

Manejo e sanidade de peixes em cultivo

Marcos Tavares-Dias
Organizador

Embrapa Amapá
Macapá
2009

Capítulo 3

Criopreservação de sêmen de peixes no contexto do agronegócio da piscicultura

Alexandre Nizio Maria, Hymerson Costa Azevedo & Paulo César Falanghe Carneiro

Resumo

O conhecimento sobre o armazenamento de sêmen de peixe vem avançando desde a década de 50. Neste artigo são apresentadas técnicas de processamento e armazenamento de sêmen de peixes, abordando sua importância como ferramenta tanto para programas de melhoramento genético de espécies de interesse econômico quanto para iniciativas de re-estabelecimento de populações em ambientes em recuperação. Informações sobre as particularidades do sêmen das diversas espécies de peixes permitem a padronização da técnica, definindo com isso os componentes dos crioprotetores e meios diluentes, bem como os procedimentos adequados para o congelamento e descongelamento. Avanços nessa área permitem a criação de importantes bancos de sêmen de peixes nativos, criando inclusive uma nova perspectiva para o agronegócio da piscicultura.

Abstract

The knowledge on fish semen storage has been improved since the beginning of the 1950 decade. This paper presents techniques on fish semen process and storage, indicating its importance as a tool either for aquaculture genetic programs or maintenance of genetic diversity of fish populations that are endangered. Information about particularities on semen of different fish species allow the advance on techniques as cryoprotectants and extenders determinations, as well as adequate procedures and rates for semen freezing and thawing. Improvements in this area are of interest to promote the creation of important gene banks for native fish species. Advances in this area allow the creation of semen banks of native fishes and induce a new perspective to the commercial fish culture sector.

Introdução

A criopreservação é uma técnica que se utiliza de temperaturas extremamente baixas para manter a estrutura e funcionalidade de células e tecidos vivos, conservando-os geneticamente viáveis e reversivelmente inertes do ponto de vista metabólico (Pegg, 2007). O primeiro trabalho sobre congelamento de sêmen de peixe foi realizado por Blaxter (1953) para viabilizar o cruzamento de dois “tipos” de arenques que desovam em épocas diferentes do ano. Essa pesquisa, publicada há mais 50 anos, coincidiu com um sucesso semelhante em bovinos. Nos anos seguintes, uma indústria multimilionária foi desenvolvida para o sêmen congelado de animais domésticos, enquanto que, apenas recentemente, a criopreservação de sêmen de espécies aquáticas parece estar na fase de transição entre a experimentação e o mercado (Tiersch, 2003).

A tecnologia de congelamento de sêmen de bovinos pode ser considerada madura nos dias atuais. Essa tecnologia tem sido adotada pelos programas de inseminação artificial em todo o mundo devido, em parte, aos seus benefícios econômicos como o aumento da disponibilidade de sêmen e redução nos custos com transporte e manutenção de plantéis de reprodutores. Uma tecnologia madura é aquela que já está em uso durante um período suficientemente longo e a maioria das suas falhas iniciais e problemas inerentes já foram reduzidos ou eliminados (Wikipedia, 2009). Podemos considerar a cronologia de desenvolvimento do mercado maduro de sêmen de bovinos leiteiros como uma trajetória teórica do ciclo de vida para um futuro mercado de sêmen de peixes criopreservado (Figura 1). Comparativamente, à criopreservação do sêmen de bovinos leiteiros e de outros animais domésticos que atingiram sua maturidade e tem sido utilizado em nível comercial, o estágio de desenvolvimento tecnológico de sêmen conservado de peixes estão em algum lugar entre a concepção e a infância (Caffey & Tiersch, 2000).

Atualmente, muitas são as técnicas de manipulação de sêmen já estabelecidas para várias espécies de peixes, com especial destaque para as famílias characidae, prochilodontidae, anastomidae (Viveiros & Godinho, 2009), cyprinidae (Billard et al., 1995), siluridae (Legendre et al., 1996) e salmonidae (Scott & Baynes, 1980). Mesmo assim, com exceção da truta arco-íris e o salmão do Atlântico, ainda há muitas questões básicas para serem respondidas no que tange às técnicas de conservação de sêmen de muitas espécies tropicais de interesse econômico e ambiental (Carolsfeld et al., 2003a).

O presente capítulo apresenta informações sobre a criopreservação de sêmen de peixes e, além disso, aborda sua importância como ferramenta na conservação dos recursos genéticos da ictiofauna bem como sua aplicação no agronegócio da piscicultura.

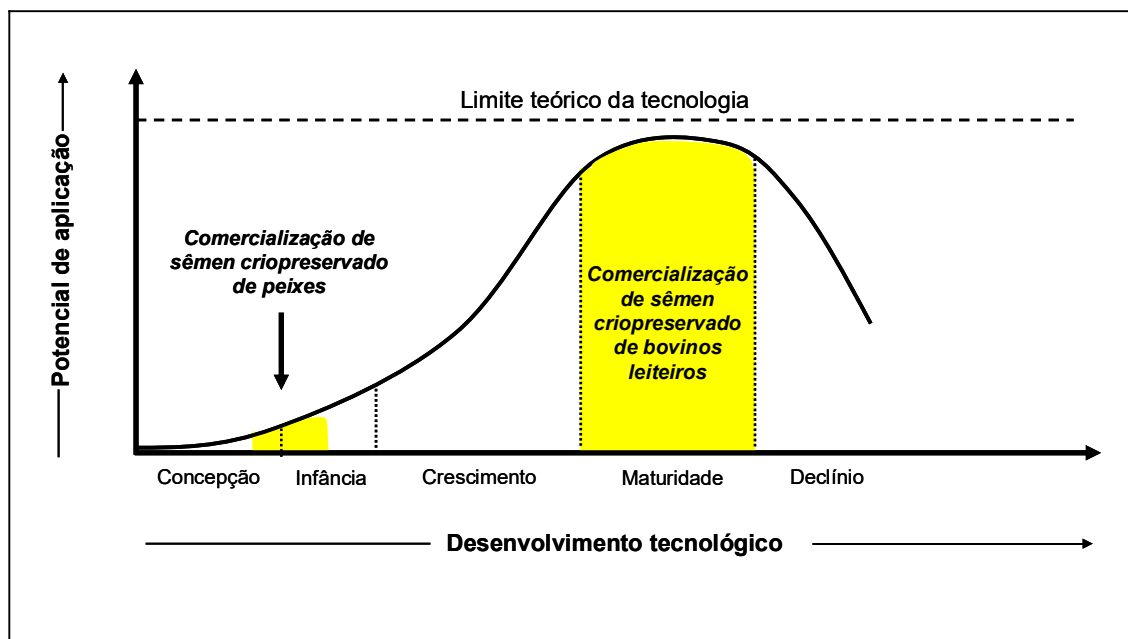


Figura 1. Estudo comparativo do ciclo de vida do mercado de sêmen criopreservado de bovinos e de peixe (Adaptado de Caffey & Tiersch, 2000).

A importância da conservação de sêmen de peixes para o agronegócio

No tocante ao agronegócio da piscicultura, há muitas vantagens no uso de técnicas de conservação de sêmen de peixes. Ao rever um pouco a história percebe-se que todas as espécies de animais e plantas tidas hoje como domesticadas passaram por um processo de cruzamentos iniciado e complementado continuamente com a participação de espécies silvestres. Os parentes silvestres das raças melhoradas têm genes necessários para o melhoramento continuado das espécies domesticadas de interesse econômico. Em vários casos eles oferecem genes para os quais não houve previsão de seu uso no presente, mas que podem ser importantes para a continuidade da produção de uma determinada espécie.

A manutenção de plantéis de reprodutores de peixes com a finalidade de gerar descendentes para a produção nas pisciculturas depende da constante renovação de seus indivíduos e atenção para se evitar os riscos do endocruzamento. Endocruzamento é o acasalamento entre indivíduos de parentesco próximo e que leva à homozigose, presença de apenas uma forma do gene para uma característica particular. A homozigose não é necessariamente um problema, sendo muitos dos caracteres importantes de animais domésticos dependentes de características homozigóticas relacionadas, por exemplo, ao crescimento e produção de leite. Porém, a

homozigose de formas deletérias de genes é prejudicial e o endocruzamento tem maior tendência a acumular esta condição do que o cruzamento entre indivíduos sem parentesco (Tave, 1986).

Em aquicultura, problemas de consanguinidade, por exemplo, podem ocorrer como resultado de cruzamento seletivo que seleciona genes de interesse particular pelo endocruzamento, reduzindo a diversidade genética. Uma forma de contornar esses problemas é pela conservação do sêmen a baixas temperaturas, seja na forma resfriada ou congelada em bancos de germoplasma, mantendo o tamanho efetivo da população sem a necessidade de manutenção de um grande número de reprodutores no plantel e possibilitando ainda a redução nos custos de produção.

Sob refrigeração, os espermatozóides de peixes podem ser armazenados por algumas horas ou dias, dependendo da espécie, enquanto que mantidos em temperaturas negativas podem ser estocados por muitos anos (Billard et al., 2004). A refrigeração do sêmen possibilita sua estocagem por aproximadamente 10 dias, facilitando os trabalhos de rotina dentro de um laboratório de reprodução induzida e favorecendo a concentração dos esforços para o trabalho com as fêmeas. Adicionalmente, trata-se de uma técnica simples e de baixo custo que pode ser implementada nas pisciculturas voltadas à produção de alevinos. A técnica de refrigeração possibilita também a redução dos custos de manutenção do plantel de reprodutores, bem como trocas de material genético entre laboratórios (Carneiro et al., 2006).

A conservação de sêmen por longos períodos, possível pela técnica de criopreservação, tem como uma finalidade importante guardar genes para aumentar a variabilidade genética de uma determinada população. Da mesma forma que uma população natural de peixes depende de elevada biodiversidade genética para aumentar suas chances de adaptação ao meio onde vive, um programa de melhoramento genético precisa dessa variabilidade para diminuir possíveis efeitos negativos causados por endocruzamentos e homozigoses (Fauvel et al., 1998; Carolsfeld et al., 2003b) e para transmitir à população genes que poderão ser responsáveis por características importantes como resistência a doenças e a mudanças climáticas.

O congelamento do sêmen de peixes com nitrogênio líquido apresenta algumas limitações técnicas quanto à sua utilização para a produção de alevinos em larga escala em função da necessidade de determinação de metodologias para o armazenamento de grandes volumes de sêmen. No Brasil a utilização de sêmen congelado como rotina nas estações de piscicultura ainda é pouco difundida ou inexistente na grande maioria dos laboratórios. Por outro lado, trata-se de uma técnica muito valiosa para a preservação de material genético que pode ser utilizado em programas de melhoramento de espécies de interesse econômico ou mesmo em laboratórios públicos ou privados de produção de alevinos.

A criopreservação na conservação de recursos genéticos

São muitas as razões que justificam o uso de técnicas para o armazenamento de sêmen de peixes do ponto de vista da conservação de recursos genéticos. A agressão sofrida pelo meio ambiente nos últimos anos, em especial os ambientes aquáticos, vem afetando diretamente as

populações de espécies nativas de peixes. Mesmo antes de uma espécie de peixe entrar para a lista daquelas ameaçadas de extinção, muitas de suas características genéticas originais podem ter sido modificadas visando a sua adaptação ao ambiente alterado. Com o passar de algumas poucas gerações, algumas características genéticas podem até serem perdidas. As estratégias de recuperação da ictiofauna de corpos d'água que passam por período de reversão de um processo de deterioração podem ser grandemente auxiliadas por ações prévias de colheita e conservação do sêmen sob baixas temperaturas (Rana, 1995).

O tema reveste-se de grande importância, principalmente em função do notório declínio dos estoques pesqueiros causado pelas mais diversas razões tais como: a sobrepesca, poluição, uso conflitante da água, construção de barragens e reservatórios, extrativismo, além da introdução indiscriminada de espécies exóticas no ambiente. Adicionalmente, as mudanças climáticas recentemente intensificadas pela emissão de gases na atmosfera certamente estão tendo e ainda terão efeito na perda ou descaracterização de algumas populações de peixes que não são adaptáveis às temperaturas mais quentes das águas. A redução no número de indivíduos de uma determinada população reduz também a sua variabilidade genética, fazendo com que sua capacidade de adaptação a novos ambientes seja diminuída. O armazenamento de sêmen de peixes por longos períodos de tempo é uma ferramenta importante que possibilita a manutenção da variabilidade genética de uma população para uso futuro. Sua utilização numa eventual tentativa de recuperação de uma população de peixes garante uma base genética mais ampla, produzindo indivíduos com maior capacidade de adaptação e menores chances de sucumbir diante das alterações causadas no meio ambiente (Carolsfeld et al., 2003b).

Biologia espermática de peixes

Os espermatozóides de peixes variam em estrutura (Jamieson, 1991), refletindo sua história evolutiva de mais de 550 milhões de anos (Janvier, 1999). Segundo Nagahama (1983), os espermatozóides podem ser morfológicamente subdivididos em cabeça, peça intermediária e cauda. A morfologia dos espermatozóides parece refletir o seu modo de fertilização. Na maioria dos grupos de peixes falta o acrossomo, que ocorre em todos os outros grupos de vertebrados. A carência do acrossomo é compensada pela presença da micrópila, um orifício no córion do ovo para a penetração do espermatozóide (Cosson et al., 1999).

Apesar de apresentar grandes diferenças entre algumas espécies, o sêmen da maioria dos peixes possui uma característica em comum que é a ativação da motilidade espermática pela água. Os espermatozóides não apresentam motilidade, isto é, não apresentam movimento quando estão dentro dos testículos. A fertilização dos ovócitos somente ocorre após a ativação da motilidade dos espermatozóides que se dará após seu contato com a água. Normalmente a ativação é irreversível e a motilidade tem duração muito curta de tempo, após o que o espermatozóide fica incapaz de fertilizar o ovócito. As reservas energéticas do espermatozóide são esgotadas rapidamente, sendo importante o conhecimento desse tempo para a espécie que está sendo trabalhada. Espermatozóides de salmão e truta nadam

vigorosamente por menos de um minuto ao passo que outras espécies como tilápias, dourado e a piracanjuba produzem sêmen que apresentam motilidade espermática de alguns minutos. Algumas espécies tropicais nativas de água doce de interesse econômico como o pintado, o curimatá, o matrinxã, o piaçu e o pacu apresentam tempo muito curto de motilidade, excedendo pouco mais de um minuto (Marques, 2001).

Durante os procedimentos de desova em laboratório é comum a retirada dos gametas "a seco", evitando o contato com a água. A adição da água é feita somente após a mistura dos gametas, aumentando com isso as chances dos espermatozoides fertilizarem os ovócitos dentro do curto tempo em que permanecem ativos. Para o armazenamento do sêmen sob baixas temperaturas, portanto, é importante que seu congelamento seja feito sem que ele seja ativado, sendo imprescindível evitar seu contato com a água ou mesmo a urina do peixe durante sua extração (Harvey & Carolsfeld, 1993).

No congelamento de sêmen, são utilizadas soluções crioprotetoras compostas de um diluidor e um agente crioprotetor, como serão relatados a seguir, e estas são geralmente constituídas de soluções aquosas. Contudo esta solução deve ser elaborada de modo a não ativar o sêmen, sendo mais comumente feita a adição de glicose para regular a sua pressão osmótica e evitar com isso a ativação do espermatozoide. Na prática o desenvolvimento de uma solução crioprotetora para uma determinada espécie de peixe necessita de ensaios para a avaliação dos seus eventuais efeitos tóxicos e sua influência sobre a integridade e funcionalidade espermática. Resumidamente, quando misturado ao meio diluidor, o sêmen não deve estar móvel, mas a sua ativação deve continuar sendo possível com a adição de água no momento da fertilização após o armazenamento e descongelamento (Ohta e Izawa, 1996).

O efeito do congelamento nas células espermáticas

Algumas informações básicas sobre criobiologia são necessárias para a compreensão das injúrias que acontecem durante o congelamento e descongelamento, bem como para encontrar forma de evitá-las. O congelamento, tanto muito lento quanto muito rápido, tende a ser prejudicial às células. Quando qualquer célula em meio aquoso é submetida a temperaturas entre -5 e -15°C, ocorre formação de gelo no meio externo (cristalização), entretanto o conteúdo celular permanece líquido e supergelado. O calor latente do processo de cristalização eleva a temperatura para o ponto de congelamento do meio, isto é, -5°C. Como parte da água do meio extracelular é transformada em gelo, o meio se torna cada vez mais concentrado (hiperosmótico) em relação às células. Numa tentativa de manter o equilíbrio, a água do meio intracelular sai das células. Portanto, os eventos físicos que acontecem na célula dependem da velocidade de congelamento (Medeiros et al., 2002; Viveiros, 2005).

Quando o congelamento é feito em ritmo adequado, há tempo suficiente para a desidratação da célula e a saída da água, evitando-se com isso a formação de cristais em seu interior. Porém, muitas vezes esse processo não ocorre dessa maneira e há a formação de cristais de gelo intracelulares responsáveis por injúrias irreversíveis na célula. Por outro lado, durante congelamento excessivamente lento, as células são expostas por

muito tempo aos chamados "efeitos de solução", isto é, a todas as características de mudanças da solução extracelular como: a cristalização do gelo, a concentração de sal e elevação da osmolaridade, a alteração do pH, as alterações das composições das soluções em consequência dos sais atingirem seu ponto de saturação e cristalização, além de todas as implicações celulares desses eventos (Senger, 1986; Watson, 1995).

Diferentemente das hemácias, células com alta permeabilidade que possibilita rápida desidratação, o espermatozóide necessita da adição de substâncias com ação crioprotetora para o seu congelamento adequado (Suquet et al., 2000). As substâncias adicionadas para exercer função crioprotetora direta sobre a célula espermática são divididas em crioprotetores intracelulares e extracelulares. O crioprotetor intracelular é uma substância química não tóxica ou com baixa toxicidade capaz de retirar a água da célula e diminuir a temperatura de congelamento no seu interior, diminuindo ou impedindo a formação de cristais de gelo internamente. O produto mais conhecido e utilizado em sêmen de peixe é o dimetilsulfóxido (DMSO). Porém, outras substâncias como o glicerol, metanol e metilglicol também têm sido usadas para algumas espécies (Suquet et al., 2000; Maria et al., 2006b).

Os crioprotetores extracelulares revestem a célula externamente e estabilizam sua membrana, diminuindo os danos provocados pelo congelamento. São exemplo de crioprotetores celulares os açúcares de um modo geral como a glicose, sacarose e trealose. De acordo com Denniston et al. (2000), o desempenho de um crioprotetor intracelular pode ser otimizado quando se associa crioprotetores de ação extracelular. Além de funcionar como fonte de nutrientes, a gema de ovo também tem ação crioprotetora por conter ácidos graxos e antioxidantes que auxiliam na proteção e conservação do espermatozóide (Carolsfeld et al., 2003b). Apesar disso, alguns pesquisadores não têm constatado benefícios no uso da gema de ovo em determinadas soluções crioprotetoras para sêmen de peixes, mostrando que existe uma importante interação deste componente com o diluidor utilizado (Maria et al., 2006a). Do ponto de vista sanitário é importante ressaltar que muitos países proíbem a comercialização e importação de sêmen diluído em diluentes com este componente biológico na sua composição.

O descongelamento é um procedimento inverso ao congelamento, porém que merece a mesma atenção. A velocidade de descongelamento do sêmen deve ser tal que permita a rehidratação celular, mas ao mesmo tempo seja breve o suficiente para evitar que pequenos cristais no interior da célula aumentem seus tamanhos durante esse processo e prejudiquem a célula. Como há muitas particularidades entre o sêmen das diferentes espécies de peixe, tanto a velocidade e temperatura de congelamento quanto de descongelamento devem ser determinadas após a condução de ensaios experimentais prévios (Fauvel et al., 1998; Billard et al., 2004).

Conservando o sêmen de peixes

A - Refrigeração

Os espermatozoides de peixes são apropriados para a conservação em curto prazo à temperatura de geladeira (0-6°C), primeiro porque que são

imóveis no plasma seminal, não requerendo fontes imediatas de energia para seu metabolismo, e segundo porque não sofrem choque térmico, sendo mais tolerantes a baixas temperaturas do que os espermatozóides de mamíferos (Bobe & Labbe, 2008). Os espermatozóides mantidos em baixas temperaturas, ao redor de 4°C, têm um baixo metabolismo e podem ser conservados por muitos dias em diluidores apropriados sem mudanças significantes na qualidade (Kime et al., 1996). Além disso, temperaturas abaixo de 6°C reduzem drasticamente o crescimento bacteriano sendo, portanto, mais indicadas no armazenamento de sêmen em relação àquelas mais elevadas (Bobe & Labbe, 2008).

Os diluidores são soluções de sais ou de carboidratos que ajudam a manter a viabilidade das células durante o resfriamento. Uma solução diluidora deve ser utilizada no processo de resfriamento porque a diluição diminui a competição dos espermatozóides por oxigênio (O₂) e espaço (Carolsfeld & Harvey, 1999). Além disso, o uso de diluidores pode estabilizar as condições físico-químicas durante a estocagem do sêmen, prolongando a viabilidade dos espermatozóides. Para que as soluções funcionem bem como diluidores, algumas condições são exigidas: devem ser isotônicas em relação ao sêmen ou possuírem tonicidade que não ative a motilidade espermática, serem estáveis ao longo do armazenamento especialmente em relação ao pH e serem estéreis, inócuas e inibidoras da proliferação microbiana. A taxa de diluição ou proporção sêmen: diluidor normalmente utilizada está entre 1:1 e 1:10 e varia em função da concentração espermática da espécie, ou seja, espécies com sêmen apresentando alta densidade de células requerem maior diluição. Avaliações adicionais de diluidores e condições de estocagem são necessárias antes que a refrigeração de sêmen se torne uma ferramenta de rotina no manejo dos machos e na fertilização dos ovócitos. No Brasil existem poucos trabalhos sobre refrigeração de sêmen dos peixes nativos, mas algumas pesquisas têm obtido resultados promissores (Maria et al., 2006ab; Carneiro et al., 2006; Viveiros et al., 2009b).

O desenvolvimento de protocolos de resfriamento de sêmen, principalmente de espécies nativas, tem mostrado peculiaridades espécies-específicas, tanto para a duração do período de estocagem quanto para os diluidores usados. Os fatores mais importantes que determinam o sucesso do resfriamento são: velocidade de redução da temperatura, fornecimento e troca de gases, prevenção da desidratação ou dessecação e prevenção do desenvolvimento bacteriano. A adição de antibióticos em concentrações apropriadas pode prolongar o tempo de estocagem dos espermatozóides refrigerados prevenindo as infecções bacterianas (Segovia et al., 2000).

B - Criopreservação

O congelamento de células vivas pode ser feito basicamente de duas formas, pelo uso do gelo seco (neve carbônica ou dióxido de carbono sólido) ou do nitrogênio líquido. O gelo seco mantém as células na temperatura -79°C enquanto que o nitrogênio líquido permite a manutenção da temperatura -196°C. Este último método apresenta-se como o melhor meio para conservação de sêmen de peixe, e sêmen de outros animais, por longos períodos de tempo, facilitando inclusive sua identificação e diminuindo o risco de contaminação do material. O congelamento em gelo seco é feito pela

colocação de pequenas porções de sêmen diluído, previamente resfriadas, diretamente sobre pequenos poços feitos no bloco de gelo seco, formando os chamados "pelletes" de sêmen. Trata-se de uma metodologia pouco utilizada atualmente, porém que possibilitou a geração de muita informação sobre as particularidades de várias espécies anteriormente ao advento do nitrogênio líquido (Blaxter, 1953).

Trabalhar com nitrogênio líquido exige cuidados especiais e o conhecimento de duas de suas propriedades básicas: a baixa temperatura e a alta taxa de expansão. Por estar na forma líquida em -196°C são necessários recipientes especiais para evitar grandes perdas por evaporação e equipamentos de proteção individual para sua manipulação como luvas e óculos. O fato de expandir-se rapidamente e ocupar volumes muito maiores quando na forma gasosa exige também que o recipiente que vai mantê-lo não seja lacrado totalmente. Nota-se, portanto, que o transporte de recipientes com nitrogênio líquido, normalmente representado por botijões especiais de diferentes tamanhos possui regulamentações internacionais por tratar de material perigoso. Atualmente para o transporte são utilizados botijões menores chamados de "dry shippers" que possuem material poroso absorvente na parede para reter o nitrogênio líquido, eliminando com isso o perigo de vazamento (Carolsfeld et al., 2003b).

Teoricamente a velocidade do metabolismo celular é nula a -196°C e o tempo de armazenamento podem ser ilimitados em condições ideais de estocagem, que inclui basicamente a manutenção adequada do nível do nitrogênio líquido dentro do botijão e o manuseio correto das doses de sêmen criopreservadas. Porém, existem inúmeros detalhes importantes que devem ser observados para o sucesso no armazenamento do sêmen por longos períodos, desde a sua incorporação à solução protetora adequada, seu correto resfriamento anteriormente ao congelamento, seu congelamento propriamente dito e finalmente seu descongelamento e utilização.

O preparo da solução crioprotetora envolve primeiramente a diluição do crioprotetor intracelular, a exemplo do DMSO ou metilglicol, em concentrações de 5 a 10% na presença de glicose, geralmente em 5% para aumentar a pressão osmótica da solução e evitar a ativação do espermatozóide. A gema de ovo pode participar como um crioprotetor extracelular e, quando utilizada, é adicionada à solução crioprotetora. Para espécies de peixes ainda pouco estudadas sugerem-se ensaios prévios envolvendo a observação da motilidade do espermatozóide em microscópio utilizando-se ativadores como NaCl a 0,3% ou NaHCO_3 a 1% antes e após sua incorporação à solução protetora. A proporção sêmen:diluidor normalmente utilizada está entre 1:3 e 1:10 e varia em função da concentração final requerida para a fertilização. Esta por sua vez leva em conta o número de ovos que se deseja fertilizar com cada dose armazenada individualmente.

No acondicionamento das amostras de sêmen é importante que se leve em consideração a taxa de congelamento e a identificação da amostra. Atualmente, alguns diferentes tipos de recipientes têm sido utilizados como criotubos plásticos, tubos de vidro e ampolas, e palhetas plásticas. As diferentes formas e materiais desses recipientes resultam em diferentes propriedades de transferência de calor durante o congelamento e descongelamento. Mesmo dentro de recipientes com o mesmo modelo,

diferenças podem existir entre os produtos de diferentes fabricantes, o que pode resultar em variação na taxa de congelamento e descongelamento (Yang & Tiersch, 2009). Portanto, é necessário padronizar o método de embalagem para garantir que os protocolos sejam replicados de forma similar nos diferentes laboratórios (Figura 2).

A forma mais utilizada para manipulação dessas doses para o armazenamento envolve o emprego de palhetas plásticas francesas de 0,5 mL que podem ser acondicionadas organizadamente nos botijões criogênicos (Figura 2). Esse tipo de recipiente utilizado no acondicionamento do sêmen apresenta uma série de vantagens como a possibilidade de enchimento e fechamento automatizado, identificação da amostra a exemplo da impressão permanente de rótulos alfanuméricos ou código de barras, proteção (biossegurança) da amostra pela vedação completa, facilidade de transporte e racionalização de espaço e padronização de todo o processo (Yang & Tiersch, 2009).

A organização no armazenamento é importante para evitar a retirada e possível descongelamento de palhetas erradas ou adicionais àquela de interesse. Para tanto são feitas identificações individuais nas palhetas que por sua vez são colocadas em globetes ou cassetes plásticos ou ainda em raques de alumínio e, por fim, armazenadas nas canecas (ou "canisters") dentro dos botijões criobiológicos (Ohta et al., 1997; Carolsfeld et al., 2003b; Billard et al., 2004).

A adição da solução crioprotetora ao sêmen pode ser feita suavemente nos próprios tubos graduados utilizados para a sua coleta, sendo que a homogeneização e envase é facilitada utilizando-se tubos de ensaio de 15 mL. O envase pode ser realizado logo após a diluição à temperatura ambiente ou após a refrigeração. O sêmen geralmente é refrigerado até a temperatura de 5°C em gelo ou geladeira e em seguida congelado posicionando-se as palhetas em rampas horizontais e expondo-as inicialmente ao vapor e posteriormente à imersão direta no nitrogênio líquido para posterior armazenamento. Atualmente tem sido utilizada, com muito sucesso em várias espécies, a automatização do processo de refrigeração e congelamento com grandes vantagens na uniformização e controle de qualidade do sêmen criopreservado. Na automatização, após a diluição e envase em temperatura ambiente, o sêmen é colocado em máquinas com curvas de resfriamento e congelamento previamente programadas. Muitas dessas etapas podem ser eliminadas ou simplificadas quando for utilizado o "dry shipper" para algumas espécies, introduzindo-se as palhetas diretamente nos botijões após breve refrigeração e envase do sêmen diluído. Na vitrificação, técnica ainda em fase de desenvolvimento e expansão na tecnologia de sêmen é utilizada altas taxas de resfriamento e aquecimento, fundamentalmente removendo-se anteriormente o máximo possível de água das células através da adição de elevadas concentrações de crioprotetores o que induz a solidificação das células e previne a formação de cristais de gelo intra e extracelulares. De qualquer forma, o procedimento para criopreservação de sêmen deve ser padronizado previamente para cada espécie de peixe para definição da taxa de resfriamento mais adequada (Ohta & Izawa, 1996; Carolsfeld et al., 2003b).

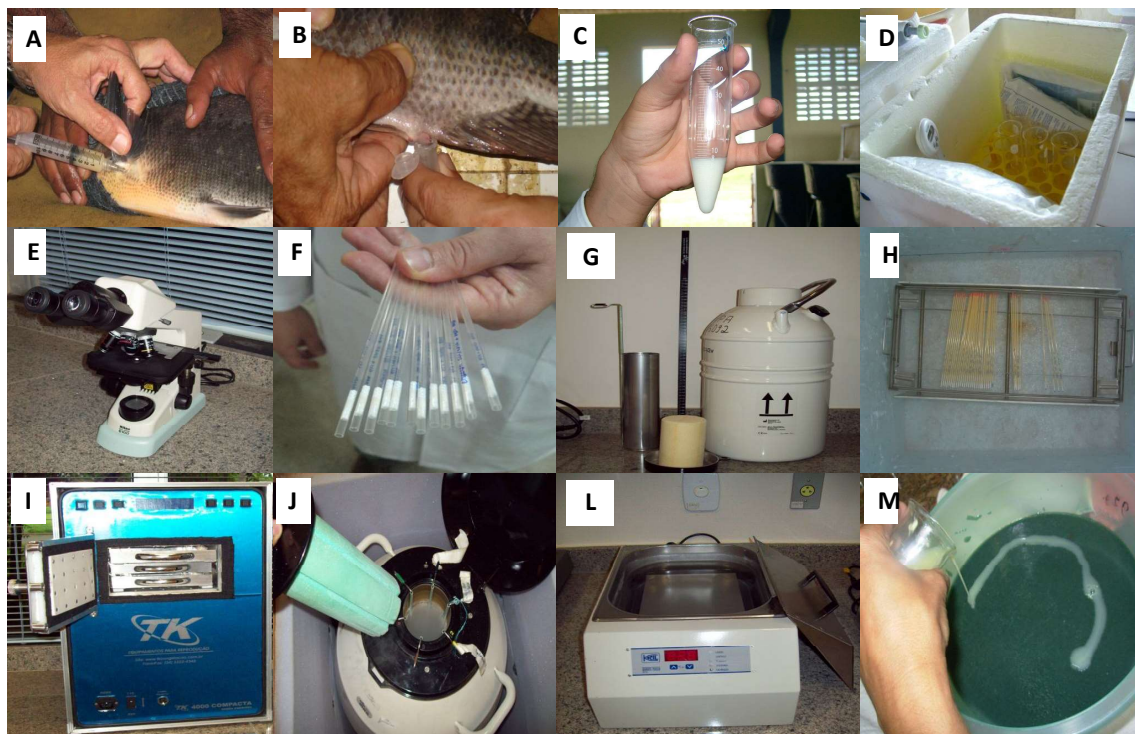


Figura 2. Ilustração do roteiro utilizado durante a coleta, processamento, congelamento e descongelamento de sêmen de peixes até o momento da fertilização dos óvulos. (A) Indução hormonal da espermição. (B-C) Coleta do sêmen dos machos em frascos limpos e secos por meio de suave massagem abdominal. (D) Manutenção do sêmen sob refrigeração (4-6°C) até o processamento das amostras para o congelamento. (E) Verificação da qualidade do sêmen ao microscópio. A diluição do sêmen em soluções crioprotetoras é feita em seguida. (F) Palhetas para acondicionamento do sêmen diluído durante procedimentos de criopreservação. Congelamento do sêmen no vapor de nitrogênio líquido utilizando botijões tipo “dry shipper” (G), caixa de isopor (H) ou ainda em máquinas automatizadas específicas para congelamento de sêmen (I), onde se pode programar a velocidade de congelamento. (J) Armazenamento das amostras de sêmen congelado em botijões com nitrogênio líquido. (L) Banho-Maria utilizado para o descongelamento da amostra de sêmen vinda do botijão criobiológico por ocasião da fertilização. (M) Adição de sêmen descongelado em óvulos para posterior fertilização com a adição da solução ativadora da motilidade espermática.

Da mesma forma é importante também a determinação da taxa de descongelamento para uso do sêmen após o período de armazenamento em nitrogênio líquido. As palhetas normalmente são descongeladas por imersão em água no banho-maria. O sêmen congelado, ao ser retirado do botijão de nitrogênio líquido, deve ser imerso na água quente (45-60°C) por poucos segundos (3-8) para que descongele uniformemente. Com macropalhetas ou

criotubos maiores, por exemplo, este processo se torna mais difícil porque o descongelamento não é uniforme, ou seja, a superfície descongela mais rápido que a porção central.

O procedimento de fertilização de ovos que se segue após o descongelamento do sêmen deve ser bem organizado para que o sêmen descongelado seja rapidamente misturado aos ovócitos e os espermatozóides ativados pela adição de água ou solução ativadora (Billard et al., 2004; Suquet et al., 2000). O procedimento de fertilização não deve ser demorado, pois a qualidade dos ovócitos diminui rapidamente após a desova. Em *Salminus brasiliensis*, por exemplo, as taxas de eclosão diminuíram de 80% para 5% em apenas 30 minutos após a desova, quando os ovos são mantidos em temperatura ambiente (24 a 26°C) (Viveiros & Godinho, 2009).

Perspectivas futuras

No Brasil, há razões que apontam para um futuro onde será possível o emprego de sêmen criopreservado de peixes em atividades de rotina dos laboratórios de produção de alevinos. Os procedimentos de reprodução de nossas espécies reofílicas como o surubim, o matrinxã, o tambaqui, além de muitas outras, estão fundamentados na retiradas dos gametas, fertilização artificial e incubação dentro de estruturas que permitem alto grau de controle, diferentemente do que ocorre na indústria norte americana do bagre do canal, onde não há manipulação dos gametas separadamente, nem mesmo a fertilização artificial. No Brasil, os produtores de alevinos estão acostumados com uma rotina de laboratório onde os procedimentos lembram a inseminação artificial em bovinos, guardadas às devidas proporções. Essa analogia nos permite predizer que a utilização de sêmen criopreservado nos laboratórios de reprodução de peixes no Brasil está muito mais próxima do que o observado nos Estados Unidos e nos demais países onde a piscicultura encontra-se em estágio de desenvolvimento mais avançado. Esta comparação é possível, pois estes países utilizam, em muitos casos, espécies que não tem a fertilização artificial como prática de rotina de produção.

Um outro ponto importante que contribui para a incorporação da técnica de criopreservação de sêmen pela cadeia produtiva da piscicultura, é o fato da criação comercial de peixes ser relativamente nova em nosso País, tornando-se mais fácil a absorção de novas tecnologias por parte do setor produtivo, quando comparado às cadeias produtivas mais consolidadas e tradicionais.

Um dos entraves para a comercialização de sêmen de peixes nativos no Brasil é a necessidade de determinação de protocolos eficazes de manipulação e processamento desse material, o que exige conhecimento aprofundado das considerações feitas neste trabalho. Para melhorar o processo de desenvolvimento desses protocolos, maior ênfase deve ser dada na padronização das etapas e parâmetros que seguem: coleta e diluição do sêmen, determinação dos diluentes e crioprotetores, tempo de equilíbrio, taxas de resfriamento e descongelamento e proporção espermatozóides: ovo nos testes de fertilização (Mongkonpunya et al., 2000). A replicação de protocolos de criopreservação de sêmen de espécies nativas disponíveis na literatura não é uma tarefa fácil. Dados sobre a viabilidade pós-descongelamento são altamente heterogêneos mesmo comparando-se

estudos realizados dentro de uma mesma espécie como os demonstrados na Figura 3 (Bedore, 1999; Carolsfeld et al., 2003b; Streit Junior et al., 2006) nos quais os autores congelaram amostras de sêmen com a mesma solução crioprotetora, mas mesmo assim obtiveram resultados bastante divergentes, comprovando a necessidade de padronização da metodologia.

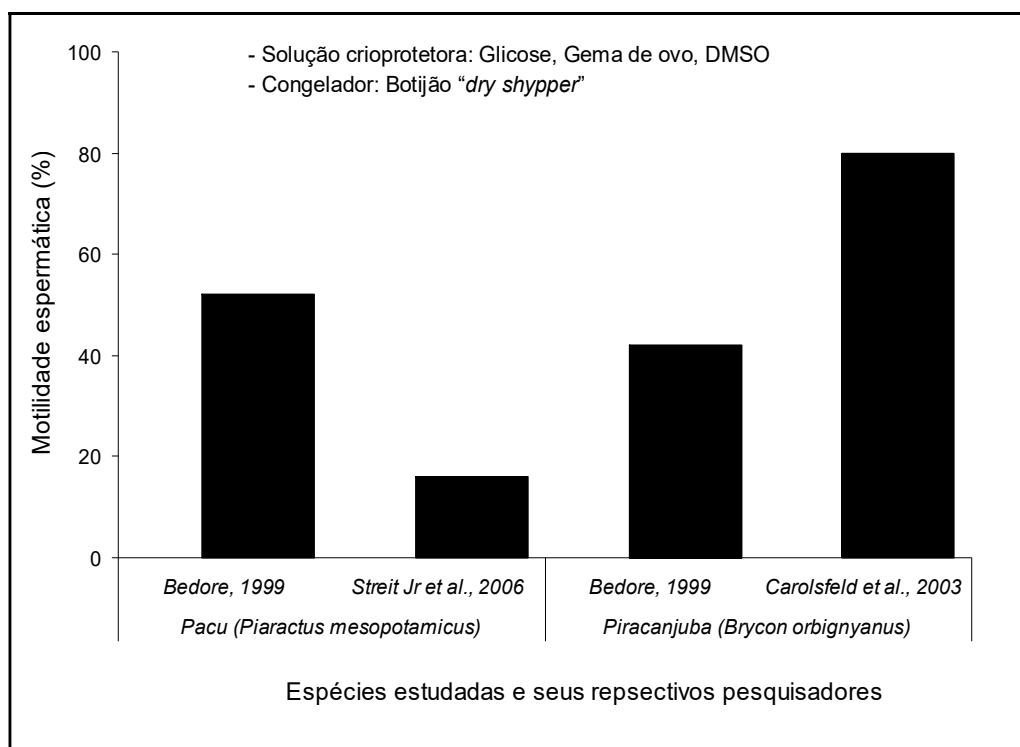


Figura 3. Variação na motilidade espermática pós-descongelamento no sêmen de duas espécies nativas brasileiras, em diferentes estudos.

Muitas são as perguntas que tem que ser respondidas, entre elas, como congelar a célula espermática de uma espécie brasileira conhecendo-se muito pouco sobre sua biologia? É necessário adquirirmos conhecimento sobre a biologia e fisiologia espermática básica e também conhecermos as características seminais ao longo do período reprodutivo para não realizarmos experimentações baseadas em tentativa e erro ou utilizarmos resultados de outras espécies. A variação sazonal da atividade espermatogênica provoca variações na quantidade e qualidade dos espermatozóides, assim como, a variação entre indivíduos provoca diferenças na fisiologia e composição bioquímica do sêmen (Fickel et al., 2007). Mudanças na qualidade

espermática em relação ao período de coleta têm sido relatadas não só em algumas espécies de peixes (Rana, 1995; Rouxel et al., 2008), mas também em mamíferos (Holt et al., 2005; Blottner et al., 2006) e anfíbios (Cabada, 1975).

Outro entrave atual no avanço das ações voltadas à comercialização de sêmen de peixes no Brasil é a necessidade de se trabalhar com um produto diferenciado com elevado valor agregado. O mercado demanda animais com desempenho zootécnico superior e melhor adaptados ao ambiente do cativeiro. Assim, torna-se imperativa a necessidade de linhagens de animais produzidos por programas de melhoramento genético para justificar o estabelecimento da comercialização de sêmen de peixes em nosso país. No final de 2008 foi iniciada a primeira ação voltada ao estabelecimento de um programa de melhoramento genético em nível nacional para o tambaqui que, em breve estará atendendo outras espécies nativas de interesse comercial com o surubim. O programa conta com muitas instituições de pesquisa e ensino, como também a participação da iniciativa privada, e tem como horizonte a geração das primeiras linhagens de animais melhorados disponíveis aos produtores em 5-6 anos. A importância das técnicas de criopreservação de sêmen de peixes é notória para o bom andamento do programa de melhoramento genético por facilitar e reduzir os custos nas transferências de material genético necessárias entre os locais onde suas atividades são desenvolvidas. Porém, a padronização e refinamento das técnicas de criopreservação serão fundamentais quando o sêmen de animais melhorados geneticamente estiver disponível para o agronegócio da piscicultura. Com o devido planejamento, as instituições de pesquisa nacionais podem, em alguns anos, estar prontas para fornecer ao setor produtivo a tecnologia necessária para estimular o surgimento de um novo segmento do agronegócio da piscicultura nacional representado por empresas privadas voltadas à comercialização de sêmen de peixes de alto desempenho zootécnico.

Referências

-
- BEDORE, A. G. 1999. *Característica e conservação do sêmen de Pacu-Caranha (Piaractus mesopotamicus) e de Piracanjuba (Brycon orbignyanus)*. 53f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- BILLARD, R.; COSSON, J.; CRIM, L. W.; SUQUET, M. 1995. Sperm physiology and quality. In: BROMAGE, N.R.; ROBERTS, R. J. (Ed.). *Broodstock management and egg and larval quality*. Cambridge: Cambridge University Press, Cambridge, p.53-76.
- BILLARD, R. J.; COSSON, S. B.; NOVEIRI, M. 2004. Cryopreservation and short-term storage of sturgeon sperm, a review. *Aquaculture*, 236:1-9.
- BLAXTER J. H. S. 1953. Sperm storage and cross fertilization of spring and autumn spawning herring. *Nature*, 172:1189-1190.
- BLOTTNER, S.; WAGENER, A.; SCHÖN, J.; GÖRITZ, F.; FICKEL, J. 2006. Reproductive fitness in roe bucks (*Capreolus capreolus*): seasonal timing of testis function. *Eur. J. Wildl. Res.*, 52:9-13.

- BOBBE, J.; LABBÉ, C. 2008. Chilled storage of sperm and eggs. In: CABRITA, E.; ROBLES, V.; HERRÁEZ, M. P. (Eds.). *Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and freshwater species*. 1ª ed. FL, USA: Taylor & Francis Group, LLC, p. 219-236.
- CABADA M. O. 1975. Seasonal variations in the fertilizing capacity of *Bufo arenarum* (Amphibia anura) spermatozoa. *Experientia*, 31:174-175.
- CAFFEY, R. H.; T. R. TIERSCH. 2000. Economics and marketing of cryopreserved Fish Sperm. In: TIERSCH, T. R.; MAZIK, P. M. Cryopreservation in aquatic species (Eds). Baton Rouge: World Aquaculture Society, p. 388-408.
- CARNEIRO, P. C. F.; SEGUI, M. S.; ÍORIS-FILHO, C. R.; MIKOS, J. D. 2006. Viabilidade do sêmen do jundiá, *Rhamdia quelen*, armazenado sob refrigeração. *Rev. Acadêm.*, 4 (3): (in press).
- CAROLSFELD, J.; HARVEY, B.; BAER, A.; ROSS, C. 2003a. Migratory fishes of South America: biology, social importance and conservation status, New York: *World Bank and Ottawa-IDRC*. 215p.
- CAROLSFELD, J.; HARVEY, B.; GODINHO, H. P.; ZANIBONI-FILHO, E. 2003b. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. *J. Fish. Biol.*, 63: 472-481.
- CAROLSFELD, J.; HARVEY, B. J., 1999. Conservação de recursos genéticos em peixes: teoria e prática. Curso de treinamento brasileiro. Tradução H. P. Godinho. Victória, Canadá: *World fisheries Trust*, p. 47.
- COSSON, J.; BILLARD, R.; CIBERT, C.; DRÉANNO, C.; SUQUET, M. 1999. *Ionic factors regulating the motility of fish sperm*. In: GAGNON, C. (Ed.). The male gamete: from basic science to clinical applications. Viena: *Cache River Press*, p. 162-186.
- DENNISTON, R. S.; MICHELET, S.; GODKE, R. A. 2000. *Principles of cryopreservation*. In: TIERSCH, T.R.; MAZIK, P.M. (Eds.). *Cryopreservation in aquatic species*. Baton Rouge: World Aquaculture Society, p. 59-74.
- FAUVEL, C.; SUQUET, M.; DREANNO, C.; ZONNO, V.; MENU, B. 1998. Cryopreservation of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) spermatozoa in experimental and production conditions. *Aquatic Liv Res*, 11: 387-394.
- FICKEL, J.; WAGENER, A.; LUDWIG, A. 2007. Semen cryopreservation and the conservation of endangered species. *Eur. J. Wildl. Res.* 53: 81-89.
- HARVEY, B.; CAROLSFELD, J. 1993. Induced breeding in tropical fish culture. Ottawa: *International Development Research Centre*.
- HOLT, W. V.; MEDRANO, A.; THURSTON, L. M.; WATSON, P. E. 2005. The significance of cooling rates and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope. *Theriogenology* 63:370-382.
- JANVIER, P. 1999. Catching the first fish. *Nature*, 402(6758): 21-22.
- KIME, D. E.; EBRAHIMI, M.; NYSTEN, K.; ROELANTS, I.; RURANGWA, E.; MOORE, H. D. M.; OLLEVIER, F. 1996. Use of computer assisted sperm analysis (CASA) for monitoring the effects of pollution on sperm quality of fish: application to effects of heavy metals. *Aquatic Toxicol.*, 36(3/4): 223-237.
- LEGENDRE, M.; LINHART, O.; BILLARD, R. 1996. Spawning and management of gametes, fertilized eggs and embryos in Siluroidei. *Aquatic Liv. Res.*, 9: 59-80.

- LEUNG, L. K. P.; JAMIESON, B. G. M. 1991. Live preservation of fish gametes. In: JAMIESON, B. G. M. (Ed). *Fish evolution and systematics: evidence from spermatozoa*. Cambridge: Cambridge University Press, p. 245–269.
- MARIA, A. N.; VIVEIROS, A. T. M.; FREITAS, R. T. F.; OLIVEIRA, A. V. 2006a. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyianus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. *Aquaculture*, 260:298–306.
- MARIA, A. N.; VIVEIROS, A. T. M.; ORFÃO, L. H.; OLIVEIRA, A. V.; MORAES, G. F. 2006b. Effects of cooling and freezing on sperm motility of the endangered fish piracanjuba *Brycon orbignyianus* (Characiformes, Characidae). *Anim Reprod* 3: 55–60.
- MARQUES, S. 2001. *Preservação a curto prazo do sêmen de teleósteos neotropicais de água doce*. 98f. Dissertação (Mestrado de Zoologia de Vertebrados) - Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Programa de Pós Graduação em Zoologia, Belo Horizonte.
- MEDEIROS, C. M. O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A. T. D.; RODRIGUES, J. L. 2002. Current status of sperm criopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*, 57: 327–344.
- MONGKONPUNYA, K.; PUPIPAT, T.; TIERSCH, T.R. 2000. Cryopreservation of sperm of Asian catfishes, including the endangered Mekong giant catfish. In: TIERSCH, T.R.; MAZIK, M. (Eds). *Cryopreservation in aquatic species*. Baton Rouge: The World Aquaculture Society, p. 108–116.
- NAGAHAMA, Y.; The functional morphology of teleost gonads. 1983. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J.; DONALDSON, E. M. (Ed). *Fish physiology*. New York: Academic Press, p. 233–275.
- OHTA, H.; IZAWA, T. 1996. Diluent for cool storage of the Japanese eel (*Anguilla japonica*) spermatozoa. *Aquaculture*, 142: 107–118.
- OHTA, H.; IKEDA, K.; IZAWA, T. 1997. Increases in concentrations of potassium and bicarbonate ions promote acquisition of motility in vitro by Japanese eel spermatozoa. *J. Exp. Biol.*, 277: 171–180.
- PEGG, D. E. 2007. Principles of Cryopreservation. In: DAY, J. G.; STACEY, G. N. (Ed). *Methods in molecular biology: Cryopreservation and freeze-drying protocols*. 2ed. Totowa, NJ: Humana Press Inc.
- RANA, K. 1995. Preservation of gametes. In: BROMAGE, N.R., ROBERTS, R.J. (Ed.). *Broodstock management and egg and larval quality*. Cambridge: Cambridge University Press, p.88–94.
- ROUXEL, C.; SUQUET, M.; COSSON, J.; SEVERE, A.; QUEMENER, L.; FAUVEL, C. 2008. Changes in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) sperm quality during the spawning season. *Aquaculture Research*, 39: 434–440.
- SCOTT, A. P.; BAYNES, S. M. 1980. A review of the biology, handling and storage of salmonid spermatozoa. *J. Fish Biol.*, 17: 707–739.
- SEGOVIA, M.; JENKINS, J. A.; PANIAGUA-CHAVEZ, C.; TIERSCH, T. R. 2000. Flow cytometric evaluation of antibiotic effects on viability and mitochondrial function of refrigerated spermatozoa of Nile tilapia. *Theriogenology*, 53(7): 1489–1499.
- SENGER, P. L. 1986. Principles and procedures for storing and using frozen bovine semen. In: Morrow DA (Ed). *Current therapy in theriogenology*. Philadelphia: WB Saunders, p.116–174.

- SQUIRES, E. L.; PICKETT, B. W.; GRAHAM, J. K.; VANDERWALL, D. K.; MCCUE, P. M.; BRUEMMER, J. E. 1999. *Principles of cryopreservation*. In: Cooled and frozen Stallion Semen, Cap. 9.
- STREIT JUNIOR, D. P.; BENITES, C.; MORAES, G.V.; RIBEIRO, R. P.; SAKAGUTI, E. S.; CALDIERI, R. F. 2006. Sêmen de pacu (*Piractus mesopotamicus*) criopreservado com diluentes utilizados para sêmen de suínos. *Ciê. Anim. Brasil.*, 7(3): 289-297.
- SUQUET, M.; DREANNO, C.; FAUVEL, C.; COSSON, J.; BILLARD, R. 2000. Cryopreservation of sperm in marine fish. *Aquacult Res*, 31:231-243.
- TAVE D. 1986. Genetics for fish hatchery managers. Westport, CN: AVI Publishing.
- TIERSCH, T. N. 2003. Cryopreservation: A new industry for aquatic species. *Louisiana Agricul.*, 46(4): 9.
- VIVEIROS, A. T. M. 2005. Criopreservação de sêmen de peixes. In: XVI Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, Goiania. *Anais do XVI Congresso Brasileiro de Reprodução Animal*. Goiânia, v. CD.
- VIVEIROS, A. T. M.; GODINHO, H. P., 2009. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. *Fish Physiol. Biochem.*, 35: 137-150.
- VIVEIROS, A. T. M.; ISAU, Z. A.; FIGUEIREDO, H. C. P.; LEITE, M. A. S.; MARIA, A. N. 2009. Gentamycin controls bacterial growth during refrigerated storage of piracanjuba, *Brycon orbignyanus*, semen. *J. World Aquacul. Soc.*, 2009 (In press).
- WATSON, P. F. 1995. Recent developments and concepts in cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fétil. Dev.*, 7: 871-891.
- Wikipedia. Disponível em: http://en.wikipedia.org/wiki/Mature_technology. Acessado em: 06/05/2009.
- YANG, H.; TIERSCH, T. R. 2009. Current status of sperm cryopreservation in biomedical research fish models: Zebrafish, medaka, and *Xiphophorus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 149C: 224-232.