

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Escola de Veterinária**  
**Pós-graduação em Zootecnia**

Williane Ferreira Menezes

**TRIPLOIDA EM TILÁPIA DO NILO: STATUS HEMATOLÓGICO, DESEMPENHO  
ZOOTÉCNICO E INSTABILIDADE GENÔMICA**

Belo Horizonte

2023

Williane Ferreira Menezes

**Triploida em tilápia do Nilo: status hematológico, desempenho zootécnico e instabilidade genômica**

**Versão Final**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Zootecnia.

Orientador: Eduardo Maldonado Turra

Coorientador: Érika Ramos de Alvarenga

Belo Horizonte

2023

M543t Menezes, Williane Ferreira, 1991 -  
Triploida em tilápia do Nilo: status hematológico, desempenho zootécnico e instabilidade genômica / Williane Ferreira Menezes. – 2023.  
66 f. il

Orientador: Eduardo Maldonado Turra  
Tese (Doutorado) apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção do título de Doutora.  
Bibliografias: f. 57 a 65.

1. Tilápia – Peixe – Criação - Teses - 2. Aquicultura - Teses - I. Turra, Eduardo Maldonado – II. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária - III. Título.

**CDD – 639**

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569  
Biblioteca da Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.



Escola de Veterinária  
UFMG

ESCOLA DE VETERINÁRIA DA UFMG  
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA  
Av. Antônio Carlos 6627 - CP 567 - CEP 30123-970 - Belo Horizonte- MG  
TELEFONE (31)-3409-2173

[www.vet.ufmg.br/academicos/pos-graduacao](http://www.vet.ufmg.br/academicos/pos-graduacao)  
E-mail [cpzootec@vet.ufmg.br](mailto:cpzootec@vet.ufmg.br)

### ATA DE DEFESA DE TESE DA ALUNA WILLIANE FERREIRA MENEZES

Às 13:00 horas do dia 16 de fevereiro de 2023, reuniu-se, presencialmente e remotamente, a Comissão Examinadora de Tese, aprovada por ad referendum no dia 17/01/2023, para julgar, em exame final, a defesa da tese intitulada: "Triploidia em tilápia do Nilo: status hematológico, desempenho zootécnico e instabilidade genômica", como requisito final para a obtenção do Grau de **Doutor em Zootecnia, área de concentração Produção Animal**

Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. **Eduardo Maldonado Turra**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares da Defesa de Tese, passou a palavra ao (a) candidato (a), para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato (a). Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento da tese, tendo sido atribuídas as seguintes indicações:

	Aprovada	Reprovada
Prof.(a)/Dr.(a) Eduardo Maldonado Turra	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Prof.(a)/Dr.(a) Gabriel Francisco de Oliveira Alves	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Prof.(a)/Dr.(a) Alexandre Benvindo de Sousa	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Prof.(a)/Dr.(a) Fábio Luiz Buranelo Toral	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Prof.(a)/Dr.(a) Ariane Flávia do Nascimento	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>


Pelas indicações, o (a) candidato (a) foi considerado (a):  Aprovado (a)  
 Reprovado (a)

Para concluir o Doutorado, o(a) candidato(a) deverá entregar 03 volumes encadernados da versão final da tese acatando, se houver, as modificações sugeridas pela banca, e a comprovação de submissão de pelo menos um artigo científico em periódico recomendado pelo Colegiado dos Cursos. Para tanto terá o prazo máximo de 60 dias a contar da data defesa.

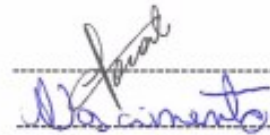
O resultado final, foi comunicado publicamente ao (a) candidato (a) pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora e encaminhada juntamente com um exemplar da tese apresentada para defesa.

Belo Horizonte, 16 de fevereiro de 2023.

Assinatura dos membros da banca:

  
-----

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** GABRIEL FRANCISCO DE OLIVEIRA ALVES  
Data: 16/02/2023 16:43:48-0300  
Verifique em <https://verificador.ig.br>

  
-----

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** ALEXANDRE BENVINDO DE SOUSA  
Data: 16/02/2023 16:49:27-0300  
Verifique em <https://verificador.ig.br>

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, William e Claudia, pelo amor incondicional, e pela liberdade que sempre me deram apoiando minhas escolhas. Este momento é fascinante e só existe porque vocês se doaram em silêncio e aceitaram viver comigo o meu sonho. Com o apoio de vocês sempre me senti forte para seguir em frente, vocês são o meu exemplo!

Ao meu irmão, Leonardo, por ser minha metade, pelo carinho e cumplicidade, por me fazer sentir que a família é nosso maior apoio. Ao Roger, por sempre que preciso ceder um olhar de apoio, uma palavra de incentivo, um gesto de compreensão e uma atitude de amor. À Brisa, por ser tão fofa e carinhosa, por aquecer meus pés nas inúmeras horas de escrita ao longo desses quatro anos.

A Universidade Federal de Minas Gerais que proporcionou condições para o desenvolvimento deste trabalho. Ao Departamento de Zootecnia e aos professores meu agradecimento eterno pelas experiências compartilhadas, que tanto me serviram de aprendizado. Ao Prof. Dr. Eduardo Maldonado Turra, pela orientação, pelos seus ensinamentos e conselhos, e acima de tudo pela confiança depositada em mim neste processo. À Dra. Érika Ramos de Alvarenga, pela coorientação, pela parceria e tantos ensinamentos. Ao professor Dr. Luiz Renato França pela parceria neste projeto. Ao professor Dr. Rafael Henrique Nóbrega pela contribuição com parte do material essencial a este trabalho. À técnica Mara Livia do ICB-UFMG pela ajuda dedicada na elaboração de parte do material pesquisado. À técnica Dra. Larissa Ragozo C. de Oliveira do Setor Microbiologia e Imunologia- UNESP pela ajuda no uso do citômetro de fluxo. Aos colegas do Laboratório de Aquicultura e à equipe do NGTAqua, agradeço de coração todo apoio durante esse período de trabalho e no desenvolvimento desta pesquisa.

À Dra. Ariane Flávia do Nascimento, Dr. Gabriel Francisco de Oliveira Alves, Dr. Alexandre Benvindo de Sousa, Dr. Fabio Luiz Buranelo Toral e Dr. Marcelo Rezende Luz por aceitarem compor a banca de examinação.

À Cordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) pela bolsa de estudos concedida.

À FAPEMIG e ao CNPq pelo financiamento da pesquisa.

O meu muito obrigado!

## Resumo

A triploidia é uma manipulação cromossômica utilizada com o objetivo de esterilizar indivíduos e controlar a maturidade sexual precoce e a reprodução indesejada em um sistema de produção de algumas espécies aquícolas. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a condição ploidia de tilápias do Nilo triploides ao longo do tempo e melhor caracterizá-los quanto à histologia do fígado, variáveis sanguíneas e indicadores de crescimento. O experimento foi conduzido no Laboratório de Aquicultura da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil, com aprovação da comissão de ética no uso de animais sob protocolo CEUA: 215/2021 (CEUA-UFMG). Os ovos de fêmeas de tilápia foram fertilizados, metade da desova foi submetida a um choque de quatro minutos em água a 41°C aos quatro minutos pós-fertilização. Ovos tratados e controle foram incubados e cultivados para crescimento. A determinação da ploidia foi realizada por citometria de fluxo em dois momentos. Inicialmente para separar os grupos controle, tratado (mas não triploide) e triploide. E mais tarde, nos mesmos animais adultos. Os animais foram pesados periodicamente para controle de crescimento, e ao fim do experimento foram feitas coletas de sangue para análises hematológicas e, em seguida, os animais foram eutanasiados, para coleta do fígado para análises morfológicas. Com os resultados da primeira citometria, observou-se 14 animais triploides, já na análise de ploidia dos animais adultos, apenas 12,5% dos indivíduos triploides vivos permaneceram triploides e os demais perderam conjuntos de cromossomos. O desempenho de crescimento da tilápia triploide foi superior ao da tilápia diploide durante a fase juvenil, mas semelhante em adultos. Dentre os parâmetros hematológicos, o destaque maior é que a triploidia levou a um aumento do tamanho dos eritrócitos, como esperado, devido à presença de um conjunto de cromossomos a mais. A análise histológica do fígado indicou que as tilápias que perderam um conjunto de cromossomos não apresentaram alterações histopatológicas significativas. É importante reavaliar a viabilidade do uso de triploides como opção para a produção de tilápia do Nilo ou mesmo como modelo de pesquisa. Nossos resultados sugerem que devido a instabilidades cromossômicas causadas pela poliploidização, a geração de um estoque de tilápias triploide pode ter baixa eficiência.

**Palavras-chave:** Choque térmico; manipulação cromossômica; *Oreochromis niloticus*; triploides

## Abstract

Triploidy is a chromosomal manipulation used with the aim of sterilizing individuals and controlling precocious sexual maturity and unwanted reproduction in a production system of some aquaculture species. Thus, the objective of this work was to evaluate the ploidy condition of triploid Nile tilapia over time and better characterize them in terms of liver histology and blood and growth variables. The experiment was conducted at the Aquaculture Laboratory of the Veterinary School of the Federal University of Minas Gerais, Brazil, with approval from the ethics committee on the use of animals under protocol CEUA: 215/2021 (CEUA-UFMG). Eggs from female tilapia were fertilized, half of the spawning was subjected to a four-minute shock in water at 41°C at four minutes post-fertilization. Treated and control eggs were incubated and cultured for growth. Ploidy determination was performed by flow cytometry at two times. Initially to separate the control, treated (but not triploid) and triploid groups. And later, in the same adult animals. The animals were periodically weighed for growth control, and at the end of the experiment, blood samples were collected for hematological analysis and then, the animals were euthanized, to collect the liver for morphological analysis. With the results of the first cytometry, 14 triploid animals were observed, while the ploidy analysis of the adult animals indicated that only 12.5% of the live triploid individuals remained triploid and the others lost sets of chromosomes. The growth performance of triploid tilapia was superior to that of diploid tilapia during the juvenile stage, but similar in adults. Among the hematological parameters, the highlight is that triploidy led to an increase in the size of erythrocytes as expected due to the presence of an extra set of chromosomes. Liver histology was analyzed and indicated that tilapia that have lost a set of chromosomes did not show significant histopathological changes. It is important to reassess the feasibility of using triploids as an option for Nile tilapia production or even as a research model. Our results suggest that due to chromosomal instabilities caused by polyploidization, the generation of a triploid tilapia stock may have low efficiency.

**Keywords:** Chromosomal manipulation; *Oreochromis niloticus*; thermal shock; triploids

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figure 1- Experimental procedures schematic summary. After spawning induction and fertilization, 1,476 eggs were obtained and split equally among treatments (control and heat shock groups). Following yolk sac absorption, we counted the number of resultant larvae and equalized the stocking density of control group with the stocking density of the heat shock group (160 larvae per group, using the number of surviving larvae from heat shock group as reference). On the 74th day post yolk sac absorption, the early juveniles were recounted (68 and 73 juveniles from control and heat shock groups, respectively) and on the 85th day post yolk sac absorption, blood samples were collected for the first time to determine the ploidy by flow cytometry. Analysis of the DNA content histograms of the animals' blood cells indicated 14 triploids in the heat shock (treated) group. On 227th day post yolk sac absorption, a new stocking density adjustment was made according to the living triploids number (10 individuals). Therefore, 10 juveniles from the control group and others 10 juveniles from treated group (animals submitted to heat shock, but non-triploid) were randomly selected. At the end of the experiment, there were 8 animals from triploid group, 9 fish from control group and 9 tilapias from treated group. Blood samples were collected from all remain animals to evaluate the ploidy by flow cytometry in adult animals. In this second analysis, only one animal from triploid group was confirmed triploid. ....36

Figure 2- Representative histograms of DNA content of the animal's blood cells from flow cytometry analysis. All cells with equal amounts of DNA content form a peak, one peak representing G1 and the other (twice the channel value) representing the G2/M phase of the cell cycle. The position of the G1 peak established the ploidy level of this material (Ochatt, 2006). With a known diploid animal, the position where the peak was determined and estimated the position of a triploid animal. In the first column we observed the results of the cytometry performed in juveniles and in the second column the analysis of the same tilapia in the adult phase. (A) Tilapia hatched from eggs not subjected to heat shock (control group). (B) Tilapia hatched from eggs subjected to heat shock, observed a shift of the peak to the right, demonstrating that the shock was efficient in inducing triploidy. However, in adult fish, the peak is wider, indicating greater chromosomal variability, probably due to aneuploidies. (C) Tilapia hatched from heat-shocked eggs, whose DNA content histograms indicated triploid status in the juvenile stage, but as adults it lost irregularly shaped sets of chromosomes, becoming mosaic. (D) Tilapia hatched from eggs subjected to heat shock, whose DNA content



histograms indicated triploid status in the juvenile stage, but when adult it lost a set of chromosomes, becoming diploid.....	37
Figure 3- Photomicrograph of male and female Nile tilapia gonads. Observe an atretic follicle (A; arrow) of a triploid female and a vitellogenic follicle (B; arrow) of a control female. Spermatozoa founded in the lumen of seminiferous tubule (star) in the testis of a male that lost triploid status (C), and in diploid male (D). .....	38
Figura 4 – Eritrócitos de tilápias do Nilo submetidas ou não a choque térmico para indução de triploidia. (A) indivíduos triploides, (B) indivíduos controle, (C) indivíduos que perderam o status triploide e (D) indivíduos submetidos ao choque não triploide. ....	52
Figura 5– Hepatócitos de tilápias do Nilo submetidas ou não a choque térmico para indução de triploidia. (A) indivíduos triploides, (B) indivíduos controle, (C) indivíduos que perderam o status triploide e (D) indivíduos submetidos ao choque não triploide. ....	53
Figura 6 – Fotomicrografia do fígado de tilápia do Nilo caracterizando as principais lesões hepáticas encontradas neste estudo. (A) Capilares sinusóides, (B) Inclusões amarelo-amarronzadas, (C) Infiltrado leucocitário e agregado melanomacrofágico, (D) Agregado melanomacrofágico, (E) vacuolização hepatocelular do tipo lipídico (claro, esférico) e (F) vacuolização hepatocelular do tipo glicogênio. ....	54

## LISTA DE TABELAS

Table 1- Water quality parameters (means $\pm$ standard deviation) from the tanks in which tilapias hatched from eggs subjected or not to heat shock were cultivated. ....	34
Table 2 - Body weight (median) and survival rate (median) of Nile tilapias from 26 <sup>th</sup> to 126 <sup>th</sup> day post yolk sac absorption, hatched from eggs subjected or not to heat shock for triploidy induction. ....	34
Table 3- Body weight mean, coefficient of variation (CV) and survival rate (median) of Nile tilapias from 126 <sup>th</sup> to 378 <sup>th</sup> day of age post yolk sac absorption, hatched from eggs subjected or not to heat shock for triploidy induction. ....	35
Table 4 - Relative frequency (%) and number (in parentheses) of males and females of Nile tilapia classified according to ploidy after heat shock for triploidy induction. ....	35
Table 5- Relative frequency (%) and number (in parenthesis) of the predominance of vitellogenic or atretic follicles in females and presence/absence of spermatozoa in males of Nile tilapia, hatched from eggs subjected or not to heat shock for triploidy induction. ....	35
Tabela 6 – Índices hematimétricos (média e coeficiente de variação (CV)) de tilápias do Nilo submetidas ou não a choque térmico para indução de triploidia	50
Tabela 7– Morfometria eritrocitária de tilápias do Nilo submetidas ou não a choque térmico para indução de triploidia. ....	50
Tabela 8 - Valores médios da contagem total de leucócitos (ou glóbulos brancos), trombócitos e contagem diferencial de leucócitos em tilápias do Nilo submetidas ou não a choque térmico para indução de triploidia. ....	50
Tabela 9 –Relação área e volume nuclear dos hepatócitos de tilápias do Nilo submetidas ou não a choque térmico para indução de triploidia. ....	51
Tabela 10 –Quantificação em scores (0 - sem acometimento, 1 – pouco acometido, 2 – acometido, 3 – muito acometido) de lesões hepáticas em tilápias do Nilo submetidas ou não a choque térmico para indução de triploidia. ....	51

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	14
<b>3. REVISÃO DE BIBLIOGRÁFICA</b> .....	14
3.1. Indução de triploidia.....	14
3.2. Esterilidade em triploides.....	16
3.3. Desempenho zootécnico.....	17
3.4. Características morfofisiológicas.....	18
3.5. Instabilidade cromossômica em poliploides.....	20
<b>4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	22
<b>5. ARTIGO 1 - Growth performance, reproductive status, and chromosomal instability in triploid Nile tilapias</b> .....	27
5.1. Introduction .....	28
5.2. Material and methods.....	30
5.3. Results.....	33
5.4. Discussion.....	33
References.....	37
Anexo I – Tables.....	46
Anexo II – Figures.....	48
<b>6. ARTIGO 2 - Alterações hepáticas, hematológicas e tamanho das células em tilápias do Nilo triploides</b> .....	51
6.1. Introdução.....	52
6.2. Material e métodos.....	53
6.3. Resultados.....	57
6.4. Discussão.....	58
Anexo III – Tabelas.....	63
Anexo IV – Figuras.....	65

Referências .....	68
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>75</b>
<b>ANEXO V .....</b>	<b>77</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O controle reprodutivo é um dos maiores desafios na tilapicultura e muitas pesquisas vêm sendo realizadas para desenvolver algumas técnicas de prevenção de desovas de tilápias (Mtaki et al., 2022). Diferentemente de outras técnicas de esterilização, grande parte dos estudos de manipulação cromossômica em tilápia tem se concentrado na produção de prole triploide estéril, com o objetivo de combater o problema da maturidade sexual precoce e da reprodução indesejada no cultivo (Abucay e Mair, 1997). A primeira tentativa de manipulação de conjuntos de cromossomos foi conduzida utilizando-se tilápia azul (*Oreochromis aureus*) por Valenti (1975), que utilizou choques de temperatura e foi importante para subsidiar as futuras investigações sobre poliploidia em tilápia.

O uso de triploides estéreis reduz as preocupações ambientais com espécies exóticas, já que a fuga de peixes cultivados férteis representa uma ameaça de desequilíbrio e contaminação genética de populações selvagens (Wong e Zohar, 2015; do Nascimento et al, 2021). As opções genéticas usadas no controle de peixes invasores foram sintetizadas em um simpósio internacional em 2010, realizado em Minneapolis, EUA e uma opção atualmente disponível para algumas espécies é a triploidia, que pode ser usada para produzir animais estéreis (Thresher et al., 2014).

A perda de cromossomos em indivíduos poliploides é um evento frequente, diferentemente dos diploides (Comai, 2005). Alvarenga et al. (2020) sugeriram que tetraploides em tilápia não são viáveis devido à instabilidade cromossômica que possivelmente reverte animais tetraploides em aneuploides, mosaicos e triploides. Dados da literatura mostram que a instabilidade cromossômica em tetraploides é consideravelmente maior do que em triploides (Mayer e Aguilera, 1990), mas, ainda assim, a instabilidade cromossômica de triploides foi 30 vezes maior do que em diploides em *Saccharomyces cerevisiae*. Ainda não foi relatado perda de cromossomos em peixes triploides dentro da mesma geração, porém, deve ser levado em consideração que na maioria dos ensaios com triploides o número de cromossomos das células é quantificado nas fases iniciais da vida dos animais e não há o acompanhamento do status de triploidia ao longo das fases de desenvolvimento.

Há uma escassez de informações sobre o uso da técnica de triploidização e quais consequências tal processo pode causar aos animais. Em peixes triploides foram observadas alterações nos índices de eritrócitos, hemoglobina, glóbulos vermelhos e glóbulos brancos (Benfey 1999; Wang et al. 2010; Wlasow e Fopp-Bayat, 2011; Fraser et al., 2012). As análises hematológicas permitem monitorar o estado fisiológico do corpo, resposta ao estresse e o

impacto do ambiente ou nutrição (Akrami et al. 2013). A morfometria dos eritrócitos triploides é alterada para acomodar um conjunto a mais de cromossomos, o que leva a um aumento do tamanho celular com diminuição do número de células (Levy-Pereira et al., 2021). Em triploides o volume celular aumenta aproximadamente 1,4 vezes o que é observado nos diploides da mesma espécie (Benfey, 1999). Esse aumento pode alterar processos fisiológicos e de desempenho, no entanto, muitos peixes, são capazes de acomodar e compensar essas mudanças nos processos fisiológicos associados a níveis crescentes de ploidia (Mable, 2004). Por isso, é necessário conhecer até que ponto a presença de um conjunto extra de cromossomos pode resultar em efeitos deletérios à saúde. Além das análises sanguíneas, a avaliação de parâmetros hepáticos pode contribuir para a compreensão da saúde dos animais, devido às características deste órgão no metabolismo do animal (Santos et al., 2018).

A tilápia é um dos peixes mais cultivados no mundo, perdendo apenas para as carpas em termos de produção total (Menaga e Fitzsimmons, 2017). Constituem atualmente um excelente peixe para modelos experimentais devido ao crescimento rápido e boa adaptabilidade a diferentes condições de cultivo (Lacerda et al., 2008).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1.Gerais**

O objetivo deste trabalho foi avaliar e comparar a instabilidade cromossômica de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) triploides e diploides que sofreram e não sofreram choque térmico. Além de melhor caracterizar indivíduos triploides quanto à histologia das gônadas e do fígado, variáveis sanguíneas e parâmetros de crescimento.

### **2.2.Específicos**

Avaliar e comparar a instabilidade cromossômica de tilápias triploides.

Monitorar o crescimento e estado gonadal de tilápias diploides que sofreram e não sofreram choque térmico.

Acompanhar o desempenho zootécnico de tilápias triploides em relação aos indivíduos diploides em três fases de desenvolvimento – larva, juvenil e adulto.

Classificar o estágio de desenvolvimento das gônadas dos indivíduos triploides em relação aos indivíduos diploides quando atingirem peso e idade de maturidade sexual.

Aferir se os indivíduos triploides produzem gametas e quais as características desses em relação aos dos indivíduos diploides.

Avaliar se há diferença entre os indivíduos triploides e diploides nos parâmetros hematológicos.

Monitorar se há diferenças entre os indivíduos triploides e diploides devido a alterações do tecido hepático.

## **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **3.1.Indução de triploidia**

A triploidia pode contribuir para a produção de espécimes estéreis como forma de contornar os problemas já relatados relacionados à maturação sexual e, além disso, em algumas espécies de peixes pode proporcionar uma taxa de crescimento mais alta quando comparado aos animais diploides (Molina-Luzón et al., 2015).

Como no caso de outros Teleósteos, triploides (3N) de tilápia do Nilo são produzidos por meio de choque de temperatura quente e frio, pressão hidrostática e até produtos químicos, como a citocalasina B, a 6-dimetilaminopurina (6-DMAP) e a cafeína, que interferem com os microtúbulos durante a divisão celular (Piferrer et al., 2009), com o objetivo de reter o segundo corpúsculo polar, durante a meiose II, normalmente expulso após a fertilização.

Quando o ovário da fêmea libera os ovócitos, eles se encontram no estágio da metáfase da meiose II. Até essa fase, os cromossomos homólogos foram replicados e ainda não ocorreu o segundo processo de divisão cromossômica para levar o gameta ao estado haploide. No momento da fertilização, o ovócito ainda contém dois pares (2N) de cromossomos maternos homólogos. A meiose permanece parada até o ovócito ser fertilizado por um espermatozoide (Colas e Dubé, 1998). Após a hidratação do ovócito há um aumento de volume, culminando com o rompimento do folículo, devido ao aumento da pressão intrafolicular (Yueh e Chang, 2000). Quando fertilizado o ovócito continua a segunda divisão. Neste momento o ovócito empacota o segundo conjunto de cromossomos maternos em uma vesícula chamada corpúsculo polar, que é responsável em expulsar o conjunto adicional de cromossomos para fora do embrião (Budd et al., 2015).

Desta forma, por alguns minutos o zigoto fertilizado contém três conjuntos de cromossomos (3N), um paterno e dois maternos. Choques físicos externos (temperatura ou pressão, por exemplo) quando aplicados após a fertilização e antes da retomada da meiose II podem atrapalhar esse processo de extrusão do corpúsculo polar, resultando na retenção do segundo conjunto de cromossomos maternos. O momento e a duração do choque para se obter 100% de indivíduos triploides dependem da espécie de interesse. Para tilápias alguns autores sugerem um choque térmico com temperatura de 41 °C por um período de 4,5 min e 4 min após a fertilização. Na literatura, as eficiências de geração de triploides obtidas foram 100% (Hussain et al., 1991, 1995; Byamungu et al., 2001) e 90% (Pradeep et al., 2011), sendo em todos os estudos o material para determinação da ploidia colhido nos animais jovens. A partir deste instante, o embrião se desenvolve normalmente com todas as suas células contendo três conjuntos de cromossomos (3n) (Budd et al., 2015). Molina-Luzón et al. (2015) observaram que 100% dos indivíduos triploides produzidos por eles mostraram os dois alelos femininos e um dos alelos masculinos.

Uma estratégia alternativa para produzir indivíduos 3N é combinar um progenitor tetraploide (4N) a um progenitor diploide (2N), a progênie 3N resultante é chamada de triploides interploides (3NC). Ainda que a produção de triploides interploides seja considerada uma prática simples baseada em procedimento padrão de acasalamento e desova, Alvarenga et al. (2020) provaram ser difícil produzir indivíduos adultos tetraploides de tilápia do Nilo. Isso pode ser atribuído a alguns fatores, como a baixa sobrevivência das larvas e a instabilidade cromossômica presente em indivíduos poliploides, uma vez que os autores identificaram tilápias triploides, mosaicos (mistura de níveis de ploidia entre diferentes células) e aneuploides



(números anormais de cromossomos) nos indivíduos submetidos ao tratamento e nenhum juvenil 100% tetraploide. Acredita-se que o promovedor da baixa sobrevivência tenha sido a homozigose de 100% decorrente da diploidização mitótica.

### 3.2. Esterilidade em triploides

As fêmeas triploides são estéreis porque a triploidia interfere no pareamento normal de cromossomos homólogos durante a fase inicial da meiose, inibindo o desenvolvimento de gametas devido à falta de produção hormonal nas camadas teca e granulosa do folículo. Além disso, observou-se que nos ovários triploides as fêmeas triploides falharam em produzir ovócitos vitelogênicos tanto na fase de pré-desova quanto na fase de desova, resultando no aparecimento de muitos folículos atrésicos (nos quais o córion do ovo se desintegrou parcialmente e o conteúdo celular encolheu para uma massa irregular) (Lincoln, 1981; Benfey et al., 1989; Tiwary, Kirubagaran e Ray, 2000).

Diferentemente das fêmeas que possuem produção de gametas desde o início da vida, nos machos a maturidade sexual é tardia onde os gametas são produzidos após a puberdade. Desta forma, mesmo em machos triploides o desenvolvimento gonadal é completo devido à produção de células esteroideogênicas funcionais, permitindo até mesmo a produção de gametas (Benfey et al., 1989; Krisfalusi e Cloud, 1999). No entanto, a progênie dos machos triploides produzidos é aneuploide, com um número mais frequente de cromossomos intermediários entre haploide e diploide e não sobrevive além dos estágios embrionários ou larvais (Perruzi et al., 2009; Feindel et al., 2010). Os machos triploides de bacalhau do Atlântico produziram um número reduzido de espermatozoides com grandes variações no conteúdo de DNA, maior diâmetro da cabeça e formas anormais comparadas com as produzidas pelos diploides (Perruzi et al., 2009). Estes mesmos autores observaram que nenhuma das larvas de bacalhau do Atlântico, resultante de cruzamentos triploides machos  $\times$  fêmeas diploides, sobreviveu à primeira alimentação, corroborando os resultados obtidos nos ensaios de inseminação artificial. Portanto, embora os machos triploides possam participar de eventos de desova, com diploides, é improvável que ocorra introgressão genética em populações selvagens (Feindel et al., 2010).

Li et al. (2015) em um experimento com Dojô, *Misgurnus anguillicaudatus*, observaram dois cromossomos homólogos pareados com um bivalente e um cromossomo adicional se tornou univalente nos espermátócitos triploides. No entanto, os cromossomos homólogos nem sempre foram unidos por sinapse no curso da meiose e cada um dos três cromossomos homólogos se comportou como univalente. Esses resultados sugerem que o erro de pareamento

pode ocorrer entre cromossomos homólogos em células meióticas triploides, o que resulta na formação de gametas incomuns pelo envolvimento de muitos univalentes em divisões meióticas.

### **3.3. Desempenho zootécnico**

O desempenho zootécnico de tilápias triploides foram relatados em alguns estudos quando comparados aos seus correspondentes diploides e os resultados têm sido inconsistentes, com taxas de crescimento melhores, iguais e piores (Piferrer et al., 2009). Para comparar o desempenho de crescimento de indivíduos diploide e triploide, é necessário considerar duas fases diferentes de crescimento: antes e após a maturidade sexual (Fraser et al., 2012). Isso porque até a maturação sexual os triploides têm um gasto em energia metabolizável para crescimento somático semelhante aos diploides, e após a maturação os indivíduos com a alteração na ploidia não terão gastos para produção de gametas e processos reprodutivos podendo utilizar nutrientes para o crescimento corporal (Maxime, 2008).

Em resultados mais recentes, lambaris triploides apresentaram melhores taxas de crescimento, rendimento de carcaça e qualidade da carne (do Nascimento et al., 2017 a, 2017 b). Pechsiri e Yakupitiyage (2005) observaram que não houve diferenças significativas no peso final, taxa de crescimento específico, taxa de sobrevivência, taxa de conversão alimentar e taxa de eficiência proteica entre as tilápias diploides e triploides, num período de quatro meses. Pradeep et al. (2012) observaram que na tilápia vermelha, ao 120º dia de vida, o ganho total de peso entre os sexos não foi diferente entre os machos pertencentes a vários protocolos de indução de triploidia, enquanto nas fêmeas, o grupo com choque térmico apresentou um aumento significativo em relação ao das fêmeas diploides. Esses autores sugerem que o aumento do crescimento em tilápias triploides pode ter sido devido ao efeito da esterilidade, uma condição que pode desviar a maior parte da energia e nutrientes para o crescimento somático e não para o desenvolvimento gonadal e atividade sexual.

Weber et al. (2014) obteve resultados de similaridade do peso corporal de truta arco-íris 3N e 2N até a maturação sexual. A partir daí, a taxa de crescimento dos indivíduos 2N foi menor em relação aos animais 3N. No entanto, a taxa de crescimento específico de 3Ns e 2Ns foi muitas vezes diferente mesmo antes da maturação, sugerindo diferentes padrões de desenvolvimento ou respostas a mudanças ambientais ou sociais ao longo do curso do estudo.

Lefevre et al. (2015) estudando trutas arco-íris relataram que peixes triploides apresentaram filés crus e cozidos mais macios, de acordo com a avaliação instrumental, mas

essa diferença não foi percebida pelo painel sensorial, tais avaliações revelaram menor intensidade global de odor, maior exsudação e maior teor de umidade nos filés dos peixes triploides. Os efeitos significativos da triploidia foram demonstrados na composição e estrutura do músculo e devem ser levados em consideração para fins de controle da qualidade do pescado.

Fraser et al. (2012), em uma revisão de literatura, sugerem que a sobrevivência de indivíduos triploides é comparável à sobrevivência de diploides dos estágios pós-larvais em diante. Byamungu et al. (2001) relataram uma taxa de sobrevivência de 65,3% e 60,7% para diploides e triploides de tilápia azul, respectivamente. Berrill et al. (2012), em uma análise de dados coletados em fazendas de trutas arco-íris no Reino Unido, descobriram que a taxa de mortalidade em trutas arco-íris triploides é menor do que em diploides. Com isso, essa prática foi apontada como uma intervenção para reduzir a mortalidade na indústria de criação de trutas do Reino Unido, e considerada um modelo bioeconômico mais lucrativo dependendo da espécie.

### **3.4. Características morfofisiológicas**

Pouco se discute se a técnica de triploidização pode gerar consequências morfofisiológicas aos animais, além das reprodutivas. Alterações nos parâmetros hematológicos são indicadores de bem-estar dos peixes e é necessário conhecimento se o processo de triploidia os altere. Capacidade de transporte de oxigênio, pH e níveis de trifosfato de nucleotídeo (NTP) no sangue de salmão do Atlântico triploide não foram diferentes dos diploides (Graham et al., 1985). Sob condições experimentais, Peruzzi et al. (2005) observaram que robalos diploides e triploides produzidos por tratamentos sub-ótimos não diferiram na maioria dos parâmetros hematológicos (hematócrito, glicose, proteína plasmática e lactato). Diferenças significativas foram encontradas em tamanhos e contagens de glóbulos vermelhos, onde animais triploides possuíam glóbulos vermelhos maiores e em menor número. O teor de hemoglobina, níveis de cortisol plasmático e concentrações de alguns íons foi menor nos animais triploides.

O volume do núcleo dos indivíduos triploides é maior que em diploides, isso para que seja possível acomodar o conjunto adicional de cromossomos (Flajšhans et al., 2011), mas em menor quantidade, em uma variedade de tecidos. Os núcleos das células triploides contêm 50% mais DNA do que os núcleos de células diploides. Pradeep et al. (2011) observaram que a área de superfície celular dos eritrócitos e o volume celular dos triploides foram superiores em 42% e 59%, respectivamente, aos diploides.

A morfometria dos eritrócitos triploides leva a um aumento do tamanho celular com diminuição do número de células (Levy-Pereira et al., 2021). Nos peixes triploides o volume celular aumenta aproximadamente 1,4 vezes o observado em peixes diploides da mesma espécie (Benfey, 1999). Relata-se que este aumento nas células pode alterar processos fisiológicos e de desempenho, no entanto, muitos peixes, são capazes de acomodar e compensar essas mudanças nos processos fisiológicos associados a níveis crescentes de ploidia (Mable, 2004).

Em salmonídeos, ao serem examinadas possíveis diferenças na resposta ao estresse entre peixes diploides e triploides, foi observado que não há diferença nos perfis de cortisol plasmático após estresse agudo (Sadler et al., 2000). A concentração de hemoglobina está associada a quantidade de eritrócitos e é crucial para a distribuição de oxigênio necessário para processos metabólicos. Benfey (1999) relatou que não há diferença da concentração de hemoglobina no sangue de diploides e triploides. Essa ausência de diferença deve-se ao fato que o núcleo de eritrócitos triploides ocupa uma porcentagem maior do volume celular do que faz em eritrócitos diploides, compensando a diminuição no número de eritrócitos.

Levy-Pereira et al. (2021) mostraram que a triploidia afetou significativamente os perfis leucocitários de *A. altiparanae*. A contagem total e diferencial de leucócitos e trombócitos são índices importantes para determinar a defesa inespecífica (os primeiros sistemas de defesa utilizados diante de uma invasão), pois são essenciais nas reações inflamatórias (Fukushima et al. 2012). Gao et al. (2007) observaram maior número de trombócitos e monócitos, bem como diminuição do número de linfócitos, em organismos triploides de *Misgurnus anguillicaudatus*, também observaram menor contagem de neutrófilos quando comparados aos diploides. Esses mesmos autores sugerem que o nível de ploidia mais alto pode ter vantagem em relação à capacidade de transporte de oxigênio no sangue e a presença de mais trombócitos induzindo uma melhor capacidade de coagulação do sangue.

Fukushima et al. (2012) observaram que os linfócitos foram as células mais predominantes na contagem diferencial de peixes diploides (62,5%), enquanto os monócitos foram predominantes em peixes triploides (49,6%), o que provavelmente manterá o sistema de defesa dos triploides mais preparado para condições adversas de criação. Tal célula cumpre um papel importante no sistema imunológico dos peixes contra os patógenos (Vale et al., 2002).

A triploidia pode afetar processos fisiológicos e comportamentais, podendo também afetar as características de crescimento sob certas condições de cultivo. Verhille et al. (2013) demonstraram que a truta arco-íris 3N desenvolveu uma arritmia cardíaca sob cultivo a 22°C, diferentemente dos animais diploides. Taylor et al. (2013) observaram que os triploides de

salmão apresentaram deformidades significativamente aumentadas em água do mar, sendo mais evidentes as malformações da mandíbula e vértebras. Fraser et al. (2013) obtiveram resultados de radiografias que demonstraram que os triploides do salmão do Atlântico tinham uma ou mais vértebras deformadas em relação aos diploides. Porém, não se sabe até que ponto esses atributos negativos associados à triploidia derivam do estado triploide por si só, ou o trauma associado ao processo de indução.

### **3.5. Instabilidade cromossômica em poliploides**

Existem algumas desvantagens da poliploidia, como os efeitos do aumento nuclear e celular, a propensão da mitose e da meiose para produzir células aneuploides e a instabilidade epigenética. A perda de cromossomos em poliploides é frequente e ocorre em uma extensão muito maior do que em diploides (Comai, 2005). Alvarenga et al. (2020) observaram uma possível perda de um conjunto completo de cromossomos nos indivíduos em uma tentativa de indução de tetraploidia resultando em indivíduos triploides.

Evidências de estudos de tetraploides induzidos artificialmente sugerem que auto e alotetraploides naturais podem passar por um período inicial de instabilidade genômica, mas posteriormente são capazes de competir com seus parentes diploides (Comai, 2005). Zhang et al. (2010, 2014) observaram que ostras com mais aglomerados cromossômicos em suas células tendiam a ter porcentagens mais altas de aneuploidia (números anormais de cromossomos) concluindo que a condição geral de poliploidia fornece o substrato para a perda subsequente de cromossomos.

Para as ostras, a perda cromossômica não se limita apenas à aneuploidia, mas inclui a perda de conjuntos inteiros de cromossomos para se tornarem mosaicos através de um processo chamado de reversão (Zhang et al., 2010). As células que sofrem reversão eliminam continuamente cromossomos até que um estado euploide (geneticamente saudável) estável seja estabelecido (Zhang et al., 2014). A produção de gametas é um processo meiótico, enquanto a perda de cromossomos produzindo reversão (mosaicos) parece ser mitótico (De Sousa, 2016).

A reversão representa um problema para o controle biológico e, dependendo de sua extensão, possivelmente para a aquicultura comercial. A eliminação de um conjunto de cromossomos durante a somatogênese em triploides pode ter um significado evolutivo de restaurar o equilíbrio do genoma para um estado mais normal. Essa perda pode resultar em células germinativas diploides, o que posteriormente pode levar à formação de gametas

haploides férteis e recuperar a capacidade reprodutiva dos animais originalmente considerados estéreis (Zhang et al., 2010).

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abucay, J. S.; Mair, G. C. (1997). Hormonal sex reversal of tilapias: implications of hormone treatment application in closed water systems. *Aquaculture Research*, 28(11), 841-845.
- Alvarenga, É. R.; Fernandes, A. F. A.; Lopes, L. R.; Soares, T. E.; de Oliveira Alves, G. F.; da Costa, F. F. B.; Sales, S. C. M., Lima, G. K.; Turra, E. M. (2020). Attempt to produce a Nile tilapia tetraploid line by heat shock induction. *Aquaculture*, 529, 735647. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735647>
- Akrami, R.; Gharaei, A.; Karami, R. (2013). Variação específica de sexo e idade nos parâmetros bioquímicos hematológicos e séricos de Beluga (*Huso huso* Linnaeus, 1758). *Jornal Internacional de Biologia Aquática*, 1 (3), 132-137.
- Benfey, T. J. (1999). The physiology and behavior of triploid fishes. *Reviews in fisheries science*, 7(1), 39-67.
- Benfey, T. J.; Dye, H. M.; Solar, I. I.; Donaldson, E. M. (1989). The growth and reproductive endocrinology of adult triploid Pacific salmonids. *Fish physiology and biochemistry*, 6(2), 113-120.
- Berrill, I. K.; MacIntyre, C. M.; Noble, C.; Kankainen, M.; Turnbull, J. F. (2012). Bio-economic costs and benefits of using triploid rainbow trout in aquaculture: Reduced mortality. *Aquaculture economics & management*, 16(4), 365-383.
- Budd, A. M.; Banh, Q. Q.; Domingos, J. A.; Jerry, D. R. (2015). Sex control in fish: approaches, challenges and opportunities for aquaculture. *Journal of Marine Science and Engineering*, 3(2), 329-355.
- Byamungu, N.; Darras, V. M.; Kühn, E. R. (2001). Growth of heat-shock induced triploids of blue tilapia, *Oreochromis aureus*, reared in tanks and in ponds in Eastern Congo: feeding regimes and compensatory growth response of triploid females. *Aquaculture*, 198(1-2), 109-122.
- Colas, P.; Dubé, F. (1998, October). Meiotic maturation in mollusc oocytes. In *Seminars in Cell & Developmental Biology* (Vol. 9, No. 5, pp. 539-548). Academic Press.
- Comai, L. (2005). The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nature reviews genetics*, 6(11), 836-846.
- De Sousa, J. T.; Allen Jr, S. K.; Baker, H.; Matt, J. L. (2016). Aneuploid progeny of the American oyster, *Crassostrea virginica*, produced by tetraploid× diploid crosses: another example of chromosome instability in polyploid oysters. *Genome*, 59(5), 327-338. <https://doi.org/10.1139/gen-2015-0222>
- Do Nascimento, N. F.; de Siqueira-Silva, D. H.; Pereira-Santos, M.; Fujimoto, T.; Senhorini, J. A.; Nakaghi, L. S. O.; Yasui, G. S. (2017). Stereological analysis of gonads from diploid and triploid fish yellowtail tetra *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski) in laboratory conditions. *Zygote*, 25(4), 537-544.

- Do Nascimento, N. F.; Pereira-Santos, M.; Piva, L. H.; Manzini, B.; Fujimoto, T.; Senhorini, J. A.; Nakaghi, L. S. O. (2017a). Growth, fatty acid composition, and reproductive parameters of diploid and triploid yellowtail tetra *Astyanax altiparanae*. *Aquaculture*, 471, 163-171.
- Do Nascimento, N. F.; Bertolini, R. M.; Lopez, L. S.; Nakaghi, L. S. O.; Monzani, P. S.; Senhorini, J. A.; Yasui, G. S. (2021b). Heat-induced triploids in *Brycon amazonicus*: a strategic fish species for aquaculture and conservation. *Zygote*, 1-5.
- Feindel, N. J.; Benfey, T. J.; Trippel, E. A. (2010). Competitive spawning success and fertility of triploid male Atlantic cod *Gadus morhua*. *Aquaculture Environment Interactions*, 1(1), 47-55.
- Flajšhans, M.; Pšenička, M.; Rodina, M.; Těšitel, J. (2011). Image cytometric measurements of diploid, triploid and tetraploid fish erythrocytes in blood smears reflect the true dimensions of live cells. *Cell biology international*, 35(1), 67-71.
- Fraser, T. W.; Fjellidal, P. G.; Hansen, T.; Mayer, I. (2012). Welfare considerations of triploid fish. *Reviews in Fisheries Science*, 20(4), 192-211.
- Fraser, T. W.; Hansen, T.; Skjæraasen, J. E.; Mayer, I.; Sambraus, F.; Fjellidal, P. G. (2013). The effect of triploidy on the culture performance, deformity prevalence, and heart morphology in Atlantic salmon. *Aquaculture*, 416, 255-264.
- Fukushima, H; Bailone, RL; Weiss, LA; Martins, ML; Zaniboni-Filho, E (2012). Triploidy in the hematology of jundia juveniles (*Siluriformes: Heptapteridae*). *Brazilian Journal of Biology*, 72(1), 147–151. doi:10.1590/s1519-69842012000100017
- Gao, Z.; Wang, W.; Abbas, K.; Zhou, X.; Yang, YI.; Diana, JS.; Wang, H.; Li, Y.; Sun, Y. (2007). Haematological characterization of loach *Misgurnus anguillicaudatus*: Comparison among diploid, triploid and tetraploid specimens. *Comparative Biochemistry and Physiology*, vol. 147, no. 4, p. 1001-1008. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.03.006>
- Graham, M. S.; Fletcher, G. L.; Benfey, T. J. (1985). Effect of triploidy on blood oxygen content of Atlantic salmon. *Aquaculture*, 50(1-2), 133-139.
- Hussain, M. G.; Chatterji, A.; McAndrew, B. J.; Johnstone, R. (1991). Triploidy induction in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. using pressure, heat and cold shocks. *Theoretical and Applied Genetics*, 81(1), 6-12.
- Hussain, M. G.; Rao, G. P. S.; Humayun, N. M.; Randall, C. F.; Penman, D. J.; Kime, D.; McAndrew, B. J. (1995). Comparative performance of growth, biochemical composition and endocrine profiles in diploid and triploid tilapia *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture*, 138(1-4), 87-97.
- Krisfalusi, M.; Cloud, J. G. (1999). Gonadal sex reversal in triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Experimental Zoology*, 284(4), 466-472.



Lacerda, S. M. S. N.; Batlouni, S. R.; Assis, L. H.; Resende, F. M.; Campos-Silva, S. M.; Campos-Silva, R.; Franca, L. R. (2008). Germ cell transplantation in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Cybium*, 32(2), 115-118.

Lefevre, F.; Cardinal, M.; Bugeon, J.; Labbe, L.; Medale, F.; Quillet, E. (2015). Selection for muscle fat content and triploidy affect flesh quality in pan-size rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 448, 569-577.

Levy-Pereira, N.; Carriero, M. M.; Yasui, G. S.; Meira, C. M.; de Sousa, R. L. M.; Maia, A. A. M.; Pilarski, F. (2021). Effects of triploid induction on innate immunity and hematology in *Astyanax altiparanae*. *Fish & Shellfish Immunology*, 116, 12-18.

Li, Y. J.; Gao, Y. C.; Zhou, H.; Ma, H. Y.; Li, J. Q.; Arai, K. (2015). Meiotic chromosome configurations in triploid progeny from reciprocal crosses between wild-type diploid and natural tetraploid loach *Misgurnus anguillicaudatus* in China. *Genetica*, 143(5), 555–562. doi:10.1007/s10709-015-9853-2

Lincoln, R. F. (1981). Sexual maturation in female triploid plaice, *Pleuronectes platessa*, and plaice× flounder, *Platichthys flesus*, hybrids. *Journal of Fish Biology*, 19(5), 499-508.

Mable, B. K. (2004). ‘Why polyploidy is rarer in animals than in plants’: myths and mechanisms. *Biological Journal of the Linnean Society*, 82(4), 453-466.

Maxime, V. (2008). The physiology of triploid fish: current knowledge and comparisons with diploid fish. *Fish and Fisheries*, 9(1), 67-78.

Mayer, V. W.; Aguilera, A. (1990). High levels of chromosome instability in polyploids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 231(2), 177-186.

Menaga, M.; Fitzsimmons, K. (2017). Growth of the tilapia industry in India. *World Aquaculture*, 48(3), 49-52.

Molina-Luzón, M. J.; López, J. R.; Robles, F.; Navajas-Pérez, R.; Ruiz-Rejón, C.; De la Herrán, R.; Navas, J. I. (2015). Chromosomal manipulation in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858): induction of triploidy and gynogenesis. *Journal of applied genetics*, 56(1), 77-84.

Mtaki, K.; Limbu, S. M.; Mmochi, A. J.; Mtolera, M. S. (2022). Hybrids production as a potential method to control prolific breeding in tilapia and adaptation to aquaculture climate-induced drought. *Aquaculture and Fisheries*, 7(6), 647-652.

Pechsiri, J.; Yakupitiyage, A. (2005). A comparative study of growth and feed utilization efficiency of sex-reversed diploid and triploid Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture Research*, 36(1), 45-51.

Peruzzi, S.; Rudolfson, G.; Primicerio, R.; Frantzen, M.; Kaurić, G. (2009). Milt characteristics of diploid and triploid Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Aquaculture research*, 40(10), 1160-1169.

Peruzzi, S.; Varsamos, S.; Chatain, B.; Fauvel, C.; Menu, B.; Falguière, J. C.; Flik, G. (2005). Haematological and physiological characteristics of diploid and triploid sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *Aquaculture*, 244(1-4), 359-367.

Piferrer, F.; Beaumont, A.; Falguière, J. C.; Flajšhans, M.; Haffray, P.; Colombo, L. (2009). Polyploid fish and shellfish: production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. *Aquaculture*, 293(3-4), 125-156.

Pradeep, P. J.; Srijaya, T. C.; Bahuleyan, A.; Renjithkumar, C. R.; Jose, D.; Papini, A.; Chatterji, A. K. (2012). Triploidy induction by heat-shock treatment in red tilapia. *Caryologia*, 65(2), 152-156.

Pradeep, P. J.; Srijaya, T. C.; Mithun, S.; Shaharom, F.; Chatterji, A. (2011). Seed production and hatchery management techniques in tilapia. *Tilapia aquaculture techniques and potential*. University of Malaysia Terengganu publication, 105-122.

Sadler, J.; Pankhurst, N. W.; Pankhurst, P. M.; King, H. (2000). Physiological stress responses to confinement in diploid and triploid Atlantic salmon, *J. Fish Biol.*, 56(3), 506-518, <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2000.tb00751.x>

Santos, A.; Ranzani-Paiva, M.; Felizardo, N.; Rodrigues, E. (2018). Análise histopatológica de fígado de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*, criada em tanque-rede na represa de Guarapiranga, São Paulo, SP, Brasil, *Bol. Inst. Pesca*, 30(2), 141-145,

Taylor, J. F.; Sambraus, F.; Mota-Velasco, J.; Guy, D. R.; Hamilton, A.; Hunter, D.; Migaud, H. (2013). Ploidy and family effects on Atlantic salmon (*Salmo salar*) growth, deformity and harvest quality during a full commercial production cycle. *Aquaculture*, 410, 41-50.

Thresher, R. E.; Hayes, K.; Bax, N. J.; Teem, J.; Benfey, T. J.; Gould, F. (2014). Genetic control of invasive fish: technological options and its role in integrated pest management. *Biological Invasions*, 16(6), 1201-1216.

Tiwary, B. K.; Kirubakaran, R.; Ray, A. K. (2000). Gonadal development in triploid *Heteropneustes fossilis*. *Journal of fish biology*, 57(5), 1343-1348.

Vale, A.; Afonso, A.; Silva, M. T. (2002). The Professional phagocytes of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): cytochemical characterisation of neutrophils and macrophages in the normal and inflamed peritoneal cavity. *Fish Shellfish and Immunology*, vol. 13, no. 3, p. 183-198. <http://dx.doi.org/10.1006/fsim.2001.0394>

Valenti, R. J. (1975). Induced polyploidy in *Tilapia aurea* (Steindachner) by means of temperature shock treatment. *Journal of Fish Biology*, 7(4), 519-528.

Verhille, C.; Anttila, K.; Farrell, A. P. (2013). A heart to heart on temperature: impaired temperature tolerance of triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) due to early onset of cardiac arrhythmia. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 164(4), 653-657.

Weber, G. M., Hostuttler, M. A., Cleveland, B. M., & Leeds, T. D. (2014). Growth performance comparison of intercross-triploid, induced triploid, and diploid rainbow trout. *Aquaculture*, 433, 85-93.

Wlasow, T.; Fopp-Bayat, D. (2011). The effect of thermal shock on morphological characteristics of blood cells in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) triploids. *Acta Veterinaria Brno*, 80(2), 215-218.

Wong, T. T.; Zohar, Y. Reproductively sterile fish production by a non-transgenic gene silencing technology. *Scientific reports*, 5, 15822, 2015.

Yueh, W. S.; Chang, C. F. (2000). Morphological changes and competence of maturing oocytes in the protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegeli*. *ZOOLOGICAL STUDIES-TAIPEI*, 39(2), 114-122.

Zhang, Q.; Yu, H.; Howe, A.; Chandler, W.; Allen Jr, S. K. (2010). Cytogenetic mechanism for reversion of triploids to heteroploid mosaics in *Crassostrea gigas* (Thunberg) and *Crassostrea ariakensis*. *Aquaculture research*, 41(11), 1658-1667. doi:10.1111/j.1365-2109.2010.02541.x.

Zhang, Z.; Wang, X.; Zhang, Q.; Allen, S. (2014). Cytogenetic mechanism for the aneuploidy and mosaicism found in tetraploid Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Journal of Ocean University of China*, 13(1), 125-131. doi:10.1007/s11802-014-2318-x

## 5. ARTIGO 1 - Growth performance, reproductive status, and chromosomal instability in triploid Nile tilapias

**Authors:** Williane Ferreira Menezes<sup>a</sup>; Érika Ramos Alvarenga<sup>a</sup>, Rafael Henrique Nóbrega<sup>b</sup>, Luiz Renato França<sup>c</sup>, Ludson Guimarães Manduca<sup>a</sup>, Franklin Fernando Batista da Costa<sup>a</sup>, Vinícius Monteiro Bezerra<sup>a</sup>, Eduardo Maldonado Turra<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Aquacultura (LAQUA), Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, nº 6627, Caixa Postal 567, Campus da UFMG, CEP 30123-970. Belo Horizonte, MG – Brasil.

<sup>b</sup>Instituto de Biociências de Botucatu, Departamento de Morfologia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, R. Professor Doutor Antônio Celso Wagner Zanin, nº 250, Campus de Botucatu, CEP 18618-689. Botucatu, SP – Brasil.

<sup>c</sup>Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Diretoria. Av. André Araújo Petrópolis, CEP 69067-375. Manaus, AM – Brasil.

\* Corresponding author: Phone: 55 31 3409 3306; E-mail: [eduardoturra@yahoo.com.br](mailto:eduardoturra@yahoo.com.br) (Turra, E.M)

### **Abstract**

Reproductive control is one of the biggest challenges in tilapia production and triploidy was developed as an alternative to sterilization. The generation of the triploid individual is done by chromosomal manipulation, and in general polyploids present chromosomal instability, but all the causes are not well discussed. Lifetime follow-up of triploid Nile tilapia and assessment of its chromosomal instability has yet to be reported. This study evaluated the chromosomal instability from juveniles to adulthood, growth performance and gonadal status of tilapia (diploid, triploid or aneuploid) hatched from eggs submitted or not to heat shock. Nile tilapia oocytes were fertilized (1,476 oocytes), half of the eggs was subjected to a four-minute shock in 41°C water four minutes after fertilization and the other half were not (Control group). Treated and control eggs were incubated (at 27°) and 160 larvae from treated group hatched and survived after yolk sac absorption (the same number of the control group were randomly

picked to continue the experiment). The determination of ploidy was performed by flow cytometry in two periods, initially (at 85<sup>th</sup> day of age post yolk sac absorption) to separate the control, treated (but not triploid) and triploid groups; and subsequently, in the same adult animals (at 301<sup>th</sup> day of age post yolk sac absorption). After the first cytometry analysis of the 73 surviving juveniles so far from the treated group, only 14 were confirmed triploid. The analysis of adult ploidy indicated that 12.5% of triploid individuals (one out of 8 surviving adult tilapias from the 14 confirmed triploid juveniles) remained triploid and 87.5% initially triploid tilapia lost chromosome sets. Gonadal histology was analyzed and tilapia that lost a set of chromosomes continued to produce gametes. The growth performance of triploid tilapia was superior to that of diploid tilapia during the juvenile phase, but similar in adults. It is important to reassess the viability of using triploids as an option for Nile tilapia production or even as a research model. Once the chromosome sets are lost and the animals become diploid again, they can reproduce, and the growth performance can become similar to the growth of diploid animals. The loss of a complete set of chromosomes poses a problem for biological control and, depending on its extent, possibly for commercial aquaculture. Our results suggest that, due to genomic instabilities caused by polyploidization, the triploid generation of tilapia has low efficiency.

**Keywords:** genomic instabilities, heat shock, *Oreochromis niloticus*, polyploidy, reproduction.

## 5.1. INTRODUCTION

Although the introduction of tilapia in several countries has been a great success in the last two decades, there are discussions and concerns about possible environmental and biodiversity damage caused by this group of species (Teletchea and Fontaine, 2014). Reproductive control is one of the biggest challenges in tilapiculture and researches have been conducted to develop techniques for tilapia spawning prevention. In this way, fish do not move energy to reproduction, only to growth. Lots of monosex fish or sterile individuals can be obtained by sexing, sexual manipulations, using sexual steroids or chromosomal manipulations such as polyploidy (Arai and Fujimoto, 2018; Baroiller and Cotta, 2018; Wang and Shen, 2018; Alvarenga et al., 2020, Costa e Silva et al., 2022). The effectiveness of sterility is important for environmental sustainability, since the escape of fertile fish represents the threat of genetic contamination of wild population stocks and possible ecological imbalance (Wong and Zohar, 2015).

Currently, the most used method on sexual control in commercial tilapia production is the use of monosex populations through the sexual inversion induction by hormonal treatment (Baroiller and D'Cotta, 2018; Costa e Silva et al., 2022). However, much is discussed about the sex steroids use in tilapia larvae, therefore, triploidy was considered as an alternative for reproductive control (Teletchea and Fontaine, 2014). The individual with three sets of chromosomes (3N), one paternal and two maternal (Budd et al., 2015) is a triploid. Triploidy can be induced by chromosomal manipulation, resulting in sterile individuals that circumvent the problem of early sexual maturity and unwanted reproduction (Pradeep et al., 2012).

Polyploidy increases the occurrence of spindle irregularities that can lead to disordered chromatids segregation, aneuploid cell production (abnormal chromosome numbers) and epigenetic instability (Borel et al., 2002). It is very common to study neoplastic cells to investigate the chromosomal aneuploid origin and karyotype instability (Reshmi et al., 2004; Silva et al., 2010), but it is relatively new to evaluate chromosomal instability in triploids and tetraploids fish. Aneuploidy can arise through two main mechanisms: cells can proceed through a tetraploid intermediate to a multipolar mitosis that creates a random chromosomal distribution, or they can proceed directly to aneuploidy through failure of a critical control of euploidy (Borel et al., 2002).

The lack of constancy in the number of chromosomes between polyploid suggests that polyploidy may not be a genetically stable combination (Comai, 2005). Alvarenga et al. (2020) observed a possible loss of chromosomes in Nile tilapia individuals during an attempt to induce tetraploidy, resulting in individual's aneuploid, mosaic or triploid. Chromosomal instability in tetraploid is considerably larger than in triploids, yet chromosomal triploid instability was 30 times higher than in diploids in *Saccharomyces cerevisiae* (Mayer and Aguilera, 1990). This instability in triploid and tetraploids was also demonstrated in Oysters (De Sousa et al., 2016).

As far as we know, studies conducted with triploid Nile tilapia have evaluated ploidy status in the early stages of development (Hussain et al. 1991; Bramick et al. 1995; Byamungu et al., 2001; Pradeep et al. 2011, 2012, 2013, 2014) and the accompaniment of adult tilapias to verify chromosomal stability has not yet been reported. Thus, the objective of this study was to evaluate and to compare the chromosomal instability of triploid and diploid tilapia hatched from eggs subjected or not to heat shock, and to evaluate the growth and gonadal status of these animals.

## 5.2.MATERIAL AND METHODS

### Experimental installations and animals

The experiment was conducted at the Aquaculture Laboratory of the Veterinary School (EV) of Federal University of Minas Gerais (UFMG), Brazil. All procedures were previously approved by the UFMG animal ethics committee under protocol number 215/2021. For the induction of triploidy, twenty-seven females ( $729 \text{ g} \pm 357$ ) and 15 males ( $910 \text{ g} \pm 430$ ) from the Nile tilapia broodstock (Chitralada lineage) of the NGTAqua research group (Nutrition, Genetics and Technology in Aquaculture) of EV/UFMG were kept separated into two different tanks (useful volume of  $3.6 \text{ m}^3$  each) in clear water system. These animals were fed with vitamin C enriched feed as recommended by Mataveli et al. (2018).

Four females that presented an enlarged and reddish genital papilla and cambered ventral region (“ready to spawn”) were chosen for reproduction induced with human chorionic gonadotropin (hCG) (Vetecor, Calier Laboratory, Spain) by a single dose of  $1 \text{ IU} \cdot \text{gram of female}^{-1}$  (Azevedo et al., 2021). After 24 hours, the induced females were striped to obtain their oocytes that were fertilized by semen collected from three males (the oocytes of each female were fertilized by  $0.6^{-1} \text{ mL}$  of semen). After dry fertilization,  $10 \text{ mL}$  of water from the egg incubation system was added. The total spawning volume of each female was divided into two batches, and after 4 minutes, one batch was subjected to a 4-minute heat shock in water at  $41^\circ\text{C}$  (Pradeep et al., 2010). Then, the treated and control eggs were transferred to an artificial incubator ( $28^\circ\text{C}$ ). Before egg distribution, a random sample of  $1.0 \text{ mL}$  of eggs was obtained, fixed in Bouin's solution and used to measure egg production ( $\text{eggs} \cdot \text{mL}^{-1} \times \text{total egg volume}$ ) and the approximate number of eggs per each group of treatment ( $\text{eggs} \cdot \text{mL}^{-1} \times \text{volume of eggs distributed in each group of treatment}$ ). The number of larvae was also measured after yolk sac absorption to determine the survival rate of hatched eggs. The tilapias were kept in a closed production system until adulthood. The larviculture period was carried out in a water recirculation system and the fattening in a biofloc system. The overall experiment schematic summary is shown in Figure 1.

The initial ration had 55% crude protein (Propescado-Nutriave Foods, Brazil), starting with a daily treat of 20% of biomass and a feeding frequency of eight times a day, according to Kubitzka (2000). Granulometry, dietary protein level and feeding frequency were adjusted for tilapia growth according to the same author.

### Water quality

Water quality was evaluated twice a week. The parameters measured with digital equipment were temperature ( $^{\circ}\text{C}$ ), pH, and salinity ( $\%$ ). Alkalinity ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ), total ammonia nitrogen-TAN ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ), and nitric nitrogen- $\text{N-NO}_2^-$  ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) were measured according to the protocols of APHA (2012), UNESCO (1983), and Bendschneider and Robinson (1952), respectively. Nitrogen nitrate ( $\text{N-NO}_3^-$ ) was quantified by the methodology applied by Monteiro et al. (2003).

For the period in which the animals were raised in biofloc systems, commercial sugar (50% carbon) was used as an additional carbon source. The amount of sugar added to the system was calculated using a C:N ratio of 6:1 based on the TAN concentration according to Ebeling et al. (2006). Sedimentary solids (SS) were measured when the animals were in a biofloc system, with a 1 L Imhoff cone after settling for 15 min. The averages of the water quality parameters were within the recommended limits for tilapia (Table 1).

### **Flow cytometry analysis**

When the tilapias reached 85 days post-yolk sac absorption, they were anesthetized by immersion in water with eugenol solution (5% -  $1 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$  of water) and identified by Passive Integrated Transponder (PIT) tags. Then, ten  $\mu\text{L}$  of blood were collected and processed according to Alvarenga et al. (2020). The samples were stored in a refrigerator at  $4^{\circ}\text{C}$  until analysis. Ploidy determination was performed as described by Herbst (2002). An estimate of the number of cells was obtained by counting erythrocytes/microliters. The ideal amount for the cytometry analysis is  $10^5 - 10^6$  cells/microliters. Blood samples were also collected at the end of the experiment (adult fish, 300 days) to recheck ploidy and assess chromosomal stability.

The cytometry was carried out at the Institute of Biosciences-UNESP, Botucatu, Brazil. Blood samples were centrifuged by 8 min to 300 g, the supernatant was discarded and added 1 ml of phosphate-biffered saline (PBS) (NaCl 0.8%, KCl 0.02%,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.144%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.024%) and blood cells were resuspended in 1 ml of PBS, and then centrifuged by 8 min to 300 g. The supernatant was discarded. Blood cells were resuspended in 1 mL of cell nuclei marking solution (1 mL of Triton X-100, 0.2 mg of RNase,  $0.02 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  propidio iodide (PI) in PBS). Data acquisition was performed in Facscantotmii flow cytometer (BD Biosciences) with Facsdiva software (BD Biosciences). Ten thousand events were purchased by sample. The doors were established based on size (FSC) and granularity (SSC) parameters and later PI fluorescence. Red blood sample cells of a known diploid tilapia were used as internal control.



The measurements of DNA content from control individuals (diploid) were compared to those that received heat treatment. The fish were classified as diploid (flow cytometry results equal to diploid control), aneuploid (histogram peak slightly displaced to the left compared to the diploid control histogram peak), triploid (histogram peak moved to the right compared to the diploid control histogram peak), as described by Zhang and Arai (1996). The results were analyzed by Flowjo® software.

### **Growth performance**

To assess tilapia growth performance, body weight was measured on the 26th, 39th, 60th, 74th, 126th, 126th, 227th, 276th, and 301st day of age post yolk sac absorption with an analytical balance and the number of individuals was counted to obtain the survival rate (%). Tilapia were previously anesthetized by water immersion with eugenol solution (5% - 1 mL · L<sup>-1</sup> of water) (Ranzani-Paiva et al., 2013).

### **Gonadal development**

At 378 days of age post yolk sac absorption, the tilapias were euthanized, the gonads were removed and fragmented (~5 mm thick). These fragments were fixed by immersion in 5% glutaraldehyde and 0.05 M phosphate buffer (pH 7.3) and then embedded in methacrylate glycol. Sections were obtained using a Reichert Jung automatic microtome (NuBlock, Germany) and stained with 1% toluidine blue. Analyzes of these sections were performed on an Olympus IX70® light microscope to identify the presence of spermatozoa in males and vitellogenic oocytes in females.

### **Experimental design and statistics**

Prior to ploidy's first analysis, the comparison was performed between two groups: control (which did not receive treatment) and heat shock (which received heat shock treatment). After the first cytometry, the individuals were separated into three groups: control, treated group but non-triploid (which received heat shock but had no change in ploidy) and triploids. Individuals who after the first cytometry were classified as aneuploid were not used. For statistical analysis, the growth performance, water quality and reproductive variables were analyzed for normality (Shapiro-wilks test) and homoscedasticity (Bartlett test) using R software (R Core Team, 2020). The variables that met these ANOVA assumptions were submitted to it, followed by Duncan's test. For data that assumptions did not meet, the non-

parametric Kruskal-Wallis test was used. Fisher's exact test was used to compare the results of number of males and females between groups diploids, triploids and aneuploids. The level of significance was  $p < .05$ .

### 5.3.RESULTS

The average body weight (g) and survival rate (%) of animals from different growth stages are shown in Table 2 and Table 3. From the 1<sup>st</sup> day of age post yolk sac absorption (when the number of surviving larvae was equated) to the 126<sup>th</sup>, average body weight and survival rate did not differ between groups. From the 126<sup>th</sup> to the 301<sup>st</sup> day of age post yolk sac absorption, the triploids had a higher average body weight. But at the final weighing (378 days of age post yolk sac absorption), body weight was not different between the groups.

The second analysis of tilapia ploidy (in adult fish) showed that only one individual (which corresponded to 12.5% of individuals) remained triploid. Thus, 87.5% of fish (7 individuals) lost sets of chromosomes, becoming aneuploid (2 individuals), mosaic (3 individuals) or diploids (2 individuals) as adults (Figure 2).

The relative frequency of females and males according to the result of the first ploidy analysis were showed in Table 4. The sex ratio did not differ between groups.

The individual who remained triploid was a female and had only atretic follicles (absence of vitellogenic follicles). The individuals who lost triploid status, all males had spermatozoa, 25% of the females had a predominance of atretic follicles, and 75% had a predominance of vitellogenic follicles. In the treated group, all males had spermatozoa, 66.7% of females had a predominance of vitellogenic follicles and 33.3%, a predominance of atretic follicles (Table 5 and Figure 3).

### 5.4.DISCUSSION

In this study, only one triploid individual maintained the same ploidy when Nile tilapias were analyzed in adult phase, and the others lost sets of chromosomes. As far as we know, an unprecedented situation for triploid fish. It is assumed that the loss caused the development of the gonads and probable the recovery of the reproductive capacity. In addition, the previously triploid and the other individuals equalized the average body weight.

From 126<sup>th</sup> to 301<sup>st</sup> day of age post yolk sac absorption in our study, triploid group performed greater than animals not submitted to heat shock. Brämick et al. (1995) also observed a higher growth of Nile tilapia triploids (139 g) compared to diploid ones (81 g) at the end of

154 days of experiment. Even under different feeding regimes, a normal one (7 days/week of feeding) or a restricted one (5 days/week of feeding), Byamungu et al. (2001) obtained a higher growth for triploid blue tilapia juveniles compared to diploid ones, weighting around 70-110g. The literature shows that in other fish species, like yellowtail tetra *Astyanax altiparanae*, triploids had better growth rate, carcass yield and meat quality than diploid ones (do Nascimento et al., 2017a and 2017b). However, also in our study, the triploid group weight performance equaled the control one when adulthood was analysed, this final result must be associated with the chromosomes loss observed for most triploid individuals. This event indicates that the loss of chromosomes can occur in advanced tilapia phases of development and has not been observed in studies that analyzed the ploidy in early stages of development.

The survival of triploid individuals is comparable to diploid individuals from post-larval stages (Pechsiri and Yakupitiyage, 2005; Fraser et al., 2012). Byamungu et al. (2001) reported a survival rate of 65.3% and 60.7% for diploid and triploid *Oreochromis aureus*, respectively. In the present study, we did not obtain statistical differences regarding the survival of triploid and diploid animals, but high mortality in the larval phase was observed in triploids. A high mortality was also observed in larvae hatched from eggs treated with heat shock when it was not yet known whether they were triploid or not.

The sex ratio did not differ between triploid, treated and control groups. Likewise, Chang et al. (1991) reported no difference between the sex ratio in diploids and triploids of *Oreochromis aureus*. However, the triploid tilapias number obtained in this induction was small (14 out of 73 surviving juveniles from the heat shock group) and the male/female ratio equality may have been due to the small sample size of surviving tilapia triploids. Brämick et al. (1995) observed that the overall sex ratio (males:females) was balanced in triploid tilapia too and these authors evaluated a larger number, 63 triploid. However, Pradeep et al. (2012) observed that fish subjected to heat shock at 41° C produced an asymmetry to males, 84.1% of males, in relation to control (28° C), 50.9% of males, and cold shock treatment (9° C), 54.7% of males. The same authors in a study published in 2013 obtained the same asymmetry (Pradeep et al., 2013)

In our study, the ploidy of tilapias in the initial phase of life and in the adult phase was analyzed, and it was observed that most of the triploid animals when young were no longer as adults. In this sense, the efficiency of adult triploid production is even lower than the estimated efficiency of juvenile tilapia. Chromosomal loss in polyploids is frequent and occurs to a much greater extent than in diploids (Comai, 2005). Zhang et al. (2010) e Zhang et al. (2014) founded

that oysters with increased ploidy in their cells tended to have higher percentages of aneuploidy, concluding that the general polyploidy condition provides the substrate for subsequent loss of chromosomes. For oysters, chromosomal loss is not limited to aneuploidy, but includes the loss of a complete set of chromosomes to become mosaics through a process called reversal (Zhang et al., 2010). Some findings suggested that the reversal existed in both tetraploid and triploid oyster and chromosomal agglomeration is the mechanism for chromosomal loss in polyploid. Cells that suffer reversal continually eliminate chromosomes until a stable (genetically healthy) state is established. It is assumed that the mitotic chromosome segregation cells is affected in cells with abnormal chromosome, resulting in daughter cells with unusual chromosomal constitutions (Zhang et al., 2014).

For vertebrate animals, chromosomal instability was reported in cattle clones. Two clones were evaluated at various times up to 20 months of age and the incidence of abnormal lymphocytes since they derived from different donor cell cultures with high abnormal cell incidences. The incidence of abnormal lymphocytes in clones remained stable, indicating a transient event of chromosomally abnormal nuclei found in the cloned animals. These results show that most phenotypically normal clones have normal chromosomal composition, but the instability of the number of chromosomes can occur (Hanada et al., 2005).

Chromosomes losses has not been reported in triploid fish within the same generation yet, however, in most triploid trials, the chromosomes number in the cells is quantified in early stages of development and there is no triploidy status monitoring throughout developmental stages. Benfey (2016) also hypothesized chromosomal instability in fish and pointed out that a possible cause of the occasional occurrence of triploid individuals is either the mixing of ploidy levels between different cells (i.e., emergence of animals in mosaic) or the reversion to a state fully diploid. In the review on triploidy effectiveness as a management tool for reproductive control of farmed fish, the author mentioned that mosaic individuals have been reported as a result of triploid induction of Atlantic salmon, but that may be erroneous results due to errors in erythrocyte size measurements, and therefore the instability of triploids has not yet been reported in fish. Two theories for the complete triploid reversal were presented by Benfey (2016). One would be the loss of one or some chromosomes at a time, presumably through errors in many cell divisions. The other theory is the loss of an entire haploid set chromosomes defined in a single cell division event.

In our study, during the cytometry analysis of adult animals, an abnormal amount of DNA was observed in the cells. Sometimes the triploidy induction results in mosaic individuals,

where the level of ploidy varies between tissues (Teplitz et al., 1994; Arai, 2001). The presence of mosaic individuals was observed in other fish species after triploidy induction (Ewing et al, 1991; Teplitz et al, 1994; Goudie et al, 1995). When this occurs, it is important to verify whether the precursors of the germ cells are triploid, since the interest of triploidy is to be a direct method to guarantee the sterility of the animal. Sterility would not be guaranteed if mosaicism affected gametes as it affects other cells (Piferrer et al., 2009). The individual who remained triploid have only atresic follicles (instead of vitellogenic follicles), which may indicate that animals that reach triploid adult stage can be considered sterile. Benfey (2016) comments that there are several reports of triploid females that occasionally spawn mature oocytes, showing that perhaps the loss of chromosomes has occurred in these triploid individuals. Johnstone et al (1991) estimated that 0.1% of the triploid Atlantic salmon female population ovulate and when fertilized with sperm from diploid males, produce aneuploid embryos that die early in development, the same was reported by Benfey (1996) with females of *Salvelinus fontinalis*.

In the present study, most adult animals lost triploid status, indicating the possible unfeasibility of using triploidy on a commercial scale for tilapiculture. Triploidy induction is well established for salmonids and already has commercial application, but in all current studies the animals were tested in the youth phase (average weight of 5 grams) (Leclercq et al. 2011; Taylor et al, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015). For tilapia, triploidy induction is only at the level of laboratory experimentation and there are no reports of large-scale use of triploid individuals. Brämick et al. (1995) evaluated that of all 2,139 fish submitted to thermal shock to obtain triploidy, only 63 were triploid (= 3%). One hypothesis raise is that in salmonids, triploidy occurs spontaneously in the natural habitat (Cuellar e Uyeno, 1972; Thorgaard e Gall, 1979; Allendorf e Thorgaard, 1984; Leclercq et al., 2011; Glover et al., 2015; Jørgensen et al., 2018) probably facilitating the application of the technique, the survival of a large number of triploid adult salmonids and its feasibility, and for tilapia there are no reports for such a case.

These results demonstrate that there is still much to be investigated about chromosomal manipulation as a sterility tool for tilapia and other fish, and mainly point out the risks in the production of fish considered as triploids, in which their ploidy condition was evaluated only in the early stages of life. Reversal can be a problem for biological control and, depending on its extent, possibly for commercial aquaculture.

The elimination of a chromosomes set during triploid somatogenesis can have an evolutionary meaning of restoring the genome balance near to normal state. This loss can result in diploid germ cells, which can lead to fertile haploid gametes formation. In other words, the reproductive

capacity can be recovered in animals originally considered sterile. Since chromosomes sets are lost and the animal becomes diploid again, reproduction can be resumed, and growth performance becomes similar to those of diploid animals. It is important to reassess the feasibility of using triploids as an option to produce Nile tilapia or even as a research model. Our results suggest that due to genomic instability caused by polyploidization, the generating of 3N Nile tilapias may have low efficiency.

## REFERENCES

Allendorf, F. W., Thorgaard, G. H., 1984. Tetraploidy and the evolution of salmonid fishes. *Evolutionary genetics of fishes*, pp. 1-53. Springer, Boston, MA.

Alvarenga, E. R., Alves, G. F. D. O., Fernandes, A. F. A., Costa, G. R., da Silva, M. A., Teixeira, E. D. A., Turra, E. M., 2018. Moderate salinities enhance growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings in the biofloc system. *Aquac. Res.*, 49(9), 2919-2926. doi: 10.1111/are.13728

Alvarenga, É. R., Fernandes, A. F. A., Lopes, L. R., Soares, T. E., de Oliveira Alves, G. F., da Costa, F. F. B., Sales, S. C. M., Lima, G. K., Turra, E. M., 2020. Attempt to produce a Nile tilapia tetraploid line by heat shock induction. *Aquaculture*, 529, 735647. doi: 10.1016/j.aquaculture.2020.735647

APHA - American Public Health Association. Standard methods for the examination of water and wastewater, 2012. 22nd. Rice, E.W.; Baird, R.B.; Eaton, A.D.; Clesceri, L.S. Washington, D.C.: American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, pp. 1496.

Arai, K., 2001. Genetic improvement of aquaculture finfish species by chromosome manipulation techniques in Japan. *Aquaculture*, 197(1-4), 205-228. doi: 10.1016/S0044-8486(01)00588-9

Arai, K., Fujimoto, T., 2018. Chromosome manipulation techniques and applications to aquaculture. *Sex control in Aquaculture*, pp. 137-162.

Avnimelech, Y., 2009. Biofloc technology. A practical guide book. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, pp. 182.

Azevedo, R. O., de Alvarenga, É. R., Fernandes, A. F. A., da Silva, M. A., Alves, G. F. D. O., Menezes, W. F., Turra, E. M., 2021. Use of hCG hormone in the natural and artificial reproduction of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquac. Res.* 52(12), 6380-6388. doi: 10.1111/are.15502

Baroiller, J. F., D'Cotta, H., 2018. Sex control in tilapias. *Sex control in aquaculture*, pp. 189-234.

Bendschneider, K., Robinson, R. J., 1952. A new spectrophotometric method for the determination of nitrite in sea water, pp.26.

Benfey, T. J., 1996. Ovarian development in triploid brook trout (*Salvelinus fontinalis*). In: Goetz FW, Thomas P (eds) *Proceedings of the 5th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish*, pp. 357; *Fish Symp* 95, Austin.

Benfey, T. J., 2016. Effectiveness of triploidy as a management tool for reproductive containment of farmed fish: Atlantic salmon (*Salmo salar*) as a case study. *Reviews in Aquaculture*, 8(3), 264-282.

Borel, F., Lohez, O. D., Lacroix, F. B., Margolis, R. L., 2002. Multiple centrosomes arise from tetraploidy checkpoint failure and mitotic centrosome clusters in p53 and RB pocket protein-compromised cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99(15), 9819-9824. doi: 10.1073/pnas.152205299

Brämick, U., Puckhaber, B., Langholz, H. J., Hörstgen-Schwark, G., 1995. Testing of triploid tilapia (*Oreochromis niloticus*) under tropical pond conditions. *Aquaculture*, 137(1-4), 343-353. doi: 10.1016/0044-8486(95)01104-8

Budd, A. M., Banh, Q. Q., Domingos, J. A., Jerry, D. R., 2015. Sex control in fish: approaches, challenges and opportunities for aquaculture. *J. Mar. Sci. Eng.* 3(2), 329-355. doi: 10.3390/jmse3020329

Byamungu, N., Darras, V. M., Kühn, E. R., 2001. Growth of heat-shock induced triploids of blue tilapia, *Oreochromis aureus*, reared in tanks and in ponds in Eastern Congo: feeding regimes and compensatory growth response of triploid females. *Aquaculture*, 198(1-2), 109-122. doi: 10.1016/S0044-8486(00)00605-0

Chang, S. L., Chang, C. F., Liao, I. C., 1991. Study on the growth performance and gonadal development of triploid tilapia, *Oreochromis aureus*. In III International Symposium. Tilapia in Aquaculture, Abidjan, Ivory Coast. Abstract.

Comai, L. 2005. The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nat. Rev. Genet.*, 6(11), 836-846. doi:10.1038/nrg1711

Costa e Silva, R. Z., Alvarenga, E. R., Matta, S. V., Alves, G. F. O., Manduca, L. G., Silva, M. A., Yoshinaga, T. T., Fernandes, A. F. A., Turra, E. M., 2022. Masculinization protocol for Nile tilapia (*O. niloticus*) in Biofloc technology using 17- $\alpha$ -methyltestosterone in the diet. *Aquaculture*, 547, 737470. doi: 10.1016/j.aquaculture.2021.737470

Cuellar, O., Uyeno, T., 1972. Triploidy in rainbow trout. *Cytogenet. Genome Res.* 11(6), 508-515. doi: 10.1159/000130217

De Sousa, J. T., Allen Jr, S. K., Baker, H., Matt, J. L., 2016. Aneuploid progeny of the American oyster, *Crassostrea virginica*, produced by tetraploid $\times$  diploid crosses: another example of chromosome instability in polyploid oysters. *Genome*, 59(5), 327-338. doi: 10.1139/gen-2015-0222

do Nascimento, N. F., de Siqueira-Silva, D. H., Pereira-Santos, M., Fujimoto, T., Senhorini, J. A., Nakaghi, L. S. O., Yasui, G. S., 2017. Stereological analysis of gonads from diploid and triploid fish yellowtail tetra *Astyanax altiparanae* (Garutti and Britski) in laboratory conditions. *Zygote*, 25(4), 537-544.

do Nascimento, N. F., Pereira-Santos, M., Piva, L. H., Manzini, B., Fujimoto, T., Senhorini, J. A., Yasui, G. S., Nakaghi, L. S. O., 2017. Growth, fatty acid composition, and reproductive



parameters of diploid and triploid yellowtail tetra *Astyanax altiparanae*. *Aquaculture*, 471, 163-171. doi: 10.1016/j.aquaculture.2017.01.007

Ebeling, J. M., Timmons, M. B., Bisogni, J. J., 2006. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia–nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture*, 257(1-4), 346-358. doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.03.019

El-Sayed, A. F. M., 2006. Tilapia culture in salt water: environmental requirements, nutritional implications and economic potentials. *Avances en Nutricion Acuicola*. pp. 96-106.

Ewing, R. A., Scalet, C. G., Evenson, D. P., 1991. Flow cytometric identification of larval triploid walleyes. *The Progressive Fish-Culturist* (53), 177–180. doi: 10.1577/1548-8640(1991)053<0177:FCIOLT>2.3.CO;2

Fraser, T. W., Fjellidal, P. G., Hansen, T., Mayer, I., 2012. Welfare considerations of triploid fish. *Rev. Fish. Sci.*, 20(4), 192-211. doi: 10.1080/10641262.2012.704598

Glover, K. A., Madhun, A. S., Dahle, G., Sørvik, A. G., Wennevik, V., Skaala, Ø., Fjellidal, P. G., 2015. The frequency of spontaneous triploidy in farmed Atlantic salmon produced in Norway during the period 2007–2014. *Bmc Genetics*, 16(1), 1-10.

Goudie, C. A., Simco, B. A., Davis, K. B., Liu, Q., 1995. Production of gynogenetic and polyploidy catfish by pressure-induced chromosome set manipulation. *Aquaculture*, (133), 185–198. doi: 10.1016/0044-8486(94)00367-W

Hanada, H., Takeda, K., Tagami, T., Nirasawa, K., Akagi, S., Adachi, N., Takahashi, S., Izaike, Y., Iwamoto, M., Fuchimoto, D. I., Miyashita, N., Kubo, M., Onishi, A., King, W. A., 2005. Chromosomal instability in the cattle clones derived by somatic cell nuclear-transfer. *Mol. Reprod. Dev.: Incorporating Gamete Research*, 71(1), 36-44. doi: 10.1002/mrd.20283

Herbst, E. C., 2002. Induction of tetraploidy in zebra fish *Danio rerio* and Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. 2002. 127 Thesis (MSc) - University of North Carolina at Charlotte, NC.

Hussain, M. G.; Chatterji, A.; McAndrew, B. J.; Johnstone, R., 1991. Triploidy induction in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. using pressure, heat and cold shocks. *Theoretical and Applied Genetics*, 81(1), 6-12.

Johnstone, R., McLay, H. A., Walsingham, M. V., 1991. Production and performance of triploid Atlantic salmon in Scotland. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48, 15–36.

Jørgensen, K. M., Wennevik, V., Eide Sørvik, A. G., Unneland, L., Prusov, S., Ayllon, F., Glover, K. A., 2018. Investigating the frequency of triploid Atlantic salmon in wild Norwegian and Russian populations. *BMC genetics*, 19(1), 1-9.

Kubitza, F., 2000. Tecnologia e planejamento na produção comercial de tilápias.

Leclercq, E., Taylor, J. F., Fison, D., Fjelldal, P. G., Diez-Padrisa, M., Hansen, T., Migaud, H., 2011. Comparative seawater performance and deformity prevalence in out-of-season diploid and triploid Atlantic salmon (*Salmo salar*) post-smolts. *Comp Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol*, 158(1), 116-125. doi: 10.1016/j.cbpa.2010.09.018

Mataveli, M., de Moraes, G. V., Streit Jr, D. P., Mendez, L. D. V., Sakaguti, E. S., Toninato, J. C., Barbosa, R. C., Merlini, L., 2018. Avaliação da qualidade do sêmen de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagem Chitralada, suplementada com diferentes concentrações de vitamina C. *Bol. Inst. Pesca*, 33(1), 1-7.

Mayer, V. W., Aguilera, A., 1990. High levels of chromosome instability in polyploids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res. /Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 231(2), 177-186. doi: 10.1016/0027-5107(90)90024-X

Monsees, H., Klatt, L., Kloas, W., Wuertz, S., 2017. Chronic exposure to nitrate significantly reduces growth and affects the health status of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) in recirculating aquaculture systems. *Aquac. Res.* 48, 3482–3492. doi: 10.1111/are.13174

Monteiro, M. I. C., Ferreira, F. N., De Oliveira, N. M. M., Avila, A. K., 2003. Simplified version of the sodium salicylate method for analysis of nitrate in drinking waters. *Anal. Chim. Acta.*, 477(1), 125-129. doi: 10.1016/S0003-2670(02)01395-8

Ochatt, S. J., 2006. Flow cytometry (ploidy determination, cell cycle analysis, DNA content per nucleus). *Medicago truncatula*, 13.

Pechsiri, J., Yakupitiyage, A., 2005. A comparative study of growth and feed utilization efficiency of sex-reversed diploid and triploid Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. *Aquac. Res.* 36(1), 45-51. doi:10.1111/j.1365-2109.2004.01182.x

Piferrer, F., Beaumont, A., Falguière, J. C., Flajšhans, M., Haffray, P., Colombo, L., 2009. Polyploid fish and shellfish: production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. *Aquaculture*, 293(3-4), 125-156. doi: 10.1016/j.aquaculture.2009.04.036

Pradeep, P. J., Srijaya, T. C., Bahuleyan, A., Papini, A., 2012. Can sterility through triploidy induction make an impact on Tilapia industry? *Int. J. Aquatic. Sci.*, 3(2), 89-96.

Pradeep, P. J., Srijaya, T. C., Hassan, A., Chatterji, A. K., Raghavan, R., Withyachumnarnkul, B., & Jeffs, A., 2013. Growth performance of triploid red tilapia reared under laboratory conditions. *Journal of Applied Aquaculture*, 25(2), 176-189.

Pradeep, P. J., Srijaya, T. C., Hassan, A., Chatterji, A. K., Withyachumnarnkul, B., & Jeffs, A., 2014. Optimal conditions for cold-shock induction of triploidy in red tilapia. *Aquaculture International*, 22, 1163-1174.

Pradeep, P. J., Srijaya, T. C., Shahreeza, M. S., Mithun, S., Anuar, H., Anil, A., 2010. Induction of triploidy in red tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Peters, 1852) × *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) by heat shock treatment under laboratory conditions. *J. Coast. Environ.* 1(1), 91-102.

Pradeep, P. J.; Srijaya, T. C.; Mithun, S.; Shaharom, F.; Chatterji, A., 2011. Seed production and hatchery management techniques in tilapia. *Tilapia aquaculture techniques and potential*. University of Malaysia Terengganu publication, 105-122.

R Core Team, 2020. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>

Ranzani-Paiva, M. J. T. R., de Pádua, S. B., Tavares-Dias, M., Egami, M. I., 2013. Métodos para análise hematológica em peixes. Editora da Universidade Estadual de Maringá-EDUEM, pp. 135.

Reshmi, S. C., Saunders, W. S., Kudla, D. M., Ragin, C. R., Gollin, S. M., 2004. Chromosomal instability and marker chromosome evolution in oral squamous cell carcinoma. *Genes Chromosom. Cancer*. 41(1), 38-46. doi: 10.1002/gcc.20064

Silva, A. G., Graves, H. A., Guffei, A., Ricca, T. I., Mortara, R. A., Jasiulionis, M. G., Mai, S., 2010. Telomere-centromere-driven genomic instability contributes to karyotype evolution in a mouse model of melanoma. *Neoplasia*, 12(1), 11. doi: 10.1593/neo.91004

Taylor, J. F., Bozzolla, P., Frenzl, B., Matthew, C., Hunter, D., Migaud, H., 2014. Triploid Atlantic salmon growth is negatively affected by communal ploidy rearing during seawater grow-out in tanks. *Aquaculture* 432, 163–174. doi: 10.1016/j.aquaculture.2014.05.014

Taylor, J. F., Leclercq, E., Preston, A. C., Guy, D., Migaud, H., 2012. Parr-smolt transformation in out-of-season triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 362, 255–263. doi: 10.1016/j.aquaculture.2010.12.028

Taylor, J. F., Preston, A. C., Guy, D., Migaud, H., 2011. Ploidy effects on hatchery survival, deformities, and performance in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 315(1-2), 61-68. doi: 10.1016/j.aquaculture.2010.11.029

Taylor, J. F., Sambras, F., Mota-Velasco, J., Guy, D. R., Hamilton, A., Hunter, D., Migaud, H., 2013. Ploidy and family effects on Atlantic salmon (*Salmo salar*) growth, deformity and

harvest quality during a full commercial production cycle. *Aquaculture*, 410, 41-50. doi: 10.1016/j.aquaculture.2013.06.004

Taylor, J. F., Waagbø, R., Diez-Padrisa, M., Campbell, P., Walton, J., Hunter, D., Migaud, H., 2015. Adult triploid Atlantic salmon (*Salmo salar*) have higher dietary histidine requirements to prevent cataract development in seawater. *Aquac. Nutr.* 21(1), 18-32. doi: 10.1111/anu.12130

Teletchea, F., Fontaine, P., 2014. Levels of domestication in fish: implications for the sustainable future of aquaculture. *Fish. Fish.* 15(2), 181-195. doi: 10.1046/j.1365-2664.2003.00824.x

Teplitz, R. L., Joyce, J. E., Doroshov, S. I., Min, B. H., 1994. A preliminary ploidy analysis of diploid and triploid salmonids. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 51(S1), 38-41. doi: 10.1139/f94-293

Benfey, T. J. 2016. Effectiveness of triploidy as a management tool for reproductive containment of farmed fish: Atlantic salmon (*Salmo salar*) as a case study. *Reviews in Aquaculture*, 8(3), 264-282.

UNESCO., 1983. Chemical methods for use in marine environmental monitoring. Em: Manual and Guides12. Intergovernmental Oceanographic Commission, Paris, Franca.

Vicente, I. S. T., Elias, F., Fonseca-Alves, C. E., 2014. Prospects of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) production in Brazil. *Rev. Ciênc. Agron. (Portugal)*, 37(4), pp. 392-398.

Wang, H. P., Shen, Z. G., 2018. Sex control in aquaculture: concept to practice. *Sex Control in Aquaculture*, pp. 1-34.

Wedemeyer, G., 1996. Physiology of fish in intensive culture systems. Springer Science & Business Media.

Wong, T. T.; Zohar, Y., 2015. Reproductively sterile fish production by a non-transgenic gene silencing technology. *Scientific reports*, 5, 15822.

Zhang, Q., Arai, K., 1996. Flow cytometry for DNA contents of somatic cells and spermatozoa in the progeny of natural tetraploid loach. *Fish. Sci.*, 62(6), 870-877. doi: 10.2331/fishsci.62.870

Zhang, Q., Yu, H., Howe, A., Chandler, W., Allen Jr, S. K., 2010. Cytogenetic mechanism for reversion of triploids to heteroploid mosaics in *Crassostrea gigas* (Thunberg) and *Crassostrea ariakensis*. *Aquac. Res.*, 41(11), 1658-1667. doi: 10.1111/j.1365-2109.2010.02541.x

Zhang, Z., Wang, X., Zhang, Q., Allen, S., 2014. Cytogenetic mechanism for the aneuploidy and mosaicism found in tetraploid Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *J. Ocean Univ. China*, 13(1), 125-131. doi: 10.1007/s11802-014-2318-x

## ANEXO I - TABLES

Table 1- Water quality parameters (means  $\pm$  standard deviation) from the tanks in which tilapias hatched from eggs subjected or not to heat shock were cultivated

Parameters	Means $\pm$ standard deviation	Reference values
Temperature ( $^{\circ}$ C)	26.7 $\pm$ 3.10	27-32 <sup>(1)</sup>
pH	6.6 $\pm$ 0.82	6-9 <sup>(2)</sup>
Salinity (ppt)	1.5 $\pm$ 0.98	1-8 <sup>(3)</sup>
Total ammonia nitrogen (mg $\cdot$ L <sup>-1</sup> )	0.006 $\pm$ 0.03	<1 <sup>(1)</sup>
Nitric nitrogen (mg $\cdot$ L <sup>-1</sup> )	2.5 $\pm$ 0.64	<8 <sup>(1)</sup>
Dissolved oxygen (mg $\cdot$ L <sup>-1</sup> )	6.0 $\pm$ 1.21	>4 <sup>(2)</sup>
Alkalinity (mg $\cdot$ L <sup>-1</sup> )	39.2 $\pm$ 0.98	>20 <sup>(1)</sup>
Settleable solids (mL $\cdot$ L <sup>-1</sup> )	14.0 $\pm$ 8.61	2-40 <sup>(4)</sup>
Nitrate (g $\cdot$ L <sup>-1</sup> )	0.2 $\pm$ 0.06	<0.5 <sup>(5)</sup>

<sup>(1)</sup>El-Sayed (2006)<sup>(2)</sup>Wedemeyer (1996)<sup>(3)</sup>Alvarenga et al. (2018)<sup>(4)</sup>Avnimelech (2009)<sup>(5)</sup> Monsees et al. (2017)Table 2 - Body weight (median) and survival rate (median) of Nile tilapias from 26<sup>th</sup> to 126<sup>th</sup> day post yolk sac absorption, hatched from eggs subjected or not to heat shock for triploidy induction

Days after fertilization	Variables	Control group	Heat shock Group
26 <sup>th</sup> day	W (g) <sup>1</sup>	0.66	0.66
39 <sup>th</sup> day	W (g) <sup>1</sup>	2.84	3.08
60 <sup>th</sup> day	W (g) <sup>1</sup>	11.26	12.48
74 <sup>th</sup> day	W (g) <sup>1</sup>	22.19	24.19
126 <sup>th</sup> day	W (g) <sup>1</sup>	65.00	57.50
	SUR (%) <sup>1</sup>	42.50	45.63

SUR= Survival rate (from 26<sup>th</sup> day to 126<sup>th</sup> day after yolk sac absorption); W= average body weight.<sup>1</sup>Median do not differ by the Kruskal-Wallis test ( $p > 0.05$ ).

Table 3- Body weight mean, coefficient of variation (CV) and survival rate (median) of Nile tilapias from 126<sup>th</sup> to 378<sup>th</sup> day of age post yolk sac absorption, hatched from eggs subjected or not to heat shock for triploidy induction

Days after fertilization	Variables	Control group	Triploid group	Treated group	CV(%)
126 <sup>th</sup> day	W (g) <sup>1</sup>	65.00 <sup>a</sup>	55.00 <sup>a</sup>	65.75 <sup>a</sup>	42.28
227 <sup>th</sup> day	W (g) <sup>1</sup>	178.47 <sup>b</sup>	241.25 <sup>a</sup>	127.22 <sup>b</sup>	32.44
276 <sup>th</sup> day	W (g) <sup>1</sup>	221.53 <sup>b</sup>	347.50 <sup>a</sup>	186.67 <sup>b</sup>	34.63
301 <sup>st</sup> day	W (g) <sup>1</sup>	274.86 <sup>b</sup>	397.50 <sup>a</sup>	220.00 <sup>b</sup>	35.13
	SUR (%) <sup>2</sup>	90	80	90	-
Days after fertilization	Variables	Control	Confirmed triploids	Animals that lost the triploid status	Treated non-triploids
378 <sup>th</sup> day	W (g)	326.82	940.00*	378.57	281.11

SUR= Survival rate (from 126<sup>th</sup> day to 378<sup>th</sup> day post yolk sac absorption); W= average body weight.

<sup>1</sup>Means followed by the same letter do not differ from each other by the Duncan test ( $p > 0.05$ ).

<sup>2</sup>Median followed by the same letter do not differ by the Kruskal-Wallis test ( $p > 0.05$ ).

\* Only one animal had triploidy confirmed at the end of experiment.

Table 4 - Relative frequency (%) and number (in parentheses) of males and females of Nile tilapia classified according to ploidy after heat shock for triploidy induction

Sex	Diploid <sup>1</sup>	Triploid <sup>1</sup>	Aneuploid <sup>1</sup>
F	38.46% (10)	57.14% (8)	42.43% (14)
M	61.54% (16)	42.86% (6)	57.57% (19)
Total	100.00% (26)	100.00% (14)	100.00% (33)

F=Female; M= Male

<sup>1</sup>Values do not differ by Fisher's exact test ( $p < 0.05$ )

Table 5- Relative frequency (%) and number (in parenthesis) of the predominance of vitellogenic or atretic follicles in females and presence/absence of spermatozoa in males of Nile tilapia, hatched from eggs subjected or not to heat shock for triploidy induction

Sex	Parameter	Control	Confirmed triploids	Animals that lost the triploid status	Treated non-triploids
Males	Presence of spermatozoa <sup>1</sup>	100% (4) <sup>a</sup>	0% (0)	100% (3) <sup>a</sup>	100% (6) <sup>a</sup>
	Absence of spermatozoa <sup>1</sup>	0% (0) <sup>b</sup>	0% (0)	0% (0) <sup>b</sup>	0% (0) <sup>b</sup>
Subtotal		100% (4)	100% (0)	100% (3)	100% (6)
Females	Predominance of vitellogenic oocytes <sup>1</sup>	100% (5) <sup>a</sup>	0% (0) <sup>a</sup>	75% (3) <sup>a</sup>	66.7% (2) <sup>a</sup>
	Predominance of Atretic follicle <sup>1</sup>	0% (0) <sup>b</sup>	100% (1) <sup>a</sup>	25% (1) <sup>b</sup>	33.3% (1) <sup>b</sup>
Subtotal		100% (5)	100% (1)	100% (4)	100% (3)
Total		(9)	(1)	(7)	(9)

<sup>1</sup>Values followed by the same letter in the column do not differ by Fisher's exact test ( $p > 0.05$ )



## ANEXO II – FIGURES

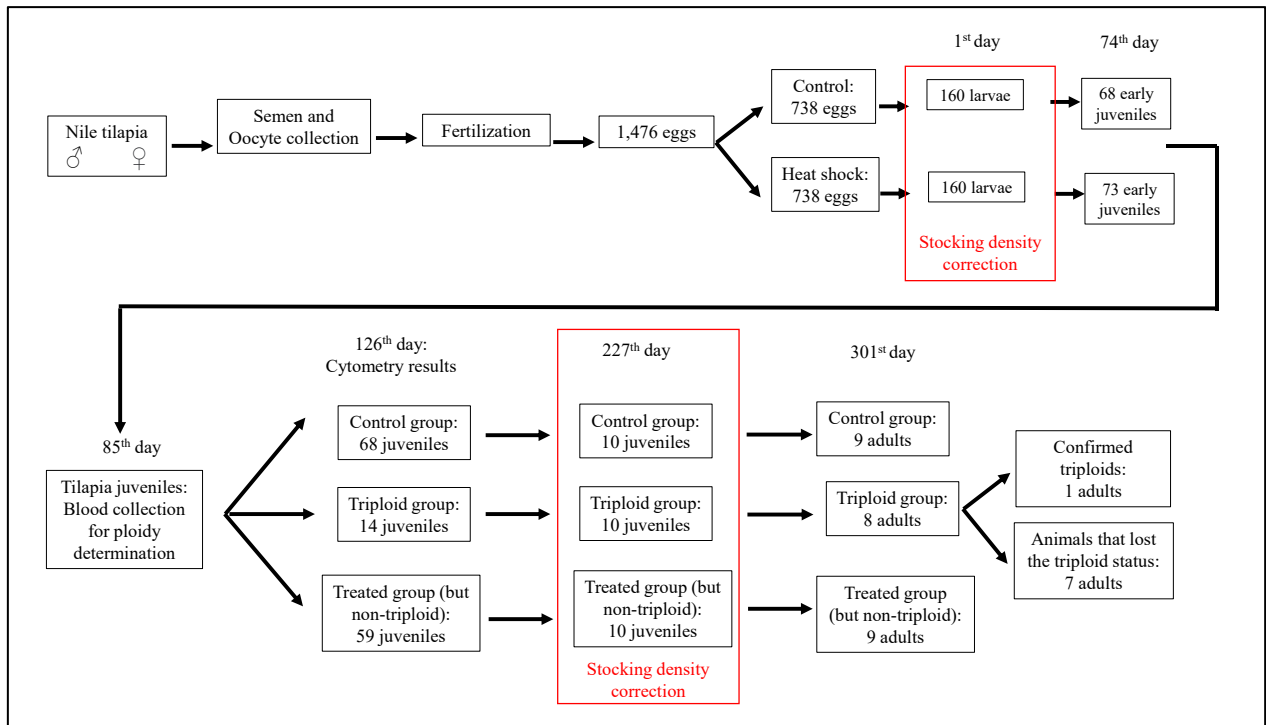


Figure 1- Experimental procedures schematic summary. After spawning induction and fertilization, 1,476 eggs were obtained and split equally among treatments (control and heat shock groups). Following yolk sac absorption, we counted the number of resultant larvae and equalized the stocking density of control group with the stocking density of the heat shock group (160 larvae per group, using the number of surviving larvae from heat shock group as reference). On the 74th day post yolk sac absorption, the early juveniles were recounted (68 and 73 juveniles from control and heat shock groups, respectively) and on the 85th day post yolk sac absorption, blood samples were collected for the first time to determine the ploidy by flow cytometry. Analysis of the DNA content histograms of the animals' blood cells indicated 14 triploids in the heat shock (treated) group. On 227th day post yolk sac absorption, a new stocking density adjustment was made according to the living triploids number (10 individuals). Therefore, 10 juveniles from the control group and others 10 juveniles from treated group (animals submitted to heat shock, but non-triploid) were randomly selected. At the end of the experiment, there were 8 animals from triploid group, 9 fish from control group and 9 tilapias from treated group. Blood samples were collected from all remain animals to evaluate the ploidy by flow cytometry in adult animals. In this second analysis, only one animal from triploid group was confirmed triploid.

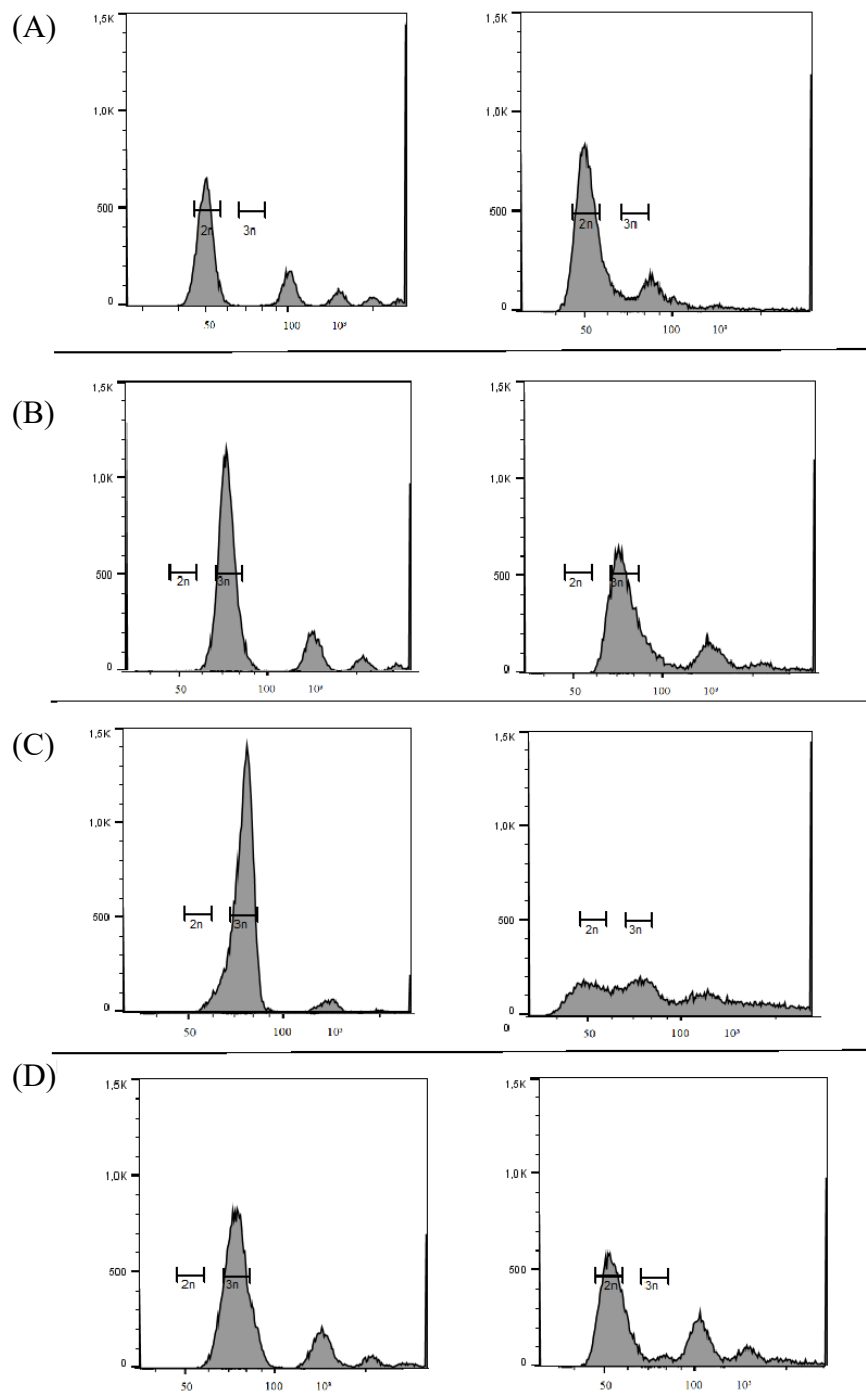


Figure 2- Representative histograms of DNA content of the animal's blood cells from flow cytometry analysis. All cells with equal amounts of DNA content form a peak, one peak representing G1 and the other (twice the channel value) representing the G2/M phase of the cell cycle. The position of the G1 peak established the ploidy level of this material (Ochatt, 2006). With a known diploid animal, the position where the peak was determined and estimated the position of a triploid animal. In the first column we observed the results of the cytometry performed in juveniles and in the second column the analysis of the same tilapia in the adult phase. (A) Tilapia hatched from eggs not subjected to heat shock (control group). (B) Tilapia hatched from eggs subjected to heat shock, observed a shift of the peak to the right, demonstrating that the shock was efficient in inducing triploidy. However, in adult fish, the peak is wider, indicating greater chromosomal variability, probably due to aneuploidies. (C) Tilapia hatched from heat-shocked eggs, whose DNA content histograms indicated triploid status in the juvenile stage, but as adults it lost irregularly shaped sets of chromosomes, becoming mosaic. (D) Tilapia hatched from eggs subjected to heat shock, whose DNA content histograms indicated triploid status in the juvenile stage, but when adult it lost a set of chromosomes, becoming diploid.

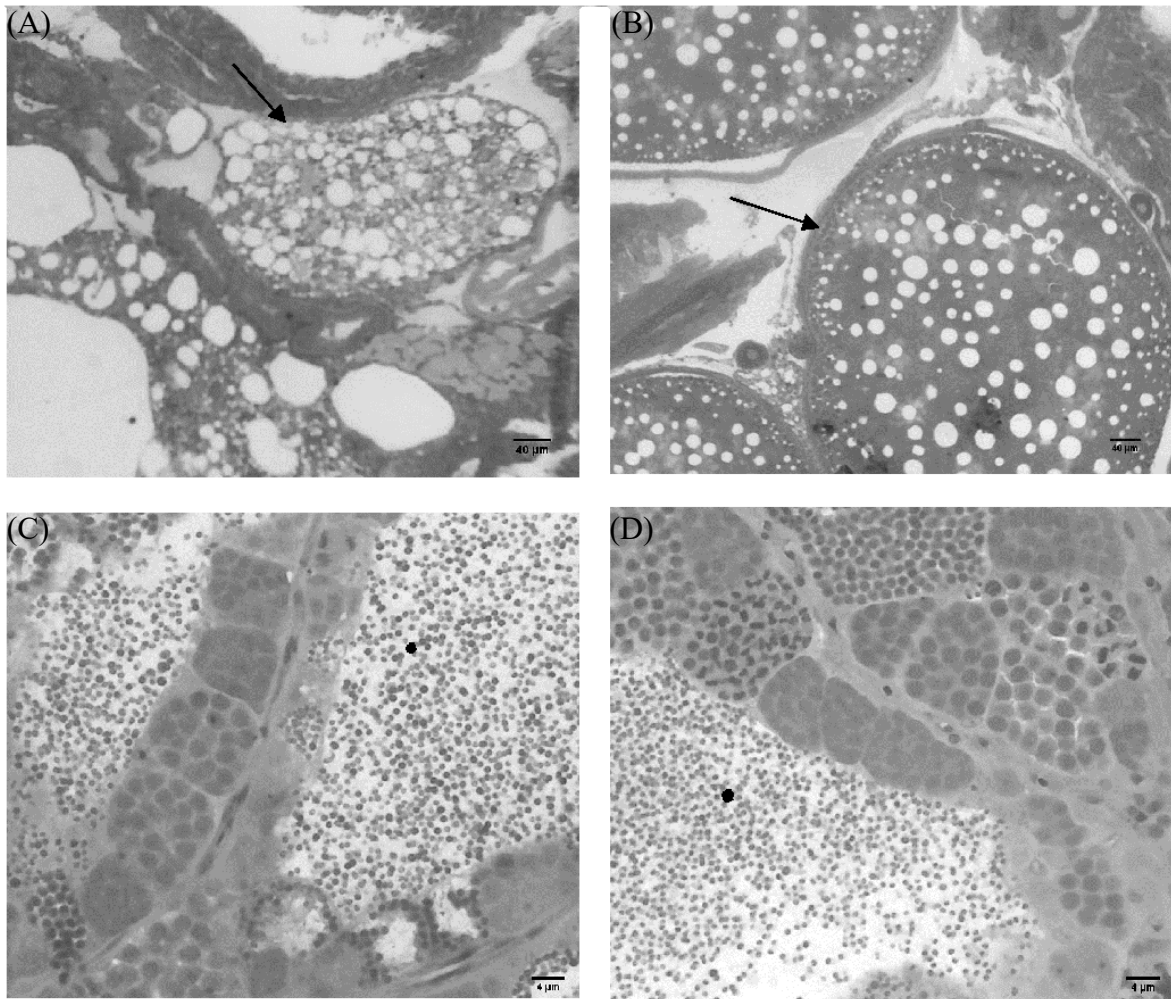


Figure 3- Photomicrograph of male and female Nile tilapia gonads. Observe an atretic follicle (A; arrow) of a triploid female and a vitellogenic follicle (B; arrow) of a control female. Spermatozoa founded in the lumen of seminiferous tubule (star) in the testis of a male that lost triploid status (C), and in diploid male (D).

## **6. ARTIGO 2 - Alterações hepáticas, hematológicas e tamanho das células em tilápias do Nilo triploides**

### **Resumo**

O objetivo deste trabalho é caracterizar indivíduos de tilápia do Nilo diploides, triploides e animais que perderam o status triploide quanto às variáveis sanguíneas e desenvolvimento morfofisiológico do fígado, a fim de avaliar se a triploidia causa alterações nos animais ao nível hematológico e hepático. Oócitos de tilápia do Nilo foram fertilizados (1.476 oócitos), metade dos ovos foi submetida a um choque de quatro minutos em água a 41°C quatro minutos após a fertilização e a outra metade não (grupo controle). Ovos tratados e controle foram incubados (a 27°) e 160 larvas do grupo tratado eclodiram e sobreviveram após a absorção do saco vitelino (o mesmo número do grupo controle foi escolhido aleatoriamente para continuar o experimento). A determinação da ploidia foi realizada por citometria de fluxo em dois períodos, inicialmente (aos 85 dias de idade pós-absorção do saco vitelínico) para separar os grupos controle, tratado (mas não triploide) e triploide; e posteriormente, nos mesmos animais adultos (aos 301 dias de idade pós-absorção do saco vitelínico). Após a primeira análise citométrica dos 73 juvenis sobreviventes até agora do grupo tratado, apenas 14 foram confirmados como triploides. A análise da ploidia adulta indicou que 12,5% dos indivíduos triplóides (uma em cada 8 tilápias adultas sobreviventes dos 14 juvenis triplóides confirmados) permaneceram triplóides e 87,5% das tilápias inicialmente triplóides perderam conjuntos cromossômicos. Foi feita análise sanguínea ao fim do experimento. Os eritrócitos dos peixes triploides são de tamanho maior em relação aos peixes diploides, isso devido a maior quantidade de material genético nessas células. Além disso, a triploidia diminui o número de leucócitos e essa diferença pode afetar a atividade celular e a resposta dos peixes às condições de criação e eventuais infecções. Com isso, a avaliação de lâmina de esfregaço sanguíneo apresenta uma possibilidade prática e de baixo custo para a identificação da triploidia em tilápias do Nilo. Não foram observadas alterações histopatológicas significativas nas amostras de fígado em nenhum dos tratamentos. Assim, pode-se afirmar que a indução da triploidia não causa lesões e alterações histopatológicas no tecido hepático de tilápias do Nilo.

**Palavras-chave:** Choque térmico, fígado, índices hematimétricos, triploides.

## 6.1.INTRODUÇÃO

A manipulação da ploidia com objetivo de criar indivíduos triploides é uma das abordagens mais pesquisadas para controlar a reprodução em espécies de aquicultura e é rotineiramente aplicada à produção comercial, como no caso de salmonídeos (Budd et al., 2015). As células triploides possuem 50% a mais de DNA do que as células diploides, com isso, no caso dos animais que possuem os eritrócitos nucleados, o volume celular é aumentado para acomodar seus núcleos celulares maiores (Benfey, 1999). A dimensão das células eritrocitárias e do seu núcleo em peixes triploides pode ser usado para avaliação de ploidia por ser significativamente maior que em peixes diploides (Fiske et al., 2019).

Embora promissor devido ao fato de serem considerados animais estéreis, o estado triploide frequentemente é relatado como prejudicial aos animais (Sutterlin et al., 1987; Sadler et al., 2000; Amoroso et al., 2016; Babaheydari et al., 2016). Em peixes triploides foram observadas alterações nos índices de eritrócitos, hemoglobina, glóbulos vermelhos e glóbulos brancos (Benfey 1999; Wang et al. 2010; Wlasow e Fopp-Bayat 2011; Fraser et al., 2012). A contagem total e diferencial de leucócitos e trombócitos são índices importantes para determinar a defesa inespecífica, pois são essenciais nas reações inflamatórias (Fukushima et al., 2012). Analisar os parâmetros sanguíneos é relativamente simples e é um excelente método para avaliar a saúde dos organismos aquáticos. COLOCAR REFERENCIA As análises hematológicas permitem monitorar o estado fisiológico do corpo, resposta ao estresse e o impacto do ambiente ou nutrição (Akrami et al. 2013). Por isso, é necessário conhecer até que ponto a presença de um conjunto extra de cromossomos pode resultar em efeitos deletérios à saúde.

Além das análises sanguíneas, a avaliação de parâmetros relacionados à saúde hepática pode contribuir para a compreensão do estado de saúde dos animais, devido ao fígado ser um órgão central, com inúmeras funções vitais do metabolismo básico dos vertebrados (Santos et al., 2018). O exame microscópico do fígado do peixe pode fornecer informações pertinentes à avaliação da saúde geral e pode revelar potencialmente a existência de doenças (Lamaziere et al., 2013).

Há uma escassez de informações sobre o uso da técnica de triploidização e quais consequências tal processo pode causar aos animais. Em um trabalho anterior desse grupo de pesquisa (Menezes et al., 2023, sob avaliação de revista) foi relatado que indivíduos triploides podem perder cromossomos e retornar ao estágio diploide. Desta forma, o objetivo deste trabalho é caracterizar indivíduos de tilápia do Nilo diploides, triploides e animais que perderam

o status triploide quanto às variáveis sanguíneas e desenvolvimento morfofisiológico do fígado, a fim de avaliar se a triploidia causa alterações nos animais ao nível hematológico e hepático.

## 6.2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Aquicultura da Escola de Veterinária (EV) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Brasil. Todos os procedimentos foram previamente aprovados pelo comitê de ética animal da UFMG sob o protocolo número 215/2021. Para a indução da triploidia, vinte e sete fêmeas ( $729 \text{ g} \pm 357$ ) e quinze machos ( $910 \text{ g} \pm 430$ ) do plantel tilápia do Nilo (linhagem Chitralada) do grupo de pesquisa NGTAqua (Nutrição, Genética e Tecnologia em Aquicultura) de EV/UFMG foram mantidas separadas em dois tanques diferentes (volume útil de  $3,6 \text{ m}^3$  cada) em sistema de água clara. Esses animais foram alimentados com ração enriquecida com vitamina C conforme recomendação de Mataveli et al. (2018).

Quatro fêmeas que apresentavam papila genital aumentada e avermelhada e região ventral curvada (“pronta para desovar”) foram escolhidas para reprodução induzida com gonadotrofina coriônica humana (hCG) (Vetecor, Laboratório Calier, Espanha) em dose única de 1 UI/grama do sexo feminino (Azevedo et al., 2021). Após 24 horas, as fêmeas induzidas foram extrusadas para obtenção de seus oócitos que foram fertilizados por sêmen coletado de três machos (os oócitos de cada fêmea foram fertilizados por  $0,6^{-1} \text{ mL}$  de sêmen). Após a fertilização a seco, foram adicionados 10 mL de água do sistema de incubação de ovos. O volume total de desova de cada fêmea foi dividido em dois lotes e, após 4 minutos, um lote foi submetido a um choque térmico de 4 minutos em água a  $41^\circ\text{C}$  (Pradeep, 2010). Em seguida, os ovos tratados e controle foram transferidos para uma incubadora artificial ( $28^\circ\text{C}$ ). Antes da distribuição dos ovos, uma amostra aleatória de 1,0 mL de ovos foi obtida, fixada em solução de Bouin e usada para medir a produção de ovos ( $\text{ovos} \cdot \text{mL}^{-1} \times \text{volume total de ovos}$ ) e o número aproximado de ovos por grupo de tratamento ( $\text{ovos} \cdot \text{mL}^{-1} \times \text{volume de ovos distribuídos em cada grupo de tratamento}$ ). O número de larvas também foi medido após a absorção do saco vitelino para determinar a taxa de sobrevivência dos ovos eclodidos. As tilápias foram mantidas em sistema fechado de produção até a fase adulta. O período de larvicultura foi realizado em sistema de recirculação de água e a engorda em sistema de bioflocos.

Os peixes foram alimentados com ração comercial com 55% de proteína bruta (Propescado-Nutriave Foods, Brasil), iniciando com uma taxa de arraçoamento diária de 20%

da biomassa e uma frequência alimentar de oito vezes ao dia, segundo Kubitzka (2000). A granulometria, o nível de proteína da dieta e a frequência alimentar foram ajustados para o crescimento da tilápia segundo o mesmo autor.

A qualidade da água foi avaliada duas vezes por semana. Os parâmetros medidos com equipamento digital foram temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ), pH e salinidade ( $\%$ ). Alcalinidade ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ), nitrogênio amoniacal total (TAN) e nitrogênio nítrico ( $\text{N-NO}_2^-$ ) foram medidos de acordo com os protocolos da APHA (2012), UNESCO (1983) e Bendschneider e Robinson (1952), respectivamente. O nitrato de nitrogênio ( $\text{N-NO}_3^-$ ) foi quantificado pela metodologia aplicada por Monteiro et al. (2003).

Durante o período em que os animais foram criados em sistemas de bioflocos, foi utilizado açúcar comercial (50% de carbono) como fonte adicional de carbono. A quantidade de açúcar adicionado ao sistema foi calculada usando uma relação C:N de 6:1 com base na concentração de TAN de acordo com Ebeling et al. (2006). Os sólidos sedimentares (SS) foram medidos quando os animais estavam em um sistema de bioflocos, com um cone Imhoff de 1 L após sedimentação por 15 min. As médias dos parâmetros de qualidade da água ficaram dentro dos limites recomendados para tilápia (Tabela 1).

Quando as tilápias atingiram 85 dias pós-absorção do saco vitelino, foram anestesiadas por imersão em água com solução de eugenol (5% -  $1 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$  de água) e identificadas por tags Passive Integrated Transponder (PIT). Em seguida, dez  $\mu\text{L}$  de sangue foram coletados e processados conforme Alvarenga et al. (2020). As amostras foram armazenadas em geladeira a  $4^{\circ}\text{C}$  até a análise. A determinação da ploidia foi realizada conforme descrito por Herbst (2002). Uma estimativa do número de células foi obtida pela contagem de eritrócitos  $\times$  microlitros $^{-1}$ . A quantidade ideal para a análise citométrica é de  $10^5$  -  $10^6$  células  $\times$  microlitros $^{-1}$ . Amostras de sangue também foram coletadas ao final do experimento (peixe adulto, 300 dias) para reavaliar a ploidia e avaliar a estabilidade cromossômica.

A citometria foi realizada no Instituto de Biociências-UNESP, Botucatu, Brasil. As amostras de sangue foram centrifugadas por 8 min a 300 g, o sobrenadante foi descartado e adicionado 1 ml de solução salina biferificada com fosfato (PBS) ( $\text{NaCl}$  0,8%,  $\text{KCl}$  0,02%,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,144%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,024%) e as células sanguíneas foram ressuspensas em 1 ml de PBS e, em seguida, centrifugado por 8 min a 300 g. O sobrenadante foi descartado. As células sanguíneas foram ressuspensas em 1 mL de solução marcadora de núcleos celulares (1 mL de Triton X-100, 0,2 mg de RNase,  $0,02 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  de iodeto de propídio (PI) em PBS). A aquisição de dados foi realizada no citômetro de fluxo FacsCantotmii (BD Biosciences) com o software

Facsdiva (BD Biosciences). Dez mil eventos foram adquiridos por amostra. As portas foram estabelecidas com base nos parâmetros tamanho (FSC) e granularidade (SSC) e posteriormente fluorescência PI. Células de amostra de sangue vermelho de uma conhecida tilápia diploide foram usadas como controle interno.

As medidas de conteúdo de DNA de indivíduos controle (diplóides) foram comparadas com aquelas que receberam tratamento térmico. Os peixes foram classificados como diploides (resultados da citometria de fluxo iguais ao controle diploide), aneuploides (pico do histograma ligeiramente deslocado para a esquerda em comparação com o pico do histograma do controle diploide), triploide (pico do histograma movido para a direita em relação ao pico do histograma do controle diploide), conforme descrito por Zhang e Arai (1996). Os resultados foram analisados pelo software Flowjo®.

Quando os animais obtiveram peso médio de 353g, aos 378 dias, foram anestesiados em solução de eugenol (5% - 1 mL · L<sup>-1</sup> de água) e foi feita coleta de sangue via punção caudal utilizando seringas de 3 mL e agulhas de 25 × 7 mm previamente heparinizadas. O sangue foi colocado em microtubos de 2 mL e sob refrigeração a 4 °C até a realização das análises hematológicas. O hematócrito (%) foi determinado pelo método do micro hematócrito, onde os microcapilares foram preenchidos em dois terços com o sangue total e, em seguida, foram transferidos para centrífuga de micro hematócrito, onde foram centrifugados a 12000 rpm por cinco minutos. A porcentagem de células vermelhas foi determinada pela leitura na régua de micro hematócrito (Goldenfarb et al., 1971).

A concentração de hemoglobina total (g · dL<sup>-1</sup>) foi determinada pelo método de cianometahemoglobina em espectrofotômetro com leitura em comprimento de onda de 540 nm, utilizando o reagente de Drabkin. Com auxílio de microscópio de luz, com aumento de 40 X, foi realizada a contagem total de eritrócitos em câmara de Neubauer (número de eritrócitos x 10<sup>6</sup> µL de sangue<sup>-1</sup>). Em seguida, com os resultados da hemoglobina (Hb), número total de eritrócitos (Er) e hematócrito (Ht) foram calculados os seguintes índices hematimétricos absolutos:

$$\text{Volume corpuscular médio – VCM (fL)} = (\text{Ht/Er}) \times 10$$

$$\text{Hemoglobina corpuscular média – HCM (pg)} = (\text{Hb/Er}) \times 10$$

$$\text{Concentração de hemoglobina corpuscular média – CHCM (g dL}^{-1}\text{)} = (\text{Hb/Ht}) \times 100$$

Esfregaços de sangue foram feitos dentro de 15 minutos após a coleta da amostra, corados com MGGW (May-Grunwald; Giemsa; Wrigth) e usados para determinar a contagem de leucócitos e trombócitos, a diferencial absoluta de leucócitos e estimativas do tamanho das



células (Ranzani -Paiva et al., 2013). Para medição dos tamanhos dos eritrócitos e seus núcleos foram produzidas fotos das lâminas em microscópio de luz Olympus IX70® com câmera acoplada. Trinta células de cada lâmina de sangue dos indivíduos foram selecionadas para medição dos diâmetros maior e menor dos eritrócitos e seus núcleos (Benfeyet e Sulterline 1984). A medição foi feita com ajuda do software ImageJ® sendo a escala calibrada com a régua padrão do microscópio para o aumento utilizado no momento da foto. A área de superfície (S) celular e nuclear e volume (V) celular e nuclear foram calculados usando a fórmula abaixo sugerida por Lemoine e Smith (1980):

$$S = a \times b \times \pi / 4$$

$$V = (a / 2) \times (b / 2) 2\pi \times 4/3$$

Onde: a é o maior e b é o menor eixo da célula ou núcleo.

Após a coleta do sangue, os peixes foram eutanasiados, seguida de evisceração, com separação do fígado e pesagem dele para cálculo do índice hepatossomático [IHS (%) = (peso do tecido hepático  $\times$  peso corporal<sup>-1</sup>)  $\times$  100]. Fragmentos da região mediana do fígado foram coletados e fixados em líquido de Bouin (12-24h) e transferidos para álcool 70%. Foi realizado o processamento histológico de rotina envolvendo os processos de desidratação em séries alcoólicas de concentração crescente, diafanização em xilol e inclusão do tecido em parafina. Os blocos foram submetidos à microtomia para obtenção de cortes com 2  $\mu$ m de espessura. As lâminas foram coradas com corante HE (hematoxilina-eosina) conforme Luna (1968) e Bernet et al. (1999). Foram analisados três cortes histológicos do fígado em duplicatas por animal à procura das seguintes alterações histopatológicas: hepatócitos com vacuolização citoplasmática indicativa de acúmulo de glicogênio ou de lipídeo, necrose focal, infiltrado leucocitário discreto, hepatócitos em apoptose, agregados melanomacrofágicos, inclusões amarelo-amarronzadas no citoplasma do hepatócito, inclusões eosinofílicas, capilares sinusóides dilatados, alterações nucleares dos hepatócitos, foco de alteração celular vacuolizado e áreas de hemorragia. As lesões foram qualificadas e quantificadas em scores: 0 - sem acometimento, 1 - pouco acometido, 2 - acometido, 3 - muito acometido. Para medição dos tamanhos dos núcleos dos hepatócitos foram realizadas fotos das lâminas em microscópio de luz Olympus IX70® com câmera acoplada. Trinta núcleos dos hepatócitos de cada lâmina foram selecionados para medição dos diâmetros maior e menor. A medição foi feita com ajuda do software ImageJ® sendo a escala calibrada com a régua padrão do microscópio para o aumento utilizado no momento da foto. A área de superfície (S) e volume (V) nuclear foram calculados como anteriormente descrito para os eritrócitos.

Antes da primeira análise de ploidia, a comparação foi feita entre dois grupos: controle (que não recebeu tratamento) e choque térmico (que recebeu tratamento de choque térmico). Após a primeira citometria, os indivíduos foram separados em três grupos: controle, grupo tratado não triploide (que recebeu choque térmico, mas não teve alteração na ploidia) e triploide. Não foram utilizados indivíduos que após a primeira citometria foram classificados como aneuploides. Para análise estatística, as variáveis foram analisadas quanto à normalidade (teste de Shapiro-wilks) e homocedasticidade (teste de Bartlett) usando o software R (R Core Team, 2020). As que atenderam a esses pressupostos da ANOVA foram submetidas a ela, seguida do teste de Tukey (CV até 15%) e teste de Duncan (CV de 15% a 30%). Para os dados que as suposições não atenderam, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. O nível de significância foi  $p < 0,05$ .

### 6.3.RESULTADOS

Os índices hematimétricos dos animais submetidas ou não a choque térmico para indução de triploidia estão apresentados na Tabela 6. Hematócrito, hemoglobina, volume corpuscular médio e concentração de hemoglobina corpuscular média não apresentaram diferenças estatísticas ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos. A contagem de eritrócitos foi maior ( $p < 0,05$ ) no grupo controle. A hemoglobina corpuscular média foi maior no grupo dos animais que perderam o status triploide e menor no grupo controle ( $p < 0,05$ ).

Os resultados de área da célula, volume da célula, largura do citoplasma, comprimento do citoplasma, relação área  $\times$  volume do citoplasma<sup>-1</sup>, área do núcleo, volume do núcleo, largura do núcleo e comprimento do núcleo dos eritrócitos estão apresentados na Tabela 7. A área, o volume e comprimento do citoplasma<sup>-1</sup> foram maiores no tratamento tratado não triploide (Figura 4). A largura e a relação área  $\times$  volume do citoplasma não apresentou diferenças entre os tratamentos. A área, volume, largura e comprimento nuclear foram maiores nos animais do tratamento tratado não triploide, seguido de animais que perderam o status triploides e os menores valores foram encontrados no tratamento controle.

Os resultados de contagens totais e diferenciais das células sanguíneas são apresentados na Tabela 8. A contagem total de trombócitos não apresentou diferenças estatísticas entre os tratamentos e a contagem de leucócitos foi maior em animais do tratamento controle quando comparada aos animais que perderam o status triploide. A contagem diferencial de linfócitos teve o mesmo comportamento, em que o tratamento controle foi maior que o tratamento de animais que perderam o status triploide. A contagem diferencial de neutrófilos, basófilos,

eosinófilos e monócitos não apresentou diferenças estatísticas entre os tratamentos e não foram encontrados eosinófilos em nenhum dos tratamentos.

O índice hepatossomático não apresentou diferença entre os tratamentos animais que perderam o status triploide (2,08), tratado (1,81) e controle (1,87), e o confirmado triploide (2,60). A partir dos cortes histológicos do fígado foram mensurados os comprimentos dos diâmetros dos núcleos dos hepatócitos e foi calculado a área e o volume nuclear do hepatócito e estão apresentados na Tabela 4. O tratamento dos animais que perderam o status triploide apresentou maior ( $p < 0,05$ ) área e volume nuclear que o tratamento tratado e controle (Figura 5).

As alterações histopatológicas encontradas no tecido hepático estão apresentadas na Tabela 9, e nenhuma das lesões, exceto alterações nucleares dos hepatócitos, apresentaram diferenças estatísticas entre os tratamentos. Não foram encontradas áreas de necrose, hepatócitos em apoptose, inclusões eosinofílicas, presença de parasitas e áreas de hemorragia. Para ilustração as lâminas foram fotografadas e as principais lesões encontradas estão apresentadas na Figura 6.

#### **6.4.DISSCUSSÃO**

A estimativa de vários parâmetros sanguíneos pode revelar o estado de saúde dos peixes mediante desvios das funções fisiológicas normais. Apenas um indivíduo manteve o estado triploide na fase adulta (confirmado triploide, não considerado nas análises estatísticas), e nele podemos observar que, numericamente, o valor do hematócrito é menos que a metade que nos demais grupos. Segundo Benfey (1999), existe um mecanismo homeostático que parece compensar o aumento do volume celular pela diminuição proporcional do número de células. Pode-se considerar que o estágio de triploidia pode ser considerado um fator estressante para as células que necessitam de armazenar um conjunto a mais de cromossomos. Boutilier e Shelton (1986) relatam que em condições de estresse, há maior recrutamento de eritrócitos jovens por parte dos órgãos eritropoiéticos, isso por causa do aumento da demanda de oxigênio pelos tecidos. Os mesmos autores também relatam que o aumento do número de eritrócitos torna o sangue mais viscoso, por essa causa o aumento do número de eritrócitos para melhorar o transporte de oxigênio é limitado. Desta forma, isso explica não ter sido encontrada diferença nos hematócritos entre as amostras de sangue dos diferentes grupos.

O aumento no tamanho dos eritrócitos pode resultar em diminuição no número dessas células, como estratégia adaptativa do tecido hematopoiético afim de manter a viscosidade do

sangue, que sofre alterações com a variação da concentração de eritrócitos (Carvalho et al., 2017). Devido ao maior tamanho e menor quantidade das células de indivíduos triploides, supõe-se que há também uma maior concentração de hemoglobina nas células para garantir o adequado transporte de oxigênio para os tecidos.

Foi observado uma diminuição de eritrócitos em animais que inicialmente eram triploides. Os eritrócitos são a forma mais significativa de quantificar a eficiência do transporte de oxigênio do sistema respiratório para os tecidos e alterações em seu número e volume podem influenciar o desempenho metabólico (Hlavova, 1993; Holland e Forster, 1966). Entretanto, foi observado por Sadler et al. (2000) que o salmão do Atlântico triploide possuía uma menor quantidade de eritrócitos e que tinha uma capacidade de transporte de oxigênio muito semelhante à dos diploides. Da mesma forma que Benfey e Sutterlin (1984) relataram que não houve diferença no consumo de oxigênio entre Salmão diploide e triploide, e que provavelmente os animais compensaram pela frequência respiratória aumentada. A triploidia levou a uma diminuição no número de eritrócitos como o esperado pelo aumento do tamanho dos eritrócitos e existe a hipótese que essa diminuição na quantidade de eritrócitos seja um mecanismo homeostático dos triploides para compensar o aumento do volume celular, causado pela acomodação de material genético extra, para manter a viscosidade sanguínea igual mesmo com o tamanho celular aumentado. Levy-Pereira et al. (2021) observaram que tanto a hematologia quanto a morfometria dos eritrócitos triploides indicaram aumento do tamanho das células com diminuição do número de células. Este aspecto hematológico de eritrócitos maiores e em menor quantidade é coerente com os achados para outras espécies e explica a falta de diferença no hematócrito (Benfey, 1999). O grupo de peixes tratado não-triploide, que consistia em indivíduos submetidos ao choque por calor, mas não se tornaram triploides, juntamente com os animais que perderam o status triploide, apresentaram diferença nos parâmetros hematológicos. Uma hipótese a ser levantada para justificar tal fato é que talvez o tratamento para induzir a triploidia cause essas alterações e não o fato desses indivíduos ter um conjunto a mais de cromossomos.

A concentração de hemoglobina não apresentou diferença entre os tratamentos e essa variável é crucial para a distribuição de oxigênio necessário para processos metabólicos (Benfey, 1999). Contudo, a hemoglobina corpuscular média (HCM) foi maior em animais que perderam o status triploide que podemos associar ao tamanho aumentado dos eritrócitos. Volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) não tiveram diferença entre diploide e triploides, e tal semelhança pode ser explicada

pelo fato que o volume de toda a célula aumenta com a triploidia, o que está associado à redução do número de células do animal (Ihssen et al., 1990; Benfey, 1999). Isso foi encontrado por Sezaki et al. (1991) e Gao et al. (2007), com kinguio e dojô, respectivamente, em que os valores médios de VCM e CHCM não aumentaram significativamente com o aumento do nível de ploidia.

O aumento do tamanho nuclear dos eritrócitos em triploides é uma consequência do maior conteúdo de DNA (Benfey, 1999). Em peixes teleósteos, pode-se utilizar os eritrócitos para a determinação da ploidia pois o sangue é de fácil coleta, as células são nucleadas e os núcleos têm uma forma geométrica elipsoide, permitindo ser medida com exatidão em programas de análise de imagens (Bencsik et al., 2013; Lahnsteiner e Kletzl, 2018). Após a calibração de valores conhecidos de área e volume celular de indivíduos confirmadamente triploides, esses resultados fornecem intervalos numéricos para identificação da triploidia sem a necessidade de comparação diploide. O aumento do tamanho dos eritrócitos em indivíduos triploides já foi relatado e a medição da dimensão dessa célula foi proposta como um método rápido e barato para determinação da ploidia (Benfey, 1984; Garcia- Abiado et al., 1999; Jayaprasad et al., 2011).

Um aspecto importante do aumento do volume nuclear e/ou celular em peixes triploides é a diminuição da relação entre área de superfície e volume. Deve-se observar as alterações no metabolismo basal das células especialmente nos processos fisiológicos mediados pela membrana plasmática dessas células em organismos que tiveram alterações na ploidia devido à alteração na relação área superficial/volume celular. Isso pode afetar alguns processos limitados pela área de superfície, como as trocas de nutrientes e metabólitos, trocas iônicas passivas e ativas e ligação de hormônios e outros mensageiros à membrana. Devido à diminuição do número de células, essa proporção diminuída de superfície para volume também se aplica a tecidos e órgãos (Benfey, 1999).

A contagem total e diferencial de leucócitos e trombócitos são índices importantes para determinar a defesa inespecífica, pois são essenciais nas reações inflamatórias (Fukushima et al., 2012). Os trombócitos além das funções hemostáticas também possuem funções fagocíticas envolvidas na regulação imunológica (Nagasawa et al., 2014). A quantidade de trombócitos pode ser um indicativo da capacidade de coagulação do sangue, e o valor observado neste estudo está dentro do esperado para a tilápia (Hrubic et al., 2000). Lahnsteiner e Kletzl (2018), estudando trutas triploides, não observaram efeitos negativos da triploidização no número de trombócitos. A diminuição do número de leucócitos nos indivíduos triploides observada neste

trabalho corrobora com Benfey e Biron (2000), Budiño et al. (2006) e Fukushima et al. (2012) trabalhando com truta arco-íris, pregado e jundiá, respectivamente. Os neutrófilos e monócitos de teleósteos são um tipo de leucócitos diferenciados terminalmente que evoluíram de modo a proteger o animal e montar respostas contra patógenos invasores. De todos os leucócitos recrutados para um local inflamatório, os neutrófilos são os primeiros a serem mobilizados (Havixbeck et al., 2016). Os linfócitos também participam do processo inflamatório, atuando como células imunocompetentes. No presente estudo verificou-se uma diminuição significativa dessas células no sangue de tilápia triploide, que perderam o status triploide e submetidas ao choque, assim como o encontrado por Fukushima et al. (2012) com jundiá. Esses autores associam tal fato a um aumento significativo nos neutrófilos e monócitos circulantes, provavelmente mantendo seu sistema de defesa mais preparado para condições adversas de criação. Não encontramos eosinófilos, assim como Gao et al. (2007). Eosinófilos e basófilos normalmente ocorrem em baixo número no sangue de peixes (Fukushima et al., 2012).

Neste estudo não se observou diferenças entre IHS para tilápias que perderam o status triploides e diploides, assim como o encontrado por Kızak et al. (2013). Não foi observado diferenças nas alterações hepáticas, o que pode ser atribuído ao fato do fígado ser um órgão que tem capacidade incomparável de regeneração após exposição a fatores de dano hepático (Al-Okbi et al., 2017; van de Laarschot et al., 2016). Quando o peixe se encontra bem alimentado, os hepatócitos armazenam quantidades significativas de glicogênio e processam grande quantidade de lipídios (Santos et al., 2018). Peixes de cativeiro tendem a ter os hepatócitos moderado a fortemente vacuolizados devido ao armazenamento de reservas de carboidratos ou lipídeos que indicam um excesso de energia em relação às demandas físicas do cativeiro (Gingerick, 1982; Ferguson, 1989). Observamos presença de agregados melanomacrofágicos e estes estão constitutivamente presentes em órgãos como o rim, baço e fígado e são compostos principalmente por macrófagos histiocíticos e podem não ser influenciados por exposições tóxicas ou degradação ambiental (Wolf et al., 2015). As inclusões citoplasmáticas podem representar uma variedade de constituintes potenciais e muitas vezes é associado à idade dos animais (Strnad et al., 2011) o que pode explicar a pouca aparição desta lesão no fígado dos animais em estudo. A presença de sinusóides dilatados cheios de sangue (possível congestão) foi encontrado em baixa frequência nos animais deste estudo e deve ser interpretado com cautela, pois a aparência de congestão pode ser simulada pelo manuseio de artefatos durante a coleta de tecido (Wolf et al., 2015). As alterações nucleares aqui relatadas condizem com os achados em área e volume celular e nuclear aumentado dos indivíduos triploides. Não foi

relatado infiltrados leucocitários que é um resultado benéfico que representa a ausência de respostas potenciais a danos celulares, estimulação imunológica e/ou distúrbios fisiológicos (Wolf e Wheeler, 2018).

Os eritrócitos dos peixes triploides são de tamanho maior em relação aos peixes diploides, isso devido a maior quantidade de material genético nessas células. Além disso, a triploidia diminui o número de leucócitos e essa diferença pode afetar a atividade celular e a resposta dos peixes às condições de criação e eventuais infecções. Com isso, a avaliação de lâmina de esfregaço sanguíneo apresenta uma possibilidade prática e de baixo custo para a identificação da triploidia em tilápias do Nilo. Não foram observadas alterações histopatológicas significativas nas amostras de fígado em nenhum dos tratamentos. Assim, pode-se afirmar que a indução da triploidia não causa lesões e alterações histopatológicas no tecido hepático de tilápias do Nilo.

## ANEXO III - TABELAS

Tabela 6 – Índices hematimétricos (média e coeficiente de variação (CV) e medianas (mín – máx)) de tilápias do Nilo submetidas ou não a choque térmico para indução de triploidia

Parâmetro	Triploides confirmados*	Animais que perderam o status triploide	Tratados não-triploides	Controle	CV (%)
Hematócrito (%) <sup>1</sup>	13,00	27,75	23,65	24,95	23,79
Hemoglobina (g,dL <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	7,23	9,18	7,97	8,38	18,52
Eritrócitos (10 <sup>6</sup> , µl <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	1,38	1,88 <sup>b</sup>	1,95 <sup>b</sup>	2,38 <sup>a</sup>	18,3
VCM (fl) <sup>1</sup>	94,20	148,47	126,63	106,14	-
HCM (pg) <sup>3</sup>	52,37	49,38 <sup>a</sup>	41,67 <sup>b</sup>	35,57 <sup>b</sup>	-
CHCM (g,dL <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	55,60	36,98	36,74	33,87	-

\* Apenas um indivíduo, portanto não incluído nos cálculos estatísticos, VCM = Volume corpuscular médio (fl); HCM = hemoglobina corpuscular média (pg); CHCM = Concentração hemoglobina corpuscular média (g,dL<sup>-1</sup>),

<sup>1</sup> Médias não diferem entre si ao nível de significância de 5%,

<sup>2</sup> Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de significância de 5%,

<sup>3</sup> Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Kruskal-Wallis,

Tabela 7– Morfometria eritrocitária de tilápias do Nilo submetidas ou não a choque térmico para indução de triploidia

Parâmetros	Triploides confirmados*	Animais que perderam o status triploide	Tratados não-triploides	Controle	CV (%)
Área do citoplasma (µm <sup>2</sup> ) <sup>1</sup>	103,96 (83,73 - 129,29)	72,79 <sup>a</sup> (47,43 - 108,65)	76,04 <sup>b</sup> (45,19 - 115,18)	72,11 <sup>a</sup> (54,80 - 96,43)	-
Volume do citoplasma (µm <sup>3</sup> ) <sup>1</sup>	277,23 (223,28 - 344,78)	194,10 <sup>a</sup> (126,48 - 289,72)	202,78 <sup>b</sup> (120,51 - 307,14)	192,28 <sup>a</sup> (146,14 - 257,14)	-
Relação área/volume citoplasma <sup>2</sup>	0,38	0,38	0,38	0,38	-
Largura do citoplasma (µm) <sup>2</sup>	9,40 (7,87 - 11,37)	8,25 (7,64 - 9,21)	8,31 (7,43 - 9,34)	8,28 (7,87 - 8,84)	-
Comprimento do citoplasma (µm) <sup>3</sup>	14,39	11,30 <sup>a</sup>	11,64 <sup>b</sup>	11,16 <sup>a</sup>	8,70
Área nuclear (µm <sup>2</sup> ) <sup>1</sup>	16,90 (12,22 - 23,61)	12,65 <sup>b</sup> (7,37 - 28,96)	14,49 <sup>c</sup> (6,21 - 31,22)	11,39 <sup>a</sup> (5,80 - 20,06)	-
Volume nuclear (µm <sup>3</sup> ) <sup>1</sup>	45,07 (32,58 - 62,96)	33,73 <sup>b</sup> (19,65 - 77,23)	38,64 <sup>c</sup> (16,55 - 83,25)	30,38 <sup>a</sup> (15,48 - 53,49)	-
Largura nuclear (µm) <sup>1</sup>	3,32 (2,65 - 4,83)	3,31 <sup>b</sup> (2,96 - 4,29)	3,45 <sup>c</sup> (2,87 - 4,22)	3,06 <sup>a</sup> (2,61 - 3,28)	-
Comprimento nuclear (µm) <sup>1</sup>	6,19 (5,28 - 8,19)	5,04 <sup>b</sup> (4,58 - 6,11)	5,36 <sup>c</sup> (4,84 - 6,17)	4,78 <sup>a</sup> (4,48 - 5,09)	-

\* Apenas um indivíduo, portanto não incluído nos cálculos estatísticos,

<sup>1</sup> Medianas seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ao nível de significância de 5%,

<sup>2</sup> Medianas não diferem entre si ao nível de significância de 5%,

<sup>3</sup> Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%,

Tabela 8 - Valores médios da contagem total de leucócitos (ou glóbulos brancos), trombócitos e contagem diferencial de leucócitos em tilápias do Nilo submetidas ou não a choque térmico para indução de triploidia

Parâmetros	Triploides confirmados*	Animais que perderam o status triploide	Tratados não-triploides	Controle	CV (%)
Contagem de trombócitos total (µL <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	0,00	11420,83	27793,93	28239,64	76,76
Contagem de leucócitos total (µL <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	14490,00	33416,25 <sup>a</sup>	49101,43 <sup>ab</sup>	77639,29 <sup>b</sup>	55,25



Contagem diferencial de leucócitos					
Neutrófilos ( $\mu\text{L}^{-3}$ ) <sup>1</sup>	0,00	36,75	238,39	72,05	144,39
Linfócitos ( $\mu\text{L}^{-3}$ ) <sup>2</sup>	14200,20	32050,21 <sup>a</sup>	47379,26 <sup>ab</sup>	75195,17 <sup>b</sup>	56,10
Basófilos ( $\mu\text{L}^{-3}$ ) <sup>3</sup>	0,00 (0,00 – 0,00)	160,80 (0,00 – 540,00)	130,50 (0,00 – 676,81)	0,00 (0,00 – 559,94)	-
Eosinófilos ( $\mu\text{L}^{-3}$ ) <sup>3</sup>	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 213,33)	0,00 (0,00 – 0,00)	-
Monócitos ( $\mu\text{L}^{-3}$ ) <sup>1</sup>	289,80	1133,83	1238,34	2177,15	74,33

\* Apenas um indivíduo, portanto não incluído nos cálculos estatísticos,

<sup>1</sup> Médias não diferem entre si ao nível de significância de 5%,

<sup>2</sup> Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de significância de 5%,

<sup>3</sup> Medianas não diferem entre si ao nível de significância de 5%,

Tabela 9 –Relação área e volume nuclear dos hepatócitos de tilápias do Nilo submetidas ou não a choque térmico para indução de triploidia

Parâmetros	Triploides confirmados*	Animais que perderam o status triploide	Tratados não-triploides	Controle
AH ( $\mu\text{m}^2$ ) <sup>1</sup>	34,20 (14,36 – 43,29)	18,02 <sup>b</sup> (10,19 – 38,85)	13,26 <sup>a</sup> (05,51– 22,68)	13,17 <sup>a</sup> (6,35– 25,49)
VH ( $\mu\text{m}^3$ ) <sup>1</sup>	91,20 (38,28 – 115,44)	48,05 <sup>b</sup> (27,18 – 103,60)	35,36 <sup>a</sup> (14,70 – 60,47)	35,12 <sup>a</sup> (16,94 – 67,97)

\* Apenas um indivíduo, portanto não incluído nos cálculos estatísticos, AH = Área do núcleo do hepatócito, VH = Volume do núcleo do hepatócito

<sup>1</sup> Medianas seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis,

Tabela 10 –Quantificação em scores (0 - sem acometimento, 1 – pouco acometido, 2 – acometido, 3 – muito acometido) de lesões hepáticas em tilápias do Nilo submetidas ou não a choque térmico para indução de triploidia

Parâmetros	Triploides confirmados*	Animais que perderam o status triploide	Tratados não-triploides	Controle
VL <sup>1</sup>	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)	1 (0 – 1)
VG <sup>1</sup>	3 (2 – 3)	3 (2 – 3)	3 (2 – 3)	3 (2 – 3)
AM <sup>1</sup>	2 (1 – 2)	2 (1 – 2)	2 (1 – 2)	2 (0 – 2)
IA <sup>1</sup>	1 (0 – 1)	1 (0 – 1)	1 (0 – 1)	1 (0 – 1)
CS <sup>1</sup>	2 (1 – 2)	2 (1 – 2)	2 (1 – 2)	2 (0 – 2)
AN <sup>2</sup>	3 (3 – 3)	2 <sup>a</sup> (2 – 2)	0 <sup>b</sup> (0 – 0)	0 <sup>b</sup> (0 – 0)
FV <sup>1</sup>	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)
IL <sup>1</sup>	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)

\* Apenas um indivíduo, portanto não incluído nos cálculos estatísticos, VL = Vacuolização hepatocelular do tipo lipídico, VG = Vacuolização hepatocelular do tipo glicogênio, AM= Agregado melanomacrofágico, IA = Inclusões amarelo-amarronzadas, CS = Capilares sinusóides dilatados, AN = Alterações nucleares de hepatócitos (núcleos aumentados), FV = Foco de vacuolização, IL = Infiltrados leucocitários,

<sup>1</sup>Medianas não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis,

<sup>2</sup>Medianas seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis

## ANEXO IV – FIGURAS

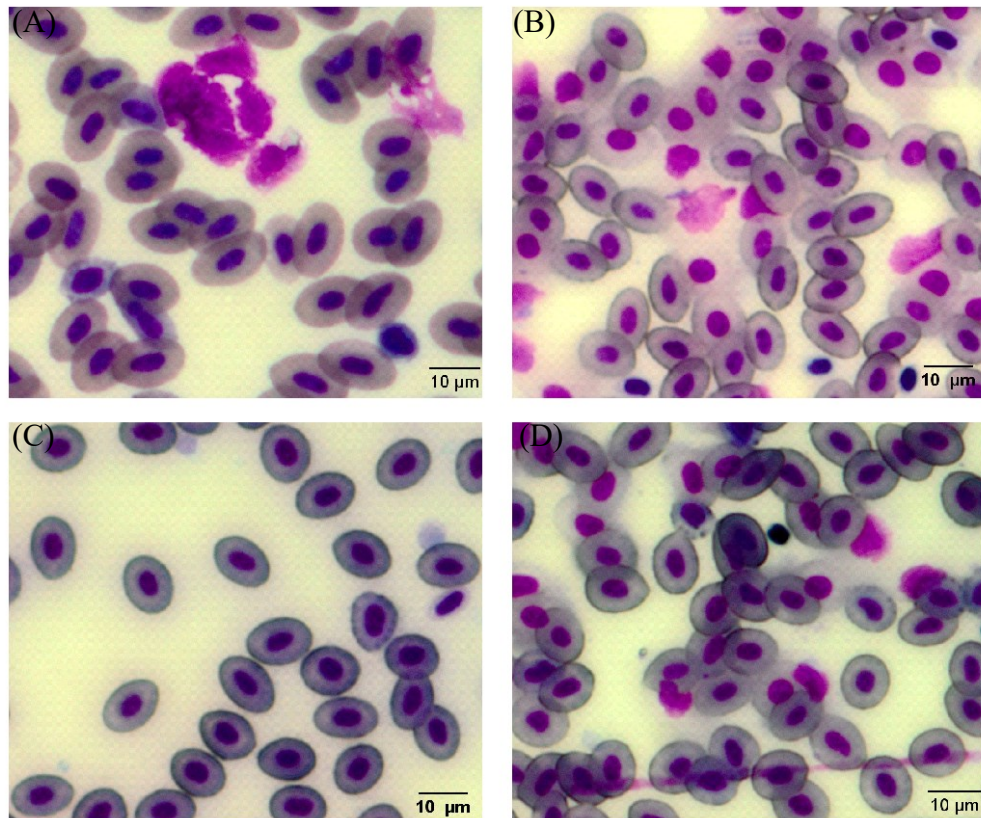


Figura 4 – Eritrócitos de tilápias do Nilo submetidas ou não a choque térmico para indução de triploidia, (A) indivíduos triploides, (B) indivíduos controle, (C) indivíduos que perderam o status triploide e (D) indivíduos submetidos ao choque não triploide,

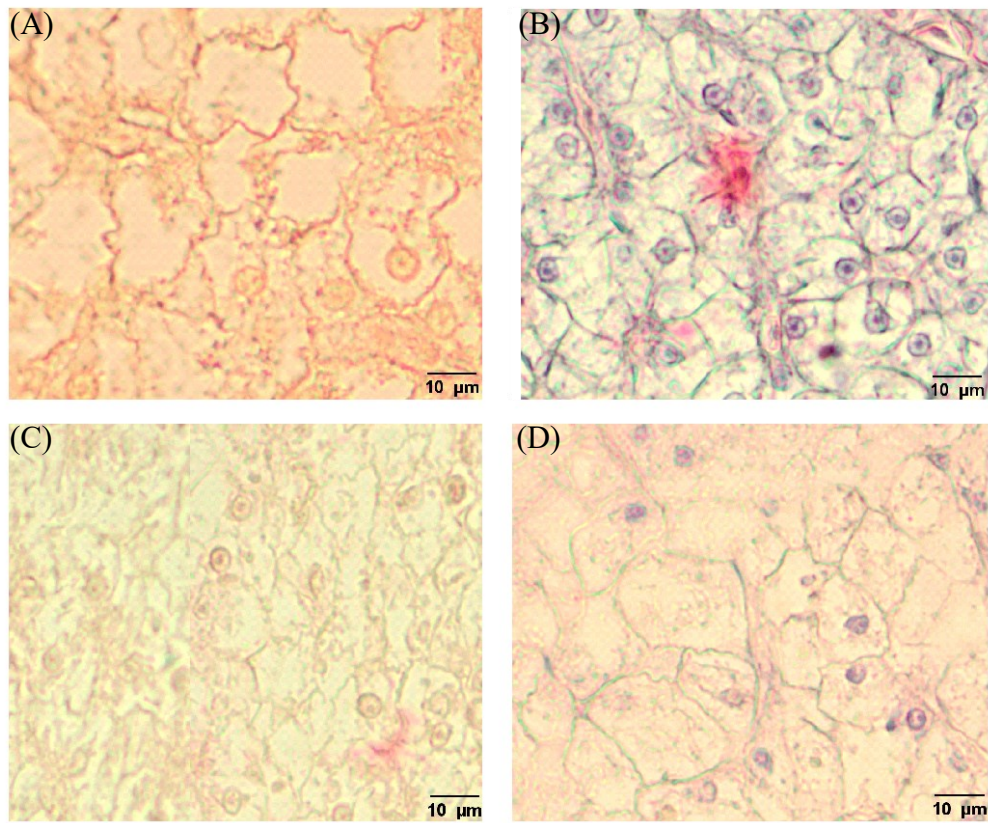


Figura 5– Hepatócitos de tilápias do Nilo submetidas ou não a choque térmico para indução de triploidia, (A) indivíduos triploides, (B) indivíduos controle, (C) indivíduos que perderam o status triploide e (D) indivíduos submetidos ao choque não triploide,



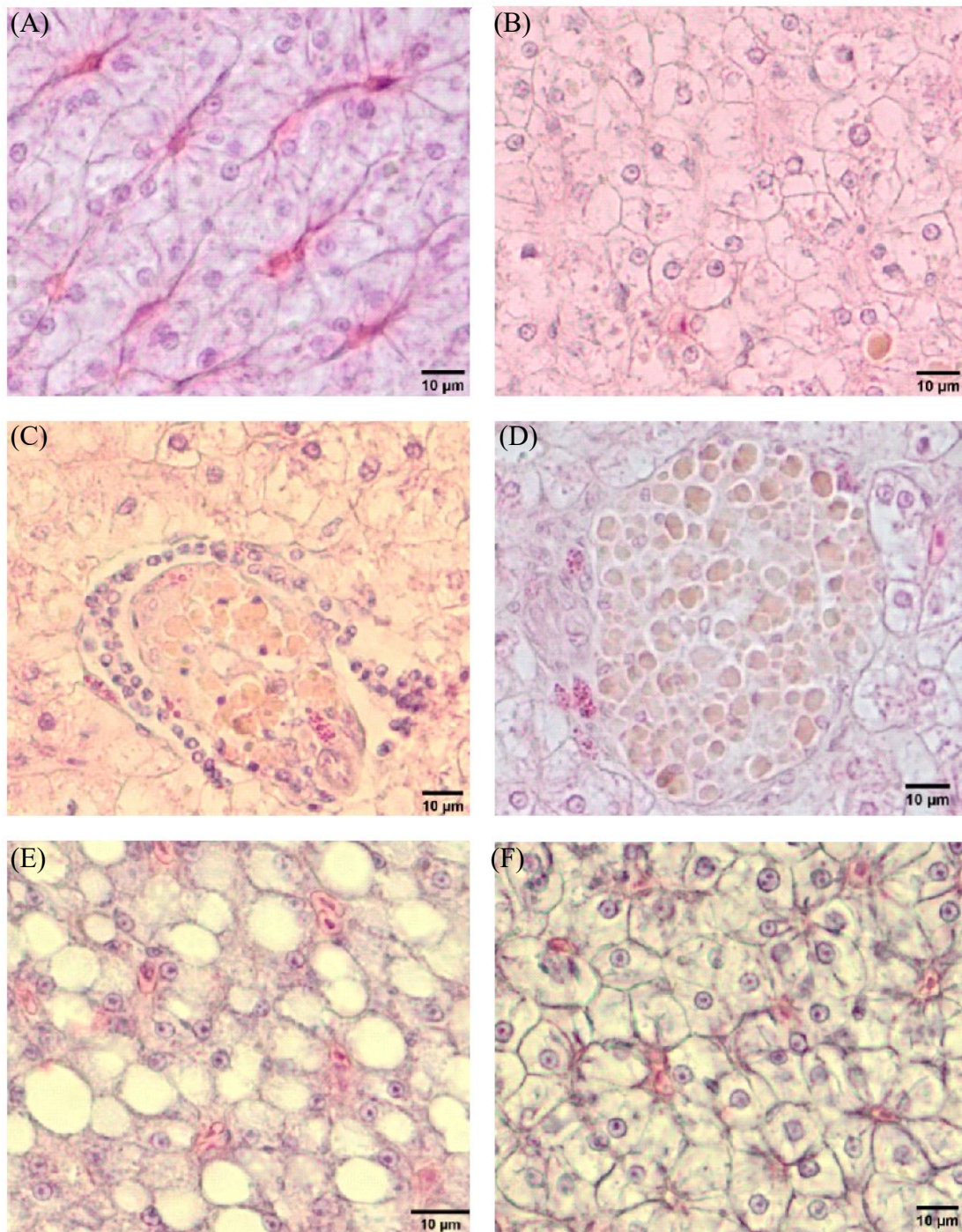


Figura 6 – Fotomicrografia do fígado de tilápia do Nilo, caracterizando as principais lesões hepáticas encontradas neste estudo, (A) Capilares sinusóides, (B) Inclusões amarelo-amarronzadas, (C) Infiltrado leucocitário e agregado melanomacrofágico, (D) Agregado melanomacrofágico, (E) vacuolização hepatocelular do tipo lipídico (claro, esférico) e (F) vacuolização hepatocelular do tipo glicogênio,

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akrami, R.,; Iri, Y.,; Rostami, H, K.,; Mansour, M, R, 2013, Effect of dietary supplementation of fructooligosaccharide (FOS) on growth performance, survival, lactobacillus bacterial population and hemato-immunological parameters of stellate sturgeon (*Acipenser stellatus*) juvenile, Fish Shellfish Immunol., 35(4), 1235-1239, <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.07.039>

Al-Okbi, S, Y.,; Mohamed, D, A.,; Hamed, T, E.,; Hussein, A.,; Fouda, K, 2017, Evaluation of Functional Foods for Prevention of Hepatorenal Syndrome in Rat Model, Res, J, Pharm, Biol, Chem, Sci., 8(2), 1202-1211,

Alvarenga, É. R., Fernandes, A. F. A., Lopes, L. R., Soares, T. E., de Oliveira Alves, G. F., da Costa, F. F. B., Sales, S. C. M., Lima, G. K., Turra, E. M., 2020. Attempt to produce a Nile tilapia tetraploid line by heat shock induction. Aquaculture, 529, 735647. doi: 10.1016/j.aquaculture.2020.735647

Amoroso, G.; Cobcroft, J. M.; Adams, M. B.; Ventura, T.; Carter, C. G. 2016. Concurrence of lower jaw skeletal anomalies in triploid Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) and the effect on growth in freshwater. Journal of fish diseases, 39(12), 1509-1521.

APHA - American Public Health Association. Standard methods for the examination of water and wastewater, 2012. 22nd. Rice, E.W.; Baird, R.B.; Eaton, A.D.; Clesceri, L.S. Washington, D.C.: American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, pp. 1496.

Babaheydari, S. B.; Keyvanshokoo, S.; Dorafshan, S.; Johari, S. A., 2016, Proteomic analysis of skeletal deformity in diploid and triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) larvae. Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics, 19, 1-7.

Bencsik, I.,; Pacala, N.,; Dumitrescu, G.,; Dronca, D.,; Stanculet, J.,; Petculescu-Ciochina, L, 2013, Triploidy determination in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) based on erythrocytes dimensions, J, Anim, Sci, Biotechnol., 46, 113-117,

Bendschneider, K., Robinson, R. J., 1952. A new spectrophotometric method for the determination of nitrite in sea water, pp.26.

Benfey, T, J, 1999, The physiology and behavior of triploid fishes, Rev, Fish, Sci, Aquac., 7(1), 39-67, <https://doi.org/10.1080/10641269991319162>

Benfey, T, J,; Biron, M, 2000, Acute stress response in triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brook trout (*Salvelinus fontinalis*), Aquaculture, 184(1-2), 167-176, [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00314-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00314-2)

Benfey, T, J,; Sutterlin, A, M, 1984, Triploidy induced by heat shock and hydrostatic pressure in landlocked Atlantic salmon (*Salmo salar* L.), Aquaculture, 36(4), 359-367, [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(84\)90328-4](https://doi.org/10.1016/0044-8486(84)90328-4)

Bernet, D,; Schmidt, H,; Meier, W,; Burkhardt-Holm, P,; Wahli, T, 1999, Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution, J, Fish Dis., 22(1), 25-34, <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.1999.00134.x>

Boutilier, R, G,; Shelton, G, 1986, Respiratory properties of blood from voluntarily and forcibly submerged *Xenopus laevis*, J, Exp, Biol., 121(1), 285-300,

Budd, A, M,; Banh, Q, Q,; Domingos, J, A,; Jerry, D, R, 2015, Sex control in fish: approaches, challenges and opportunities for aquaculture, , Mar, Sci, Eng., 3(2), 329-355, <https://doi.org/10.3390/jmse3020329>

Budiño, B,; Cal, R, M,; Piazzon, M, C,; Lamas, J, 2006, The activity of several components of the innate immune system in diploid and triploid turbot, Comp, Biochem, Physiol, Part A Mol, Integr, Physiol., 145(1), 108-113, <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.05.007>

Carvalho, C, S,; Utsunomiya, H, S, M,; Pasquoto, T,; Lima, R,; Costa, M, J,; Fernandes, M, N, 2017, Blood cell responses and metallothionein in the liver, kidney and muscles of bullfrog tadpoles, *Lithobates catesbeianus*, following exposure to different metals, Environ, Pollut., 221, 445-452,

Coward, K.; Bromage, N, R, 2002, Stereological point-counting; an accurate method for assessing ovarian function in tilapia, *Aquaculture*, 212(1-4), 383-401, [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00051-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00051-0)

Ebeling, J. M., Timmons, M. B., Bisogni, J. J., 2006. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia–nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture*, 257(1-4), 346-358. doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.03.019

Felip, A.; Piferrer, F.; Zanuy, S.; Carrillo, M, 2001, Comparative growth performance of diploid and triploid European sea bass over the first four spawning seasons, *J, Fish Biol.*, 58(1), 76-88, <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2001.tb00500.x>

Ferguson, H, W, 1989, *Systemic pathology of Fish, A text and atlas of comparative tissue responses in diseases of teleosts*, pp,263, Iowa State University Press,

Fiske, J, A,; Van Eenennaam, J, P,; Todgham, A, E,; Young, S, P,; Holem-Bell, C, E,; Goodbla, A, M,; Schreier, A, D, 2019, A comparison of methods for determining ploidy in white sturgeon (*Acipenser transmontanus*), *Aquaculture*, 507, 435-442, <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.03.009>

Fraser, T, W,; Fjellidal, P, G,; Hansen, T,; Mayer, I, 2012, Welfare considerations of triploid fish, *Rev, Fish, Sci, Aquac.*, 20(4), 192-211, <https://doi.org/10.1080/10641262.2012.704598>

Fukushima, H,; Bailone, R, L,; Weiss, L, A,; Martins, M, L,; Zaniboni-Filho, E, 2012, Triploidy in the hematology of jundia juveniles (*Siluriformes: Heptapteridae*), *Braz, J, Biol.*, 72, 147-151, <https://doi.org/10.1590/S1519-69842012000100017>

Gao, Z,; Wang, W,; Abbas, K,; Zhou, X,; Yang, Y,; Diana, J, S,; Sun, Y, 2007, Haematological characterization of loach *Misgurnus anguillicaudatus*: comparison among diploid, triploid and tetraploid specimens, *Comp, Biochem, Physiol, Part A Mol, Integr, Physiol.*, 147(4), 1001-1008, <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.03.006>

Garcia-Abiado, M, A, R.; Dabrowski, K.; Christensen, J, E.; Czesny, S.; Bajer, P, 1999, Use of erythrocyte measurements to identify triploid saugeyes, *N, Am, J, Aquac*, 61 (4), 319-325, [https://doi.org/10.1577/1548-8454\(1999\)061<0319:UOEMTI>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8454(1999)061<0319:UOEMTI>2.0.CO;2)

Gingerich, W. H. (1982). Hepatic toxicology of fishes. *Aquatic toxicology*, 1, 55-105.

Goldenfarb, P, B.; Bowyer, F, P.; Hall, E.; Brosious, E, 1971, Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination, *Am, j, clin, pathol.*, 56(1), 35-39, <https://doi.org/10.1093/ajcp/56.1.35>

Havixbeck, J, J.; Rieger, A, M.; Wong, M, E.; Hodgkinson, J, W.; Barreda, D, R, 2016, Neutrophil contributions to the induction and regulation of the acute inflammatory response in teleost fish, *J, Leukoc, Biol.*, 99(2), 241-252, <https://doi.org/10.1189/jlb.3HI0215-064R>

Herbst, E. C., 2002. Induction of tetraploidy in zebra fish *Danio rerio* and nile tilapia *Oreochromis niloticus*. 2002. 127 Thesis (MSc) - University of North Carolina at Charlotte, NC.

Hlavová, V, 1993, Reference values of the haematological indices in grayling (*Thymallus thymallus* Linnaeus), *Comp, Biochem, Physiol, Part A Mol, Integr, Physiol.*, 105(3), 525-532, [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(93\)90429-8](https://doi.org/10.1016/0300-9629(93)90429-8)

Holland, R, A, B.; Forster, R, E, 1966, The effect of size of red cells on the kinetics of their oxygen uptake, *J, Gen, Physiol.*, 49(4), 727-742, <https://doi.org/10.1085/jgp.49.4.727>

Hrubec, T, C.; Cardinale, J, L.; Smith, S, A, 2000, Hematology and plasma chemistry reference intervals for cultured tilapia (*Oreochromis hybrid*), *Vet, Clin, Pathol.*, 29(1), 7-12, <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2000.tb00389.x>

Ihssen, P, E.; Mckay, L, R.; Mcmillan, I.; Phillips, R, B, 1990, Ploidy manipulation and gynogenesis in fishes: cytogenetic and fisheries applications, *Trans, Am, Fish, Soc.*, 119(4), 698-717, [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1990\)119<0698:PMAGIF>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1990)119<0698:PMAGIF>2.3.CO;2)



Inoue, L, A, K, A.; Moraes, G.; Iwama, G, K.; Afonso, L, O, B, 2008, Physiological stress responses in the warm-water fish matrinxã (*Brycon amazonicus*) subjected to a sudden cold shock, *Acta Amaz.*, 38, 603-609, <https://doi.org/10.1590/S0044-59672008000400002>

Jayaprasad, P, P.; Srijaya, T, C.; Jose, D.; Papini, A.; Hassan, A.; Chatterji, A, K, 2011, Identification of diploid and triploid red tilapia by using erythrocyte indices, *Caryologia*, 64(4), 485-492,

Kızak, V.; Güner, Y.; Türel, M.; Kayım, M, 2013, Comparison of growth performance, gonadal structure and erythrocyte size in triploid and diploid brown trout (*Salmo trutta fario* L, 1758), *J, Fish, Aquat, Sci.*, 13(4), [https://doi.org/10.4194/1303-2712-v13\\_4\\_02](https://doi.org/10.4194/1303-2712-v13_4_02)

Lahnsteiner, F.; Kletzl, M, 2018, Pressure shock triploidization of *Salmo trutta f, lacustris* and *Salvelinus umbla* eggs and its impact on fish development, *Theriogenology*, 115, 65-76, <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.04.020>

Lamaziere, A.; Wolf, C.; Barbe, U.; Bausero, P.; Visioli, F, 2013, Lipidomics of hepatic lipogenesis inhibition by omega 3 fatty acids, *Prostaglandins Leukot, Essent, Fatty Acids*, 88(2), 149-154, <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2012.12.001>

Lemoine Jr, H, L.; Smith, L, T, 1980, Polyploidy induced in brook trout by cold shock, *Trans, Am, Fish, Soc.*, 109(6), 626-631, [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1980\)109<626:PIIBTB>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1980)109<626:PIIBTB>2.0.CO;2)

Levy-Pereira, N.; Carriero, M. M.; Yasui, G. S.; Meira, C. M.; de Sousa, R. L. M.; Maia, A. A. M.; Pilarski, F. 2021. Effects of triploid induction on innate immunity and hematology in *Astyanax altiparanae*. *Fish & Shellfish Immunology*, 116, 12-18.

Lochmiller, R, L.; Weichman, J, D.; Zale, A, V, 1989, Hematological assessment of temperature and oxygen stress in a reservoir population of striped bass (*Morone saxatilis*), *Comp, Biochem, Physiol, Part A Mol, Integr, Physiol.*, 93(3), 535-541, [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(89\)90007-8](https://doi.org/10.1016/0300-9629(89)90007-8)

Luna, L. G. (1968), Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology,

Mataveli, M., de Moraes, G. V., Streit Jr, D. P., Mendez, L. D. V., Sakaguti, E. S., Toninato, J. C., Barbosa, R. C., Merlini, L., 2018. Avaliação da qualidade do sêmen de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagem Chitralada, suplementada com diferentes concentrações de vitamina C. Bol. Inst. Pesca, 33(1), 1-7.

Monteiro, M. I. C., Ferreira, F. N., De Oliveira, N. M. M., Avila, A. K., 2003. Simplified version of the sodium salicylate method for analysis of nitrate in drinking waters. Anal. Chim. Acta., 477(1), 125-129. doi: 10.1016/S0003-2670(02)01395-8

Nagasawa, T.; Nakayasu, C.; Rieger, A, M.; Barreda, D, R.; Somamoto, T.; Nakao, M, 2014, Phagocytosis by thrombocytes is a conserved innate immune mechanism in lower vertebrates, Front, Immunol., 5, 445, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00445>

Pereira, D, S, P.; Guerra-Santos, B.; Moreira, E, L, T.; Albinati, R, C, B.; Ayres, M, C, C, 2018, Parâmetros hematológicos e histológicos de tilápia-do-nilo em resposta ao desafio de diferentes níveis de salinidade, Bol, Inst, Pesca, 42(3), 635-647, <https://doi.org/10.20950/1678-2305.2016v42n3p635>

Pradeep, P, J.; Srijaya, T, C.; Shahreeza, M, S.; Mithun, S.; Anuar, H.; Anil, A, J, J, C, E, 2010, Induction of triploidy in red tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Peters, 1852) × *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) by heat shock treatment under laboratory conditions, J, Coast, Environ., 1(1), 91-102,

Ranzani-Paiva, M, J, T.; E Pádua, S, B.; Tavares-Dias, M.; Egami, M, I, 2013, Métodos para análise hematológica em peixes, pp, 139, Editora da Universidade Estadual de Maringá-EDUEM,

Sadler, J.; Pankhurst, N, W.; Pankhurst, P, M.; King, H, 2000, Physiological stress responses to confinement in diploid and triploid Atlantic salmon, J, Fish Biol., 56(3), 506-518, <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2000.tb00751.x>

Santos, A.; Ranzani-Paiva, M.; Felizardo, N.; Rodrigues, E, 2018, Análise histopatológica de fígado de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*, criada em tanque-rede na represa de Guarapiranga, São Paulo, SP, Brasil, *Bol, Inst, Pesca*, 30(2), 141-145.

Sezaki, K.; Watabe, K.; Tsukamoto, K.; Hashimoto, K, 1991, Effects of increase in ploidy status on respiratory function of ginbuna, *Carassius auratus Langsdorfi* (Cyprinidae), *Comp, Biochem, Physiol*, A99, 123 – 127, [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(91\)90246-9](https://doi.org/10.1016/0300-9629(91)90246-9)

Strnad, P.; Nuraldeen, R.; Guldiken, N.; Hartmann, D.; Mahajan, V.; Denk, H.; Haybaeck, J, 2011, Broad spectrum of hepatocyte inclusions in humans, animals, and experimental models, *Compr, Physiol.*, 3(4), 1393-1436, <https://doi.org/10.1002/cphy.c120032>

Sutterlin, A. M., Holder, J., & Benfey, T. J., 1987. Early survival rates and subsequent morphological abnormalities in landlocked, anadromous and hybrid (landlocked× anadromous) diploid and triploid Atlantic salmon. *Aquaculture*, 64(2), 157-164.

Telli, G, S.; Ranzani-Paiva, M, J, T.; De Carla Dias, D.; Sussel, F, R.; Ishikawa, C, M.; Tachibana, L, 2014, Dietary administration of *Bacillus subtilis* on hematology and non-specific immunity of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* raised at different stocking densities, *Fish Shellfish Immunol.*, 39(2), 305-311, <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.05.025>

Thorgaard, G, H.; Gall, G, A, 1979, Adult triploids in a rainbow trout family, *Genetics*, 93(4), 961-973, <https://doi.org/10.1093/genetics/93.4.961>

UNESCO., 1983. Chemical methods for use in marine environmental monitoring. Em: Manual and Guides12. Intergovernmental Oceanographic Commission, Paris, Franca.

Van de Laarschot, L, F.; Jansen, P, L.; Schaap, F, G.; Olde Damink, S, W, 2016, The role of bile salts in liver regeneration, *Int, J, Hepatol.*, 10(5), 733-740,

Wang, B.; Liu, Y.; Chen, X.; Fan, Z, 2010, Amitosis-like nuclear division in erythrocytes of triploid rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, *J, Fish Biol.*, 76(5), 1205-1211, <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2010.02556.x>

Wlasow, T.; Fopp-Bayat, D, 2011, The effect of thermal shock on morphological characteristics of blood cells in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) triploids, *Acta Vet, Brno*, 80(2), 215-218, <https://doi.org/10.2754/avb201180020215>

Wolf, J, C.; Baumgartner, W, A.; Blazer, V, S.; Camus, A, C.; Engelhardt, J, A.; Fournie, J, W.; Wolfe, M, J, 2015, Nonlesions, misdiagnoses, missed diagnoses, and other interpretive challenges in fish histopathology studies: a guide for investigators, authors, reviewers, and readers, *Toxicol, Pathol.*, 43(3), 297-325, <https://doi.org/10.1177/0192623314540>

Wolf, J, C.; Wheeler, J, R, 2018, A critical review of histopathological findings associated with endocrine and non-endocrine hepatic toxicity in fish models, *Aquat, Toxicol.*, 197, 60-78, <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.01.013>

Zhang, Q., Arai, K., 1996. Flow cytometry for DNA contents of somatic cells and spermatozoa in the progeny of natural tetraploid loach. *Fish. Sci.*, 62(6), 870-877. doi: 10.2331/fishsci.62.870

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados dos nossos estudos demonstram que ainda há muito a ser investigado sobre a manipulação cromossômica como ferramenta de esterilidade e apontam os riscos na produção de peixes considerados triploides, nos quais sua condição de ploidia foi avaliada apenas no início estágios da vida,

A perda de cromossomos pode ser um problema para o controle biológico, modelo de pesquisa e até mesmo para a aquicultura comercial, Essa perda pode resultar em células germinativas diploides, que podem levar à formação de gametas haploides férteis, Ou seja, a capacidade reprodutiva pode ser recuperada em animais originalmente considerados estéreis, Como os conjuntos de cromossomos são perdidos e o animal torna-se novamente diploide, a reprodução pode ser retomada e o desempenho do crescimento torna-se semelhante ao dos animais diploides,

Os eritrócitos dos peixes triploides são maiores que os diploides devido à maior quantidade de material genético nessas células, Com isso, a avaliação de lâmina de esfregaço sanguíneo apresenta uma possibilidade prática e de baixo custo para a identificação da triploidia em tilápias do Nilo, Não foi relatado alterações histopatológicas significativas nas amostras de fígado em nenhum dos tratamentos, podendo indicar que a indução da triploidia não causa lesões e alterações histopatológicas no tecido hepático de tilápias do Nilo,

## ANEXO V

### Comprovante de submissão de artigo,

Journal: Aquaculture  
 Title: Growth performance, reproductive status, and chromosomal instability in triploid Nile tilapias  
 Corresponding Author: Dr. Eduardo Maldonado Turra  
 Co-Authors: Williane Ferreira Menezes; Érika Ramos Awaranga; Rafael Henrique Nóbrega; Luiz Renato França; Ludson Guimarães Manduca; Franklin Fernando Batista da Costa; Vinicius Monteiro Bezerra  
 Manuscript Number: AQUACULTURE-D-23-00112

Dear Williane Ferreira Menezes,

The corresponding author Dr. Eduardo Maldonado Turra has listed you as a contributing author of the following submission via Elsevier's online submission system for Aquaculture.

Submission Title: Growth performance, reproductive status, and chromosomal instability in triploid Nile tilapias

Elsevier asks all authors to verify their co-authorship by confirming agreement to publish this article if it is accepted for publication.

Please read the following statement and confirm your agreement by clicking on this link: [Yes, I am affiliated.](#)

I irrevocably authorize and grant my full consent to the corresponding author of the manuscript to: (1) enter into an exclusive publishing agreement with Elsevier on my behalf (or, if the article is to be published under a CC BY license, a non-exclusive publishing agreement), in the relevant form set out at [www.elsevier.com/copyright](http://www.elsevier.com/copyright); and (2) unless I am a US government employee, to transfer my copyright or grant an exclusive license of rights (or for CC BY articles a non-exclusive license of rights) to Elsevier as part of that publishing agreement, effective on acceptance of the article for publication. If the article is a work made for hire, I am authorized to confirm this on behalf of my employer. I agree that the copyright status selected by the corresponding author for the article if it is accepted for publication shall apply and that this agreement is subject to the governing law of the country in which the journal owner is located.

If you did not co-author this submission, please contact the corresponding author directly at [eduardoturra@yahoo.com.br](mailto:eduardoturra@yahoo.com.br).

Thank you,  
 Aquaculture

More information and support  
 FAQ: What is copyright co-author verification?  
[https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a\\_id/28460/supporthub/publishing/](https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/28460/supporthub/publishing/)