**INVERSÃO SEXUAL de *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard)
com 17α-metiltestosterona**

**Luciano Augusto Weiss1\*; Alex Pires de Oliveira Nuñer2**

1\*luciano@lapad.ufsc.br. Doutor em Aquicultura/PPG-AQI UFSC. 2alex.nuner@ufsc.br. Doutor em Ecologia e Recursos Naturais/UFSCAR e Professor Titular/AQI-CCA UFSC.

**RESUMO**

O cultivo monosexo feminino é indicado para *Rhamdia quelen* devido ao maior crescimento das fêmeas e maturação sexual precoce dos machos durante o ciclo de produção. Proles femininas livres de hormônio exógeno podem ser produzidas através da inversão sexual indireta, envolvendo inicialmente a masculinização das fêmeas normais (fêmeas genotípicas e fenotípicas) para originar reprodutores neomachos, os quais poderão produzir descendências femininas ao serem cruzados com fêmeas normais. O objetivo do estudo foi masculinizar fêmeas de *R. quelen*, por via oral, com 17α-metiltestosterona (MT) incorporado na ração. Grupos de larvas receberam dietas suplementadas com MT nas doses de 60, 80 ou 100 mg/kg de ração durante 21 dias. Um grupo controle foi alimentado com dieta similar livre de hormônio. Aos 150 dias pós-eclosão, 30 peixes de cada dose foram eutanasiados para avaliação das gônadas através de técnicas histológicas. A inversão sexual foi observada em todas as doses, tendo sido obtidos 50, 40 e 20% de neomachos nas doses de MT 60, 80 e 100 mg/kg de ração, respectivamente. Gônadas intersexuais foram observadas em todas as doses masculinizantes. Os resultados mostraram que a administração oral de MT foi eficaz para masculinizar fêmeas de *R. quelen*, sendo indicada a menor dose testada por não haver diferença entre as doses testadas.

**Palavras-chave:** monosexo, histologia, jundiá, neomacho.

**ABSTRAT**

The female monosex fish culture is indicate for *Rhamdia quelen* due to their higher growth and early sexual maturation of males during the production cycle. Hormone-free offspring can be generate by indirect sex reversal, which initially involves the masculinization of normal females (genotypic and phenotypic females) to yield neomales breeders that are can be able to produce all-female offspring when crossed with normal females. Thus, the objective of the study was to masculinize *R. quelen* female by oral administration using 17α-methyltestosterone (MT) incorporated into the feed. Groups of larvae fed with diets supplemented with MT at doses of 60, 80 or 100 mg.kg-1 diet for 21 days. A control group fed a similar hormone-free diet. At 150 days post-hatching (DPH) 30 fish from each dose were euthanized to gonadal evaluation through histological techniques. Sex reversal was observe at all MT doses that produced 50, 40 and 20% neomales at 60, 80 and 100 mg.kg-1, respectively. Intersex fish were observe at all masculinizing doses. Besides that, higher MT doses caused inhibitory effects of development in the female and male gonads. The results showed that oral administration of MT was effective to induce *R. quelen* female masculinization; being indicated the lowest dose tested due to no difference between the doses tested.

**Key words:** monosex, histology, jundiá, neomale.

1. **INTRODUÇÃO**

O cultivo de *Rhamdia quelen*, espécie gonocorística de peixe e popularmente conhecido como jundiá, vem apresentando aumento constante na região sul do Brasil nos últimos anos (SILVEIRA et al., 2014). Para esta espécie, ambos os sexos apresentam taxas de crescimento similares no início do cultivo, no entanto as fêmeas alcançam maior tamanho no momento da despesca (GHIRALDELLI et al., 2007). Deste modo, a produção desta espécie poderia ser incrementada com o cultivo monosexo feminino.

O cultivo monosexo é uma condição altamente desejada para muitas espécies de interesse comercial, como por exemplo, as do gênero *Oreochromis* e os salmonídeos e ciprinídeos, principalmente devido às diferenças de crescimento entre os sexos, ou pela reprodução indesejada durante o ciclo de produção (DUNHAN, 2004).

Normalmente lotes monosexo são obtidos através da aplicação de técnicas de inversão de sexo, que pode ser induzida pela temperatura (BAROILLER et al., 1999) ou pela administração de hormônios por via oral, por banho de imersão, por injeção ou implantes (PANDIAN, 2013).

A administração de dieta suplementada com hormônio é um método de baixo custo para a inversão sexual, sendo amplamente utilizada em espécies cujo período lábil, ou seja, o período no qual as células são totipotentes em relação ao sexo, ocorre após o início da alimentação exógena (PANDIAN, 2013). Considerando-se que as larvas de *R. quelen* são capazes de digerir dietas artificiais antes mesmo de consumirem o vitelo (SILVEIRA et al., 2013), a inversão sexual por via oral apresenta-se como um método viável para inversão sexual.

Populações monosexo também podem ser originadas combinando-se a utilização de esteroides com estratégias de acasalamento. Este método indireto de inversão sexual tem sido aplicado em cultivos comerciais, como os de salmonídeos (FEIST et al., 1995), evitando a aplicação de hormônios nos peixes destinados ao consumo. Como o uso de esteroides provoca controvérsias relacionadas à saúde humana e ao meio ambiente, muitos países europeus proibiram sua utilização em peixes cultivados (EL-SAYED, 2006).

Em salmonídeos a obtenção de proles femininas livres de hormônio feminilizante envolve inicialmente a masculinização direta, seguida pela realização de testes de progênie para identificação das fêmeas masculinizadas, conhecidas como neomachos, sendo que do cruzamento entre reprodutores neomachos e fêmeas normais obtém-se uma descendência feminina (DONALDSON e DEVLIN, 1996).

Neste estudo relatamos a masculinização do *R. quelen* por via oral com 17α-metiltestosterona, como o passo inicial para a geração de descendência feminina livre da adição exógena de hormônio através de reprodutores neomachos.

# 2- MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce (LAPAD) do Departamento de Aquicultura do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), utilizando os procedimentos experimentais aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSC.

***2.1– Peixes***

As larvas de *R. quelen* foram obtidas através da reprodução artificial de exemplares selvagens capturados na Bacia do Rio Uruguai e mantidos pelo LAPAD em seu plantel de reprodutores.

A desova foi induzida de acordo com o protocolo descrito por Woynarovich e Horváth (1980). Um pool contendo volumes iguais de sêmen proveniente de dois machos foi utilizado para fertilizar um pool contendo volumes iguais de ovos provenientes de duas fêmeas. Os ovos fertilizados foram incubados em incubadoras (tipo cilindro-cônicas) abastecidas por um sistema controlado de recirculação de água, com temperatura de 24,84 ± 0,35°C (média ± dp).

***2.2– Ensaio masculinizante***

Larvas de *R. quelen* com 2 dias pós-eclosão (DPE), em início da alimentação exógena, foram distribuídas aleatoriamente na densidade de 6 larvas/L em tanques circulares (60 L) abastecidos por um sistema controlado de recirculação de água com taxa de renovação de 800% ao dia e qualidade da água com as seguintes características: temperatura: 24,80 ± 0,85°C; pH: 7,77 ± 0,15; condutividade eléctrica: 242,63 ± 27,69 µS/cm; oxigênio dissolvido: 7,54 ± 0,52 mg/L; amônia não ionizada: 0,17 ± 0,09 mg/L de NH3; nitrito: 0,11 ± 0,09 mg/L de NO2; alcalinidade total: 31,50 ± 5,08 mg/L de CaCO3; dureza total: 152,50 ± 23,95 mg/L de CaCO3.

Durante 21 dias grupos de larvas de *R. quelen* foram alimentados até a saciedade aparente cinco vezes ao dia com dieta artificial suplementada com 17α-metiltestosterona (MT), nas doses 0 (controle), 60, 80 ou 100 mg/kg de ração.

A incorporação de MT foi realizada pelo método da evaporação de álcool etílico (SHELTON et al., 1981) em ração comercial contendo 55% de proteína bruta (PB). As alimentações preparadas com cada dose de MT foram peneiradas (0-250, 250-650 e 650-850 µm), embaladas individualmente, refrigeradas até o momento de serem oferecidas e fornecidas na primeira (0-250 µm), segunda (250-650 µm) e terceira semanas (650-850 µm). Diariamente antes da primeira alimentação, os restos de ração e as fezes foram retirados das unidades experimentais através da sifonagem de fundo.

Ao final do tratamento masculinizante, o volume de água de cada tanque foi aumentado em 40 L para favorecer o crescimento, e neste momento todos os peixes passaram a ser alimentados com uma dieta livre de hormônio (45% PB) até completarem 150 DPE, quando foi realizada a biometria (peso e comprimento) e retirada das gônadas para a avaliação histológica.

***2.3– Procedimentos histológicos***

Para a avaliação microscópica dos efeitos do hormônio na diferenciação gonadal do *R. quelen*, trinta animais de cada tratamento masculinizante com MT foram eutanasiados com eugenol e deles foram retiradas amostras do terço médio das gônadas por meio de incisão ventral, que foram prontamente fixadas em solução de Karnovsky (Paraformol 2,0%; Glutaraldeído 2,0% e Tampão Fosfato 0,1 M; pH 7,4) para a aplicação das técnicas histológicas: inclusão em parafina, microtomia (cortes seriados de 5,0 µm), coloração e montagem das lâminas. As secções de 5,0 µm foram coradas com Hematoxilina / Eosina (HE) ou Ácido Periódico de Schiff + Hematoxilina Férrica + Metanil Yellow (MY), para serem analisadas em microscópio de luz.

***2.4– Análise estatística***

Tabelas de contingência (2 x 2) da frequência dos sexos foram analisadas pelo teste exato de Fisher ao nível de significância de 5,0% (ZAR, 2010), aplicado para testar se a proporção entre machos e o total de fêmeas genotípicas (gônadas femininas + gônadas intersexuais + gônadas masculinizadas) para cada dose masculinizante e o controle diferiu da proporção equilibrada 1:1, e para testar a proporção entre fêmeas com gônada exclusivamente feminina (gônada feminina) e neomachos (gônada masculinizada) entre os tratamentos masculinizantes. Para avaliar se houve efeito do hormônio, uma hipótese unilateral foi testada para avaliar se a proporção entre fêmeas masculinizadas somada a de peixes intersexuais (gônadas masculinizadas + intersexuais) e fêmeas com gônada exclusivamente feminina (gônadas femininas), foi maior nos tratamentos do que no controle.

Os peixes com gônadas indiferenciadas foram excluídos de todas as análises estatísticas.

# 3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Aos 150 DPE os peixes apresentaram crescimento similar em todos os tratamentos, com peso corporal (média ± dp) de 10,09 ± 1,70 g e comprimento total de 8,47 ± 4,39 cm.

Através da análise histológica as gônadas foram classificadas em gônadas indiferenciadas, nas quais a presença das células germinativas primordiais não possibilitou a sexagem; gônadas masculinas, caracterizando os machos; gônadas femininas, caracterizando as fêmeas; gônadas intersexuais, com a presença simultânea de tecido masculino e feminino; e as gônadas masculinizadas, nas quais as lamelas ovarianas contendo exclusivamente células da linhagem germinativa masculina caracterizaram as gônadas femininas masculinizadas dos neomachos de *R. quelen*.

Um desvio significativo (*P* < 0,05) na proporção sexual foi observado em favor dos machos, tanto no controle quanto nos grupos tratados com MT (Tabela 1).

Independentemente do tratamento masculinizante, as fêmeas genotípicas (gônadas femininas + gônadas intersexuais + gônadas masculinizadas) ocorreram em baixa frequência (≤ 20%), limitando o número de peixes passíveis de inversão.

A produção de neomachos (fêmeas masculinizadas) foi de 20, 40 e 50%, respectivamente da maior para a menor dose de MT testadas, valores que representaram a porcentagem de fêmeas genotípicas (gônada feminina + gônada intersexual + gônada masculinizada) passíveis de serem masculinizadas, no entanto, diferenças significativas não foram observadas entre as doses (Tabela 1). Peixes intersexuais foram observados em todos os grupos tratados com MT.

Tabela 1. Classificação das gônadas de *Rhamdia quelen* (150 dias pós-eclosão) alimentados durante 21 dias com dieta comercial suplementada com diferentes doses de 17α-metiltestosterona (MT).

|  |  |
| --- | --- |
| Classificação das gônadas | Doses de MT (mg/kg de ração) |
| 0 (Controle) | 60 | 80 | 100 |
| Masculina | 20\* | 21\* | 20\* | 20\* |
| Feminina | 5 | 1 | 1 | 3 |
| Intersexual | 0 | 2 | 2 | 1 |
| Masculinizada | 0 | 3a | 2a | 1a |
| Indiferenciada\*\* | 5 | 3 | 5 | 5 |

\* Desvio significativo (*P* < 0,05) em favor dos machos (gônadas masculinas), considerando uma proporção esperada de 1:1 entre machos (gônadas masculinas) e fêmeas genotípicas (gônadas femininas + gônadas intersexuais + gônadas masculinizadas).

Letras sobrescritas idênticas indicam que a proporção de gônadas femininas masculinizadas não diferiu significativamente (*P* > 0,05; Teste de Fisher) entre as doses.

\*\* Peixes com gônadas indiferenciadas foram excluídos de todas as análises estatísticas.

Ainda que em populações selvagens de *R. quelen* a proporção sexual esteja balanceada (1:1) (BALDISSEROTO et al., 2010), no presente estudo uma maior frequência de machos (72% das gônadas sexadas) foi encontrada na descendência proveniente de reprodutores selvagens, condição também registrada por Sulis-Costa et al. (2013) com a mesma linhagem de reprodutores. Como a descendência utilizada para o ensaio masculinizante apresentou fêmeas em menor frequência, um menor número de animais foi alvo efetivo do processo de inversão sexual. Apesar disso, a masculinização ocorreu em todas as doses de MT testadas.

Nas gônadas indiferenciadas de *R. quelen*, que representaram 15% do total de gônadas analisadas, a presença das células germinativas primordiais caracterizou o epitélio germinativo que dará origem as lamelas ovarianas ou aos túbulos seminíferos, delimitando o lúmen ovariano e testicular, respectivamente (MAZZONI, 2010). A presença de peixes com gônadas indiferenciadas aos 150 DPE sugere que seria necessário um período ainda maior para que todos os peixes apresentassem o sexo fenotípico definido nas condições ambientais apresentadas. Entretanto, o fato desta condição também ocorrer no tratamento controle, no qual os peixes não foram expostos a MT, demonstra que não há relação com as doses de MT testadas.

Davis et al. (1990) mostraram que a duração eficiente para a inversão sexual foi de 21 dias após o início da alimentação exógena em *Ictalurus punctatus*, uma outra espécie de Siluriformes. Para *Tachysurus fulvidraco*, o período de diferenciação sexual, conhecido como período lábil, no qual as gônadas indiferenciadas apresentam capacidade de resposta à ação de esteroides (PIFERRER, 2001), ocorre entre o 8 e 30° DPE, apresentando maior duração nas fêmeas (PARK et al., 2004). Em *Salvelinus fontinalis* o período lábil ocorre antes e é mais longo quando comparado com a maioria dos salmonídeos, que normalmente apresentam este período do 18 ao 28º DPE (HAFFRAY et al., 2009).

Como o período lábil para *R. quelen* não está identificado, uma menor frequência de peixes invertidos poderia ser esperada, entre outros fatores, se a administração da dieta suplementada com MT não abrangesse todo este período. Neste ensaio masculinizante, entretanto, foi utilizado o mesmo tempo de tratamento aplicado por Amaral Júnior et al. (2008) na feminilização direta de *R. quelen* por suplementação dietética com 17β-estradiol (21 dias a partir da primeira alimentação exógena), no qual foram produzidas 79% de fêmeas na melhor dose testada (100 mg/kg de ração).

A presença de peixes com gônadas intersexuais em todas as doses masculinizantes pode ser um indicativo de que o período lábil do *R. quelen* não foi completamente abrangido pela administração do hormônio. Por outro lado, as gônadas poderiam estar no meio do processo de inversão, ou seja, seria necessário um período maior do que 150 DPE para que a inversão sexual fosse completada nas condições experimentais utilizadas. Além disso, as gônadas intersexuais podem decorrer de doses abaixo do ideal ou de doses muito elevadas de hormônio, sendo que no último caso normalmente também se observa a presença de indivíduos estéreis (PANDIAN e SHEELA, 1995). Apesar de a intersexualidade gonadal ser observada também em machos expostos a MT (KANG et al., 2008), as análises histológicas das gônadas de *R. quelen* mostraram que o tecido gonadal intersexual foi proveniente de gônadas femininas, devido à presença de lamelas ovarianas, semelhante ao que foi reportado para *Morone saxatilis* (SCHUTZ e HARRELL, 1999).

A administração de MT por via oral foi capaz de induzir a masculinização em *R. quelen*, sendo que os peixes invertidos apresentaram tamanho e condição similar ao dos outros peixes no momento da retirada das gônadas. Através da histologia foi possível observar que as gônadas masculinizadas apresentaram lamelas ovarianas preenchidas com espermatogônias e espermatócitos, ou seja, apresentaram exclusivamente células da linhagem germinativa masculina. A eficácia das doses testadas, entretanto, foi menor do que a encontrada para outras espécies de interesse comercial, como *Oreochromis niloticus* (SHELTON et al., 1981).

**4- CONCLUSÃO**

Considerando-se a eficácia das diferentes doses utilizadas e a preocupação com o meio ambiente relacionado a aplicação de hormônio, recomenda-se 60 mg de MT/kg de ração como a dose mais indicada para a masculinização de fêmeas de *R. quelen* nas condições experimentais utilizadas.

# 5- AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelas bolsas de estudo do primeiro e do segundo autor e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento deste estudo (Projeto Universal 486868/2013-3).

# 6- REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AMARAL JUNIOR, H.; NUNES, M.F.S.; GARCIA, S. Análise de diferentes dosagens de hormônio na ração, para definição de um protocolo de feminilização do jundiá *Rhamdia quelen*. **Rev Electrón Vet**; v.25(12), p.1-7, 2008.

BALDISSEROTO, B.; RADÜNZ NETO, J.; BARCELLOS, L.G. Jundiá (*Rhamdia* sp.). In BALDISSEROTO, B.; GOMES, L.C. Espécies nativas para piscicultura no Brasil. Santa Maria: UFSM, 2010. p.301-333.

BAROILLER, J.F.; GUIGUEN, Y.; FOSTIER, A. Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. **Cell Mol Life**, v.55, p.910-931, 1999.

DAVIS, K.B.; SIMCO, B.A.; GOUDIE, C.A.; PARKER, N.C.; CAULDWELL, W.; SNELLGROVE, R. Hormonal sex manipulation and evidence for female homogamety in channel catfish. **Gen Comp Endocrinol**; v.78, p.218-223, 1990.

DONALDSON, E.M.; DEVLIN, R.H. Uses of biotechnology to enhance production. In Pennell W, Barton BA, editors. Developments in Aquaculture and Fisheries Science: Principles of Salmonid Culture. Amsterdam: Elsevier; 1996. p.969-1020.

DUNHAN, R.A. **Aquaculture and Fisheries Biotechnology: Genetic Approaches**. Wallingford: CABI; 2004.

EL-SAYED, A.F.M. **Tilapia culture**. Cambridge: CABI Publishing; 2006.

FEIST, G.; YEOH, C.; FITZPATRICK, M.S.; SCHRECK, C.B. The production of functional sex-reversed male rainbow trout with 17α-methyltestosterone and 11 β-hydroxyandrostenedione. **Aquaculture**, v.13, p.145-152, 1995.

GHIRALDELLI, L.; MACHADO, C.; FRACALOSSI, D.M.; ZANIBONI-FILHO E. Desenvolvimento gonadal do jundiá, *Rhamdia quelen* (Teleostei, Siluriformes), em viveiros de terra, na região Sul do Brasil. **Acta Sci Biol Sci**, v.29, p.349-356, 2007.

HAFFRAY, P.; PETIT, V.; GUIGUEN, Y.; QUILLET, E.; RAULT, P.; FOSTIER, A. Successful production of monosex female brook trout *Salvelinus fontinalis* using gynogenetic sex reversed males by a combination of methyltestosterone immersion and oral treatments. **Aquaculture**, v.290, p.47-52, 2009.

KANG, I.J.; YOKOTA, H.; OSHIMA, Y.; TSURUDA, Y.; SHIMASAKI, Y.; HONJO, T. The effects of methyltestosterone on the sexual development and reproduction of adult medaka (*Oryzias* *latipes*). **Aquat Toxicol**, v.87, p.37-46, 2008.

MAZZONI, T.S.; GRIER, H.J.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I. Germline cysts and the formation of the germinal epithelium during the female gonadal morphogenesis in *Cyprinus carpio* (Teleostei: Ostariophysi: Cypriniformes). **Anat Rec**, v.293, p.1581-1606, 2010.

PANDIAN, T.J.; SHEELA, S.G. Hormonal induction of sex reversal in fish. **Aquaculture**, v.138, p.1-22, 1995.

PANDIAN, T.J. Sex Reversal. In PANDIAN, T.J., editor. Endocrine sex differentiation in fish. Florida: CRC Press; 2013. p.175-212.

PARK, I.S.; KIM, J.H.; CHO, S.H.; KIM, D.S. Sex differentiation and hormonal sex reversal in the bagrid catfish *Pseudobagrus fulvidraco* (Richardson). **Aquaculture**, v.232, p.183-193, 2004.

PIFERRER, F. Endocrine sex control strategies for the feminilization of teleost fish. **Aquaculture**, v.197, p.229-281, 2001.

SCHUTZ, J.R.; HARRELL, R.M. Use of sex reversal in striped bass to create an all-male population. **N Am J Aquac**, v.61(2), p.97-106, 1999.

SHELTON, W.L.; RODRIGUES-GUERRERO, D.; LOPES-MACIAS, J. Factors affecting androgen sex reversal of Tilapia aurea. **Aquaculture**, v.25(1), p.59-65, 1981.

SILVEIRA, F.S.; SILVA, F.M.; CASACA, J.M. Desempenho catarinense na piscicultura de água doce 2014. Florianópolis: EPAGRI/CEDAP; 2014.

SILVEIRA, J.; SILVA, C.P.; CARGNIN-FERREIRA, E.; ALEXANDRE, D.; ELIAS, M.A.; FRACALOSSI, D.M. Freshwater catfish jundiá (*Rhamdia quelen*) larvae are prepared to digest inert feed at the exogenous feeding onset: physiological and histological assessments. **Fish Physiol Biochem**, v.39, p.1581-1590, 2013.

SULIS-COSTA, R.; JIMENEZ, J.E.; WEINGARTNER, M.; NUÑER, A.P.O. Efeito da temperatura da água na fase inicial de vida e na proporção sexual do jundiá. **Bol Inst Pesca**, v.39(4), p.379-388, 2013.

WOYNAROVICH, E.; HORVÁTH, L. The artificial propagation of warm-water finfishes: a manual for extension. FAO Fisheries Technical Paper, n.201; 1980.

ZAR, J.H. **Biostatistical analysis**. New Jersey: Prentice Hall; 2010.