

EFETOS DA ABLAÇÃO DA GLÂNDULA ANDROGÊNICA NO CRESCIMENTO E NA REVERSÃO SEXUAL DE MACHOS DO CAMARÃO DE ÁGUA DOCE *MACROBRACHIUM ROSENBERGII* (DE MAN).

AMIR SAGI¹, EVYATAR SNIR² E SÉRGIO ZIMMERMANN³

RESUMO - O experimento descreve os efeitos resultantes da ablação da glândula androgênica (andrectomia) na reprodução, no crescimento e no desenvolvimento das gônadas em camarões de água doce do gênero *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). Foram selecionados camarões machos imaturos, tão logo apresentavam papila genital aparente. Esses animais foram submetidos à ablação bilateral da glândula androgênica e cresceram até a maturidade em compartimentos individuais. Os machos andrectomizados não desenvolveram quelas azuis e genitália características de machos normais. Foi observado amplo espectro de anormalidades no desenvolvimento das gônadas dos animais andrectomizados: testículos de tamanho reduzido; animais intersexo com testículos e com ovários

(“ovotestículos”); desenvolvimento de ovários anormais lobulados; e “neofêmeas” (machos transformados em fêmeas funcionais que fizeram postura de óvulos). Como resultado da andrectomia ocorreram reversões sexuais funcionais. O grau de feminização mais elevado foi obtido com machos andrectomizados mais jovens e com menor tamanho. O crescimento somático dos machos andrectomizados foi significativamente menor que o dos machos operados em simulação e muito semelhante ao crescimento de fêmeas normais.

Os resultados sugerem que a glândula androgênica afeta, direta ou indiretamente, o crescimento dos crustáceos, além de influir na determinação de sexo e no crescimento do tecido reprodutivo. Há necessidade de verificar a possibilidade de obtenção

1 - Department of Life Sciences, Ben Gurion University, P.O. Box 653, Ber Sheva, 84105, Israel.

2 - A. Sjölander, Industrigatan 5, S-112 46 Stockholm, Suécia.

3 - Setor de Aquacultura, Departamento de Zootecnia, Faculdade de Agronomia (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 7712 - 91.540-000 - Porto Alegre, RS.

de populações monossexos pelo cruzamento de machos normais com as "neo-fêmeas" (machos genéticos), obtidas por esta técnica.

Palavras-chave: aquacultura; camarão de água doce; glândula androgênica; *Macrobrachium rosenbergii*; reversão sexual.

EFFECTS OF ANDROGENIC
GLAND ABLATION ON
SOMATIC GROWTH AND SEX
REVERSAL IN
MACROBRACHIUM ROSENBERGII
(DE MAN) MALES

ABSTRACT - This article summarizes the effects of androgenic gland ablation (andrectomy) on reproduction, somatic growth and development of the gonads in *Macrobrachium rosenbergii* males. Immature males were selected as soon as their genital papillae were apparent. These males were subjected to bilateral androgenic gland ablation, and were grown to maturity in individual compartments. Andrectomized males did not develop the blue claws and genitalia which are characteristic of normal males. A wide range of abnormalities in gonadal development was observed in andrectomized males with development of reduced testes, intersex with partly testicular and partly ovarian gonad ("ovotestes"); development of abnormally lobulated ovaries, and "neo-females" in which egg laying took place. A complete, functional sex reversal may occur as a result of andrectomy, with a higher degree of feminization obtained in the

smallest and youngest andrectomized males. The somatic growth of andrectomized males was significantly lower than that of sham operated and normal males, and was very similar to that of normal females. The results suggest that the androgenic gland is affecting, either directly or indirectly, somatic growth in crustacea, in addition to its effect on sex determination and growth of reproductive tissue. These results indicate a need for further studies to verify the possibility of obtaining monosex populations from crossing of normal males with "neo-females" (genetic males) obtained by this technique.

Keywords: androgenic gland; aquaculture; freshwater prawn; *Macrobrachium rosenbergii*; sex reversal.

INTRODUÇÃO

A glândula androgênica, um órgão endócrino masculino dos crustáceos, foi primeiramente descrita por CRONIN (1947). Experimentação documentada da sua função, em relação à determinação de sexo e das características sexuais, foi conduzida uma década mais tarde, por CHARNIAUX-COTTON (1954, 1955, 1957). A feminização de machos andrectomizados de *Orchestia gammarella* e a masculinização de fêmeas implantadas com glândula androgênica foram descritos (para uma revisão sobre este assunto, consultar CHARNIAUX-COTTON e PAYEN, 1988; PAYEN, 1991). Ademais, vários níveis de masculinização foram

observados após a implantação das glândulas androgênicas ou injeção de extrato da glândula androgênica em fêmeas de diversos crustáceos (KATAKURA, 1961; NAGAMINE et al., 1980b; KATAKURA e HASEGAWA, 1983).

NAGAMINE et al. (1980a) foram os primeiros a registrar a reversão sexual em machos de *M. rosenbergii*. A andrectomia resultou em feminização, porém, sem capacidade reprodutiva dos machos andrectomizados (transformação numa "neo-fêmea" fértil). NAGAMINE et al. (1980a) e SAGI et al. (1990) notaram que, dentro de uma mesma desova, quanto menor era o macho andrectomizado, mais completa a reversão sexual obtida. Recentemente, SAGI e COHEN (1990) relataram uma reversão completa e funcional em machos andrectomizados de *M. rosenbergii*.

Não foram observadas diferenças entre machos e fêmeas de *M. rosenbergii*, na velocidade de crescimento até a maturação (RA'ANAN e COHEN, 1985). Entretanto, após a maturação, uma fração de machos cresce mais rápido: os animais maiores são geralmente machos (COHEN et al., 1981; TELECKY, 1982). KURIS et al. (1987) sugeriram que a glândula androgênica possa ter o papel no controle da velocidade do crescimento somático. SAGI e COHEN (1990) mostraram que machos de *M. rosenbergii* andrectomizados atingiram somente metade do peso médio atingido por machos operados em simulação.

Neste trabalho, descrevem-se o crescimento somático, as características sexuais secundárias e a reprodução de

machos andrectomizados, bem como uma variedade de diferentes níveis de desenvolvimento gonadal nos machos andrectomizados, desde o desenvolvimento de testículos reduzidos, às gonadas de intersexo (parte testicular e parte ovarianas) bem como os ovários lobulados até as "neo-fêmeas" completamente funcionais.

MATERIAL E MÉTODOS

Pós-larvas de *M. rosenbergii* foram adaptadas à água doce e cultivadas durante dois meses em tanques com 1m³ de capacidade, conectado a um biofiltro, mantidos a uma temperatura de 28 °C. A cada três dias retiravam-se os animais, cuja papila genital masculina estava claramente aparente (peso médio de 0,96 gramas). A andrectomia foi realizada em 25 animais, de acordo com as técnicas descritas por NAGAMINE et al. (1980a). Os animais controle foram 25 fêmeas normais, 25 machos intactos e 25 machos, que sofreram uma operação simulada. Os camarões foram colocados em gaiolas plásticas cilíndricas verticais (30 cm de diâmetro) no interior de aquários de vidro (100 x 37 x 39 cm). Cada aquário foi equipado com um biofiltro e um termostato/aquecedor, que manteve a temperatura entre 25 e 27°C. Cada gaiola possuía um cano plástico de 10 cm de diâmetro e 20 a 25 cm de comprimento o qual servia como abrigo para o camarão. Os animais foram alimentados diariamente, *ad libitum*, com alimento vivo (*Daphnia*) e ração artificial (25% de Proteína Bruta). Os animais foram pesados uma vez a cada mês. Diariamente, todos os animais experimentais foram

externamente examinados com a finalidade de detectar o desenvolvimento de gonoporos femininos e gônadas vitelogênicas (como foi descrito por SAGI e RA'ANAN, 1985). Ao final do experimento, os animais foram sacrificados e seu sistema reprodutivo foi examinado mediante cortes histológicos, com a finalidade de registrar a forma e o desenvolvimento do aparelho e das gônadas.

RESULTADOS

Taxa de crescimento de machos andrectomizados

O crescimento somático foi significativamente reduzido pela andrectomia ($17,3 \pm 1,96$ g) comparado com o crescimento apresentado pelos camarões machos operados com simulação, o qual foi duas vezes maior ($39,5 \pm 81,85$ g) no mesmo período de cultivo. A andrectomia afetou o tamanho das quelas (quelíceras) e o tamanho corporal. Na Figura 1, compara-se o crescimento de machos de *M. rosenbergii* andrectomizados com grupos de fêmeas normais e machos operados com simulação, cultivados como controle. Após 257 dias, os machos andrectomizados pesaram $17,3 \pm 1,96$ g, enquanto as fêmeas normais pesaram $14,7 \pm 0,73$ g. Não houve diferenças significativas no crescimento entre as fêmeas e os machos andrectomizados durante o período experimental.

Efeitos da andrectomia na morfologia externa

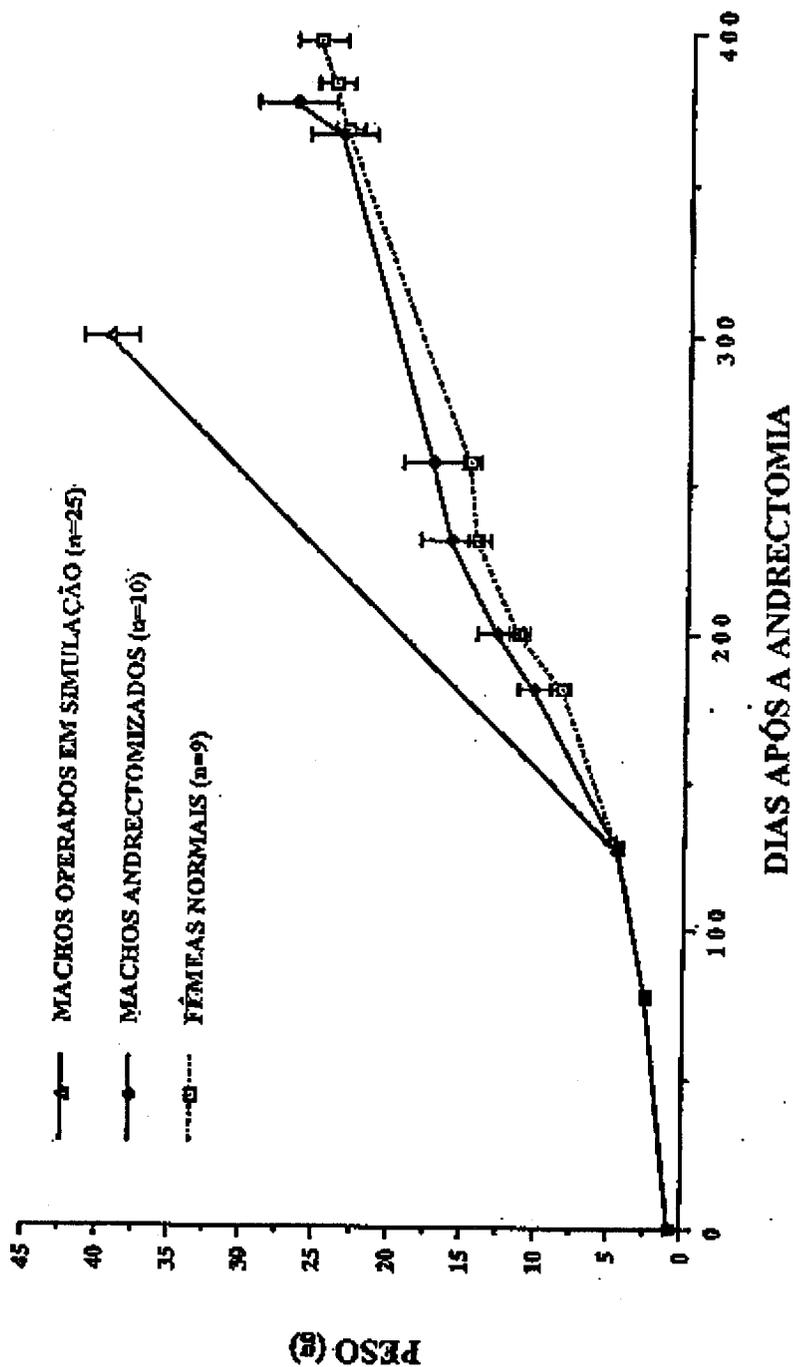
A maioria dos 50 machos do grupo controle (64%) - aqueles operados por

simulação e os que permaneceram intactos - desenvolveu-se até o morfotipo Quelas Azuis. Por outro lado, a maioria dos machos andrectomizados (48%) desenvolveu quelas que lembravam o morfotipo masculino Quelas Laranjas, e nenhum chegou ao morfotipo Quelas Azuis. Os camarões machos que sofreram operação simulada e os intactos desenvolveram quelas maiores em relação ao comprimento do corpo, o propodus cresceu mais em relação à carapaça e as quelas eram mais espinhosas que os machos andrectomizados. Os machos operados em simulação foram quase idênticos à aparência morfológica de Quelas Azuis, e os animais andrectomizados exibiram ampla diversidade de tamanho e características morfológicas.

Efeito sobre aspectos morfocitológicos e função reprodutiva

Nenhum dos animais andrectomizados desenvolveu papila genital masculina, enquanto o desenvolvimento normal da genitália foi observado em todos os demais machos (normais e operados em simulação), porém, cerca de 84% dos machos andrectomizados desenvolveram gônadas femininas, e o desenvolvimento funcional do sistema reprodutivo feminizado dos machos andrectomizados variou. A andrectomia resultou em ampla variação no desenvolvimento do sistema reprodutivo, desde machos com sistema reprodutivo presente mas não completamente desenvolvido, até casos nos quais o macho foi completamente convertido a uma fêmea madura ("neofêmea"), capaz de copular, reproduzir e carregar ovos e eclodir uma progênie viável.

FIGURA 1



Foram observadas várias anormalidades no desenvolvimento do sistema reprodutivo. Em diversos casos, a forma da gônada lembrava um testículo normal de macho de *M. rosenbergii*, entretanto, era menos desenvolvido e menor que o normal, e o duto espermático era menor e com menos curvas. Esses machos não desenvolveram nem genitália masculina nem quaisquer características externas femininas. Em outros casos, parte das gônadas desenvolvem-se em tecidos semelhantes a ovários, contendo a “gema”, enquanto o resto da gônada lembrava um tecido testicular. Nesses animais não foram constatados oócitos no tecido semelhante ao ovário, nem dutos espermáticos ou ovidutos. Os

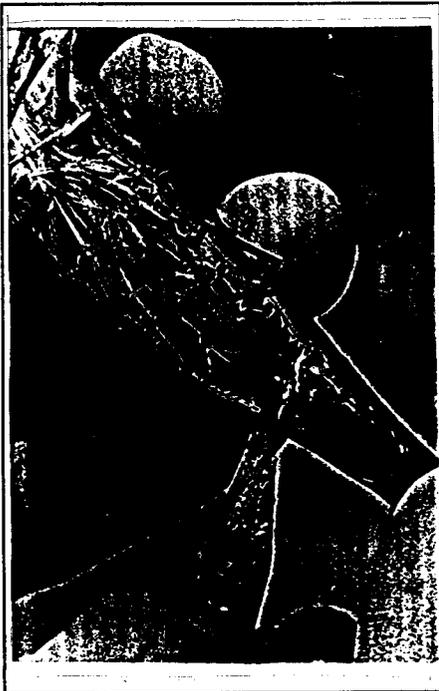


FIGURA 2

ovários dos indivíduos que sofreram reversão sexual, desenvolvendo todas as características secundárias femininas, foram em muitos casos mais lobulados que os encontrados em fêmeas normais. Os ovidutos estavam presentes e foram observados oócitos vitelogênicos, com um diâmetro de até 500 μm .

A reversão sexual completa, por meio da qual o macho tornou-se uma fêmea funcional, ocorreu em 44% dos machos andrectomizados sobreviventes. A “neo-fêmea”, mostrada na Figura 2, foi cruzada com um macho operado em simulação, ambos da mesma ninhada. Os ovos fertilizados (flexa) eclodiram, produzindo uma progênie viável. Essas 11 “neo-fêmeas” passaram por um período de 32 maturações gonadais, durante o período de 5 meses, e, em 15 ocasiões (46,9%), os ovos foram chocados e eclodiram. Por outro lado, 40% dos machos andrectomizados desenvolveram gônadas lobuladas pequenas e anormais, localizadas numa posição mais posterior e ventral que nas fêmeas normais, além de nunca terem liberado óvulos.

DISCUSSÃO

A remoção da glândula androgênica de camarões machos de *M. rosenbergii* causa mudanças das características sexuais secundárias, diminuição na velocidade de crescimento e pode desenvolver gônadas femininas funcionais (NAGAMINE et al., 1980a; SAGI et al., 1990). Essas últimas, “neo-fêmeas”, são geneticamente machos, e podem ser cruzadas com machos normais, produzindo óvulos férteis. O

primeiro efeito observado após a andrectomia foi a diferenciação anormal das quelas, confirmando os resultados anteriormente obtidos por NAGAMINE et al. (1980a) e SAGI et al. (1990). As quelas dos machos andrectomizados eram diferentes daquelas dos dois morfotipos maduros, os machos Quelas Laranjas e os machos Quelas Azuis, descritos por RA'ANAN e COHEN (1985). Lembavam, entretanto, estágios anteriores à diferenciação morfotípica dos machos (machos pequenos e machos Quelas Laranjas Fracos), de acordo com a descrição de KURIS et al. (1987).

NAGAMINE et al. (1980a) mostraram que o desenvolvimento das características sexuais secundárias femininas ocorreu quando a andrectomia era realizada em machos juvenis. Entretanto, esses autores não estudaram a diferenciação morfotípica dos machos andrectomizados, nem estudaram o desenvolvimento do ovário, postura e eclosão larval. SAGI et al. (1990) mostraram que a andrectomia de machos maduros, embora iniba a diferenciação no tipo dominante com Quelas Azuis, não causa o desenvolvimento gonadal em ovário feminino. O desenvolvimento completo do ovário feminino e de características sexuais secundárias (como a câmara de receptáculo de esperma) depende, provavelmente, da ausência da glândula androgênica antes do período crítico do comprometimento da gônada (NAGAMINE et al., 1980a; KATAKURA, 1989), bem como da presença de outros fatores secretados quando do desenvolvimento do ovário (NAGAMINE e KNIGHT, 1987). A maioria dos animais andrectomizados

desenvolveu ovário feminino; entretanto, menos de 50% dos animais desenvolveram ovários completamente funcionais que resultassem em postura de óvulos e desenvolvimento larval normal. As desigualdades na função dos ovários podem ser resultantes das diferenças na idade ou tamanho do macho na época da operação ou do insucesso na completa remoção da glândula.

Os machos de *M. rosenbergii* andrectomizados apresentaram taxa de crescimento menor, quando comparados aos machos operados em simulação (SAGI e COHEN, 1990). Mostraram crescimento semelhante a fêmeas normais. As diferenças entre animais de rápido crescimento (machos com operação simulada) e animais de crescimento relativamente lento (machos andrectomizados e fêmeas normais) (Figura 1) evidenciam a existência de fatores diretos ou indiretos da glândula androgênica no crescimento somático.

Entre juvenis de *M. rosenbergii*, que são indivíduos de crescimento mais veloz numa população, ocorre a relação normal de machos:fêmeas de 1:1. No entanto, em uma população adulta, a fração da população de crescimento rápido consiste quase que somente de machos (RA'ANAN e COHEN, 1985; SNIR, não publicado). O fato de as diferenças nas taxas de crescimento entre machos e fêmeas não serem notadas em juvenis, mas somente nas populações adultas, sugere que o fator da glândula androgênica, que afeta o crescimento ou não é secretado durante o estágio de juvenil ou seu efeito no crescimento, não seja expresso em juvenis.

MALECHA et al. (1992) registraram reversão sexual de fêmeas de *M. rosenbergii* em machos funcionais, mediante implantação da glândula androgênica em juvenis. Neste experimento e nos anteriores (SAGI e COHEN, 1990), registrou-se a reversão sexual funcional de machos de *M. rosenbergii* pela remoção da glândula androgênica. Em ambos os casos, camarões sexualmente revertidos foram cruzados com machos normais. A progênie originada desse cruzamento parece apoiar a hipótese de que o sexo é determinado, cromossomicamente, em certos Malacostracos, sendo a fêmea heterozigótica (ZW) e o macho, homozigótico (ZZ) (CHARNIAUX-COTTON, 1962; KATAKURA, 1989; SUZUKI e YAMASAKI, 1991). No caso de *M. rosenbergii* e de outros crustáceos cultivados, esses resultados estimulam a continuação de pesquisas, pois a reversão sexual, que permitirá o cultivo de populações 100% masculinas, possui grande importância comercial, uma vez que os machos crescem mais rapidamente e atingem pesos superiores, em dado período de tempo (SAGI et al., 1986; HULATA et al., 1988).

Este estudo oferece uma nova maneira de aumentar a produção do *M. rosenbergii*, mediante manipulação dos sistemas endócrino e genético que regulam o crescimento e o desenvolvimento. Se a produção de populações de *M. rosenbergii* 100% masculinas for atingida, espera-se o crescimento da produção por área e por tempo. Tais aumentos em produção foram demonstrados em experimentos de viabilidade, os quais precederam o deste trabalho. Esses estudos incluíram

populações monossexo separadas visualmente e cultivadas em gaiolas (SAGI et al., 1986), em monocultivo em viveiros escavados (COHEN et al., 1988) e em policultivo com tilápias e carpas (HULATA et al., 1988). Todos os estudos mostraram que as populações exclusivamente masculinas resultaram em maior produção. A relação machos:fêmeas e o desempenho no crescimento da progênie dos animais revertidos deverão ser posteriormente estudados em *M. rosenbergii* e em outros crustáceos cultivados, nos quais o macho cresce mais que as fêmeas.

Os registros dos diversos papéis regulatórios da glândula androgênica sugerem que os fatores da glândula androgênica, se administrados a populações cultivadas, poderão afetar a morfogênese e aumentar o crescimento. A extração e a purificação dos hormônios de crescimento e de reprodução da glândula androgênica serão buscadas no futuro.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Dr. Dan Cohen e à Empresa APT (Israel) Ltda., bem como à FAPERGS e ao CNPq, pelo apoio dado a este estudo. Gostaríamos também de agradecer à Sra. Tikva Zino, pela assistência técnica no trabalho de campo, e à Prof. Ema Magalhães Lebouté (UFRGS), pela revisão crítica deste manuscrito.

LITERATURA CITADA

- 1 - CHARNIAUX-COTTON, H. Decouverte chez un crustace amphipode (*Orchestia gammarella*) d'une glande endocrine responsable de la

- differentiation des caracteres sexuels primaires et secondaires males. C.R. Acad. Sci., Paris, v. 239, p. 780-782, 1954.
- 2 - CHARNIAUX-COTTON, H. Le determinisme hormonal des caracteres sexuels d'*Orchestia gammarella* (crustace amphipode). C.R. Acad. Sci., Paris, v. 240, p. 1487-1489, 1955.
 - 3 - CHARNIAUX-COTTON, H. Croissance, regeneration et determinisme endocrine des caracteres sexuels d'*Orchestia gammarella* (Pallas) (Crustacea amphipode). Ann. Sci. Nat., v. 19, p. 411-559, 1957.
 - 4 - CHARNIAUX-COTTON, H. Androgenic gland of crustaceans. Gen. Com. Endocrinol., Suplemento I, p. 241-247, 1962.
 - 5 - CHARNIOUX-COTTON, H., PAYEN, G. Crustacean Reproduction. In: LAUFER, H., DOWNER, R.G.H. Endocrinology of Selected Invertebrate Types. New York, 1988, p. 279-304, 1988.
 - 6 - COHEN, D., RA'ANAN, Z., BRODY, T. Population profile development and morphotypic differentiation in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). J. World Maricul. Soc., v. 12, n. 2, p. 231-243, 1981.
 - 7 - COHEN, D., SAGI, A., RA'ANAN, Z. et al. The production of *Macrobrachium rosenbergii* in monosex populations. III. Yield characteristics under intensive monoculture conditions in earthen ponds. Israeli J. Aquacult. Bamidgheh, v. 40, n. 2, p. 57-63, 1988.
 - 8 - CRONIN, L.E. Anatomy and histology of the male reproductive system of *Callinectes sapidus* Rathbun. J. of Morphol., v. 81, p. 209-239, 1947.
 - 9 - HULATA, G., KARPLUS, I., WOHLFARTH, G.W. et al. The production of *Macrobrachium rosenbergii* monosex populations. II. Yield characteristics in polyculture ponds. Israeli J. Aquacult. Bamidgheh, v. 40, p. 9-16, 1988.
 - 10 - KATAKURA, Y. Hormonal Control of development of sexual characters in the Isopod crustacean, *Armadillidium vulgare*. Annot. Zool. Jap., v. 34, n. 2, p. 60-71, 1961.
 - 11 - KATAKURA, Y. Endocrine and genetic control of sex differentiation in the Malacostacan Crustacea. Invert. Reprod. Devel., v. 16, p. 177-182, 1989.
 - 12 - KATAKURA, Y., HASEGAWA, Y. Masculinization of females of the Isopod crustacean, *Armadillidium vulgare*, following injections of an active extract of the androgenic gland. Gen. Comp. Endocrinol., v. 48, p. 57-62, 1983.
 - 13 - KURIS, A.M., RA'ANAN, Z., SAGI, A. et al. Morphotypic differentiation of male Malaysian giant prawns, *Macrobrachium rosenbergii*. J. Crust. Biol., v. 7, n. 2, p. 219-237, 1987.
 - 14 - MALECHA, S.R., NEVIN, A.P., HA, P. et al. Sex-ratios and sex-determination in progeny from crosses of surgically sex-reversed freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii*. Aquaculture, v. 105, p. 201-218, 1992.
 - 15 - NAGAMINE, C.M., KNIGHT, A.W. Induction of female breeding characteristics by ovarian tissue implants in androgenic gland ablated male freshwater prawns *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) (Decapoda, Palaemonidae). Invert. Reprod. Devel., v. 11, p. 225-234, 1987.
 - 16 - NAGAMINE, C.M., KNIGHT, A.W., MAGGENTI, A. et al. Effects of androgenic gland ablation on male primary and secondary sexual characteristics in the Malaysian prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) (Decapoda, Palaemonidae) with first evidence of induced feminization in a nonhermaphroditic decapod. Gen. Comp. Endocrinol., v. 41, p. 423-441, 1980a.
 - 17 - NAGAMINE, C.M., KNIGHT, A.W., MAGGENTI, A. et al. Masculinization of female *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) (Decapoda, Palaemonidae) by androgenic gland implantation. Gen. Comp. Endocrinol., v. 41, p. 441-452, 1980b.
 - 18 - PAYEN, G.G. Roles of androgenic gland hormone in determining the sexual characters in crustacea. In: GUPTA, A.P. Morphogenetic hormones of Arthropods, New Brunswick, New Jersey: Rutgers University Press, 1991. p. 431-452.
 - 19 - RA'ANAN, Z., COHEN, D. Ontogeny of social structure and population dynamics in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). In: WENNER, A.M. Crustacean Issues 3, Factors in adult growth, Rotterdam, Boston: A.A. Balkema, 1985. p. 277-311.

- 20 - SAGI, A., COHEN, D. Growth, maturation and progeny of sex-reversed *Macrobrachium rosenbergii* males. World Aquaculture, v. 21, n. 4, p. 87-90, 1990.
- 21 - SAGI, A., COHEN, D. Rapid identification of reproductive state and the receptive period of females in pond populations of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) - a new technique. Aquaculture, v. 51, p. 265-275, 1985.
- 22 - SAGI, A., RA'ANAN, Z., COHEN, D. et al. Production of *Macrobrachium rosenbergii* in monosex populations: Yield characteristics under intensive monoculture conditions in cages. Aquaculture, v. 51, p. 265-275, 1986.
- 23 - SAGI, A., COHEN, D., MILNER, Y. Effect of androgenic gland ablation on morphotypic differentiation and sexual characteristics of male freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. Gen. Comp. Endocrinol., v. 77, p. 15-22, 1990.
- 24 - SUZUKI, S., YAMASAKI, K. Sex-reversal of male *Armadillidium vulgare* (Isopoda, Malacostraca, Crustacea) following andrectomy and partial gonandrectomy. Gen. Comp. Endocrinol., v. 83, p. 375-378, 1991.
- 25 - TELECKY, T.M. The proportion of runt-fertilized females in two captive populations of *Macrobrachium rosenbergii* and the behaviour of runts associated with courting bull and female. Reno, Nevada, University of Nevada, 1982. 50p. (Tese M.S.).