferentes temperaturas. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$).

Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) no consumo de alimento e na conversão alimentar dos peixes criados a 26, 23 e 20°C, porém, os peixes criados a 17°C consumiram menos alimento e apresentaram um consumo alimentar pior que os demais ($P < 0,05$) (Tabela 2). Em todas as temperaturas testadas a sobrevivência foi de 100%.

Tabela 2. Consumo de alimento e conversão alimentar (média \pm EP) de juvenis de linguado *Paralichthys orbignyanus* criados em diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	Consumo de alimento (g)	Conversão alimentar
17	3,74 \pm 0,21 b	2,44 \pm 0,29 b
20	4,28 \pm 0,21 a	1,01 \pm 0,04 a
23	4,88 \pm 0,08 a	0,98 \pm 0,08 a
26	5,01 \pm 0,15 a	0,86 \pm 0,02 a

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($P < 0,05$).

3.3.2. Expressões gênicas

A análise por PCR em tempo real (qRT-PCR) mostrou que não houve diferença significativa ($P > 0,05$) na expressão gênica do NPY, independente da temperatura em que os peixes foram criados (Figura 2A).

Não houve diferença significativa na expressão do gene GH dos peixes criados a 17, 20 e 23°C ($P > 0,05$), porém foi observada uma maior expressão deste gene nos peixes criados a 26°C ($P < 0,05$) (Figura 2B).

A expressão gênica do IGF-I hepático foi similar nos peixes criados a 17, 20 e 26°C ($P > 0,05$). Porém, houve uma menor expressão ($P < 0,05$) desse gene nos peixes criados a 23°C (Figura 2C).

Já a expressão do gene IGF-I muscular foi inferior ($P < 0,05$) nos peixes criados a 17°C em relação aos criados nas demais temperaturas (Figura 2D). Os peixes criados a 23°C expressaram mais que os criados a 20°C ($P < 0,05$), porém a expressão deste gene em ambos foi similar ($P > 0,05$) a dos peixes criados a 26°C.

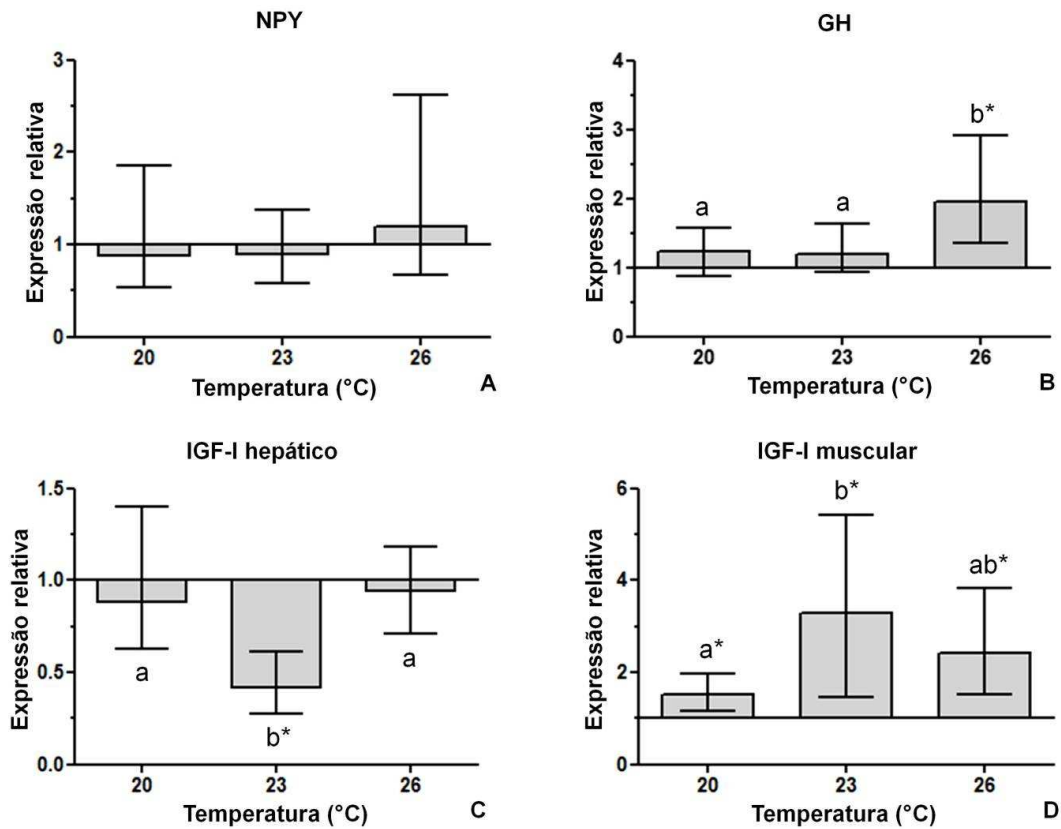


Figura 2. Expressão gênica do neuropeptídeo Y (NPY) (A), do hormônio do crescimento (GH) (B), do fator de crescimento tipo insulina I hepático (IGF-I hepático) (C) e do fator de crescimento tipo insulina I muscular (IGF-I muscular) (D) de juvenis de linguado *Paralichthys orbignyanus* criados em diferentes temperaturas. As expressões gênicas dos peixes criados a 17°C foram utilizadas como referência e estão representadas pelas linhas que cruzam o ponto 1 de cada gráfico. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre as temperaturas 20, 23 e 26°C e os asteriscos indicam diferença significativa ($P < 0,05$) dessas temperaturas com 17°C.

3.4. Discussão

Para organismos ectotérmicos, como os peixes, existem faixas de temperatura em que o crescimento é favorecido. Em temperaturas inferiores a essa faixa ocorre uma queda do metabolismo, prejudicando o crescimento, enquanto que em temperaturas acima dessa faixa também ocorre redução do crescimento devido a um gasto energético excessivo para a manutenção corporal (Brett e Groves, 1979). Ao longo desse experimento, a sobra de alimento foi sempre maior nos tanques mantidos a 17°C, indicando um menor consumo dos peixes criados nessa condição, provavelmente causado pelo metabolismo reduzido, resultando em uma menor TCE e um menor peso dos juvenis ao final do experimento. O oposto ocorreu com os peixes criados a 23 e 26°C, reforçando os resultados obtidos no Capítulo 1.

Temperaturas elevadas podem promover uma taxa de ingestão de alimento muito alta que não é convertida em crescimento, prejudicando a conversão alimentar (Luckenbach et al., 2007; Streit et al., 2010). Os resultados de crescimento desse estudo aliados à melhor conversão alimentar apresentada pelos peixes criados a 26°C sugerem que a maior temperatura testada está dentro da faixa favorável para o crescimento de juvenis de *P. orbignyanus*.

Como mencionado acima, os peixes criados a 17°C consumiram menos alimento. Assim, a similaridade nos níveis de expressão do gene NPY em todos os tratamentos foi considerada como um ponto positivo, pois indica que os peixes foram mantidos saciados ao longo do experimento, já que o NPY é considerado o principal estimulador de apetite em vertebrados (Volkoff et al., 2005). Ou seja, não faltou alimento em nenhum tratamento e as diferenças de crescimento podem ser creditadas ao efeito da temperatura.

Baseado nos resultados de crescimento esperava-se encontrar uma maior expressão do gene GH nos peixes criados a 23 e 26°C, porém a 23°C a expressão foi similar a dos peixes mantidos nas temperaturas mais baixas. Isso indica que outro fator externo estaria inibindo a expressão desse gene. Pelos resultados de expressão do IGF-I hepático, supõe-se que o mesmo teria ocorrido com a secreção do GH nessas temperaturas, uma vez que esse hormônio estimula o fígado a expressar e sintetizar o IGF-I (Moriyama et al., 2000). Em salmonídeos, o nível de GH no plasma aumenta com o prolongamento do fotoperíodo, porém em condição de luz contínua ocorre uma forte inibição da secreção desse hormônio (Björnsson et al., 1995; McCormick et al., 1995; Stefansson et al., 1991). Portanto, o fotoperíodo utilizado no presente estudo (24 h de luz) pode ser inadequado para a criação de juvenis de linguado por inibir a secreção do GH, e estudos futuros abordando esse assunto devem ser realizados.

Por outro lado, houve uma maior expressão do gene GH nos peixes criados a 26°C. Isso poderia ser explicado pelo fato do GH ser utilizado em outras funções fisiológicas além do crescimento, como na regulação do sistema imune de peixes (Yada, 2007). Foi observado no Capítulo 2 que durante a fase de diferenciação das gônadas, a determinação do sexo do linguado é afetada a 17 e 26°C, e que essa interferência pode estar relacionada ao estresse causado por essas temperaturas e consequente aumento nos níveis de cortisol, como ocorre em juvenis de *P. olivaceus* (Yamaguchi et al., 2010). Além disso, Yada et al. (2005) mencionam o cortisol como um potente estimulador da expressão gênica do GH em truta arco-íris.

A determinação do sexo do linguado é afetada de uma forma menos intensa a 17°C, o que explicaria porque a expressão do gene GH também não aumentou a essa temperatura. Gabillard et al. (2003a) também não encontraram uma relação na expressão do gene GH e o crescimento de juvenis de truta arco-íris criadas em

diferentes temperaturas, indicando que a expressão desse gene isoladamente não é um parâmetro ideal para explicar o crescimento de peixes.

Já o IGF-I atua mais diretamente no crescimento dos vertebrados (Moriyama et al., 2000) e a expressão desse gene, tanto o hepático como o muscular, tem sido utilizada para interpretar o crescimento de alguns peixes (Gabillard et al., 2003b; Luckenbach et al., 2007). Como mencionado acima, a similaridade da expressão do gene IGF-I hepático pode estar relacionado à baixa secreção do GH devido à exposição à luz contínua. Porém, a menor expressão obtida a 23°C não está clara, uma vez que todos os tanques foram mantidos a essa mesma condição.

Em relação ao IGF-I muscular, houve uma tendência de aumento na expressão do seu gene em temperaturas elevadas, resultando em uma maior expressão a 23°C quando comparado às temperaturas inferiores. Esses resultados sugerem que o mecanismo de expressão do IGF-I muscular é independente do eixo somatotrófico e sofre influência da temperatura. Juvenis de *P. lethostigma* criados a 23°C apresentaram maior expressão do gene IGF-I muscular e, conseqüentemente maior crescimento, que aqueles criados a 28°C (Luckenbach et al. 2007), indicando que ao contrário do que ocorreu no presente estudo, a temperatura mais alta testada está fora da faixa considerada ótima para a espécie.

As informações obtidas nesse estudo mostram que mesmo com a provável interferência do fotoperíodo sobre o eixo somatotrófico, os peixes criados nas temperaturas mais elevadas apresentaram um crescimento maior. Esse incremento sugere que o IGF-I produzido no tecido muscular compensou o baixo nível do IGF-I hepático nas temperaturas elevadas, mostrando sua importância no crescimento de juvenis de *P. orbignyanus*.

Referências

- Bianchini, A., Wasielesky, W., Miranda, K.C., 1996. Toxicity of nitrogenous compounds to juveniles of flatfish *Paralichthys orbignyanus*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 56: 453-459.
- Björnsson, B.T., Stefansson, S.O., Hansen, T., 1995. Photoperiod regulation of plasma growth hormone levels during parr-smolt transformation of Atlantic salmon: implications for hypoosmoregulatory ability and growth. Gen. Comp. Endocr. 100: 73-82.
- Brett, J.R., Groves, T.D.D., 1979. Physiological energetic, in: Hoar, W.S., Randall, D.J., Brett, J.R. (Eds.). Fish physiology, vol. 8. Academic Press, New York, pp. 280-352.
- Butler, A.A., Le Roith, D., 2001. Control of growth by the somatotropic axis: growth hormone and insulin-like growth factors have related and independent roles. Annu. Rev. Physiol. 63: 141-164.
- Canosa, L.F., Chang, J.P., Peter, R.E., 2007. Neuroendocrine control of growth hormone in fish. Gen. Comp. Endocr. 151: 1-26.
- Deane, E.E., Woo, N.Y.S., 2006. Molecular cloning of growth hormone from silver sea bream: effects of abiotic and biotic stress on transcriptional and translational expression. Biochem. Biophys. Res. Co. 342: 1077-1082.
- Díaz de Astarloa, J.M., 2002. A review of the flatfish fisheries of the South Atlantic Ocean. Rev. Biol. Mar. Oceanog. 37(2): 113-125.
- Eppler, E., Caellers, A., Shved, N., Hwang, G., Rahman, A.M., Maclean, N., Zapf, J., Reinecke, M., 2007. Insulin-like growth factor I (IGF-I) in a growth-enhanced

- transgenic (GH overexpressing) bony fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*): indication for a higher impact of endocrine IGF-I. *Transgenic Res.* 16: 479-489.
- Figueiredo, J.L., Menezes, N.A., 2000. Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. Museu de Zoologia / USP, São Paulo.
- Figueroa, J., San Martin, R., Flores, C., Grothusen, H., Kausel, G., 2005. Seasonal modulation of growth hormone mRNA and protein levels in carp pituitary: evidence for two expressed genes. *J. Comp. Physiol. B* 175: 185-192.
- Gabillard, J-C., Weil, C., Rescan, P-Y., Navarro, I., Gutiérrez, J., Le Bail, P-Y., 2003a. Environmental temperature increases plasma GH levels independently of nutritional status in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen. Comp. Endocr.* 133: 17-26.
- Gabillard, J-C., Weil, C., Rescan, P-Y., Navarro, I., Gutiérrez, J., Le Bail, P-Y., 2003b. Effects of environmental temperature on IGF1, IGF2, and IGF type I receptor expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen. Comp. Endocr.* 133: 233-242.
- Handeland, S.O., Berge, A., Björnsson, B.T., Lie, O., Stefansson, S.O., 2000 Seawater adaptation by out of season Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts at different temperatures. *Aquaculture* 181: 377-396.
- Imslund, A.K., Björnsson, B.T., Gunnarsson, S., Foss, A., Stefansson, S.O., 2007. Temperature and salinity effects on plasma insulin-like growth factor-I concentrations and growth in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture* 271: 546-552.
- Kajimura, S., Uchida, K., Yada, T., Riley, L.G., Byatt, J.C., Collier, R.J., Aida, K., Hirano, T., Grau, E.G., 2001. Stimulation of insulin-like growth factor-I

- production by recombinant bovine growth hormone in Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Fish Physiol. Biochem.* 25: 221-230.
- Kehoe, A.S., Volkoff, H., 2007. Cloning and characterization of neuropeptide Y (NPY) and cocaine and amphetamine regulated transcript (CART) in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comp. Biochem. Physiol. Mol. Integr. Phys. A* 146: 451-461.
- Le Bail, P-Y., Gentil, V., Noel, O., Gomez, J.M., Carre, F., Le Goff, P., Weil, C., 1998. Structure, function, and regulation of insulin-like growth factors in fish. *Ann. NY. Acad. Sci.* 839: 157-161.
- Le Roith, D., Scavo, L., Buttle, A., 2001. What is the role of circulation IGF-I? *Trends Endocrinol. Met.* 12: 48-52.
- Luckenbach, J.A., Murashige, R., Daniels, H.V., Godwin, J., Borski, R.J., 2007. Temperature affects insulin-like growth factor I and growth of juvenile southern flounder, *Paralichthys lethostigma*. *Comp. Biochem. Phys. A* 146: 95-104.
- MacDonald, E., Volkoff, H., 2009. Neuropeptide Y (NPY), cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) and cholecystokinin (CCK) in winter skate (*Raja ocellata*): cDNA cloning, tissue distribution and mRNA expression responses to fasting. *Gen. Comp. Endocr.* 161: 252-261.
- McCormick, S.D., Björnsson, B.T., Sheridan, M., Eilertson, C., Carey, J.B., O'Dea, M., 1995. Increased daylength stimulates plasma growth hormone and gill Na⁺,K⁺-ATPase in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J. Comp. Physiol. B* 165: 245-254.
- Moriyama, S., Ayson, F.G., Kawauchi, H., 2000. Growth regulation by insulin-like growth factor-I in fish. *Biosci. Biotech. Bioch.* 64: 1553-1562.
- Moriyama, S., Shimma, H., Tagawa, M., Kagawa, H., 1997. Changes in plasma insulin-like growth factor-I in the precociously maturing amago salmon *Oncorhynchus masou ishikawai*. *Fish Physiol. Biochem.* 17: 253-259.

- Peng, C., Peter, R.E., 1997. Neuroendocrine regulation of growth hormone secretion and growth in fish. *Zool. Stud.* 36: 79-89.
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., Dempfle, L., 2002. Relative expression software tool (REST[®]) for group-wise comparison and statistical analyses of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 30: e36.
- Pierce, A.L., Shearer, K.D., Baker, D.M., Dickhoff, W.W., 2001. An autumn profile of growth regulatory hormones in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Fish Physiol. Biochem.* 25: 83-88.
- Reinecke, M., Björnsson, B.T., Dickhoff, W.W., McCormick, S.D., Navarro, I., Power, D.M., Gutiérrez, J., 2005. Growth hormone and insulin-like growth factors in fish: where we are and where to go. *Gen. Comp. Endocr.* 42: 20-24.
- Sampaio, L.A., Bianchini, A., 2002. Salinity effects on osmoregulation and growth of the euryhaline flounder *Paralichthys orbignyanus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 269: 187-196.
- Sampaio, L.A., Robaldo, R.B., Bianchini, A., 2008. Hormone induced ovulation, natural spawning and larviculture of Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839). *Aquac. Res.* 39: 712-717.
- Silverstein, J.T., Plisetskaya, E.M., 2000. The effects of NPY and insulin on food intake regulation in fish. *Am. Zool.* 40: 296-308.
- Sokal, R.R., Rohlf, E.J., 1995. *Biometry*, terceira ed. Freeman and Company, New York.
- Stefansson, S.O., Björnsson, B.T., Hansen, T., Haux, C., Taranger, G.L., Saunders, R.L., 1991. Growth, parr-smolt transformation, and changes in growth hormone of Atlantic salmon (*Salmo salar*) reared under different photoperiods. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48: 2100-2108.

- Streit, D.P., Tesser, M.B., Burkert, D., Sanchez, C.C., Sampaio, L.A., 2010. Survival and growth of juvenile marine pejerrey, *Odontesthes argentinensis*, reared at different temperatures. *J. World Aquac. Soc.* 41(6): 931-935.
- Uchida, K., Kajimura, S., Riley, L.G., Hirano, T., Aida, K., Grau, E.G., 2003. Effects of fasting on growth hormone/ insulin-like growth factor I axis in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Comp. Biochem. Phys. A.* 134: 429-433.
- Van Stappen, G., Merchie, G., Dhont, J., Lavens, P., Baert, P., Bosteels, T., Sorgeloos, P., 1996. *Artemia*, in: Lavens, P., Sorgeloos, P. (Eds.), *Manual on the production and use of live food for aquaculture*. FAO, Roma, pp. 79-251.
- Volkoff, H., Canosa, L.F., Unniappan, S., Cerdá-Reverter, J.M., Bernier, N.J., Kelly, S.P., Peter, R.E., 2005. Neuropeptides and the control of food intake in fish. *Gen. Comp. Endocr.* 142: 3-19.
- Walters, M.J., Hoang, H.N., Fairlie, D.P., Pelekanos, R.A., Brown., 2006. New insights into growth hormone action. *J. Mol. Endocrinol.* 36: 1-7.
- Wasielesky, W., Bianchini, A., Miranda, K., 1998. Tolerancia a la temperatura de juveniles de lenguado *Paralichthys orbignyanus*. *Frente Marítimo* 17(A): 43-48.
- Wasielesky, W., Bianchini, A., Santos, M.H.S., Poersch, L.H., 1997. Tolerance of juvenile flatfish *Paralichthys orbignyanus* to acid stress. *J. World Aquacult. Soc.* 28: 202-204.
- Wood, A.W., Duan, C., Bern, H.A., 2005. Insulin-like growth factor signaling in fish. *Int. Rev. Cytol.* 243: 215-285.
- Yada, T., 2007. Growth hormone and fish immune system. *Gen. Comp. Endocr.* 152: 353-358.

- Yada, T., Muto, K., Azuma, T., Hyodo, S., Schreck, C.B., 2005. Cortisol stimulates growth hormone gene expression in rainbow trout leucocytes in vitro. *Gen. Comp. Endocrinol.* 142: 248-255.
- Yakar, S., Liu, J., Stannard, B., Butler, A., Accili, D., Sauer, B., & Le Roith, D., 1999. Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 7324-7329.
- Yamaguchi, T., Yoshinaga, N., Yazawa, T., Gen, K., Kitano, T., 2010. Cortisol is involved in temperature-dependent sex determination in the Japanese flounder. *Endocrinology* 151(8): 3900-3908.

Discussão Geral

Esse estudo nos fornece informações de como a temperatura atua no crescimento e na determinação do sexo de juvenis de *P. orbignyana*. No momento, tais informações nos permitem optar pela produção de lotes compostos por machos e fêmeas ou pela produção de neomachos.

Foi observado que o linguado *P. orbignyana* apresenta um padrão de DTS semelhante aos apresentados pelos linguados *P. lethostigma* e *P. olivaceus* (Luckenbach et al., 2003; Yamamoto, 1999). Durante o período crítico de diferenciação sexual, temperaturas baixas ou altas induzem a formação de machos, enquanto que em temperaturas intermediárias, a proporção entre machos e fêmeas fica próxima de 1:1.

Para essas três espécies de linguados, apenas indivíduos que possuem genótipo feminino são sensíveis a temperatura, transformando-se em neomachos. Foi verificado que temperaturas elevadas estão associadas à redução nos níveis de RNAm de P450arom e baixos níveis de estradiol, levando ao processo de masculinização em juvenis de *P. olivaceus* (Kitano et al., 1999). Posteriormente, Yamaguchi et al. (2010) demonstraram que níveis elevados de cortisol suprimem a expressão de RNAm de P450arom e que a mudança do sexo fenotípico no linguado japonês está relacionado ao estresse causado por tais temperaturas.

Porém, fêmeas de *P. orbignyana* crescem mais rápido que os machos (Cazorla, 2005), e apesar da criação exclusiva de fêmeas ser mais interessante, a feminização direta pela temperatura não é apropriada. No Japão, a feminização indireta de *P. olivaceus* é realizada com o cruzamento de neomachos (XX) obtidos pela manipulação da temperatura com fêmeas normais (Yamamoto, 1999). Além disso, para assegurar que

os lotes sejam compostos exclusivamente por fêmeas, os juvenis são criados em uma temperatura que não afeta o sexo fenotípico.

O conhecimento do período de diferenciação sexual é fundamental quando se trabalha com controle do sexo. Baroiller e D’Cotta (2001) alertam que o tratamento com temperatura deve ser iniciado antes e mantido durante esse período. Juvenis que já se encontram sexualmente diferenciados, dificilmente respondem aos tratamentos, mesmo com a utilização de hormônios esteróides (Piferrer, 2001). Baseados em critérios histológicos, Radonic e Macchi (2009) definiram que a diferenciação das gônadas de *P. orbignyanus* ocorre em indivíduos entre 41 – 75 mm CT.

Das temperaturas testadas, 17 e 26°C alteraram a proporção de 1:1 entre machos e fêmeas de *P. orbignyanus*. Porém, a temperatura mais elevada se mostrou mais potente, gerando um percentual de machos superior a 90%. Temperaturas elevadas também se mostraram mais eficientes para a produção de machos de *P. lethostigma* e *P. olivaceus* (Luckenbach et al., 2003; Yamamoto, 1999).

Wasielesky et al. (1998) verificaram que juvenis de aproximadamente 110 g sobrevivem normalmente entre 10 e 27°C. Os resultados de sobrevivência obtidos nesse estudo mostram que, logo após a metamorfose, juvenis de linguado já são tolerantes a uma ampla faixa de temperatura. Essa característica é interessante para a criação em áreas como o Estuário da Lagoa dos Patos e região costeira adjacente, onde podem ocorrer variações sazonais de temperatura entre 9 e 28°C (Baumgarten e Niencheski, 1990).

Para organismos ectotérmicos, como os peixes, existem faixas de temperatura em que o crescimento é favorecido. Em temperaturas inferiores a essa faixa ocorre uma queda do metabolismo, prejudicando o crescimento (Brett e Groves, 1979). Entre as temperaturas testadas, 17°C proporcionou o pior crescimento, havendo uma maior sobra

de alimento nos tanques, indicando um menor consumo de alimento nessa condição, provavelmente causado pelo metabolismo reduzido.

Temperaturas elevadas podem promover uma taxa de ingestão de alimento muito alta que não é convertida em crescimento, prejudicando a conversão alimentar (Luckenbach et al., 2007; Streit et al., 2010). Os resultados de crescimento aliados à melhor conversão alimentar apresentada pelos peixes criados a 26°C sugerem que a maior temperatura testada está dentro da faixa favorável para o crescimento de juvenis de *P. orbignyanus*.

De maneira geral, as expressões gênicas do GH e do IGF-I hepático nos peixes criados a 17°C mantiveram-se nos mesmos níveis dos peixes criados nas demais temperaturas. Essa similaridade das expressões pode ter sido causada pelo fotoperíodo empregado (24 h de luz). Em salmonídeos, a secreção de GH no plasma é inibida em condição de luz contínua (Björnsson et al., 1995; McCormick et al., 1995; Stefansson et al., 1991).

A maior expressão do gene GH nos peixes criados a 26°C poderia ser explicado pelo fato do GH ser utilizado para outras funções fisiológicas além do crescimento, como na regulação do sistema imune de peixes (Yada, 2007). Então, a maior expressão gênica do GH nos juvenis criados a 26°C pode estar relacionada com o estresse causado por essa temperatura e consequente aumento do cortisol durante o período de diferenciação das gônadas, como visto em juvenis de *P. olivaceus* (Yamaguchi et al., 2010).

A expressão do gene IGF-I muscular foi maior nas temperaturas mais elevadas, sugerindo que o mecanismo de expressão do IGF-I muscular é independente do eixo somatotrófico e sofre influência da temperatura. Esse aumento da expressão sugere que o IGF-I produzido no tecido muscular compensou o baixo nível do IGF-I hepático nas

temperaturas elevadas, mostrando sua importância no crescimento de juvenis de *P. orbignyana*. O IGF-I muscular também se mostrou importante no crescimento de juvenis do linguado *P. lethostigma* (Luckenbach et al. 2007).

Pelos resultados alcançados, deve ser levado em consideração que a temperatura afeta o crescimento e a determinação do sexo de juvenis de *P. orbignyana*. Logo após a metamorfose, o crescimento é otimizado a 23 e 26°C. Dessa maneira, devido ao crescimento mais acelerado das fêmeas, sugere-se que os juvenis sejam criados a 23°C. Por outro lado, se o objetivo for a produção de neomachos, a temperatura utilizada deve ser 26°C.

Referências

- Baroiller, J.F., D’Cotta, H., 2001. Environment and sex determination in farmed fish. *Comp. Biochem. Physiol. C* 130: 399-409.
- Baumgarten, M.G.Z., Niencheski, L.F., 1990. Estuário da Laguna dos Patos: variações de alguns parâmetros físico-químicos da água e metais associados ao material em suspensão. *Cienc. Cult.*, 42(5/6): 390-396.
- Björnsson, B.T., Stefansson, S.O., Hansen, T., 1995. Photoperiod regulation of plasma growth hormone levels during parr-smolt transformation of Atlantic salmon: implications for hypoosmoregulatory ability and growth. *Gen. Comp. Endocr.* 100: 73-82.
- Brett, J.R., Groves, T.D.D., 1979. Physiological energetic, in: Hoar, W.S., Randall, D.J., Brett, J.R. (Eds.). *Fish physiology*, vol. 8. Academic Press, New York, pp. 280-352.

- Cazorla, A.L., 2005. On the age and growth of flounder *Paralichthys orbignyanus* (Jenins, 1842) in Bahía Blanca Estuary, Argentina. *Hidrobiologia* 537: 81-87.
- Kitano, T., Takamune, K., Kobayashi, T., Nagahama, Y., Abe, S-I., 1999. Suppression of P450 aromatase gene expression in sex-reversed males produced by rearing genetically female larvae at a high water temperature during a period of a sex differentiation in the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *J. Mol. Endocrinol.* 23: 167-176.
- Luckenbach, J.A., Godwin, J., Daniels, H.V., Borski, R.J., 2003. Gonadal differentiation and effects of temperature on sex determination in southern flounder (*Paralichthys lethostigma*). *Aquaculture* 216: 315-327.
- Luckenbach, J.A., Murashige, R., Daniels, H.V., Godwin, J., Borski, R.J., 2007. Temperature affects insulin-like growth factor I and growth of juvenile southern flounder, *Paralichthys lethostigma*. *Comp. Biochem. Phys. A* 146: 95-104.
- McCormick, S.D., Björnsson, B.T., Sheridan, M., Eilertson, C., Carey, J.B., O’Dea, M., 1995. Increased daylength stimulates plasma growth hormone and gill Na⁺,K⁺-ATPase in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J. Comp. Physiol. B* 165: 245-254.
- Piferrer, F., 2001. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. *Aquaculture* 197: 229-281.
- Radonic, M., Macchi, G.J., 2009. Gonadal sex differentiation in cultured juvenile flounder, *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839). *J. World Aquacult. Soc.* 40: 129-133.
- Stefansson, S.O., Björnsson, B.T., Hansen, T., Haux, C., Taranger, G.L., Saunders, R.L., 1991. Growth, parr-smolt transformation, and changes in growth hormone of Atlantic salmon (*Salmo salar*) reared under different photoperiods. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48: 2100-2108.

- Streit, D.P., Tesser, M.B., Burkert, D., Sanchez, C.C., Sampaio, L.A., 2010. Survival and growth of juvenile marine pejerrey, *Odontesthes argentinensis*, reared at different temperatures. *J. World Aquac. Soc.* 41(6): 931-935.
- Wasielesky, W., Bianchini, A., Miranda, K., 1998. Tolerancia a la temperatura de juveniles de lenguado *Paralichthys orbignyanus*. *Frente Marítimo* 17(A): 43-48.
- Yada, T., 2007. Growth hormone and fish immune system. *Gen. Comp. Endocr.* 152: 353-358.
- Yamaguchi, T., Yoshinaga, N., Yazawa, T., Gen, K., Kitano, T., 2010. Cortisol is involved in temperature-dependent sex determination in the Japanese flounder. *Endocrinology* 151(8): 3900-3908.
- Yamamoto, E., 1999. Studies on sex-manipulation and production of cloned populations in hirame, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel). *Aquaculture* 173: 235-246.