

**CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN DE
MACHOS-XX DE TRUTA ARCO-ÍRIS
(*Oncorhynchus mykiss*)**

RAFAEL VENÂNCIO DE ARAÚJO

2007

RAFAEL VENÂNCIO DE ARAÚJO

**CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN DE MACHOS-XX DE TRUTA
ARCO-ÍRIS (*Oncorhynchus mykiss*)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora

Prof^ª. PhD Ana Tereza de Mendonça Viveiros

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2007

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Araújo, Rafael Venâncio

Criopreservação do sêmen de machos-XX de truta arco-íris
(*Oncorhynchus mykiss*) / Rafael Venâncio Araújo. – Lavras: UFLA,
2007.

124 p. : il.

Orientador: Ana Tereza de Mendonça Viveiros.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Truta. 2. Sêmen. 3. Criopreservação. I. Universidade Federal de
Lavras. II. Título.

CDD-639.3755

RAFAEL VENÂNCIO DE ARAÚJO

**CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN DE MACHOS-XX DE TRUTA
ARCO-ÍRIS (*Oncorhynchus mykiss*)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 09 de janeiro de 2007

| | |
|--|---------------|
| Profa. Dra. Yara Aiko Tabata | (APTA-SAA-SP) |
| Prof. Dr. Rilke Tadeu Fonseca de Freitas | UFLA |
| Prof. Dr. José Cleto da Silva Filho | UFLA |

Profa. PhD Ana Tereza de Mendonça Viveiros
UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

A Deus,

pela minha vida e por seu Amor infinito.

Aos meus pais, Jair e Dilma,

por acreditarem no meu potencial, pela educação

recebida e pelo amor e carinho dedicados.

A todos aqueles que, de alguma forma, colaboraram

para a concretização deste curso e deste trabalho.

DEDICO

As duas palavras mais importantes: “MUITO OBRIGADO”. A palavra mais importante: “NÓS”. A palavra menos importante: “EU”

“Nada façais por contenda ou por vanglória, mas por humildade; cada um considere os outros superiores a si mesmo”.

Filipenses 2.3

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, pela excelência na educação superior, em especial ao Departamento de Zootecnia, pelo acolhimento.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro.

À Profa. PhD. Ana Tereza de Mendonça Viveiros, pela atenção, orientação e companheirismo durante todo este trabalho.

Ao Prof. Dr. Rilke Tadeu Fonseca Freitas, pelo direcionamento estatístico durante a elaboração e execução do projeto.

À Profa. Dra. Priscila V. R. Logato, pelos conhecimentos transmitidos durante todo o curso.

Aos pesquisadores científicos Yara Aiko Tabata e Marcos Guilherme Rigolino, pela atenção, orientação, amizade e companheirismo durante todo este trabalho.

À equipe de apoio Rosana Aparecida da Silva, Antônio Donizeti da Silva e Luiz Roberto da Silva, da Estação Experimental de Salmonicultura “Dr. Ascânio de Faria”-APTA-SAA-SP, pela ajuda e por contribuírem com informações imprescindíveis para a realização deste trabalho.

À equipe da Estação de Hidrobiologia de Furnas Centrais Elétricas, em especial ao Sr. Dirceu e Sra. Marcília, pela valiosa colaboração e auxílio.

Aos colegas Alexandre N. Maria, Laura H. Orfão, Ziara Isaú, João Fernando Koch, Aleximiliano V. Oliveira, Daniel Henrique B. Padrão, Ivan B. Nakandakare, Marcos P. César, Larissa N. e Milena, pela ajuda.

Enfim, a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho, e a DEUS, que a todos observa e de todos cuida em cada momento de nossa jornada, **agradeço**.

BIOGRAFIA

RAFAEL VENÂNCIO DE ARAÚJO, filho de Jair Venâncio de Araújo e Dilma Noemia Araújo, nasceu na cidade de Curitiba, estado do Paraná.

Em fevereiro de 2005, colou grau em Zootecnia, pela Universidade Federal de Lavras.

Em março do mesmo ano, iniciou o mestrado no programa de Pós-Graduação em Zootecnia, do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras, tendo defendido dissertação em 9 de janeiro de 2007.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----|
| RESUMO | i |
| ABSTRACT | iii |
| CAPÍTULO 1 | 01 |
| 1. INTRODUÇÃO | 02 |
| 2. OBJETIVOS | 04 |
| 2.1 Objetivo geral..... | 04 |
| 2.2 Objetivos específicos | 04 |
| 3 REVISÃO DE LITERATURA | 05 |
| 3.1 Truta arco-íris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>). | 05 |
| 3.2 Reprodução. | 08 |
| 3.3 Controle da sexualidade em peixes. | 10 |
| 3.4 Sexualidade em peixes | 11 |
| 3.5 Determinação sexual | 13 |
| 3.6 Diferenciação sexual | 14 |
| 3.7 Inversão sexual..... | 15 |
| 3.8 Aspectos relevantes da biologia do sêmen de peixes. | 21 |
| 3.8.1 Morfologia dos espermatozóides | 22 |
| 3.8.2 Metabolismo e motilidade dos espermatozóides..... | 23 |
| 3.8.3 Volume de sêmen..... | 27 |
| 3.8.4 Concentração espermática..... | 28 |
| 3.9 Diluidores de sêmen..... | 29 |
| 3.10 Crioprotetores..... | 31 |
| 3.11 Criopreservação do sêmen de peixes | 32 |
| 3.12 Descongelamento do sêmen de peixes | 37 |
| 3.13 Proporção espermatozóide: ovo e fertilização artificial. | 38 |
| 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 41 |

| | |
|-----------------------------------|-----|
| CAPÍTULO 2..... | 55 |
| RESUMO | 56 |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 58 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS | 60 |
| 3 RESULTADOS..... | 66 |
| 4 DISCUSSÃO..... | 71 |
| 5 CONCLUSÃO | 79 |
| 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 80 |
| CAPÍTULO 3..... | 87 |
| RESUMO | 88 |
| 1 INTRODUÇÃO | 90 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS | 92 |
| 3 RESULTADOS..... | 97 |
| 4 DISCUSSÃO..... | 101 |
| 5 CONCLUSÃO | 104 |
| 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 105 |
| CAPÍTULO 4..... | 108 |
| 2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 115 |
| ANEXOS | 117 |

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

| | |
|--|----|
| TABELA 1: Estimativa de produção e número de produtores de truta nos estados brasileiros | 08 |
|--|----|

CAPÍTULO 2

| | |
|--|----|
| TABELA 1: Dados referentes ao número de animais, peso vivo, volume, motilidade, concentração espermática e pH nas diferentes etapas experimentais..... | 66 |
|--|----|

| | |
|---|----|
| TABELA 2: Motilidade (%; média \pm desvio padrão; n=5 machos-XX) espermática do sêmen de machos-XX de truta arco-íris, criopreservado em diferentes diluidores e DMSO 10% | 67 |
|---|----|

| | |
|--|----|
| TABELA 3: Motilidade (%; média \pm desvio padrão; n=5 peixes) espermática pós-descongelamento do sêmen de machos-XX de truta arco-íris, criopreservado em glicose-gema combinado a diferentes crioprotetores (10%) e taxas de diluição | 68 |
|--|----|

| | |
|--|----|
| TABELA 4: Motilidade (%; média \pm desvio padrão; n=5 doadores de sêmen) espermática do sêmen de machos-XX de truta arco-íris, criopreservado em meio contendo glicose-gema-DMSO, e envasado em diferentes volumes de palhetas | 69 |
|--|----|

| | |
|--|----|
| TABELA 5: Motilidade (%; média \pm desvio padrão; n=5 doadores de sêmen) espermática do sêmen de machos-XX de truta arco-íris, criopreservado em meio contendo glicose-gema-DMSO e descongelado em diferentes temperaturas | 69 |
|--|----|

| | |
|---|----|
| TABELA 6: Taxa de ovos olhados em diferentes relações espermatozóide : ovo para o sêmen de machos-XX de truta arco-íris, criopreservado em glicose-gema-DMSO e descongelado a 70°C por 3 segundos | 70 |
|---|----|

CAPÍTULO 3

TABELA 1: Dados referentes ao número de animais, peso vivo, volume, motilidade, concentração espermática, pH e índice gonadossomático (GSI) nas diferentes etapas experimentais.....97

TABELA 2: Motilidade (%; média \pm desvio padrão; n=3 machos-XX) espermática do sêmen intratesticular de machos-XX de truta arco-íris, criopreservado em diferentes diluidores, acrescidos de 10% de gema e 10% DMSO e descongelado em diferentes temperaturas98

TABELA 3: Motilidade (%; média \pm desvio padrão; n=5 machos-XX) espermática do sêmen intratesticular de machos-XX de truta arco-íris, diluído em diferentes proporções sêmen: plasma seminal, incubado ou não por 1:30h a 4°C e criopreservado em glicose-gema-DMSO.....99

TABELA 4: Motilidade (%; média \pm desvio padrão; n=5 machos-XX) espermática do sêmen intratesticular de machos-XX de truta arco-íris, diluído em diferentes proporções sêmen: plasma, incubado por 1:30h a 4°C e criopreservado em diferentes diluidores.....100

CAPÍTULO 4

TABELA 1: Dados referentes ao número médio de animais, peso vivo, volume, motilidade, concentração espermática, pH e índice gonadossomático (GSI)110

TABELA 2: Melhores resultados de motilidade espermática e taxa de ovos olhados para machos-XX de truta arco-íris com e sem ductos espermáticos112

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- FIGURA 1: Truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*)05
- FIGURA 2: Método indireto para obtenção de progênie 100% feminina..... 16
- FIGURA 3: Alterações testiculares. A. Constrição testicular e ausência de ductos espermáticos. B. Presença simultânea de ovários e testículos.....20
- FIGURA 4: Sucessão de eventos desencadeadores da motilidade espermática em espécies de água doce.....27
- FIGURA 5: A. Botijão de vapor de nitrogênio líquido; B. Botijão de nitrogênio líquido36
- FIGURA 6: Incubadoras40
- FIGURA 7: Ovos olhados e eclosão de um eleuteroembriões40

CAPÍTULO 2

- FIGURA 1: Incubadoras de bandeja – parcelas distribuídas aleatoriamente65

CAPÍTULO 3

- FIGURA 1: Extração do sêmen intratesticular por gotejamento.....93

RESUMO

ARAÚJO, Rafael Venâncio. **Criopreservação do sêmen de machos-XX de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*)**. 2007. 124 p. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

O estudo foi conduzido entre julho e agosto de 2005 e 2006, com o objetivo de aperfeiçoar as técnicas de criopreservação do sêmen de machos de truta arco-íris obtidos por inversão sexual (machos-XX). Inicialmente, apenas os peixes que liberavam sêmen por pressão abdominal foram utilizados. No experimento 1, foram testados quatro diluidores de sêmen (glicose 5,4%, NaCl 0,9%, NaCl 1,2%-tris e BTS[®]) e o efeito da adição da gema de ovo aos diluidores. Depois, o efeito dos crioprotetores DMSO, etileno glicol, metil glicol e metanol, taxas de diluição de 1:3 e 1:7 (experimento 2), das palhetas de 0,25; 0,5 e 4,0 ml (experimento 3) e do descongelamento das palhetas a temperaturas do banho-maria de 70°C/3s, 60°C/8s e 50°C/8s (experimento 4) foi avaliado quanto à motilidade espermática. No experimento 5, o sêmen congelado foi avaliado quanto à capacidade de fertilização (taxa de ovos olhados), em diferentes proporções espermatozóide:ovo (15x10⁶ a 60x10⁶), após 196°C dias de incubação. Em todos os experimentos, as amostras de sêmen diluídas foram congeladas em vapor de nitrogênio (N₂), a -170°C, por 12-16 horas, até serem transferidas para o N₂ líquido. Na fase seguinte, apenas o sêmen obtido diretamente dos testículos (intratesticular) foi utilizado. No experimento 1, o sêmen foi diluído em três diluidores (glicose 5,4%, NaCl 0,9% ou NaCl 1,2%-tris), gema e DMSO. As amostras foram congeladas conforme descrito na fase inicial e descongeladas a 70°C/3s ou 35°C/16s. Depois, o período de incubação de 01h30min, antes do congelamento, foi testado no sêmen diluído (1:0, 1:6 ou 1:8, experimento 2; 1:5, 1:7 ou 1:9, experimento 3) em plasma seminal e congelado em glicose ou NaCl como diluidores (experimento 3), gema de ovo e DMSO. As amostras de sêmen coletadas por meio de massagem abdominal apresentaram as maiores taxas de motilidade espermática pós-descongelamento quando criopreservadas em meio contendo glicose, gema e DMSO, na proporção 1:3, envasadas em palhetas de 0,5 ml e descongeladas a 70°C/3s. As maiores taxas de ovos olhados foram produzidas com sêmen descongelado nas proporções acima de 30x10⁶ espermatozóides:ovo. Quando o sêmen intratesticular foi congelado diretamente, sem passar pelo período de incubação, as taxas de motilidade espermática pós-descongelamento foram baixas; entretanto, quando diluído 1:6 em plasma, incubado e re-diluído 1:3 em glicose-gema-DMSO, a motilidade espermática aumentou de 18% para 60%. Com base nos resultados deste trabalho, conclui-se que o sêmen de machos-

XX de truta arco-íris pode ser criopreservado em meio contendo glicose, gema e DMSO, em palhetas de 0,5 ml e descongelado a 70° C/3s. O sêmen intratesticular pode ser criopreservado com o mesmo protocolo, mas precisa ser previamente incubado em plasma seminal, por 01h30min.

¹ Comitê Orientador: Ana Tereza de Mendonça Viveiros - UFLA (Orientadora), Rilke Tadeu Fonseca de Freitas – UFLA e Yara Aiko Tabata – APTA (co-orientadores).

ABSTRACT

ARAÚJO, Rafael Venâncio. **Semen cryopreservation of rainbow trout XX-males**. 2007. 124 p. Dissertation (Master in Animal Production) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.¹

This study was carried out during July and August of 2005 and 2006. The aim of this study was to improve the cryopreservation techniques for semen cryopreservation of sex-reversed rainbow trout males (XX-males). The first session of experiments, only semen collected under abdominal massage was used. In experiment 1, four semen extenders (glucose 5,4%, NaCl 0,9%, NaCl 1,2%-tris and BTS[®]) and the addition of egg yolk at 0 and 5% to the freezing media were tested. Then the effects of DMSO, ethylene glycol, methylglycol and methanol as cryoprotectants, semen dilution ratios of 1:3 and 1:7 (experiment 2), straw volumes of 0.25; 0.5 and 4.0 ml (experiment 3) and thawing at a water bath temperatures of 70°C/3s, 60°C/8s and 50°C/8s (experiment 4) on post-thaw sperm motility were evaluated. In experiment 5, post-thaw semen was used at different sperm:egg ratios (15×10^6 to 60×10^6) and eyed-egg rate was calculated after 196°C days. In all these five experiments, semen was cryopreserved in nitrogen (N₂) vapor at -170°C for 12-16 h, then transferred to a liquid N₂ vessel. During the second session of experiments, only intratesticular semen obtained after male sacrifice was used. In experiment 1, semen was cryopreserved in one extender (glucose 5,4%, NaCl 0,9% or NaCl 1,2%-tris), egg yolk and DMSO according to the method described previously, and thawed at 70°C/3s or 35°C/16s. Then the pre-freezing incubation of semen diluted (1:0, 1:6 or 1:8, experiment 2; 1:5, 1:7 or 1:9, experiment 3) in seminal plasma and frozen in glucose or NaCl as extender (experiment 3), egg yolk and DMSO was tested. When semen was collected under abdominal massage, the highest post-thaw sperm motilities were observed in those samples diluted 1:3 in glucose, egg yolk and DMSO as freezing medium, cryopreserved in 0.5-ml straws and thawed at 70°C/3s. The highest eyed-egg rates were observed when sperm:egg ratio was above 30×10^6 . When intratesticular semen was immediately cryopreserved without the incubation period, very low post-thaw sperm motility were observed. However, when intratesticular semen was diluted 1:6 in seminal plasma, incubated for 1:30h and cryopreserved in glucose, egg and DMSO, post-thaw sperm motility increased from 18% (without incubation) to 60% (after incubation). Based in these results we can conclude that semen of rainbow trout XX-males can be successfully cryopreserved in a freezing medium containing glucose, egg and DMSO, in 0.5-ml straws and thawed at 70°C/3s. If

intratesticular semen is used, than the pre-freezing incubation period of 1:30h in seminal plasma is mandatory.

¹ Comitê Orientador: Ana Tereza de Mendonça Viveiros - UFLA (Orientadora), Rilke Tadeu Fonseca de Freitas – UFLA e Yara Aiko Tabata – APTA (co-orientadores).

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A Aqüicultura é o setor de produção de alimentos que mais cresce no mundo. Em 1999, ela foi responsável pela produção de 42,77 milhões de toneladas, o que correspondeu a 31,3% da produção pesqueira mundial (Fish Farming International, 2001).

Os salmonídeos estão entre os grupos de espécies de peixes mais produzidos em confinamento, contribuindo com 1,39 milhão de toneladas, no valor de 4,57 bilhões de dólares. As principais espécies representantes deste grupo são o salmão-do-atlântico (*Salmo salar*) e a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), esta última a espécie avaliada neste estudo.

O controle da sexualidade em truta arco-íris é de grande importância para a indústria da aqüicultura, pois as fêmeas dessa espécie apresentam taxas de crescimento mais elevadas do que os machos. Os machos atingem a maturidade sexual antes de alcançar o peso comercial, comprometendo a qualidade e a rentabilidade da criação, por ser este um dos processos biológicos que mais afetam a produtividade. Durante este período, a energia que seria utilizada para o crescimento somático é canalizada para a produção de gametas, resultando na diminuição do crescimento, na eficiência alimentar, na sobrevivência e na qualidade do pescado (Bye & Lincoln, 1986).

Uma das técnicas mais utilizadas para a obtenção de lotes 100% femininos em truta arco-íris é a inversão sexual pela via indireta, que consiste na masculinização de fêmeas genótípicas por meio andrógenos e posterior fertilização de óvulos normais com o sêmen dessas fêmeas masculinizadas (machos-XX). Esse procedimento permite o crescimento dos testículos e a produção de espermatozóides viáveis nesses indivíduos, que são geneticamente fêmeas, e, conseqüentemente, todos os seus espermatozóides carregam o cromossomo X. Entretanto, esse tratamento conduz a uma população masculina

na qual a maioria dos machos-XX apresenta os dutos espermáticos ausentes, incompletos ou afuncionais, o que requer o sacrifício dos animais e a retirada dos testículos para se obter o sêmen.

A necessidade do sacrifício dos animais para a retirada dos testículos e a obtenção do sêmen requer do produtor a manutenção de um número mais elevado de reprodutores nas pisciculturas, além de uma utilização constante de hormônios para a manutenção dos lotes invertidos. Essas práticas acabam, muitas vezes, onerando os custos de produção na propriedade. Dessa forma, o sêmen desses animais poderia ser criopreservado, dispensando-se, assim, a prática contínua do tratamento hormonal e permitindo a disponibilidade desse material ao longo do ano, reduzindo a necessidade de um estoque muito grande de reprodutores. Pode ainda servir como base para o desenvolvimento e a manutenção de bancos genéticos e transporte de gametas (McAndrew et al., 1995).

O objetivo deste estudo foi avaliar alguns fatores que interferem na criopreservação do sêmen de machos-XX de truta arco-íris, buscando aperfeiçoar as técnicas de criopreservação, tanto para os peixes que possuem os dutos espermáticos completos, como para aqueles que não os possuem, na tentativa de racionalizar a produção de lotes 100% femininos, levando em consideração as condições de cultivo encontradas no Brasil.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho teve o objetivo geral de aperfeiçoar as técnicas de criopreservação do sêmen de machos-XX de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*).

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a eficiência de diferentes soluções diluidoras e crioprotetoras sobre a motilidade espermática após o congelamento.
- Avaliar a eficiência de diferentes taxas de diluição (sêmen:criosolução) sobre a motilidade espermática após o descongelamento.
- Avaliar a motilidade espermática, após o descongelamento, para o sêmen envasado em diferentes volumes de palhetas.
- Avaliar o efeito de diferentes temperaturas de descongelamento do sêmen sobre a motilidade espermática, após o descongelamento.
- Avaliar o efeito de diferentes proporções de espermatozóide por ovo sobre a taxa de fertilização, para o sêmen criopreservado.
- Avaliar a eficiência de diferentes diluidores de sêmen e temperaturas de descongelamento sobre a motilidade espermática, após o congelamento do sêmen intratesticular
- Avaliar o efeito da incubação pré-congelamento do sêmen intratesticular em plasma seminal, em diferentes taxas de diluição.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*).

Reino: Animália;

Filo: Chordata;

Classe: Actinopterygii;

Ordem: Salmoniformes;

Família: Salmonidae;

Gênero: *Oncorhynchus*;

Espécie: *Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792.

Nome vulgar: truta arco-íris.



FIGURA 1: Truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) Foto: www.fws.gov

A truta arco-íris (Figura 1) caracteriza-se pelo formato fusiforme do seu corpo coberto por finas escamas. Sua coloração varia de acordo com o ambiente em que vive, com o sexo, a idade e o estado de maturação sexual, entre outros fatores. Geralmente, a coloração do seu dorso varia do castanho para o esverdeado, os flancos são acinzentados e o ventre esbranquiçado, apresentando pintas escuras espalhadas pelo corpo e nadadeiras (Blanco-Cachafeiro, 1995). É um peixe carnívoro, que se alimenta na natureza de presas vivas, como insetos, larvas, moluscos, crustáceos e pequenos peixes.

A truta arco-íris, a forma residente em água doce da espécie *Oncorhynchus mykiss*, é um salmonídeo originário dos rios da vertente pacífica da América do Norte, cuja distribuição natural se estende do sul do Alasca até o norte do México (Tabata, 1997). Por apresentar excelentes características, tanto para a aqüicultura quanto para a pesca esportiva, encontra-se amplamente distribuída em todas as águas frias do mundo, exceto no continente Antártico (Hershberger, 1992). Na América do Sul é encontrada na Argentina, no Brasil, na Bolívia, no Chile, na Colômbia, no Equador, no Peru e na Venezuela.

Além das formas anádroma (que passa uma parte de sua vida no mar e desova em água doce, de modo semelhante aos salmões-do-atlântico ou do pacífico) e do fato de ser residente em água doce (que passa toda sua vida em riachos, lagos ou rios), denominadas respectivamente de steelhead e arco-íris, esta espécie também apresenta dimorfismos quanto às formas costeira e continental (Tabata & Ports, 2004). Essas diferenças, decorrentes de sua adaptação a diferentes habitats, geraram certa confusão quanto a sua classificação taxonômica. MacCrimmon (1971) listou 20 nomes de espécies que eram usados para identificar as várias formas encontradas, sendo os mais citados: *Salmo gairdneri*, *S. irideus* e *S. gilberti*.

Com base em análises osteológicas de DNA mitocondrial, que revelaram que a truta apresenta maior similaridade com os salmões-do-pacífico (gênero *Oncorhynchus*) do que com a truta e o salmão-do-atlântico (gênero *Salmo*), o “American Fisheries Society Names of Fishes Committee”, em 1988, adotou o uso do nome genérico *Salmo* para todas as trutas e salmões-do-atlântico. Além disso, a constatação de que a truta arco-íris, descrita por Richardson, em 1836, como *Salmo gairdneri*, era a mesma espécie descrita por Johann Walbaum em 1792, como *Salmo mykiss*, na região de Kamchatka, *mykiss* teve prioridade sobre *gairdneri* por ter sido descrito primeiro. Desde então, a truta arco-íris e todas as

suas formas passaram a ser denominadas de *Oncorhynchus mykiss* (Smith & Stearley, 1989).

A propagação artificial da truta arco-íris teve início em 1874, pela transferência de ovos embrionados do rio MacCloud, no norte da Califórnia, para a Caledônia, Nova York. A primeira exportação realizada com sucesso ocorreu em 1874, para Tóquio. Foi introduzida na França em 1879 e, daí, disseminada por toda a Europa, onde seu cultivo, como atividade industrial, iniciou-se na Dinamarca, em 1890. Com exceção da carpa comum, a truta arco-íris é, provavelmente, uma das espécies mais antigas empregadas em cultivo (Gall & Crandell, 1992).

No Brasil, a truta arco-íris foi introduzida em 26 de maio de 1949, inicialmente na Serra da Bocaina, no município de Bananal, por meio de 5.000 ovos embrionados procedentes da Dinamarca. Em maio do ano seguinte, mais 50.000 ovos foram importados do mesmo local e incubados no recém-organizado Posto de Biologia e Criação de Trutas, em Bananal, de onde foram distribuídos para vários municípios do sudeste e sul do Brasil (Faria, 1953).

Posteriormente, foram realizadas várias importações de ovos embrionados de diferentes procedências, até que, na década de 1970, iniciaram-se os primeiros trabalhos sobre reprodução artificial desta espécie no Brasil. No princípio daquela mesma década, foi instalada, em Campos do Jordão, SP, a primeira truticultura comercial. Atualmente, existem cerca de 120 truticulturas localizadas nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Tabela 1).

Apesar de, anteriormente, terem ocorrido duas outras tentativas de introdução de trutas, a primeira, em 1913, com ovos da espécie *Salmo trutta fario*, e a segunda, com ovos de truta arco-íris, em maio do mesmo ano (Sociedade de Amigos dos Aquários Públicos, 1996), a introdução feita em 1949

é considerada o marco da introdução da truta no Brasil, pois, a partir deste lote, originaram-se populações “naturalizadas” (Porto -Foresti et al., 2002).

TABELA 1. Estimativa de produção e número de produtores de truta nos estados brasileiros (Proença et al., 2001).

| Estado | Produção (t ano ⁻¹) | Nº de produtores |
|-------------------|---------------------------------|------------------|
| São Paulo | 600 | 25 |
| Minas Gerais | 500 | 22 |
| Santa Catarina | 215 | 35 |
| Rio de Janeiro | 200 | 32 |
| Espírito Santo | 85 | 2 |
| Paraná | 60 | 2 |
| Rio Grande do Sul | 25 | 3 |
| Total | 1685 | 121 |

Além de sua capacidade de adaptação a diversos sistemas aquáticos (rios, lagos, represas, tanques, laboratórios de incubação, tanques rede, etc.), a truta apresenta um alto grau de domesticação: ambos os sexos amadurecem em cativeiro, os gametas podem ser facilmente coletados, a fertilização é realizada externamente, aceita alimento artificial desde a primeira alimentação e permite uma série de manipulações no tocante ao controle da sexualidade. Estas características, aliadas ao elevado valor comercial, fizeram da truta arco-íris uma das espécies mais intensamente pesquisadas e um dos salmonídeos mais cultivados (Tabata, 1997).

3.2 Reprodução

As trutas completam a maturação sexual aos 2 anos de idade, com peso ao redor de 1.000 gramas. Ao final do primeiro ano de vida, alguns machos se apresentam maduros sexualmente, entretanto, esta característica é prejudicial ao ganho de peso. No Brasil, o período de reprodução ocorre entre os meses de maio a agosto, quando os dias são mais curtos (menor fotoperíodo) e as

temperaturas mais baixas. Para se obter bons resultados no processo da reprodução, a temperatura da água deve estar próxima dos 10°C.

São vários os fatores ambientais que regulam a função reprodutiva nos peixes. Dentre eles, o fotoperíodo e a temperatura são os mais importantes, especialmente em salmonídeos (Bromage et al., 2001). O fotoperíodo é o principal fator determinante da maturação e do período de reprodução, atuando no mecanismo da puberdade, gametogênese e ovulação. A temperatura da água desempenha um papel modulador, regulando a progressão de vários estágios do processo reprodutivo, como a liberação dos gametas, a fertilização, a embriogênese, a diferenciação sexual, etc. (Bromage & Cumarantunga, 1998; Davies & Bromage, 2002).

A puberdade consiste em uma série de mecanismos fisiológicos que promovem a primeira maturação gonadal, quando são ativados os processos de gametogênese e a produção de hormônios sexuais, que culminam, mais tarde, com a maturação sexual (Tabata & Ports, 2004). Esse processo envolve a maturação dos gametas, a expressão das características sexuais secundárias e o comportamento reprodutivo. O momento em que a puberdade é desencadeada depende da espécie, da idade, do peso e do perfil genético do animal (Estay et al., 1995).

Quando livres na natureza, as trutas migram para as cabeceiras dos rios em busca de águas mais limpas e locais mais protegidos de predadores para se reproduzirem; assim, desovam uma vez por ano, nas estações de temperaturas mais baixas. As fêmeas escavam um ninho em zonas de fundo arenoso e pouca corrente (normalmente margens do rio). Os ovos são depositados nessas concavidades e, depois de fertilizados, pelo macho são cobertos com areia, onde ficam até a eclosão (Blanco-Cachafeiro, 1995). Quando confinadas em tanques, as trutas não se reproduzem naturalmente. Os reprodutores alcançam a maturidade sexual e a maturação final dos ovócitos e espermatozóides, porém,

não os liberam naturalmente, sendo necessária a intervenção do homem para completar o processo reprodutivo (Tabata & Portz., 2004). Essa intervenção se dá pela extrusão manual dos ovócitos e espermatozóides por compressão abdominal, não sendo necessária a aplicação de hormônios, como o extrato bruto de pituitária de carpa, normalmente usado na reprodução de outras espécies de peixes mantidas em cativeiro. Segundo Springate et al. (1984), a produtividade máxima pode ser alcançada quando os ovos são fertilizados entre quatro e dez dias após a ovulação, sob temperatura da água de 10°C.

3.3 Controle da sexualidade em peixes

As técnicas de controle da sexualidade em peixes apresentam um grande potencial para aumentar a produtividade nos cultivos, pois permitem obter os benefícios associados ao sexo que apresentam as características morfológicas, fisiológicas ou comportamentais de interesse econômico (Tabata, 1997).

Nas criações comerciais, uma das principais vantagens obtidas pelo cultivo monossexo, é quando um dos sexos apresenta, em relação ao outro, uma marcada superioridade na taxa de crescimento. Contudo, dependendo da espécie, as técnicas de controle dos sexos podem trazer outros benefícios, tais como: supressão da reprodução, contenção de gastos energéticos com a atividade reprodutiva, uniformidade de tamanho na colheita, redução dos efeitos da maturação sexual na aparência e na qualidade da carne, bem como a diminuição dos riscos de impacto ambiental decorrente do escape de peixes para os sistemas naturais (Beardmore et al., 2001).

Em muitas espécies de peixes cultivados, as fêmeas apresentam taxas de crescimento mais elevadas do que os machos, alcançando tamanhos maiores. Em alguns grupos, incluindo os salmonídeos, os machos maturam antes de atingir o peso comercial, comprometendo a qualidade e a rentabilidade da criação.

A maturação sexual é um dos processos biológicos que mais afetam a produtividade, pois, durante este período, a energia para o crescimento somático é canalizada para a produção de gametas, resultando na diminuição do crescimento, da eficiência alimentar, da sobrevivência e da qualidade do pescado (Bye & Lincoln, 1986). Desse modo, a truta arco-íris tem sido tradicionalmente comercializada na forma de truta porção, com peso de, aproximadamente, 250 gramas, que pode ser alcançado antes do início da atividade reprodutiva. Nos machos, entretanto, esses problemas são mais acentuados, pois uma considerável proporção deles amadurece sexualmente ainda no primeiro ano de vida, enquanto as fêmeas maturam somente aos dois anos de idade (Tabata & Ports 2004). Além disso, após atingirem a maturação sexual, os salmonídeos machos desenvolvem algumas características sexuais secundárias que consistem, principalmente, na projeção da mandíbula em forma de gancho e no espessamento e escurecimento da pele, que são indesejáveis, do ponto de vista comercial. Essas alterações, associadas à queda da resistência e ao aumento do comportamento agressivo os predispõem a infecções por fungos e bactérias que, além de comprometerem a comercialização, podem provocar a morte dos animais (Brown & Roberts, 1982).

Assim, em algumas espécies, particularmente em truta arco-íris, o cultivo de lotes femininos é vantajoso, pois se elimina o problema da maturação sexual precoce dos machos e, ao mesmo tempo, pode-se aumentar a produção de ovos com o mesmo custo de manutenção de reprodutores.

3.4 Sexualidade em peixes

A expressão da sexualidade em peixes é bastante diversificada, proporcionando um excelente material para os estudos relacionados à diferenciação e à evolução do sexo entre os animais. Os peixes podem ser

classificados como: gonocóricos (quando os sexos ocorrem separadamente nos indivíduos), hermafroditas (ambos os sexos estão presentes no mesmo indivíduo) e unissexuados (espécies onde ocorre apenas o sexo feminino). Em razão dessa ampla variação, machos e fêmeas poderiam ser melhor definidos, respectivamente, como produtores de sêmen e de ovos (Yamamoto, 1969).

As espécies cultivadas, em sua maioria, são do tipo gonocórico, que podem ser divididas em indiferenciadas e diferenciadas. Nas gonocóricas indiferenciadas, a gônada primordial primeiro se desenvolve em uma gônada semelhante a um ovário e, depois, metade dos indivíduos torna-se macho e a outra metade torna-se fêmea. Nas espécies diferenciadas, a gônada diferencia-se diretamente em um testículo ou em um ovário.

Hermafroditismo é a ocorrência de tecido ovariano e testicular em um mesmo indivíduo. Há três tipos de hermafroditas: sincrônico (em que ovos e espermatozoides maturam ao mesmo tempo), protogínico (primeiro desenvolvem ovário e, posteriormente, revertem para testículo) e protandrômico (primeiro desenvolvem testículo e depois ovário). As espécies unissexuadas apresentam reprodução natural por ginogênese, em que o espermatozoide do macho de uma espécie bissexual contribui apenas para a ativação do desenvolvimento do ovo, sem ocorrência da singamia (Yamazaki, 1983).

A expressão do sexo depende de dois eventos: da determinação sexual e da diferenciação sexual. A determinação sexual é responsável pelo sexo genético (ou genotípico), enquanto que a diferenciação sexual é responsável pelo desenvolvimento das gônadas (sexo gonadal ou fenotípico). A interação desses dois eventos resulta em dois fenótipos: macho ou fêmea, seja morfológica, comportamental ou funcionalmente (Piferrer, 2001).

3.5 Determinação sexual

O sexo genético é determinado na fertilização, pela combinação dos cromossomas provenientes do ovo e do espermatozóide (Yamazaki, 1983). A determinação sexual é definida como a soma de genes responsáveis pela formação das gônadas e de suas características. Esses genes podem estar espalhados pelo genoma ou a maioria deles, concentrados em um par de cromossomas que, neste caso, são chamados de cromossomas sexuais. Há três modelos de determinação sexual que podem ser aplicados em peixes: cromossômico, poligênico e interação genótipo-ambiente (Piferrer, 2001).

A determinação sexual cromossômica implica na presença de cromossomas sexuais, em que um par de cromossomas (denominados de heterocromossomas) acumula a maioria dos genes responsáveis pelo desenvolvimento sexual. A maioria dos peixes não apresenta heterocromossomas, não sendo morfologicamente distintos. Mas, com base em análises citogenéticas, reversão sexual e cruzamentos controlados, oito sistemas cromossômicos já foram descritos. Estes sistemas variam desde sistemas simples, como XX/XY ou WZ/ZZ, até os mais complexos, envolvendo mais que um par de cromossomas sexuais ou diferentes números de cromossomas, dependendo do sexo.

O sexo em que os cromossomas são iguais é chamado de homogamético, e heterogamético, quando os cromossomas são diferentes. Os sistemas cromossômicos XX/XY e ZW/ZZ são os mais freqüentes entre as espécies cultivadas e, neles, a proporção sexual na progênie não difere significativamente de 1:1. No sistema XX/XY, as fêmeas são homogaméticas e os machos heterogaméticos, enquanto que, no sistema ZW/ZZ, as fêmeas são heterogaméticas e os machos homogaméticos. A denominação de XY ou ZW é

usada apenas para evitar confusões, quando se descrevem os dois sistemas (Tave, 1993).

No sistema poligênico de determinação sexual, genes epistáticos determinantes do sexo estão presentes tanto nos cromossomas autossômicos, como nos heterocromossomas e o sexo do embrião será resultante da combinação dos fatores masculinos e femininos, presentes no conjunto cromossômico herdado de cada parental (Hunter et al., 1983). Nesse sistema, a proporção sexual macho:fêmea será diferente de 1:1. A influência que esses genes influenciadores ou modificadores do sexo têm sobre a determinação sexual constitui um problema quando se objetiva a produção de lotes monossexos.

Embora a determinação sexual ocorra, principalmente, sob controle genético, fatores ambientais, tais como: temperatura, fotoperíodo, salinidade e altas densidades de estocagem, podem ter influência nesse processo. A determinação sexual pela interação genótipo-ambiente está se tornando evidente em um número cada vez maior de espécies, mostrando que é possível controlar o sexo pela manipulação ambiental.

3.6 Diferenciação sexual

A diferenciação sexual envolve todos os eventos que ocorrem durante o desenvolvimento, resultando na expressão do sexo genético no sexo fenotípico. Ela inclui os primeiros eventos que ocorrem desde a gônada primordial até a diferenciação completa em testículos ou ovários.

Nas espécies gonocóricas diferenciadas, a diferenciação sexual ocorre primeiro nas fêmeas e depois nos machos. Os primeiros sinais de diferenciação sexual nas fêmeas são a entrada das oogonias na meiose e ou a proliferação das células somáticas para formar a cavidade ovariana. Nos machos, a diferenciação

sexual é caracterizada pelo surgimento da espermatogônia, pelo arranjo das células germinativas e somáticas em lóbulos e pela diferenciação do sistema vascular do testículo, incluindo os dutos espermáticos.

A natureza do indutor endógeno da diferenciação sexual ainda não está totalmente esclarecida, mas, muitas evidências reforçam a idéia de que os esteróides sexuais são, de fato, indutores naturais da diferenciação sexual em peixes. Mais recentemente, muitas pesquisas têm focado a importância das enzimas esteroidogênicas, no processo da diferenciação sexual em peixes e outros vertebrados. Salmões machos funcionais foram obtidos de fêmeas genóticas tratadas com inibidor específico da aromatase, evidenciando que os estrógenos endógenos são responsáveis pela diferenciação ovariana e que a aromatase tem um papel fundamental neste processo (Piferrer, 2001).

3.7 Inversão sexual

O controle artificial do sexo em peixes, pela administração hormonal, iniciou-se com os trabalhos realizados no final de 1930 e princípio de 1940 (revisão em Yamamoto, 1969). Os resultados obtidos nesses estudos proporcionaram não somente informações sobre os mecanismos genéticos da diferenciação sexual, mas também demonstraram as potencialidades de suas aplicações em espécies economicamente importantes, em que os cultivos monossexos são vantajosos.

Uma vez que os esteróides sexuais estão envolvidos no processo natural de diferenciação sexual, esse processo pode ser controlado pela administração de hormônios sexuais, em peixes sexualmente indiferenciados, alterando o curso da diferenciação no sentido do sexo desejado.

A feminização pela técnica hormonal pode ser conduzida, diretamente, pelo fornecimento de estrógenos durante os estágios iniciais do

desenvolvimento, ou, indiretamente (Figura 2), pela masculinização de fêmeas genotípicas com andrógenos e posterior fertilização de óvulos normais com o sêmen dessas fêmeas masculinizadas (Piferrer & Donaldson, 1989).

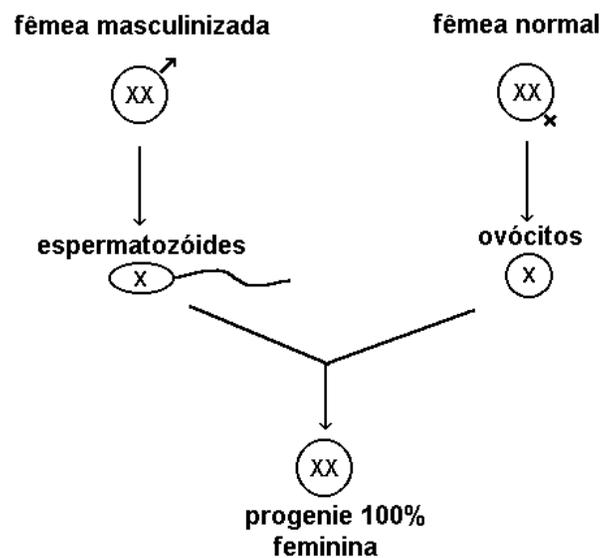


FIGURA 2: Método indireto para a obtenção de prole 100% feminina (Fonte: APTA-SAA-SP).

A feminização direta pode ser aplicada em qualquer espécie, independentemente do sistema de determinação sexual, ou de qual é o sexo homogamético ou heterogamético, enquanto que a feminização indireta é indicada para aquelas espécies em que as fêmeas são homogaméticas no sistema de determinação sexual. São várias as espécies em que o acasalamento de fêmeas masculinizadas com fêmeas normais produz uma prole totalmente feminina, entre elas: truta arco-íris, salmão-do-atlântico, tilápia-do-nilo, medaka, goldfish, etc. (Piferrer, 2001).

A utilização do método indireto é o mais indicado, pois os peixes submetidos ao tratamento hormonal são em número reduzido e não são destinados ao consumo humano, mas empregados como reprodutores e, ainda, a progênie resultante é 100% feminina, pois as fêmeas invertidas, embora sejam funcionalmente machos, são genotipicamente femininas (Piferrer & Donaldson, 1988).

Além disso, restrições, como a alta mortalidade e a redução no crescimento, foram verificadas durante o tratamento de feminização por estrógenos, tornando esse método impraticável, do ponto de vista econômico. Outra desvantagem desse método consiste no fato de que os animais tratados não podem ser utilizados como reprodutores, pois metade deles, supostamente, é de machos genotípicos (Johnstone et al., 1979).

Por outro lado, o método indireto requer mais de uma geração para a produção de lotes 100% femininos. Na implantação do método, é necessário realizar a separação entre as fêmeas masculinizadas e os machos normais, por meio do teste de progênie ou pela observação direta das gônadas (Bye & Lincoln, 1986). Uma vez que o primeiro lote monossexo feminino tenha sido obtido, essa identificação torna-se desnecessária, pois o tratamento de masculinização pode ser aplicado em uma parcela totalmente feminina.

O sucesso da inversão sexual depende do tipo, da natureza e da concentração do hormônio utilizado, bem como da via de administração, da época de início e da duração do tratamento. A resposta à administração de esteróides sexuais varia muito de acordo com o estágio de desenvolvimento, portanto, o período em que o tratamento é conduzido (fase de maior sensibilidade ao esteróide exógeno) é mais importante do que a dosagem ou a duração do tratamento (Piferrer & Donaldson, 1993). Segundo Yamamoto (1969), para promover uma reversão do sexo de modo eficiente, a administração dos esteróides sexuais deve ser iniciada antes do aparecimento dos primeiros

sinais da diferenciação e continuar até a fase em que a diferenciação tenha se estabelecido.

Nas espécies gonocóricas diferenciadas, a reversão do sexo obtida de modo artificial é, provavelmente, permanente, pois a ação dos genes determinantes do sexo gonadal é restrita ao período da diferenciação, enquanto que, nas espécies hermafroditas, os genes ligados ao sexo podem se expressar em estágios mais avançados do desenvolvimento gonadal (Yamazaki, 1983).

A truta arco-íris é classificada, quanto ao tipo de sexualidade, como uma espécie do tipo gonocórico diferenciado, em que a gônada diferencia-se diretamente em um testículo ou em um ovário (Takashima et al., 1980). Nela, o sexo genético é determinado no momento da fertilização, pelos cromossomas sexuais, como acontece na maioria dos peixes gonocóricos. Entretanto, a diferenciação sexual ocorre algum tempo após a eclosão, no período final da absorção do saco vitelínico, quando se inicia a alimentação (Yamazaki, 1983). Os primeiros sinais da diferenciação aparecem primeiro nas fêmeas, entre 18 e 28 dias após a eclosão, a uma temperatura de incubação de 11,5°C (Van den Hurk & Slof, 1978). Nesses estágios iniciais do desenvolvimento, a diferenciação sexual é bastante lábil e a reversão completa e funcional dos sexos pode ser facilmente obtida pela administração de hormônios esteroidais (Yamamoto, 1969).

Estes tratamentos são conduzidos nas fases iniciais do desenvolvimento, muitos meses antes da comercialização e os resíduos desses esteróides desaparecem em menos de um mês depois de finalizado o tratamento (Piferrer, 2001).

A administração do hormônio pode ser feita por vários modos, entretanto, sob condições comerciais, a escolha deve levar em consideração a sua praticidade. Dentre as vias de administração, as mais recomendadas são as que veiculam o hormônio por meio da ração ou de banhos de imersão. Em

salmonídeos, os banhos de imersão, aplicados próximos à eclosão, são eficientes para veicular os esteróides, pois, essas espécies possuem um grande volume de vitelo, que serve como reservatório para o hormônio, que é absorvido durante a fase de diferenciação sexual (Piferrer, 2001).

Dentre os estrógenos, o 17 beta-estradiol tem sido o mais utilizado para promover a feminização, pois, além de ser eficiente, é natural, sendo menos impactante ao ambiente (Piferrer, 2001). Doses de 20 mg.kg⁻¹ de dieta, com ou sem imersão prévia de ovos olhados e alevinos em solução aquosa de 250 µgL⁻¹, foram suficientes para induzir a feminização em truta arco-íris (Johnstone et al., 1978).

A masculinização tem sido conduzida usando-se 17 alfa-metiltestosterona (MT) que, por ser um esteróide sintético, é mais potente do que os naturais e, portanto, a dose empregada é menor. Por outro lado, por demandar maior tempo para ser degradado na natureza é mais nocivo ao ambiente (Lee & Donaldson, 2001). A dose efetiva de MT, para se obter a inversão sexual de fêmeas para machos funcionais, é espécie específica. Okada et al. (1981) analisaram diferentes concentrações de MT em truta arco-íris, usando alevinos todos fêmeas, que foram obtidos pela fertilização de ovos normais com sêmen de fêmeas masculinizadas. Doses que variaram de 0,01 e 100 mg.kg⁻¹ de ração foram administradas por 8 semanas, a partir do início da alimentação, a uma temperatura de 10°C. A maior porcentagem (84,4%) de machos foi obtida com a dose de 0,5 mg.kg⁻¹ de dieta.

As fêmeas masculinizadas (machos-XX) apresentam testículos morfológicamente alterados e, na maioria das vezes, com dutos espermáticos ausentes (Figura 3), sendo necessário o sacrifício dos animais e a remoção das gônadas para a utilização do sêmen. Este sêmen coletado diretamente do testículo apresenta uma redução na taxa de fertilização, provavelmente, em razão da presença de grande quantidade de espermátides.



FIGURA 3. Alterações testiculares. **A.** Constrição testicular e ausência de dutos espermáticos. **B.** Presença simultânea de ovários e testículos (Foto: APTA-SAA-SP).

Para racionalizar a produção de lotes monossexos femininos, o sêmen obtido das fêmeas masculinizadas poderia ser criopreservado, dispensando-se, desse modo, a prática contínua do tratamento hormonal (Hunter et al., 1983; Kavamoto et al., 1991; Silveira et al., 2000). Entretanto, para viabilizar o emprego desta técnica, torna-se necessário produzir fêmeas masculinizadas com dutos espermáticos funcionais, como os descritos por Tabata et al. (2000) e Tsumura et al. (1991), uma vez que o sêmen obtido de fêmeas com dutos mostrou-se qualitativamente semelhante ao de machos normais.

Por ser aromatizável, o MT, quando administrado em doses superiores àquelas recomendadas para a inversão ou por períodos prolongados, produz a chamada feminização paradoxal (Solar & Donaldson, 1985). Por outro lado, quando administrado em doses elevadas, ao redor de 25 mg.kg⁻¹ de ração, promove a esterilização das gônadas (Mellito da Silveira et al., 1995). Nos casos em que se deseja promover a esterilidade reprodutiva, os autores recomendam a utilização de banhos de imersão, seguidos do fornecimento do hormônio na dieta (Mellito da Silveira et al., 1995). Embora a esterilização possa ser induzida por tal tratamento, a necessidade da exposição a altas doses de hormônios androgênicos limita o seu uso na produção de salmonídeos estéreis em larga escala.

3.8 Aspectos relevantes da biologia do sêmen de peixes

Os fatores que envolvem a biologia do sêmen de peixes já foram amplamente estudados, sendo identificadas várias características referentes à biologia seminal de peixes, como a imobilidade dos espermatozoides no sêmen *in natura*, a curta duração do seu desenvolvimento após sua ativação e a necessidade de diluição em um meio hiposmótico para a iniciação do movimento espermático (Billard & Cosson, 1992). Existem várias características

que podem ser utilizadas como parâmetros para a avaliação da qualidade seminal. Entre elas, podem-se citar a motilidade espermática, a taxa de fertilização (Rana, 1995), a concentração espermática (Billard 1988; Lahnsteiner et al., 2000; Stein 1980) e a análise morfológica do sêmen (Kavamoto et al., 1999).

Segundo Bedore (1999), o sucesso da aplicação da tecnologia de criopreservação do sêmen de uma determinada espécie de peixe depende, preliminarmente, da análise de variáveis seminais, dentre as quais incluem-se volume produzido, concentração e motilidade espermática.

3.8.1 Morfologia dos espermatozóides

Os espermatozóides podem ser morfológicamente subdivididos em cabeça, peça intermediária e cauda (Nagahama, 1983). Na maioria dos grupos de peixes falta o acrossoma, que ocorre em todos os outros grupos de vertebrados. A morfologia dos espermatozóides parece refletir no seu modo de fertilização. A carência do acrossoma é compensada pela presença da micrópila, um orifício no córion do ovo para a penetração do espermatozóide (Cosson et al., 1999). A cauda, ou flagelo, pode ainda ser subdivida em colo e peça intermediária, principal e terminal, assim como ocorre para os espermatozóides de mamíferos domésticos. O colo, ou peça de conexão, representa a inserção do corpo basal do flagelo à cabeça. A peça intermediária consiste de uma bainha mitocondrial disposta em hélice, responsável pela geração de energia necessária à propulsão mótil dos espermatozóides (Hafez, 2004).

3.8.2 Metabolismo e motilidade dos espermatozóides

Segundo Stoss (1983), o metabolismo basal dos espermatozóides e a energia necessária para motilidade espermática são derivados do catabolismo de nutrientes exógenos e endógenos, de maneira aeróbica ou anaeróbica. Os espermatozóides de peixes que possuem fertilização interna apresentam a capacidade de realizar glicólise em processos anaeróbios, sendo muito provável que a manutenção do metabolismo espermático seja feita a partir dos açúcares ovarianos (Gardiner, 1978, citado por Leung & Jamieson, 1991). Entretanto, a atividade glicolítica de espermatozóides de peixes de fecundação externa é muito limitada, principalmente com relação ao metabolismo oxidativo (Harvey & Kelley, 1984).

Billard et al. (1995) concluíram que os espermatozóides de carpa (*Cyprinus carpio*) são carregados com ATP, o qual é a maior fonte de energia durante o curto período de motilidade, porém, é hidrolisado rapidamente durante a fase ativa da motilidade. A síntese de ATP fornece uma contribuição muito pequena e pode ser resultado da glicólise e da respiração mitocondrial. A motilidade é interrompida quando 50% a 80% desses ATPs são consumidos pela hidrólise. A mitocôndria é o reservatório endógeno de fonte de energia para a motilidade de espermatozóides em peixes marinhos e essa motilidade está diretamente relacionada à presença das mitocôndrias na peça intermediária do espermatozóide (Gwo 1995). Provavelmente, a exaustão do suprimento de energia contida na mitocôndria restringe a motilidade dos espermatozóides nestes peixes. Cosson (2004), estudando fatores que controlam a motilidade espermática em peixes, observou que espermatozóides que perderam a motilidade, após algum tempo, têm essa capacidade restaurada, sugerindo uma resposta à reposição dos estoques de ATP por meio da via oxidativa do metabolismo mitocondrial.

Na presença de cianeto de potássio (inibidor da oxidação do citocromo), antimicina (inibidor da etapa catalítica entre o citocromo b e c1) e atractilosida (inibidor da fosforilação do ADP), o período de motilidade do espermatozóide de *Cottus gobio* é diminuído em cerca de 98%. Isso demonstra que a fosforilação oxidativa e a oxidação de ácidos graxos são importantes para a obtenção de recursos energéticos para a motilidade nesta espécie (Lahnsteiner et al., 1997). Em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), o cianeto de potássio, a antimicina e o atractiloside também são eficientes inibidores da motilidade espermática (Lahnsteiner et al., 1993).

Ainda de acordo com Lahnsteiner et al. (1997), a presença de grânulos de glicogênio nos espermatozóides de *Cottus gobio* indica que, provavelmente, estes desempenham algum papel no suprimento de energia em ciprinídeos e salmonídeos. Entretanto, o 2-deoxy-d-glicose, um inibidor da glicólise, não afeta a duração da motilidade, sugerindo a utilização de outros recursos energéticos pelo espermatozóide quando o glicogênio não está disponível (Lahnsteiner et al., 1995). Após o término da glicólise, as células espermáticas utilizam exclusivamente triglicerídeos para a obtenção de energia (Bedore, 1999).

Os espermatozóides de peixes são imóveis nos testículos e no plasma seminal. A motilidade é ativada quando o meio em que os espermatozóides se encontram se torna hiposmótico, como a água do ambiente externo (Cosson, 2004). A diferença existente entre a baixa osmolaridade da água em relação àquela do plasma seminal é essencial para a iniciação da motilidade dos espermatozóides em peixes de água doce. Nos peixes marinhos, a situação é inversa – a motilidade é iniciada quando o espermatozóide entra em contato com a água do mar, cuja osmolaridade é muito mais elevada que a do plasma seminal (Takai & Morisawa, 1995).

A motilidade espermática tem sido freqüentemente utilizada como critério de viabilidade do espermatozóide, porém, segundo Bedore (1999), nem

sempre representa um bom indicativo da capacidade de fertilização. Espermatozoides imóveis não estão necessariamente mortos ou incapazes de fertilização (Friborough, 1966 citado por Jamieson, 1991). A utilização de espermatozoides de salmão-do-atlântico com baixa ou nenhuma motilidade resultou em fertilização (Truscott & Idles, 1968 citado por Jamieson, 1991). Entretanto, segundo Carolsfeld & Harvey (1999) e Godinho (2000), a motilidade espermática é um dos principais parâmetros a serem considerados na análise da qualidade do sêmen de peixes. Para tanto, deve-se levar em conta que a motilidade espermática é influenciada por inúmeros fatores, como temperatura, estado nutricional, estado sanitário, condições de análise, soluções ativadoras empregadas, espécie estudada e, segundo Rana (1995), um dos principais moderadores da motilidade espermática é o progresso da época reprodutiva em que os machos se encontram.

Segundo Morisawa et al. (1983), a osmolaridade não é determinante essencial da motilidade espermática em salmonídeos; nestes peixes, a motilidade é suprimida pelo K⁺ seminal contido no ducto espermático e é iniciada pela redução da sua concentração na água doce onde ele é liberado. Com a diminuição da concentração externa de íons K⁺, ocorre o efluxo desse cátion para o meio extracelular, estimulando a abertura de canais de Ca⁺⁺ e seu influxo para o interior da célula espermática. O aumento da concentração intracelular de Ca⁺⁺ participa decisivamente na iniciação da motilidade (Cosson, 2004). Fatores, como o pH ou outros íons presentes, podem polarizar a membrana celular e estimular a motilidade dos espermatozoides dos peixes (Morisawa et al., 1999).

A estrutura do espermatozoide de truta foi consideravelmente alterada depois da diluição do sêmen em água, tendo ocorrido ruptura da membrana plasmática e intumescimento das mitocôndrias (Billard, 1978). Essas alterações não foram observadas quando o sêmen foi diluído em soluções com cerca de

0,7% de salinidade. Concluiu-se, então, que a água, doce ou do mar, não é o melhor meio a ser utilizado em inseminação artificial e experimentos devem ser conduzidos para definir qual é o melhor ativador do sêmen a ser utilizado nas práticas de piscicultura (Billard, 1978). Gwo (1995) cita a ocorrência de ruptura na membrana plasmática e nas mitocôndrias, confirmando resultados observados anteriormente por Billard (1978, 1983) e Morisawa et al. (1983); afirma, ainda, que danos osmóticos na estrutura do espermatozóide podem ser o principal fator limitante da duração da motilidade espermática em peixes de água doce.

Na Figura 4 estão descritos os possíveis eventos ocorridos no desencadeamento da motilidade espermática. O exemplo ilustra a ativação dos espermatozoides de alguns peixes de água doce, quando transferidos do fluido seminal para água doce, mostrando como a súbita diminuição da osmolaridade externa imediatamente leva ao reajustamento da concentração iônica interna pelo processo osmorregulativo da membrana.

A diminuição da concentração iônica interna atinge valores em que a atividade da ATPase é ótima e, conseqüentemente, a motilidade é em alta velocidade. Posteriormente, o conteúdo de ATP torna-se baixo porque a renovação pela fosforilação mitocondrial é muito lenta, o que é combinado com uma diminuição adicional da concentração iônica a valores em que a atividade da ATPase é bloqueada; por isso, a intensidade flagelar é completamente interrompida alguns minutos mais tarde. De acordo com Perchee-Poupard et al. (1997), em ambiente hiposmótico, o volume citoplasmático das células espermáticas de espécies de água doce pode aumentar em até três vezes, em resposta ao influxo de água.

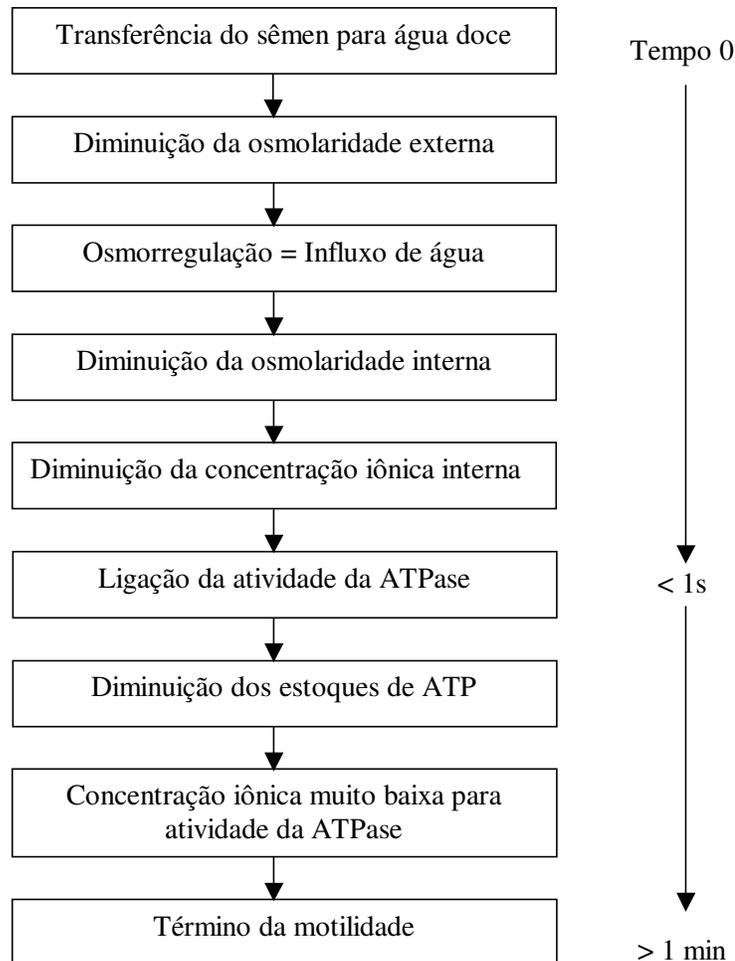


FIGURA 4. Sucessão de eventos desencadeadores da motilidade espermática em espécies de água doce. Modificado de Cosson (2004).

3.8.3 Volume de sêmen

O volume de sêmen produzido pelos peixes é muito variável. Ele vai depender muito da espécie, da idade e do tamanho do indivíduo, da época do ano em que ele foi obtido, se foi coletado no início ou no final do período

reprodutivo e da metodologia utilizada na sua obtenção (Bedore, 1999). A idade e o tamanho do peixe estão altamente relacionados com o volume de sêmen obtido em uma coleta. O volume obtido em truta arco-íris com 3 anos de idade é 3 vezes maior do que aquele obtido em indivíduos com 2 anos (Büyükhapoglu & Holtz, 1984).

Baynes & Scott (1987) registraram diminuição no volume de sêmen de truta arco-íris a cada coleta subsequente. Eles obtiveram 5 ml na primeira coleta, 2 ml na segunda e menos de 2 ml na terceira. Concluíram que, possivelmente, o manejo dos peixes promove inibição da produção de sêmen. Kavamoto et al. (1985), trabalhando com truta arco-íris de acordo com as condições climáticas brasileiras para a reprodução da espécie, verificaram que o volume de sêmen obtido de 79 machos distribuídos nos períodos reprodutivos de 1980, 1981 e 1983 variou de 5,01 a 12,36 ml, que foram próximos aos valores mínimo de 4 ml e máximo de 8 ml encontrados por Billard et al. (1971).

3.8.4 Concentração espermática

O conhecimento da concentração espermática do sêmen é de grande importância para a sua adequada utilização. Os métodos utilizados para a sua determinação são a contagem em câmara de Neubauer (Büyükhapoglu & Holtz, 1984) e o estabelecimento da relação entre volume celular:volume de fluido seminal, obtida por meio do espermátócrito (Fogli da Silveira et al., 1990) e por espectrofotometria (Billard et al., 1971; Ciereszko & Dabrowski, 1993; Fogli da Silveira et al., 1987; Suquet et al., 1992).

O cálculo da concentração espermática é realizado em números de células espermáticas coletadas por quilograma de peso corporal (células/kg), por grama de testículo ou, ainda, por peixe (células/peixe). O número de espermatozóides por ml de sêmen é mais apropriado, podendo ser

complementado pelo volume total de sêmen. Sêmen altamente concentrado nem sempre oferece elevada motilidade ou altas taxas de fertilização (Geffen & Evans, 2000; Williot et al., 2000). Este parâmetro não é uma medida específica da capacidade de fertilização do sêmen e pode variar muito dentro de determinadas espécies de peixes ou em um mesmo indivíduo ao longo da vida. É importante observar que a concentração espermática torna-se uma característica relativamente importante quando se fertilizam ovos com um volume constante de sêmen, analisando a capacidade de fertilização de diferentes amostras de sêmen (Rurangwa et al., 2004).

Os valores de concentração espermática para o sêmen de machos normais de truta arco-íris podem variar de $15,3 \times 10^6$ a $20,69 \times 10^6$ espermatozoides / mm^3 (Billard et al., 1971). Kavamoto et al. (1985) avaliaram a concentração espermática do sêmen de truta arco-íris durante três anos consecutivos e encontraram resultados que estão dentro dos limites observados por Billard et al. (1971).

3.9 Diluidores de sêmen

Os diluidores são soluções de sais ou de carboidratos adicionados ao sêmen, cuja função é manter a viabilidade das células espermáticas durante a redução da temperatura. As condições mínimas requeridas de um diluidor adequado são: isotonicidade, para que não haja ativação prévia da motilidade espermática; estabilidade, pois suas características físico-químicas não devem ser alteradas durante o contato com o sêmen; condutividade térmica elevada, permitindo a rápida transferência de temperatura do meio externo para os espermatozoides; esterilidade, ou seja, não devem veicular microrganismos potencialmente nocivos às células espermáticas e, finalmente, servir de carreador de crioprotetores. É importante que a motilidade dos espermatozoides

não seja ativada antes do congelamento e nem durante o descongelamento, pois ela pode exaurir a reserva energética necessária à fertilização (Legendre & Billard, 1980).

Segundo Tan-Fermin et al. (1999), a diluição do sêmen em solução com mesma composição do plasma seminal permite melhor aproveitamento da sua capacidade fecundante, principalmente levando-se em conta que a quantidade de sêmen utilizada em procedimentos rotineiros de desova induzida é maior do que o necessário. O uso de diluidores pode estabilizar as condições físico-químicas durante a estocagem do sêmen, prolongando a viabilidade dos espermatozoides.

Soluções contendo glicose em sua composição (McNiven et al., 1993; Piironen 1993; Silveira et al., 2006; Stoss & Reftsie 1983) e soluções salinas (Babiak et al., 1995; Büyükhatipoglu & Holtz, 1978; Stein 1980; Stoss & Holtz 1981) têm sido bastante empregadas como diluidores de sêmen de truta arco-íris. A glicose desempenha um papel muito importante na motilidade espermática do sêmen. Estudos mostraram que os espermatozoides de truta arco-íris utilizam triglicerídeos e glicose como fontes primárias de energia (Lahnsteiner et al., 1993). Concentrações adequadas de glicose podem atuar suprindo as necessidades metabólicas das células espermáticas.

As soluções salinas simples também têm sido empregadas com grande sucesso como diluidor de sêmen de diversas espécies. Soluções que possuem como base o NaCl em sua composição, com níveis entre 100 e 200 mM, apresentam um pequeno risco de danos hipo ou hiperosmótico para os espermatozoides de salmonídeos (Scott & Baynes 1980).

Outras soluções diluidoras desenvolvidas para algumas espécies em particular, muitas vezes, podem ser utilizadas com sucesso em outras espécies. O diluidor BTS® (Beltsville Thawing Solution - Minitub®) foi originalmente desenvolvido para o resfriamento do sêmen suíno e tem obtido bons resultados como diluidor na criopreservação do sêmen de algumas espécies, como a

piracanjuba (*Brycon orbignyanus*), (Maria, 2005), a curimba (*Prochilodus lineatus*), (Miliorini, 2006 e Òrfão, 2006) e a pirapitinga (*Brycon nattereri*), (Oliveira, 2006), entre outros.

3.10 Crioprotetores

Os crioprotetores são substâncias acrescidas ao meio diluidor do sêmen com a finalidade de proteger os espermatozóides durante o congelamento e o descongelamento. Os crioprotetores impedem as criolesões, mas, quando usados em concentrações elevadas, podem se tornar tóxicos aos espermatozóides. Dentre as características desejáveis em um crioprotetor, destacam-se a reduzida toxicidade e a alta solubilidade em água.

Os crioprotetores podem ser divididos em dois grupos: os chamados intracelulares ou solúveis (permeáveis) à membrana plasmática e os extracelulares ou não solúveis. O determinante são as propriedades físico-químicas (principalmente o peso molecular) e a interação existente entre a substância e a membrana plasmática. No grupo dos crioprotetores solúveis, os mais usados são: o dimetil sulfoxido (DMSO), o glicerol e o metanol. O segundo grupo é conhecido como crioprotetores não permeáveis ou crioprotetores externos e incluem: açúcares (ex.: sacarose, glicose), polímeros (ex.: dextran, PVP) e proteínas (ex.: gema de ovo, leite desnatado, soro).

O papel dos crioprotetores intracelulares é evitar, ou diminuir, a formação de microcristais de gelo intracelulares, enquanto os crioprotetores extracelulares atuam estabilizando e reparando externamente a membrana celular. Os alvos da proteção proporcionada pelos crioprotetores intracelulares são as enzimas lábeis (por exemplo, a catalase) e a estabilidade das proteínas em soluções aquosas. Segundo Chao (1991), há um grande risco, porém, na utilização de crioprotetores internos, porque estes podem, alternativamente,

promover a desnaturação protéica, sobretudo sob elevadas temperaturas, causando uma toxicidade nos sistemas enzimáticos e, por conseguinte, celulares. Isso ocorre, principalmente, quando as concentrações de crioprotetores internos são muito elevadas (Cruz, 2001). Os crioprotetores internos mais efetivos são aqueles que permeiam a membrana celular rapidamente (Simeone, 1998).

Existem relatos da utilização de diversos crioprotetores intracelulares na preservação do sêmen de salmonídeos. Entre eles, estão DMSO (Baynes & Scott, 1987; Holtz, 1993; Legendre & Billard, 1980; Stoss & Holts, 1983), glicerol (Pironen, 1993), DMSO e glicerol combinados (Lahnsteiner et al., 1995, 1996c), propanodiol (Lahnsteiner et al., 1996b), dimetil acetamida (McNiven et al., 1993) e metanol (Lahnsteiner et al., 1997, 2000, 2002). O DMSO e o metanol são os crioprotetores intracelulares mais utilizados na criopreservação do sêmen de truta arco-íris. Em salmonídeos, de forma geral, o crioprotetor extracelular mais usado é a gema de ovo e a utilização desse agente estabilizador de membrana é essencial para manter a viabilidade dos espermatozóides após o processo de congelamento e descongelamento (Baynes & Scott, 1987; Lahnsteiner et al., 1996a).

Aparentemente, determinados crioprotetores agem melhor em algumas espécies do que em outras, de sorte que a seleção do melhor crioprotetor a ser testado pela primeira vez numa espécie deve ser feita por tentativa e erro (Bedore, 1999).

3.11 Criopreservação do sêmen de peixes

A criopreservação envolve procedimentos que permitem o armazenamento de espermatozóides em nitrogênio líquido, a uma temperatura de, aproximadamente, -196°C , mantendo-se a viabilidade dos gametas por tempo indefinido. Mins et al. (2000) verificaram que a percentagem de

espermatozóides móveis, contidos no sêmen criopreservado de esturjão, não diminuiu ao longo de cinco anos de armazenamento.

A tecnologia para a criopreservação de gametas de peixes encontra-se ainda em desenvolvimento e a sua utilização em produções comerciais ainda é bastante escassa, comparada a algumas espécies de animais domésticos. Entretanto, o progresso alcançado nos últimos anos, com relação ao desenvolvimento de diluentes e técnicas de criopreservação, indica que a criopreservação de gametas de peixes pode vir a ser mais utilizada no futuro.

Atualmente, sêmen de várias espécies de peixes é criopreservado com sucesso, alcançando taxas de fertilização cada vez mais semelhantes às obtidas com sêmen fresco (salmonídeos, por Billard et al., 1992; bagre-africano, *Clarias gariepinus*, por Viveiros et al., 2000 e 2002; bagre-europeu, *Silurus glanis*, por Linhart et al., 1993; tilápia, *Oreochromis niloticus*, por Rana & McAndrew, 1989), podendo ser utilizados rotineiramente em programas de produção e hibridação. Em revisão sobre criopreservação de gametas, foram listadas mais de 50 espécies de peixes, cujos espermatozóides já foram criopreservados (Leung & Jamieson, 1991). Os salmonídeos ocupam o primeiro lugar em número de espécies e, dentre estas, incluem-se peixes de alta importância econômica, como a truta arco-íris e o salmão-do-atlântico. É provável que técnicas similares possam fornecer resultados positivos para espécies nas quais o congelamento ainda não foi testado (Bedore, 1999).

Estudos envolvendo o congelamento do sêmen de machos normais de truta arco-íris foram relatados por vários autores (Baynes & Scott, 1987; Cabrita et al., 2001a, Conget et al., 1996; Fogli da Silveira et al., 1994; McNiven et al., 1993; Stoss et al., 1978; Stoss et al., 1983; Wheeler & Thogaard, 1991), porém, o número de trabalhos relacionados à utilização e à aplicação do sêmen obtido de fêmeas masculinizadas ainda é bastante escasso (Feist et al., 1995; Kavamoto et al., 1991; Robles et al., 2003; Silveira et al., 2006; Tabata & Mizuta, 1997).

Quando o sêmen é colocado diretamente no nitrogênio líquido, a membrana plasmática e a peça intermediária podem desaparecer inteiramente. Por outro lado, quando o sêmen é colocado no vapor de nitrogênio líquido, os espermatozóides sofrem um congelamento gradual e as estruturas membranosas não são muito alteradas, apesar de o aspecto da cromatina ser consideravelmente modificado (Billard, 1983).

A formação de microcristais de gelo é deletéria aos espermatozóides por duas razões principais: a osmoconcentração e a elevação da temperatura intracitoplasmática. Com a desidratação pela retenção de água nos cristais, o meio extracelular torna-se progressivamente mais concentrado e há uma osmoconcentração também em regiões dentro do citoplasma. A osmoconcentração extracelular ocasiona efluxo de água e intensificação da concentração osmótica interna, o que promove desnaturação das macromoléculas e crenação celular, podendo haver total colapso da membrana celular (Mazur, 1977).

O processo de cristalização resulta, ainda, em elevação momentânea da temperatura, o que é prejudicial às células espermáticas. Em temperaturas em torno de 5°C, a água intra e extracelular permanece super-resfriada e não se cristaliza. Entre -5°C e -10°C, microcristais de gelo começam a se formar no meio extracelular e o processo de desidratação se inicia. Os maiores prejuízos conhecidos na estrutura do espermatozóide ocorrem no intervalo crítico entre 0°C e -40°C (Leung, 1991). A finalidade do processo de congelamento em nitrogênio líquido é fazer com que a suspensão de células espermáticas atinja temperaturas abaixo do ponto de congelamento do meio, antes que haja a formação de microcristais de gelo nos meios intra e extracelular.

Além da escolha de diluidores e crioprotetores adequados, o sucesso da criopreservação de sêmen em nitrogênio líquido exige que as taxas de resfriamento estejam situadas entre 10°C e 50°C min⁻¹ (Harvey & Carolsfeld,

1993). Esta taxa é usualmente obtida no vapor de nitrogênio. Para isso, tradicionalmente, despeja-se nitrogênio líquido numa caixa de isopor e, após o equilíbrio entre o vapor e o líquido, encontra-se a distância correta da superfície do nitrogênio líquido onde o sêmen deveria ser colocado, para que taxas de congelamento ideais fossem obtidas. Esta operação é dificultada por variações bruscas na temperatura do ambiente onde se realiza a criopreservação, sendo bastante difícil de ser obtida quando realizada no campo. O uso de botijões contendo apenas vapor de nitrogênio ("dry-shipper", Taylor-Wharton) (Figura 5) pode facilitar a realização dos procedimentos de criopreservação no campo, pois eles são hermeticamente fechados e, por isto, mantêm a temperatura constante (cerca de -180°C). Resultados satisfatórios com esta metodologia encontram-se disponíveis na literatura (Aoki et al., 1997; Cruz, 2001; Serralheiro et al., 1999; Silveira et al., 2006).

O tipo de recipiente utilizado para envasar o sêmen é um outro aspecto importante no processo de criopreservação. Palhetas de diferentes capacidades têm sido utilizadas (0,25 ml; 0,5 ml; 1,0 ml; 1,2 ml; 1,8 ml; 2,5 ml; 4,0 ml e 5,0 ml). A taxa de fertilização, quando o sêmen foi envasado em palheta de 1,2 ml, foi semelhante àquela com palheta de 0,5 ml para salmonídeos e a palheta de 0,5 ml resultou em uma fertilização 40% inferior em relação ao sêmen fresco (Lahnsteiner et al., 1997). Não foi encontrada diferença na motilidade espermática para o sêmen de truta arco-íris, quando palhetas de 0,5; 1,8 e 5,0 ml foram comparadas. Porém, a viabilidade das células e a taxa de fertilização foram mais baixas para as palhetas de maior volume com relação às de 0,5 ml (Cabrita et al., 2001b). Excelentes resultados de motilidade espermática e fertilização também são encontrados em estudos com palhetas de 0,25 e 0,5 ml, na criopreservação do sêmen de salmonídeos (Lahnsteiner et al., 1995). Em geral, as palhetas de 0,5 ml são as mais utilizadas entre os pesquisadores no congelamento de sêmen de peixes, porém, sua capacidade de fertilização se

restringe a um número muito pequeno de ovos, o que torna cada vez mais freqüentes estudos com palhetas de maior volume, objetivando a fertilização em grande escala. Quando grupos grandes de ovos (1.600-2.000 ovos) foram fertilizados com palheta de 5,0 ml, os resultados de fertilização foram similares aos das palhetas de 0,5 ml, demonstrando que a ligeira perda em fertilização foi compensada pelos benefícios das palhetas de 5,0 ml (Cabrita et al., 2001b). A grande desvantagem das palhetas muito calibrosas é que, geralmente, não proporcionam um descongelamento uniforme, ou seja, a superfície descongela mais rapidamente que a porção central (Carolsfeld & Harvey, 1999).



FIGURA 5. A. Botijão de vapor de nitrogênio líquido; **B.** Botijão de nitrogênio líquido (Foto: DZO – UFLA).

3.12 Descongelamento do sêmen de peixes

Em geral, células congeladas rapidamente, como em palhetas de 0,5 ml, devem ser mais rapidamente descongeladas quando comparadas com células congeladas em velocidade mais lenta, como em criotubos ou macropalhetas contendo um volume maior de sêmen (Viveiros, 2005). Portanto, a velocidade de congelamento das células e o volume das palhetas que serão utilizadas devem ser levados em conta para selecionar a temperatura ideal de descongelamento e o tempo de exposição das palhetas a essa temperatura. O congelamento envolve a perda de água e a desidratação celular, enquanto o descongelamento envolve uma reidratação das células, ocorrendo influxo de água para o interior do citoplasma (Holt, 2000).

A maioria das células suporta um descongelamento rápido, mesmo que não se hidrate totalmente, exceto para embriões de mamíferos (Bedore, 1999). O descongelamento rápido tem sido utilizado como medida importante na prevenção de recristalização de gelo intracelular, letal para as células (Leung & Jamieson, 1991). As taxas de descongelamento mais bem sucedidas são aquelas que envolvem altas temperaturas e reduzido intervalo de tempo de exposição, entretanto, cuidados com o superaquecimento devem ser assegurados, pois pode ser letal aos espermatozoides (Scott & Baynes, 1980).

O descongelamento das palhetas normalmente é feito por imersão em banho-maria. O sêmen congelado, ao ser retirado do botijão de nitrogênio líquido, deve ser agitado em banho-maria por poucos segundos, para que descongele uniformemente (Cruz, 2001). Com palhetas mais calibrosas, este processo se torna mais difícil porque o descongelamento não é uniforme, ou seja, a superfície descongela mais rápido que a porção central. Deve-se, então, aquecer a palheta apenas o tempo suficiente para iniciar o descongelamento do conteúdo, de modo que a temperatura da palheta continue a subir mesmo depois

de ter sido removida da água quente, completando, assim, o processo de descongelamento (Carolsfeld & Harvey, 1999).

Existe uma numerosa variação com relação à taxa de descongelamento, para o sêmen de salmonídeos (Lanhesteiner et al., 1997). Fogli da Silveira et al. (1994) usaram, pela primeira vez, a temperatura de descongelamento de 70°C, por 3 segundos, para o descongelamento do sêmen de truta arco-íris, que foi posteriormente adotado por Silveira (2002, 2006), obtendo excelentes resultados de fertilização para o sêmen criopreservado.

As condições de criopreservação do sêmen apresentam grande variação entre as diferentes espécies de peixes, porém, quando se trata do descongelamento do sêmen, esse parâmetro não se mostra espécie-específico. Em estudos com diferentes espécies de salmonídeos, não foi observada diferença quanto à temperatura de descongelamento e os resultados eficientes de motilidade espermática e fertilização foram obtidos com sêmen descongelado a 25°C, por 30 segundos, para todas as espécies estudadas (Lahnsteiner et al., 1995).

3.13 Proporção espermatozóide: ovo e fertilização artificial

A fertilização artificial de gametas de peixes representa um enorme avanço em programas comerciais. Esta técnica apresenta várias vantagens, dentre as quais se sobressaem o aproveitamento de gametas e o maior número de ovos férteis e de embriões viáveis. Com isso, o sêmen extruído de um único macho pode fertilizar até cinco fêmeas (Billard, 1990).

A qualidade espermática, em muitos casos, tem sido somente avaliada em termos de motilidade após descongelamento. Segundo Rana & MacAndrew (1989), a taxa de fertilização dos ovos é, sem dúvida, o mais apropriado e prático critério nos protocolos de avaliação para a criopreservação de

espermatozóides. Todavia, resta a incerteza relativa ao fato de este parâmetro ser avaliado isoladamente, uma vez que a homogeneidade das condições de fertilização constitui requisito imprescindível a sua validação.

Outros fatores, como o número de espermatozóides por ovo, a duração do contato entre os gametas ou o protocolo de fertilização utilizado, podem também influenciar o sucesso da fertilização (Suquet et al., 1995; Chereguini et al., 1999). Na produção comercial, uma relação ótima espermatozóide:ovo tem sido recomendada; ao mesmo tempo, os trabalhos experimentais utilizam o sucesso da fertilização como um ponto final da qualidade espermática, sugerindo uma relação mínima espermatozóide:ovo (Suquet et al., 1995).

Existe grande variação da proporção de número de espermatozóide por ovo que adotada nos trabalhos que envolvem fertilização a partir do sêmen criopreservado de salmonídeos. A proporção recomendada para as culturas comerciais de truta arco-íris é de 10×10^6 espermatozóides por ovo (Scott & Baynes, 1980 - revisão). Proporções de $3,5 \times 10^6$ (Fogli da Silveira et al., 1994), $2,7 \times 10^6$ (Lahnsteiner et al., 2002), 20×10^6 (Silveira et al., 2002) e 16×10^6 espermatozóides por ovo (Salte et al., 2004) têm sido usadas para o sêmen criopreservado. Para o sêmen de machos-XX, é descrita uma proporção de 20×10^6 espermatozóides por ovo (Silveira et al., 2006), para os peixes que apresentam os dutos espermáticos funcionais e $3,8 \times 10^6$ (Geffen & Evans., 2000) e 17×10^6 (Robles et al., 2003) para o sêmen intratesticular.

Para a truta arco-íris, o método recomendado para a fertilização é o método “seco”, no qual os gametas são misturados na ausência de água, fazendo com que cada ovócito fique envolvido por milhares de espermatozóides, facilitando a sua penetração no canal micropilar antes da ativação espermática. Esse procedimento é necessário porque o espermatozóide, uma vez ativado, apresenta motilidade, cuja duração é de 30 segundos, no máximo, permitindo um deslocamento de cerca de 3 mm, o que é insuficiente para percorrer um ovo de

diâmetro médio de 5 mm, como é o caso do ovo de truta (Billard & Cosson, 1992). Entretanto, o excesso de espermatozoides utilizados na fertilização encobre a qualidade dos espermatozoides criopreservados, dificultando as comparações entre protocolos (Viveiros et al., 2000).

Após o processo de fertilização, os ovócitos são levados para as incubadoras (Figura 6), onde permanecem por, aproximadamente 300°C dias até a eclosão. Em salmonídeos, o tempo de incubação é dado em unidades térmicas acumuladas (UTA) em °C dias, de modo que, conhecendo-se a temperatura média da água, é possível prever o número de dias necessários para o desenvolvimento de cada etapa do embrião. Aos 180°C dias decorridos da fertilização, a organogênese está bem avançada, com os olhos dos embriões bem pigmentados e visíveis através da casca do ovo. Nessa fase, denominada de “ovos olhados” (Figura 7), os embriões são bem resistentes e permitem uma série de manipulações que possibilitam a sua comercialização. Aos 500°C dias, os eleuteroembriões já apresentam dois terços do saco vitelínico absorvido, seu desenvolvimento já está completo e podem ser chamados de alevinos.



FIGURA 6. Incubadoras

Fonte: APTA-SAA-SP



FIGURA 7. Ovos olhados e eclosão de um eleuteroembriões.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOKI, K.; OKAMOTO, M.; TATSUMI, K.; ISHIKAWA, Y. Cryopreservation of medaka spermatozoa. **Zoological Science**, Tokyo, v. 14, n. 4, p. 641-644, Aug. 1997.

BABIAK, I.; GLOGOWSKI, J.; LUCZYNSKI, M. J.; KUCHARCZYK, D.; LUCZYNSKI, M. Cryopreservation of the milt of the Northern pike. **Journal of Fish Biology**, London, v. 46, n. 5, p. 819-828, May 1995.

BAYNES, S. M.; SCOTT, A. P. Cryopreservation of rainbow trout spermatozoa: The influence of sperm quality, egg quality and extender composition on postthaw fertility. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 66, n. 1, p. 53-67, Oct. 1987.

BEARDMORE, J. A.; MAIR, G. C.; LEWIS, R. I. Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: applications, problems and prospects. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 197, n. 1/4, p. 283-301, June 2001.

BEDORE, A. G. **Características criopreservação do sêmen de pacu-caranha (*Piaractus mesopotamicus*) e de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)**. 1999. 53 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

BILLARD, R. Artificial insemination and gamete management in fish. **Marine Behaviour and Physiology**, Reading, v. 14, n. 1, p. 3-21, 1988.

BILLARD, R. Artificial insemination in fish. In: LAMING, G. E. (Org.). **Marshall's physiology of reproduction**. 4. ed. New York: Churchill Livingstone, 1990. Chap. 9, p. 870-887.

BILLARD, R. Changes in structure and fertilizing ability of marine and freshwater fish spermatozoa diluted in media of various salinities. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 14, n. 3, p. 187-198, July 1978.

BILLARD, R. Ultrastructure of trout spermatozoa: changes after dilution and deep-freezing. **Cell Tissue Research**, New York, v. 228, n. 2, p. 205-218, 1983.

BILLARD, R.; BRETON, B.; JALABERT, B. La production espermatogénétique chez la truite. **Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique**, Paris, v. 11, n. 2, p. 99-112, 1971.

BILLARD, R.; COSSON, M. P. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. **The Journal of Experimental Zoology**, New York, v. 261, n. 2, p. 122-13, Feb. 1992.

BILLARD, R.; COSSON, J.; PERCHEC, J.; LINHART, O. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 129, n. 1/4, p. 95-112, Jan. 1995.

BLANCO-CACHAFEIRO, M. C. **La Trucha. cria industrial**. 2. ed. Espanha: Ediciones Mundi-Prensa, 1995. 503 p.

BROMAGE, N.; CUMARNATUNGA, R. . Egg production in the rainbow trout. In: MUIR, J. F.; ROBERT, R. J. (Ed.) **Recent Advances in Aquaculture**, 1998. v. 3, p. 64 -138.

BROMAGE, N.; PORTER, M.; RANDALL, C. The environmental regulation of maturation in farmed finfish with special reference to the role of photoperiod and melatonin. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 197, n. 1/4, p. 63-98, June 2001 .

BROWN, L. A.; ROBERTS, R. J. Production of neutered salmonids. **Comparative Biochemistry Physiology**, Oxford, v. 73b, n. 1, p. 177-180. 1982.

BÜYÜKHATIPOGLU, S.; HOLTZ, W. Sperm output in rainbow trout (*Salmo gairdnerii*) – effect of age, timing and frequency of stripping and presence of females. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 37, n. 1, p. 63-71, Feb. 1984.

BÜYÜKHATIPOGLU, S.; HOLTZ, W. Preservation of trout sperm in liquid and frozen state. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 14, n. 1, p. 49-56, May 1978.

BYE, V. J.; LINCOLN, R. F. Commercial methods for the control of sexual maturation in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 57, n. 1/4, p. 299-309, Oct. 1986.

CABRITA, E.; ANEL, L.; HERRÁEZ, M. P. Effect of external cryoprotectants as membrane stabilizers on cryopreserved rainbow trout sperm. **Theriogenology**, Woburn, v. 56, n. 4, p. 623-635, Sept. 2001a.

CABRITA, E.; ROBLES, V.; ALVAREZ, R.; HERRÁEZ, M. P. Cryopreservation of rainbow trout sperm in large straws: application to large scale fertilization. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 201, n. 3/4, p. 301-314, Oct. 2001b.

CAROLSFELD, J.; HARVEY, B. **Conservação de recursos energéticos de peixes: teoria e prática**. Curso de treinamento Brasileiro. Victoria, Canadá: World Fisheries Trust, 1999.

CHAO, N. H. Fish sperm cryopreservation. In: **Technology advancement and extension efforts**. Taiwan: Department of Aquaculture, Taiwan Fishery Research Institute, 1991. p. 31. (Paper on International Symposium on Reproductive Biology in Aquaculture).

CHEREGUINI, O.; GARCÍA de la BANDA, I.; RASINES, I.; FERNANDEZ, A. Artificial fertilisation in turbot, *Scophthalmus maximus*: different methods and determination of the optimal sperm-egg ratio. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 30, n. 5, p. 319-324, May 1999.

CIERESZKO, A.; DABROWSKI, K. Estimation of sperm concentration of rainbow trout, whitefish and yellow perch using a spectrophotometric technique. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 109, n. 3/4, p. 367-373, Feb. 1993.

CONGET, P.; FERNANDEZ, M.; HERRERA, G.; MINGUELL, J. J. Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa using programmable freezing. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 143, n. 3/4, p. 319-329, Aug. 1996.

COSSON, J. The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa. **Aquaculture International**, London, v. 12, n. 1, p. 69-85, 2004.

COSSON, J.; BILLARD, R.; CIBERT, C.; DRÉANNO, C.; SUQUET, M. Ionic factors regulating the motility of fish sperm. In: GAGNON, C. (Ed.) **The male gamete: from basic science to clinical applications**. Vienna: Cache River Press, 1999. Chap. 16, p. 162-186.

CRUZ, V. L. B. **Criopreservação do sêmen de curimatá (*Prochilodus lineatus*)**. 2001. 59 p. Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte.

DAVIS, B.; BROMAGE, N. The effects of fluctuating seasonal and constant water temperatures on the photoperiodic advancement of reproduction in female rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 125, n. 1/2, p. 183-200, Feb. 2002.

ESTAY, F.; DÍAZ, N. F.; VALADARES, L.; DAZAROLA, G. **Manejo reproductivo de salmonidos**. Chile, 1995. 61 p. (Serie Publicaciones para la Acuicultura, 2)

FARIA, A. **Dados sobre a biologia da truta arco-íris**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura – Departamento Nacional de Produção Animal – Divisão de Caça e Pesca, 1953. 43 p.

FEIST, G.; CHOO-GUAN, Y.; FITZPATRICK, M. S.; SCHRECK, C. B. The production of functional sex-reversed male rainbow trout with 17 α methyltestosterone and 11 β -hydroxyandrostenedione. **Aquaculture**, v. 131, n. 1/2, p. 145-152, Mar. 1995.

FISH FARMING INTERNATIONAL. **Future is Farmed!** Londres, v. 28, n. 12, 2001.

FOGLI DA SILVEIRA, W. F.; KAVAMOTO, E. T.; CESTAROLLI, M. A.; GODINHO, H. P.; RAMOS, S. M.; SILVEIRA, A. N. Avaliação espermática, preservação criogênica e fertilidade do sêmen do pacu, *Piaractus mesopotamicus* (HOLMBERG, 1887), proveniente de reprodução induzida. **Boletim Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 17, p. 1-13, 1990. Único.

FOGLI DA SILVEIRA, W.; KAVAMOTO, E. T.; RIGOLINO, M. G.; TABATA, Y. A. O método espectrofotométrico na avaliação da concentração de espermatozoides da truta arco-íris, *Salmo irideus* Gibbons. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 14, p. 69-73, 1987. Único.

FOGLI DA SILVEIRA, W.; KAVAMOTO, E. T.; RIGOLINO, M. G.; TABATA, Y. A.; ARRUDA SOARES, H.; SILVEIRA, A. N.; VERÍSSIMO, R. Congelamento do sêmen de truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, em vapor de nitrogênio líquido. **Boletim Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 21, p. 55-60, 1994. Único.

GALL, G. A. E.; CRANDELL, P. A. . The rainbow trout. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 100, n. 1/3, p. 1-10, jan. 1992.

GEFFEN, A. J.; EVANS, J. P. Sperm traits and fertilization success of male and sex-reversed female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 182, n. 1/2, p. 61-72, Feb. 2000.

GODINHO, H. P. Criopreservação de sêmen de peixes. **Informe Agopecuário**, Belo Horizonte, v. 21, n. 203, p. 16-20, mar./abr. 2000.

- GWO, J. Ultrastructural study of osmolality effect on spermatozoa of three marine teleosts. **Tissue & Cell**, Edinburgh, v. 27, n. 5, p. 491-497, Oct. 1995.
- HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. 7. ed. São Paulo: Manole, 2004. 513 p.
- HARVEY, B.; CAROLSFELD, J. Preservation of sperm. In: HARVEY, B.; CAROLSFELD, J. (Ed.) **Induced breeding in tropical fish culture**. Ottawa, Ontario: International Development Research Centre, 1993. Chap. 7, p. 119-130.
- HARVEY, B.; KELLEY, R. N. Chilled storage of *Sarotherodon mossambicus* milt. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 36, n. 1/2, p. 85-95, 1984.
- HERSHBERGER, W. K. Genetic variability in rainbow trout population. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 100, n. 1/3, p. 51-71, Jan. 1992.
- HOLTZ, W. Cryopreservation of rainbow trout. (*Oncorhynchus mykiss*) sperm: practical recommendations. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 110, n. 1, p. 97-100. Feb. 1993.
- HOLT, W. V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, Woburn, v. 53, n. 1, p. 47-58, Jan. 2000.
- HUNTER, G. A.; DONALDSON, E. M.; STOSS, J.; BAKER, I. Production of monosex female groups of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawitscha*) by the fertilization of normal ova with sperm from sex-reversed female. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 33, n. 1/4, p. 355-364, June 1983.
- JAMIESON, B. G. M. **Fish evolution and systematics**: evidence from spermatozoa. Cambridge: Cambridge University Press, 1991. 139 p.
- JOHNSTONE, R.; SIMPSON, T. H.; YOUNGSON, A. F. Sex reversal in salmonid culture. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 13, n. 2, p. 115-134, Feb. 1978.
- JOHNSTONE, R.; SIMPSON, T. H.; YOUNGSON, A. F.; WHITEHEAD, C. Sex reversal in salmonid culture. Part II. The progeny of sex-reversed rainbow trout. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 18, n. 1, p. 13-19, Sept. 1979.
- KAVAMOTO, E. T.; BARNABE, V. H.; CAMPOS, B. E. S. de; ANDRADE-TALMELLI, E. F. de Anormalidades morfológicas nos espermatóides do curimatá, *Prochilodus lineatus* (Steindachner, 1881) (Osteichthyes,

Characiformes, Prochilodontidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 25, p. 61-66, 1999.

KAVAMOTO, E. T.; FOGLI DA SILVEIRA, W.; RIGOLINO, M. G.; CARVALHO FILHO, A. C. de. Avaliação macro e microscópica do sêmen de truta arco-íris *Salmo irideus* Gibbons. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 12, n. 3, p. 73-81, 1985.

KAVAMOTO E. T.; TABATA, Y. A.; FOGLI DA SILVEIRA, W.; RIGOLINO, M. G.; SILVEIRA, A. N. Criopreservação de sêmen de fêmeas genotípicas de truta arco-íris, *Salmo gairdnerii*, masculinizadas pela 17^ª α -metiltestosterona. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE ICTIOLOGIA, 1991, Maringá, Paraná. **Abstracts...** Maringá, Paraná, 1991. p. 189.

LAHNSTEINER, F.; BERGER, B.; HORVÁTH, A.; URBÁNYI, B.; WEISMANN, T. Criopreservation of spermatozoa in cyprinid fishes. **Theriogenology**, Woburn, v. 54, n. 9, p. 1477-1496, Dec. 2000.

LAHNSTEINER, F.; BERGER, B.; WEISMANN, T.; PATZNER, R. A. The influence of various cryoprotectants on semen quality of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) before and after cryopreservation. **Journal Applied Ichthyology**, Berlin, v. 12, n. 2, p. 99-106, July 1996a.

LAHNSTEINER, F.; BERGER, B.; WEISMANN, T.; PATZNER, R. A. Physiological and biochemical determination of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, semen quality for cryopreservation. **Journal of Applied Aquaculture**, Binghamton, v. 6, n. 1, p. 47-73, 1996b.

LAHNSTEINER, F.; MANSOUR, N.; WEISMANN, T. A new technique for insemination of large egg batches with cryopreserved semen in the rainbow trout. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 209, n. 1/4, p. 359-367, June 2002.

LAHNSTEINER, F.; PATZNER, R. A.; WEISMANN, T. Energy resources of spermatozoa of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Pisces, Teleostei). **Reproduction Nutrition Development**, Paris, v. 33, n. 4, p. 349-360, 1993.

LAHNSTEINER, F.; WEISMANN, T.; PATZNER, R. A. Methanol as cryoprotectant and the suitability of 1,2 and 5 ml straws for cryopreservation of semen from salmonid fishes. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 28, n. 6, p. 471-479, June 1997.

LAHNSTEINER, F.; WEISMANN, T.; PATZNER, R. A Semen cryopreservation of salmonid fishes. Influence of handling parameters on the postthaw fertilization rate. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 27, n. 9, p. 659-671, Sept. 1996c.

LAHNSTEINER, F.; WEISMANN, T.; PATZNER, R. A. A uniform method for cryopreservation of semen of salmonid fishes (*Oncorhynchus mykiss*, *Salmo trutta f. fario*, *Salmo trutta f. lacustris*, *Coregonus sp.*). **Aquaculture Research**, Oxford, v. 26, n. 6, p. 801-807, June 1995.

LEE, C. S.; DONALDSON, E. M. General discussion on reproductive biotechnology in finfish aquaculture. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 197, n. 1/4, p. 303-320, June 2001.

LEGENDRE, M.; BILLARD, R. Cryopreservation of rainbow trout sperm by deep-freezing. **Reproduction Nutrition Development**, Paris, v. 20, n. 6, p. 1859-1868, 1980.

LEUNG, L. K. P.; JAMIESON, B. G. M. Live preservation of fish gametes. In: JAMIESON, B. G. M. (Ed.). **Fish evolution and systematics: evidence from Spermatozoa**. Cambridge: Cambridge University Press, 1991. Cap. 20, p. 245-295.

LINHART, O.; BILLARD, R.; PROTEAU, J. P. Cryopreservation of European catfish (*Silurus glanis L.*) spermatozoa. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 115, n. 3/4, p. 347-359, Sept. 1993.

MACCRIMMON, H. R. Word distribution of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, Ottawa, v. 28, n. 5, p. 663-704, 1971.

MARIA, A. N. **Diluidores e crioprotetores no resfriamento e congelamento do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)**. 2005. 73 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras. Lavras, MG.

MAZUR, P. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. **Cryobiology**, San Diego, v. 14, n. 3, p. 251-272, 1977.

MCANDREW, B. J.; RANA, K. L.; PENMAN, D. J. Conservation and preservation of genetic variation in aquatic organisms. In: MUIR, J. F.;

ROBERTS, R. J. (Eds.). **Recent Advances in Aquaculture IV**. Oxford: Blackwell, 1995. p. 295-336. .

MCNIVEN M. A.; GALLANT R. K.; RICHARDSON G. F. Dimethylacetamide as a cryoprotectant for rainbow trout spermatozoa. **Theriogenology**, Woburn, v. 40, n. 5, p. 943-948, Nov. 1993.

MILIORINI, A. B. **Ativadores e concentrações de metanol e dimetilsulfóxido na qualidade do sêmen criopreservado de curimba (*Prochilodus lineatus*)**. 2006. 99 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MELLITO DA SILVEIRA, M. P.; TABATA, Y. A.; RIGOLINO, M. G. Análises macro e microscópica de gônadas de *Oncorhynchus mykiss* esterilizadas ou masculinizadas pela 17alfa-metiltestosterona. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 93-102, 1995.

MINS, S. D.; TSVETKOVA, L. I.; BROWN, G. G. Cryopreservation of sperm of sturgeon and paddlefish. In: TIERSCH, T. R.; MAZIK, P. M. (Ed.) **Cryopreservation in Aquatic Species**. Louisiana: World Aquaculture Society, Baton Rouge, 2000. p. 123-129.

MORISAWA, M.; ODA, S.; YOSHIDA, M.; TAKAI, H. Transmembrane signal transduction for the regulation of sperm motility in fishes and ascidians. In: GAGNON, C. (Ed.) **The male gamete: from basic knowledge to clinical applications**. Vienna. USA: CACHE River Press, 1999. p. 149-160.

MORISAWA, M.; SUZUKI, K.; MORISAWA, S. Effects of potassium and osmolality on spermatozoa motility of salmonid fishes. **Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 107, n. 1, p. 105-113, Nov. 1983.

NAGAHAMA, Y. The functional morphology of teleost gonads. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J.; DONALDSON, E. M. (Ed.). **Fish physiology**. New York: Academic Press, 1983. v. 9, p. 233-275.

OKADA, H.; MATSUMOTO, H.; MURAKAMI, Y. Ratio of induced male from genetical females at various dietary concentrations of methyltestosterone. Page 33. Abstr. Annu. Meet. Jpn. Soc. Sci. Fish. 1981.

OLIVEIRA, A. V. **Resfriamento e criopreservação do sêmen de dourado *Salminus maxillosus* e de pirapitinga *Brycon nattereri***. 2006. 94 p.

Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

ÓRFÃO, L. H. **Resfriamento e criopreservação de sêmen de curimba *Prochilodus lineatus* (VALENCIENNES, 1836)**. 2006. 86 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PERCHEC-POUPARD, G.; GATTI, J. L.; COSSON, J.; JEULIN, C.; FIERVILLE, F.; BILLARD, R. Effects of extracellular environment on the osmotic signal transduction involved in activation of motility of carp spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 110, n. 2, p. 315-327, July 1997.

PIFERRER, F. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 197, n. 1/4, p. 229-281, June 2001.

PIFFERER, F.; DONALDSON, E. M. Gonadal differentiation in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, after a single treatment with androgen or estrogen at different stages during ontogenesis. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 77, n. 2/3, p. 251-262, Mar. 1989.

PIFERRER, F.; DONALDSON, E. M. Progress in the development of sex control techniques for the culture of Pacific salmon. In: AQUACULTURE INTERNATIONAL CONGRESS & EXPOSITION, 1988, Vancouver. **Proceedings...** Vancouver, 1988. p. 316-326.

PIFERRER, F.; DONALDSON, E. M. Sex control in Pacific salmon. In: MUIR, J. F.; ROBERTS, R. J. (Ed.). **Recent advances in aquaculture**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1993. v. 4, p. 67-77.

PIIRONEN J. Cryopreservation of sperm from the brown trout (*Salmo trutta m. lacustris* L.) and Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 116, n. 2/3, p. 275-285, Oct. 1993.

PORTO-FORESTI, F.; TABATA, Y. A.; RIGOLINO, M. G.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Truta arco-íris. **Panorama da Aqüicultura**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 69, p. 22-24, jan./fev. 2002.

PROENÇA, C. E. M.; CARNEIRO, D.; RIGOLINO, M. G.; AKAHASHI, N. S.; TSUKAMOTO, R. Y.; CARNEIRO, T. F.; TABATA, Y. A. **Plataforma do agronegócio da truta**. Brasília: Conselho Nacional de Desenvolvimento

Científico e Tecnológico – CNPq. Departamento de Pesca e Aqüicultura do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento DPA/MAPA, 2001. 39p.

RANA, K. Preservation of gametes. In: BROMAGE, N. R.; ROBERTS, R. J. (Ed.). **Broodstock management and egg and larval quality**. London: Blackwell Science, 1995. p. 53-75.

RANA, K. J.; McANDREW, B. J. The viability of cryopreserved tilapia spermatozoa. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 76, n. 3/4, p. 335-345, Feb. 1989.

ROBLES, V.; CABRITA, E.; CUÑADO, S.; HERRAEZ, M. P. Sperm cryopreservation of sex-reversed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): parameters that affect its ability for freezing. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 224, n. 1/4, p. 203-212, June 2003.

RURANGWA, E.; KIME, D. E.; OLLEVIERA, F.; NASH, J. P. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 234, n. 1/4, p. 1-28, May 2004.

SALTE, R.; GALLI, A.; FALASCHI, U.; FJALESTAD, K. T.; ALEANDRI, R. A protocol for the on-site of frozen milt from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) applied to the production of progeny groups: comparing males from different populations. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 231, n. 1/4, p. 337-345, Mar. 2004

SERRALHEIRO, P. C. S.; FOGLI DA SILVEIRA, W.; GODINHO, H.; OLIVEIRA, I. R. O uso de três soluções diluidoras em sêmen de tainha – *Mugil platanus*, Gunther, 1880, resfriado em container de vapor de nitrogênio. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE ICTIOLOGIA, 13., 1999, São Carlos. **Anais...** São Carlos, 1999. p. 508.

SILVEIRA, A. N.; FORESTI, F.; TABATA, Y. A. Congelamento e fertilidade do sêmen de fêmeas revertidas de truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA, 23., 2000, Cuiabá, MS. **Programa e Resumos...** Cuiabá, MS. : Sociedade Brasileira de Zoologia e Universidade Federal do Mato Grosso, 2000. p. 360

SILVEIRA, A. N.; FORESTI, F.; TABATA, Y. A.; RIGOLINO, M. G.; SILVEIRA, R. V. Cryopreservation of rainbow trout semen: diluent, straw and the vapor column. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 28, n. 2, p. 135-139, 2002.

SILVEIRA, A. N.; FORESTI, F.; TABATA, Y. A.; RIGOLINO, M. G.; SILVEIRA, R. V. Cryopreservation of semen From Functional Sex-Reversed Genotypic Females of the Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 49, n. 1, p. 73-77, Jan. 2006.

SIMEONE, F. P. **Cryopreservation manual**. New York: Nalge Nunc International Corporation, 1998. p. 8.

SOCIEDADE DE AMIGOS DOS AQUÁRIOS PÚBLICOS. 1996. Revista Aquarium 2: 16-17.

SOLAR, I. I.; DONALDSON, E. M. Studies on genetic and hormonal sex control in domesticated rainbow trout. II. Use of methyltestosterone for masculinization and sterilization in cultured rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences 1380: 13 p.

SCOTT, A. P.; BAYNES, S. M. A review of the biology, handling and storage of salmonid spermatozoa. **Journal of Fish Biology**, London, v. 17, n. 6, p. 707-739, July 1980.

SMITH, G. R.; R. F. STEARLEY. The classification and scientific names of rainbow and cutthroat trouts. **Fisheries**, Bethesda, v. 14, n. 1, p. 4-10, Jan./Feb. 1989.

SPRINGATE, J. R. C.; BROMAGE, N.; ELLIOT, J. A. K.; HUDSON, D. L. The timing of ovulation and stripping and their effects on the rates of fertilization, and survival to eying, hatching and swim-up in the rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 43, n. 1/3, p. 313-322, Dec. 1984.

STEIN, H. **Die künstliche Besamung bei Salmoniden Mitteleuropas. Habilitationsschrift**. München-Weihenstephan: University of München-Weihenstephan, 1980.

STOSS, J. Fish gamete preservation and spermatozoa physiology. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J.; DONALDSON, E. M. (Ed.). **Fish physiology**. London: B. Academic Press, 1983. v. 9, cap. 6, p. 305-350.

STOSS, J.; BUYUKHATIPOGLU, S.; HOLTZ, W. Short term and cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) sperm. **Annales**

de Biologie Animal Biochimie Biophysique, Paris, v. 18, n. 4, p. 1077-1082, 1978.

STOSS, J.; HOLTZ, W. Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm. III. Effect of proteins in the diluent, in sperm from different males and interval between sperm collection and freezing. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 31, n. 2/4, p. 275-82, Mar. 1983.

STOSS, J.; HOLTZ, W. Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm. I. Effect of thawing solution, sperm density and interval between thawing and insemination. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 22, p. 97-104, 1981.

STOSS, J.; REFTSIE T. Short term storage and cryopreservation of milt from Atlantic salmon and sea trout. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 30, n. 1/4, p. 229-236, Jan. 1983.

SUQUET, M.; BILLARD, R.; COSSON, J.; NORMANT, Y.; FAUVEL, C. Artificial insemination in turbot (*Scophthalmus maximus*): determination of the optimal sperm to egg ratio and time of gamete contact. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 133, n. 1, p. 83-90, May 1995.

SUQUET, M.; OMMES, M. H.; NORMANT, Y. FAUVEL, C. Assessment of sperm concentration and motility in turbot (*Scophthalmus maximus*), **Aquaculture**, Amsterdam, v. 101, n. 1/2, p. 177-185, Feb. 1992.

TABATA, Y. A. Truticultura: situação mundial e no Brasil. In: WORKSHOP INTERNACIONAL DE AQUICULTURA 1., 1977, São Paulo. **Anais...** São Paulo, SP, 1977. p. 137-148.

TABATA, K.; MIZUTA, A. Cryopreservation of sex reversed gynogenetic female sperm hirame. **Fisheries Science**, Tokyo, v. 63, n. 3, p. 482-483, June 1997.

TABATA, Y. A.; PORTS, L. Truticultura em clima tropical. In: Cyrino, J. E. P. et al. (Ed.) **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt/ Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, 2004, Cap. 11, p. 308-341.

TABATA, Y. A.; RIGOLINO, M. G.; NAGATA, M. K. (2000), Produção de fêmeas masculinizadas de truta arco-íris com ductos espermáticos funcionais. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, 2000, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis, SC, 2000.

TAKAI, H.; MORISAWA, M. Change in intracellular K⁺ concentration caused by external osmolality change regulates sperm motility of marine and freshwater teleosts. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 108, n. 3, p. 1175-1181, Mar. 1995.

TAKASHIMA, F.; PATINO, R.; NOMURA, M. Histological studies on the sex differentiation in rainbow trout. **Bulletin Japanese Society Scientific Fisheries**, Tokyo, v. 46, n. 11, p. 1317-1322, 1980.

TAN-FERMIN, J. D.; MIURA, T.; ADACHI, S.; YAMAUCHI, K. Seminal plasma compositions, sperm motility and milt dilution in the Asian catfish *Clarias macrocephalus* (Gunther). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 171, n. 3/4, p. 323-338, Feb. 1999.

TAVE, D. **Review of basic genetics. Genetics for fish hatchery managers.** 2. ed. New York: Van Nostrand Reinhold, 1993. p. 7-20.

TSUMURA, K.; BLANN, V. E.; LAMONT C. A. Progeny test of masculinized female rainbow trout having functional gonoducts. **The Progressive Fish-Culturist**, Bethesda, v. 53, p. 45-47, 1991.

VAN DEN HURK, R.; SLOF, G. A. A morfological and experimental study of sex differentiation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. **Cell and Tissue Research**, Berlin, v. 218, n. 3, p. 487-497, July 1978.

VIVEIROS, A. T. M. **Semen collection and preservation in African catfish, *Clarias gariepinus*.** 2002. 143 p. Thesis (Ph D) - Wageningen University, Wageningen.

VIVEIROS, A. T. M. Semen cryopreservation in catfish species, with particular emphasis on the African catfish. **Animal Breeding Abstracts**, Fort Collins, v. 73, n. 1, p. 1N-9N, Jan. 2005.

VIVEIROS, A. T. M.; SO, N.; KOMEN, J. Sperm Cryopreservation of African Catfish (*Clarias gariepinus*) Cryoprotectants, Freezing Rates and Sperm: Egg Dilution Ratio. **Theriogenology**, New York, v. 54, n. 9, p. 1305-1308, Dec. 2000.

WHEELER, P. A.; THORGAARD, G. H. Cryopreservation of rainbow trout semen in large straws. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 93, n. 1, p. 95-100, Feb. 1991.

WILLIOT, P.; KOPEIKA, E. F.; GONCHARO, B. F. Influence of testis state, temperature and delay in semen collection on spermatozoa motility in the

cultured Siberian sturgeon (*Acipenser baeri Brandt*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 189, n. 1/2, p. 53-61, Sept. 2000.

YAMAMOTO, T. Sex differentiation, In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J. (Ed.) **Fish physiology**. New York: Academic Press, 1969. v. 3, p. 117-58.

YAMAZAKI, F. Sex control and manipulation in fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 33, n. 1/4, p. 329-354, June 1983.

CAPÍTULO 2

CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN DE MACHOS-XX DE TRUTA ARCO-ÍRIS (*Oncorhynchus mykiss*) COM DUTOS ESPERMÁTICOS FUNCIONAIS

Criopreservação do Sêmen de machos-XX de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) com dutos espermáticos funcionais

RESUMO

As fêmeas de truta arco-íris apresentam taxas de crescimento mais elevadas do que os machos, sendo a inversão sexual a técnica mais utilizada para a obtenção de lotes 100% femininos. Neste estudo, diversos fatores que interferem na criopreservação do sêmen de machos-XX (fêmeas masculinizadas) de truta arco-íris foram avaliados, com o objetivo de aperfeiçoar as técnicas de criopreservação do sêmen. Foram utilizados machos-XX que apresentavam os dutos espermáticos funcionais e o sêmen coletado por pressão abdominal. No experimento 1, quatro diferentes diluidores (glicose 5,4%; BTS® 6%; NaCl 0,9% e NaCl 1,2%-tris) e a adição da gema de ovo à criosolução (diluidor + crioprotetor) foram testados. A criosolução foi preparada com 80% de cada um dos diluidores testados, acrescidos de 10% de gema e 10% de dimetil sulfoxido (DMSO), ou 90% de BTS® e 10% de DMSO. O sêmen foi diluído 1:3 (sêmen:criosolução), envasado em palhetas de 0,5 ml e congelado em botijão de vapor de nitrogênio (CP 100, Taylor-Wharton), a -170°C, transferido, após 12-16 horas, para o nitrogênio líquido, a -196°C, onde permaneceu por, no mínimo, 6 horas antes de ser descongelado para avaliação da motilidade espermática e ou fertilização. O descongelamento do sêmen foi feito em banho-maria, a 70°C, por 3 segundos. No experimento 2, diferentes crioprotetores (DMSO, etileno glicol, metil glicol e metanol) e duas taxas de diluição do sêmen (1:3 e 1:7) foram avaliados. No experimento 3, o sêmen foi diluído 1:3 em glicose, gema e DMSO e criopreservado em três diferentes volumes de palhetas (0,25; 0,5 e 4,0 ml). As palhetas de 0,25 e 0,5 ml foram descongeladas em banho-maria, a 70°C/3s e as de 4,0 mL, a 70°C/15s. No experimento 4 o sêmen foi diluído 1:3 em glicose-gema-DMSO, criopreservado em palhetas de 0,5 ml e descongelado em três diferentes temperaturas (70°C/3s, 60°C/8s e 50°C/8s). Nos experimentos 1, 2, 3 e 4, o sêmen descongelado foi avaliado quanto à motilidade. No experimento 5, o sêmen foi diluído 1:3 em glicose-gema-DMSO e criopreservado em palhetas de 0,5 ml. Após o descongelamento a 70°C/3s, o sêmen foi avaliado quanto à capacidade de fertilização (taxa de ovos olhados), em diferentes proporções espermatozóide:ovo (15×10^6 a 60×10^6), após 196°C dias de incubação. O diluidor glicose-gema proporcionou maior motilidade espermática, quando comparado aos outros diluidores testados, e o acréscimo de gema de ovo foi fundamental para o processo de criopreservação. O crioprotetor DMSO proporcionou maior motilidade espermática quando comparado ao etileno glicol,

metil glicol e metanol, e o sêmen diluído 1:3 obteve motilidade espermática maior que o sêmen diluído 1:7. A motilidade espermática do sêmen descongelado a 70°C/3s foi maior quando comparado ao sêmen descongelado a 60°C/8s e 50°C/8s. A motilidade espermática foi maior ($P < 0,05$) quando o sêmen foi criopreservado em palhetas de 0,5 ml, em relação às palhetas de 0,25 e 4,0 ml e a taxa de ovos olhados para a proporção de 15×10^6 espermatozoides por ovo foi menor ($P < 0,05$), comparada às outras proporções testadas (30×10^6 , 45×10^6 , 60×10^6). Com base nesses resultados, pode-se concluir que o sêmen de truta arco-íris criopreservado em glicose-gema-DMSO, diluído 1:3, envasado em palhetas de 0,5 ml e descongelado a 70°C/3s, obteve as maiores taxas de motilidade espermática após o descongelamento. A proporção de 30×10^6 espermatozoides por ovo, para o sêmen criopreservado, é suficiente para alcançar taxas de ovos olhados de, aproximadamente, 40%.

1 INTRODUÇÃO

Os salmonídeos estão entre os grupos de espécies de peixes mais produzidos em confinamento e as principais espécies representantes deste grupo são o salmão-do-atlântico (*Salmo salar*) e a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*).

Para que seja possível alcançar altas taxas de produtividade por área em um menor espaço de tempo, o que tem se usado nas pisciculturas modernas são as chamadas técnicas de controle da sexualidade em peixes. Em trutas e salmões, as fêmeas apresentam taxas de crescimento mais elevadas do que os machos, sendo assim, mais vantajosas para a produção comercial. Os machos alcançam a maturidade sexual antes de atingir o peso comercial, comprometendo a qualidade e a rentabilidade da criação, já que a maturação sexual é um dos processos biológicos que mais afetam a produtividade. Isso porque, durante este período, a energia que seria utilizada para o crescimento somático é canalizada para a produção de gametas, resultando na diminuição do crescimento, eficiência alimentar, sobrevivência e na qualidade do pescado (Bye & Lincoln, 1986).

Existem diferentes técnicas que podem ser empregadas para a obtenção de lotes monossexos em trutas, porém, a mais utilizada comercialmente é a inversão sexual pela via indireta. Esta técnica consiste na masculinização de fêmeas XX pela administração de hormônios masculinizantes. O andrógeno sintético 17 alfa-metiltestosterona é o hormônio mais utilizado para o processo de inversão de sexos e o resultado da sua administração é a obtenção de machos XX. Lotes 100% femininos são produzidos pelo acasalamento desses machos-XX com fêmeas normais XX. O grande problema encontrado nesse tipo de manipulação é o fato de que esses machos-XX, obtidos por inversão sexual, apresentam testículos morfológicamente alterados e, na maioria das vezes, com dutos espermáticos ausentes, incompletos ou afuncionais (Geffen & Evans,

2000; Tsumura et al., 1991), sendo necessário o sacrifício dos animais e a remoção das gônadas para a utilização do sêmen intratesticular. Essa prática de sacrifício dos animais torna necessária a manutenção de um número elevado de reprodutores nas piscigranjas, além de uma utilização constante de hormônios para a manutenção dos lotes invertidos, o que acaba, muitas vezes, onerando os custos de produção na propriedade.

Com base nesses dados, torna-se necessária a adoção de técnicas que atuem de forma eficiente na racionalização da produção de lotes 100% femininos. Dessa forma, o sêmen de machos-XX de truta arco-íris poderia ser criopreservado, diminuindo, assim, a prática contínua de tratamento hormonal (Hunter et al., 1983; Kavamoto et al., 1991; Silveira et al., 2000) e permitindo a disponibilidade desse material ao longo do ano, reduzindo a necessidade de um estoque muito grande de machos-XX. Pode, ainda, servir como base para o desenvolvimento e a manutenção de bancos genéticos, transporte de gametas e facilitando a fertilização artificial. (McAndrew et al., 1995). Entretanto, o sucesso da criopreservação do sêmen depende de vários fatores que, em conjunto, atuam melhorando a qualidade do sêmen criopreservado. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar parâmetros, como: diluidores de sêmen, crioprotetores, taxas de diluição do sêmen, temperaturas de descongelamento das palhetas, volumes de palhetas e relação ideal de espermatozoides por ovo, no intuito de aperfeiçoar as técnicas de criopreservação do sêmen de machos-XX de truta arco-íris que apresentam os dutos espermáticos funcionais, levando em consideração as condições de cultivo encontradas no Brasil.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado nos meses de julho e agosto de 2005, obedecendo ao período reprodutivo da truta arco-íris para as condições climáticas encontradas no Brasil. Os animais utilizados eram provenientes da Estação Experimental de Salmonicultura “Dr. Ascânio de Faria” - APTA-SAA-SP, localizada na cidade de Campos do Jordão, SP.

As médias de temperatura da água no período foram de 12,7°C e 12,4°C, respectivamente. Para cada experimento, foram selecionados cinco machos-XX de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) com, aproximadamente, dois anos de idade e peso médio de 1,3 kg. A inversão sexual das fêmeas foi feita conforme rotina na Estação Experimental de Campos do Jordão, por meio da utilização do hormônio sintético 17 alpha-metil testosterona, na dose de 250 microgramas / kg de ração, ministrado durante 80 dias a uma temperatura média de 12,8°C, totalizando 1024 UTA (unidades térmicas acumuladas), em graus centígrados dias (°C dias). Nos peixes em que os dutos espermáticos se apresentavam funcionais (cerca de 30% do total submetido ao processo de inversão sexual), o sêmen foi coletado por meio de massagem abdominal após os peixes serem devidamente anestesiados em solução de benzocaína na proporção de 1:10.000. Os que não apresentavam os dutos funcionais, impossibilitando a coleta do sêmen por massagem abdominal, não foram utilizados. O sêmen foi coletado em tubos de ensaio graduados, após ter sido rejeitada uma pequena parcela inicial para evitar a contaminação, seu volume mensurado e mantido em um recipiente com gelo até ser manipulado.

Antes de iniciar cada experimento, a motilidade espermática (% espermatozóides móveis em relação ao total observado) foi estimada subjetivamente no microscópio de luz em aumento de 400X. A solução utilizada como ativadora da motilidade espermática foi o NaHCO₃ 1% (Fogli da Silveira

et al., 1994) pH 8,3, na proporção de 40 microlitros de ativador para cada 10 microlitros de sêmen. Foi avaliada a concentração espermática do sêmen de cada peixe utilizando-se a câmara de Neubauer. Foi mensurado o pH do sêmen de 60% dos peixes utilizados. Apenas as amostras de sêmen que apresentaram taxas de motilidade espermática iniciais iguais ou superiores a 80% foram utilizadas. Em todos os experimentos, as palhetas foram congeladas em botijão de vapor de nitrogênio (CP 100, Taylor-Wharton), a -170°C . Após 12-16 horas, as amostras foram transferidas para o nitrogênio líquido a -196°C , onde permaneceram por, no mínimo, 6 horas antes de serem descongeladas para a avaliação da motilidade espermática.

2.1 Experimento 1: diluidores de sêmen

O experimento 1 foi dividido em três etapas e teve como objetivo principal avaliar o efeito de diferentes diluidores na criopreservação do sêmen. A criosolução foi preparada com 80% ou 90% de cada um dos diluidores testados, 10% do crioprotetor dimetil sulfoxido (DMSO) e 0% ou 10% de gema. O sêmen foi diluído na proporção de 1:3 (sêmen: criosolução), envasado em palhetas de 0,5 ml ($n=3$), descongelado em banho-maria, a 70°C , por 3 segundos e as taxas de motilidade espermática estimadas. A etapa A foi conduzida em um delineamento em blocos casualizados (DBC), com cinco blocos, sendo um macho-XX doador de sêmen por bloco. Foram testados dois diferentes diluidores: glicose 5,4% + gema de ovo (glicose-gema), de acordo com Silveira et al. (2006) e BTS[®] 6% - Beltsville Thawing Solution, Minitub[®], contendo glicose monohidratada 80%, citrato de sódio 12,7%, EDTA 2,65%, sulfato de gentamicina 0,50%, NaHCO_3 2,65% e KCl 1,59% (Maria et al., 2006).

Na etapa B, foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado (DIC), com cinco repetições. Foi coletado, individualmente, sêmen de cinco

machos-XX, de um mesmo lote, para compor um ‘pool’. Testaram -se, nessa etapa, além da solução de glicose 5,4%, a solução de NaCl 1,2% + Tris 0,4% (NaCl-tris; solução imobilizadora de Saad; Linhart et al., 1993) e a solução de NaCl 0,9%. Nas três soluções houve o acréscimo de 10% de gema de ovo.

O objetivo da etapa C foi avaliar o efeito da gema de ovo na criopreservação do sêmen. Foi utilizada a solução diluidora que obteve maiores taxas de motilidade espermática nas etapas A e B (glicose 5,4%). Na metade da solução foi acrescentado 10% de gema e a outra metade permaneceu sem gema. O delineamento experimental utilizado, assim como na etapa A, foi o DBC com cinco blocos, sendo um macho-XX doador de sêmen por bloco.

2.2 Experimento 2: crioprotetores

O objetivo deste experimento foi selecionar um crioprotetor que, combinado ao diluidor glicose-gema, proporcionasse maiores taxas de motilidade espermática pós-descongelamento. O delineamento experimental utilizado em cada uma das etapas foi o DBC, com 5 blocos, sendo um macho-XX doador de sêmen por bloco. Na etapa A, foram testados os seguintes crioprotetores: DMSO, etileno glicol, metil glicol e metanol, todos na proporção de 10% da criosolução (80% glicose 5,4% - 10% gema) diluídos 1:3.

Na etapa B foram testadas duas diferentes taxas de diluição do sêmen (1:3 e 1:7) combinadas aos crioprotetores DMSO e etileno glicol, dispostos em uma estrutura fatorial 2x2 (taxa de diluição x crioprotetor).

Em ambas as etapas, o sêmen foi envasado em palhetas de 0,5 ml (n=3), descongelado em banho-maria, a 70°C, por 3 segundos e as taxas de motilidade espermática estimadas.

2.3 Experimento 3: volume de palhetas

Para testar o efeito do volume das palhetas na criopreservação do sêmen, o experimento 4 foi dividido em duas etapas. Na etapa A, o sêmen foi envasado em palhetas de 0,25 e 0,5 ml (n=3 palhetas/ macho-XX). Na etapa B, comparou-se a palheta de 0,5 ml com a palheta de 4,0 ml (n=5). O delineamento experimental utilizado foi o DBC, com 5 blocos, sendo um macho-XX doador de sêmen por bloco.

Em ambas as etapas o sêmen foi diluído em glicose-gema-DMSO, na proporção de 1:3. A temperatura de descongelamento adotada foi a de 70°C, por 3 segundos, com exceção das palhetas de 4,0 ml, que foram descongeladas a 70°C, por 15 segundos. Após o descongelamento, as taxas de motilidade espermática foram estimadas.

2.4 Experimento 4: temperatura de descongelamento

O sêmen de cinco machos-XX foi diluído em glicose-gema-DMSO, na proporção de 1:3, envasado em palhetas de 0,5 ml (n=3) e congelado de acordo com a metodologia adotada como padrão. O descongelamento das palhetas foi feito em banho-maria em três diferentes temperaturas (70°C/3s, 60°C/8s e 50°C/8s) e a motilidade espermática do sêmen estimada. O delineamento utilizado foi um DBC com 5 blocos, sendo um macho-XX doador de sêmen por bloco.

2.5 Experimento 5: proporção espermatozóides:ovo na taxa de fertilização

Foi coletado, individualmente, sêmen de cinco machos-XX e constituído um ‘pool’ com 3 ml de cada macho. O ‘pool’ foi diluído 1:3 em glicose -gema-DMSO, envasado em palhetas de 0,5 ml e congelado.

O sêmen foi descongelado em banho-maria a 70°C, por 3 segundos e, antes de iniciar a fertilização, cinco palhetas foram usadas para avaliar a taxa de motilidade espermática. Foram selecionados cinco machos-XX para compor um outro ‘pool’ que serviu como controle (n=3/tratamento). O ‘pool’ foi utilizado *in natura* para fertilizar cada fêmea, respeitando-se as devidas concentrações espermáticas para cada tratamento, com o objetivo de avaliar a viabilidade dos ovos. Foram testados quatro diferentes tratamentos: 15×10^6 , 30×10^6 , 45×10^6 e 60×10^6 espermatozóides por ovo. Duas réplicas foram executadas para cada tratamento em cada fêmea (3 fêmeas x 2 repetições), totalizando seis réplicas por tratamento. Cem ovos de cada fêmea foram distribuídos em copos plásticos de 100 ml devidamente identificados; o sêmen descongelado foi imediatamente misturado aos ovos e a ativação dos espermatozóides feita com uma solução de NaHCO_3 1%. Depois de 20 minutos da ativação, os ovos foram enxaguados com água corrente e as parcelas aleatoriamente distribuídas em incubadoras de bandeja (Figura 1). A taxa de ovos olhados foi determinada após 16 dias de incubação com 194°C dias, etapa em que os embriões já apresentam os olhos pigmentados. O cálculo foi feito relacionando-se a quantidade de ovos viáveis e o número total de ovos por amostra.

O delineamento experimental utilizado foi um DBC, composto por três blocos, sendo cada bloco constituído por uma fêmea doadora de ovos de, aproximadamente, dois anos de idade e peso médio de 1,33 kg. Os testes de fertilização foram realizados 24 horas após o congelamento do sêmen.



FIGURA 1: Incubadoras de bandeja – parcelas distribuídas aleatoriamente
(Fonte: APTA-SAA-SP)

2.6 Análise estatística

Os dados de motilidade espermática e taxas de fertilização dos ovos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelos testes F e Scott-Knott, a 5% de probabilidade, utilizando-se o pacote computacional Sistema de Análise de Variância (Sisvar) (Ferreira, 1999).

3 RESULTADOS

As características do sêmen dos 25 machos-XX utilizados neste estudo estão apresentadas na Tabela 1.

TABELA 1: Dados referentes ao número de animais, peso vivo, volume, motilidade, concentração espermática e pH, nas diferentes etapas experimentais.

| Peixes | Experimento | Peso vivo (kg) | Volume (ml) | Motilidade inicial (%) | ¹ Sptz x 10 ⁶ /mm ³ | pH |
|-------------------|-------------|-------------------|----------------|---------------------------|---|---------|
| 1 | 1A e 2A | 0,90 | 3,5 | 100 | 10 | 7,2 |
| 2 | 1A e 2A | 1,10 | 11,0 | 80 | 10 | -- |
| 3 | 1A e 2A | 1,10 | 3,7 | 80 | 5 | 7,3 |
| 4 | 1A e 2A | 1,10 | 6,1 | 100 | 11 | 7,3 |
| 5 | 1A e 2A | 1,25 | 3,6 | 80 | 13,7 | -- |
| 6 | 1B e 4B | 1,20 | 3,0 | 90 | 15 | 7,0 |
| 7 | 1B e 4B | 0,90 | 4,0 | 80 | 17 | -- |
| 8 | 1B e 4B | 1,25 | 5,5 | 90 | 18 | 7,4 |
| 9 | 1B e 4B | 1,00 | 4,0 | 90 | 17 | -- |
| 10 | 1B e 4B | 1,00 | 3,5 | 80 | 14 | 7,2 |
| 11 | 1C e 4A | 1,00 | 3,0 | 90 | 13 | 7,3 |
| 12 | 1C e 4A | 0,90 | 3,5 | 90 | 15 | -- |
| 13 | 1C e 4A | 0,95 | 5,0 | 90 | 13 | 7,3 |
| 14 | 1C e 4A | 1,10 | 5,0 | 100 | 20 | -- |
| 15 | 1C e 4A | 1,20 | 5,0 | 100 | 12 | 7,0 |
| 16 | 2B e 3 | 0,98 | 5,0 | 100 | 8 | 7,4 |
| 17 | 2B e 3 | 0,84 | 4,0 | 100 | 13 | -- |
| 18 | 2B e 3 | 1,24 | 4,0 | 100 | 8 | 7,6 |
| 19 | 2B e 3 | 0,90 | 4,0 | 100 | 17 | -- |
| 20 | 2B e 3 | 0,94 | 4,5 | 100 | 5 | 7,1 |
| 21 | 5 | 2,10 | 6,0 | 80 | 12 | 7,0 |
| 22 | 5 | 2,40 | 8,0 | 80 | 10 | -- |
| 23 | 5 | 2,40 | 6,0 | 90 | 15 | 7,0 |
| 24 | 5 | 2,60 | 6,0 | 90 | 11 | -- |
| 25 | 5 | 2,00 | 5,0 | 80 | 14 | 7,2 |
| média ± DP | | 1,3±0,5 | 5,0±2,0 | 90±8,0 | 13±4,0 | 7,2±0,2 |

Sptz – espermatozóides.

3.1 Experimento 1: diluidores de sêmen

O diluidor glicose-gema foi o que proporcionou maiores taxas de motilidade espermática pós-descongelamento, em todas as etapas experimentais. Os resultados estão expressos na Tabela 2.

TABELA 2: Motilidade (%; média \pm desvio padrão; n=5 machos-XX) espermática do sêmen de machos-XX de truta arco-íris, criopreservado em diferentes diluidores e DMSO 10%.

| Etapas | Diluidores | Motilidade espermática (%) |
|--------|-------------------------------|----------------------------|
| A | Glicose 5,4% + gema | 41 \pm 18 a |
| | ¹ BTS [®] | 3,0 \pm 2,5 b |
| B | Glicose 5,4% + gema | 60 \pm 0,0 a |
| | NaCl 0,9% + gema | 50 \pm 7,0 b |
| | NaCl-tris + gema | 22 \pm 8,0 c |
| C | Glicose 5,4% + gema | 53 \pm 7,0 a |
| | Glicose 5,4% | 17 \pm 8,0 b |

Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna e etapa não diferem entre si, pelo teste de Scott Knott, na etapa B e pelo teste F, nas etapas A e C (P>0,05).

¹Glicose monohidratada 80%; citrato de sódio 12,7%; EDTA 2,65%; sulfato de gentamicina 0,50%; NaHCO³ 2,65 %; KCl 1,59 %.

3.2 Experimento 2: crioprotetores

Na etapa A houve diferença significativa (P<0,05) entre os crioprotetores testados. O DMSO foi o crioprotetor que apresentou maiores taxas de motilidade espermática pós-descongelamento, seguido de etileno glicol, metil glicol e metanol.

Na etapa B, detectou-se que o efeito dos crioprotetores e dos níveis de diluição foi significativo (P<0,05). O crioprotetor DMSO foi o que proporcionou maiores taxas de motilidade espermática pós-descongelamento, tanto na diluição

1:3 como na 1:7, quando comparado ao etileno glicol. Quando se avaliou a motilidade espermática dentro de cada diluidor, observou-se que a diluição 1:3 obteve melhores resultados, tanto para o crioprotetor DMSO como para o etileno glicol, quando comparada à diluição 1:7. Os resultados de motilidade espermática estão expressos na Tabela 3.

TABELA 3: Motilidade (%; média \pm desvio padrão; n=5 peixes) espermática pós-descongelamento do sêmen de machos-XX de truta arco-íris, criopreservado em glicose-gema combinado a diferentes crioprotetores (10%) e taxas de diluição.

| Etapa | Crioprotetor (10%) | Sêmen: criosolução | |
|-------|--------------------|--------------------|------------------|
| | | 1:3 | 1:7 |
| A | DMSO | 41 \pm 18 a | Nt ¹ |
| | Etileno glicol | 32 \pm 10 b | Nt |
| | Metil glicol | 18 \pm 8,0 c | Nt |
| | Metanol | 5,0 \pm 3,0 d | Nt |
| B | DMSO | 63 \pm 3,0 a A | 37 \pm 10 a B |
| | Etileno glicol | 26 \pm 3,0 b A | 13 \pm 3,0 b B |

Médias seguidas de letras iguais maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas, dentro da mesma etapa, não diferem entre si, pelo teste de Scott Knott (P>0,05).

¹ Não testado

3.3 Experimento 3: volume de palhetas

Na etapa A, houve diferença significativa (P<0,05) para a taxa de motilidade espermática nos diferentes volumes de palhetas testados. A palheta de 0,5 ml apresentou maiores taxas de motilidade espermática pós-descongelamento, quando comparada com a de 0,25 ml. Na etapa B, novamente, as taxas de motilidade espermática foram maiores quando o sêmen foi congelado em palhetas de 0,5 ml, comparadas com a de 4,0 ml (P<0,05). Os resultados de motilidade espermática estão expressos na Tabela 4.

TABELA 4: Motilidade (%; média \pm desvio padrão; n=5 doadores de sêmen) espermática do sêmen de machos-XX de truta arco-íris, criopreservado em meio contendo glicose-gema-DMSO e envasado em diferentes volumes de palhetas.

| Etapa | Palheta (ml) | Descongelamento (°C) | Tempo (segundos) | Motilidade (%) |
|-------|--------------|----------------------|------------------|----------------|
| A | 0,5 | 70 | 3 | 50 \pm 7 a |
| | 0,25 | 70 | 3 | 32 \pm 14 b |
| B | 0,5 | 70 | 3 | 60 \pm 3 a |
| | 4,0 | 70 | 15 | 46 \pm 3 b |

Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna e etapa não diferem entre si, pelo teste F (P>0,05).

3.4 Experimento 4: temperaturas de descongelamento

A temperatura de descongelamento de 70°C, por 3 segundos, proporcionou maiores taxas de motilidade espermática (P<0,05), quando comparada às temperaturas de 60°C e 50°C, por 8 segundos (Tabela 5).

TABELA 5: Motilidade (%; média \pm desvio padrão; n=5 doadores de sêmen) espermática do sêmen de machos-XX de truta arco-íris, criopreservado em meio contendo glicose-gema-DMSO e descongelado em diferentes temperaturas.

| Descongelamento (°C) | Tempo (segundos) | Motilidade (%) |
|----------------------|------------------|----------------|
| 70 | 3 | 63 \pm 3,0 a |
| 60 | 8 | 51 \pm 8,0 b |
| 50 | 8 | 48 \pm 12 b |

Médias seguidas por letras iguais na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott Knott (P>0,05).

3.5 Experimento 5: proporção espermatozóides:ovo na taxa de fertilização

Quando se utilizou uma relação de 15×10^6 espermatozóides por ovo, a taxa de ovos olhados foi de 30%, ou seja, significativamente menor ($P < 0,05$) quando comparada às outras três relações utilizadas (30×10^6 , 45×10^6 , 60×10^6) que apresentaram taxas de ovos olhados de 39%, 45% e 43%, respectivamente (Tabela 6). Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre elas e a motilidade média do sêmen pós-descongelamento foi de 52%.

TABELA 6: Taxa de ovos olhados em diferentes relações espermatozóide:ovo para o sêmen de machos-XX de truta arco-íris, criopreservado em glicose-gema-DMSO e descongelado a 70°C , por 3 segundos.

| Nº de palhetas | Espermatozóides:ovo | Ovos olhados (%) |
|----------------|---------------------|------------------|
| 1 | 15×10^6 | $30 \pm 3,0$ a |
| 2 | 30×10^6 | $39 \pm 2,0$ b |
| 3 | 45×10^6 | $45 \pm 0,0$ b |
| 4 | 60×10^6 | 43 ± 10 b |

Médias seguidas por letras iguais na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott Knott ($P > 0,05$).

4 DISCUSSÃO

A utilização de andrógenos para a inversão sexual em truta arco-íris é uma técnica muito usada, porém, na maioria das vezes, esse tratamento conduz a uma população masculina cuja maioria dos machos-XX apresenta os dutos espermáticos ausentes, incompletos ou afuncionais, o que requer o sacrifício dos animais para obter o sêmen intratesticular (Geffen & Evans, 2000; Tsumura et al., 1991). Quando compararam-se machos-XX que apresentavam os dutos espermáticos com machos normais XY, não foi encontrada diferença com relação às características seminais (viscosidade, coloração, motilidade e concentração espermática) e o sêmen dos peixes com dutos teve o mesmo comportamento que o sêmen dos machos normais XY, após a criopreservação (Silveira et al., 2006). A criopreservação do sêmen de machos-XX que apresentam os dutos espermáticos facilita o gerenciamento da reprodução e reduz o número de reprodutores estocados (Feist et al., 1995; Tabata et al., 2000).

A solução de glicose 5,4% usada como diluidor na criopreservação do sêmen de truta arco-íris, acrescida de 10% DMSO e 10% gema de ovo, mostrou-se eficiente, apresentando uma boa taxa de motilidade espermática após o descongelamento. Soluções contendo glicose em sua composição têm sido amplamente usadas por vários autores (McNiven et al., 1993; Piironen, 1993; Silveira et al., 2006; Stoss & Reftsie, 1983) para a criopreservação do sêmen de truta arco-íris, proporcionando excelentes resultados de motilidade espermática e fertilização pós-descongelamento. A fosforilação oxidativa mitocondrial é altamente requerida para produzir energia durante o batimento flagelar dos espermatozóides e a insuficiência de ATP é uma das principais causas da redução da motilidade espermática (Cosson et al., 1999). Estudos mostraram que os espermatozóides de truta arco-íris utilizam triglicerídeos e glicose como

fontes primárias de energia (Lahnsteiner et al., 1993). Provavelmente, a concentração de glicose empregada neste estudo (5,4% da solução diluidora) foi suficiente para suprir as necessidades metabólicas das células espermáticas.

O diluidor BTS[®], rotineiramente utilizado como diluidor do sêmen de suíno no processo de resfriamento, possui 80% de glicose na sua composição. Não existem relatos na literatura de utilização de BTS[®] para a criopreservação do sêmen de truta arco-íris, porém, ele tem sido altamente eficaz como diluidor utilizado no processo de criopreservação do sêmen de espécies nativas brasileiras, como a piracanjuba, *Brycon orbignyanus* (Maria, 2005), a curimba, *Prochilodus lineatus* (Miliorini, 2006 e Órfão, 2006) e a pirapitinga, *Brycon nattereri* (Oliveira, 2006), entre outros.

No presente trabalho utilizou-se o BTS[®] como diluidor de sêmen na tentativa de testar sua eficácia na preservação do sêmen de truta arco-íris, porém, os resultados de motilidade espermática obtidos não foram satisfatórios. A solução fisiológica de NaCl 0,9% (154 mM) utilizada neste trabalho como diluidor de sêmen, acrescida de DMSO 10% e gema de ovo 10%, mostrou-se eficiente no processo de criopreservação do sêmen, proporcionando boas taxas de motilidade espermática pós-descongelamento.

Diluidores à base de soluções salinas já foram amplamente estudados por diversos autores (Babiak et al., 1995; Borchard & Schmidt, 1979; Büyükhatipoglu & Holtz, 1978; Stein, 1980; Stoss & Holtz, 1981). A grande vantagem do NaCl é a simplicidade da sua formulação, tendo em vista que soluções simples têm sido empregadas com grande sucesso como diluidor de sêmen de diversas espécies. Além disso, soluções que têm como base o NaCl, com níveis entre 100 e 200 mM, possuem um pequeno risco de danos hipo ou hiperosmótico para os espermatozoides de salmonídeos (Scott & Baynes, 1980). Outra solução salina simples que foi avaliada foi a solução de NaCl 1,2%-tris, acrescida de 10% de gema de ovo. Esta solução foi testada pela primeira vez em

salmonídeos neste trabalho e não proporcionou resultados satisfatórios de motilidade espermática com taxas abaixo de 23%. Maria (2005), testando o mesmo diluidor para criopreservação do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*), também não obteve boas taxas de motilidade espermática pós-descongelamento. Entretanto, taxas de motilidade espermática acima de 60% foram observadas quando se utilizou a solução de NaCl 1,2%-tris + DMSO ou NaCl 1,2%-tris + metil glicol, na criopreservação do sêmen de dourado (*Salminus maxillosus*) (Órfão & Viveiros, 2004).

O acréscimo de gema de ovo, combinado à glicose e ao DMSO, foi crucial para a manutenção da motilidade espermática após o descongelamento. A gema de ovo é rotineiramente adicionada aos diluidores para criopreservação do sêmen de mamíferos, com o objetivo de proteger as células espermáticas contra o choque térmico. Acredita-se que sua ação seja devido à presença de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), as quais aderem à membrana celular durante o processo de criopreservação, preservando, com isso, a membrana dos espermatozóides (Moussa et al., 2002). Sua atuação se dá na superfície da membrana plasmática, restaurando a perda de fosfolípidos e, aparentemente, induzindo uma alteração transitória de sua composição, conseqüentemente prevenindo a ruptura da membrana (Farstard, 1996). Em peixes, como em mamíferos, a gema de ovo está relacionada com a resistência da membrana plasmática e aos danos causados pela baixa temperatura (Leung, 1991). Em Salmonídeos, esse agente estabilizador de membrana é essencial para manter a viabilidade dos espermatozóides após o processo de congelamento e descongelamento (Baynes & Scott, 1987; Lahnsteiner et al., 1996a); já nos ciprinídeos, a adição de gema de ovo provoca um efeito negativo na qualidade do sêmen, reduzindo a motilidade espermática (Babiak & Glogowski, 1998; Lahnsteiner et al., 2000).

Existem relatos da utilização de diversos crioprotetores que são utilizados na preservação do sêmen de salmonídeos, entre eles estão o dimetil sulfoxido (DMSO) (Baynes & Scott 1987; Holtz 1993; Legendre & Billard 1980; Stoss & Holts 1983), glicerol (Pironen 1993), combinação entre DMSO e glicerol (Lahnsteiner et al., 1995, 1996b), propanodiol (Lahnsteiner et al., 1996b), dimetil acetamida (McNiven et al., 1993) e metanol (Lahnsteiner et al., 1997, 2000, 2002). Neste estudo, foram testados DMSO, metanol, metil glicol e etileno glicol, tendo os dois últimos sido testados, pela primeira vez, na criopreservação do sêmen de truta arco-íris. O DMSO foi o crioprotetor que apresentou melhores resultados no decorrer dos experimentos, proporcionando motilidade espermática entre 41% e 63% e taxa de ovos olhados de 45%. O DMSO tem sido usado como crioprotetor de eleição por vários autores (Cabrita et al., 2001a e 2001b; Fogli da Silveira et al., 1994; Robles et al., 2003; Silveira et al., 2002 e 2006) na criopreservação do sêmen de truta arco-íris, proporcionando bons resultados de motilidade espermática e fertilização após o descongelamento.

O crioprotetor metanol, combinado ao diluidor glicose-gema, não proporcionou resultados satisfatórios de motilidade espermática neste estudo. Entretanto, quando o metanol foi comparado ao DMSO, foi observada maior capacidade de fertilização do sêmen criopreservado em metanol quando combinado a diluidores complexos que tinham como base soluções salinas em sua composição (Lahnsteiner et al., 1997). Talvez essa combinação explique a melhor eficiência do metanol em relação aos resultados encontrados neste trabalho, tendo em vista que avaliou-se o metanol associado apenas a diluidores mais simples, tendo como base a glicose e não soluções salinas.

Dentre os crioprotetores que foram testados pela primeira vez neste trabalho, o etileno glicol proporcionou motilidade espermática de 32%, enquanto o metil glicol proporcionou apenas 18% de motilidade pós-descongelamento.

Pelo fato terem sido testados pela primeira vez em truta arco-íris, acredita-se que ainda necessitam de mais estudos quanto à concentração ideal, diluição utilizada e sua resposta em associação a diferentes diluidores, para que se possa inferir com maior precisão sobre a eficácia do etileno glicol e do metil glicol na preservação do sêmen de truta arco-íris. Na criopreservação de sêmen de tilápia (*Sarotherodon mossambicus*), foi observado sinergismo entre crioprotetores (Harvey, 1983). Aparentemente, determinados crioprotetores agem melhor em algumas espécies do que em outras, de sorte que a seleção do melhor crioprotetor a ser testado pela primeira vez numa espécie deve ser feita em testes de tentativa e erro (Bedore, 1999).

Quando se avaliou a taxa de diluição do sêmen, a proporção 1:3 (v/v) proporcionou maior motilidade espermática pós-descongelamento, quando comparada à diluição 1:7 (v/v), tanto para a criosolução glicose-gema-DMSO quanto para a criosolução glicose-gema-etileno glicol. As taxas de diluição utilizadas para criopreservação de sêmen de peixes têm variado de 1:1 a 1:10 (v/v). A concentração espermática também apresenta grande diferença entre as diferentes espécies de peixes (Stein, 1980) e a relação ótima para a diluição do sêmen é espécie-específica (Lahnsteiner et al., 1996c). Entretanto, a concentração espermática depende muito do período em que a espécie se encontra dentro da estação reprodutiva (Piironen & Hyvärinen 1983; Piironen 1985) e da idade dos peixes (Billard, 1988), podendo, ainda, variar entre as diferentes populações de uma mesma espécie. Portanto, a avaliação da concentração espermática e a adaptação das relações de diluição do sêmen devem ser recomendadas de acordo com cada reprodutor e populações de peixes (Lahnsteiner et al., 2000). Geralmente, a diluição recomendada para a criopreservação do sêmen de salmonídeos varia de 1:1 a 1:3 (Babiak et al., 1995; Legendre & Billard 1980).

No presente estudo, foram avaliados três diferentes volumes de palhetas (0,5, 0,25 e 4,0 ml). A palheta de 0,5 ml, quando comparada a de 0,25 ml, proporcionou maior taxa de motilidade espermática pós-descongelamento (50 e 32% respectivamente). O mesmo foi observado quando se comparou a palheta de 0,5 com a de 4,0 ml (60% e 46%, respectivamente). Em estudos realizados com o mesmo estoque de reprodutores, palhetas de 0,5 e 4,0 ml foram utilizadas no processo de criopreservação. Não foi observada diferença entre os volumes das palhetas quando o sêmen foi criopreservado no diluidor V2 composto por: NaCl 0,75g, NaHCO₃ 0,20g, KCl 0,038g, glicose 0,10g, água destilada 100 ml, gema de ovo 20 ml (Stein & Bayrle, 1978) e 10 ml de DMSO. Porém, quando se utilizou a solução modificada de Cortland para diluir o sêmen, as taxas de fertilização foram maiores para as palhetas de 0,5 ml com relação às de 4,0 ml (Solução modificada de Cortland: NaCl 0,725g, CaCl₃2H₂O 0,023g, KCl 0,038g, NaH₂PO₄ 0,041g; Mg(SO₄).7H₂O 0,023g; NaHCO₃ 0,10g; glicose 0,10 g, água destilada 100 ml [Carosfeld et al., 1990] e 24 ml de DMSO). Em outro estudo, não foi encontrada diferença na motilidade espermática ao comparar palhetas de 0,5; 1,8 e 5,0 ml. Porém, a viabilidade das células e a taxa de fertilização foram mais baixas para as palhetas de maior volume com relação às de 0,5 ml (Cabrita et al., 2001b).

Excelentes resultados de motilidade espermática e fertilização também foram encontrados em estudos com palhetas de 0,25 e 0,5 ml, na criopreservação do sêmen de salmonídeos (Lahnsteiner et al., 1995). Em geral, as palhetas de 0,5 ml são mais eficientes que as palhetas de maior volume, porém, sua capacidade de fertilização se restringe a um número muito pequeno de ovos, o que torna cada vez mais freqüentes estudos com palhetas de maior volume, objetivando a fertilização em grande escala. Quando grupos grandes de ovos (1.600-2000 ovos) foram fertilizados com palheta de 5,0 ml, os resultados de fertilização foram similares aos das palhetas de 0,5 ml, demonstrando que a ligeira perda em

fertilização foi compensada pelos benefícios das palhetas de 5,0 ml (Cabrita et al., 2001b).

Em geral, células congeladas rapidamente, como em palhetas de 0,5 ml, devem ser mais rapidamente descongeladas quando comparadas com células congeladas em velocidade mais lenta, como em criotubos ou macropalhetas contendo um volume maior de sêmen (Viveiros, 2005). Portanto, a velocidade de congelamento das células e o volume das palhetas que serão utilizadas devem ser levados em conta para selecionar a temperatura ideal de descongelamento e o tempo de exposição das palhetas a essa temperatura. Neste estudo, testou-se apenas o descongelamento rápido para palhetas de 0,5 ml e observou-se que a exposição das palhetas por três segundos, a uma temperatura de 70°C, resultou em maior taxa de motilidade espermática pós-descongelamento em relação às temperaturas de 60°C e 50°C, por oito segundos. Fogli da Silveira et al. (1994) usaram, pela primeira vez, a temperatura de descongelamento de 70°C, por 3 segundos, que foi posteriormente adotada por Silveira (2002, 2006), obtendo excelentes resultados de fertilização para o sêmen criopreservado.

Existem relatos de que há diferenças com relação às condições de criopreservação do sêmen para as diversas espécies, porém, quando se trata do descongelamento do sêmen, esse parâmetro não se mostra espécie-específico, observando-se resultados eficientes de motilidade e fertilização para o sêmen descongelado a 25°C, por 30 segundos, para diferentes espécies de salmonídeos (Lahnsteiner et al., 2000).

Existe uma grande variação da proporção de número de espermatozóide por ovo adotada nos trabalhos que envolvem fertilização a partir do sêmen criopreservado de salmonídeos. A proporção recomendada para as culturas comerciais de truta arco-íris é de 10×10^6 espermatozoides por ovo (spz:ovo) (Scott & Baynes, 1980 - revisão). Proporções de $3,5 \times 10^6$ (Fogli da Silveira et al., 1994), $2,7 \times 10^6$ (Lahnsteiner., 2002), 20×10^6 (Silveira et al., 2002) e 16×10^6

spz:ovo (Salte, 2004) têm sido usadas para o sêmen criopreservado. Para o sêmen de machos-XX, é descrita uma proporção de 20×10^6 spz:ovo (Silveira et al., 2006) para os peixes que apresentam os dutos espermáticos funcionais e de $3,8 \times 10^6$ (Geffen & Evans, 2000) e 17×10^6 spz:ovo (Robles et al., 2003) para o sêmen intratesticular. No presente trabalho, proporções acima de 30×10^6 spz:ovo foram suficientes para alcançar taxas de ovos olhados de 42%, em média, demonstrando maior eficiência quando comparadas à proporção de 15×10^6 spz:ovo.

O protocolo de criopreservação do sêmen utilizado neste experimento foi o que obteve maiores taxas de motilidade espermática nos experimentos 1, 2, 3 e 4 (glicose-gema-DMSO, diluído 1:3, envasado em palhetas de 0,5 ml e descongelado a 70°C por 3s). Sabe-se que o processo de criopreservação causa diversos danos às células espermáticas, resultando em uma diminuição significativa da motilidade espermática e do número de espermatozóides vivos, o que afeta diretamente o número de espermatozóide que realmente estarão aptos a fertilizar os ovos após o descongelamento do sêmen. As proporções de espermatozóide por ovo que são relatadas na literatura, geralmente, não levam em conta o número de espermatozóides vivos após o processo de criopreservação. Esse fato talvez explique a grande diferença entre os protocolos utilizados.

A truta arco-íris é uma espécie muito estudada em todo o mundo, geralmente servindo como modelo para estudos preliminares em outras espécies. Por ser um peixe de clima temperado, grande parte das pesquisas está concentrada em países tradicionais no cultivo de trutas e salmões, como é o caso do Canadá, Estados Unidos e diversos países europeus. Em países de clima tropical, onde a espécie foi introduzida e o seu processo de adaptação ainda não foi totalmente consolidado, a truta arco-íris ainda é pouco estudada. Na literatura internacional, foram realizados diversos estudos que envolvem protocolos de

criopreservação com excelentes resultados, porém, neste estudo, procurou-se avaliar alternativas mais simples para o processo de criopreservação, na tentativa de adaptar um protocolo que seja eficiente para as condições de cultivo encontradas no Brasil.

5 CONCLUSÃO

Para as condições de cultivo dos machos-XX de truta arco-íris encontradas no Brasil, a solução composta por 80% glicose 5,4% + 10% gema de ovo associada a 10% do crioprotetor DMSO mostrou-se eficiente no processo de criopreservação do sêmen, quando envasado em palhetas de 0,5 ml e descongelado a 70° C, por 3 segundos, utilizando para o processo de fertilização, uma proporção maior ou igual a 30×10^6 espermatozóiide por ovo.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BABIAK, I.; GLOGOWSKI, J. Cryopreservation of sperm from asp *Aspius asuius*. **Progressive Fish Culturist**, Bethesda, v. 60, n. 2, p. 146-148, Apr. 1998.
- BABIAK, I.; GLOGOWSKI, J.; LUCZYNSKI, M. J.; KUCHARCZYK, D.; LUCZYNSKI, M. Cryopreservation of the milt of the Northern pike. **Journal of Fish Biology**, London, v. 46, n. 5, p. 819-828, May 1995.
- BAYNES, S. M.; SCOTT, A. P. Cryopreservation of rainbow trout spermatozoa: The influence of sperm quality, egg quality and extender composition on postthaw fertility. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 66, n. 1, p. 53-67, Oct. 1987.
- BEDORE, A. G. **Características criopreservação do sêmen de pacu-caranha (*Piaractus mesopotamicus*) e de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)**. 1999. 53 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- BILLARD, R. Artificial insemination and gamete management in fish. **Marine Behaviour and Physiology**, Reading, v. 14, n. 1, p. 3-21, 1988.
- BORCHARD, B.; SCHMIDT, G. W. Versuche mit Regenbogenforellensperma. IV. Die Tiefkühlkonservierung. Beobachtungen zum Einsatz bei praktischen und wissenschaftlichen Arbeiten. **Fischwirt**, Hamburg, v. 29, p. 49-51, 1979.
- BÜYÜKHATİPOĞLU, S.; HOLTZ, W. Preservation of trout sperm in liquid and frozen state. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 14, n. 1, p. 49-56, May 1978.
- BYE, V. J.; LINCOLN, R. F. Commercial methods for the control of sexual maturation in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 57, n. 1/4, p. 299-309, Oct. 1986.
- CABRITA, E.; ANEL, L.; HERRAÉZ, M. P. Effect of external cryoprotectants as membrane stabilizers on cryopreserved rainbow trout sperm. **Theriogenology**, Woburn, v. 56, n. 4, p. 623-635, Sept. 2001a.

- CABRITA, E.; ROBLES, V.; ALVAREZ, R.; HERRÁEZ, M. P. Cryopreservation of rainbow trout sperm in large straws: application to large scale fertilization. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 201, n. 3/4, p. 301-314, Oct. 2001b.
- CAROSFELD, J.; HARVEY, B.; FOGLI DA SILVEIRA, W.; KAVAMOTO, E. T.; RAMOS, S. M.; SILVEIRA, A. N. Criopreservação do sêmen do pacu *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1987. **Boletim Técnico CEPTA**, Pirassununga, v. 3, p. 1-4, 1990.
- COSSON, J.; BILLARD, R.; CIBERT, C.; DRÉANNO, C.; SUQUET, M. Ionic factors regulating the motility of fish sperm. In: GAGNON, C. (Ed.) **The male gamete: from basic science to clinical applications**. Vienna: Cache River Press, 1999. Chap. 16, p. 162-186.
- FARSTAD, W. Semen cryopreservation in dogs and foxes. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 42, n. 1/4, p. 251-260, Apr. 1996.
- FEIST, G.; CHOO-GUAN, Y.; FITZPATRICK, M. S.; SCHRECK, C. B. The production of functional sex-reversed male rainbow trout with 17 α methyltestosterone and 11 β -hydroxyandrostenedione. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 131, n. 1/2, p. 145-152, Mar. 1995.
- FERREIRA, D. F. **Sistema de análise de variância –SISVAR**. Ver. 4. 3. Lavras: UFLA-Departamento de Ciências Exatas, 1999.
- FOGLI DA SILVEIRA, W.; KAVAMOTO, E. T.; RIGOLINO, M. G.; TABATA, YA.; ARRUDA SOARES, H. ; SILVEIRA, A. N.; VERÍSSIMO, R. Congelamento do sêmen de truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, em vapor de nitrogênio líquido. **Boletim Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 21, p. 55-60, 1994. Único.
- GEFFEN, A. J.; EVANS, J. P. Sperm traits and fertilization success of male and sex-reversed female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 182, n. 1/2, p. 61–72, Feb. 2000.
- HARVEY, B. Cryopreservation of *Sarotherodon mossambicus* spermatozoa. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 32, p. 313-320, 1983.
- HARVEY, B.; KELLEY, R. N. Chilled storage of *Sarotherodon mossambicus* milt. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 36, 1/2, p. 85-95, 1984.

HOLTZ W. Cryopreservation of rainbow trout. (*Oncorhynchus mykiss*) sperm: practical recommendations. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 110, n. 1, p. 97-100. Feb. 1993.

HUNTER, G. A.; DONALDSON, E. M.; STOSS, J.; BAKER, I. Production of monosex female groups of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawitscha*) by the fertilization of normal ova with sperm from sex-reversed female. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 33, n. 1/4, p. 355-364, June 1983.

KAVAMOTO E. T.; TABATA, Y. A.; FOGLI DA SILVEIRA, W.; RIGOLINO, M. G.; SILVEIRA, A. N. Criopreservação de sêmen de fêmeas genóticas de truta arco-íris, *Salmo gairdnerii*, masculinizadas pela 17 α -metiltestosterona. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE ICTIOLOGIA, 1991, Maringá, Paraná. **Abstracts...** Maringá, Paraná, 1991. p. 189.

LAHNSTEINER, F.; BERGER, B.; HORVÁTH, A.; URBÁNYI, B.; WEISMANN, T. Criopreservation of spermatozoa in cyprinid fishes. **Theriogenology**, Woburn, v. 54, n. 9, p. 1477-1496, Dec. 2000.

LAHNSTEINER, F.; BERGER, B.; WEISMANN, T.; PATZNER, R. A. The influence of various cryoprotectants on semen quality of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) before and after cryopreservation. **Journal Applied Ichthyology**, Berlin, v. 12, n. 2, p. 99-106, July 1996a.

LAHNSTEINER, F.; BERGER, B.; WEISMANN, T.; PATZNER, R. A. Physiological and biochemical determination of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, semen quality for cryopreservation. **Journal of Applied Aquaculture** Binghamton, v. 6, p. 47-73, 1996c.

LAHNSTEINER, F.; MANSOUR, N.; WEISMANN, T. A new technique for insemination of large egg batches with cryopreserved semen in the rainbow trout. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 209, n. 1/4, p. 359-367, June 2002.

LAHNSTEINER, F.; PATZNER, R. A.; WEISMANN, T. Energy resources of spermatozoa of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Pisces, Teleostei). **Reproduction Nutrition Development**, Paris, v. 33, n. 4, p. 349-360, 1993.

LAHNSTEINER, F.; WEISMANN, T.; PATZNER, R. A. Methanol as cryoprotectant and the suitability of 1,2 and 5 ml straws for cryopreservation of semen from salmonid fishes. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 28, n. 6, p. 471-479, June 1997.

LAHNSTEINER, F.; WEISMANN, T.; PATZNER, R. A Semen cryopreservation of salmonid fishes. Influence of handling parameters on the postthaw fertilization rate. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 27, n. 9, p. 659-671, Sept. 1996b.

LAHNSTEINER, F.; WEISMANN, T.; PATZNER, R. A. A uniform method for cryopreservation of semen of salmonid fishes (*Oncorhynchus mykiss*, *Salmo trutta f. fario*, *Salmo trutta f. lacustris*, *Coregonus sp.*). **Aquaculture Research**, Oxford, v. 26, n. 6, p. 801-807, June 1995.

LEGENDRE, M.; BILLARD, R. Cryopreservation of rainbow trout sperm by deep-freezing. **Reproduction Nutrition Development**, Paris, v. 20, n. 6, p. 1859-1868, 1980.

LEUNG, L. K. P. Principles of biological criopreservation. In: JAMIESON, B. G. M. (Ed.). **Fish evolution and systematics: evidence from Spermatozoa**. Cambridge: Cambridge University Press, 1991. Cap. 19, p. 230-244.

LINHART, O.; BILLARD, R.; PROTEAU, J. P. Cryopreservation of European catfish (*Silurus glanis L.*) spermatozoa. **Aquaculture**, Amsrterdam, v. 115, n. 3/4, p. 347-359, Sept. 1993.

MARIA, A. N. **Diluidores e crioprotetores no resfriamento e congelamento sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)**. 2005. 73 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras. Lavras, MG.

MILIORINI, A. B. **Ativadores e concentrações de metanol e dimetilsulfóxido na qualidade do sêmen criopreservado de curimba (*Prochilodus lineatus*)** 2006. 99 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A.; TAINTURIER, D.; ANTON, M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by na easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, Woburn, v. 57, n. 6, p. 1695-1706, Apr. 2002.

MCANDREW, B. J.; RANA, K. L.; PENMAN, D. J. Conservation and preservation of genetic variation in aquatic organisms. In: MUIR, J. F.; ROBERTS, R. J. (Ed.). **Recent advances in aquaculture IV**. Oxford: Blackwell, 1995. p. 295-336.

MCNIVEN, M. A.; GALLANT, R. K.; RICHARDSON, G. F. Dimethylacetamide as a cryoprotectant for rainbow trout spermatozoa. **Theriogenology**, Woburn, v. 40, n. 5, p. 943-948, Nov. 1993.

OLIVEIRA, A. V. **Resfriamento e criopreservação do sêmen de dourado *Salminus maxillosus* e de pirapitinga *Brycon nattereri***. 2006. 94 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

ÓRFÃO, L. H.; VIVEIROS, A. T. M. Criopreservação do sêmen do osteíctio dourado, *Salminus maxillosus*. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFLA – CICESAL, 17., 2004, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2004

ÓRFÃO, L. H. **Resfriamento e criopreservação de sêmen de curimba *Prochilodus lineatus* (VALENCIENNES, 1836)**. 2006. 86 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PIIRONEN, J.; HYVÄRINEN, H. Cryopreservation of spermatozoa of the whitefish (*Coregonus muksun Pallas*). **Journal of Fish Biology**, London, v. 22, n. 2, p. 159-163, Feb. 1983.

PIIRONEN J. Variation in the properties of milt from the Finnish landlocked salmon (*Salmo salar sehago Girad*) during a spawning season. **Aquaculture**, v. 48, n. 3/4, p. 337-350, Sept. 1985.

PIIRONEN J. Cryopreservation of sperm from the brown trout (*Salmo trutta m. lacustris L.*) and Arctic charr (*Salvelinus alpinus L.*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 116, n. 2/3, p. 275-285, Oct. 1993.

ROBLES, V.; CABRITA E.; CUÑADO S.; HERRAEZ M. P. Sperm cryopreservation of sex-reversed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): parameters that affect its ability for freezing. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 224, n. 1/4, p. 203-212, June 2003.

SALTE, R.; GALLI, A.; FALASCHI, U.; FJALESTAD, K. T.; ALEANDRI, R. A protocol for the on-site of frozen milt from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) applied to the production of progeny groups: comparing males from different populations. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 231, n. 1/4, p. 337-345, Mar. 2004.

SILVEIRA, A. N.; FORESTI, F.; TABATA, Y. A.; RIGOLINO, M. G.;
SILVEIRA, R. V. Cryopreservation of rainbow trout semen: diluent, straw and
the vapor column. . **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 28, n. 2, p.
135-139, 2002.

SILVEIRA, A. N.; FORESTI, F.; TABATA, Y. A.; RIGOLINO, M. G.;
SILVEIRA, R. V. Cryopreservation of semen From Functional Sex-Reversed
Genotypic Females of the Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Brazilian
Arquivos of Biology and Technology**, Curitiba, v. 49, n. 1, p. 73-77, Jan./Mar.
2006.

SILVEIRA, A. N.; FORESTI, F.; TABATA, Y. A. Congelamento e fertilidade
do sêmen de fêmeas revertidas de truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*. In: In:
CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA, 23., 2000, Cuiabá – MS.
Programa e Resumos... Cuiabá, MT: Sociedade Brasileira de Zoologia e
Universidade Federal do Mato Grosso, 2000. p. 360

SCOTT, A. P.; BAYNES, S. M. A review of the biology, handling and storage
of salmonid spermatozoa. **Journal of Fish Biology**, London, v. 17, n. 6, p. 707-
739, July 1980.

STEIN, H.; BAYRLE, H. Cryopreservation of the sperm of some freshwater
teleosts. **Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique**, Paris, v. 18,
n. 4, p. 1073-1076, 1978.

STEIN, H. **Die künstliche Besamung bei Salmoniden Mitteleuropas.**
Habilitationsschrift. University of München-Weihenstephan, 1980.

STOSS, J.; REFTSIE T. Short term storage and cryopreservation of milt from
Atlantic salmon and sea trout. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 30, n. 1/4, p. 229-
236, Jan. 1983.

STOSS, J.; HOLTZ, W. Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*)
sperm. III. Effect of proteins in the diluent, in sperm from different males and
interval between sperm collection and freezing. **Aquaculture**, Amsterdam, v.
31, n. 2/4, p. 275-82, Mar. 1983.

STOSS, J.; HOLTZ, W. Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*)
sperm. I. Effect of thawing solution, sperm density and interval between thawing
and insemination. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 22, p. 97-104, 1981.

TABATA, Y. A.; RIGOLINO, M. G.; NAGATA, M. K. Produção de fêmeas masculinizadas de truta arco-íris com ductos espermáticos funcionais. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, 2000, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis, SC, 2000.

TABATA, Y. A.; PORTS, L. Truticultura em clima tropical. In: CYRINO, J. E. P. et al. (Ed.) **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática/TecArt, 2004. Cap. 11, p. 308-341.

TSUMURA, K.; BLANN, V. E.; LAMONT C. A. Progeny test of masculinized female rainbow trout having functional gonoducts. **The Progressive Fish-Culturist**, Bethesda, v. 53, n. 1, p. 45-47, Jan. 1991.

VIVEIROS, A. T. M. Semen cryopreservation in catfish species, with particular emphasis on the African catfish. **Animal Breeding Abstracts**, Fort Collins, v. 73, n. 1, p. 1N-9N, Jan. 2005.

CAPÍTULO 3

CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN INTRATESTICULAR DE MACHOS-XX DE TRUTA ARCO-ÍRIS (*Oncorhynchus mykiss*)

Criopreservação do Sêmen Intratesticular de machos-XX de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*)

RESUMO

O controle da sexualidade em truta arco-íris é de grande importância para a indústria da aquicultura, pois as fêmeas dessa espécie apresentam taxas de crescimento mais elevadas do as dos machos. Os machos atingem a maturidade sexual antes de alcançarem o peso comercial. Essa precocidade afeta a produção, pois está associada a alterações no metabolismo que resultam na diminuição do ganho de peso, perda da qualidade da carne e maior suscetibilidade a doenças. A inversão sexual pela via indireta é a técnica mais utilizada para a produção de lotes 100% femininos e consiste na obtenção de machos-XX, a partir da masculinização de fêmeas normais (XX) por meio da administração de andrógenos. O resultado do cruzamento entre machos-XX e fêmeas normais é o de indivíduos 100% fêmeas. A morfologia externa dos machos-XX é idêntica à dos machos normais, porém, na maioria das vezes, apresentam os dutos espermáticos incompletos, sendo necessário remover as gônadas para a obtenção do sêmen. As características espermáticas do sêmen intratesticular exigem a elaboração de um protocolo específico para criopreservação. Neste estudo, alguns fatores que interferem na criopreservação do sêmen intratesticular de machos-XX de truta arco-íris foram avaliados, na tentativa de aperfeiçoar as técnicas de criopreservação. No experimento 1, três diluidores (glicose 5,4%; NaCl 0,9% e NaCl 1,2%-tris) e duas temperaturas de descongelamento (70°C/3s e 35°C/16s) foram testados. A criosolução (diluidor + crioprotetor) foi preparada com 80% de cada um dos diluidores, 10% do crioprotetor dimetil sulfóxido (DMSO) e 10% de gema. O sêmen foi diluído 1:3 (sêmen:criosolução), envasado em palhetas de 0,5 ml e congelado em botijão de vapor de nitrogênio (CP 100, Taylor-Wharton) a -170°C, transferido, após 12-16 horas, para o nitrogênio líquido, a -196°C, onde permaneceu por 6 horas, antes de ser descongelado para avaliação da motilidade espermática. No experimento 2, foram testadas três taxas de diluições em plasma seminal (1:0, 1:6 e 1:8). Depois de diluído, o sêmen foi dividido em duas partes; uma delas foi re-diluída 1:3 em glicose-gema-DMSO e imediatamente congelada (controle) e a outra permaneceu por 1h:30min à temperatura de 4°C (incubação) antes de ser re-diluída 1:3 em glicose-gema-DMSO e congelada. No experimento 3, o sêmen foi diluído em plasma seminal em três diferentes proporções (1:5, 1:7 e 1:9) e incubado como no experimento 2. Após esse período, o sêmen foi re-diluído 1:3, em duas diferentes criosoluções (glicose-gema-DMSO e NaCl-gema-DMSO).

Nos experimentos 2 e 3, o sêmen foi envasado em palhetas de 0,5 ml, descongelado a 70°C/3s e as taxas de motilidade espermática avaliadas. Os diluidores glicose 5,4% e NaCl 0,9% foram significativamente superiores ao NaCl-tris, porém, a motilidade espermática foi baixa para todos os tratamentos e não houve diferença significativa ($P>0,05$) entre as temperaturas de descongelamento de 70°C/3s e 35°C/16s. A incubação pré-congelamento em plasma seminal proporcionou maior taxa de motilidade espermática pós-descongelamento e o sêmen diluído 1:6 obteve melhores resultados quando comparada a 1:8 e 1:0. O sêmen diluído 1:5 e 1:7 em plasma proporcionou maiores taxas de motilidade espermática com relação à diluição 1:9. O mesmo foi observado para o diluidor glicose 5,4%, que obteve melhores resultados quando comparado ao NaCl 0,9%. Com base nesses resultados, pode-se concluir que a incubação pré-congelamento do sêmen em plasma seminal foi fundamental para o aumento do potencial de motilidade do sêmen intratesticular e que o sêmen diluído 1:6 em plasma e re-diluído 1:3 em glicose-gema-DMSO, quando envasado em palhetas de 0,5 ml e descongelado a 70°C/3s, pode alcançar taxas de motilidade espermática de 60% pós-descongelamento.

1 INTRODUÇÃO

O controle da sexualidade em truta arco-íris é de grande importância para a indústria da aquicultura, pois as fêmeas dessa espécie apresentam taxas de crescimento mais elevadas do que a dos machos. As fêmeas de truta arco-íris alcançam a maturidade sexual mais tarde do que os machos e atingem seu peso comercial antes de entrarem em atividade reprodutiva. Assim, a produção de lotes 100% femininos é um dos objetivos a serem alcançados pelos piscicultores, pois traz benefícios econômicos importantes para a produção comercial (Panadian & Sheela, 1995).

A feminilização pode ser obtida por meio da inversão sexual pela via indireta, que consiste na masculinização de fêmeas genotípicas com andrógenos e posterior fertilização de óvulos normais com o sêmen dessas fêmeas masculinizadas (Piferrer & Donaldson, 1989). Dentre as vias de administração de hormônios, as mais recomendadas são as que veiculam o hormônio por meio da ração ou de banhos de imersão (Tabata & Portz, 2004). Esses procedimentos permitem o crescimento dos testículos e a produção de espermatozóides viáveis nesses indivíduos, que são geneticamente fêmeas e, conseqüentemente, todos os seus espermatozóides carregam o cromossomo X. Entretanto, esse tratamento conduz a uma população masculina na qual a maioria dos machos-XX apresenta os dutos espermáticos ausentes, incompletos ou afuncionais, o que requer o sacrifício dos animais e a retirada dos testículos para se obter o sêmen (Geffen & Evans, 2000; Tsumura et al., 1991).

Esses espermatozóides extraídos diretamente dos testículos não sofrem as modificações que ocorrem nos dutos espermáticos de machos normais, tais como a nutrição e a reabsorção dos espermatozóides (Billard & Takashima, 1983) e a regulação da composição iônica do fluido seminal (Morisawa & Morisawa, 1990), entre outros. Além disso, impedem a secreção de hormônios

que atuam indiretamente na motilidade espermática do sêmen (Van den Hurk et al., 1978). Portanto, o sêmen obtido diretamente do testículo não está completamente maduro, sua densidade é elevada e, provavelmente, diversas células ainda se apresentam imaturas. Este fato requer uma maturação externa prévia dos espermatozóides antes da ativação, tendo em vista que os espermatozóides coletados diretamente dos testículos apresentam motilidade mais baixa com relação ao sêmen dos machos normais (Robles et al., 2003).

A necessidade do sacrifício dos animais para a retirada dos testículos e obtenção do sêmen requer, do produtor, a manutenção de um número mais elevado de reprodutores nas pisciculturas, além da utilização constante de hormônios para a manutenção dos lotes invertidos. Essas práticas acabam, muitas vezes, onerando os custos de produção na propriedade. Dessa forma, o sêmen desses animais poderia ser criopreservado, dispensando-se, assim, a prática contínua do tratamento hormonal (Hunter et al., 1983; Kavamoto et al., 1991; Silveira et al., 2000) e permitindo a disponibilidade desse material ao longo do ano, reduzindo a necessidade de um estoque muito grande de reprodutores. Pode ainda servir como base para o desenvolvimento e a manutenção de bancos genéticos e transporte de gametas (McAndrew et al., 1995).

As características diferenciadas do sêmen intratesticular de machos-XX de truta arco-íris devem ser consideradas para a formulação de um protocolo específico de criopreservação do sêmen.

O objetivo deste estudo foi avaliar alguns fatores que interferem na criopreservação do sêmen intratesticular de machos-XX de truta arco-íris, na tentativa de definir um protocolo eficaz de criopreservação. Foram avaliados o efeito de diferentes diluidores de sêmen e temperaturas de descongelamento, diferentes taxas de diluições do sêmen em plasma seminal e o efeito da incubação pré-congelamento na motilidade dos espermatozóides.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado nos meses de julho e agosto de 2006, obedecendo ao período reprodutivo da truta arco-íris para as condições climáticas encontradas no Brasil. Os animais utilizados eram provenientes da Estação Experimental de Salmonicultura “Dr. Ascânio de Faria” - APTA-SAA-SP, localizada na cidade de Campos do Jordão, SP.

As médias de temperatura da água, nos meses de julho e agosto de 2006, foram de 11,7°C e 12,4°C, respectivamente. Para cada experimento foram selecionados de três a cinco machos-XX de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) com, aproximadamente, dois anos de idade e peso médio de 1,5 kg. A inversão sexual das fêmeas foi feita conforme rotina na Estação Experimental de Campos de Jordão, por meio da utilização do hormônio sintético 17 alpha-metil testosterona, na dose de 250 microgramas / kg de ração, ministrado durante 80 dias, a uma temperatura média de 12,8°C, totalizando 1024 UTA (unidades térmicas acumuladas), em graus centígrados dias (°C dias). Foi utilizado sêmen intratesticular de machos-XX que não apresentavam os dutos espermáticos, sendo necessário o sacrifício dos peixes e a retirada dos testículos. Os peixes foram insensibilizados em solução contendo o anestésico benzocaína, na proporção de 1:10.000 por, aproximadamente, 30-40 segundos, até cessarem os movimentos. As brânquias foram seccionadas para a sangria, que teve o objetivo de diminuir o fluxo de sangue na região dos testículos e evitar, ao máximo, a contaminação do sêmen com sangue. Os testículos foram removidos, pesados para a determinação do índice gonadossomático e cortados, no sentido longitudinal, para a extração do sêmen por gotejamento (Figura 1). Este método de obtenção do sêmen diminui a contaminação com sangue e a deposição de células espermáticas ainda imaturas (Robles et al., 2003). O sêmen foi coletado

em tubos de ensaio graduados, seu volume mensurado e mantido em um recipiente com gelo até ser manipulado.

Antes de iniciar cada experimento, a motilidade espermática foi subjetivamente estimada no microscópio de luz em aumento de 400X. A solução utilizada como ativadora da motilidade espermática foi o NaHCO_3 1% (Fogli da Silveira et al., 1994) pH 8,3, na proporção de 40 microlitros de ativador para cada 10 microlitros de sêmen. Foram avaliados também a concentração espermática utilizando-se a câmara de Neubauer, e o pH do sêmen de cada peixe. O sêmen, depois de diluído em criosolução (diluidor + crioprotetor), foi envasado em palhetas de 0,5 ml e criopreservado em botijão de vapor de nitrogênio (CP 100, Taylor-Wharton), a -170°C . Após 12-16 horas, as amostras foram transferidas para o nitrogênio líquido a -196°C , onde permaneceram por, no mínimo, 6 horas, até serem descongeladas para avaliação da motilidade espermática.



FIGURA 1. Extração do sêmen intratesticular por gotejamento (Fonte: Rafael V.A).

2.1 Experimento 1: diluidores de sêmen e temperaturas de descongelamento

No experimento 1, foram testados três diferentes diluidores de sêmen: glicose (glicose 5,4%), NaCl (NaCl 0,9%) e NaCl-tris (NaCl 1,2% + Tris 0,4% - solução imobilizadora de Saad; Linhart et al., 1993). A criosolução foi preparada com 80% de cada um dos diluidores testados, 10% do crioprotetor dimetil sulfoxido (DMSO) e 10% de gema. O sêmen foi diluído na proporção de 1:3 (sêmen: criosolução), envasado em palhetas de 0,5 ml (n=6 palhetas/diluidor/macho) e congelado. O descongelamento das palhetas foi feito em duas diferentes temperaturas (70°C/3s e 35°C/16s; n=3 palhetas/temperatura/diluidor/macho) e a taxa de motilidade espermática subjetivamente estimada. O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados (DBC), com três blocos (1 bloco=1 macho-XX), dispostos em uma estrutura fatorial 3x2 (diluidores x temperaturas de descongelamento).

2.2 Experimento 2: incubação pré-congelamento do sêmen em plasma seminal

Sêmen de cinco machos-XX de um mesmo lote foi coletado e homogeneamente misturado para compor um ‘pool’. O ‘pool’ de sêmen foi diluído em plasma seminal, em três diferentes proporções (1:0 = sem diluir; 1:6 e 1:8). Após a diluição em plasma, uma parte das amostras foi novamente diluída 1:3 (sêmen + plasma: criosolução), em uma criosolução à base de glicose-gema-DMSO, envasada em palhetas de 0,5 ml (n=5 palhetas/taxa de diluição) e imediatamente congeladas. A outra parte foi acondicionada em tubos de ensaio, recebeu uma suplementação de oxigênio e foi mantida, por 1h:30min, à temperatura de 4°C (incubação), na tentativa de promover a maturação dos espermatozóides. Após 1h:30min de incubação, o sêmen foi novamente diluído

1:3 (sêmen + plasma: criosolução) em uma criosolução a base de glicose-gema-DMSO, envasado em palhetas de 0,5 ml (n=5 palhetas/taxa de diluição) e congelado. As amostras foram descongeladas a 70°C/3s e a taxa de motilidade espermática subjetivamente estimada. O plasma seminal utilizado para diluir o sêmen intratesticular foi obtido a partir da centrifugação do sêmen de machos normais de truta arco-íris. O sêmen foi centrifugado a uma velocidade de 3.000 rpm durante uma hora, após esse período, o sobrenadante foi coletado e centrifugado novamente por mais uma hora. O plasma coletado foi acondicionado em tubos de ensaio e mantido a 4°C até ser utilizado. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC), disposto em uma estrutura fatorial 3x2 (taxa de diluição em plasma x situações: incubação e controle s/incubação).

2.3 Experimento 3: incubação pré-congelamento e diluidores de sêmen.

O sêmen intratesticular de cinco machos-XX de um mesmo lote foi coletado e misturado homogeneamente para compor um ‘pool’. O ‘pool’ de sêmen foi diluído em plasma seminal em três diferentes proporções (1:5; 1:7 e 1:9). Após a diluição, o sêmen foi acondicionado em tubos de ensaio, recebeu uma suplementação de oxigênio e foi mantido, por 1h:30min, à temperatura de 4°C. Após 1h:30min de incubação, o sêmen foi re-diluído na proporção de 1:3 (sêmen + plasma: criosolução), em duas diferentes criosoluções (glicose-gema-DMSO e NaCl-gema-DMSO), envasado em palhetas de 0,5 ml (n=5 palhetas/taxa de diluição em plasma/diluidor) e congelado. O descongelamento foi feito a 70°C/3s e a taxa de motilidade espermática subjetivamente estimada. O delineamento experimental utilizado foi um DIC, disposto em uma estrutura fatorial 3x2 (taxa de diluição em plasma x diluidor).

2.6 Análise estatística

Os dados de motilidade espermática foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade, utilizando-se o pacote computacional Sistema de Análise de Variância (Sisvar) (Ferreira, 1999).

3 RESULTADOS

As características do sêmen intratesticular dos 13 machos-XX utilizados nesse estudo estão apresentados na Tabela 1.

TABELA 1: Dados referentes ao número de animais, peso vivo, volume, motilidade, concentração espermática, pH e índice gonadossomático (GSI), nas diferentes etapas experimentais.

| Peixe | ¹ Expto | Peso vivo (kg) | Volume (ml) | Motilidade inicial (%) | ² Sptz x 10 ⁶ /mm ³ | pH | ³ GSI |
|------------|--------------------|----------------|-------------|------------------------|--|----------|------------------|
| 1 | 1 | 2,7 | 3,0 | 80 | 33 | 6,8 | 3,8 |
| 2 | 1 | 2,6 | 3,0 | 70 | 30 | 7,2 | 3,75 |
| 3 | 1 | 2,9 | 4,0 | 80 | 35 | 7,0 | 3,8 |
| 4 | 2 | 1,1 | 2,5 | 70 | 35 | 7,2 | 6,36 |
| 5 | 2 | 1,0 | 3,0 | 80 | 30 | 7,2 | 5,5 |
| 6 | 2 | 1,2 | 4,0 | 70 | 32 | 7,0 | 5,5 |
| 7 | 2 | 1,0 | 3,5 | 70 | 38 | 6,9 | 5,8 |
| 8 | 2 | 1,3 | 3,0 | 70 | 31 | 6,8 | 4,65 |
| 9 | 3 | 1,0 | 5,0 | 80 | 36 | 7,2 | 6,8 |
| 10 | 3 | 1,4 | 3,0 | 70 | 32 | 6,9 | 5,32 |
| 11 | 3 | 1,0 | 4,0 | 70 | 38 | 6,9 | 5,0 |
| 12 | 3 | 1,2 | 4,0 | 80 | 30 | 7,1 | 4,6 |
| 13 | 3 | 1,1 | 3,0 | 80 | 35 | 7,0 | 3,8 |
| Média ± DP | | 1,5± 0,7 | 3,5± 0,7 | 74,6± 5,2 | 33,5± 2,9 | 7,0±0,15 | 5,0±1,0 |

¹Sptz = espermatozoides;

²Expto = experimento

³GSI = Índice gonadossomático (GSI = peso da gônada (g) x 100/peso vivo (g)).

3.1 Experimento 1: diluidores de sêmen e temperaturas de descongelamento

A interação diluidor x temperatura de descongelamento não foi significativa ($P>0,05$), indicando que não houve variações nas taxas de motilidade espermática para as diferentes combinações entre diluidores e temperaturas de descongelamento. Em média, o sêmen criopreservado em meio contendo glicose 5,4% e NaCl 0,9% obteve maiores taxas de motilidade espermática, quando comparado ao sêmen criopreservado em meio contendo NaCl-tris. Para as temperaturas de descongelamento de 70°C/3s e 35°C/16s, não houve diferença significativa. Os resultados estão expressos na Tabela 2.

TABELA 2: Motilidade (%; média \pm desvio padrão; n=3 machos-XX) espermática do sêmen intratesticular de machos-XX de truta arco-íris, criopreservado em diferentes diluidores, acrescidos de 10% de gema e 10% DMSO e descongelado em diferentes temperaturas.

| Diluidores | Descongelamento | | Motilidade (%) |
|------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | 70°C/3s | 35°C/16s | Média \pm DP |
| NaCl 0,9% | 6,7 \pm 2,9 | 6,7 \pm 0,0 | 6,7 \pm 0,0 a |
| ¹ NaCl-tris | 4,5 \pm 2,5 | 5,0 \pm 0,0 | 4,7 \pm 0,7 b |
| Glicose 5,4% | 7,8 \pm 2,5 | 6,7 \pm 1,7 | 7,2 \pm 0,8 a |
| Média \pm DP | 6,3 \pm 1,7 A | 6,1 \pm 1,0 A | |

Médias seguidas de letras iguais maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem entre si, pelo teste de Scott Knott ($P>0,05$).

¹NaCl-tris = NaCl 1,2% + Tris 0,4% - Solução imobilizadora de Saad.

3.2 Experimento 2: incubação pré-congelamento do sêmen em plasma seminal

Os efeitos da diluição em plasma seminal e da incubação pré-congelamento (1h:30min/4°C) foram significativos ($P<0,05$). Os tratamentos

que passaram pelo período de incubação pré-congelamento proporcionaram maiores taxas de motilidade espermática e, em média, o sêmen diluído 1:6 (sêmen: plasma) obteve maiores taxas de motilidade espermática, quando comparado às proporções 1:8 e 1:0. Quando o sêmen foi submetido à incubação pré-congelamento e diluído 1:6 em plasma, observou-se maior taxa de motilidade espermática pós-descongelamento com relação ao sêmen diluído 1:8 e 1:0. Para o sêmen controle, que não passou pelo período de incubação, não houve diferença quando o sêmen foi diluído 1:6 ou 1:8. Entretanto, essas duas diluições proporcionaram maiores taxas de motilidade espermática com relação ao sêmen não diluído (1:0). Quando foi avaliado o período de incubação dentro de cada nível de diluição em plasma seminal, o sêmen diluído 1:6 ou 1:8 proporcionou maiores taxas de motilidade espermática quando passou pelo período de incubação pré-congelamento. Para a diluição 1:0, não houve diferença, entre o sêmen que foi incubado ou não, quanto à motilidade espermática (Tabela 3).

TABELA 3: Motilidade (%; média \pm desvio padrão; n=5 machos-XX) espermática do sêmen intratesticular de machos-XX de truta arco-íris, diluído em diferentes proporções sêmen:plasma seminal, incubado ou não por 1h:30min a 4°C e criopreservado em glicose-gema-DMSO..

| Taxa de diluição (Sêmen:plasma) | Motilidade (%) | |
|------------------------------------|-----------------------|------------------------------|
| | ¹ Controle | Incubação (1h:30min /4°C) |
| ² 1:0 | 6,0 \pm 2,2 Ab | 0,0 \pm 0,0 Ac |
| 1:6 | 18 \pm 8,3 Ba | 60 \pm 7,0 Aa |
| 1:8 | 15 \pm 5,0 Ba | 50 \pm 7,0 Ab |

Médias seguidas de letras iguais maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem entre si, pelo teste de Scott Knott (P>0,05).

¹Controle: sêmen que não passou pelo período de incubação de 1h:30min, a 4°C

²1:0 : sêmen não diluído (*in natura*).

3.3 Experimento 3: incubação pré-congelamento e diluidores de sêmen

Detectou-se que o efeito dos diluidores foi significativo ($P < 0,05$), entretanto, o mesmo não foi observado quando foram avaliadas as diferentes taxas de diluição em plasma. Quando o sêmen foi diluído 1:5 em plasma seminal, a solução de glicose, que foi utilizada para re-diluir o sêmen e prepará-lo para o congelamento, proporcionou maiores taxas de motilidade espermática pós-descongelamento, comparada à solução de NaCl. O mesmo foi observado para o sêmen diluído 1:7 em plasma seminal. Quando o sêmen foi diluído 1:9, não houve diferença entre a solução de glicose e NaCl, com relação à motilidade espermática. Quando foram avaliadas as diferentes diluições em plasma, dentro de cada solução diluidora de sêmen, não detectou-se diferença para o sêmen diluído 1:5, 1:7 e 1:9, quando a solução de NaCl foi utilizada para re-diluir o sêmen. Entretanto, quando a solução de glicose foi utilizada, as diluições 1:5 e 1:7, em plasma, proporcionaram maiores taxas de motilidade espermática quando comparadas ao sêmen diluído 1:9 (Tabela 4).

TABELA 4: Motilidade (%; média \pm desvio padrão; n=5 machos-XX) espermática do sêmen de machos-XX de truta arco-íris, diluído em diferentes proporções sêmen: plasma, incubado por 1h:30min, a 4°C e criopreservado em diferentes diluidores.

| Taxa de diluição (Sêmen:plasma) | ¹ Solução diluidora | |
|------------------------------------|--------------------------------|-----------------|
| | Glicose 5,4% | NaCl 0,9% |
| 1:5 | 50 \pm 0,0 Aa | 36 \pm 5,5 Ba |
| 1:7 | 54 \pm 5,5 Aa | 40 \pm 0,0 Ba |
| 1:9 | 44 \pm 5,5 Ab | 44 \pm 5,5 Aa |

Médias seguidas de letras iguais maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem entre si, pelo teste de Scott Knott ($P > 0,05$).

¹Solução diluidora: Soluções à base de glicose ou NaCl utilizadas para re-diluir o sêmen após ser pré-diluído em plasma seminal e incubado por 1h:30min, a 4°C.

4 DISCUSSÃO

Os dutos testiculares possuem um papel importante no armazenamento e nutrição dos espermatozoides, síntese de esteróides, composição iônica do fluido seminal, atividade auto e heterofagocítica e na formação do plasma seminal (Lahnsteiner et al., 1993). Conseqüentemente, o sêmen obtido diretamente do testículo não está completamente maduro, sua densidade é elevada e, provavelmente, diversas células ainda se apresentam imaturas. Diferenças com relação às características seminais (motilidade espermática, concentração espermática e de ATP) foram observadas quando o sêmen de machos-XX, que possuíam os dutos espermáticos funcionais, foi comparado ao sêmen intratesticular dos machos-XX sem dutos (Geffen & Evans 2000). Em outro estudo, quando o sêmen de machos-XX que apresentavam os dutos foi comparado ao sêmen de machos normais XY, não foi encontrada diferença com relação às características seminais (viscosidade, coloração, motilidade e concentração espermática), apresentando comportamento semelhante de motilidade e fertilização após a criopreservação (Silveira et al., 2006).

No experimento 1 do presente estudo, foram testados diferentes diluidores de sêmen à base de glicose, NaCl e NaCl-tris, e duas temperaturas de descongelamento (70°C/3s e 35°C/16s) no processo de criopreservação do sêmen intratesticular. Os resultados de motilidade espermática pós-descongelamento não foram satisfatórios, apresentando taxas abaixo de 7%, dificultando a avaliação do efeito dos diferentes diluidores e temperaturas de descongelamento testadas. A utilização do sêmen *in natura*, extraído diretamente dos testículos e sem passar por nenhuma diluição prévia ou período de incubação pré-congelamento, pode explicar as baixas taxas de motilidade espermática encontradas, tendo em vista a elevada densidade do sêmen intratesticular e a presença de células imaturas.

O efeito da incubação do sêmen em plasma seminal foi avaliado e teve como objetivo detectar a capacidade do plasma seminal como promotor da maturação dos espermatozoides, quando submetido a um período de incubação por 1h:30min, a 4°C (experimento 2). Foram avaliadas também diferentes taxas de diluição do sêmen em plasma, na tentativa de preparar os espermatozoides para o processo criogênico. A densidade do sêmen intratesticular é bastante elevada e foi uma das hipóteses levantadas para o insucesso da criopreservação quando o sêmen não foi submetido a pré-diluições. Essa alta densidade poderia estar dificultando o contato uniforme da criosolução com os espermatozoides e impedindo a entrada dos crioprotetores de forma eficaz em todas as células. Em operações comerciais, devido à alta viscosidade do sêmen intratesticular, geralmente, são feitas pré-diluições em soluções que apresentam osmolaridade semelhante à do sêmen, evitando-se, assim, a sua ativação (Geffen & Evans, 2000).

Quando o tratamento controle foi avaliado, ou seja, o sêmen que não passou pelo período de incubação, detectou-se efeito significativo com relação à diluição em plasma seminal. Maiores taxas de motilidade espermática foram obtidas quando o sêmen foi diluído em plasma seminal (1:6 ou 1:8), com relação ao sêmen não diluído (1:0), porém, os valores de motilidade espermática encontrados (1:6 = 18% e 1:8 = 15%) não foram satisfatórios. Entretanto, as mesmas amostras de sêmen diluídas 1:6 e 1:8, quando foram incubadas por 1h:30min, a 4°C, proporcionaram taxas de motilidade espermática pós-descongelamento de 50% e 60%, respectivamente. Esses resultados mostram que a diluição do sêmen intratesticular contribuiu para o aumento da motilidade espermática, quando comparado ao sêmen não diluído, porém, para que se alcancem resultados satisfatórios de motilidade espermática pós-descongelamento, é necessária a incubação do sêmen em meio específico, na tentativa de promover a maturação das células espermáticas.

Imediatamente após terem completado a espermiogênese, os espermatozoides ainda não estão completamente maduros e não apresentam um potencial para motilidade (Lahnsteiner et al., 1999; Miura et al., 1992; Morisawa & Morisawa, 1986). A maturação final é feita no lúmen lobular e nos dutos espermáticos, onde existem hormônios que são responsáveis por esse processo. Mais especificamente em salmonídeos, acredita-se que o hormônio 17 alpha, 20 beta-dihydroxy-4-pregnen-3-one (17, 20-DP) seja responsável pela maturação final dos espermatozoides e esteja envolvido, direta ou indiretamente, na elevação do pH do plasma seminal, causando, dessa maneira, um aumento no índice de AMPc dentro dos espermatozoides, permitindo que sejam móveis uma vez que entrem em contato com uma solução hipoosmótica (Miura et al., 1992; Nagahama, 1994). Este fato talvez explique as baixas taxas de motilidade espermática encontradas no sêmen intratesticular, que necessitam de uma maturação exógena prévia antes da ativação (Robles et al., 2003). Além disso, nos dutos espermáticos, grandes quantidades de triglicerídeos estão presentes no plasma seminal (Piironen & Hyvarinen, 1983) e sabe-se que estes compostos são usados pelos espermatozoides de machos normais para obter energia (Lahnsteiner et al., 1993).

Os espermatozoides de truta apresentam uma única mitocôndria na base de sua cabeça, que possui baixa habilidade para realizar a fosforilação oxidativa (Le Lay et al., 1999). Esse fato explica o curto período de movimento dessas células. Conseqüentemente, as deficiências em compostos responsáveis pelo fornecimento de energia, como é o caso dos triglicerídeos e os baixos índices de AMPc dentro das células, atuam negativamente no metabolismo energético dos espermatozoides, diminuindo a motilidade e a viabilidade espermática do sêmen intratesticular de machos-XX.

Quando o sêmen intratesticular de machos-XX foi incubado em plasma seminal artificial (NaCl 7,60 g, KCl 2,98 g, CaCl₂ · 2H₂O 0,37 g, MgCl₂ ·

6H₂O 0,31 g, NaHCO₃ 0,21 g, e 1000-ml de água destilada), na proporção de 1:10 (v/v), em pH 9,9, por 2 horas, a 4°C, a porcentagem de espermatozóides móveis aumentou de 0,5% para 80% e a taxa de ovos olhados passou de 5,5% para 53,8% (Kobayashi et al., 2004). Em outro estudo, o sêmen intratesticular de machos-XX foi diluído 1:9 (v/v) em uma solução comercial de maturação (MATURFISH[®], IMV, França), incubado por 2 horas, a 4°C, com suplementação de oxigênio, re-diluído 1:3 (v/v) em um criodiluidor à base de DMSO-gema-proteína de soja e criopreservado. As taxas de motilidade espermática variaram entre 10% a 30% e as taxas de fertilização entre 30% e 60% (Robles et al., 2003). No experimento 3, podemos avaliar o efeito de dois diluidores de sêmen que foram utilizados para re-diluir o sêmen incubado e o diluidor que proporcionou maiores taxas de motilidade espermática pós-descongelamento foi a solução à base de glicose, quando comparada ao NaCl. Nossos melhores resultados de motilidade espermática pós-descongelamento foram obtidos quando o sêmen foi pré-diluído 1:6 (v/v) em plasma seminal, incubado por 1h:30min, a 4°C e re-diluído (1:3 v/v) em glicose-gema-DMSO, antes de ser congelado.

5 CONCLUSÃO

Neste estudo, concluiu-se que a incubação pré-congelamento dos espermatozóides em plasma seminal foi fundamental para o aumento do potencial de motilidade do sêmen intratesticular de machos-XX e que o sêmen diluído 1:6 em plasma seminal, incubado por 1h:30min, a 4°C e re-diluído 1:3 em glicose-gema-DMSO, foi o protocolo de criopreservação que proporcionou os maiores taxas de motilidade espermática pós-descongelamento.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BILLARD, R.; TAKASHIMA, F. Reabsorption of spermatozoa in the sperm duct of rainbow trout during the post - spawning period. **Bulletin Japanese Society Scientific Fisheries**, Tokyo, v. 43, p. 387– 392, 1983.

BÜYÜKHATİPOĞLU, S.; HOLTZ, W. Preservation of trout sperm in liquid and frozen state. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 14, n. 1, p. 49-56, May 1978.

FERREIRA, D. F. **Sistema de análise de variância –SISVAR**. Ver. 4. 3. Lavras: UFLA. Departamento de Ciências Exatas, 1999.

FOGLI DA SILVEIRA, W.; KAVAMOTO, E. T.; RIGOLINO, M. G.; TABATA, YA.; ARRUDA SOARES, H. ; SILVEIRA, A. N.; VERÍSSIMO, R. Congelamento do sêmen de truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, em vapor de nitrogênio líquido. **Boletim Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 21, p. 55-60, 1994. Único.

GEFFEN, A. J.; EVANS, J. P. Sperm traits and fertilization success of male and sex-reversed female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 182, n. 1/2, p. 61-72, Feb. 2000.

HUNTER, G. A.; DONALDSON, E. M.; STOSS, J.; BAKER, I. Production of monosex female groups of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawitscha*) by the fertilization of normal ova with sperm from sex-reversed female. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 33, n. 1/4, p. 355-364, June 1983.

KAVAMOTO E. T.; TABATA, Y. A.; FOGLI DA SILVEIRA, W.; RIGOLINO, M. G.; SILVEIRA, A. N. Criopreservação de sêmen de fêmeas genotípicas de truta arco-íris, *Salmo gairdnerii*, masculinizadas pela 17^ª α -metilttestosterona. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE ICTIOLOGIA, 1991, Maringá, Paraná. **Abstracts...** Maringá, Paraná, 1991. p. 189.

KOBAYASHI, T.; FUSHIKI, S.; UENO, K. Improvement of sperm motility of sex-reversed male rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by incubation in high-pH artificial seminal plasma. **Environmental Biology of Fishes**, Dordrecht, v. 69, n. 1/4, p. 419–425, Mar. 2004.

LAHNSTEINER, F.; BERGER, B.; WEISMANN, T. Sperm metabolism of the teleost fishes *Chalcalburnus chalcoides* and *Oncorhynchus mykiss* and its

relation to motility and viability. **Journal of Experimental Zoology**, New York, v. 284, n. 4, p. 454–465, Sept. 1999.

LAHNSTEINER, F.; PATZNER, R. A.; WEISMANN, T. Energy resources of spermatozoa of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Pisces, Teleostei). **Reproduction Nutrition Development**, Paris, v. 33, n. 4, p. 349-360, 1993.

LE LAY, S.; OGIER DE BAULNY, B.; MAISSE, G.; LABBE', C. Cellular ATP content before freeze-thawing and rainbow trout sperm fitness to cryopreservation. In: ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY FOR CRYOBIOLOGY, 36., 1999, Marseille. **Abstracts book...** Marseille, 1999. 210 p.

LINHART, O.; BILLARD, R.; PROTEAU, J. P. Cryopreservation of European catfish (*Silurus glanis L.*) spermatozoa. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 115, n. 3/4, p. 347-359, Sept. 1993.

MCANDREW, B. J.; RANA, K. L.; PENMAN, D. J. Conservation and preservation of genetic variation in aquatic organisms. In: MUIR, J. F.; ROBERTS, R. J. (Ed.). **Recent advances in aquaculture IV**. Oxford: Blackwell, 1995. p. 295-336.

MIURA, T.; YAMAUCHI, K.; TAKAHASHI, H.; NAGAHAMA, Y. The role of hormones in the acquisition of sperm motility in salmonid fish. **Journal of Experimental Zoology**, New York, v. 261, n. 3, p. 359–363, 1992.

MORISAWA, M.; MORISAWA, S. Acquisition and initiation of sperm motility. In: GAGNON, C. (Ed.). **Controls of Sperm Motility: biological and clinical aspects**. Boca Raton, FL: CRC Press, 1990. p. 137-151.

MORISAWA, S.; MORISAWA M. Acquisition of potential for sperm motility in rainbow trout and chum salmon. **Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 126, n. 1, p. 89–96, 1986.

NAGAHAMA, Y. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. **International Journal of Developmental Biology**, Japan, v. 38, n. 2, p. 217–229, June 1994.

PANADIAN, T. J.; SHEELA, S. G. Hormonal induction of sex reversal in fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 138, n. 1/4, p. 1-22, Dec. 1995.

PIFFERER, F.; DONALDSON, E. M. Gonadal differentiation in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, after a single treatment with androgen or estrogen at

different stages during ontogenesis. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 77, n. 2/3, p. 251-262, Mar. 1989.

PIIRONEN, J.; HYVARINEN, H., Composition of the milt of some teleost fishes. **Journal of Fish Biology**, London, v. 22, n. 3, p. 351– 361, 1983.

ROBLES, V.; CABRITA, E.; CUÑADO, S.; HERRAEZ, M. P. Sperm cryopreservation of sex-reversed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): parameters that affect its ability for freezing. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 224, n. 1/4, p. 203-212, June 2003.

SILVEIRA, A. N.; FORESTI, F.; TABATA, Y. A. Congelamento e fertilidade do sêmen de fêmeas revertidas de truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA, 23., 2000, Cuiabá – MS. **Programa e Resumos...** Cuiabá, MT: Sociedade Brasileira de Zoologia e Universidade Federal do Mato Grosso, 2000. p. 360

SILVEIRA, A. N.; FORESTI, F.; TABATA, Y. A.; RIGOLINO, M. G; SILVEIRA, R. V. Cryopreservation of semen From Functional Sex-Reversed Genotypic Females of the Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 49, n. 1, p. 73-77, Jan. 2006.

TABATA, Y. A.; PORTS, L. Truticultura em clima tropical. In: CYRINO, J. E. P. et al. (Ed.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Aqüicultura e Biologia Aquática/TecArt, 2004. Cap. 11, p. 308-341.

TSUMURA, K.; BLANN, V. E.; LAMONT C. A. Progeny test of masculinized female rainbow trout having functional gonoducts. **The Progressive Fish-Culturist**, Bethesda, v. 53, n. 1, p. 45-47, Jan. 1991.

VAN DEN HURK, R.; SLOF, G. A. A morfological and experimental study of sex differentiation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. **Cell and Tissue Research**, Berlin, v. 218, n. 3, p. 487-497, July 1978.

CAPÍTULO 4

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO GERAL

1. Criopreservação do sêmen de machos-XX de truta arco-íris

A truta arco-íris é uma das espécies de salmonídeos mais cultivadas e pesquisadas em todo do o mundo, devido às suas excelentes características, tanto para a aqüicultura quanto para a pesca esportiva, além de se adaptar muito bem a diversos sistemas aquáticos e apresentar alto grau de domesticação.

Por ser uma espécie de clima temperado, alguns aspectos devem ser observados para a sua implantação em países onde o clima tropical é predominante. Nas regiões montanhosas do Brasil, onde o relevo não favorece a agricultura convencional e os rios apresentam condições hidrobiológicas impróprias para o desenvolvimento da aqüicultura com espécies tropicais, o cultivo da truta arco-íris tem se tornado uma alternativa bastante viável, tanto para os pequenos como para os grandes produtores (Tabata & Portz, 2004).

Ao contrário de outras espécies, em que pouco se conhece sobre manejo e tecnologia de produção, na truta arco-íris alguns padrões de cultivo já estão bem estabelecidos e foram adaptados para as condições encontradas no Brasil, o que favorece a disponibilidade de tecnologia para os produtores. Dentre essas tecnologias disponíveis, podemos citar a criopreservação do sêmen, que foi o alvo de nosso estudo e que será discutida nesse breve capítulo.

O objetivo deste trabalho foi aperfeiçoar as técnicas de criopreservação do sêmen de machos-XX de truta arco-íris, tanto para os peixes portadores de dutos espermáticos funcionais, ou seja, naqueles em que a coleta do sêmen pode ser feita por pressão abdominal, quanto para aqueles que não apresentavam os dutos espermáticos e o sêmen tem que ser coletado diretamente do testículo. No presente estudo, foram utilizados 25 machos-XX, que apresentavam os dutos espermáticos funcionais e 13 machos que não possuíam os dutos. As características seminais desses dois grupos estão expressas na Tabela 1.

TABELA 1: Dados referentes ao número médio de animais, peso vivo, volume, motilidade, concentração espermática, pH e índice gonadossomático (GSI).

| Machos XX | PV (kg) | Volume (ml) | Motilidade inicial (%) | ¹ Spz x 10 ⁶ /mm ³ | PH | ² GSI |
|-----------------------|-----------|----------------|---------------------------|--|------------|------------------|
| Com ductos n=25 | 1,3 ± 0,5 | 5,0 ± 2,0 | 90 ± 8,0 | 13 ± 4,0 | 7,2 ± 0,2 | |
| Sem ductos n=13 | 1,5 ± 0,7 | 3,5 ± 0,7 | 74,6 ± 5,2 | 33,5 ± 2,9 | 7,0 ± 0,15 | 5,0 ± 1,0 |
| Média total | 1,4 ± 0,6 | 4,3 ± 1,3 | 82,3 ± 6,6 | 23,2 ± 3,4 | 7,1 ± 0,17 | 5,0 ± 1,0 |

¹ Spz = espermatozoides;

² GSI = Índice gonadossomático (GSI = peso da gônada (g) x 100/peso vivo (g)).

Vários diluidores foram testados no processo de criopreservação do sêmen (capítulos 2 e 3), porém, os que obtiveram melhores resultados, tanto para o sêmen coletado por pressão abdominal (peixes com dutos espermáticos), como para o sêmen intratesticular (peixes sem dutos espermáticos), foram a glicose 5,4% e o NaCl 0,9%, acrescidos de 10% de gema de ovo.

O acréscimo de gema de ovo foi crucial para a manutenção da motilidade espermática após o descongelamento, pois ela está relacionada com a resistência da membrana plasmática aos danos causados pela baixa temperatura (Leung, 1991). Em Salmonídeos, esse agente estabilizador de membrana é essencial para manter a viabilidade dos espermatozoides após o processo de congelamento e descongelamento (Baynes & Scott, 1987; Lahnsteiner et al., 1996a).

A taxa de diluição de 1:3 (sêmen: criosolução) foi a que proporcionou maior motilidade espermática pós-descongelamento para o sêmen obtido por massagem abdominal dos peixes com dutos. Quando esta mesma diluição foi utilizada para o sêmen intratesticular, as taxas de motilidade espermática caíram

consideravelmente, possivelmente porque a concentração do sêmen intratesticular é bem maior quando comparada ao sêmen coletado por pressão abdominal (Lahnsteiner et al., 1993). As taxas de diluição utilizadas para a criopreservação de sêmen de peixes têm variado de 1:1 a 1:10 (v/v). Para salmonídeos, a diluição recomendada para a criopreservação do sêmen varia de 1:1 a 1:3 (Babiak et al., 1995; Legendre & Billard 1980). A concentração espermática também apresenta grande diferença entre as diferentes espécies de peixes (Stein, 1980) e a relação ótima para a diluição do sêmen é espécie-específica (Lahnsteiner et al., 1996b).

Com relação aos crioprotetores, o DMSO proporcionou melhores resultados de motilidade após o descongelamento e foi adotado como crioprotetor padrão, devido aos bons resultados encontrados. O DMSO tem sido usado como crioprotetor de eleição por vários autores (Cabrita et al., 2001a e 2001b; Fogli da Silveira et al., 1994; Robles et al., 2003; Silveira et al., 2002 e 2006), na criopreservação do sêmen de truta arco-íris, proporcionando bons resultados de motilidade espermática e fertilização após o descongelamento.

Diferentes volumes de palhetas e temperaturas de descongelamento do sêmen também foram testadas. De maneira geral, a palheta de 0,5 ml proporcionou maiores taxas de motilidade espermática pós-descongelamento, porém, sua capacidade de fertilização se restringe a um número muito pequeno de ovos, o que torna cada vez mais freqüentes estudos com palhetas de maior volume, objetivando a fertilização em grande escala. Palhetas de 0,5 ml já foram utilizadas por vários autores (Cabrita et al., 2001b; Lahnsteiner et al., 1995; Silveira et al., 2002 e 2006, entre outros) na criopreservação do sêmen de truta arco-íris. A temperatura de descongelamento que obteve melhor resposta de motilidade espermática pós-descongelamento, para as palhetas de 0,5 ml, foi a de 70°C, por 3 segundos. Fogli da Silveira et al. (1994) usaram, pela primeira vez, a temperatura de descongelamento de 70°C, por 3 segundos, que foi

posteriormente adotada por Silveira et al. (2002, 2006), obtendo excelentes resultados de fertilização para o sêmen criopreservado. A velocidade de congelamento das células (rápida ou lenta) e o volume das palhetas que serão utilizadas devem ser levados em conta para selecionar a temperatura ideal de descongelamento e o tempo de exposição das palhetas a essa temperatura.

Os melhores resultados de motilidade espermática e fertilização, obtidos a partir da análise dos diversos fatores estudados (diluidores, crioprotetores, taxas de diluição, volume de palheta, taxa de descongelamento, etc.), estão expressos na Tabela 2,

TABELA 2: Melhores resultados de motilidade espermática e taxa de ovos olhados para machos-XX de truta arco-íris com e sem ductos espermáticos.

| Machos XX | Crio-solução | Diluição (v/v) | ¹ Vol (ml) | Descongelamento (°C) | Incubação (h/°C) | ² Motil (%) | Ovos olhados (%) |
|------------|-----------------------|----------------|-----------------------|----------------------|------------------|------------------------|------------------|
| Com ductos | Glicose + Gema + DMSO | 1:3 | 0,5 | 70°C/3s | ----- | 65 | 45 |
| Sem ductos | Glicose + Gema + DMSO | 1:3 | 0,5 | 70°C/3s | 1h:30min/ 4°C | 60 | |

¹ Vol: volume das palhetas

² Molil: motilidade espermática pós-descongelamento

Os dutos testiculares possuem um papel importante no armazenamento e na nutrição dos espermatozoides, na síntese de esteróides, na composição iônica do fluido seminal, na atividade auto e heterofagocítica e na formação do plasma seminal (Lahnsteiner et al., 1993). Conseqüentemente, o sêmen obtido

diretamente do testículo não está completamente maduro, sua densidade é elevada e, provavelmente, diversas células ainda se apresentam imaturas. Na tentativa de reverter essa situação, o efeito da incubação do sêmen intratesticular em plasma seminal e diferentes diluições do sêmen em plasma foram avaliados, na tentativa de aumentar a taxa de motilidade espermática pós-descongelamento.

Maiores taxas de motilidade espermática foram obtidas quando o sêmen foi diluído em plasma seminal (1:6 ou 1:8), com relação ao sêmen não diluído (1:0), porém, os valores de motilidade espermática encontrados (1:6 = 18% e 1:8 = 15%) não foram satisfatórios. Entretanto, as mesmas amostras de sêmen diluídas 1:6 e 1:8, quando foram incubadas por 1h:30min, a 4°C, proporcionaram taxas de motilidade espermática pós-descongelamento de 60% e 50%, respectivamente. Estes resultados mostram que a diluição do sêmen intratesticular contribuiu para o aumento da motilidade espermática quando comparado ao sêmen não diluído, porém, para que se alcancem resultados satisfatórios de motilidade espermática pós-descongelamento, é necessária a incubação do sêmen em meio específico, na tentativa de promover a maturação das células espermáticas.

O teste de fertilização para o sêmen criopreservado foi feito apenas com o sêmen coletado por massagem abdominal dos peixes que apresentavam os dutos espermáticos. Foram testadas diferentes proporções de espermatozóide por ovo para o sêmen criopreservado. Proporções acima de 30×10^6 espermatozóides por ovo foram suficientes para alcançar taxas de ovos olhados de 42%, em média. O protocolo de criopreservação do sêmen utilizado para avaliar a taxa de fertilização foi o que obteve maiores taxas de motilidade espermática nos experimentos anteriores (glicose-gema-DMSO, diluído 1:3, envasado em palhetas de 0,5 ml e descongelado a 70°C por 3s). Sabe-se que o processo de criopreservação causa diversos danos às células espermáticas, resultando em uma diminuição significativa da motilidade espermática e do número de

espermatozoides viáveis, o que afeta diretamente o número de espermatozóide que, realmente, estarão aptos a fertilizar os ovos após o descongelamento do sêmen. As proporções de espermatozóide por ovo que são relatadas na literatura, geralmente, não levam em conta o número de espermatozoides vivos após o processo de criopreservação, o que, talvez, explique a grande diferença entre os protocolos utilizados. O teste de fertilização não foi realizado para o sêmen intratesticular, pois, a definição de um protocolo eficiente de criopreservação do sêmen, a partir da avaliação da motilidade espermática pós-descongelamento, só foi alcançada no final do período reprodutivo, quando as fêmeas já haviam encerrado seu período reprodutivo.

Conclui-se, que o sêmen de machos-XX de truta arco-íres pode ser efetivamente criopreservado em meio contendo glicose, gema e DMSO, em palhetas de 0,5 ml e descongelado a 70°C/3s. O sêmen coletado por meio de massagem abdominal e criopreservado de acordo com o protocolo descrito permite uma taxa de 40% de ovos olhados, quando a proporção de 30×10^6 espermatozóide por ovo é utilizada. O sêmen intratesticular pode ser criopreservado utilizando-se o mesmo protocolo descrito acima, desde que seja previamente diluído 1:6 (v/v) em plasma seminal e incubado por 1h:30min, à temperatura de 4°C.

2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BABIAK, I.; GLOGOWSKI, J.; LUCZYNSKI, M. J.; KUCHARCZYK, D.; LUCZYNSKI, M. Cryopreservation of the milt of the Northern pike. **Journal of Fish Biology**, London, v. 46, n. 5, p. 819-828, May 1995.

BAYNES, S. M.; SCOTT, A. P. Cryopreservation of rainbow trout spermatozoa: The influence of sperm quality, egg quality and extender composition on postthaw fertility. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 66, n. 1, p. 53-67, Oct. 1987.

CABRITA, E.; ANEL, L.; HERRÁEZ, M. P. Effect of external cryoprotectants as membrane stabilizers on cryopreserved rainbow trout sperm. **Theriogenology**, Woburn, v. 56, n. 4, p. 623-635, Sept. 2001a.

CABRITA, E.; ROBLES, V.; ALVAREZ, R.; HERRÁEZ, M. P. Cryopreservation of rainbow trout sperm in large straws: application to large scale fertilization. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 201, n. 3/4, p. 301-314, Oct. 2001b.

FOGLI DA SILVEIRA, W.; KAVAMOTO, E. T.; RIGOLINO, M. G.; TABATA, YA.; ARRUDA SOARES, H.; SILVEIRA, A. N.; VERÍSSIMO, R. Congelamento do sêmen de truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, em vapor de nitrogênio líquido. **Boletim Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 21, p. 55-60, 1994. Único.

LAHNSTEINER, F.; BERGER, B.; WEISMANN, T.; PATZNER, R. A. The influence of various cryoprotectants on semen quality of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) before and after cryopreservation. **Journal Applied Ichthyology**, Berlin, v. 12, n. 2, p. 99-106, July 1996a.

LAHNSTEINER, F.; PATZNER, R. A.; WEISMANN, T. Energy resources of spermatozoa of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Pisces, Teleostei). **Reproduction Nutrition Development**, Paris, v. 33, n. 4, p. 349-360, 1993.

LAHNSTEINER, F.; WEISMANN, T.; PATZNER, R. A. A uniform method for cryopreservation of semen of salmonid fishes (*Oncorhynchus mykiss*, *Salmo trutta f. fario*, *Salmo trutta f. lacustris*, *Coregonus sp.*). **Aquaculture Research**, Oxford, v. 26, n. 6, p. 801-807, June 1995.

LAHNSTEINER, F.; WEISMANN, T.; PATZNER, R. A Semen cryopreservation of salmonid fishes. Influence of handling parameters on the postthaw fertilization rate. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 27, n. 9, p. 659-671, Sept. 1996b.

LEGENBRE, M.; BILLARD, R. Cryopreservation of rainbow trout sperm by deep-freezing. **Reproduction Nutrition Development**, Paris, v. 20, n. 6, p. 1859-1868, 1980.

LEUNG, L. K. P.; JAMIESON, B. G. M. Live preservation of fish gametes. In: JAMIESON, B. G. M. (Ed.). **Fish evolution and systematics: evidence from Spermatozoa**. Cambridge: Cambridge University Press, 1991. Cap. 20, p. 245-295.

ROBLES, V.; CABRITA, E.; CUÑADO, S.; HERRAEZ M. P. Sperm cryopreservation of sex-reversed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): parameters that affect its ability for freezing. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 224, n. 1/4, p. 203-212, June 2003.

SILVEIRA, A. N.; FORESTI, F.; TABATA, Y. A.; RIGOLINO, M. G.; SILVEIRA, R. V. Cryopreservation of rainbow trout semen: diluent, straw and the vapor column. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 28, n. 2, p. 135-139, 2002.

SILVEIRA, A. N.; FORESTI, F.; TABATA, Y. A.; RIGOLINO, M. G.; SILVEIRA, R. V. Cryopreservation of semen From Functional Sex-Reversed Genotypic Females of the Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 49, n. 1, p. 73-77, Jan. 2006.

STEIN, H. Die künstliche Besamung bei Salmoniden Mitteleuropas. Habilitationsschrift. University of München-Weihenstephan, 1980.

TABATA, Y. A.; PORTS, L. Truticultura em clima tropical. In: CYRINO, J. E. P. et al. (Ed.) **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática/TecArt, 2004. Cap. 11, p. 308-341.

ANEXOS

ANEXO A

| | | |
|-----------|---|-----|
| FIGURA 1A | Temperatura máxima, mínima e média da água, para os meses de julho (A) e agosto (B) de 2005 | 119 |
| FIGURA 2A | Temperatura máxima, mínima e média da água, para os meses de julho (C) e agosto (D) de 2006 | 120 |

ANEXO B **CAPÍTULO 2**

| | | |
|------------|---|-----|
| TABELA 1B | Análise de variância do efeito dos diluidores sobre a motilidade espermática (experimento 1 A) | 121 |
| TABELA 2B | Análise de variância do efeito dos diluidores sobre a motilidade espermática (experimento 1 B) | 121 |
| TABELA 3B | Análise de variância do efeito da gema de ovo sobre a motilidade espermática (experimento 1 C) | 121 |
| TABELA 4B | Análise de variância do efeito dos crioprotetores sobre a motilidade espermática (experimento 2 A) | 122 |
| TABELA 5B | Análise de variância do efeito dos crioprotetores e da taxa de diluição sobre a motilidade espermática (experimento 2 B) | 122 |
| TABELA 6B: | Análise de variância do efeito do volume de palheta sobre a motilidade espermática (experimento 3 A) | 122 |
| TABELA 7B | Análise de variância do efeito do volume de palheta sobre a motilidade espermática (experimento 3 B) | 123 |
| TABELA 8B | Análise de variância do efeito da temperatura de descongelamento sobre a motilidade espermática (experimento 4) | 123 |

| | | |
|-----------|---|-----|
| TABELA 9B | Análise de variância do efeito do número de espermatozóides por ovo sobre a taxa de ovos olhados (experimento 5)..... | 123 |
|-----------|---|-----|

ANEXO C CAPÍTULO 3

| | | |
|------------|---|-----|
| TABELA 1C: | Análise de variância do efeito de diluidores e temperaturas de descongelamento sobre a motilidade espermática do sêmen intratesticular (experimento 1)..... | 124 |
|------------|---|-----|

| | | |
|-----------|--|-----|
| TABELA 2C | Análise de variância do efeito da diluição e da incubação do sêmen intratesticular em plasma seminal sobre a motilidade espermática (experimento 2)..... | 124 |
|-----------|--|-----|

| | | |
|-----------|---|-----|
| TABELA 3C | Análise de variância do efeito da diluição do sêmen intratesticular em plasma seminal e do diluidor sobre a motilidade espermática (experimento 3)..... | 124 |
|-----------|---|-----|

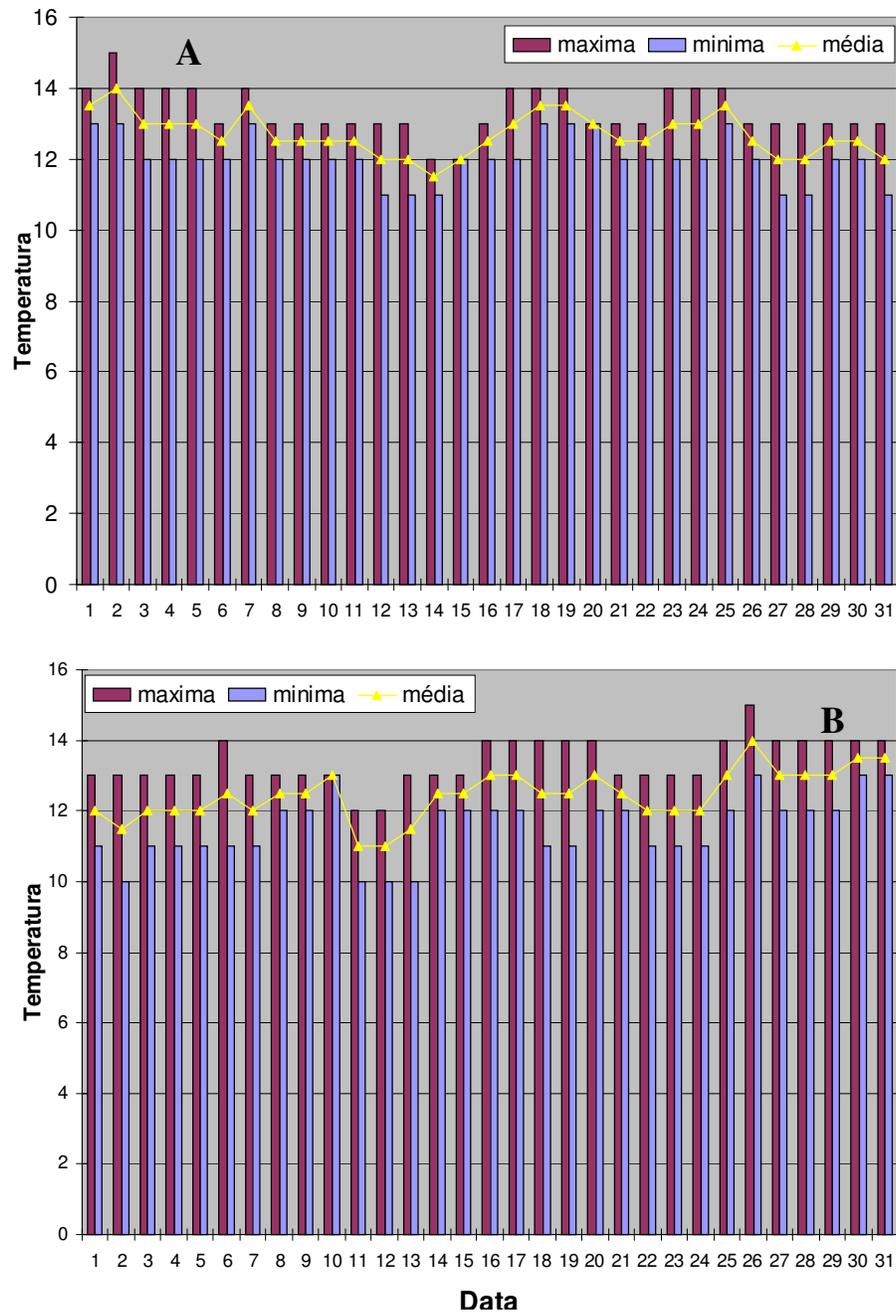


FIGURA 1A. Temperatura máxima, mínima e média da água, para os meses de julho (A) e agosto (B) de 2005.

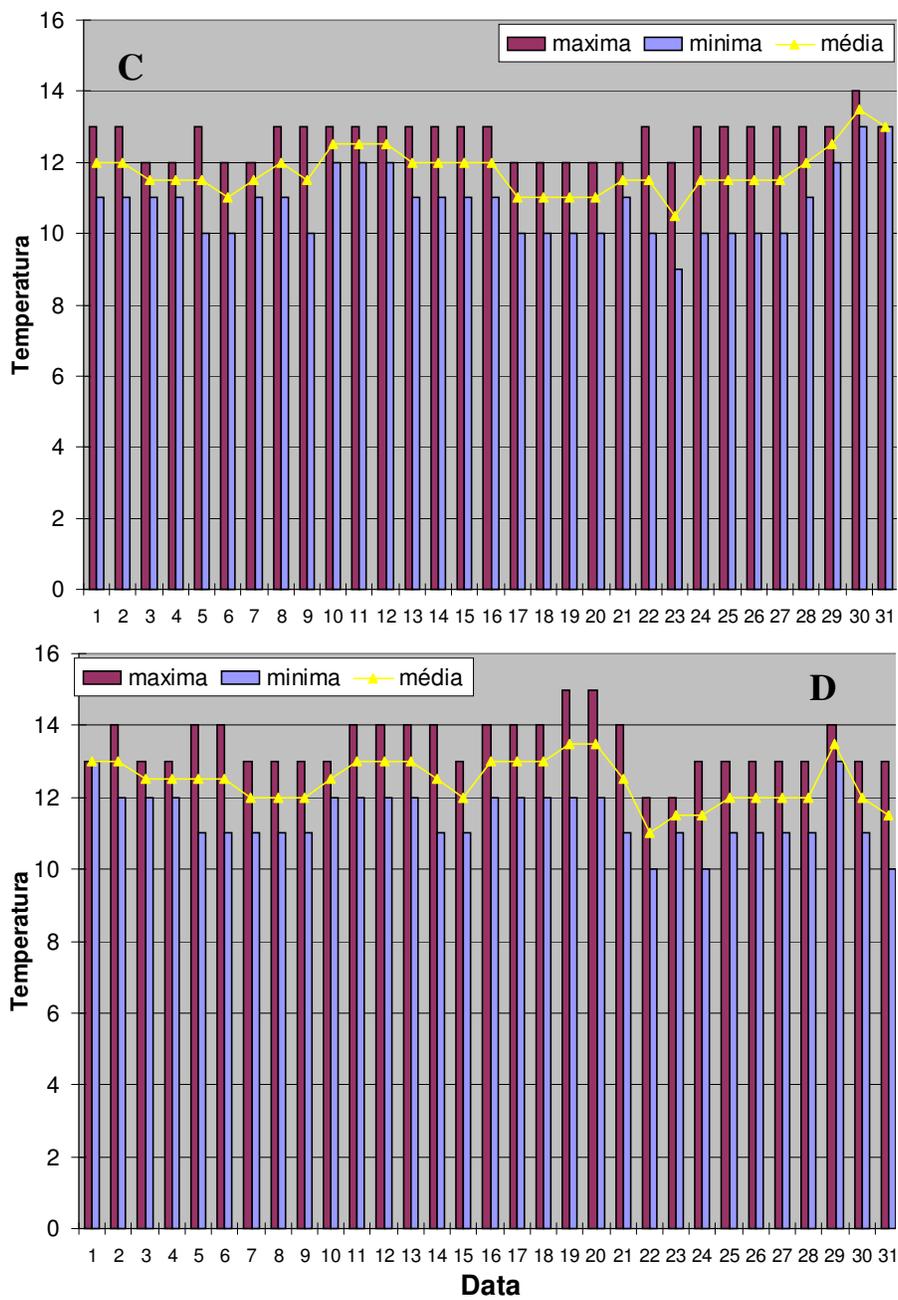


FIGURA 2A. Temperatura máxima, mínima e média da água, para os meses de julho (C) e agosto (D) de 2005.

TABELA 1B. Análise de variância do efeito dos diluidores sobre a motilidade espermática (experimento 1 A).

| FV | GL | SQ | QM | Fc | Pr>Fc |
|-----------------|------------|--------------|--------------|------------------------|--------|
| BLOCO | 4 | 2421.666667 | 605.416667 | 6.196 | 0.0014 |
| DILUIDOR | 1 | 11213.333333 | 11213.333333 | 114.763 | 0.0000 |
| erro | 24 | 2345.000000 | 97.708333 | | |
| Total corrig:29 | | 15980.000000 | | | |
| CV (%) = | 44.93 | | | | |
| Média geral: | 22.0000000 | | | Número de observações: | 30 |

TABELA 2B. Análise de variância do efeito dos diluidores sobre a motilidade espermática (experimento 1 B).

| FV | GL | SQ | QM | Fc | Pr>Fc |
|------------------|------------|-------------|-------------|------------------------|--------|
| DILUIDOR | 2 | 3880.000000 | 1940.000000 | 48.500 | 0.0000 |
| erro | 12 | 480.000000 | 40.000000 | | |
| Total corrig: 14 | | 4360.000000 | | | |
| CV (%) = | 14.37 | | | | |
| Média geral: | 44.0000000 | | | Número de observações: | 15 |

TABELA 3B. Análise de variância do efeito da gema de ovo sobre a motilidade espermática (experimento 1 C)

| FV | GL | SQ | QM | Fc | Pr>Fc |
|------------------|------------|--------------|-----------|------------------------|--------|
| GEMA | 1 | 9720.000000 | 9720.0000 | 255.416 | 0.0000 |
| BLOCO | 4 | 313.333333 | 78.333333 | 2.058 | 0.1180 |
| erro | 24 | 913.333333 | 38.055556 | | |
| Total corrig: 29 | | 10946.666667 | | | |
| CV (%) = | 17.79 | | | | |
| Média geral: | 34.6666667 | | | Número de observações: | 30 |

TABELA 4B. Análise de variância do efeito dos crioprotetores sobre a motilidade espermática (experimento 2 A).

| FV | GL | SQ | QM | Fc | Pr>Fc |
|---------------|------------|--------------|------------------------|--------|--------|
| BLOCO | 4 | 2585.833333 | 646.45833 | 5.266 | 0.0012 |
| CRIOPROTETOR | 3 | 11534.583333 | 3844.8611 | 31.317 | 0.0000 |
| erro | 52 | 6384.166667 | 122.77243 | | |
| Total corrig: | 59 | 20504.583333 | | | |
| CV (%) = | 46.33 | | | | |
| Média geral: | 23.9166667 | | Número de observações: | 60 | |

TABELA 5B. Análise de variância do efeito dos crioprotetores e da taxa de diluição sobre a motilidade espermática (experimento 2 B).

| FV | GL | SQ | QM | Fc | Pr>Fc |
|---------------|------------|--------------|------------------------|---------|--------|
| BLOCO | 4 | 376.666667 | 94.166667 | 1.956 | 0.1150 |
| CRIO | 1 | 13801.666666 | 13801.666667 | 286.692 | 0.0000 |
| DILUIÇÃO | 1 | 5801.666667 | 5801.666667 | 120.514 | 0.0000 |
| CRIO*DIL | 1 | 601.666667 | 601.666667 | 12.498 | 0.0009 |
| erro | 52 | 2503.333333 | 48.141026 | | |
| Total corrig: | 59 | 23085.00000 | | | |
| CV (%) = | 20.11 | | | | |
| Média geral: | 34.5000000 | | Número de observações: | 60 | |

TABELA 6B. Análise de variância do efeito do volume de palheta sobre a motilidade espermática (experimento 3 A).

| FV | GL | SQ | QM | Fc | Pr>Fc |
|---------------|------------|-------------|------------------------|--------|--------|
| BLOCO | 4 | 1986.666667 | 496.666667 | 5.805 | 0.0020 |
| VOL_PALH | 1 | 2430.000000 | 2430.000000 | 28.403 | 0.0000 |
| erro | 24 | 2053.333333 | 85.555556 | | |
| Total corrig: | 29 | 6470.000000 | | | |
| CV (%) = | 22.56 | | | | |
| Média geral: | 41.0000000 | | Número de observações: | 30 | |

TABELA 7B. Análise de variância do efeito do volume de palheta sobre a motilidade espermática (experimento 3 B).

| FV | GL | SQ | QM | Fc | Pr>Fc |
|-----------------|----|-------------|---------------------------|--------|--------|
| BLOCO | 4 | 300.000000 | 75.000000 | 3.395 | 0.0167 |
| PALHETA | 1 | 2178.000000 | 2178.000000 | 98.593 | 0.0000 |
| erro | 44 | 972.000000 | 22.090909 | | |
| Total corrig:49 | | 3450.000000 | | | |
| CV (%) = | | 8.87 | | | |
| Média geral: | | 53.0000000 | Número de observações: 50 | | |

TABELA 8B. Análise de variância do efeito da temperatura de descongelamento sobre a motilidade espermática (experimento 4).

| FV | GL | SQ | QM | Fc | Pr>Fc |
|-----------------|----|-------------|---------------------------|-------|--------|
| BLOCO | 4 | 1257.777778 | 314.444444 | 3.348 | 0.0192 |
| TEMP_DESC | 2 | 1831.111111 | 915.555556 | 9.748 | 0.0004 |
| erro | 38 | 3568.888889 | 93.918129 | | |
| Total corrig:44 | | 6657.777778 | | | |
| CV (%) = | | 18.02 | | | |
| Média geral: | | 53.7777778 | Número de observações: 45 | | |

TABELA 9B. Análise de variância do efeito do número de espermatozóides por ovo sobre a taxa de ovos olhados (experimento 5).

| FV | GL | SQ | QM | Fc | Pr>Fc |
|------------------|----|-------------|---------------------------|-------|--------|
| BLOCO | 2 | 26.083333 | 13.041667 | 0.241 | 0.7880 |
| SPZ:OVO | 3 | 797.458333 | 265.819444 | 4.920 | 0.0114 |
| erro | 18 | 972.416667 | 54.023148 | | |
| Total corrig: 23 | | 1795.958333 | | | |
| CV (%) = | | 18.75 | | | |
| Média geral: | | 39.2083333 | Número de observações: 24 | | |

TABELA 1C. Análise de variância do efeito de diluidores e temperaturas de descongelamento sobre a motilidade espermática do sêmen intratesticular (experimento 1).

| FV | GL | SQ | QM | Fc | Pr>Fc |
|---------------|-----------|------------------------|------------|-------|--------|
| BLOCO | 2 | 62.037037 | 31.018519 | 6.614 | 0.0030 |
| DILUIDOR | 2 | 62.037037 | 31.018519 | 6.614 | 0.0030 |
| DESCONGTO | 1 | 0.462963 | 0.462963 | 0.099 | 0.7548 |
| DIL*DESC | 2 | 6.481481 | 3.240741 | 0.691 | 0.5062 |
| erro | 46 | 215.740741 | 4.690016 | | |
| Total corrig: | | 53 | 346.759259 | | |
| CV (%) = | 34.91 | | | | |
| Média geral: | 6.2037037 | Número de observações: | | 54 | |

TABELA 2C. Análise de variância do efeito da diluição e da incubação do sêmen intratesticular em plasma seminal sobre a motilidade espermática (experimento 2).

| FV | GL | SQ | QM | F | Pr>Fc |
|---------------|------------|------------------------|-------------|---------|--------|
| DILUIÇÃO | 2 | 7361.666667 | 3680.833333 | 110.425 | 0.0000 |
| INCUBAÇÃO | 1 | 4200.833333 | 4200.833333 | 126.025 | 0.0000 |
| DIL*INCUB | 2 | 3361.666667 | 1680.833333 | 50.425 | 0.0000 |
| erro | 24 | 800.000000 | 33.333333 | | |
| Total corrig: | | 29 | 15724.16666 | | |
| CV (%) = | 23.25 | | | | |
| Média geral: | 24.8333333 | Número de observações: | | 30 | |

TABELA 3C. Análise de variância do efeito da diluição do sêmen intratesticular em plasma seminal e do diluidor sobre a motilidade espermática (experimento 3).

| FV | GL | SQ | QM | Fc | Pr>Fc |
|---------------|------------|------------------------|------------|--------|--------|
| DILUIDOR | 1 | 653.333333 | 653.333333 | 32.667 | 0.0000 |
| DILUIÇÃO | 2 | 86.666667 | 43.333333 | 2.167 | 0.1364 |
| DIL*DILUIÇÃO | 2 | 326.666667 | 163.333333 | 8.167 | 0.0020 |
| erro | 24 | 480.000000 | 20.000000 | | |
| Total corrig: | | 29 | 1546.66666 | | |
| CV (%) = | 10.01 | | | | |
| Média geral: | 44.6666667 | Número de observações: | | 30 | |