

# Manejos de gametas e embriões exigem programação hormonal

Danilo P. Streit Jr., Jayme A. Povh e Darci C. Fornari\*

A cadeia de produção de qualquer espécie zootécnica começa, necessariamente, pela oferta das “sementes”; no caso da cadeia produtiva do pescado, dos alevinos. Logo, a importância deste setor é crucial ao estabelecimento de todo o processo. Explanamos a seguir sobre o manejo de gametas e embriões de peixes que necessitam de indução hormonal para a sua propagação. Embora a descoberta da indução hormonal remonte os anos 1930, por meio do pesquisador Rodolph von Ihering, o desenvolvimento

de protocolos de indução hormonal foi fundamental para que hoje mais de 30% da produção zootécnica de peixes seja de origem nativa. Este fato ocorreu no início dos anos 1980, quando foi repassado ao Brasil o modelo de produção de alevinos para as espécies silvestres, baseado no pacote de reprodução, desenvolvido para a carpa comum (*Cyprinus carpio*).

Naquele momento, houve a formação de recursos humanos (técnicos de diferentes níveis de formação) para a replicação da

técnica e posterior produção em massa, especialmente às espécies: tambaqui (*Collossoma macropomum*); pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e curimba (*Prochilodus lineatus*). Ao longo das duas décadas seguintes houve pouca evolução quanto ao manejo de gametas e embriões das espécies nativas, inclusive não sendo desenvolvidas metodologias que considerassem a diferença de comportamento reprodutivo da carpa comum com as espécies sul-americanas de piracema.

FIGURA 1 | EXTRUSÃO DE FÊMEA TAMBAQUI COM BOA FLUIDEZ, COLORAÇÃO E BRILHO DE OÓCITOS; PISCICULTURA BOA ESPERANÇA, PIMENTA BUENO, RO, 2012



SIMONE FORNARI OLIVEIRA

Somente a partir do início dos anos 2000 foram retomadas as pesquisas sobre manejo reprodutivo, especialmente pelos seguintes fatos: demanda de alevinos em grande quantidade pelo setor de crescimento/engorda; estímulo governamental, a partir do Ministério da Pesca e Aquicultura; grande número de alevinos utilizados no repovoamento de rios e lagos, em diferentes regiões do Brasil. Todavia, a retomada das pesquisas com reproduções de peixes teve como foco os processos mais elaborados – a criopreservação para bancos de germoplasma –, e não o desenvolvimento e aprimoramento de protocolos do manejo para a obtenção de gametas e embriões, por exemplo.

**OBTENÇÃO DE GAMETAS**

As espécies nativas reofílicas precisam de indução hormonal para a liberação de gametas. Assim, no Brasil é amplamente difundida a extrusão dos gametas obtidos para a utilização reprodutiva, através do extrato de hipófise. Todavia, a partir dos anos 1990 iniciou-se a difusão do GnRH-a (Gonadotropin-releasing hormone agonist) que, no país, é comercializado com o nome de Ovopel, como uma alternativa econômica eficiente e menos agressiva fisiologicamente para o peixe, embora algumas espécies nativas ainda apresentem um comportamento reprodutivo refratário a este produto.

A qualidade dos gametas é fundamental para o desenvolvimento das técnicas *in vitro*. Pesquisas têm relatado que o estresse sofrido pelos reprodutores durante o manejo para a liberação dos gametas afeta sua qualidade, especialmente as fêmeas. Em um estudo recente com tambaquis, foi possível constatar que a boa qualidade do gameta feminino (oócitos) (Figura 1) é crucial para a fertilização, relegando a um segundo plano a importância dos espermatozoides.

**FIGURA 2 | PAILLETES DE 0,25 ML SENDO ENVASADOS COM SÊMEN + SOLUÇÃO CRIOPROTETORA À BASE DE GEMA DE OVO E GLICOSE E DMSO, COMO CRIOPROTETOR; DUKE ENERGY, SALTO GRANDE, SP, 2005**



DANILO PEDRO STREET JR.

**FIGURA 3 | BOCA DE UM BOTIJÃO TIPO DRY SHIPPER COM RACKS ALOCADAS EM UM ÚNICO CANECO PARA O RESFRIAMENTO DO SÊMEN, CARACTERIZANDO A PRÉ-CRIOPRESERVAÇÃO; DUKE ENERGY, SALTO GRANDE, SP, 2005**



DANILO PEDRO STREET JR.

**FIGURA 4 | BOTIJÃO DE ESTOCAGEM DE SÊMEN CRIOPRESERVADO A -196 °C EM NITROGÊNIO LÍQUIDO; DUKE ENERGY, SALTO GRANDE, SP, 2005**



DANILO PEDRO STREET JR.

## CRIOPRESERVAÇÃO

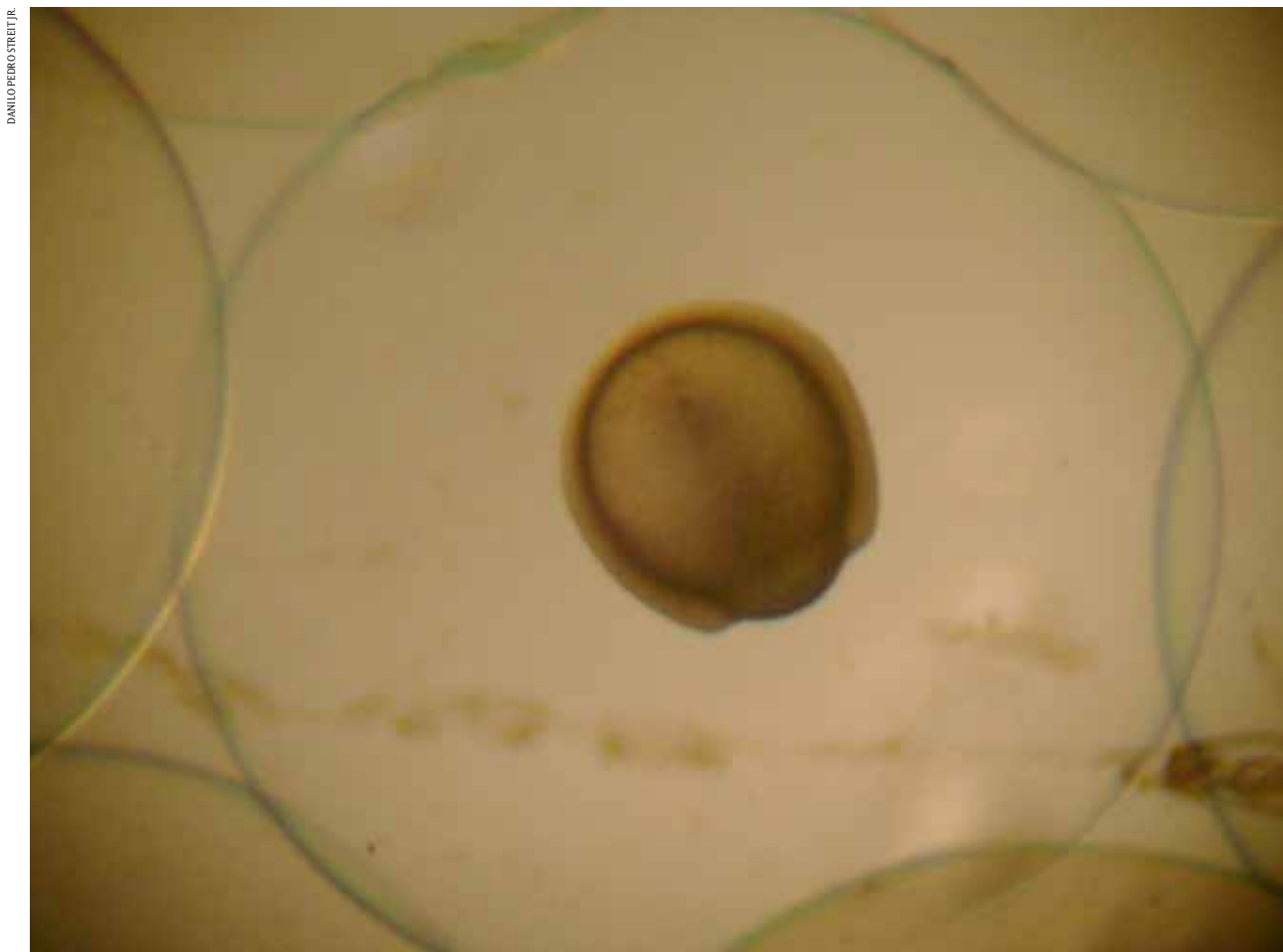
Os espermatozoides de peixes, quando liberados, estão imóveis no líquido seminal. Ao entrar em contato com a água, imediatamente inicia-se uma intensa movimentação atingindo o seu máximo de motilidade já em poucos segundos. Em geral, nos peixes de escamas sul-americanos, de água doce, este processo dura em torno de 60 segundos, podendo, no entanto, superar os 120 segundos nos siluriformes (bagres). Logo, quando se pretende manter este sêmen resfriado e/ou criopreservado por um maior período para poder utilizá-lo quando for necessário, deve-se diluí-lo em um meio aquoso, mas que o mantenha imóvel. Para tanto, utilizam-se substâncias que possuam a mesma osmolaridade do sêmen.

Para compor este diluente são necessários um crioprotetor intracelular e outro extracelular, pois o sêmen vai ser submetido a temperaturas inferiores a zero grau Celsius; além de um componente que contribua para a manutenção energética dos espermatozoides, pois, mesmo resfriados, eles mantêm a atividade basal de gasto energético. No Brasil, o meio diluente mais utilizado é composto por gema de ovo + glicose + crioprotetor interno, que pode ser o DMSO (dimetil-sulfóxido) ou o metanol, dependendo da espécie. Tem sido utilizado, com sucesso, o meio diluente desenvolvido para suínos, que substitui o tradicional ovo + glicose, conhecido como BTS (Beltsville Thawing Solution), adicionado de um crioprotetor interno.

Em geral, quando o destino é a criopreservação para banco genético, dilui-se na relação 1 : 3 ou 1 : 4 sêmen : solução crioprotetora em pailletes de 0,25 ou 0,5 mL (Figura 2). Em seguida, o *paillet* é fixado na *rack* e submergido em um botijão conhecido como *dry shipper* (Figura 3); após 24 horas o material é transferido para um botijão de estocagem com nitrogênio líquido a -196 °C (Figura 4).

Os resultados alcançados atualmente com aplicação destas técnicas variam em função da espécie do peixe, da técnica (resfriamento ou criopreservação) e da composição da solução crioprotetora. Utilizando o sêmen diluído com uma solução fisiologicamente ajustada e resfriado, é possível manter os espermatozoides ativos por pelo menos quatro dias

FIGURA 5 | EMBRIÃO DE PACU EM ESTÁDIO DE BLASTOPÓRO, MOMENTO IDEAL PARA O RESFRIAMENTO; DUKE ENERGY, SALTO GRANDE, SP, 2005



DANILO PEDRO STREIT JR.

– como ocorre para o pacu e o curimba –, ou por mais de dez dias, no caso da piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). Uma vez criopreservado, o material pode ser mantido por tempo indefinido.

### RESFRIAMENTO DE EMBRIÕES

Como alternativa à criopreservação de embriões de peixes, é viável a utilização do resfriamento que foi desenvolvido a partir de protocolos utilizados com espermatozoides. Do ponto de vista prático, utilizar embriões resfriados seguramente é mais restrito do que criopreservados em função do curto período de viabilidade. Todavia, possibilita um manejo emergencial, quando não há um número suficiente de incubadoras para serem utilizadas, pois é possível deixar os embriões na geladeira e proceder ao transporte refrigerado rápido (de até seis horas) sem perdas na taxa de eclosão. Um exemplo prático desse manejo é a obtenção de embriões em locais remotos e seu transporte até o laboratório onde serão produzidas as larvas.

O protocolo de resfriamento para embriões de espécies sul-americanas é composto por um crioprotetor externo (sacarose) e um crioprotetor interno (metanol), ambos diluídos em água, sempre utilizando o embrião em estádio pré-fechamento do blastopóro (Figura 5). Em estudos realizados com curimba, dourado (*Salminus maxillosus*) e cascudo (*Rhinelepis aspera*), foi possível obter um percentual elevado de larvas eclodidas submetidas ao resfriamento a -8 °C, após seis horas, e com pacu por até 12 horas. Ocorreram registros de sobrevivência com embriões de pacu por até 24 horas, sugerindo que é possível manter os embriões vivos por um período maior que o tempo que este levaria para se desenvolver, entre 16 a 19 horas, em temperatura adequada, 26 a 29 °C, respectivamente.

Atualmente, os trabalhos que estão sendo desenvolvidos com gametas femininos convergem para a criopreservação de tecido ovariano. Este material


é criopreservado e, depois de descongelado, reimplantado em outro animal. Os resultados têm sido animadores e abrem uma nova frente de aplicação no setor produtivo. Enquanto os programas de melhoramento genético têm avançado com as espécies, como o tambaqui e a cachara, os reprodutores melhorados passaram a apresentar valores individuais elevados, em função do seu potencial de retransmissão de carga genética para os descendentes. Logo, a garantia de manutenção das características genéticas, mesmo após a morte do reprodutor, é extremamente valiosa.

### BANCO DE SÊMEN

Tem sido dada prioridade à composição do banco de germoplasma, que considera a origem genética – no caso, o grau de consanguinidade – dos animais que serão utilizados como doadores de sêmen. O primeiro passo é realizar uma avaliação genética dos possíveis doadores por PCR (polymerase chain reaction), através de microsátélites. Em seguida, é elaborado o mapeamento do grau de consanguinidade, sinalizando o distanciamento genético entre os doadores de sêmen. Se neste mapa for identificada a presença de irmãos, não há necessidade de criopreservar o sêmen de mais de um desses indivíduos, pois eles terão a mesma carga genética.

Diferentemente do que o ocorre em outras espécies zootécnicas, os bancos de germoplasma em peixes desenvolveram-se com a intenção básica de preservação ambiental. Nos últimos quatro anos, os bancos de sêmen foram aplicados de forma intensiva para o desenvolvimento de dois projetos de produção exclusivamente zootécnica; um público (Projeto Aquabrasil) e outro privado. No projeto público, a utilização do sêmen congelado foi a alternativa escolhida quanto a custos para transporte de material genético, visando à execução do programa de melhoramento genético do tambaqui e da cachara. Neste caso, foi necessário transportar

sêmen de Mato Grosso para Rondônia, e vice-versa, assim como para Amazonas e Tocantins. O programa foi construído sobre um cruzamento entre uma fêmea e dois machos; logo, o sêmen utilizado era transportado de um local para outro, e não os reprodutores.

No programa privado, a utilização do banco foi a alternativa encontrada para a produção de alevinos do híbrido de cachara e jundiá amazônico (*Leiarius marmoratus*). Neste caso, a empresa importou sêmen de animais do estado de Rondônia e produziu o híbrido no estado de Mato Grosso, para a engorda em tanques escavados. No ano de 2010/2011 foram utilizadas mais de 5 mil doses de sêmen do jundiá amazônico e a expectativa é que esse número de doses tenha aumentado na estação reprodutiva de 2011/2012. Quando se pretende manusear (criopreservar ou resfriar) o sêmen ou os oócitos, é preciso trabalhar com o máximo de qualidade deles. Isto implica alimentação prévia dos reprodutores, boa qualidade das soluções a serem empregadas para os processos de manipulação e redução do estresse dos reprodutores, entre outros fatores. 

\* **Danilo P. Streit Jr.** é professor do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) (danilo.streit@ufrgs.br); **Jayme A. Povh** é professor do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Mato Grosso/Rondonópolis (UFMT) (jayme.peixegen@gmail.com); **Darci C. Fornari** é doutor pela UEM, responsável técnico pela empresa Delicious Fish (darci.peixegen@gmail.com).

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- LOPES, T. S.; ROMAGOSA, E.; STREIT JR., D. P. et al. Cooling of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) embryos at various stages of development for 6 or 10 hours. *Theriogenology*, v. 75, 2011, 570-576p.
- STREIT JR., D. P.; DIGMAYER, M.; RIBEIRO, R. P. et al. Embriões de pacu submetidos a diferentes protocolos de resfriamento. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 42, n. 8, 2007, 1199-1202p.
- VIVEIROS, A. T. M.; GODINHO, H. P. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian fresh water fish species: a review. *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 35, 2009, 137-150p.