

Reversão Sexual de Rã-Touro (*Rana catesbeiana*) com Hormônio Masculinizante Misturado à Ração de Girinos¹

Claudio Angelo Agostinho², Irani Quagio Grassiotto³, Francisco Stefano Wechsler⁴

RESUMO - Este trabalho consistiu em testar a eficiência de um hormônio masculinizante (17 β -hidróxi-17-metil-andróxi-4-en-3-ona) na reversão sexual de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*). Foram usados 352 girinos com dois a três meses de idade, nos estádios 30 a 36, para testar quatro níveis de hormônio na ração (0, 30, 60 e 90 μ g/g) por 45 dias. Após a metamorfose, 167 imagos foram sacrificados e 185 imagos foram criados até a idade de quatro meses e, então, sacrificados. As análises macroscópicas das gônadas e das características sexuais secundárias confirmaram a masculinização nos tratamentos com hormônio. Muitos ovócitos foram observados nos testículos dos imagos revertidos (*ovotestis*); entretanto, quatro meses após a metamorfose, os *ovotestis* ocorreram esporadicamente. Concluiu-se que, após a metamorfose, iniciou-se um processo de reabsorção dos ovócitos nos imagos revertidos, culminando com a quase total reabsorção dos ovócitos no quarto mês de idade.

Palavras-chave: 17 β -hidróxi-17-metil-andróxi-4-en-3-ona, girinos, *Rana catesbeiana*

Sexual Reversion of Bullfrog with Masculinizing Hormone Added to the Tadpole Ration

ABSTRACT - This work consisted in testing the efficiency of a masculinizing hormone (17 β -hydroxy-17-methyl-androxy-4-en-3-one) in the sex reversal of bullfrog tadpoles. Three hundred and fifty two tadpoles with two or three months old, from the stages 30 to 36, were used to test four levels of hormone in the ration (0, 30, 60 and 90 μ g/g), for 45 days. After metamorphosis, 167 juveniles were sacrificed and 185 were reared until the fourth month of age and sacrificed thereafter. Macroscopic analysis of the gonads and secondary traits confirmed the masculinization in the treatments with hormone. Many oocytes were observed in the testes of the masculinized juveniles; however, four months after metamorphosis the ovotestes were sporadic. It was concluded that, after metamorphosis, oocyte reabsorption started in reversed juveniles, culminating in almost total reabsorption at the fourth months.

Key Words: *Rana catesbeiana*, 17 β -hydroxy-17-methyl androxy-4-en-3-one, tadpoles

Introdução

Os machos e as fêmeas de rã-touro (*Rana catesbeiana*) criados em cativeiro apresentam crescimento diferenciado, porque, quando as fêmeas alcançam a primeira maturação sexual, passam a usar os nutrientes de sua dieta para a maturação dos ovários (RIBEIRO FILHO, 1999). Além de as fêmeas crescerem menos, os ovários e ovidutos de animais sexualmente maduros podem alcançar 15% do peso total do animal (COSTA et al., 1998), levando à perda de até 150 kg para cada tonelada de fêmea abatida. Portanto, a adoção de algumas técnicas de rotina usadas em piscicultura, como por exemplo a seleção para maturação sexual tardia, como é feito em salmão (GJEDREN e SKJERVOLD, 1978), ou as técnicas de reversão sexual usadas na produção comercial de tilápias (YAMAZAKI, 1983) poderão resultar em ganho na produção.

A expressão da sexualidade em rã-touro é controlada pelos cromossomos sexuais, XX em fêmeas e XY em machos, que determinam o sexo fisiológico. Entretanto, independentemente do sexo genético, o sexo fisiológico pode ser manipulado pelo uso de esteróides sexuais, que são os indutores primários de vários fenômenos reprodutivos que começam com a diferenciação das gônadas, prosseguem com a gametogênese e terminam com a ovulação ou espermição.

A manipulação do sexo fisiológico pelo uso de esteróides sexuais vem sendo realizada em anfíbios desde a década de 30 (PADOA, 1936), e a reversão de animais geneticamente machos a fêmeas tem sido realizada de diferentes formas: pela injeção de estrógeno (benzoato de estradiol) em girinos (OHTA, 1987); imersão dos girinos em solução aquosa de estrógeno (OHTA, 1987); injeção de benzoato de

¹ Projeto Financiado pela FAPESP (processo nº 96/03405-4)

^{2, 4} Prof. Ass. Dr., Caixa Postal 560, DPEA. FMVZ - Botucatu-SP. CEP 18618-000. Endereço eletrônico: agostinho@fca.unesp.br

³ Prof^a. Ass. Dr., Dep. de Morfologia, IB-UNESP, Botucatu-SP. Endereço eletrônico: morfologia@ibb.unesp.br

estradiol após a castração de machos adultos (UEDA, 1990), ou ainda pela implantação intraperitoneal de tubos com estradiol em girinos (CHANG et al., 1996).

A reversão de rãs geneticamente fêmeas a machos foi obtida pela injeção de propionato de testosterona (OHTA, 1987). Entretanto, a utilização desta técnica para a engorda de plantéis revertidos a machos é muito trabalhosa e onerosa em ranários comerciais, onde a quantidade de girinos por safra pode alcançar até 500 mil indivíduos.

Uma forma prática e viável de reversão sexual, usada na criação de tilápia nilótica, é o fornecimento de hormônio masculinizante na ração durante os primeiros 30 dias após a eclosão, o que resulta em 80 a 99% de machos (PANDIAM e SHEELA, 1995).

Objetivou-se com este trabalho adaptar a técnica usada na reversão da tilápia à reversão de girinos de rã-touro em metamorfose.

Material e Métodos

O experimento foi desenvolvido no Setor de Ranicultura do Laboratório de Aqüicultura da UNESP de Botucatu, no período de 15 de julho a 26 de dezembro de 1997.

Foram usados 352 girinos provenientes de tanque de terra, criados na densidade de 40 girinos por litro, com peso médio de 33 g. O estágio de metamorfose foi classificado de acordo com GOSNER (1960), em que se encontravam variou entre 30 (quando o girino só apresenta um vestígio de pata traseira em forma de apêndice) e 36 (quando a pata traseira já apresenta os dedos formados).

Antes de iniciar o experimento, uma amostra de 50 girinos foi sacrificada, e verificou-se a diferenciação sexual: os testículos eram pequenos, mas visíveis a olho desarmado, e apresentavam forma arredondada e coloração opaca, estando localizados na extre-midade cranial do corpo gorduroso; os ovários apresentavam a mesma disposição dos testículos, mas possuíam forma alongada e coloração hialina, podendo ser facilmente diferenciados dos testículos.

Os girinos foram distribuídos em quatro tratamentos com 88 animais cada. Os tratamentos consistiram em quatro níveis de hormônio: 0, 30, 60 e 90 µg/g de ração comercial extrusada (Rana-45 da Nutremix Premix e Rações Ltda), com 45% de proteína bruta, 4% de extrato etéreo, 6% de fibra bruta, 2,5% de cálcio e 1,4% de fósforo, triturada

para obter partículas de aproximadamente 2 mm e misturada ao hormônio masculinizante, 17β-hidróxi-17-metil-andróxi-4-en-3-ona (Testogan da Hoescht) previamente dissolvido em álcool (200 mL/kg de ração). A mistura foi feita em quantidade suficiente para uma semana de consumo e armazenada sob refrigeração. A ração foi oferecida na proporção de 3% do peso vivo dos girinos, dividida em quatro refeições e distribuída a lanço durante 45 dias.

Os girinos foram mantidos em reservatórios de amianto de 1000 litros com inclinação do fundo, de maneira que o excesso de ração e fezes fosse removido do fundo pelo fluxo de água e eliminado através de uma saída conectada a um cano de PVC de 2,5 cm de diâmetro.

A água foi renovada continuamente (10 litros por hora). Nos primeiros 25 dias, manteve-se a temperatura da água a 19°C. Em seguida, o reservatório de água foi aquecido, obtendo-se temperatura ao redor de 26°C, com o intuito de acelerar a metamorfose, que ocorreu aproximadamente 20 dias após o aquecimento.

Concluída a metamorfose, 167 animais foram sacrificados e suas gônadas examinadas macroscópica e histologicamente. A análise histológica foi realizada mediante cortes corados com hematoxilina e eosina.

Um lote de imagos de cada tratamento foi marcado e distribuído em baias climatizadas a uma densidade de 50 animais por metro quadrado, totalizando 185 imagos. As baias foram mantidas à temperatura média de 26°C e fotoperíodo de 12 horas.

As rãs receberam a mesma ração dos girinos, que inicialmente foi triturada, umedecida e misturada com 10% de larvas de *Musca* doméstica. Após 30 dias, quando as rãs já estavam adaptadas ao comedouro e à ração, o alimento passou a ser exclusivamente ração extrusada com 15 mm de diâmetro, movimentada por vibradores elétricos.

Os animais foram pesados mensalmente até completar quatro meses de recria, quando foram abatidos e registrados os pesos individuais de carcaça, gônadas e vísceras. As gônadas foram avaliadas macroscopicamente, de acordo com a metodologia proposta por COSTA et al. (1998 a e 1998 b), e amostras dos ovários e testículos foram fixadas em solução de KARNOVSKY (1964) para posteriores análises histológicas.

Os dados de ganho ponderal foram analisados estatisticamente, considerando-se os indivíduos como parcelas principais e as pesagens como medidas repetidas, conforme o seguinte modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + e_{ij} + P_k + (TP)_k + w_{ijk}$$

em que: Y_{ijk} = massa corporal do j-ésimo indivíduo do i-ésimo tratamento, obtida na k-ésima pesagem; T_i = efeito do i-ésimo tratamento (combinação de um nível de hormônio com um sexo); e_{ij} = erro aleatório relativo ao indivíduo, NID ($0, \sigma_e^2$); P_k = efeito da k-ésima pesagem; $(TP)_{ik}$ = interação entre tratamento e pesagem; W_{ijk} = erro aleatório relativo à pesagem, NID ($0, \sigma_w^2$).

Os efeitos de tratamento foram desdobrados por meio de sete contrastes linearmente independentes, a saber: efeitos linear, quadrático e cúbico do hormônio nos machos normais; efeitos linear e quadrático do hormônio nos machos revertidos; fêmeas versus demais; e machos normais versus revertidos.

Para a análise estatística dos dados de carcaça, empregou-se o seguinte modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + \beta(x_{ij} - \bar{x}) + e_{ij}$$

em que: Y_{ijk} = massa da carcaça ou de algum componente desta; T_i = como no modelo anterior; β = coeficiente de regressão; x_{ij} = massa corporal na data do abate (covariável); \bar{x} = média das massas corporais; e_{ij} como no modelo anterior.

Os efeitos de tratamento foram desdobrados tal como no modelo anterior.

Resultados e Discussão

Os imagos sacrificados logo após a metamorfose foram analisados macroscopicamente, evidenciando-se a masculinização de todos os indivíduos em todos os tratamentos que receberam hormônio masculinizante. Constataram-se pequenas deformações nas extremidades dos testículos de parte dos animais que receberam hormônio. Nestes testículos, a análise histológica revelou grande quantidade de oócitos distribuídos nos túbulos seminíferos (ovotestis) (Figura 1).

Decorridos quatro meses da metamorfose, todos os animais que haviam recebido hormônio masculinizante apresentaram características secundárias masculinas, ou seja, maior diâmetro do tímpano e papo amarelado. Ao abate, a reversão foi confirmada pela presença de testículos. Nesta idade, deformações nos testículos revertidos também foram verificadas nos três tratamentos que receberam hormônio masculinizante (Tabela 1).

Os testículos não apresentavam forma definida, principalmente as extremidades, que geralmente eram encurvadas, evidenciando que o órgão, antes da ingestão do hormônio, estava assumindo a forma de um pequeno ovário. A análise histológica destes testículos evidenciou a predominância de células

germinativas masculinas, classificadas segundo COSTA (1998a) como espermatogônios primários e secundários, espermatócitos primários e secundários, espermátides e espermatozóides. A ocorrência de ovócitos e oócitos em reabsorção foi esporádica (Figura 2).

O fato de os imagos recém-metamorfoseados

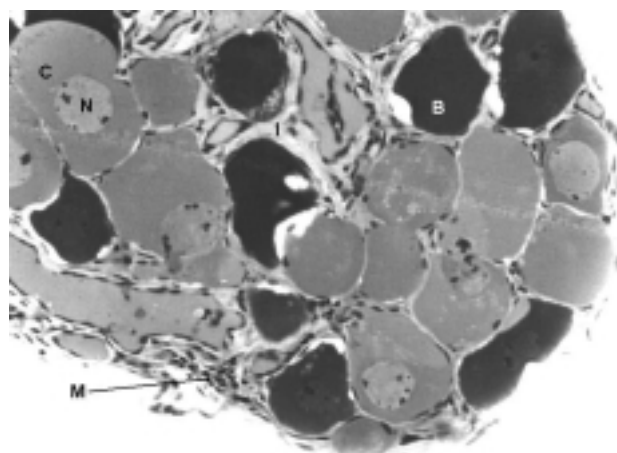


Figura 1 - Corte transversal do testículo de imago de rã-touro, proveniente de tratamento com hormônio masculinizante, ovócito (C = citoplasma e N = núcleo); B = ovócito em reabsorção; I = tecido intersticial; M = células germinativas masculinas. Aumento: aproximadamente 300x.

Figura 1 - Cross-section of testis from juvenile bullfrog treated with hormone, oocyte (C = cytoplasm and N = nucleus); B = oocyte undergoing reabsorption; I = interstitial tissue; M = male germinative cells. Magnification: approximately 300x.

Tabela 1 - Ocorrência de machos e fêmeas decorridos quatro meses da metamorfose

Table 1 - Incidence of males and females four months after metamorphosis

Categoria Class	Hormônio ¹ Hormone ¹			
	0	30 µg/g	60 µg/g	90 µg/g
Fêmeas Females	23	0	0	0
Testículos normais Normal testes	21	21	25	26
Testículos deformados Deformed testes	0	26	15	28
Total	44	47	40	54

¹ Dose de hormônio masculinizante na ração.

¹ Dose of masculinizing hormone in the ration.

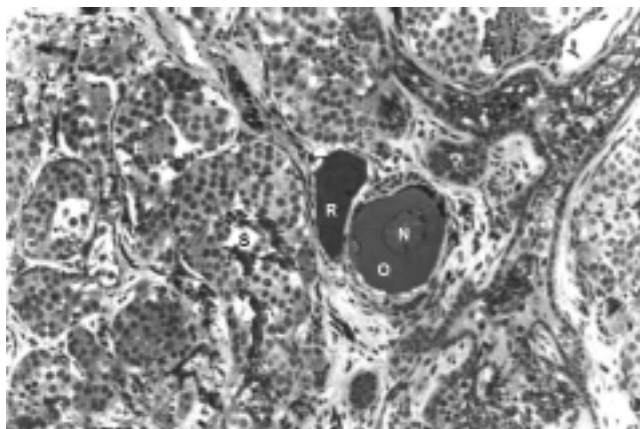


Figura 2 - Corte transversal de testículo de rã-touro com quatro meses de idade, proveniente de tratamento com hormônio, predominando os cistos com células germinativas masculinas em diferentes fases de desenvolvimento e ovócitos ocorrendo esporadicamente. C = cisto com espermátócitos; E= cisto com espermátides; S = luz dos túbulos seminíferos, I = tecido intersticial; Ovócito (O = citoplasma e N = núcleo); R = ovócito em reabsorção, Aumento: aproximadamente 300x.

Figura 2 - Testis cross-section of four-month-old bullfrog treated with hormone, with predominance of cysts with male germinative cells in different development phases and the sporadic occurrence of oocytes. C = cyst with spermatocytes; E= cyst with spermatids; S = seminiferous tubules; I = interstitial tissue; oocyte (O = cytoplasm e N = nucleus); R = oocyte undergoing reabsorption. Magnification: approximately 300x.

provenientes dos tratamentos com hormônio terem apresentado ovotestis em grande quantidade era esperado, pois, segundo LOFTS (1974) e DUELLMAN e TRUEB (1986), os girinos nos estádios 30 a 36 (GOSNER, 1960) já estão diferenciados sexualmente. Segundo YAMAZAKI (1983), a reversão sexual artificial em espécies cuja diferenciação sexual já tenha ocorrido provavelmente será permanente, pois acredita-se que a ação dos genes determinantes do sexo fisiológico está restrita a um período de tempo relativamente curto durante o desenvolvimento inicial das gônadas; estes genes tornam-se latentes ou inativos depois da diferenciação sexual das gônadas.

A reabsorção dos ovócitos nas fêmeas revertidas quatro meses após a metamorfose (Figura 2) confirma a reversão definitiva e a eficiência da 17 β -hidróxi-17-metil-andróxi-4-en-3-ona em reverter girinos que já apresentavam diferenciação sexual (estádios 30 a 36).

Nenhum dos contrastes foi significativo ($P > 0,005$) à exceção da comparação fêmeas versus demais. As fêmeas apresentaram peso médio significativamente maior no quarto mês de idade, quando comparadas com os machos normais e machos revertidos (Tabela 2). Todavia, RIBEIRO FILHO (1999) observou peso médio maior nos machos que nas fêmeas. PANDIAN e SHEELA (1995) verificaram menor desempenho de peixes como consequência da ingestão de hormônio masculinizante; entretanto, no presente estudo, esta diferença também foi verificada na testemunha, o que invalida esta hipótese.

Tabela 2 - Médias de quadrados mínimos do peso do animal e do peso das gônadas, fígado, corpo gorduroso, vísceras e carcaça (ajustado para peso vivo) das fêmeas (1), machos normais (2), machos revertidos (3) quatro meses após a metamorfose

Table 2 - Least squares means of live weight and weight of gonads, liver, fat, viscera and carcass (adjusted for live weight) in females (1), normal male (2) and reversed males (3) four months after metamorphosis

Hormônio ¹ Hormone ¹	Sexo Sex	Peso aos 4 meses Weight at 4 months	Gônadas Gonads	Fígado Liver	Gordura Fat	Vísceras Viscera	Carcaça Carcass
0	1	168,88*	4,00*	5,27	7,29**	54,19	75,99
	2	129,02	0,25	5,37	7,02	54,42	77,17
30 μ g/g	2	123,29	0,27	5,59	6,30	56,35	77,38
	3	149,44	0,08	5,77	6,37	55,12	77,58
60 μ g/g	2	148,68	0,08	5,14	5,59	55,86	77,03
	3	148,83	0,07	5,98	7,12	54,89	77,65
90 μ g/g	2	129,63	0,23	5,69	6,35	55,40	76,90
	3	130,62	0,22	5,37	6,32	55,81	77,47

¹ Dose de hormônio masculinizante na ração.

*, ** Fêmeas diferentes dos demais ($P < 0,01$ e $P < 0,05$, respectivamente).

¹ Dose of masculinizing hormone in the ration.

*, ** Females are different from the others ($P < 0,01$ and $P < 0,05$, respectively).

Conclusões

O hormônio masculinizante 17 β -hidróxi-17-metil-andróxi-4-en-3-ona misturado à ração e oferecido a girinos foi eficiente em reverter sexualmente os animais geneticamente fêmeas a machos em todos os tratamentos.

A reversão sexual de rã-touro (*Rana catesbeiana*) pode ser feita em girinos com dois a três meses de idade, estágio 30 a 36, quando já ocorreu a diferenciação sexual.

Sugere-se avaliar níveis mais baixos que 30 μ g de hormônio masculinizante num próximo experimento, pois mesmo neste nível todas as fêmeas foram revertidas.

Referências Bibliográficas

- AGOSTINHO, C.A., SILVA, M.A., TORRES, R.A. et al. 1991. Curvas de crescimento de rãs-pimenta, *Leptodactylus labyrinthicus* (SPIX, 1824). *R. Soc. Bras. Zootec.*, 20(1):47-54.
- CHANG, L.T, YU, N.W., HSU, C.Y. et al. W. 1996. Gonadal transformation in male *Rana catesbeiana* tadpoles intraperitoneally implanted with estradiol capsules. *General Comparative Endocrinology*, 102(3):299-306.
- COSTA, C.L.S., LIMA, S.L., ANDRADE, D.R. et al. 1998 b. Caracterização morfológica dos estádios de desenvolvimento do aparelho reprodutor feminino da rã-touro, *Rana catesbeiana*, no sistema anfigranja de criação intensiva. *R. Bras. Zootec.*, 27(4):642-650.
- COSTA, C.L.S., LIMA, S.L., ANDRADE, D.R. et al. 1998 a. Caracterização morfológica dos estádios de desenvolvimento do aparelho reprodutor masculino da rã-touro, *Rana catesbeiana*, no sistema anfigranja de criação intensiva. *R. Bras. Zootec.*, 27(4):651-657.
- DUELLMAN, W. E., TRUEB, L. 1986. *Biology of amphibians*. McGraw-Hill, New York. 670p.
- GJEDREN, T., SKJERVOLD, H. 1978. Improving salmon and trout farm yields through genetics. *World Review Anim. Produ.*, 14(3):29-38.
- GOSNER, K.L. 1960. A simplified table for staging anura embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, 16:183-190.
- KARNOVSKY, J.N. 1964. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell. Biol.*, 27:137.
- LOFTS, B. 1974. Reproduction In: LOFTS, B. (Ed.). *Physiology of the amphibia*. New York: Academic Press. v.2, p.107-218.
- OHTA, S. 1987. Sex determining mechanism in *Buergeria buergeri*. II. The effects of sex hormones on the differentiation of gonads and the offspring of sex reversed females. *Sci. Rep. Lab. Amphibian Biol.*, 9:213-238.
- PADOA, E. 1936. Effecte paradossale (mascolinizzazione) sulla differenziazione sessuale digirini de *Rana esculenta* trattati com ormone follicolare. *Monit.Zool. Ital.*, 48:285-289.
- PANDIAM, T.J., SHEELA, S.G. 1995. Hormonal induction of sex reversal in fish. *Aquacult.*, 138:1-22.
- RIBEIRO FILHO, O.P. *Desempenho e avaliação de carcaça de rã-touro (Rana catesbeiana Shaw, 1802) criada em cativeiro com diferentes níveis de energia metabolizável na ração*. Viçosa: UFV, 1999. 94p. (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, 1999.
- UEDA, H. 1990. Offspring of sex-reversed males in *Bufo viridis* Laur. *Sci. Rep. Lab. Amphibian Biol.*, 10:155-164.
- YAMAZAKI, F. 1983. Sex control and manipulation in fish. *Aquacult.*, 33:329-354

Recebido em: 16/06/00

Aceito em: 20/02/01