

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

BIOTECNOLOGIAS APLICADAS À REPRODUÇÃO DE
PEIXES: A CRIOPRESERVAÇÃO E O CULTIVO
MONOSEXO CONTRIBUINDO PARA A PISCICULTURA
MODERNA

Autor: Pedro Luiz de Castro
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro

MARINGÁ
Estado do Paraná
Maio – 2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

BIOTECNOLOGIAS APLICADAS À REPRODUÇÃO DE
PEIXES: A CRIOPRESERVAÇÃO E O CULTIVO
MONOSEXO CONTRIBUINDO PARA A PISCICULTURA
MODERNA

Autor: Pedro Luiz de Castro
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro

Tese apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá - Área de concentração Produção Animal.

MARINGÁ
Estado do Paraná
Maio – 2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

C355b Castro, Pedro Luiz de
Biotecnologias aplicadas à reprodução de peixes:
a criopreservação e o cultivo monosexo contribuindo
para a piscicultura moderna. / Pedro Luiz de Castro.
-- Maringá, 2018.
89 f. : il., color, figs., fotos, tabs.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro.
Co-orientador: Prof. Dr. Jawahar Patil.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de
Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia - Área de Concentração:
Produção Animal, 2018.

1. Apoptose. 2. Crio-lesões. 3. *Danio rerio*. 4.
Neo-machos. 5. Qualidade do sêmen. 6. *Salmo salar*.
I. Ribeiro, Ricardo Pereira, orient. II. Patil,
Jawahar, coorient. III. Universidade Estadual de
Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia - Área de Concentração:
Produção Animal. IV. Título.

CDD 21.ed. 639.31

AHS-CRB-9/1065



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

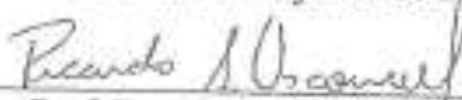



BIOTECNOLOGIAS APLICADAS À REPRODUÇÃO DE
PEIXES: A CRIOPRESERVAÇÃO E O CULTIVO
MONOSEXO CONTRIBUINDO PARA A PISCICULTURA
MODERNA

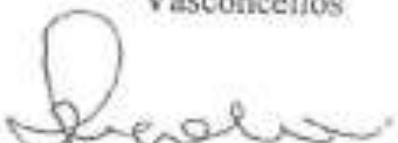
Autor: Pedro Luiz de Castro
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro


TITULAÇÃO: Doutor em Zootecnia - Área de Concentração Produção
Animal

APROVADO em 15 de junho de 2018.


Prof. Dr. Ricardo Souza
Vasconcelos


Prof. Dr. Jayme Aparecido Povh


Prof. Dr. Luiz Paulo Rigolon


Prof. Dr. Fabio Luiz Bim
Cavalieri


Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro
Orientador

“Depois de algum tempo, você aprende a diferença, a sutil diferença, entre dar a mão e acorrentar uma alma. Você aprende que amar não significa apoiar-se, e que companhia nem sempre significa segurança. E começa a aprender que beijos não são contratos e presentes não são promessas. Começa a aceitar suas derrotas com a cabeça erguida e olhos adiante, com a graça de um adulto e não com a tristeza de uma criança.

Aprende a construir todas as suas estradas no hoje, porque o terreno do amanhã é incerto demais para seus planos. E aprende que não importa o quanto você se importe, algumas pessoas simplesmente não se importam. Aceita que não importa quão boa seja uma pessoa, ela vai feri-lo de vez em quando e você precisa perdoá-la, por isso. Aprende que falar pode aliviar dores emocionais.

Descobre que se levam anos para se construir confiança e apenas segundos para destruí-la, e que você pode fazer coisas em um instante das quais se arrepende pelo resto da vida. Aprende que verdadeiras amizades continuam a crescer mesmo a longas distâncias. E o que importa não é o que você tem na vida, mas quem você tem na vida. E que bons amigos são a família que nos permitiram escolher. Aprende que não temos que mudar de amigos se compreendemos que os amigos mudam, percebe que seu melhor amigo e você podem fazer qualquer coisa, ou nada, e terem bons momentos juntos.

Descobre que as pessoas com quem você mais se importa na vida são tomadas de você muito depressa, por isso sempre devemos deixar as pessoas que amamos com palavras amorosas, pode ser a última vez que as vejamos. Aprende que as circunstâncias e os ambientes têm influência sobre nós, mas nós somos responsáveis por nós mesmos.

Começa a aprender que não se deve comparar com os outros, mas com o melhor que pode ser. Descobre que se leva muito tempo para se tornar a pessoa que quer ser, e que o tempo é curto. Aprende que não importa onde já chegou, mas onde está indo, mas se você não sabe para onde está indo, qualquer lugar serve. Aprende que, ou você controla seus atos ou eles o controlarão, e que ser flexível não significa ser fraco, pois não importa quão delicada e frágil seja uma situação, sempre existem dois lados.

Aprende que heróis são pessoas que fizeram o que era necessário fazer, enfrentando as consequências. Aprende que paciência requer muita prática. Descobre que algumas vezes a pessoa que você espera que o chute quando você cai é uma das poucas que o ajudam a levantar-se.

Aprende que maturidade tem mais a ver com os tipos de experiência que se teve e o que você aprendeu com elas do que com quantos aniversários você celebrou. Aprende que há mais dos seus pais em você do que você supunha. Aprende que nunca se deve dizer a uma criança que sonhos são bobagens, poucas coisas são tão humilhantes e seria uma tragédia se ela acreditasse nisso.

Aprende que quando está com raiva tem o direito de estar com raiva, mas isso não te dá o direito de ser cruel. Descobre que só porque alguém não o ama do jeito que você quer que ame, não significa que esse alguém não o ama, contudo o que pode, pois existem pessoas que nos amam, mas simplesmente não sabem como demonstrar ou viver isso. Aprende que nem sempre é suficiente ser perdoado por alguém, algumas vezes você tem que aprender a perdoar-se a si mesmo. Aprende que com a mesma severidade com que julga, você será em algum momento condenado. Aprende que não importa em quantos pedaços seu coração foi partido, o mundo não para para que você o conserte. Aprende que o tempo não é algo que possa voltar para trás.

Portanto... plante seu jardim e decore sua alma, ao invés de esperar que alguém lhe traga flores. E você aprende que realmente pode suportar... que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais. E que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida!”

William Shakespeare

Agradeço à minha noiva Letícia Viana Costa, que de forma muito especial e carinhosa me deu força e coragem me apoiando nos momentos de dificuldades. Quero agradecer também aos meus amigos e familiares, que embora não tivessem conhecimento disto, iluminaram os meus pensamentos me levando a buscar mais conhecimentos, assim como meus pais, Sonia Maria da Silva de Castro e Celso Luiz de Castro, pela força, companheirismo e exemplos a mim passados.

Esta conquista
dedico a vocês

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter estado comigo, dando força e sabedoria, para chegar até aqui.

Ao meu orientador Ricardo Pereira Ribeiro, por disponibilizar todo o conhecimento, incentivo, oportunidades, ferramentas e a motivação necessária para desenvolver minha carreira até este nível.

Ao meu coorientador na Austrália Jawahar Patil, por todos os ensinamentos ao longo de sete meses, um exemplo de pesquisador e ser humano ao qual sempre buscarei me espelhar.

A todos meus colegas de graduação e pós-graduação participantes do grupo de pesquisa Peixegen, Cesar Sary, Vanessa Lewandowski, André Secatto, Hanner Mahamoud, Jaísa Casetta, Laís Mantovani, Eric Campos, Jailton Bezerra, Felipe Pinheiro Elenice e Márcio, pelo companheirismo e a contribuição durante as coletas de dados.

A todos amigos que deixei na University of Tasmania, Kwan, Raihan, Komeil, Peter, Ehsan, Simon, Chris e Lisette, trago vocês em meu coração, nunca esquecerei nossos jantares, passeios e jogos de soccer às sextas feiras.

A todos meus amigos na Tasmânia, Dani e Demétrio, Leandro, Ana, Vilius, Rafael, Greg e Dorothy, vocês me fizeram sentir em família mesmo estando a 13.000 km de casa.

A todos meus irmãos de outras mães, Guilherme, Vladson, Jhony, Leandro, Pedro Henrique e Victor Hugo, que nossa amizade nunca se acabe!

À minha noiva Letícia, obrigado por todo o apoio e companheirismo, te amo!

Aos meus pais Celso e Sonia, pela excelente educação, por me ensinarem valiosos princípios e valores humanos, pela ajuda incondicional, eu jamais teria conseguido sem vocês!

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de doutorado no país e a CAPES, pela bolsa de doutorado sanduiche no exterior, proporcionando-me não apenas uma qualificação científica, mas acima de tudo uma experiência de vida.

...Enfim, agradeço a todos que encontrei nesta caminhada, mesmo que o nome aqui não tenha mencionado, sem a ajuda e o apoio de vocês nada disto teria acontecido.

Meu sincero muito obrigado a todos vocês!

BIOGRAFIA

PEDRO LUIZ DE CASTRO, filho de Celso Luiz de Castro e Sonia Maria da Silva de Castro, nasceu em Maringá, Estado do Paraná, no dia 02 de março de 1990.

Em fevereiro de 2008, ingressou no curso de Zootecnia pela Universidade Estadual de Maringá. Em agosto desse mesmo ano iniciou sua jornada na pesquisa, como bolsista do CNPq em projetos de iniciação científica na área de reprodução animal até a conclusão do curso em 2012.

Em fevereiro de 2015, obteve o título de mestre em Zootecnia, área de concentração Produção Animal, na Universidade Estadual de Maringá, realizando estudos relacionados à piscicultura e reprodução de peixes.

Em março de 2015, ingressou no mesmo programa de pós-graduação, no nível de Doutorado, dando continuidade aos estudos na área de piscicultura, genética molecular e reprodução de peixes.

Em 2017, participou do programa de doutorado sanduíche (CAPES), pelo período de sete meses na University of Tasmania, Tasmânia, Austrália.

No dia 11 de maio de 2018, submeteu-se à banca de qualificação.

INDÍCE

	Página
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
FIGURAS DO APÊNDICE.....	xiii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xvi
CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO.....	01
PARTE I – O cenário da piscicultura mundial e brasileira.....	01
1. Produção mundial de peixes: A piscicultura como única saída.....	01
2. Brasil: O maior potencial piscícola do mundo.....	02
3. As biotécnicas reprodutivas como fonte de avanços produtivos.....	03
PARTE II – A criopreservação de embriões de peixes.....	04
1. Criopreservação de embriões de peixes: vantagens e dificuldades.....	04
2. Técnicas de criopreservação.....	06
2.1. Resfriamento.....	06
2.2. Congelamento lento	07
2.3. Congelamento rápido ou vitrificação.....	09
3. Agentes crioprotetores	10
3.1. Crioprotetores intracelulares.....	10
3.2. Crioprotetores extracelulares.....	11
4. Toxicidade dos crioprotetores.....	11
5. Osmolaridade e permeabilidade dos agentes crioprotetores.....	12
6. Estágios de desenvolvimento embrionário e a criopreservação.....	14
7. Crio-lesões.....	15

8. Descongelamento.....	16
PARTE III - O cultivo monosexo de peixes.....	16
1. O cultivo monosexo e suas vantagens.....	16
2. Inversão sexual.....	17
2.1. Método direto de inversão sexual.....	19
2.2. Método indireto de inversão sexual.....	20
3. Cultivo monosexo de salmonídeos.....	21
PARTE IV – Espécies Alvo.....	22
1. O zebrafish como modelo de pesquisa.....	22
2. O salmão do Atlântico e seu mercado globalizado.....	23
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
OBJETIVO GERAL.....	34
CAPÍTULO II - CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES DE PEIXES: O USO DA MELATONINA COMO INIBIDOR DO PROCESSO APOPTÓTICO.....	35
Resumo.....	35
Abstract.....	35
Introdução.....	36
Materiais e Métodos.....	38
Resultados.....	44
Discussão.....	48
Conclusão	52
Agradecimentos.....	53
Referências bibliográficas.....	53
CAPÍTULO III - COMPARATIVE GONAD HISTOLOGY AND SPERM QUALITY OF NORMAL (XY) AND NEO-MALE (XX) ATLANTIC SALMON (<i>SALMO SALAR</i>) - IMPLICATIONS FOR HATCHERY PRODUCTION.....	58
Abstract.....	58
Introduction	58
Materials and methods.....	60
Results	65
Discusion.....	71
Acknowledgements	77
References	77
Supplementary material.....	82

CAPÍTULO IV - ARTIGO VULGARIZADO: CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES DE PEIXES: A TECNOLOGIA A FAVOR DA PRODUTIVIDADE.....	83
APÊNDICE A.....	86
APÊNDICE B.....	88

LISTA DE TABELAS

	Página
CAPITULO I – INTRODUÇÃO.....	01
Tabela 1. Principais espécies comerciais que já possuem populações monossexo produzidas por inversão sexual, além do sexo preferido e suas vantagens.....	18
CAPÍTULO II - CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES DE PEIXES: O USO DA MELATONINA COMO INIBIDOR DO PROCESSO APOPTÓTICO.....	35
Tabela 1. Solução de vitrificação utilizada para a criopreservação de embriões de Zebrafish (<i>D. rerio</i>).....	40
Tabela 2. Sequências forward e reverse, e temperatura de anelamento dos <i>primers</i> para os genes <i>bax</i> , <i>bcl-2</i> , <i>Caspase-3</i> e β - <i>actina</i> de Zebrafish (<i>D. rerio</i>).....	42
CAPÍTULO III - COMPARATIVE GONAD HISTOLOGY AND SPERM QUALITY OF NORMAL (XY) AND NEO-MALE (XX) ATLANTIC SALMON (<i>SALMO SALAR</i>) - IMPLICATIONS FOR HATCHERY PRODUCTION.....	58
Table 1. Means (\pm standard deviations) of fish and gonad size, GSI and milt volume of normal (XY) and neo (XX) male Atlantic salmon (<i>S. salar</i>) used in the study.....	65
Table 2. Means (\pm standard deviations) of structural abnormalities of sperm.....	67
Table 3. Means (\pm standard deviations) of select histological measurements in normal (XY) and neo (XX) male Atlantic salmon (<i>S. salar</i>).....	70
Supplementary table 1. CASA settings used for <i>S. salar</i> semen motility analysis.....	82

LISTA DE FIGURAS

	Página
CAPITULO I – INTRODUÇÃO.....	01
Figura 1. Processo de desidratação dos embriões pré-congelamento e embriões retraídos após a desidratação.....	13
Figura 2. Organização de embrião de peixe (Zebrafish, <i>D. rerio</i>).....	14
Figura 3. Esquema geral para a obtenção de a produção direta de linhagens monosexo.....	19
Figura 4. Esquema para a obtenção pela maneira indireta de linhagens monosexo fêmea em salmonídeos.....	20
Figura 5. Zebrafish (<i>D. rerio</i>).....	22
Figura 6. Salmão do Atlântico (<i>S. salar</i>).....	23
CAPÍTULO II - CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES DE PEIXES: O USO DA MELATONINA COMO INIBIDOR DO PROCESSO APOPTÓTICO.....	35
Figura 1. Esquema experimental utilizado.....	39
Figura 2. Processo de morte de embrião de <i>D. rerio</i> após o descongelamento.....	44
Figura 3. Microscopia eletrônica de varredura de embriões de zebrafish (<i>D. rerio</i>) vitrificados ou não, com ou sem inclusão de melatonina na solução crioprotetora.....	45
Figura 4. Níveis de expressão dos genes <i>Bax</i> , <i>Bcl-2</i> e <i>Caspase-3</i> , em embriões de Zebrafish (<i>D. rerio</i>) após a vitrificação.....	46
Figura 5. Porcentagem dos embriões afetado (emissão de fluorescência) pela formação de ERO's e fragmentação de DNA após a vitrificação.....	47
Figura 6. Emissão de fluorescência dos embriões de zebrafish (<i>D. rerio</i>) afetados pela formação de ERO's e fragmentação do DNA após a vitrificação.....	48

CAPÍTULO III - COMPARATIVE GONAD HISTOLOGY AND SPERM QUALITY OF NORMAL (XY) AND NEO-MALE (XX) ATLANTIC SALMON (<i>SALMO SALAR</i>) - IMPLICATIONS FOR HATCHERY PRODUCTION.....	58
Figure 1. Flow chart showing the steps used for extraction of milt/semen.....	61
Figure 2. Comparative gross testis morphology of Atlantic salmon (<i>S. salar</i>) neo-males (a) and normal males (b).....	66
Figure 3. Mean (\pm standard deviations) sperm qualities of normal (XY) and neo (XX) male Atlantic salmon (<i>S. salar</i>) as measured by CASA analyses.....	68
Figure 4. Hematoxylin and Eosin stained testis sections of Atlantic salmon (<i>S. salar</i>) neo- (XX) and normal (XY) males.....	69
Figure 5. TUNEL assay in testis of Atlantic salmon (<i>S. salar</i>) neo-males (XX) and normal males (XY).....	70
CAPÍTULO IV - ARTIGO VULGARIZADO: CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES DE PEIXES: A TECNOLOGIA A FAVOR DA PRODUTIVIDADE.....	83
Figura 1. Crio-lesões formadas após a vitrificação.....	85
Figura 2. Análise de formação de ERO's e fragmentação de DNA.....	85

FIGURAS DO APÊNDICE

	Página
APÊNDICE A.....	86
Figura 1A. Estrutura de recirculação de água onde os reprodutores de zebrafish (<i>D. rerio</i>) foram mantidos.....	86
Figura 2A. Coleta de embriões de zebrafish (<i>D. rerio</i>).....	87
Figura 3A. Exemplo de qPCR para os genes <i>Bcl-2</i> , <i>Bax</i> , <i>Caspase-3</i> e β -actina em embriões de zebrafish (<i>D. rerio</i>).....	87
APÊNDICE B.....	88
Figura 1B. Tanques de manutenção dos reprodutores de salmão do Atlântico (<i>S. salar</i>). New North Folk Hatcherie, Tasmania, Austrália.....	88
Figura 2B. Avaliação dos parâmetros de motilidade espermática utilizando o plug-in CASA no software ImageJ.....	88
Figura 3B. Tabela de anormalidades primárias e secundárias para espermatozoides de peixes	89

RESUMO

Espera-se que a população mundial exceda nove bilhões de pessoas até 2050, fato que aumentará a demanda por proteína animal em no mínimo 70 por cento. Neste cenário, a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura já reconhece a contribuição crescente da piscicultura para a segurança alimentar. Contudo, essa indústria ainda está longe da sofisticação atingida pela avicultura ou bovinocultura, por exemplo, sendo extremamente necessário o desenvolvimento de novas biotecnologias que visem o aumento de seus índices produtivos. O completo domínio da reprodução em ambiente de cultivo e a garantia constante oferta de alevinos é um fator considerado fundamental para o sucesso da produção de peixes. Entre os principais avanços biotecnológicos alcançados recentemente podem ser citados as aplicações da criopreservação de gametas e embriões e a propagação de populações monosexo. O objetivo geral deste trabalho foi produzir conhecimento técnico científico de qualidade acerca do manejo reprodutivo de peixes, buscando o aprimoramento da técnica de vitrificação de embriões e a utilização de indivíduos neomachos para a propagação de populações monosexo. Esses objetivos foram atingidos a partir da realização de duas pesquisas. Na primeira, ao se investigar o efeito da inclusão do hormônio melatonina na solução vitrificante de embriões de zebrafish (*Danio rerio*), sob os eventos apoptóticos e na formação de crio-lesões após o descongelamento, observou-se que embora a solução crioprotetora utilizada não tenha protegido adequadamente todas as regiões dos embriões, especialmente a camada sincicial vitelínica, em nível molecular, a suplementação de 10^{-6} M de melatonina melhorou significativamente a resposta ao processo apoptótico, principalmente quanto à expressão dos genes envolvidos e a fragmentação do DNA ($p < 0,05$). Esses resultados poderão contribuir para o futuro desenvolvimento de um protocolo eficaz para a criopreservação deste tipo de material. A segunda pesquisa avaliou comparativamente a morfologia e histologia gonadal e a qualidade espermática de machos normais (genótipo

XY) e neomachos (genótipo XX) de salmão do Atlântico (*Salmo salar*). Assim, foi verificado que os testículos de indivíduos neomachos apresentaram formatos irregulares, com túbulos seminíferos pobremente formados e maior proporção de espaço intersticial, células de Sertoli e cistos de hiperplasia epitelial ($p < 0,05$). De maneira geral, essas anormalidades pareceram formar uma barreira física que impediram a coleta de sêmen pela técnica de extrusão convencional e forçaram sua coleta pela fragmentação testicular, prática que reduziu a qualidade do sêmen, principalmente quanto à sua motilidade e duração de motilidade espermática ($p < 0,05$). O ensaio de fragmentação de DNA (Tunel) não indicou sinais de tecidos apoptóticos ou deteriorados, sugerindo que as diferenças histológicas encontradas podem estar relacionadas à maturidade sexual tardia dos neomachos. Essas observações possibilitarão a melhoria do manejo reprodutivo e consequente incremento das taxas de fertilização dos peixes neomachos.

PALAVRAS CHAVE: Apoptose, crio-lesões, *Danio rerio*, neomachos, qualidade do sêmen, *Salmo salar*

ABSTRACT

The world population is expected to exceed nine billion people by 2050, fact that has increased the demand for animal protein by no less than 70 percent. Thus, the Food and Agriculture Organization of the United Nations already recognizes the increasing contribution of fish farming to food security, however, this industry is still far from the sophistication reached by the poultry or cattle industry for example, being very necessary the development of new biotechnologies that aim at the increase of its productive indexes. The complete knowledge of the breeding in captivity and the constant fingerlings supply of the important commercial species is a factor considered fundamental for the success of fish production. Recent advances in reproductive biotechnologies for fish, such as the cryopreservation of gametes and embryos, and the propagation of a monosex progeny are cited as key recent advances. The objective of this research was to produce quality technical knowledge about the reproductive management of fish, aiming at the improvement and refinement of embryo vitrification techniques and the use of neo-males for the propagation of monosex populations. More specifically two unpublished researches were carried out, in the first one, was investigated the effect of the inclusion of the hormone melatonin in the vitrification solution of zebrafish embryos (*D. rerio*) under the apoptotic events and formation of cryo-lesions after thawing, it was observed that although the vitrification solution used did not adequately protect all regions of the embryos, especially the yolk syncytial layer, at the molecular level, 10^{-6} M supplementation of melatonin improved the response to the apoptotic process, mainly regarding the expression of the involved genes and to DNA fragmentation ($p < 0.05$), an important result that may contribute to the future discovery of an efficient protocol for the cryopreservation of this type of material. On the other hand, in the research number two, morphology and gonadal histology and the sperm quality of normal (XY genotype) and neo-males (genotype XX) of Atlantic salmon (*S. salar*) were evaluated. Morphology and gonadal histology revealed that the testicles of neo-males presented irregular shapes,

with poorly formed seminiferous tubules and a greater proportion of interstitial space, Sertoli cells and epithelial hyperplasia cysts ($p < 0.05$). Collectively, these abnormalities appeared to form a physical barrier that prevented the collection of semen by the conventional method and forced its collection by testicular fragmentation, a practice that reduces semen quality, mainly in relation to the motility and duration of sperm motility ($p < 0.05$). Interestingly, the TUNEL test did not indicate signs of apoptotic or deteriorated tissue, suggesting that the histological differences found may be related to the late sexual maturity of the neo-males and, therefore, allow the improvement of the reproductive management and consequent increase of the fertilization rates.

KEY WORDS: Apoptosis, cryo-lesions, *Danio rerio*, neo-males, semen quality, *Samo salar*

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

PARTE I - O CENÁRIO DA PISCICULTURA MUNDIAL E BRASILEIRA

1. Produção mundial de peixes: A piscicultura como única alternativa

A Organização das Nações Unidas (FAO, 2015a) revela grande redução dos índices mundiais da fome a partir dos anos 2000, com a saída do estado de desnutrição de cerca de 167 milhões de pessoas. Isto se deve principalmente a estabilidade política e ao crescimento econômico, acompanhado por ações de proteção social dirigidas às pessoas mais pobres de países latino americanos, asiáticos e africanos. Contudo, esses dados estatísticos mostraram uma estimativa que 795 milhões de pessoas ainda passam fome, problema potencializado pela previsão de crescimento populacional mundial de 37,14% até 2050 (FAO, 2015a).

Um fato preocupante é o déficit na produção de alimentos necessários para atender toda essa população. Segundo a FAO (2015a), entre os anos de 1961 e 1990 a taxa de crescimento agrícola mundial sempre esteve ao redor de 3% ao ano, mas a partir de 2007, com a crise global, estes índices passaram aos menores patamares da história, apenas 1% ao ano. A entidade cita que essa diferença se deve principalmente ao esgotamento das áreas cultiváveis em diversos países, à subutilização de áreas, mudanças climáticas, falta de água e intensos processos de desertificação. Desta forma, mercados como o da carne bovina serão particularmente prejudicados, sobretudo em países com características de produção extensiva como o Brasil. Um modesto aumento no mercado mundial de carnes já foi constatado em 2015, apenas 1,7%, sendo a produção de aves e suínos responsáveis pela maior parte deste crescimento (FAO, 2015b).

Na contramão dessas expectativas, a produção global de carne de pescado acumulou crescimentos consecutivos a mais de cinco décadas, com taxas anuais médias de 3,2% (FAO, 2014). Estas observações elegem a piscicultura como uma das atividades que possuem maior importância no atendimento das demandas alimentícias futuras por proteína animal (FAO, 2014). Ainda segundo estes dados, o consumo médio per capita da carne de pescado passou de 9,9 kg em 1960 para 19,2 kg em 2012, estando esses impressionantes números relacionados ao aumento produtivo ocasionado pelo domínio sobre as técnicas produtivas e reprodutivas de diversas espécies em ambientes de cultivo.

Até o ano de 2014 a pesca era a principal fornecedora mundial de carne de pescado, mas, devido à exploração excessiva dos estoques e a degradação dos ambientes aquáticos, sua produção se estabilizou, de forma que a aquicultura ganhou espaço e hoje representa a única saída para a manutenção do crescimento produtivo (Lopera-Barrero et al, 2011). Atualmente o continente asiático detém 89,39% de toda a produção aquícola mundial, sendo que apenas a China representa cerca de 60% desse total, com produção de 4,78%, o continente americano aparece em segundo lugar (FAO, 2016). As espécies aquícolas mais importantes correspondem aos peixes de água doce principalmente carpas e tilápias, seguido dos salmonídeos (Salmão e trutas) cultivados em água salgada (FAO, 2014).

2. *Brasil: O maior potencial piscícola do mundo*

O território brasileiro detém cerca de 12% de todo o reservatório de água doce do planeta, além de mais de 8.000 km de faixa marítima, características essas que o credenciam a ser o país com maior potencial para a produção de organismos aquáticos do mundo (MPA, 2012). Segundo a FAO (2014), o Brasil melhorou de forma significativa seu ranking nos últimos anos, obtendo crescimento produtivo considerável de 43,8% entre os anos de 2007 e 2009, estimando-se ainda a produção potencial de até 20 milhões de toneladas no ano de 2030, mas que até lá, um longo caminho deve ser percorrido, já que com cerca de dois milhões de toneladas produzidas em 2013, ainda se encontra atrás de países como a Índia, Vietnã e Indonésia (Lopera-Barrero et al., 2011; MPA, 2012).

Aliado a elevação da produtividade, o consumo brasileiro de carne de pescado também cresce exponencialmente, observando-se aumento superior a 100% entre os anos de 2003 e 2013, atingindo a média de 14,5 kg/habitante/ano, valor que atendeu pela primeira vez às recomendações da FAO de 12 kg/habitante/ano (MPA, 2014).

Segundo a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA, 2013), a produção brasileira de peixes, caracteriza-se pelo cultivo de espécies exóticas (Tilápias e carpas), peixes redondos (Tambaqui e híbridos) e os surubins (Cachara, pintado e seus híbridos). Embora a tilápia ainda ocupe a primeira posição em produção, por determinações legais de alguns estados, bem como características de mercado, as espécies nativas vêm ganhando espaço, principalmente com o surgimento dos animais melhorados, mais produtivos e adaptados. Ainda de acordo com os mesmos autores, 52 espécies nativas brasileiras já são produzidas em ambientes de cultivo, destacando-se as famílias *Serrasalminidae* (Tambaqui, pacu e pirapitinga), *Anostomidae* (Piau-açu), *Pimelodidae* (Surubins, pintado, cacharas e mandis) e *Characidae* (Matrinxã e piracanjuba). Embora o número de espécies exploradas seja relativamente grande, poucas são as que possuem tecnologias produtivas e reprodutivas totalmente desenvolvidas e consolidadas (EMBRAPA, 2013). Uma alternativa é a utilização de uma espécie modelo como o zebrafish (*Danio rerio*) para o desenvolvimento das pesquisas científicas em laboratório, com o intuito de estender os resultados obtidos para as outras espécies posteriormente.

3. As biotecnologias reprodutivas como fonte de avanços produtivos

Segundo definição do dicionário Aurélio (Ferreira, 1999), o termo biotecnologia é definido como “O conjunto de processos e técnicas que visam utilizar os conhecimentos da área da biologia em diversas áreas científicas e tecnológicas, notadamente para aumentar e melhorar a produção no desenvolvimento agrícola e na indústria da alimentação”. Desta forma, em um cenário em que a piscicultura ganha importância, e a otimização dos resultados passa a ser um fator primordial, a utilização de biotecnologias nesta atividade é cada vez mais comum. Santos e Silva (1998) citam que as aplicações biotecnológicas produtivas e reprodutivas na piscicultura há algum tempo atrás aparentavam ser ficção científica, mas que a partir do fim dos anos 1990 já estavam incorporadas ao dia a dia dos piscicultores e proporcionaram grandes avanços. Em adição, os autores citam que a popularização destas técnicas já vem acontecendo nas últimas duas décadas, e indica que, em alguns anos podem superar as técnicas convencionais de produção, pelo menos para as espécies comercialmente mais importantes.

Especificamente quanto ao desenvolvimento de técnicas reprodutivas para peixes, pesquisadores do mundo todo vêm focando seus esforços no sentido do desenvolvimento de conhecimento específico para a reprodução em ambientes de cultivo de cada espécie com importância comercial. No Brasil, estes esforços se voltam aos

peixes nativos, aos quais, ainda possuem pouco ou nenhum conhecimento consolidado sobre seu comportamento reprodutivo (Reis et al., 2016). Estes estudos são fundamentais, já que um dos pilares para o cultivo de qualquer espécie é a garantia constante da oferta de alevinos, obtida através do completo domínio da reprodução em ambientes de cultivo.

Os principais avanços recentes no desenvolvimento de biotecnologias reprodutivas para peixes, focados no aumento dos índices produtivos bem como a melhoria do manejo, incluem aplicações de técnicas de criopreservação aos gametas (sêmen e oócitos) e embriões (Falconer, 1987; Lahnsteiner et al. 2008 e Digmayer, 2013) bem como a propagação de populações monosexo (Bye e Lincoln, 1986; Donaldson, 1996).

PARTE II - A CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES DE PEIXES

1. Criopreservação de embriões de peixes: vantagens e dificuldades

As técnicas de criopreservação possuem como principal objetivo a manutenção e a retomada do desenvolvimento celular normal de tecidos biológicos após o armazenamento, por um longo período de tempo, em baixas temperaturas, utilizando na maioria das vezes o nitrogênio líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Mattos e Costa, 2011).

Na piscicultura, o primeiro estudo realizado neste sentido, foi a criopreservação de espermatozoides feito por Blaxter na década de 1950 (Blaxter, 1953), prática amplamente difundida desde então. Por outro lado, embora muitos pesquisadores ao redor do mundo tenham focado seus estudos no desenvolvimento de um protocolo eficaz para a criopreservação dos gametas femininos e embriões de peixes, isto ainda não é possível, obtendo-se avanços metodológicos, mas ainda 100% de mortalidade pós-descongelamento (Fornari et al., 2012). Diwan et al (2010) citam, que os estudos acerca deste tipo de criopreservação ainda são modestos em comparação aos desenvolvidos para espermatozoides, uma vez que o sêmen de mais de 200 espécies de peixes já é congelado ou resfriado com relativo sucesso.

A criopreservação de embriões de peixes causaria uma verdadeira revolução na piscicultura e o incremento dos índices produtivos em ambientes de cultivo em curto período de tempo, já que entre outros, (a) contribuiria para a conservação da diversidade genética de espécies ameaçadas de extinção, além de linhagens de interesse para programas de melhoramento genético, (b) facilitaria o intercâmbio de material genético entre estoques comerciais ou conservacionistas, (c) promoveria a criação de bancos

genéticos, (d) possibilitaria a produção contínua de alevinos de espécies com hábitos reprodutivos sazonais (Digmayer, 2013).

Mattos e Costa (2011) relatam que cada tipo de tecido biológico submetido à criopreservação possui sua peculiaridade e exige diferentes métodos para o sucesso após o descongelamento. Um exemplo são os tecidos ósseos/cartilagosos e cardíaco, o primeiro não precisa de suas células vivas após o processo, bastando a preservação das proteínas e do colágeno, diferentemente do segundo, que é altamente vascularizado e precisa essencialmente de suas células intactas. Da mesma forma, os oócitos e embriões de peixes possuem características especiais que dificultam sua criopreservação, sendo necessário o entendimento dos complexos processos físicos, químicos e biológicos que os envolvem (Mattos e Costa, 2011).

As dificuldades na criopreservação deste tipo de material se baseiam nos seguintes aspectos: (a) grande tamanho do embrião e conseqüente baixa relação superfície de absorção/volume; (b) existência de várias membranas semipermeáveis; (c) complexa compartimentalização existente entre o blastoderme e o vitelo (diferentes propriedades e permeabilidade) que dificultam o fluxo dos crioprotetores e da água durante os processos de congelamento e descongelamento; (d) presença de saco vitelínico volumoso e rico em gordura, que possui um ambiente osmótico particular ao restante do tecido; (e) sensibilidade acentuada ao frio, principalmente nos estágios iniciais de desenvolvimento, fazendo com que as membranas se rompam facilmente; (f) grande suscetibilidade à cristalização e formação de gelo intracelular que também promove a ruptura e a desestabilização das membranas celulares; (g) rápida diferenciação afetada pela ação dos crioprotetores; (h) vias metabólicas incompletas e impede a reação aos efeitos tóxicos e ao choque osmótico promovido pela ação dos agentes crioprotetores, (i) redução no estoque intracelular de ATP; (j) e danos irreversíveis às mitocôndrias e aos demais componentes do sistema energético vital das células (Zhang e Rawson, 1995; Lahnsteiner, 2008; Wang et al., 2008; Herraéz, 2009; Fornari et al., 2012).

Segundo Isayeva et al. (2004) as principais barreiras a serem ultrapassadas para o estabelecimento de um protocolo adequado para a criopreservação de oócitos e embriões de peixes consiste na descoberta da técnica apropriada de criopreservação, escolha dos crioprotetores e concentrações ideais e a utilização do estágio de desenvolvimento embrionário mais adequado.

2. *Técnicas de criopreservação*

O processo de criopreservação pode ser realizado pelo resfriamento, congelamento lento e vitrificação, sendo a principal diferença entre eles a velocidade de redução de temperatura e a temperatura final em que os embriões serão mantidos. Segundo Mattos e Costa (2011), o método de criopreservação deve ser escolhido de acordo com as características do tecido alvo e o tempo em que a amostra deverá ser armazenada. Os mesmos autores afirmam que, independentemente do método utilizado, cinco etapas do processo são comuns: (1) Exposição a solução crioprotetora, com a finalidade de permitir a difusão dos agentes crioprotetores nos compartimentos celulares; (2) resfriamento com a redução da temperatura de forma gradual ou súbita, na qual a amostra passa da temperatura ambiente para a temperatura criogênica; (3) armazenamento ou estocagem, permitindo a preservação do material em temperatura muito baixas por períodos indefinidos; (4) descongelação ou aquecimento, etapa pela qual ocorre o resgate do material criopreservado e retomada do metabolismo celular; (5) diluição ou remoção do agente crioprotetor, a fim de evitar, na presença de temperatura fisiológica ou ambiente, a produção de metabólitos secundários, que intensificaria a ação tóxica destes aditivos.

2.1 *Resfriamento*

Devido aos resultados insatisfatórios obtidos até então pela criopreservação em nitrogênio líquido, diversos autores citam que as técnicas de resfriamento podem ser utilizadas como alternativa, já que consistem em métodos menos intensos e tóxicos (temperatura, tempo de exposição e concentração de crioprotetores) (Streit Jr. et al., 2007; Fornari et al., 2011). Segundo Ahammad, et al. (2003), essa técnica consiste basicamente na tentativa de manter o embrião estocado em temperaturas baixas (até -8°C , temperatura de freezer comum) pelo maior período de tempo possível.

Por mais que o resfriamento de embriões não possibilite a conservação por longos períodos, como se estivesse mantido em nitrogênio líquido, suas vantagens podem ser inúmeras, por exemplo, embriões de espécies ameaçadas de extinção no interior da floresta amazônica poderiam ser coletados, armazenados em refrigeradores comuns e levados até o laboratório para incubação (Ahammad et al., 2003).

Os primeiros protocolos de resfriamento de embriões de peixes migradores foram descritos para *Labeo rohita*, *Catla catla* e *Cirrhinus mrigalha* (Ahammad et al., 1998) e *Cyprinus carpio* (Ahammad et al., 2002). Já para peixes nativos sul-americanos Streit Jr.

et al. (2007), Fornari (2012), e Fornari (2014) apresentaram bons resultados utilizando diferentes protocolos de resfriamento para embriões de *Piaractus mesopotamicus*.

Streit jr (2007) constatou que soluções crioprotetoras à base de etilenoglicol e geleia real foram inapropriadas para embriões de *P. mesopotamicus*, mas que por outro lado a combinação de metanol (9%) e sacarose (17%) possibilitou eclosão de 69,2% dos embriões resfriados a -8°C por seis horas. Fornari et al. (2012), ao testarem esta mesma solução crioprotetora, resfriaram embriões da mesma espécie a - 8°C por 24 horas, obtendo valores aproximados (acima de 60% de sobrevivência), os autores citam ainda, que os tipos e concentrações dos crioprotetores utilizados foram fundamentais para o sucesso da técnica.

Para *Brycon orbignyanus*, Fornari et al. (2014) observaram que soluções contendo glicose e DMSO para o resfriamento foram ineficientes (27% e 0% de taxas de eclosão, respectivamente), e recomendaram o uso de soluções à base de metanol e sacarose para embriões desta espécie.

2.2 Congelamento lento

A técnica de congelamento lento para a conservação de materiais biológicos foi amplamente utilizada por mais de três décadas, tanto para serviços de reprodução assistida humana, quanto animal. Em animais, o pioneiro em seu uso foi Polge que em 1949 publicou na revista Nature um estudo envolvendo técnicas de congelamento para sêmen de galo. Na década de 1970, surgiram os primeiros estudos que utilizariam estes princípios para a criopreservação de embriões de camundongos (Whittingham et al., 1972) e bovinos (Willadsen et al. 1976).

Este procedimento tem como princípio básico a utilização de baixas concentrações de agentes crioprotetores e a redução lenta e gradual da temperatura até -120°C para posterior armazenamento em nitrogênio líquido (-196°C), características importantes pois minimizam o estresse térmico na fase de transição das soluções do estado líquido para o sólido (Manzur, 1984).

Contudo, durante o congelamento lento é comum a formação de cristais de gelo extracelulares que não permitem a desidratação completa das células e favorecem a formação de gelo intracelular, fato que pode causar a lise da membrana, danos ao citoesqueleto e o aumento excessivo e tóxico da concentração de crioprotetores no meio intracelular (Son e Tan, 2009). Além disto, segundo os mesmos autores esta técnica está sujeita a um processo de resfriamento intracelular intenso conhecido como supercooling,

que altera o equilíbrio eletrolítico entre o interior e o exterior das células e também afeta negativamente a desidratação do material. Para prevenir este acontecimento realiza-se o “seeding”, em que cristais de gelo são introduzidos de forma controlada no interior do material a ser criopreservado, geralmente na temperatura de -7°C , a fim de se manter e reestabelecer a taxa de desidratação possibilitando o resfriamento sem danos maiores (Manzur, 1984).

Com relação as taxas de redução de temperatura para o congelamento lento, Hagedorn et al. (1997) sugerem curvas que variam entre 0,5 a $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$, devendo-se considerar os tipos de células, principalmente quanto a sua quantidade de água intracelular, tamanho e permeabilidade de membrana. Mazur (1984) e Zhang et al. (2008) constataam que o resfriamento deve ser suficientemente lento para que saída da água ocorra por osmose, mantendo-se o equilíbrio osmótico entre os meios extra e intracelulares, e que caso seja rápido demais, o potencial químico da água e da solução extracelular diminui mais rápido que a água intracelular, resultando da desidratação incompleta do material, que eventualmente forma gelo intracelular e provoca a apoptose celular.

Segundo Caetano et al. (2011), o congelamento lento deve ser realizado em cinco etapas, são elas: (a) Inclusão da solução crioprotetora no material alvo e acondicionamento em palhetes; (b) definição da curva de resfriamento ideal, planejando-se o momento mais adequado para a realização do “seeding”; (c) estabelecimento da temperatura final da curva de resfriamento antes da transferência para o nitrogênio líquido; (d) armazenamento por tempo indeterminado em nitrogênio líquido e; (e) descongelação.

Em peixes, estudos realizados por Zhang et al. (2003) com embriões de zebrafish (*Danio rerio*) não obtiveram resultados positivos a partir do resfriamento com diferentes taxas de redução de temperatura, lenta ($1^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$), intermediária ($30^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$) e rápida ($300^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$). Lopes et al. (2012), sugeriram que no processo de resfriamento de embriões de *P. mesopotamicus* seja aplicada a curva de resfriamento com queda gradual de temperatura de $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até -8°C (seeding). Fornari et al. (2012), ao submeter embriões de *Colossoma macropomum* a diferentes taxas de redução de temperatura (0,25, 0,5, 0,75, 1,0 e $1,25^{\circ}\text{C}/\text{min}$) observaram que nenhum dos tratamentos evitaram a formação de cristais de gelo, causando a deformação embrionária e a inviabilização dos embriões.

Atualmente, a técnica do congelamento lento deu lugar a outras técnicas de criopreservação mais simples, baratas e com melhores resultados, principalmente o congelamento rápido, devido a necessidade de máquina programável cuja execução é demorada e ao grande valor investido frente aos resultados poucos satisfatórios e inconsistentes, (Mattos e Costa, 2011).

2.3 Congelamento rápido ou vitrificação

A vitrificação é um procedimento de congelação de materiais biológicos de maneira rápida, caracterizada pela utilização de soluções crioprotetoras com alto grau de viscosidade e grande velocidade de desidratação, que promove a solidificação em estado vítreo instantânea a partir de soluções líquidas (Al-Hasani e Zhoni, 2008). Esta técnica é amplamente utilizada para a criopreservação de embriões humanos e outros mamíferos, além de ser considerada a mais adequada para o futuro da criopreservação de embriões para diversas outras espécies, como peixes e invertebrados aquáticos (Zhang & Rawson, 1995). As principais vantagens deste método se baseiam principalmente na não passagem por curvas de resfriamento ou congelação, reduzindo significativamente a formação de cristais de gelo, minimizando os danos estruturais nas células e seus efeitos deletérios de sensibilidade ao frio (Zhang e Rawson, 1995; Hagedorn et al., 1997; Wusteman et al., 2002). Além disto, conta com grande praticidade, podendo acelerar significativamente o processo de criopreservação, sem a necessidade de um congelador programável de alto custo, e torna esta técnica menos onerosa, mais rápida e prática que os congelamentos convencionais (Keivanloo e Sudagar, 2013; Niemann, 1991).

Contudo, a vitrificação só é alcançada pela utilização de soluções com altas concentrações de agentes crioprotetores, exigindo estudos aprofundados quanto à suas taxas de toxicidez aos embriões (Zhang, 2004; Herraéz, 2009). Rana (1995) cita que as concentrações de crioprotetores não tóxicas aos embriões de peixes situam-se entre 7 e 15%, mas para Bart (2000), estas quantidades não são suficientes para a realização de uma vitrificação adequada. O autor sugere a utilização de soluções com 15 a 30% de crioprotetores para esta técnica, recomendando-se a inclusão de maneira gradual e rápida, por exemplo, primeiramente, os embriões seriam expostos a uma solução com baixa concentração de crioprotetores (5 a 10%) para em seguida serem colocados, rapidamente, em outra com alta concentração (15 a 30%).

Alguns estudos que tentaram a aplicação da vitrificação em embriões de peixes já foram realizados. Chen e Tian (2005), reportaram a sobrevivência de alguns embriões de

linguado (*Paralichthys olivaceus*) após a vitrificação em nitrogênio líquido, sendo, no entanto, esses resultados contestados por sua irreplicabilidade. Robles et al. (2003) observaram em embriões de turbot (*Psetta máxima*) vitrificados, que após a descongelação, 49% deles estavam normais, mas com o passar do tempo as morfoanomalias aumentaram e inviabilizaram sua sobrevivência.

Em adição, Keivanloo e Sudagar (2013), citam que o desenvolvimento de um protocolo eficaz para a vitrificação de embriões de peixe se baseia na descoberta dos crioprotetores ideais e suas concentrações, principalmente quanto a suas propriedades vitrificantes (sozinhos ou combinados em soluções), toxicidez e tempo de exposição. Desta forma, assim como para o resfriamento e o congelamento lento, os crioprotetores assumem grande importância para o sucesso da criopreservação de embriões de peixes.

3. Agentes crioprotetores

Independentemente da técnica de criopreservação escolhida, a utilização da solução crioprotetora é imprescindível. Geralmente, esta solução contém uma combinação de agentes crioprotetores internos e externos, que possuem funções distintas de proteção dos embriões durante o congelamento.

3.1 Crioprotetores intracelulares

Os crioprotetores intracelulares são solventes orgânicos de baixo peso molecular que atuam na substituição parcial da água no interior da célula, aumentando a viscosidade da solução de congelamento, e conseqüentemente, reduzindo seu ponto de congelamento. Reichenbach et al. (2008) listaram os principais crioprotetores intracelulares que já foram utilizados para a criopreservação de embriões, são eles: Metanol, dimetilsulfóxido (DMSO), etilenoglicol, propilenoglicol, glicerol, butanodiol e etanol, todos eles considerados moderadamente tóxicos por Harvey (1983).

Em peixes, até os anos 1990, a maioria dos estudos apontavam o DMSO como o melhor crioprotetor intracelular pré-congelamento (Adam et al., 1995), contudo, atualmente o metanol e o propilenoglicol também vêm se destacando, principalmente por sua natureza menos tóxica (Fornari et al., 2012). Quanto à concentração, Zhang et al. (1993), em testes de toxicidade (sem congelamento), observaram que soluções com dois molares dos crioprotetores metanol e DMSO possibilitou o desenvolvimento normal de embriões de peixes, enquanto esta mesma dose de etanodiol levou a 100% de mortalidade após o tratamento. Esses dados revelam que, embora os agentes crioprotetores sejam essenciais

ao processo, seus mecanismos de ação, bem como a toxicidade e sua metabolização são bem variáveis e ainda não completamente entendidos, fato que dificulta na tomada de decisões, principalmente em testes de criopreservação de embriões ainda não estabelecidos como os de peixes (Castro et al 2011).

3.2 Crioprotetores extracelulares

Ao contrário dos crioprotetores intracelulares, os extracelulares são macromoléculas com alto peso molecular e, portanto, não permeiam as células (Niemann, 1991). Segundo Palaz e Mapletoft (1996), estes agentes têm a função de: (a) auxiliar a desidratação intracelular, atuando na pressão osmótica (entrada e saída do crioprotetor intracelular), (b) evitar danos às proteínas de membranas, pela redução da formação e alteração do formato (tamanhos e formato inócuos que não danificam a estrutura celular) dos cristais de gelo e, (c) diminuir a toxicidade dos crioprotetores ao embrião pela redução da quantidade de crioprotetores intracelulares. Para Denniston et al. (2000), o desempenho dos agentes crioprotetores intracelulares é otimizado pela associação aos crioprotetores extracelulares.

Os crioprotetores externos mais utilizados são: sacarose, glicose, lactose, polivinilpirrolidona (PVP), rafinose, manitol, sendo a sacarose a mais testada em embriões de peixes (Denniston et al., 2000; Zhang et al., 1993). Segundo Rall (1987), a sacarose tem o efeito adicional de proteção celular, pois além de proteger o meio extracelular, contribui para a desidratação dos embriões pela redução da quantidade de água no citoplasma, evitando assim a formação de gelo intracelular. Entretanto, também se deve dar atenção a sua concentração, uma vez que, Martinez et al. (2002) ao estudarem a criopreservação de embriões bovinos, demonstraram que altas concentrações de sacarose (0,5 Molar) podem resultar em baixas taxas de viabilidade.

4. Toxicidade dos agentes crioprotetores

É importante a compreensão de que os embriões de peixes, em geral, são muito mais sensíveis às substâncias crioprotetoras utilizadas tradicionalmente do que os embriões de outras espécies, como de mamíferos, e que sua toxicidade aumenta com o tempo de exposição, temperatura, concentração e estágio de desenvolvimento (Zhang et al., 1993).

Muitos trabalhos têm sido desenvolvidos para relatar a toxicidade destes agentes em embriões de peixes, sendo observadas grandes variações em seu grau de toxicidade

em relação a cada crioprotetor testado (Zhang et al., 1993; Hagedorn et al., 1997; Chen e tian, 2005). Para os crioprotetores mais utilizados (DMSO, metanol, glicerol, propanodiol, etilenoglicol e propilenoglicol) concentrações baixas, entre um e dois molares, foram recomendadas para espécies com embriões pequenos (Zhang, 2001). Em estudos realizados com embriões maiores (Esturjão persa, *Acipenser persicus*) vitrificados e estágio de 48 horas após a fertilização, Keivanloo e Sudagar (2013) observaram melhores resultados para solução crioprotetora com concentrações máximas de cinco a seis molares de DMSO e Propilenoglicol, respectivamente.

Kusuda et al. (2002) observaram que altas concentrações de crioprotetores, em virtude da desidratação e aumento das concentrações extracelulares durante a exposição, são tóxicas e podem causar danos irreversíveis às células, pela grande susceptibilidade à degeneração das proteínas presentes na membrana nuclear. Além disto, Chao e Liao (2001) afirmam que a velocidade de entrada e saída dos crioprotetores nas células é outro fator que pode ser prejudicial, já que mudanças brutas do volume das células podem promover severos danos estruturais.

5. *Osmolaridade e permeabilidade dos agentes crioprotetores*

A adequada ação do crioprotetor está relacionada ao processo de desidratação (pré-congelamento) e reidratação (descongelamento) dos embriões. Durante a desidratação, o embrião se retrai no momento em que é exposto à solução crioprotetora (Figura 1), devido a perda de água causada pela hiperosmolaridade do meio extracelular, já que sua membrana é mais permeável à saída de água do que a entrada do crioprotetor (Schneider & Mazur, 1984). Segundo os mesmos autores, o índice de entrada do crioprotetor depende de seu coeficiente de permeabilidade e da temperatura da solução. O equilíbrio é atingido quando o embrião retorna ao seu volume inicial já com o crioprotetor no interior de suas células. Segundo Kasai et al. (1996), agentes com rápida capacidade de penetração são mais favoráveis, pois o tempo de exposição antes do resfriamento é menor, prevenindo assim as lesões osmóticas. Uma saída para este problema é a adição de altas concentrações de crioprotetores extracelulares, como os açúcares sacarose e trehalose, já que estes componentes tem a capacidade de reduzirem a velocidade de entrada ou saída da água das células, evitando assim um choque osmótico que levaria a apoptose (Godoy, 2012).

Mesmo com altas taxas osmóticas e baixos pesos moleculares, os crioprotetores internos podem não adentrar os embriões de maneira eficiente, protegendo apenas partes específicas, fato que inviabiliza sua sobrevivência após o descongelamento, isto se deve à natureza multicompartimentalizada deste tecido, em que cada membrana possui diferentes estruturas e propriedades osmóticas. Harvey et al. (1983) por exemplo, ao examinaram a permeabilidade do glicerol e do DMSO em embriões zebrafish (*D. rerio*), descobriram que a remoção do córion melhorou significativamente a entrada dos crioprotetores, mas ainda assim, estes agentes foram capazes de proteger apenas a camada blastodérmica. Suzuki et al. (1995) em trabalho realizado com embriões de peixe (carpa, medaka e truta arco-íris), observaram que o DMSO adentrou o espaço perivitelínico apenas em algumas amostras, e que mesmo assim a quantidade foi insuficiente para a criopreservação. Zhang & Rawson (1995) verificaram que somente o metanol apresentou permeação significativa em embriões de *D. rerio*. Hagedorn et al. (1997) ao examinaram a multicompartimentalização da mesma espécie identificaram que a camada sincicial vitelínica compõe uma importante barreira para a entrada dos crioprotetores, e que sem a devida proteção, cristais de gelo se formam no seu interior causando danos ao embrião.

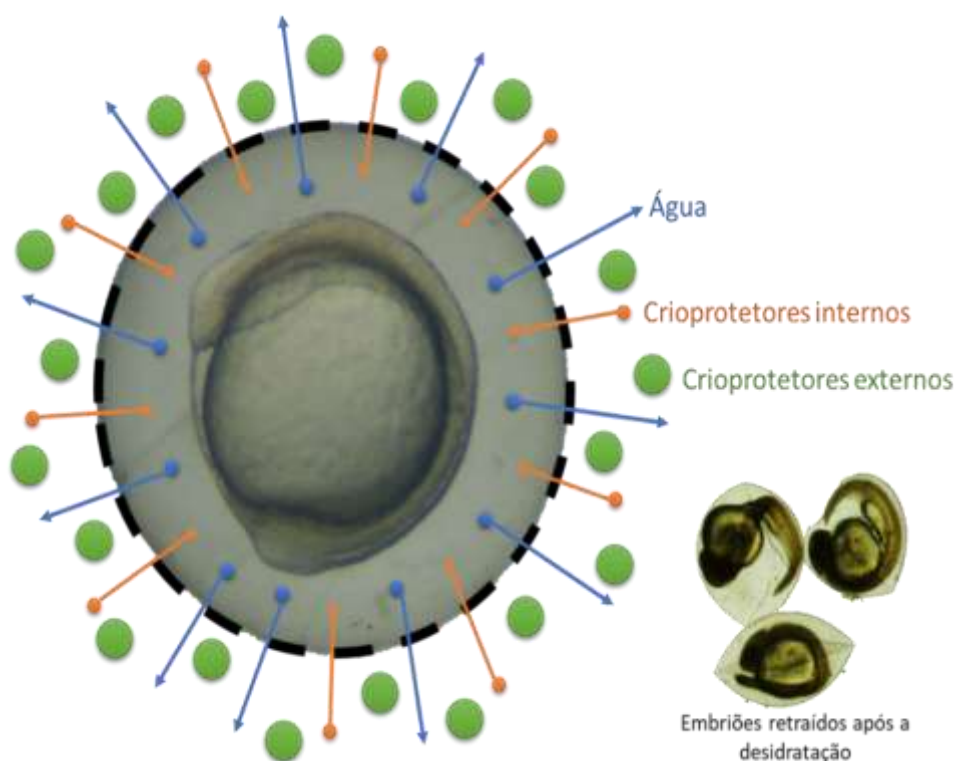


Figura 1. Processo de desidratação dos embriões pré-congelamento e embriões retráidos após a desidratação. Fonte: autor.

6. Estágios de desenvolvimento embrionário e a criopreservação

O desenvolvimento embrionário dos peixes se inicia na fertilização do oócito e vai até a eclosão das larvas. Estes embriões possuem diferenças com relação aos embriões mamíferos. Após a fertilização por exemplo, em contato com a água, o ovo se hidrata, ocorrendo a formação de um grande espaço perivitelínico, com a separação do córion da membrana vitelínica. Além disto, possuem grande conteúdo de vitelo, do qual o embrião irá se nutrir durante a embriogênese e em seu período larval inicial (Nakatani et al., 2001; Kimmel et al., 1995). Um exemplo da organização de embrião de peixe (Zebrafish, *D. rerio*) em estágio de desenvolvimento de três somitos (12h de desenvolvimento) e 22-24 somitos (24 horas de desenvolvimento) é apresentado na Figura 2.

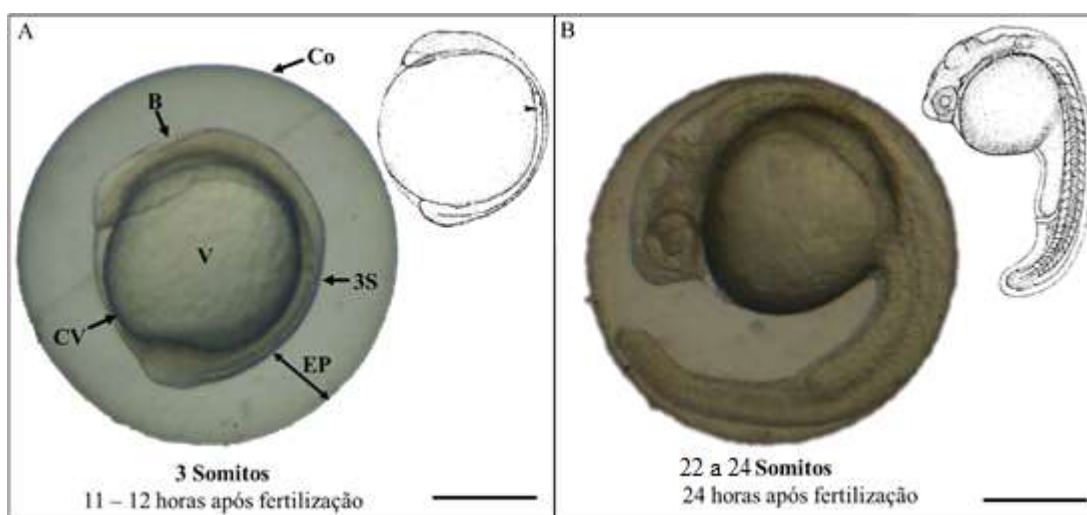


Figura 2. Organização de embrião de peixe (Zebrafish, *D. rerio*). A) Estágio de desenvolvimento de três somitos. Co: Córion; 3S: Somitos; EP: Espaço perivitelínico; B: Blastoderme; CV: Camada vitelínica; V: Vitelo. B) Estágio de desenvolvimento de 24 somitos. Fonte: próprio autor.

De acordo com Nakatani et al. (2001) este processo pode ser dividido nas seguintes fases: ovo recém-fertilizado, segmentação, blastulação, gastrulação, fechamento do blastóporo, formação da vesícula óptica, formação da vesícula auditiva, liberação da cauda e eclosão. Contudo não é bem estabelecido na literatura, em qual destas fases o embrião possui maior resistência à criopreservação. Para Zhang e Rawson (1995), a definição da fase de desenvolvimento em que os embriões permanecem íntegros após a exposição é determinante para o sucesso da criopreservação. De fato, ao se revisar a literatura, observa-se que o estágio embrionário de diferentes espécies de peixes possui particularidades quanto a permeabilidade de suas membranas e à sensibilidade ao frio.

Zhang e Rawson (1995) observaram que para embriões de *Danio rerio*, a sensibilidade ao frio é mais elevada nos estágios iniciais de desenvolvimento, pela elevada quantidade de lipídios, dificultando a ação das substâncias crioprotetoras. Bart (2000) afirma que as fases mais desenvolvidas dos embriões de peixes suportam melhor a toxicidade dos crioprotetores, no mesmo sentido, Neves (2008) afirma que embriões em estágio de desenvolvimento mais avançado, como o de pós-gastrulação são mais resistentes as lesões causadas pelo frio.

7. Crio-lesões

A criopreservação pode causar danos às células por inúmeros fatores, sendo os principais destacados por Herráez (2009): velocidade da curva de resfriamento “cold shock”, estresse osmótico causado pelas variações de concentrações do meio externo, toxicidade dos crioprotetores e ponto de solidificação (momento em que se torna vítreo). O efeito do resfriamento depende da sensibilidade de cada tipo de célula ao choque frio, por exemplo, sêmen e embriões de mamíferos se mantêm em temperatura entre 30 e 40°C e quando submetidos a temperaturas menores que 4°C, podem sofrer alterações na fluidez de suas membranas (Adam, et al., 1995; Lahnsteiner, 2008; Herráez, 2009). No caso dos peixes de água fria, em temperaturas de 2 a 4°C os embriões não sofrem alterações, porém, o decréscimo a -15 ou -20°C pode ser crucial para a sua viabilidade (Ahammad et al., 2002; Zhang et al., 2005).

A estrutura mais prejudicada com a redução de temperatura é a membrana plasmática, que pode perder a disposição de seus lipídios formadores da bicamada. Quando tais lipídios alcançam seu momento de transição, a membrana pode desorganizar-se e depois se tornam um pacote formando por pequenas micelas, desta forma, a formação típica do mosaico fluído é perdida, afetando sua permeabilidade e outras funções celulares (Adam et al., 1995). A desorganização lipídica também afeta as proteínas existentes na membrana, entre elas as que formam canais permeáveis e outras regiões com funções específicas (Harvey, 1983), além de promover a perda de material intracelular (Mazur, 1984; Li et al., 2008).

Relacionando lesões ao processo de criopreservação, Ninhaus-Silveira et al. (2008) verificaram alterações ultraestruturais, após a congelação e descongelação de embriões de *Prochilodus lineatus*. Ainda, Fornari et al. (2010) destacaram como principais danos da criopreservação observados em embriões de *P. mesopotamicus* o extravasamento de vitelo, ausência de córion e a presença de blastoderme danificada.

8. *Descongelamento*

O descongelamento dos embriões após a criopreservação é um dos pontos críticos para a obtenção de bons resultados de sobrevivência, este processo compreende a adequada retirada do crioprotetor com conseqüente reidratação do material, e o aumento gradual da temperatura após a retirada do nitrogênio líquido.

Da mesma forma que no início do processo, durante o descongelamento é recomendado a retirada gradual dos crioprotetores do interior do embrião, evitando-se a entrada muito rápida de água nas células, e a redução drástica na osmolaridade que levaria a lise celular (Godoy, 2012). Além da diluição, recomenda-se a utilização de crioprotetores extracelulares, como a sacarose e trehalose no meio de descongelamento (Neves, 2008). A sacarose atua como um tampão osmótico, mantendo constante a concentração do meio extracelular, regulando a velocidade de entrada e saída do crioprotetor no embrião, evitando assim o choque osmótico (Leibo, 1984). Quando o crioprotetor tiver saído completamente do interior da célula, após conclusão do procedimento, este material biológico deve ser mantido no meio de cultura para se reestabelecer.

Com relação à taxa de descongelamento, o processo deve acontecer em velocidade média de 10°C/min, a fim de se evitar a recristalização do gelo, maior causa de crio-lesões (Neves, 2008). Em resumo, durante o descongelamento, a retirada do crioprotetor se dá pela passagem por diluições menos concentradas de crioprotetor e na presença de sacarose.

PARTE III - O CULTIVO MONOSEXO DE PEIXES

1. *O cultivo monosexo e suas vantagens*

Os mecanismos que envolvem a definição do sexo em peixes começaram a ser estudados no final da década de 1930 e início dos anos 1940, avaliando-se a importância dos hormônios esteroides neste processo (Yamamoto, 1958). A partir daí, técnicas de cultivo monosexo na piscicultura passaram a ser desenvolvidas, e hoje em dia representam uma das ferramentas de maior importância no incremento produtivo para esta atividade, uma vez que potencializa os benefícios associados as características fenotípicas relacionadas ao sexo em várias espécies, além de resolver problemas associados ao manejo das unidades de cultivo (Reis et al., 2016).

Exemplos das vantagens obtidas pelo cultivo monosexo são citados por diversos autores (Arai, 2001; Beardmore et al. 2001; Cnaani e Levavi-Sivan, 2009; Budd et al., 2015), sendo as principais apresentadas a seguir: (a) Redução dos gastos energéticos com a atividade reprodutiva; (b) inexistência de reprodução dentro das unidades de cultivo, o que reduz a competitividade por território, alimento e oxigênio, além de facilitar o manejo na despesca; (c) uniformidade de tamanho dos lotes à despesca; (d) redução dos efeitos da maturação sexual na aparência fisiológica e na qualidade da carne; (e) diminuição dos riscos de impacto ambiental decorrentes do escape de peixes para os sistemas naturais; (f) coleta de ovas de todos animais estocados em pisciculturas voltadas à produção de caviar; (g) produção em maior quantidade de indivíduos possuidores de cores, tamanhos e formatos apreciados em peixes ornamentais; h) não limitar a capacidade suporte antes dos peixes atingirem o peso adequado.

Atualmente, diferentes formas para a produção de lotes monosexo de peixes podem ser utilizadas: manipulação cromossômica, como a ginogênese e a triploidia, esterilização, hibridização, inversão sexual pelo efeito da temperatura e pelo uso de esteroides sexuais, sendo a última a mais utilizada e difundida comercialmente (Bombardelli et al., 2004; Kowalski et al. 2011).

2. *Inversão sexual*

O primeiro estudo relacionado a inversão sexual de peixes, testou esta técnica no peixe medaka (*Oryzias latipes*) na década de 1950 (Yamamoto, 1958), sendo replicado para espécies comerciais (salmonídeos) apenas na década de 1980, em que lotes exclusivos de fêmeas foram produzidos (Donaldson e Hunter, 1982). Desde então, segundo Piferrer (2001), mais de 60 espécies de teleósteos distribuídas em 16 famílias já foram invertidas sexualmente com sucesso a partir do uso de hormônios. Na tabela 1, são apresentadas as principais espécies comerciais que já possuem populações monosexo produzidas por inversão sexual, além do gênero preferido e suas vantagens (Adaptado de Piferrer, 2001).

Para espécies como a tilápia (*Oreochromis niloticus*), o cultivo comercial de lotes monosexo de machos é extremamente necessário, uma vez que esses indivíduos possuem maior crescimento, ganho de peso e conversão alimentar (Bombardelli et al., 2007). Em bagres-do-canal (*Ictalurus punctatus*), a produção de lote monosexo masculino também está relacionada ao maior crescimento desses indivíduos em relação às fêmeas, que podem ser de 10 a 30% superior (Cesar et al., 2005). Por outro lado, fêmeas de

salmonídeos são maiores e mais produtivas (Kowalski et al., 2011). Outras características fenotípicas associadas ao sexo também justificam a produção de lotes monosexo para a carpa comum (*Cyprinus carpio*), e a produção de fêmeas visa a obtenção de ovas para consumo e para peixes ornamentais, como o “guppy” (*Poecilia reticulata*), na produção de machos pela presença de nadadeiras com visual mais atrativo e/ou de coloração mais intensa (Batista et al., 2013; Reis et al., 2016).

Para a realidade brasileira, apesar da produção de lotes monosexo ser praticada há muitos anos nos países em que a piscicultura já é uma indústria consolidada, nossas espécies nativas ainda não foram estudadas a fundo para justificar o uso de lotes monosexo para fins comerciais, isso se deve em grande parte, a falta da correta avaliação das diferenças sexuais fenotípicas com potencial econômico (Reis et al., 2016). No entanto, alguns autores já citaram vantagens comerciais na produção de estoques monosexo feminino de tambaqui (*Colossoma macropomum*) e cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum*) (Valentin, 2013; Embrapa, 2015). Ainda, Baldisseroto e Radünz (2005), descreveram que as fêmeas de *R. quelen* podem crescer de 20-30% mais que os machos e, por essa razão, o cultivo monosexo feminino deveria ser estimulado.

Tabela 1. Principais espécies comerciais que já possuem populações monosexo produzidas por inversão sexual, além do sexo preferido e suas vantagens.

Espécie	Nome popular	Gênero	Vantagem
<i>Anguilla anguilla</i>	Enguia europeia	F	Crescimento
<i>Betta splendens</i>	Betta	M	Cor e nadadeira
<i>Cyprinus carpio</i>	Carpa comum	F	Crescimento
<i>Dicentrarchus labrax</i>	Robalo	F	Crescimento
<i>Epinephelus marginatus</i>	Garoupa verdadeira	M	Reprodutores
<i>Gadus mohua</i>	Bacalhau	F	Qualidade de carne
<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	Halibute	F	Crescimento
<i>Ictalurus punctatus</i>	Bagre americano	M	Crescimento
<i>Oncohynchus mykiss</i>	Truta arco-íris	F	Crescimento
<i>Oncohynchus tshawytscha</i>	Salmão rei	F	Crescimento
<i>Oreochromis niloticus</i>	Tilápia do Nilo	M	Crescimento
<i>Paralichthys lethostigma</i>	Linguado	F	Crescimento
<i>Poecilia latipinna</i>	Molinésia	M	Nadadeira dorsal
<i>Poecilia reticulata</i>	Lebiste	M	Cor e nadadeira
<i>Rhamdia quelen</i>	Jundiá	F	Crescimento
<i>Salmo salar</i>	Salmão do Atlântico	F	Qualidade de carne
<i>Scophthalmus maximus</i>	Linguado Europeu	F	Crescimento

Espécies de peixes de importância comercial com produção monosexo e seus nomes populares. Gênero, F: Feminino ou M: Masculino indica o gênero superior comercialmente e sua vantagem. Adaptado de Piferrer, 2001.

A inversão sexual, na maioria das vezes, é realizada pelo uso de hormônios esteroides, podendo ser de maneira direta ou indireta. Nos métodos diretos, os hormônios atuam diretamente sobre os processos fisiológicos que irão determinar o sexo dos alevinos (hormônios masculinizantes ou feminizantes), já nos métodos indiretos os hormônios atuam sobre processos genéticos ou variáveis ambientais que influenciarão indiretamente na determinação do sexo fenotípico dos alevinos (Bombardelli et al., 2007).

2.1 Método direto de inversão sexual

Este método de inversão sexual consiste na aplicação de hormônios durante as fases iniciais do desenvolvimento larval de determinadas espécies, com a finalidade da produção única do sexo fenotípico desejado (Bombardelli et al., 2007). Embora o tratamento hormonal seja mais efetivo no início da fase larval, antes da diferenciação sexual, Bombardelli et al. (2004) citam que o tratamento não necessariamente deve ser iniciado neste período, mas sim no momento de maior sensibilidade particular de cada espécie, ex. *O. niloticus* possuem período ideal de diferenciação entre o 9º e 10º dia e termina entre 30º e 33º dia após a eclosão, já para a *O. mossambicus* este período termina entre o 16º e o 20º dia após a eclosão (Bombardelli, et al 2004, Alvenida-Casauay e Carin 1988; Phelps e Popma, 2000).

Os tratamentos de método direto para o controle fenotípico do sexo podem utilizar vários agentes, sendo os mais comuns os hormônios andrógenos, para a masculinização (ex. 17 α -metiltestosterona) e estrógenos para a feminilização (ex. 17 β -estradiol) (Cnaani e Levavi-Sivan, 2009), ambos ministrados por via oral pela incorporação na ração (Meurer et al., 2008), por banho de imersão (Zanardi et al., 2011), por injeção ou por implantes (Pandian, 2013). Na Figura 3, é apresentado um esquema geral da produção direta de linhagens monosexo adaptado de Almeida-Toledo et al., 1996.



Figura 3. Esquema geral para a obtenção de a produção direta de linhagens monosexo (Adaptado de Almeida-Toledo et al., 1996).

2.2 Método indireto de inversão sexual

Embora o método direto seja muito eficaz na produção de linhagens monosexo, esta prática possui grande problema que é a necessidade do uso de hormônios em larga escala, e pode resultar em problemas ambientais. Uma solução alternativa para isto é a utilização do método de inversão sexual indireta, na qual o processo hormonal é realizado apenas no plantel de reprodutores. Contudo, este método requer um custo maior, já que demora mais de uma geração para a produção de lotes 100% monosexo, além da necessidade de realizar a separação entre as fêmeas masculinizadas ou machos feminilizados dos indivíduos normais através do teste de progênie ou pela observação direta das gônadas (Bye e Lincoln, 1986).

Pelo método indireto de inversão sexual a obtenção de linhagens 100% monosexo é realizada em duas etapas, ex. Linhagem 100% fêmea: Na primeira etapa, deve-se promover a masculinização de fêmeas genótípicas com hormônio andrógênio, originando neomachos (fêmeas genótípicas masculinizadas, mas que apresentam fenótipo masculino), na segunda etapa, fertiliza-se oócitos normais com o sêmen de neomachos. Dessa forma, ao se cruzar fêmeas masculinizadas (genótipo XX) com fêmeas normais (genótipo XX), será produzida, teoricamente, descendência 100% feminina (Isler, 2009).

A produção de lotes monosexo femininos pelo método indireto já é muito utilizada em escala comercial no cultivo de salmonídeos (Bye e Lincoln, 1986; Donaldson, 1996). Na Figura 4, é apresentado um esquema da produção indireta de linhagens monosexo fêmea em salmonídeos.

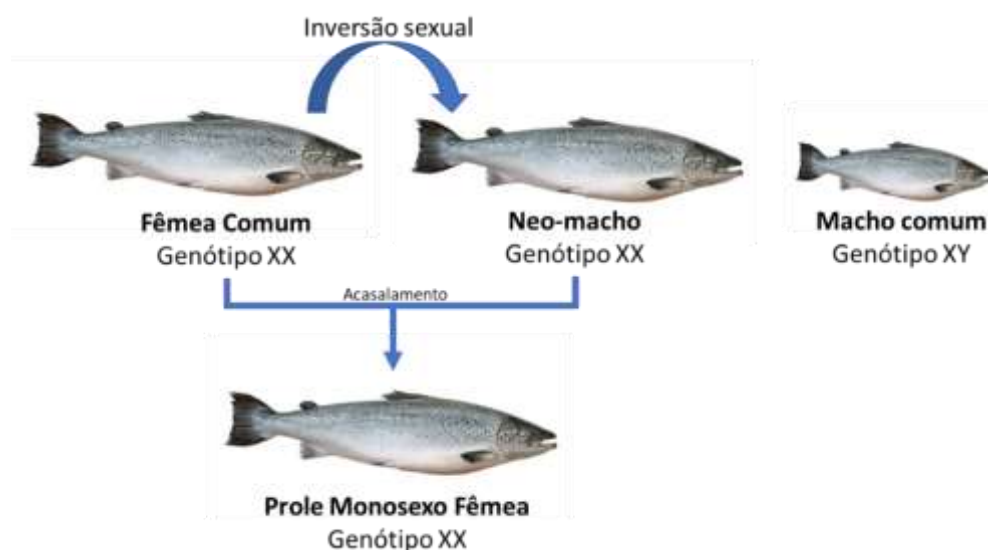


Figura 4. Esquema para a obtenção pela maneira indireta de linhagens monosexo fêmea em salmonídeos.

3. Cultivo monosexo de salmonídeos

Nos salmonídeos, os protocolos para a produção de populações monosexo fêmea começaram a ser desenvolvidas nas décadas de 1970 e 1980 principalmente para salmão do Atlântico (*Salmo salar*), truta Arco-íris (*Oncorhynchus Mykiss*), salmão Coho (*Oncorhynchus kisutch*) e salmão Chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*), sendo o método indireto de inversão sexual por neomachos o mais utilizado (Donaldson, 1996).

Nestas espécies, realiza-se o método de inversão por banhos de imersão, estes banhos são aplicados próximos à eclosão das larvas, e são eficientes para a veiculação dos esteroides, já que seus ovos possuem grande volume de vitelo, que serve como reservatório para o hormônio, que será absorvido durante a fase de diferenciação sexual (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 µ gL⁻¹, foram suficientes para induzir a feminização em truta Arco-íris (Johnstone et al., 1978).

As fêmeas destas espécies são preferidas comercialmente, pois possuem características produtivas extremamente favoráveis quando comparadas aos machos (Elliott e Kube, 2009). Isler (2009) e Davidson et al (2009), ressaltam que a precocidade dos machos, principalmente de salmão do Atlântico (*S. salar*) está diretamente relacionada a perdas econômicas e a redução da aceitação do consumidor ao produto final, pois diminui a intensidade da cor alaranjada da carne, paralisa o crescimento, aumenta os níveis de mortalidade, além de promover alterações corporais indesejadas, como o desenvolvimento do maxilar inferior na forma de gancho e a corcunda na região dorsal que deixam o peixe com aparência pouco agradável.

Contudo, o manejo reprodutivo de neomachos é na grande maioria das vezes dificultado, pois a coleta do sêmen por extrusão (massagem abdominal sentido encéfalo-caudal para a remoção do sêmen) está impossibilitada pela presença de testículos morfológicamente alterados e na maioria das vezes, com ductos espermáticos ausentes, permitindo a coleta dos gametas apenas diretamente do interior das gônadas após o abate e dissecação (Bye e Lincoln, 1986). Este sêmen coletado diretamente dos testículos apresenta redução significativa na taxa de fertilização, provavelmente, em razão da presença de grande quantidade de espermátides. Rodina et al. (2008) registraram baixa velocidade, baixa motilidade e conseqüentemente baixa taxa de fertilização do sêmen de neomachos de *Perca fluviatilis* L coletados por esta técnica.

Kowalski et al. (2011) ao compararem o potencial reprodutivo de neomachos (XX) com machos heterogaméticos (XY) de truta arco-íris (*O. mykiss*) verificaram que

os testículos de neomachos apresentavam células de Sertoli hipertrofiadas que prejudicaram a função secretora, mas que apesar de se diferenciar histologicamente dos testículos de machos normais, os espermatozoides dos neomachos apresentaram maturação completa e taxa de motilidade semelhante ao dos machos genotípicos 73,1% e 73,7%, respectivamente, indicando a viabilidade do sêmen. Da mesma forma, em truta-arco-íris, Robles et al. (2003) citam que os ductos espermáticos de neomachos não se desenvolvem adequadamente, e faz com que o sêmen só seja obtido após a eutanásia do animal e posterior esmagamento dos testículos. Como alternativa para a racionalização da produção de lotes monosexo feminino, o sêmen obtido das fêmeas masculinizadas poderia ser criopreservado, dispensando-se deste modo a prática contínua do tratamento hormonal (Hunter et al., 1983; Kavamoto et al., 1991; Silveira et al., 2000).

PARTE IV - ESPÉCIES ALVO

1. O zebrafish como modelo de pesquisa

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Classe: Actinopterygii

Ordem: Cypriniformes

Família: Cyprinidae

Gênero: *Danio*

Espécie: *Danio rerio*



Figura 5. Zebrafish (*D. rerio*).

O zebrafish (*Danio rerio*) também conhecido como paulistinha ou peixe-zebra é um pequeno teleosteo (3 a 4 cm) de água doce, encontrado naturalmente em todo o sul e sudeste da Ásia, com maior diversidade de espécies no nordeste da Índia, Bangladesh e Myanmar (Barman, 1991).

Atualmente, este pequeno peixe possui grande importância para a ciência, já que nos últimos anos se tornou um dos modelos animais mais importantes em estudos genéticos, neurofisiológicos e biomédicos para vertebrados (Amsterdam & Hopkins, 2006). O pioneiro na sua utilização como modelo de pesquisas científicas foi o biólogo George Streisinger, da Universidade do Oregon, que em 1981 publicou na revista *Nature*

o primeiro artigo relacionado a estudos genéticos (Silveira, 2012). O uso de *D. rerio* como modelo de pesquisas se justifica por diversos fatores:

- Pequeno porte e fácil manutenção em aquários;
- Alta prolificidade, pode produzir de 200-300 ovos a cada 2 a 3 dias;
- Desenvolvimento rápido, em 48 a 72 horas evolui do estado de ovo para larva e se torna adulto aos 3 meses de vida;
- Devido ao seu curto ciclo de vida, cerca de 3 anos, estudos que envolvem diferentes períodos do desenvolvimento podem ser realizados com rapidez;
- Embriões transparentes, possibilitando a fácil visualização do desenvolvimento embrionário;
- Sequenciamento completo do genoma com grande homologia aos mamíferos.

As características de rápido desenvolvimento e embriões transparentes, foram os principais motivos da escolha deste peixe para a realização de ensaios de criopreservação nesta pesquisa.

2. O salmão do Atlântico e seu mercado globalizado

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Classe: Actinopterygii

Ordem: Salmoniformes

Família: Salmonidae

Gênero: *Salmo*

Espécie: *Salmo salar*



Figura 6. Salmão do Atlântico (*S. salar*).

A família dos salmonídeos, composta pelos salmões e trutas, possui grande importância no fornecimento global de carne de pescado, representando a quarta família de peixes mais produzida e cerca de 16% do valor e 7,2% em peso vivo de todo o mercado de peixes no ano de 2016 (FAO, 2016). Segundo a mesma fonte, o comércio desta família de peixes apresentou forte crescimento nas últimas décadas, tornando a maior commodity por valor no ano de 2013 e que este crescimento tende a se manter constante nos próximos anos, particularmente para o salmão do Atlântico (*Salmo salar*) cultivado, isto é resultado da aceitação mundial de sua carne, reconhecida pela qualidade e características particulares

como a coloração alaranjada e o alto conteúdo lipídico, a abertura de novos mercados a partir da produção dos mais variados tipos de produtos processados, além da recente aprovação da produção de populações de salmões geneticamente modificadas pela Food and Drug Administration nos Estados Unidos.

Dentro da família dos salmonídeos, o Salmão do Atlântico (*S. salar*) se destaca, já que é responsável por cerca de 50% do mercado e 90% dos peixes produzidos. Estima-se que em 2016 sua produção tenha ultrapassado um milhão de toneladas, sendo que Noruega e Chile apresentam-se como primeiro e segundo lugar respectivamente na produção desta espécie (FAO, 2016). Embora a produção em ambientes de cultivo esteja crescendo consideravelmente, seus estoques marinhos vêm reduzindo drasticamente, observando queda vertiginosa na disponibilidade, principalmente pelo aumento do esforço pesqueiro em seus habitats naturais (Região norte do oceano Atlântico) (Klemetsen et al., 2003).

A grande importância comercial desta espécie, e a falta de informações disponíveis no uso de biotecnologias reprodutivas como produção de neomachos (genótipo XX) foi determinante para o estudo dos parâmetros qualitativos seminais e estrutura histológica gonadal realizados nesta pesquisa.

Referências bibliográficas

- ADAM, M.; RANA, K. J.; MCANDREW, B. J. The effect of temperature and chorion manipulation on the permeability of rosy bard and zebrafish embryos. **CryoLetters**, v.18, n.2, p.16-65, 1995.
- AHAMMAD, M. M.; BHATTACHARYYA, D.; JANA, B. B. Hatching of common carp (*Cyprinus carpio* L.) embryo stored at 4 and -2°C in different concentration of methanol and sucrose. **Theriogenology**, v.60, n.8, p.1409-1422, 2003.
- AL-HASANI, S.; ZOHNI, K. Future aspects in human cryopreservation. **Journal of Family and Reproductive Health**, v.2, n.1, p.1-11, 2008.
- ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; BIGONI, A. P.; BERNARDINO, G.; FORESTI, F.; TOLEDO FILHO, A. S. Karyotype and NOR conservatism with heterochromatin reorganization in neotropical bryconids. **Caryologia**, v.49, n.1, p.35-43, 1996.
- ALVENIDA-CASAUAY, A.; CARIÑO, V. S. Gonadal sex differentiation in *Oreochromis niloticus*. In: **International Symposium on Tilapia Aquaculture**, 2, Manila. Proceedings...Manila: ICLARM, p.121-124, 1998.

- AMSTERDAM, A.; HOPKINS, N. Mutagenesis strategies in zebrafish for identifying genes involved in development and disease. **Trends genetic**, v.22, n.9, p. 473-478, 2006.
- ARAI, K. Genetic improvement of aquaculture finfish species by chromosome manipulation techniques in Japan. **Aquaculture**, v.197, p.205-228, 2001.
- BALDISSEROTTO, B.; RADÜNZ NETO, J. Jundiá (*Rhamdia* sp.). In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, C. L. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: Editora UFSM, p. 303-319, 2005.
- BARMAN, R. P. A taxonomic revision of the Indo-Burmese species of *Danio rerio*. **Record of the Zoological Survey of India Occasional Papers**, v.137, p.1-91, 1991.
- BART, A. New approaches in cryopreservation of fish embryos. In: TIERSCH, T.R.; MAZIK, P.M. **Cryopreservation in aquatic species**: World Aquaculture Society. Baton Rouge cap.3, p.179-187, 2000.
- BATISTA, E. B.; MOREIRA, L. S.; ASSIS, G. C.; BEZERRA, A. J. M. **Reversão sexual de betas para pequenos produtores**. 2013. 5 f. Mostra Nacional de Iniciação Científica e Tecnológica Interdisciplinar – VI MICTI, Instituto Federal Catarinense.
- BEARDMORE, J. A.; MAIR, G. C.; LEWIS, R. I. Monosex male production in finfish as exemplified by Tilapia: applications, problems and prospects. **Aquaculture**, v.197, p.283-301, 2001.
- BILLARD, R.; ZHANG, T. Techniques of genetic resource banking in fish. In: TAYLOR, A.; FRANCIS, R. **Cryobanking the genetic resource. Wildlife conservation for the future?**. London: Taylor and Francis Books. p. 145-170, 2001.
- BLAXTER J. H. S. Sperm storage and cross-fertilization of spring and autumn spawning herring. **Nature**, London, v. 172, p. 1189-1190, 1953.
- BOMBARDELLI, R. A.; CARMINO, H.; MEURER, F. Aplicação de métodos diretos e indiretos para a produção de populações monossexuais na tilapicultura. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia**, v.7, n.1, p.57-68, 2004.
- BOMBARDELLI, R. A.; SANCHES, E. A.; PINTO, D. F. H.; MARCOS, R. M.; BARBERO, L. Idade de maior sensibilidade de tilápias-do-Nilo aos tratamentos de masculinização por banhos de imersão. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 1, p. 1-6, 2007.

- BUDD, A. M.; BANH, Q. Q.; DOMINGOS, J. A.; JERRY, D. R. Sex Control in Fish: Approaches, Challenges and Opportunities for Aquaculture. **J Mar Sci Eng**, v.3, p.329-355, 2015.
- BYE, V. J.; LINCOLN, R. F. Commercial methods for the control of sexual maturation in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). **Aquaculture**, v.57, p.299-309, 1986.
- CAETANO, J. P. J.; COTA, A. M. M.; LAMAITAI, R. M. Criopreservação de Embriões e Banco de Embriões. In: **Criopreservação de gametas, embriões e tecidos germinativo em laboratório de fertilização *in vitro***. Rio de Janeiro: Cultura Médica. p.105-117, 2011.
- CASTRO, S. V.; CARVALHO, A. A.; DA SILVA, C. M. G.; FAUSTINO, L. R.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Intracellular Cryoprotectant Agents: Characteristics and Use of Ovarian Tissue and Oocyte Cryopreservation. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.39, n.2, p.1-17, 2011.
- CESAR, M. P.; MURGAS, L. D. S.; DE ARAÚJO, R. V.; DRUMMOND, C. D. **Métodos para obtenção de população monossexo na piscicultura. Boletim Agropecuário**. 2005. 27 f. Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- CHAO, N. H.; LIAO, I. C. Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos. **Aquaculture**, v.197, n.1, p.161-189, 2001.
- CHEN, S. L.; TIAN, Y. S. Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos by vitrification. **Theriogenology**, v.63, p.1207-1219, 2005.
- CNAANI, A.; LEVAVI-SIVAN, B. Sexual Development in Fish, Practical Applications for Aquaculture. **Sexual development**, v. 3, p.164–175, 2009.
- DAVIDSON, W. S.; HUANG, T.; FUJIKI, K.; VON SCHALBURG, K. R.; KOOP, B. F. The sex determining loci and sex chromosomes in the family *Salmonidae*. **Sexual Development**. v 3, p.78–87, 2009.
- DENNISTON, R.; MICHELET, S.; GODKE, R. A. Principles of cryopreservation. In: TIERSCH, T.R. e MAZIK, P.M. Cryopreservation in aquatic species. **World Aquaculture Society**: Baton Rouge. 2000, p.59-74.
- DIGMAYER, M. **Influência da baixa temperatura e diferentes crioprotetores em oócitos e embriões de *Colossoma macropomum* e *Piaractus brachypomus***. 2013. Tese (Doutorado em produção animal), Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2013.
- DIWAN, A. D.; AYYAPPAN, S.; LAL, K. K.; LAKRA, W. S. Cryopreservation of fish gametes and embryos. **Indian J. Anim. Sci.** v.80, p.109-124, 2010.

- DONALDSON, E. M.; HUNTER, G. A. Sex control in fish with particular reference to salmonids. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, v.39, p.99-110, 1982.
- DONALDSON, E. M. Manipulation of reproduction in farmed fish. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.42, p.381-392, 1996.
- ELLIOTT, N.; KUBE, P. Development and early results of the Tasmanian Atlantic salmon breeding program. **Proc Assoc Advmt Anim Breed Genet**, v.18, p.362–365, 2009.
- EMBRAPA. Piscicultura de água doce, multiplicando conhecimentos. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 17p., 2013.
- EMBRAPA. Plantel só de fêmeas aumenta produtividade do tambaqui. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2015.
- FALCONER, D. S. **Introdução a genética quantitativa**. Viçosa:edUFV, 1987.
- FAO. **The state of world fisheries and aquaculture**. Rome: FAO, 2014, 66 pp.
- FAO. **The State of Food Insecurity in the World**. Rome: FAO, 2015a, 62 pp.
- FAO. **Food Outlook - Biannual report on global food markets**. Rome: FAO, 2015b, 142pp.
- FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all**. Rome, 2016, 200 pp.
- FERREIRA, A. B. H. Novo *Aurélio* Século XXI: o *dicionário* da língua portuguesa. 3ed. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1999.
- FORNARI, D. C. **Crioprotetores no resfriamento e congelamento de embriões de pacu (*Piaractus mesopotamicus*)**. 2009, 64p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual de Maringá – Área de concentração Produção Animal - UEM: Maringá: 2009.
- FORNARI, D. C.; RIBEIRO, R. P.; STREIT JR., D. P.; VARGAS, L.; MORAES, V. G. Freezing injuries in the embryos of *Piaractus mesopotamicus*. **Zygote**, Cambridge, v.19, n.2, p.345-350, 2010.
- FORNARI, D. C.; RIBEIRO, R. P.; STREIT JR., D. P.; GODOY, L. C.; NEVES, P. R. Effect of cryoprotectants on the survival of cascudo preto (*Rhinelepis aspera*) embryos stored at – 8°C. **Zygote**, Cambridge, v.18, n.1, p.1-6, 2011.
- FORNARI, D. C.; RIBEIRO, R. P.; STREIT JR., D. P., VARGAS, L., GODOY, L., OLIVEIRA, C. A. L.; DIGMAYER, M.; GALO, J. M.; NEVES, P. R. Increasing

- storage capability of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) embryos by chilling: development of a useful methodology for hatcheries management. **CryoLettrs**, Lewes, v. 33, n. 2, p. 125-133, 2012.
- FORNARI, D. C.; RIBEIRO, R. P.; STREIT JR., D. P.; VARGAS, L.; LOPERA, N. M.; MORAES, V. G. Freezing injuries in the embryos of *Piaractus mesopotamicus*. **Zygote**, v.19, n.4, p.345-350, 2010.
- FORNARI, D. C.; STREIT JR., D. P. TONISSI, L. B.; POVH, J. A.; SIROL, R. N.; RIBEIRO, R. P. Cooling protocol for embryos of piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1850). **Semina: Ciências Agrárias**, v.35, n.4, p.2809-2816, 2014.
- GODOY, L. C. **Desenvolvimento de protocolo para criopreservação de folículos ovarianos em peixes usando vitrificação**. 2012. 114p. Tese (Doutorado em Zootecnia). Programa de pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - FURG: Porto Alegre, 2012.
- HAGEDORN, M.; KLEINHANS, F.W.; WILDT, D.E.; RALL, W.F. Chill sensitivity and cryoprotectant permeability of dechorionated zebrafish embryos, *Brachydanio rerio*. **Cryobiology**, San Diego, v.34, n.3, p.251-263, 1997.
- HARVEY, B. Cooling of embryonic cells, isolated blastoderms, and intact embryos of the zebra fish *Brachydanio rerio* to minus -196 Celsius. **Cryobiology**, San Diego, v.20, n.5, p.440-447, 1983.
- HERRÁEZ, M. P. Criopreservación de gametas y embriones. In: Carrillo-Estévez, M. A. (Eds.). **La reproducción de los peces: Aspectos básicos y sus aplicaciones em acuicultura**. Madrid: Fundación Observatorio Español de Acuicultura. 2009, p.477-530.
- HUNTER, G. A.; DONALDSON, E. M.; STOSS, J.; BAKER, I. Production of monosex female groups of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) by the fertilization of normal ova with sperm from sex-reversed females. **Aquaculture**, v.33, p.355-364, 1983.
- ISAYEVA, A.; ZHANG, T.; RAWSON, D. M. Studies on chilling sensitivity of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes. **Cryobiology**, New York, v. 49, p. 114-122, 2004.
- ISLER, I. V. Biotechnology applied to salmoniculture. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.36-42, 2009.
- 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**, v.18, p.13-19, 1979.

- KASAI, M. Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. **Animales Reproduction Science**, v. 42, n. 3, p. 67-75, 1996.
- KAVAMOTO, E. T.; BARNABE, V. H.; CAMPOS, B. E. S. Anormalidades morfológicas em cultura. Part. II. The progeny of *Prochilodus lineatus* (Steindachner, 1881) (*Osteichthyes, Characiformes, Prochilodontidae*). **Boletim do Instituto de Pesca**, v.25, p.61-66, 1999.
- KEIVANLOO, S.; SUDAGAR, M. Feasibility Studies on Vitrification of Persian Sturgeon (*Acipenser persicus*) Embryos. **J Aquac Res Development**, v.4, n.3, 2013.
- KIMMEL, C. B.; BALLARD, W. W.; KIMMEL, S. R. et al. Stages of embryonic development of the zebrafish. **Developmental Dynamics**. v. 203, p. 253-310, 1995.
- KLEMETSEN, A.; AMUNDSEN, P. A.; DEMPSON, J. B.; JONSSON, B.; JONSSON, N.; O'CONNELL, M. F.; MORTENSEN, E. Atlantic salmon *Salmo salar* L., brown trout *Salmo trutta* L. and Arctic charr *Salvelinus alpinus* (L.): a review of aspects of their life histories. **Ecology of Freshwater Fish**, v.12, p.1-59, 2003.
- KOWALSKI, R. K.; SAROSIEK, B.; DEMIANOWICZ, W.; JUDEK, J.; GORYCZKO, K.; DOBOSZ, S.; KUS, H.; DEMSKA-ZAKKA, K.; BABIAK, I.; GLOGOWSKI, J. Quantitative Characteristics of Rainbow Trout, *Oncorhynchus Mykiss*, Neo-Males (XX Genotype) and Super-Males (YY Genotype) Sperm. **International Journal of Biological**, v.5, n.5, p.315-322, 2011.
- KUSUDA, S.; TERANISHI, T.; KOIDE, N. Cryopreservation of chum salmon blastomeres by the straw method. **Cryobiology**, v.45, p.60-67, 2002.
- LAHNSTEINER, F. The effect internal and external on zebrafish (*Dario rerio*) embryo. **Theriogenology**, v.69, n.2, p.384-396, 2008.
- LEIBO, S. P. A. One-Step method for direct non-surgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. **Theriogenology**, v.21, p.767-790, 1984.
- LI, B. P.; WEI, Q.; LIU, L. DNA integrity of *Polyodon spathula* cryopreserved sperm. **Journal of Applied Ichthyology**, v.24, n.2, p.121-125, 2008.
- LOPERA-BARRERO, N.M.; RIBEIRO, R.P.; VARGAS, L.; POVH, J.A. PAIRRA, A. As principais espécies produzidas no Brasil. In. LOPERA-BARRERO, N.M.; RIBEIRO, R.P.; POVH, J.A.; MENDEZ, L.D.V.; POVEDA-PRRA, A.R. (Eds.). **Produção de organismos aquáticos: uma visão geral no Brasil e no mundo**. Guaíba: Agrolivros. 2011, p.143-215.

- LOPES, T.; STREIT JR., D.P.; FORNARI, D.C.; OLIVEIRA, D.; RIBEIRO, R.P.; ROMAGOSA, E. Chilling curves for *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) embryos stored at -8°C . **Zygote**, p. 1-6, 2012.
- MARTÍNEZ, G.A.; VALCÁRCEL, A.; DE LAS HERAS, M.A. Vitrification of in vitro produced bovine embryos: in vitro and in vivo evaluations. **Animal Reproduction Science**, v.73, p.11-21, 2002.
- MATTOS, B.; COSTA, R. R. Técnicas de criopreservação. In: ALMODIN, C. G.; COSTA, R. R. (Eds) **Criopreservação de gametas, embriões e tecidos germinativo em laboratório de fertilização in vitro**. Rio de Janeiro: Cultura médica, 2001, p.1-27.
- MAZUR, P. Freezing of live cells: mechanisms and implications. **American Journal of Physics**, v.42, n.3, p.125-247, 1984.
- MEURER, F.; CARMINO, H.; BARBERO, L. M.; DOS SANTOS, L. D.; BOMBARDELLI, R. A.; COLPINI, L. M. Farelo de soja na alimentação de tilápias-do-nylo durante o período de reversão sexual. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 5, p.791-794, 2008.
- MPA. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura**. Brasília: Ministério da pesca e aquicultura, 2012.
- MPA. **Potencial brasileiro de produção de pescados**. Brasília: Ministério da Pesca e Aquicultura, 2014. Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/index.php/aquicultura/potencialbrasileiro>. Acesso em: 10 jan. 2015.
- NAKATANI, K.; AGOSTINHO, A. A.; BAUMGARTNER, G.; BIALETZKI, A.; SANCHES, P. V.; MAKRAKIS, M. C.; PAVANELLI, C. S. Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e manual de identificação, Maringá, EDUEM, 2001.
- NEVES, P. R. **Utilização de crioprotetores intra e extracelulares em embriões de pacu (*Piaractus mesopotamicus*)**. 2008. 71p. Tese (Doutorado em Zootecnia). Programa de Pós-Graduação em Zootec da Universidade Estadual de Maringá - Área de concentração Produção Animal: Maringá – 2008.
- NIEMANN, H. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs. **Theriogenology**, v.35, p.109-124, 1991.
- NINHAUS-SILVEIRA, A.; FORESTI, F.; AZEVEDO, A.; AGOSTINHO, C.A.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R. Cryogenic preservation of embryos of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiforme; Prochilodontidae) **Zygote**, Cambridge, v.2, n.1 p.1-11. 2008.

- PALAZ, A. T., MAPLETOFT, R. J. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. **Biotechnology Advances**, v.14, n.1 p.127-149, 1996.
- PANDIAN, T. J. **Sex reversal**. In: PANDIAN, T. J. (Ed.). *Endocrine Sex Differentiation in Fish*. Florida: CRC Press, p. 175-212, 2013.
- PHELPS, R. P.; POPMA, T. J. Sex reversal of Tilapia. In: COSTA-PIERCE, B. A.; RAKOCY, J. E. **Tilapia Aquaculture in the Americas – Volume 2**. Louisiana: World Aquaculture Society, 2000. p.34-59.
- PIFERRER, F. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. **Aquaculture**, v.197, p.229-281, 2001.
- POLGE, C.; SMITH, A. U.; PARKES, A. S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature. **Nature**, v.164, n.5, p.666, 1949.
- RALL, W. F. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. **Cryobiology**, San Diego, v.24, n.3, p.387-402, 1987.
- RANA, K. J. Preservation of gametes. In: BROMAGE, N.R.; ROBERTS, J.R. (eds.). **Broodstock Management and Egg and Larval Quality**. Oxford: Blackwell Science, 1995, p.53-75.
- REICHENBACH, H. D.; OLIVEIRA, M. A. L.; LIMA, P. F. et al. **Transferência e criopreservação de embriões bovinos**. In: GONÇALVES, P. B. D., FIGUEREDO, J. R., FREITAS, V. J. F. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. São Paulo: Livraria Varela, p. 77-127, 2008.
- REIS, V. R.; DE ALMEIDA, F. L.; PIFERRER, F. Produção de populações monossexo em peixes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 40, n. 1, p. 22-28, 2016.
- ROBLES, V.; CABRITA, E.; CUÑADO, S.; HERRÁEZ, M. P. Sperm cryopreservation of sex-reversed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): parameters that affect its ability for freezing. **Aquaculture**. v. 224, n.1/4, p. 203-212, 2003.
- ROBLES, V.; CABRITA, E.; HERRÁEZ, M.P. Germplasm cryobanking in zebrafish and other aquarium model species. **Fish Haus**, v.6, n3, p.281-293, 2009.
- RODINA, M.; POLICAR, T.; LINHART, O. Cryopreservation of sperm of testicular neomales and stripped normal males of European perch (*Perca fluviatilis* L.). **Cybium**, v. 32, n. 2, p. 214, 2008.
- SALINAS-FLORES, L.; ADAMS, S. L.; LIM, M. H. Determination of the membrane permeability characteristics of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, oocytes and development of optimized methods to add and remove ethylene glycol. **Cryobiology**, v.56, n.2, 43-52, 2008.

- SANTOS, A. J. G.; SILVA, A. L. N. Biotecnologia em aquicultura: Processos, riscos e cuidados. Ênfase à produção de tilápias. **Panorama aquicultura**, v.45. 1998
- SCHNEIDER, V.; MAZUR, P. Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen-thawed embryos. **Theriogenology**, v.21, n.1, p.68-79, 1984.
- SILVEIRA, A. N.; FORESTI, F.; TABATA, Y. A. **Congelamento e fertilidade do semen de fêmeas revertidas de truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss***. p.360. In: Programa e Resumos do Congresso Brasileiro de Zoologia 23, 13 a 18 de fevereiro de 2000. Sociedade Brasileira de Zoologia e Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá-MT.
- SILVEIRA, T. R.; SCHNEIDER, A. C.; HAMMES, T. O. Zebrafish: modelo consagrado para estudos de doenças humanas. **Ciência e cultura**, v.64, n.2, 2012.
- SON, W. Y.; TAN, S. L. Coparison between slow freezing and vitrification for human embryos. **Expert Ver Med Devices**, v.6, n.1, p.1-7, 2009.
- STREIT JR., D. P.; DIGMAYER, M.; RIBEIRO, R. P.; SIROL, R. N.; MORAES, G. V.; GALO, J. M. Embriões de pacu submetidos a diferentes protocolos de resfriamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.8, p.1199-1202, 2007.
- SUZUKI, T.; KOMADA, H.; TAKAI, R.; ARII, K.; KOZIMA, T. T. Relation between Toxicity of Cryoprotectant DMSO and Its Concentration in Several Fish Embryos. **Fisheries science**, v.61, n.2, p193-197, 1995.
- VALENTIN. F. N. **Processo de diferenciação gonadal em *Pseudoplatystoma fasciatum* e tentativa de feminilização com 17 β -estradiol**. 2013. 38 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Aquicultura, UNESP, Jaboticabal, 2013.
- WANG, R. Y.; GUAN, D. M. RAWSON, T. ZHANG. Ultrasound enhanced methanol penetration of zebrafish (*D. rerio*) embryos measured by permittivity changes using impedance spectroscopy. **Eur. Biophys J**, v.37, p.1039-1044, 2008.
- WHITTINGHAM, D. G.; LEIBO, S.P.; MAZUR, P. Survival of mouse embryos by frozen to 196°C and -296°C. **Science**, Washington, v.178, n.2, p.411-414, 1972.
- WILLADSEN, S. M.; POLGE, C.; ROWSON, L. E. A. Deep-Freezing of sheep embryos. **Journal of Reproduction and fertility**, v.46, n.2, p.151-154, 1976.
- WUSTEMAN, M. C.; PEGG, D. E.; ROBINSON, M. P.; WANG, L. H.; FITCH P. Vitrification media: toxicity, permeability, and dielectric properties. **Cryobiology**, v.44, p.24-37, 2002.

- YAMAMOTO T. Artificial induction of functional sex-reversal in genotypic females of the medaka (*Oryzias latipes*). **J. Exp. Zool.**, v.137, p.227-263, 1958.
- ZANARDI, M. F.; KOBERSTEIN, T. C.; URBINATI, E. C.; FAGUNDES, M.; DOS SANTOS, M. A.; MATAQUEIRO, M. I. Concentrações de hormônio na carcaça de tilápias-do-nilo e maturação precoce após reversão sexual. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 1, p.7-11, 2011.
- ZHANG, T.; RAWSON, D. M.; MORRIS, G. J. Cryopreservation of pre-hatch embryos of zebrafish (*Brachydanio rerio*). **Aquatic Living Resources**, v.6, p. 145-153, 1993.
- ZHANG, T.; RAWSON, D.M. Studies on chilling sensitivity of zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos. **Cryobiology**, v.32, n.3, p.239-246, 1995.
- ZHANG, Y. Z.; LIU X. Z.; RAWSON D. M. Effects of methanol and developmental arrest on chilling injury in zebrafish (*Danio rerio*) embryo. **Theriogenology**, v.59, p.1545-1556, 2003.
- ZHANG, Y. Z.; ZHANG, S. C.; LIU, X. Z.; XU, Y. J.; HU, J. H.; XU, Y. Y.; LI, J.; CHEN, S. L. Toxicity and protective efficiency of cryoprotectants to flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos. **Theriogenology**, Stoneham, v.63, n.3, p.763-773, 2004.
- ZHANG, T.; ISAYEVA, A.; ADMAS, S.L.; RAWSON, D. M. Studies on membrane permeability of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes in the presence of different cryoprotectants. **Cryobiology**, v.50, n.2, 285–293, 2005.
- ZHANG, T.; RAWSON, D. M.; TOSTI, L.; CARNEVALI, O. Cathepsin activities and membrane integrity of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes after freezing to – 196°C using controlled slow cooling. **Cryobiology**, v.56, n.3, 138–143, 2008.

OBJETIVO GERAL

O objetivo geral desta pesquisa foi gerar conhecimento técnico científico de qualidade acerca do manejo reprodutivo de peixes, mais especificamente, busca-se o aprimoramento das técnicas de criopreservação de embriões e da utilização de indivíduos neomachos para a produção de progênie monosexo fêmea. Para tanto, no capítulo dois foi avaliado o efeito da inclusão de diferentes níveis do hormônio melatonina na solução vitrificante de embriões de zebrafish (*D. rerio*), sobre os eventos apoptóticos, com o intuito de se avançar na descoberta de um protocolo eficaz para criopreservação deste tipo de material. Enquanto no capítulo três, avaliou-se comparativamente a qualidade do sêmen e a histologia gonadal de machos normais (genótipo XY) e neomachos (genótipo XX) de salmão do Atlântico (*S. salar*), a fim de se otimizar a utilização dos neomachos em estações de piscicultura voltadas a produção de lotes monosexo fêmea.

-CAPÍTULO II-

CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES DE PEIXES: O USO DA MELATONINA COMO INIBIDOR DO PROCESSO APOPTÓTICO

Resumo: Há décadas a criobiologia busca a conservação de embriões de peixes. A vitrificação surge como uma técnica promissora, contudo, tem sido associada ao aumento da formação de espécies reativas de oxigênio (ERO's) e eventos apoptóticos, sendo o hormônio melatonina estudado como importante inibidor da formação desses compostos. Com o objetivo de determinar de maneira inédita o efeito da inclusão de diferentes doses de melatonina (10^{-6} M e 10^{-3} M) na solução vitrificante de embriões de zebrafish (*Danio rerio*), avaliou-se a formação de crio-lesões após o descongelamento, quantificação da expressão relativa dos genes envolvidos nos processos apoptóticos (anti-apoptótico – *Bcl-2* e pró apoptóticos – *Bax/Caspase-3*), formação de ERO's e a fragmentação de DNA por TUNEL. Constatando-se que, embora a solução vitrificante não tenha protegido adequadamente todas as membranas dos embriões, especialmente a camada sincicial vitelínica, a nível molecular, a inclusão de 10^{-6} M de melatonina, melhorou significativamente a resposta ao processo apoptótico pós descongelamento, principalmente quanto à expressão dos genes envolvidos na apoptose e à fragmentação do DNA. Este resultado é muito importante pois contribui para a futura elaboração de um protocolo adequado para a vitrificação deste tipo de material.

Palavras chave: *Danio rerio*, expressão gênica, espécies de oxigênio reativo, vitrificação

Abstract: For decades, cryobiology has researched for the conservation of fish embryos. Vitrification emerges as a promising technique, however, it has been associated with increased formation of reactive oxygen species (ROS) and apoptotic events, with the hormone melatonin being studied as an important inhibitor of the formation of these compounds. In order to determine in an unprecedented way the effect of melatonin inclusion (10^{-6} M and 10^{-3} M) in the fish embryo vitrification solution (zebrafish - *D. rerio*), it was evaluated the cryo-lesion formation after thawing, quantification of the relative expression of the genes involved in the apoptotic processes (anti-apoptotic - *Bcl-2* and pro-apoptotic - *Bax/Caspase-3*), ROS formation and TUNEL DNA fragmentation. Although the vitrification solution did not adequately protect all regions, especially the yolk syncytial layer, at the molecular level, the inclusion of 10^{-6} M melatonin significantly

improved the response to the apoptotic process post-thawing of the embryos, mainly regarding the expression of the genes involved in the apoptosis process and DNA fragmentation. This result is very important because it will contribute to the future elaboration of an adequate protocol for the vitrification of this type of material.

Key words: *Danio rerio*, gene expression, reactive oxygen species, vitrification

Introdução

A criopreservação de gametas (femininos e masculinos) e embriões é uma técnica responsável por grandes avanços científicos em diversas áreas, como ecologia, biomedicina, reprodução e melhoramento genético animal. Na aquicultura, os primeiros estudos realizados foram relacionados à criopreservação de gametas masculinos (Blaxter, 1953), metodologia difundida para diversas espécies desde então. Por outro lado, a criopreservação de gametas femininos e embriões de peixes ainda não foi estabelecida, exigindo-se estudos que busquem o entendimento dos complexos processos físicos, químicos e biológicos que a envolvem (Ninhaus-Silveira, 2004; Herraéz, 2009; Fornari et al., 2010). A descoberta de um protocolo eficaz para a criopreservação deste material causaria uma verdadeira revolução na piscicultura, incrementando fortemente, em um curto período de tempo, os índices produtivos globais, principalmente no sentido de promover a conservação da diversidade genética de populações naturais e linhagens de interesse para programas de melhoramento, além de facilitar o intercâmbio de material genético e a produção de alevinos em qualquer período do ano (Digmayer, 2013; Falconer, 1987).

Atualmente, a vitrificação é a técnica mais utilizada para a criopreservação de gametas e embriões de humanos, e representa o futuro da criopreservação para diversas espécies, já que permite que o material atinja um estado vítreo instantâneo, evitando-se a passagem por curvas de resfriamento ou congelação, e diminuindo a formação danosa de cristais de gelo (Caetano et al., 2011). No entanto, muitos autores relatam o aumento anormal dos níveis de ERO's no interior das células após a vitrificação, fato que ocasiona danos oxidativos ao DNA, pela redução do potencial de membrana das mitocôndrias, fazendo com que se rompam facilmente, liberando o citocromo C para o citoplasma, o que desencadeia a ativação da proteína CASPASE-3, responsável por importante parte do processo apoptótico (Yang et al. 1998; Simon et al. 2000; Favetta et al. 2007).

Uma das formas de prevenir a formação de ERO's é a utilização de compostos inibidores, que podem ser adicionados ao crioprotetor, melhorando significativamente as

taxas de sobrevivência (Hwang et al., 2013). Para tanto, a melatonina (N-acetil-5-hidroxitriptamina), hormônio encontrado em todos os animais vertebrados, que modula o ritmo circadiano do sono e da reprodução (Stehle et al. 2011), tem sido estudado como importante inibidor da formação desses compostos, uma vez que seus metabólitos eliminam os radicais livres, além de serem agentes antioxidantes (Barrientos, 2002; Forstermann, 1998).

Algumas proteínas são apontadas como responsáveis pelo controle dos mecanismos apoptóticos em gametas e embriões criopreservados, seja como protetores ou promotores. A família das proteínas BCL-2 (anti-apoptóticas: BCL-2, BCL-XL, BCL-W e MCL-1; pró-apoptóticas: BAX, BKA, BAD, BID, BIK e BCL-XS), por exemplo, presentes na membrana externa das mitocôndrias, possuem a função de regular a via mitocondrial de apoptose. O aumento na expressão dos genes pró-apoptóticos, causada pela elevação dos níveis citoplasmáticos de ERO's, promove a permeabilização da membrana mitocondrial e desencadeia o processo apoptótico, enquanto a expressão anti-apoptóticos, inibe esta ação (Oltvai et al., 1993).

Em estudos envolvendo a expressão dos genes relacionados a apoptose celular, é comum utilizar os genes para as proteínas BCL-2, BAX e CASPASE-3. Uma elevação anormal dos níveis intracelulares de ERO'S, aumento da expressão dos genes bax, presença da proteína CASPASE-3 e a diminuição da expressão dos genes bcl-2 foram observados em oócitos vitrificados de camundongos (Jang et al., 2014) e bovinos (Chen et al., 2014).

Zhao et al. (2016) observaram que a inclusão de melatonina na solução vitrificante de embriões bovinos diminuiu os níveis de bax e aumentou os níveis de bcl-2, melhorando significativamente a taxa de sucesso após a criopreservação. Além disso, pesquisas utilizando a melatonina para a melhoria da qualidade dos gametas e embriões criopreservados já foram realizadas com sucesso em suínos (Kang et al., 2009; Shi et al., 2009), bovinos (El-Rael et al., 2011; Zhao et al., 2014; Ashrafi et al., 2013), ovinos (Succu et al., 2011), humanos (Espino et al., 2010; Ortiz et al., 2011) e equinos (da Silva et al., 2011). No entanto, estudos a respeito da eficiência deste hormônio sobre a criopreservação de embriões de peixes não foram encontrados na literatura.

Nos últimos anos, o Zebrafish (*Danio rerio*) se tornou um dos modelos animais mais importantes em estudos genéticos, reprodutivos, toxicológicos e neurofisiológicos para vertebrados, sendo sua ampla utilização justificada pelo pequeno porte, fácil manutenção, prolificidade, rápido crescimento e sequenciamento completo do genoma

(Rubinstein, 2003; Amsterdam & Hopkins, 2006). Para o desenvolvimento de novas tecnologias na piscicultura, esta espécie tem sido utilizada principalmente em análises reprodutivas, já que as estratégias de avaliação embriológicas podem ser aplicadas com facilidade pela característica transparente dos embriões, facilitando a observação de seu desenvolvimento (Silveira, 2012).

O objetivo deste estudo foi determinar o efeito da inclusão de diferentes níveis do hormônio melatonina na solução vitrificante sobre os eventos apoptóticos, expressão dos genes envolvidos na apoptose celular, formação de espécies reativas de oxigênio, fragmentação do DNA, e na formação de crio-lesões em embriões de zebrafish após o descongelamento.

Materiais e métodos

Esta pesquisa foi realizada entre os meses de maio a novembro de 2017, no Aquaculture Center IMAS Taroona, pertencente ao Institute for Marine and Antarctic Studies da University of Tasmania, Hobart, Tasmânia, Austrália, sendo o planejamento experimental aprovado pelo University of Tasmania Animal Ethics Committee, conforme Parecer nº A0016597.

Design experimental

O estudo foi conduzido em delineamento inteiramente ao acaso, composto por quatro tratamentos: Grupo controle (Não criopreservado - Sem inclusão de melatonina), tratamento 1 (Criopreservado - Sem inclusão de melatonina), tratamento 2 (Criopreservado - Inclusão de 10^{-6} M de melatonina) e tratamento 3 (Criopreservado - Inclusão de 10^{-3} M de melatonina). Foram utilizados o total de 240 embriões, 60 embriões por tratamento. O design experimental da pesquisa é apresentado na figura 1.

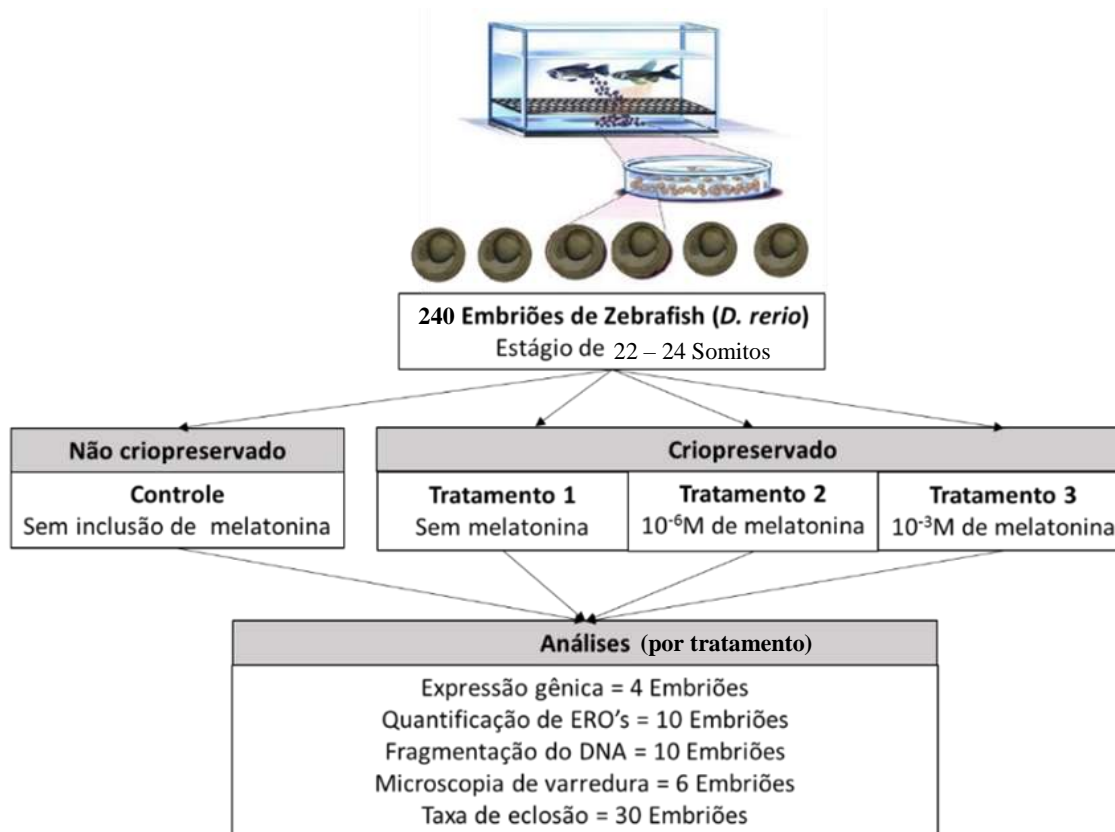


Figura 1. Esquema experimental utilizado.

Manejo reprodutivo e obtenção dos embriões

Inicialmente, 50 reprodutores de zebrafish (*D. rerio*) adultos, 25 machos e 25 fêmeas, foram adquiridos de produtores comerciais, e mantidos em aquários com sistema de recirculação de água durante todo o período experimental (Apêndice A, figura 1A). A temperatura da água e o fotoperíodo foram mantidos em 24 a 26°C e 14 horas de luz por dia, respectivamente. Os peixes receberam ração comercial floculada (API Tropical Flakes, Nebraska, Kansas, USA) três vezes ao dia.

Para a obtenção dos embriões, na noite anterior à desova, machos e fêmeas foram selecionados a partir de características sexuais secundárias como tamanho do abdômen, condições reprodutivas e sanidade, e colocados juntos (proporção de dois machos e duas fêmeas) em aquários de reprodução com fundo telado para a proteção dos embriões (Figura 1). Após o fim da desova, os reprodutores foram retirados do aquário e os embriões coletados e incubados até o estágio de 22-24 somitos (aproximadamente 22 horas após a fertilização), para a remoção do córion e realização dos ensaios de criopreservação (Apêndice A, figura 2A). Esse estágio de desenvolvimento foi escolhido a partir de estudos preliminares de Keivanloo e Sudagar (2013).

Remoção do córion

A fim de se favorecer a inclusão dos agentes crioprotetores no interior dos embriões, no momento em que os embriões possuíam o estágio de desenvolvimento escolhido, realizou-se a remoção do córion, adaptado de Sorells et al. (2013). Inicialmente os embriões foram colocados em uma placa de petri contendo 10 ml de solução 10mg/ml de Pronase E (Protease obtida de *Streptomyces griseus*, Sigma Aldrich, Darmstadt, Alemanha) em tampão fosfato salina 1X (PBS), procedendo-se na sequência incubação à 27°C por 30 minutos em incubadora convencional. A remoção do córion se deu pelo enxágue com PBS 1X e movimentações suaves com a pipeta, sendo os embriões incubados em solução PBS 1X até o uso.

Criopreservação dos embriões e inclusão de melatonina

Para vitrificação dos embriões utilizou-se como base a solução crioprotetora definida por Keivanloo e Sudagar (2013) e adaptada com testes de toxicidade pelos autores, sua composição é apresentada na tabela 1. As doses de melatonina utilizadas (10^{-6} M e 10^{-3} M) foram baseadas no estudo de Zhao et al. (2016).

Tabela 1. Solução de vitrificação utilizada para a criopreservação dos embriões de Zebrafish (*D. rerio*).

Componente	Concentração
Propilenoglicol	3M
Metanol	1,5M
Gema de ovo	15%
Penicilina + Dyhidroestreptomicina	10mL/L
Meio de cultura (L-15)	q.s.p 100mL
Melatonina	10^{-6} M (T2*) ou 10^{-3} M (T3*)

*Tratamentos 2 e 3.

O processo de vitrificação foi realizado de acordo com o descrito por Caetano et al. (2011). Em uma placa de petri pequena, os embriões descorionizados foram expostos a um gradiente crescente de concentração da solução vitrificante, um minuto a cada concentração (0% - apenas meio de cultura, 25%, 50%, 75% e 100%), totalizando cinco minutos de exposição. Posteriormente, foram imediatamente colocados em palhetes de criopreservação de 0,5 ml e imersos em nitrogênio líquido em caixa de isopor. Após 20 segundos, as amostras foram transferidas para um cilindro de nitrogênio líquido de armazenamento e ficaram estocados por uma semana até o descongelamento. O

descongelamento foi realizado pela imersão em banho maria dos palhetes a 26°C por 8 segundos, e a reidratação ocorreu pela exposição dos embriões a um gradiente decrescente de concentração da solução vitrificante (100%, 75%, 50%, 25% e 0%), adicionado 0,1 M de sacarose para redução de problemas com o choque osmótico. Durante o descongelamento foram registrados fotos e vídeos a fim de se avaliar posteriormente a evolução dos processos apoptóticos.

Taxa de sobrevivência

Após o descongelamento, os embriões foram lavados duas vezes em PBS 1X, e então incubados em PBS 1X à temperatura de 26°C para determinação da possível continuidade no seu desenvolvimento.

Microscopia de varredura

A análise foi baseada no protocolo definido por Rawson et al. (2001) para embriões de Zebrafish (*Danio rerio*). Seis embriões por tratamento foram fixados em solução de glutaraldeído 2,5% com adição de tampão cacodilato 0,1 M em pH 7,2, permanecendo sob refrigeração até o início da desidratação (adição crescente de álcool, 30, 50, 70, 80, 90, 95% e álcool absoluto por 30 minutos cada banho). Para secagem foi utilizado um aparelho de ponto crítico BAL-TAC CPD 030 (Critical Point Dryer), utilizando CO₂ líquido. Posteriormente os embriões foram transferidos em uma base metálica de alumínio (stubs), em seguida metalizados com íons de ouro-paládio em Metalizador Desk II Denton Vacuum. O material foi examinado e eletromicrografado em microscópio eletrônico de varredura JEOL (JSM-5410), avaliando-se as lesões causadas pela vitrificação.

Expressão gênica

Imediatamente após o descongelamento, quatro embriões por tratamento foram colocados diretamente em tubos de 1,5 mL contendo 1 mL de RNA later (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) e armazenados em freezer (-4°C). No momento das análises, as amostras individualizadas foram colocadas em novos tubos de 1,5 mL removendo-se completamente o conteúdo de RNA later.

A extração do RNA total foi realizada com a utilização do RNA mini kit (BioLine, Londres, Reino Unido) de acordo com instruções do fabricante. Após a extração, as

amostras de RNA total foram aliquotadas (2 μ L) para quantificação e o restante armazenado em ultrafreezer a -80°C.

A integridade do RNA obtido foi avaliada em gel de agarose 1% corado com SYBR Safe DNA gel Stain (Invitrogen, Carlsbad CA, EUA) enquanto sua concentração obtida em aparelho Fluorometro Qubit®.

Das amostras íntegras, produziu-se o cDNA com a utilização do Kit SuperScript III (Invitrogen, Carlsbad CA, EUA), em seguida as amostras foram armazenadas a -20°C até a sequência das análises. Os *primers* utilizados nas reações de PCR em tempo real (qRT-PCR) para os genes *bax*, *bcl-2* e *Caspase-3* e para o gene referência β - *actina* foram confeccionados de acordo com as informações depositadas no site: www.ncbi.nlm.nih.gov (Tabela 2).

Tabela 2. Sequências forward e reverse, e temperatura de anelamento dos *primers* para os genes *bax*, *bcl-2*, *Caspase-3* e β - *actina* de Zebrafish (*D. rerio*).

Gene		Sequência (5' – 3')	T (°C)	Nº Genbank
<i>β-Actina</i>	Forward	AAA GCC TTT GCT GGA GAT	63	AF025305.1
	Reverse	CCC ACA TAG GAG TCT TTC TGT CC		
<i>Caspase-3</i>	Forward	ATG AAC GGA GAC TGT GTG GA	63	AB047003.1
	Reverse	GTA TCT GAA GGC ATG GGA TTG A		
<i>Bcl-2</i>	Forward	GGA TGA CTG ACT ACC TGA ACG G	63	570772
	Reverse	GTA TGA AAA CGG GTG GAA CAC A		
<i>Bax</i>	Forward	TGC CTT TTA TTA GAA AGA CCT GCA T	63	NM001328066.1
	Reverse	TCC AGC AAG GAA AAC TCC AAC T		

Para as reações de qRT-PCR foi utilizado o corante fluorescente Itaq Universal Syber® Green Supermix (BioRad, Califórnia, EUA), conforme recomendações do fabricante. Todas as análises foram conduzidas em triplicata, com volume final de reação de 10 μ L utilizando o aparelho BioRad CFX. Concentrações ideais de *primer* e cDNA foram determinadas através de testes de eficiência utilizando três concentrações de *primer* (100, 200 e 400 nM) e quatro concentrações de cDNA (10, 100, 200 e 400 ng).

Quantificação de espécies reativas ao oxigênio (ERO's)

Os níveis de oxigênio reativo intracelulares foram quantificados a partir da utilização da sonda molecular 2',7'- diclorodihidrofluoresceína diacetato (Eugene, OR, EUA), de acordo com instruções do fabricante. Imediatamente após a vitrificação, os embriões foram lavados duas vezes em PBS 1X, incubados por 60 minutos em solução

10 mM de 2',7'- diclorodihidrofluoresceína diacetato à temperatura ambiente, lavados novamente em PBS 1X e posteriormente, analisados em microscópio de contraste de fase com fluorescência equipado com câmera fotográfica própria. O comprimento de ondas para excitação e emissão foram de 492-495 nm e 517-527 nm, respectivamente. A porcentagem da área superficial do embrião que emitia fluorescência (afetada pela formação de ERO's) foi mensurada com a utilização do software aberto ImageJ.

Fragmentação do DNA (TUNEL)

A fragmentação do DNA foi avaliada pela metodologia TUNEL utilizando o Kit de detecção de morte celular In Situ por fluorescência (Roche, Alemanha), de acordo com instruções do fabricante. Após o descongelamento dez embriões por tratamento passaram por duas lavagens em solução PBS 1X, fixados em solução de paraformaldeído 4%, tratado com 0,1% de Triton X-100 por 40 min, e exposto a solução de bloqueio overnight a 4°C. Posteriormente, os embriões foram incubados em solução de TUNEL, a 37°C durante uma hora no escuro, lavados em PBS 1X e fotografados em microscópio de contraste de fases com fluorescência. O comprimento de ondas para excitação e emissão foram de 450-500 nm e 515-565 nm, respectivamente. Da mesma forma que a análise de ERO's, a porcentagem da área superficial do embrião que emitia fluorescência (presença de DNA fragmentado) foi mensurada com a utilização do software ImageJ. Para o controle positivo, uma amostra foi tratada com DNase I (50 UI/ml; Promega, Southampton, Reino Unido) durante 15 minutos a 37°C, antes da incubação.

Análises estatísticas

Realizou-se uma análise fatorial (Criopreservado ou não, com dois níveis de inclusão de melatonina) para os dados de parâmetros quantitativos (Taxa de eclosão, ERO's e fragmentação de DNA), que seguiram a distribuição normal (Shapiro-Wilk a 5% de significância), sendo as diferenças significativas avaliadas pelo método de comparação de média de Tukey a 5% de significância, através do programa estatístico SAS (SAS Inst Inc. Cary, NC, EUA) com resultados expressos como média e erro padrão. Para a quantificação relativa da expressão gênica, utilizou-se o método $2^{-\Delta CT}$, com dados expressos em unidade arbitrária e diferenças significativas em relação ao controle avaliadas pelo teste de Dunnet.

Resultados

Taxa de sobrevivência e alterações morfológicas

Embora o grupo controle (Não criopreservado - Sem inclusão de melatonina), tenha apresentado taxa de sobrevivência média de $92,30 \pm 4,90\%$, não foram obtidos bons resultados para os tratamentos que passaram pela vitrificação, observando-se 100% de mortalidade após o descongelamento. Contudo, foi possível notar que os embriões mantiveram sua estrutura morfológica intacta durante o armazenamento, iniciando o processo apoptótico apenas após a retirada do nitrogênio líquido. Além disso, em poucos minutos após o início do descongelamento, observou-se o rápido rompimento da membrana sincicial vitelínica e das células da camada mais externa da epiderme dos embriões, com extravasamento de seus conteúdos (Figura 2).

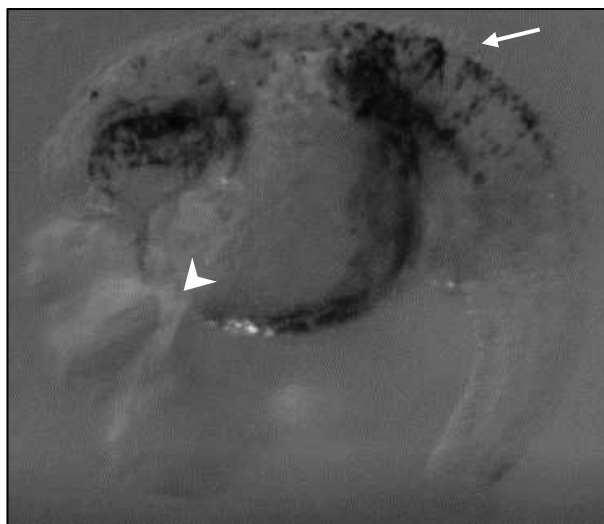


Figura 2. Morte de embrião de *D. rerio* após o descongelamento. Ponta de seta mostra o extravasamento do vitelo pelo rompimento da membrana vitelínica; Flecha aponta o rompimento das células da camada mais externa da epiderme.

Crio-lesões

Por meio, da análise de microscopia eletrônica de varredura foi possível a identificação das principais crio-lesões causadas pela vitrificação nos embriões. Os embriões criopreservados possuíam crio-lesões importantes com relação aos embriões não criopreservados, porém, entre os tratamentos criopreservados não foram observadas grandes diferenças. Assim como já relatado na análise de sobrevivência, a região do embrião mais prejudicada foi a camada sincicial vitelínica (Figura 3 – Ponta de seta), que possuiu formas, tamanhos e espessuras irregulares e se rompeu facilmente (Figura 3 –

Seta). Além disso, observou-se lesões na camada epidérmica mais externas dos embriões, como invaginações, enrugamento e perfurações (Figura 3 – Asterisco).

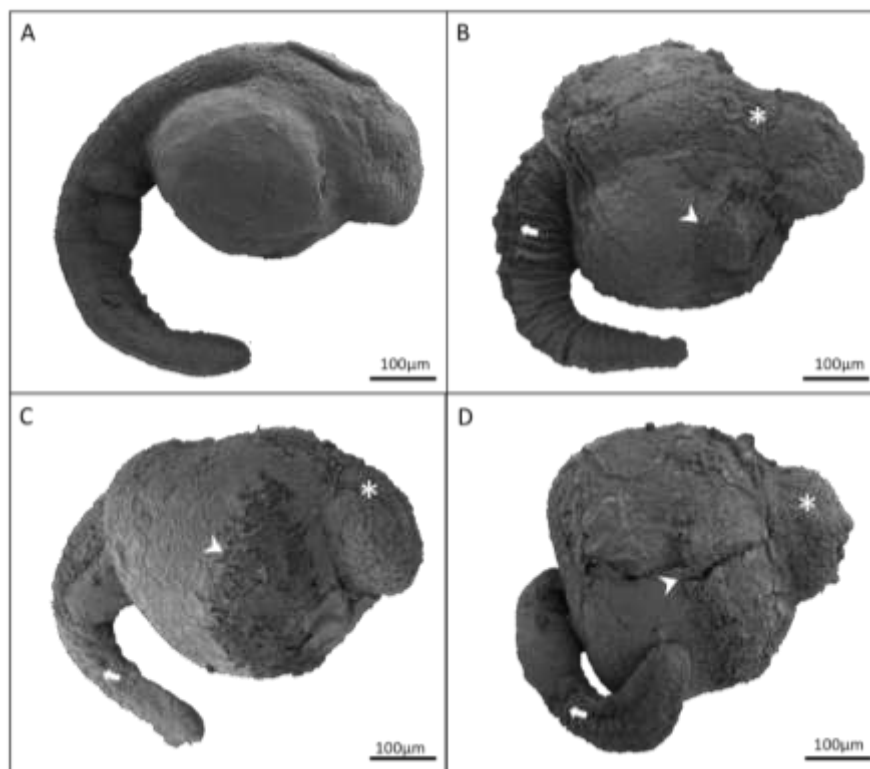


Figura 3. Microscopia eletrônica de varredura de embriões de zebrafish (*D. rerio*) vitrificados ou não, com ou sem inclusão de melatonina na solução crioprotetora. A) Grupo controle (Não criopreservado - Sem inclusão de melatonina); B) Tratamento 1 (Criopreservado - Sem inclusão de melatonina); C) Tratamento 2 (Criopreservado - Inclusão de 10^{-6} M de melatonina) e; D) Tratamento 3 (Criopreservado - Inclusão de 10^{-3} M de melatonina). Flecha aponta invaginações e perfurações; Ponta de seta aponta o rompimento da camada sincicial vitelínica; Asterisco aponta enrugamento da epiderme.

Expressão gênica

Os primers para os genes analisados neste estudo (*bax*, *bcl-2*, *Caspase-3* e β -*actina*) provaram ser adequados para a análise de PCR em tempo real. A eficiência de amplificação foi semelhante para os genes de interesse, variando entre 90 e 110% (Apêndice A, figura 3A). A análise das curvas de dissociação não revelou presença de produtos não específicos, ou formação de dímeros de primers, e demonstra a confiabilidade dos dados na expressão de mRNA dos genes estudados. Análise estatística da β -*actina* como controle endógeno não mostrou diferença significativa entre os tratamentos, comprovando desta forma a eficiência de seu uso como controle endógeno.

Foram observadas diferenças estatísticas para a expressão dos genes envolvidos no processo apoptótico (*Bcl-2* – anti-apoptótico e *Bax/Caspase-3* – pró apoptóticos) entre todos os tratamentos. *Bax* e *Bcl-2* apresentaram níveis de expressão muito baixos para os embriões do grupo controle (Não criopreservado - sem inclusão de melatonina). Por outro lado, entre os tratamentos com embriões vitrificados, a inclusão de 10^{-6} M de melatonina (tratamento 2) apresentou os melhores resultados gerais, isto é, menores médias ($p < 0,05$), enquanto o tratamento contendo 10^{-3} M (tratamento 3) de melatonina possuiu maiores médias de expressão. A expressão da proteína *Caspase-3* por sua vez, mostrou que o tratamento 2 mais uma vez foi melhor, apresentando expressão menor ($p < 0,05$) que os tratamentos vitrificados sem melatonina e com 10^{-3} M de inclusão. Os níveis de expressão do RNAm dos genes *Bax*, *Bcl-2* e *Caspase-3* (Figura 4).

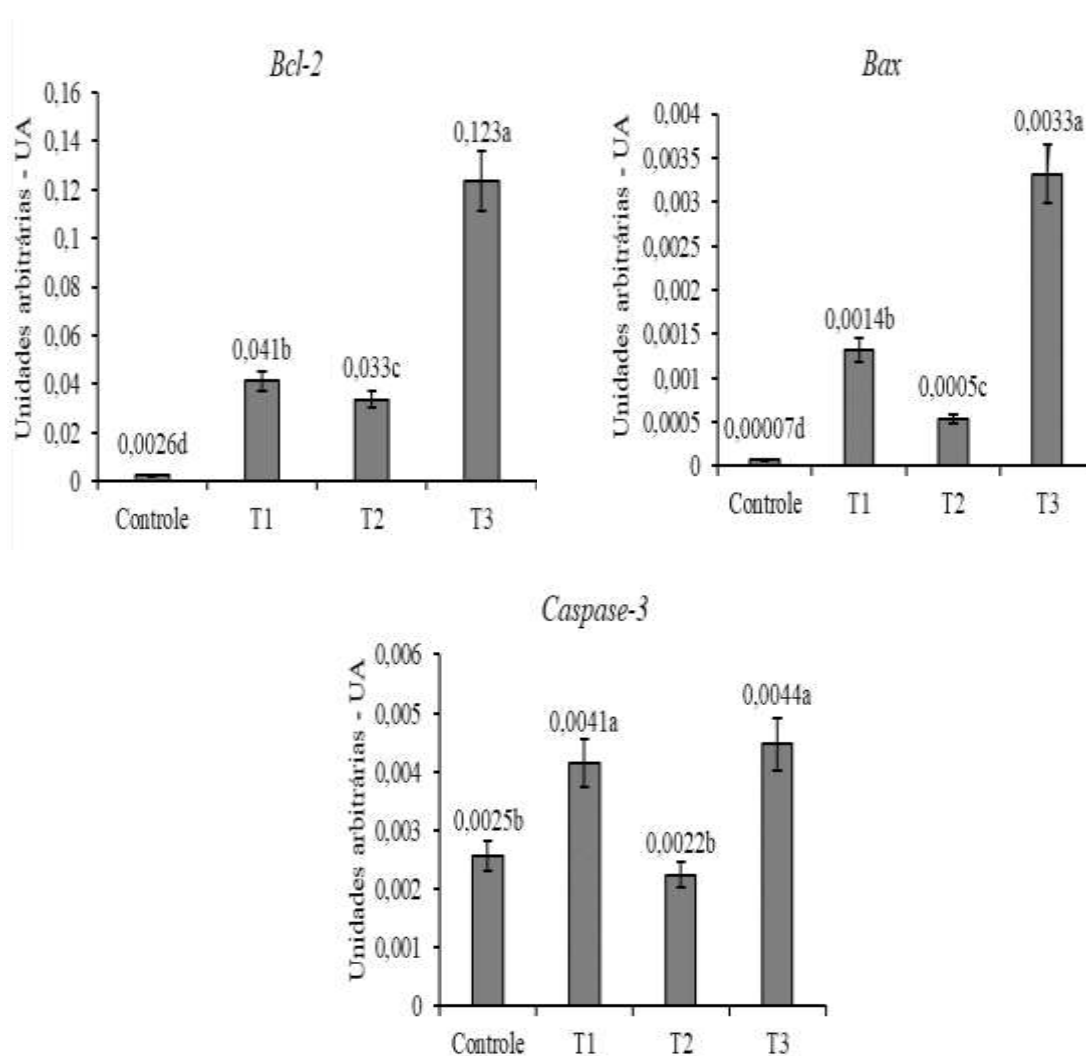


Figura 4. Níveis de expressão do RNAm dos genes *Bax*, *Bcl-2* e *Caspase-3*, em embriões de Zebrafish (*D. rerio*) após a vitrificação.

Espécies reativas ao oxigênio (ERO's) e fragmentação de DNA (TUNEL)

Para a análise de formação de ERO's, o tratamento controle apresentou porcentagem de área superficial do embrião afetada ($3,80 \pm 0,40\%$) menor ($p < 0,05$) que os tratamentos vitrificados, enquanto entre os tratamentos criopreservados, tratamento 1 ($25,59 \pm 8,80\%$), tratamento 2 ($34,45 \pm 7,90\%$) e tratamento 3 ($26,64 \pm 12,47\%$), não foram constatadas diferenças ($p > 0,05$) (Figuras 5). Além disto, grande fluorescência da região da reserva vitelínica foi observada para os tratamentos vitrificados, evidenciando que esta camada foi particularmente afetada pelo processo sendo que a solução vitrificante não foi eficiente em evitar a formação excessiva de ERO's no seu interior (Figura 6).

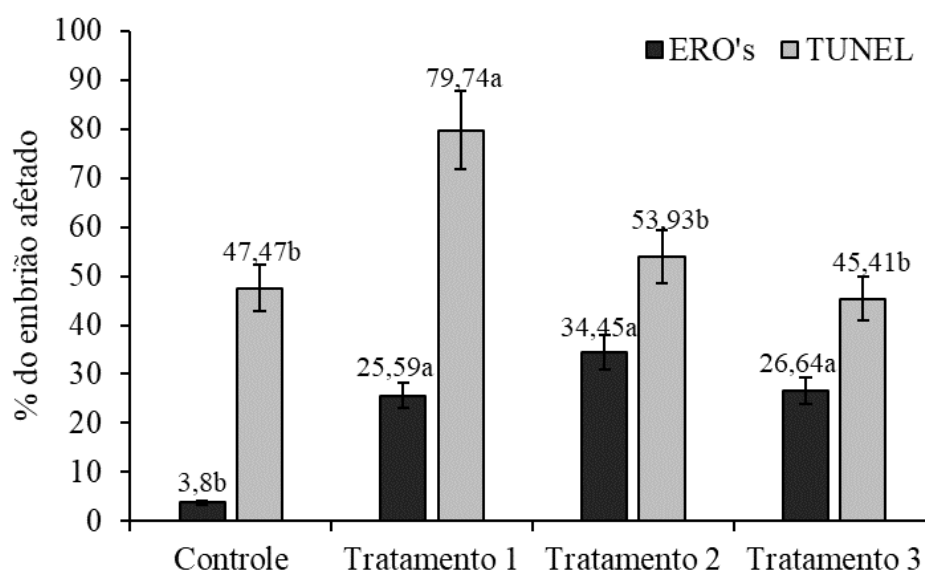


Figura 5. Porcentagem dos embriões afetado (emissão de fluorescência) pela formação de ERO's e fragmentação de DNA após a vitrificação.

Os embriões criopreservados com melatonina apresentaram menor ($P < 0,05$) fragmentação do que os tratamentos criopreservados sem melatonina. Interessante observar que os valores dos tratamentos com melatonina não diferiram significativamente do tratamento controle (Figura 5). Apesar disto, os tratamentos criopreservados com inclusão de melatonina, tratamentos 2 ($53,93 \pm 18,50\%$) e tratamento 3 ($45,41 \pm 10,20\%$) apresentaram redução ($P < 0,05$) da presença de DNA fragmentado com relação ao tratamento 1 (Criopreservado, sem melatonina – $79,74 \pm 1,00\%$), semelhante aos embriões não criopreservados do grupo controle ($47,47 \pm 10,82\%$) (Figura 6).

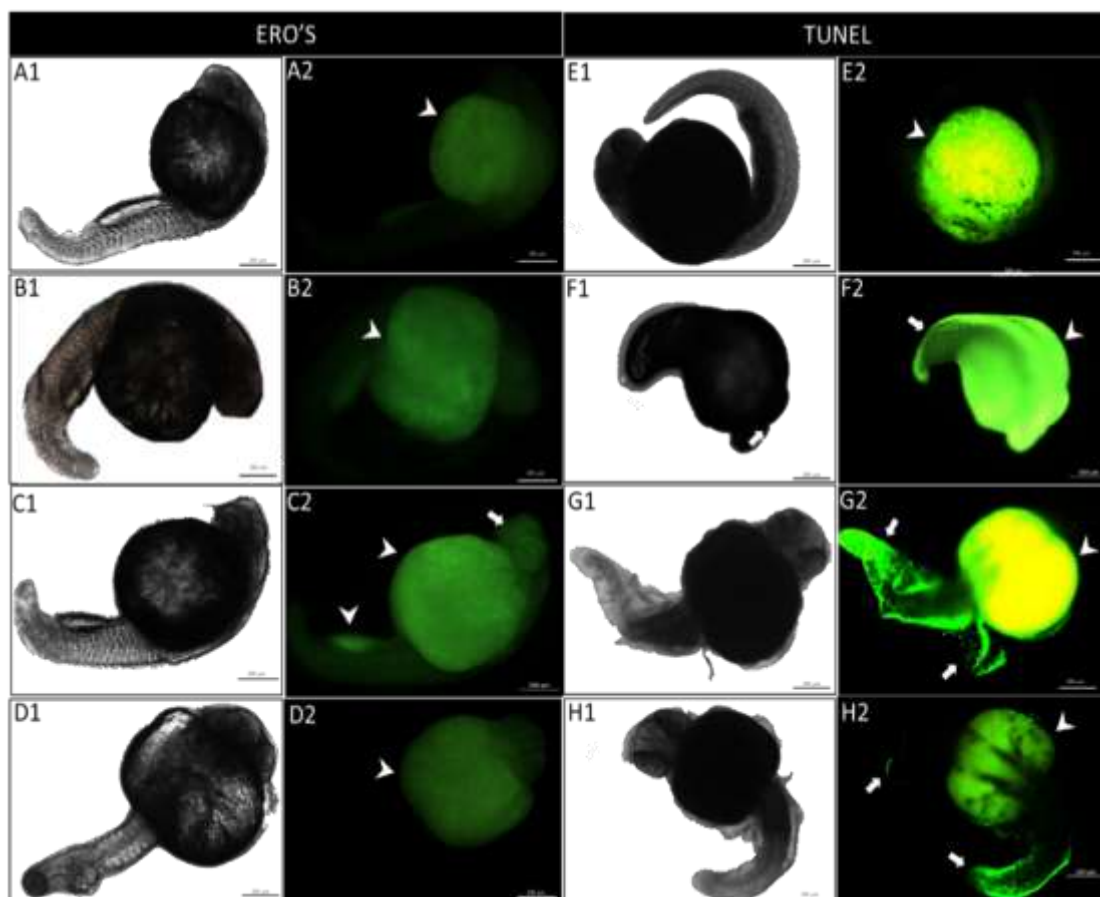


Figura 6. Emissão de fluorescência pelos embriões de zebrafish (*D. rerio*) afetados pela formação de ERO's e fragmentação do DNA após a vitrificação. A e E: Grupo controle (Não criopreservado - Sem inclusão de melatonina); B e F: Tratamento 1 (Criopreservado - Sem inclusão de melatonina); C e G: Tratamento 2 (Criopreservado - Inclusão de 10^{-6} M de melatonina) e; D e H: Tratamento 3 (Criopreservado - Inclusão de 10^{-3} M de melatonina). Cabeça de flecha aponta fluorescência natural da camada vitelínica; Flecha aponta áreas dos embriões afetadas pela formação de ERO's (2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato) e fragmentação de DNA (TUNEL).

Discussão

De maneira geral, todos os embriões que passaram pelos processos de vitrificação e descongelamento, com ou sem inclusão de melatonina, sofreram danos consideráveis que inviabilizaram sua sobrevivência. Contudo, a constatação de que os embriões mantiveram sua estrutura morfológica intacta durante o armazenamento, iniciando o processo apoptótico, apenas após a retirada do nitrogênio líquido, revela que a vitrificação é uma opção promissora para a criopreservação desse tipo de material, e pode ser o caminho para a descoberta de um protocolo eficaz para este fim nos próximos anos.

Keivanloo e Sudagar (2013a e 2016a) chegaram a mesma conclusão ao investigarem a viabilidade da vitrificação em embriões de esturjão persa (*Acipenser persicus*) com diferentes soluções e temperaturas de descongelamento (0 ou 20°C), sendo que, embora tenham obtido 100% de mortalidade, observaram que a vitrificação realizada com soluções à base de DMSO é possível, e que esta técnica é uma boa ferramenta para a criopreservação de embriões de peixes.

As crio-lesões mais observadas pela avaliação visual do descongelamento e análise de microscopia eletrônica de varredura nos embriões após a vitrificação foram: camada sincicial vitelínica com formas, tamanhos e espessuras irregulares e rompidas; e lesões na camada epidérmica mais externas dos embriões, como invaginações, enrugamento e perfurações. Embora essas lesões da camada epidérmica sejam consideradas crio-lesões reversíveis, isto é, que podem ser corrigidas apenas pelo ajuste nas concentrações de crioprotetores ou no processo de reidratação, o rompimento da camada sincicial vitelínica (CSV) foi determinante para o insucesso da vitrificação dos embriões de zebrafish neste estudo.

Crio-lesões similares foram observadas em embriões de *Piaractus mesopotamicus* congelados (extravasamento de vitelo e presença de blastoderme danificada), as quais foram responsáveis pela mortalidade total dos embriões (Fornari et al, 2010). Para esta mesma espécie, a análise morfológica dos embriões após o descongelamento demonstrou alterações consideráveis em microscópio óptico e por microscopia eletrônica de varredura, como camada sincicial vitelínica irregular; e lesões no blastoderme, fatores que inviabilizaram a eclosão dos embriões de *P. mesopotamicus* (Neves et al, 2012). Em embriões de *Prochilodus lineatus*, após a criopreservação, também houve a presença de alterações ultraestruturais como o enrugamento e o extravasamento do vitelo, culminando na completa mortalidade dos embriões (Ninhaus-Silveira et al., 2008).

O efeito do resfriamento está intimamente ligado a sensibilidade de cada tipo de célula ao choque por frio, neste sentido, acredita-se que estrutura celular mais prejudicada e a primeira a sofrer com crio-lesões seja a membrana plasmática (Herráez, 2009). Em situações em que a solução crioprotetora não é eficiente, a membrana plasmática celular pode se desorganizar no momento da transição líquido-sólido, perdendo sua formação mosaico fluído típica, e interfere em sua permeabilidade e na composição de suas proteínas de membrana, entre elas, aquelas que formam os canais permeáveis e as ligações celulares, causando danos ao citoesqueleto celular que facilita o extravasamento do

material intracelular e o rompimento de tecidos frágeis como a camada sincicial vitelínica (CSV) (Harvey, 1983).

A CSV tem sido considerada um dos principais obstáculos para o sucesso criopreservação de embriões de peixes, possuindo características extremamente particulares com relação ao restante dos tecidos embrionários (microvilosidades na região de contato com o endoderma do vitelo, grande massa citoplasmática, alta quantidade de mitocôndrias, vacúolos e ribossomos, existência de complexas redes de endomembranas e núcleos eucromáticos), além de uma intensa atividade metabólica com a função de sustentar, separar e tornar disponível o vitelo para o embrião (Ninhaus-Silveira, 2006). Em embriões de *D. rerio* descorionizados como modelo para estudo da permeabilidade à crioprotetores, a camada sincicial vitelínica pode desempenhar um papel crítico limitante permeação crioprotetora em todo o embrião (Hagedorn et al, 2004). Desta forma, tornam-se indispensáveis que estudos futuros relacionados a criopreservação de embriões de peixes, realizem ensaios prévios levando em consideração a concentração e a ação dos crioprotetores nesta camada em específico.

A expressão dos genes codificadores das proteínas envolvidas no processo apoptótico (Anti-apoptose - Bcl-2 e pró-apoptose – Bax/Caspase-3) apresentou baixos níveis para os embriões que não passaram pela vitrificação, revelando que em embriões vivos e saudáveis de peixes esses genes podem ser muito pouco expressos. Este resultado pode estar associado ao estágio de desenvolvimento escolhido (22-24 somitos), mas, observa-se o aumento da expressão dos referidos genes apenas após o desencadeamento de algum processo apoptótico, exceto para CASPASE-3 no tratamento 2. Felici et al. (1999), ao analisarem células germinativas primordiais de camundongo pelas técnicas de imunohistoquímica e imunoblotting não detectaram a expressão dessas proteínas e que esse resultado poderia estar associado ao estágio de desenvolvimento dos embriões. Por outro lado, Zhu et al. (2008) constataram o aumento da expressão dessas proteínas somente após a indução de estresse aos embriões, sugerindo que quanto menores forem as expressões dos três genes, menos eventos apoptóticos estão ocorrendo no embrião.

O padrão de expressão dos genes codificadores das proteínas Bcl-2, Bax e Caspase-3 acontece da seguinte forma: Embriões saudáveis possuem maior expressão Bcl-2 em relação a Bax/Caspase-3, enquanto em embriões com grande incidência de eventos apoptóticos isto se inverte, e a expressão do gene Bcl-2 diminui enquanto a de Bax/Caspase-3 se eleva. Sun et al. (2002), ao compararem blastocistos fragmentados e normais de camundongo verificaram que os níveis de *Bcl-2* tenderam a ser menores nos

fragmentados. Em oócitos e embriões bovinos produzidos *in vitro*, a expressão de Bcl-2 foi maior em amostras de boa qualidade e menor em embriões fragmentados, enquanto a expressão de Bax foi encontrada em todos os tipos de oócitos e embriões, mas com maior expressão nas amostras fragmentadas (Yang e Rajamahendran, 2002). Em adição, a inclusão de melatonina (10^{-3}M) na solução vitrificante de embriões bovinos melhorou significativamente a qualidade pós descongelamento, diminuiu consideravelmente a quantificação relativa da expressão dos genes Bax e Caspase-3 e aumentou a expressão de Bcl-2 (Zhao et al., 2016).

No presente estudo, embriões vitrificados com inclusão de melatonina (10^{-6}M e 10^{-3}M) seguiram este padrão, e apresentaram menor expressão do gene Bax em relação a Bcl-2. Embora o tratamento 3 (10^{-9}M de melatonina) tenha apresentado expressão de Bcl-2 mais elevadas que o tratamento 2 (10^{-6}M de melatonina), considera-se que o melhor resultado tenha sido apresentado pelo tratamento 2, já que sua expressão de Bax e Caspase-3 também se mantiveram baixos ($p < 0,05$). Por outro lado, os embriões vitrificados sem melatonina, possuíram maior expressão do gene Bax (pró-apoptótico) em relação a Bcl-2 (anti-apoptótico), mostrando que a ausência da melatonina afetou sua resistência a apoptose ($p < 0,05$).

Com isso, uma vez que o menor nível de inclusão de melatonina (10^{-6}M) apresentou os melhores resultados com relação à expressão dos genes envolvidos no processo apoptótico em relação ao maior nível de inclusão (10^{-3}M), pode-se supor que uma sobre dose deste hormônio pode estar envolvida em um processo de suprarregulação que afeta negativamente as células. Felici et al. (1999) obtiveram resultados parecidos ao examinaram a expressão das proteínas Bcl-2 e Bax em células germinativas primordiais e oócitos fetais de camundongos, observando que ambas as proteínas foram suprarreguladas quando passaram pelo processo apoptótico em cultura. Desta forma, recomenda-se a realização de estudos utilizando menores níveis de melatonina (10^{-9}M e/ou 10^{-12}M), para a confirmação destes resultados.

A vitrificação de oócitos tem mostrado estar intimamente associada com níveis aumentados de espécies reativas de oxigênio (ERO's) e eventos apoptóticos, no entanto, pouca informação está disponível sobre o efeito da melatonina nos níveis de ERO's e eventos apoptóticos em oócitos vitrificados.

Embora a vitrificação tenha aumentado a formação de ERO's em relação aos embriões não criopreservados, os níveis de inclusão de melatonina não interferiram nos tratamentos criopreservados. Resultados diferentes do observado por Zhao et al. (2014) e

Zhao et al. (2016), que demonstraram que a inclusão de melatonina na solução crioprotetora diminuiu significativamente a formação de ERO's em embriões bovinos vitrificados. Este resultado divergente, pode ter sido causado pelo seguinte fator: embora o zebrafish (*D. rerio*) tenha se mostrado um bom modelo para a realização desta metodologia, principalmente por sua característica transparente que torna possível a fácil visualização de células apoptóticas, a ineficácia da solução vitrificante, que não protegeu a grande quantidade de vitelo da formação de ERO's, elevando consideravelmente a fluorescência emitida pelas amostras, pode ter prejudicado a constatação de diferenças significativas entre os tratamentos.

Da mesma forma, a reserva vitelínica também foi um problema para a análise de fragmentação do DNA por TUNEL, apresentando fluorescência natural ao reagente já que esta camada não possui DNA para ser fragmentado, mas, no entanto, foi possível a constatação de diferenças entre os tratamentos. Os tratamentos criopreservados com melatonina, tratamento 2 ($53,93 \pm 18,50\%$) e tratamento 3 ($45,41 \pm 10,20\%$) apresentaram redução significativa na presença de DNA fragmentado com relação ao tratamento 1 (Criopreservado, sem melatonina – $79,74 \pm 1,00\%$), chegando a ser comparável aos embriões não criopreservados do grupo controle. Resultados que corroboram os encontrados por Yabu et al. (2001), que observaram que a indução da apoptose por estresse ambiental (Choque térmico a 39°C por 1h, luz ultravioleta e irradiação de raios-G) em embriões de zebrafish produziu muitas células TUNEL-positivas, a partir da formação de extensos danos ao embrião, do aumento da atividade da caspase-3 e dos níveis de fragmentação de DNA. Uma alternativa apontada por Liu et al. (2001) para a solução dos problemas relacionados a reserva vitelínica é a sua remoção manual parcial (50%) antes da vitrificação, fato que facilita a realização das análises com fluorescência além de aumentar a resistência a crio-lesões.

Conclusão

Embora a solução vitrificante utilizada para a vitrificação de embriões de zebrafish (*D. rerio*) não tenha protegido adequadamente todas as regiões, especialmente a camada sincicial vitelínica, a nível molecular, a inclusão de 10^{-6}M de melatonina, melhorou a resposta ao processo apoptótico pós-descongelamento dos embriões, principalmente quanto à expressão dos genes envolvidos na apoptose e à fragmentação do DNA. Este resultado é muito importante pois contribui para a futura elaboração de um protocolo adequado para a vitrificação deste tipo de material.

Agradecimentos

Essa pesquisa foi desenvolvida a partir de uma parceria da Universidade Estadual de Maringá e Universidade da Tasmânia, com recursos providos pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/Brasil).

Referências bibliográficas

- AMSTERDAM, A.; HOPKINS, N. Mutagenesis strategies in zebrafish for identifying genes involved in development and disease. **Trends genetic**, v.22, n.9, p.473-478, 2006.
- ASHRAFI, I.; KOHRAM, H.; ARDABILI, F. F. Antioxidative effects of melatonin on kinetics, microscopic and oxidative parameters of cryopreserved bull spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.139, n.1-4, p.25– 30, 2013.
- BARRIENTOS A. In vivo and in organelle assessment of OXPHOS activities. **Methods**, v.26, n.4, p.307–316, 2002.
- BLAXTER, J. H. S. Sperm storage and cross fertilization of spring and autumn spawning herring. **Nature**, v.172, n.1, p.1-12, 1953.
- CAETANO, J. P. J.; COTA, A. M. M.; LAMAITAI, R. M. Criopreservação de Embriões e Banco de Embriões. In: **Criopreservação de gametas, embriões e tecidos germinativo em laboratório de fertilização in vitro**. Rio de Janeiro: Cultura
- CHEN, J. Y.; LI, X. X.; XU, Y. K. Developmental competence and gene expression of immature oocytes following liquid helium vitrification in bovine. **Cryobiology**, v.69, n.3, p.428–433, 2014.
- DA SILVA, C. M.; MACÍAS-GARCÍA, B.; MIRÓ-MORÁN, A.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, L.; MORILLO-RODRIGUEZ, A.; ORTEGA-FERRUSOLA, C.; GALLARDO-BOLAÑOS, J. M.; STILWELL, G.; TAPIA, J. A.; PEÑA, F. J. Melatonin reduces lipid peroxidation and apoptotic-like changes in stallion spermatozoa. **Journal of Pineal Research**, v.51, n.2, p.172–179, 2011.
- DIGMAYER, M. Influência da baixa temperatura e diferentes crioprotetores em oócitos e embriões de *Collossoma macropomum* e *Piaractus brachypomus*. 2013. **Tese** (Doutorado em produção animal), Universidade Estadual de Maringá, Maringá.
- ESPINO, J.; BEJARANO, I.; ORTIZ, A.; LOZANO, G. M.; GARCÍA, J. F.; PARIENTE, J. A.; RODRÍGUEZ, A. B. Melatonin as a potential tool against oxidative damage and apoptosis in ejaculated human spermatozoa. **Fertility and Sterility**, v.94, n.5, p.1915-1917, 2010.

- FALCONER, D. S. **Introdução a genética quantitativa**. Viçosa, Minas Gerais, ed. UFV, 1987.
- FAVETTA, L. A.; ST JOHN, E. J.; KING, W. A.; BETTS, D. H. High levels of p66shc and intracellular ROS in permanently arrested early embryos. *Free Radical **Biology and Medicine***, v.42, n.8, p.201–1210, 2007.
- FELICI, M. D.; CARLO, A. D.; PESCE, M.; IONA, S.; FARRACE, M. G.; PIACENTINI, M. Bcl-2 and Bax regulation of apoptosis in germ cells during prenatal oogenesis in the mouse embryo. *Cell Death Differ*, v.6, n.9, p. 908-915, 1999.
- FORNARI, D. C.; RIBEIRO, R. P.; STREIT, D. P.; VARGAS, L.; BARRERO, N. M.; DE MORAES, G. V. Freezing injuries in the embryos of *Piaractus mesopotamicus*. *Zygote*, v. 2, n.4, p.345-350, 2010.
- FORNARI, D. C.; RIBERO, R. P.; STREIT, D. P.; VARGAS, L.; GODOY, L. C.; OLIVEIRA, C. A.; DIGMAYER, M.; GALO, J. M.; NEVES, P. R. Increasing storage capability of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) embryos by chilling: development of a useful methodology for hatcheries management. *Cryo Letters*, v.33, n.2, p.126-34, 2012.
- FORSTERMANN, U.; BOISSEL, J. P.; KLEINERT, H. Expressional control of the ‘constitutive’ isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *Faseb Journal*, v.12, n.10, p.773–790, 1998.
- HAGEDORN, M.; PETERSON, A.; MAZUR, P.; KLEINHANS, F. W. High ice nucleation temperature of zebrafish embryos: slow-cooling is not an option. *Cryobiology*, v.49, p.181–189, 2004.
- HARVEY, B. Cooling of embryonic cells, isolated blastoderms, and intact embryos of the zebra fish *Brachydanio rerio* to -196 degrees C. *Cryobiology*, v.20, n.4, p.440-447, 1983.
- HERRÁREZ, M. P. Criopreservación de gametas y embriones. In: **La reproducción de los peces: Aspectos básicos y sus aplicaciones em acuicultura**. Madrid: Fundación Observatorio Español de Acuicultura, 2009. p.477-530.
- HWANG, I. S.; HARA, H.; CHUNG, H. J. Rescue of vitrified warmed bovine oocytes with rho-associated coiled-coil kinase inhibitor. *Biology Reproduction*, v.89, n.2, p.89-26, 2013.

- JANG, W.; LEE, S. E.; CHOI, H. Y. Vitrification of immature mouse oocytes by the modified-cut standard straw method. **Cell Biology International**, v.38, n.2, p.164–171, 2014.
- KANG, J. T.; KOO, O. J.; KWON, D. K. Effects of melatonin on in vitro maturation of porcine oocyte and expression of melatonin receptor RNA in cumulus and granulosa cells. **Journal of Pineal Research**, v.46, n.1, p.22–28, 2009.
- KEIVANLOO, S.; SUDAGAR, M. Feasibility Studies on Vitrification of Persian Sturgeon (*Acipenser persicus*) Embryos. **J Aquac Res Development**, v.4, n.3, 2013.
- KEIVANLOO, S.; SUDAGAR, M. Cryopreservation of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) embryos by DMSO-based vitrificant solutions. **Theriogenology**, v.85, n.1, p.1013–1018, 2016.
- LAHNSTEINER F. The effect of internal and external cryoprotectants on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Theriogenology**, v.69, n.1, p.384–396, 2008.
- LIU, X. H.; ZHANG, T.; RAWSON, D. M. Differential scanning calorimetry studies of intraembryonic freezing and cryoprotectant penetration in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **J Exp Zool**. v.290, n.3, p.299–310, 2001.
- NEVES, P. R.; RIBEIRO, R. P.; STREIT, D. P.; NATALI, M. R. N.; FORNARI, D. C.; SANTOS, A. I.; GODOY, L. C. Injuries in pacu embryos (*Piaractus mesopotamicus*) after freezing and thawing. **Zygote**, v.22, n.1, p. 25-3, 2012.
- NINHAUS-SILVEIRA, A. Desenvolvimento embrionário e preservação criogênica de embriões do curimatá *Prochilodus lineatus* (Steindachner, 1881) (Teleostei, Prochilodontidae). **Tese**. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, 2004.
- NINHAUS-SILVEIRA, A.; FORESTI, F.; AZEVEDO, A. Structural and ultrastructural analysis of embryonic development of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiforme; Prochilodontidae). **Zygote**, v.14, p.217–29, 2006.
- NINHAUS-SILVEIRA, A.; FORESTI, F.; AZEVEDO, A.; AGOSTINHO, C. A.; VERISSIMO-SILVEIRA, R. Cryogenic preservation of embryos of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiforme; Prochilodontidae). **Zygote**, v.7, n.1, p.45–55, 2008.
- OLTVAI, Z. C. Bcl-2 Heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. **Cell**, v.74, n.4, p.609–619, 1993.
- ORTIZ, A.; ESPINO, J.; BEJARANO, I.; LOZANO, G. M.; MONLLOR, F.; GARCÍA, J. F.; PARIENTE, J. A.; RODRÍGUEZ, A. B. High endogenous melatonin concentrations enhance sperm quality and short-term in vitro exposure to melatonin

- improves aspects of sperm motility. **Journal of Pineal Research**, v.50, n.2, p.132–139, 2011.
- RAWSON, D. M.; ZHANG, T.; KALICHARAN, D.; JONGEBLOED, W. L. Field emission scanning electron microscopy and transmission electron microscopy studies of the chorion, plasma membrane and syncytial layers of the gastrula-stage embryo of the zebrafish *Brachydanio rerio*: a consideration of the structural and functional relationships with respect to cryoprotectant penetration. *Aquaculture research*, v.31, n.3, p.325-336, 2001.
- RUBINSTEIN, A. L. Zebrafish: from disease modelling to drug discovery. **Current Opinion in Drug Discovery Development**, v.6, n.2, p.218–223, 2003.
- SAS institute. **SAS/STAT software: changes and enhancements**. Cary: SAS Institute, 1992.
- SILVEIRA, T. R.; SCHNEIDER, C.; HAMMES, T. O. Zebrafish: modelo consagrado para estudos de doenças humanas. **Ciências e cultura**, v.64, n.2, p.4-5, 2012.
- SIMON, H. U.; HAJ-YEHIA, A.; LEVI-SCHAFFER, F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. **Apoptosis**, v.5, n.5, p.415–418. 2000.
- SHI, J. M.; TIAN, X. Z.; ZHOU, G. B. Melatonin exists in porcine follicular fluid and improves in vitro maturation and parthenogenetic development of porcine oocytes. **Journal of Pineal Research**, v.47, n.4, p.318–323, 2009.
- SORRELLS, S.; TORUNO, C.; STEWART, R. A.; JETTE, C. Analysis of apoptosis in zebrafish embryos by whole-mount immunofluorescence to detect activated Caspase 3. **Journal of visualized experiments**, on-line, 2013.
- SUCCU, S.; BERLINGUER, F.; PASCIU, V.; SATTA, V.; LEONI, G. G.; NAITANA, S. Melatonin protects ram spermatozoa from cryopreservation injuries in a dose-dependent manner. **Journal of Pineal Research**, v.50, n.3, p.310–318, 2011.
- SUN, F.; AKAZAWA, S.; SUGAHARA, K.; KAMIHIRA, S.; KAWASAKI, E.; EGUCHI, K.; KOJI, T. Apoptosis in normal rat embryo tissues during early organogenesis: the possible involvement of Bax and Bcl-2. **Arch Histol Cytol**, v.65, n.2, p.145-57, 2002.
- STEHLE, J. H.; SAADE, A.; RAWASHDEH, O. A survey of molecular details in the human pineal gland in the light of phylogeny, structure, function and chronobiological diseases. **Journal of Pineal Research**, v.51, n.1, p.17–43, 2011.
- YABU, T.; TODORIKI, S.; YAMASHITA, M. Stress-induced apoptosis by heat shock, UV and gamma-ray irradiation in zebrafish embryos detected by increased caspase

- activity and whole-mount TUNEL staining. **Fisheries Science**, v.67, n.2, p.333-340, 2001.
- YANG, H. W.; HWANG, K. J.; KWON, H. C. Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. **Human Reproduction**, v.13, n.4, p.998–1002, 1998.
- YANG, M. Y.; RAJAMAHENDRAN, R. Expression of Bcl-2 and Bax proteins in relation to quality of bovine oocytes and embryos produced in vitro. **Anim Reprod Sci**, v.15, n.70, p.159-169, 2002.
- ZHANG, T.; RAWSON, D. M. Studies on chilling sensitivity of zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos. **Cryobiology**, v.32, n.3, p.239-246, 1995.
- ZHAO, X. M.; MIN, J. T.; DU, W. H. Melatonin enhances the in vitro maturation and developmental potential of bovine oocytes denuded of the cumulus oophorus. **Zygote**, v. 29, n.4, p.1–12, 2014.
- ZHAO, X. M.; HAO, H. S.; DU, W. H.; ZHAO, S. J.; WANG, H. Y.; WANG, N.; WANG, D.; LIU, Y.; QIN, T.; ZHU, H. B. Melatonin inhibits apoptosis and improves the developmental potential of vitrified bovine oocytes. **Journal of Pineal Research**, v.60, n.2, p.132–141, 2016.
- ZHU, S.; KORZH, V.; GONG, Z.; LOW, B. C. RhoA prevents apoptosis during zebrafish embryogenesis through activation of Mek/Erk pathway. **Oncogene**, v.27, n.11, p.1580-1589, 2008.

-CAPÍTULO III-

Comparative gonad histology and sperm quality of normal (XY) and neo-male (XX) Atlantic salmon (*Salmo salar*) - Implications for hatchery production

Abstract

The neo-males (genotype XX) are mainstay to generating monosex all-female stocks for Atlantic salmon (*Salmo salar*) farming. However, unlike normal males (genotype XY) the brood stock management and breeding of neo-males is arduous and complex as they take longer to mature and do not readily express milt. The reasons for this are less known. With an overarching objective of improving hatchery production of all-female progeny, this study comparatively evaluated gonad morphology, sperm quality and gonad histology of normal and neo-males of the Atlantic salmon. Morphological and histological observations revealed that the testis of neo-males were irregularly (sac like and asymmetrical) shaped, with poorly formed seminiferous ducts, and had higher proportions of interstitial tissue ($P < 0.05$) hypertrophied Sertoli cells and cysts of epithelial hyperplasia. Collectively these abnormalities appear to form a physical barrier, precluding the collection of semen by standard stripping techniques, instead forcing their extraction by testicular fragmentation—a practice thought to reduce semen quality. This was reflected in the stark and significant differences observed in seminal quality between the genotypes. Specifically, sperm motility ($80.69 \pm 2.4\%$ for XY and $57.2 \pm 36.5\%$ for XX) and duration of motility ($99.31 \pm 28.03\text{sec}$ for XY and $66.84 \pm 23.83\text{sec}$ for XX) of neo-males were most compromised ($P < 0.05$). Interestingly, the TUNEL assay indicated no signs of apoptotic/deteriorating tissue suggesting that the histological differences may relate to delayed physiological/sexual maturity of the XX-males and thus offer opportunity for improving brood stock management and breeding practices that may translate to higher and consistent fertilization rates.

Key words: genotype, histology, reproductive parameters

1. Introduction

The Atlantic salmon (*Salmo salar*) aquaculture is one of the most economically lucrative, competitive and rapidly growing industry with ever increasing ecological footprint, demanding that production entities maximise efficiency during all the stages of

production, including seed propagation (Asche et al. 2005; FAO, 2016). As a consequence of this and its commercial fisheries significance, the reproductive biology of the species has been already researched intensively. However, there is considerable gap in knowledge on the development of neo-male (genotype XX) testis and quality of its sperm in comparison to that of normal males (genotype XY) (Geffen and Evans, 2000; Kowalski et al., 2011; Parodi et al, 2015; Vikingstad et al., 2016). This lack of knowledge often results in inconsistencies and compromises seed production efficiencies in commercial hatcheries.

Typically, commercial propagation of Atlantic salmon relies on crossing homogametic brood stock i.e. normal females (XX) and neo-males (XX) which results in the production of 100% female offspring. Monosex farming of all-female stock is favoured in most salmonids as females have extremely favourable production traits compared to males (Hunter et al. 1983; Lincoln & Scott 1983; Galbreath et al. 1994; Elliott and Kube, 2009). For example, precocious maturity of male Atlantic salmon is directly attributed to economic losses owing to reduction of consumer acceptance of the final product (Galbreath et al. 1994; Isler 2009; Davidson et al. 2009). The losses are a collective consequence of reduction in intensity of the orange colour of meat, retarded growth, increases in mortality and undesirable body changes such as the development of the lower jaw in the form of a hook and the hunchback in the dorsal region that leave the fish with an unpleasant appearance (Galbreath et al. 1994; Isler 2009; Davidson et al. 2009).

Methods to produce female monosex populations in salmonids began in the 1970s and 1980s mainly for Atlantic salmon (*S. salar*), rainbow trout (*O. Mykiss*), coho salmon (*O. kisutch*) and chinook salmon (*O. tshawytscha*) (Hunter et al. 1983; Donaldson, 1996). Of all the approaches, crossing homogametic brood fish i.e. normal female (XX) with neo-males (XX) is a preferred industry practice. The production of neo-males is achieved by feeding masculinizing hormones (e.g. 17- α -Methyltestosterone) to the larvae at first feeding (Johnstone et al. 1979, Goryczko et al. 1991). The treatment results in genetically female individuals to express the male phenotype, which on sexual maturity produce sperm that carry only X-chromosome (Isler, 2009; Eisbrenner, 2014) and when mated with normal female, produce all female progeny.

Unlike normal males the brood stock management of neo-males in most cases is relatively difficult and complex, as they take longer to mature and do not readily express milt. The reasons for this are less known. Usually, the mature neo-males display all the

secondary sexual characters of a mature normal male, but their testis tend to develop into blind sacs i.e. without apparent connection to urogenital opening, conceivably precluding the external expression of milt/sperm using standard hatchery stripping techniques. Therefore, the neo-male gametes can only be extracted directly from the interior of the gonads after sacrifice and dissection (Bye and Lincoln, 1986). In a closely related species, rainbow trout (*O. mykiss*) the presence of cysts composed of hypertrophied Sertoli cells only in the neo-male gonads have been reported (Kowalski et al. 2011). Further, these cysts are thought to preclude natural expression of milt/sperm, reduce seminal fluid quality as well as impede extraction of sperm for hatchery propagation (Kowalski et al. 2011). However, occurrence of such cyst like structures in the testis of Atlantic salmon neo-males has not yet been reported.

Analysis and verification of semen quality prior to its use in artificial propagation is critical to obtain high rates of fertilization. For fish, the most used seminal qualitative parameters are: motility (Parodi et al., 2015), concentration (Yang et al., 2017) and total abnormalities (Dadras et al., 2017). Sperm membrane integrity and adenosine triphosphate (ATP) concentration have also been used (Geffen and Evans, 2000). However, sperm motility index is consented to be the most important parameter for defining the quality of a semen sample (Parodi et al., 2014 and 2015). Increasingly, the use of Computer-assisted sperm analysis (CASA) as an easy, fast and precise tool for establishing multiple sperm motility indices has gained credence (Kowalski et al. 2011).

With an overarching objective of improving hatchery production of all-female progeny of Atlantic salmon (*S. salar*), this study comparatively evaluated the sperm quality of normal (genotype XY) and neo (genotype XX) males as well as histologically examined their gonads. The study establishes baseline data to assist in refining the generation, management and or priming of neo-male brood stock for production of all female Atlantic salmon progeny.

2. Materials and methods

2.1 Source of animals

The brood fish used were maintained by Huon Aquaculture Limited at the Inland Fisheries Service salmonid hatchery, New Norfolk, Tasmania, Australia. Fish were held in re-circulatory tanks under controlled photoperiod and water quality as per standard hatchery practices of the company (Appendix B, figure 1B). Males of both XY and XX genotypes received the same diet. In all, four normal males and seven neo-males

(generated by masculinization during early larval development) were used in the study. The animals were chosen based on secondary sexual characteristics i.e. body colour, shape of the jaw, and colouration of the urogenital papilla. The XY and XX males were four years old and came from the same brood, but were distinguished by their ability (XY) or lack (XX) to express milt as per standard hatchery practices.

2.2 Collection/Extraction of semen

As the neo-males do not freely express milt, the semen collection of both genotypes was standardized by extracting directly from the dissected testis. Prior to dissection, the animals were euthanized by anaesthesia (AQIS concentration), weighed, and length measured. Upon dissection, the testis were removed carefully and their weight and dimensions measured. The gonadosomatic index (GSI) for each fish was calculated according to the following formula: $GSI\% = \text{Testis weight} / \text{Body weight} \times 100$. Prior to harvesting milt, the testis were wiped dry to avoid contamination from blood and other residues. Left lobe of the testis (from each fish) was fixed in buffered formalin (4%, pH 7.2) for histological analysis, while the right lobe used for extracting semen. For sperm extraction, the right lobe was placed in a metal sieve (mesh size 0.25 mm), fragmented using a scalpel and the milt/semen allowed to drain naturally in a clean and dry plastic pot for 20 minutes. Key steps involved in extracting the semen are presented in figure 1.



Figure 1. Flow chart showing the steps used for extraction of milt/semen.

2.3 Qualitative and quantitative analyses of semen

After draining fragmented testis for 20 minutes the semen was collected using a 50ml syringes and the total volume was measured. Semen colour and consistency were visually evaluated as described before (Mataveli, 2007). Colour and texture schemes included white, pink or yellow and cream, milky or aqueous respectively. The pH of the semen was also measured using dip sticks (pH range 0-14; Machery-Nagel GmbH & Co., Düren, Germany). Briefly, a drop of semen sample was placed on the indicator stick for 30sec, removed by flicking and the pH recorded.

2.3.4 Sperm concentration

In a pre-labelled microfuge tube (2 mL), 2 μ L of semen was diluted in 1998 μ L of buffered saline formaldehyde (FST), resulting in a dilution factor of 1:1000. The diluted sperm was loaded on to a hemocytometer (Neubauer) and the number of spermatozoa counted in five large squares, in duplicate. The average number of spermatozoa per mm² was calculated and expressed as spermatozoa per millilitre of semen, using the formula:

$$\text{Sperm concentration (spz/mL)} = \frac{\text{total number of cells}}{\text{number of squares counted}} \times \text{dilution factor} \times 10 \times 1000$$

2.3.5 Computer-assisted sperm analysis (CASA)

All CASA analyses were carried out at ambient temperature, in a commercial hatchery set up. One microliter of semen was diluted in 999 μ L of glycine-based activating solution (0.15M sodium chloride, 0.1M Tris, 0.02M Glycine, 1L of distilled water). Immediately, 3 μ L of the activated sample was transferred to semen analysis chamber (Leja®, Nieuw-Vennep, Netherlands). The sperm motility was recorded using the Dino-Lite AM4023 image capture system and AMCap recording software under a phase contrast microscope (40X) until the sample had negligible (<1%) motility. The time between the semen activation/dilution and the beginning of the video was recorded in order to analyse the sperm motility of all the samples at the same post activation time point. Any sample not recorded within 20 seconds post activation was discarded and the measure repeated. Each semen sample was measured in duplicate.

The videos were converted to required file format (*.avi, 10 frames/second) and then analysed using the ImageJ (Java) Computer-assisted sperm analysis (CASA) plug-in. Standardized handling methods and software configurations (Supplementary table 1)

suitable for Atlantic salmon semen (Dziewulska et al. 2011 and Parodi et al. 2015) were employed. The motility indices obtained were percentage of motile sperm (MOT), percentage of linearity (LIN), progression (PROG, μm), straight line velocity (VSL, $\mu\text{m/s}^{-1}$), curvilinear Velocity (VCL, $\mu\text{m/s}^{-1}$), average path velocity (VAP, $\mu\text{m/s}^{-1}$), percentage of wobble (WOB) and beat cross frequency (BCF, Hz) (Appendix B, figure 2B).

2.3.6 Duration of sperm motility

The duration of sperm motility was calculated as the sum of the times between sperm activation and beginning of video recording and duration of the video (i.e. from time of activation to end of video recording), which ended when the spermatozoa in the field had negligible (< 1%) motility.

2.3.7 Viability of sperm cells

The viability of sperm cells was evaluated using Trypan Blue exclusion test. In this test, the integrity of the plasma membrane is determined by the ability of viable cells to exclude trypan blue, whereas unviable cells stain blue (Lubzens et al., 1997; Figueroa, 2016). Briefly, 1 μL of semen was diluted in 999 μL of Ringer's semen extender (0.1M of Sodium chloride, 0.04M of Potassium chloride, 0.002M of Sodium hydrogen carbonate, 0.003M of Calcium chloride, 850ml of Distilled water and 150ml of Methyl Alcohol, pH 8), resulting in a dilution factor of 1:1000. Then, in a new tube, a 10 μL aliquot of this dilution was mixed with an equal amount of 0.4% Trypan Blue solution (pH 7.2) and immediately transferred to a hemocytometer (Neubauer chamber). The total number of cells and the number of non-viable cells were counted in phase contrast microscope (40X). Percentage of viable cells was calculated as below:

$$\% \text{ viable cells} = \left[1.00 - \left(\frac{\text{Number of unstained cells}}{\text{Total number of cells}} \right) \right] \times 100$$

2.3.8 Structural abnormalities of sperm

Structural abnormality criteria were developed based on those described for *Piaractus mesopotamicus* (Streit jr, 2006), *Oreochromis niloticus* (Mataveli, 2007 and Kavamoto, 1999) and *Gadus mohua* (Butts et al. 2010). Broadly these were grouped as primary (broken, coiled and degenerate tail, macrocephaly, microcephaly and abaxial tail insertion) and secondary (folded tail, loose head, loose tail, proximal and distal

cytoplasmic droplets) abnormalities, in addition the abnormalities broken, coiled and folded tail were classified according to their position (Close to the acrosome, fore, middle and tip of the tail) (Appendix B, figure 3B). For analyses, smears (duplicate) were prepared from semen samples diluted in buffered formalin (1:1000) from each fish in duplicate. The smears were air dried, washed in absolute ethyl alcohol (10 minutes), stained with Bengal rose (3% solution for 10 minutes) and air dried. A total of 150 spermatozoa on each slide (totalling 300 sperm per male), were evaluated in a phase contrast microscope (objective of 100x).

2.4 Histology

Samples of approximately 2 cm³ were collected from the proximal region of the formalin fixed left testis of each fish, and transferred to tissue processing cassettes (Mega-Cassete®) and placed in 70% ethanol solution ready for histological processing. The fixed tissue was wax embedded in Sakura/Miles Tissue-Tek Vip 3000 Tissue Processor (GMI, Minneapolis, Minnesota, USA) and sectioned at 3µm thickness using a microtome (Leica 1512). Eight slides were prepared for each male (four for H&E stain and four for TUNEL assay).

2.4.1 Hematoxylin/Eosin (H&E) staining

H&E staining followed standard protocols. Briefly, the tissue sections were first kept overnight in incubator at 60° C, followed by sequential rinses in xylene and ethanol 100% and 70% for complete wax removal, then stained with Hematoxylin/Eosin and mounted with DPX. Photo-micrographs were captured using a Leica DM750 phase contrast microscope equipped with a Leica DFC420 camera, at were 10 and 40X magnification. Interstitial tissue area, number and size of the Sertoli cells, and number of cysts (when two or more Sertoli cells clustered) were evaluated from the measurement and quantification for each male in two fields of 1mm² chosen randomly.

2.5 TUNEL assay

Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP Nick-End Labeling (TUNEL) assay was carried out using *in situ* cell death detection kit (Roche, Penzberg, Germany) as per the manufacturer's instructions. Briefly, wax was removed from tissue sections as described above for H&E staining, washed twice in 1X PBS, incubated with 50µL each

of enzyme and label solution for 1h in the dark. Post staining the slides were washed and stored in 1X PBS until analysis. Photomicrographs (10 and 40X) were captured, using fluorescence microscope (Leica DM LB2 e), equipped with a digital camera (Leica DFC420). Cell viability was measured by the analysis of the type of dead cells in two fields of 1mm² chosen randomly.

2.5 Statistical analysis

All quantitative data followed the normal distribution (Shapiro-Wilk test 5%) and the statistical differences were determined by analysis of variance and mean test (Tukey 5%), using the statistical software R.

3. Results

3.1 Fish size, gonadosomatic index and testis morphology

Significant differences were found in body size between the studied genotypes, with neo-males being on average six times heavier and 42% larger than the normal males. Similarly, the gonad size (weight, length and thickness) and volume of semen extracted were also significantly higher for neo-males ($P < 0.05$). In contrast, XY males had higher gonadosomatic index and yielded higher volume of semen per mass of fish. The average (\pm standard deviations) fish and gonad measurements, including GSI and milt volume are presented in table 1.

Table 1. Means (\pm standard deviations) of fish and gonad size, GSI and milt volume of normal (XY) and neo (XX) male Atlantic salmon (*S. salar*) used in the study.

Parameter	Genotype	
	XY	XX
Body weight (Kg)	1.20 \pm 250 ^b	7.50 \pm 1.264 ^a
Body length (cm)	47.50 \pm 3.11 ^b	82.14 \pm 4.56 ^a
Gonad weight (g)	75.63 \pm 6.12 ^b	315.81 \pm 86.13 ^a
Gonad length (cm)	10.14 \pm 1.61 ^b	16.13 \pm 4.60 ^a
Gonad thickness (cm)	1.25 \pm 0.23 ^b	2.03 \pm 0.18 ^a
Gonadosomatic index (%)	6.45 \pm 1.11 ^a	4.19 \pm 0.8 ^b
Semen total volume (ml)	11.13 \pm 5.46 ^b	50.00 \pm 28.61 ^a
Semen volume per kilo (ml/Kg)	9.11 \pm 4.03 ^a	6.91 \pm 4,15 ^b

In relation to the testicular morphology, all normal males (n=4) used in the study had standard elongated and rod shaped testicles, with connection to the urogenital opening. Whereas neo-males (n=7) presented testicles with asymmetric characteristics, with a more sac like appearance and relatively firmer to touch, in most cases (n=4) one lobe was relatively elongated and the other rounded. Moreover the spermatic duct was poorly developed in all XX males, but retained connection to urogenital opening as in XY males. Dissected testis of a representative XX and XY male are presented in Figure 2.

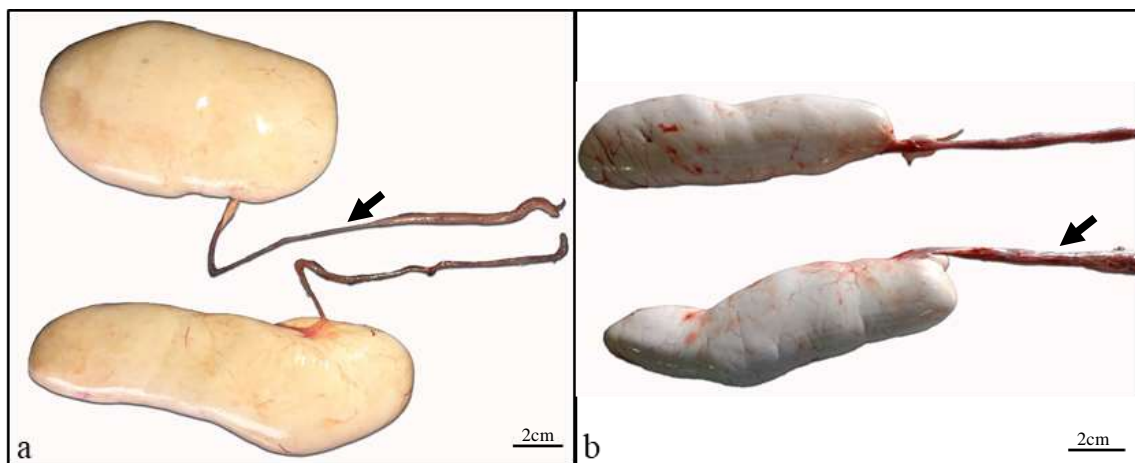


Figure 2. Comparative gross testis morphology of Atlantic salmon (*S. salar*) neo-males (a) and normal males (b). Anterior to left and posterior to right. Note the relatively constricted (arrows) and laterally connecting seminiferous ducts in neo-males compared to normal males.

3.2 Quantitative and qualitative analyses of semen

The colour and consistency of the sperm were pink and creamy respectively, with no apparent differences between the genotypes ($P > 0.05$). The semen pH (8.00 ± 0.00 for normal males and 8.14 ± 0.24 for neo-male) and concentration ($33.2 \times 10^9 \pm 5.5 \times 10^9$ spz/mL for normal males and $38.4 \times 10^9 \pm 1.1 \times 10^9$ spz/mL for neo-males) also were comparable between the genotypes ($P > 0.05$).

The CASA analyses showed higher percentage ($P < 0.05$) of sperm motility for normal ($80.69 \pm 2.4\%$) than neo-males ($57.2 \pm 36.5\%$). Similarly, the duration of sperm motility was also significantly longer for XY males (99.31 ± 28.03 sec) compared to the XX (66.84 ± 23.83 sec). Significant differences were also found for curvilinear velocity (VCL), where the normal males ($190.25 \pm 56.50 \mu\text{m/s}^{-1}$) had mean values higher ($P < 0.05$) than neo-males ($155.27 \pm 48 \mu\text{m/s}^{-1}$). The average of the remaining sperm motility

parameters measured i.e. linearity, progression, straight-line velocity, path velocity, wobble and beat cross frequency did not show significant statistical differences ($P>0.05$).

With values of 99.31 ± 28.03 seconds for normal males and 66.84 ± 23.83 seconds for neo-males, significant differences ($P<0.05$) were found for time of motility. Mean and standard errors associated with CASA analyses and time of motility of sperm motility in normal (XY) and neo-males (XX) of Atlantic salmon (*S. salar*) are presented in Figure 3.

The sperm viability analysis performed using trypan blue method, yielded comparable ($P>0.05$) results for both normal ($76.00 \pm 5.01\%$) and neo-males ($71.64 \pm 7.61\%$). Similarly, no statistical differences ($P>0.05$) were observed for total structural abnormalities the XY ($61.25 \pm 6.42\%$) and XX ($63.66 \pm 2.55\%$) males. For both genotypes, the most common primary and secondary abnormalities were loose head and broken tails respectively. Macrocephaly, microcephaly, abaxial tail insertion, proximal and distal cytoplasmic droplets were not found (Table 2).

Table 2. Means (\pm standard deviations) of structural abnormalities of sperm. A=at acrosome; F=Fore tail; M=Mid tail and T=Tip of tail.

Sperm structural characteristics	Genotype	
	XY	XX
Primary abnormalities (%)	22.64 ± 0.96	26.79 ± 1.30
Broken tail (A)	0.78 ± 0.66	0.61 ± 0.67
Broken tail (F)	3.54 ± 0.53	3.60 ± 2.67
Broken tail (M)	5.33 ± 1.48^b	6.63 ± 1.20^a
Broken tail (T)	1.06 ± 0.17^b	2.08 ± 1.10^a
Coiled tail (F)	4.85 ± 1.79	4.62 ± 1.23
Coiled tail (M)	1.25 ± 0.77	1.55 ± 0.93
Coiled tail (T)	0.83 ± 0.48^b	1.39 ± 0.87^a
Degenerate tail	5.00 ± 1.78^b	6.31 ± 1.73^a
Secondary abnormalities (%)	38.71 ± 2.15	36.87 ± 3.33
Folded tail (F)	3.25 ± 1.16^a	1.53 ± 1.00^b
Folded tail (M)	2.91 ± 1.64^b	6.46 ± 2.91^a
Folded tail (T)	0.69 ± 0.66^b	1.07 ± 0.37^a
Just tail	27.32 ± 5.67^a	22.94 ± 9.91^b
Just head	4.54 ± 1.62	4.87 ± 2.33
Total abnormalities (%)	61.35 ± 6.42	63.66 ± 2.55
Normal spermatozoa (%)	38.75 ± 5.86	36.34 ± 6.79

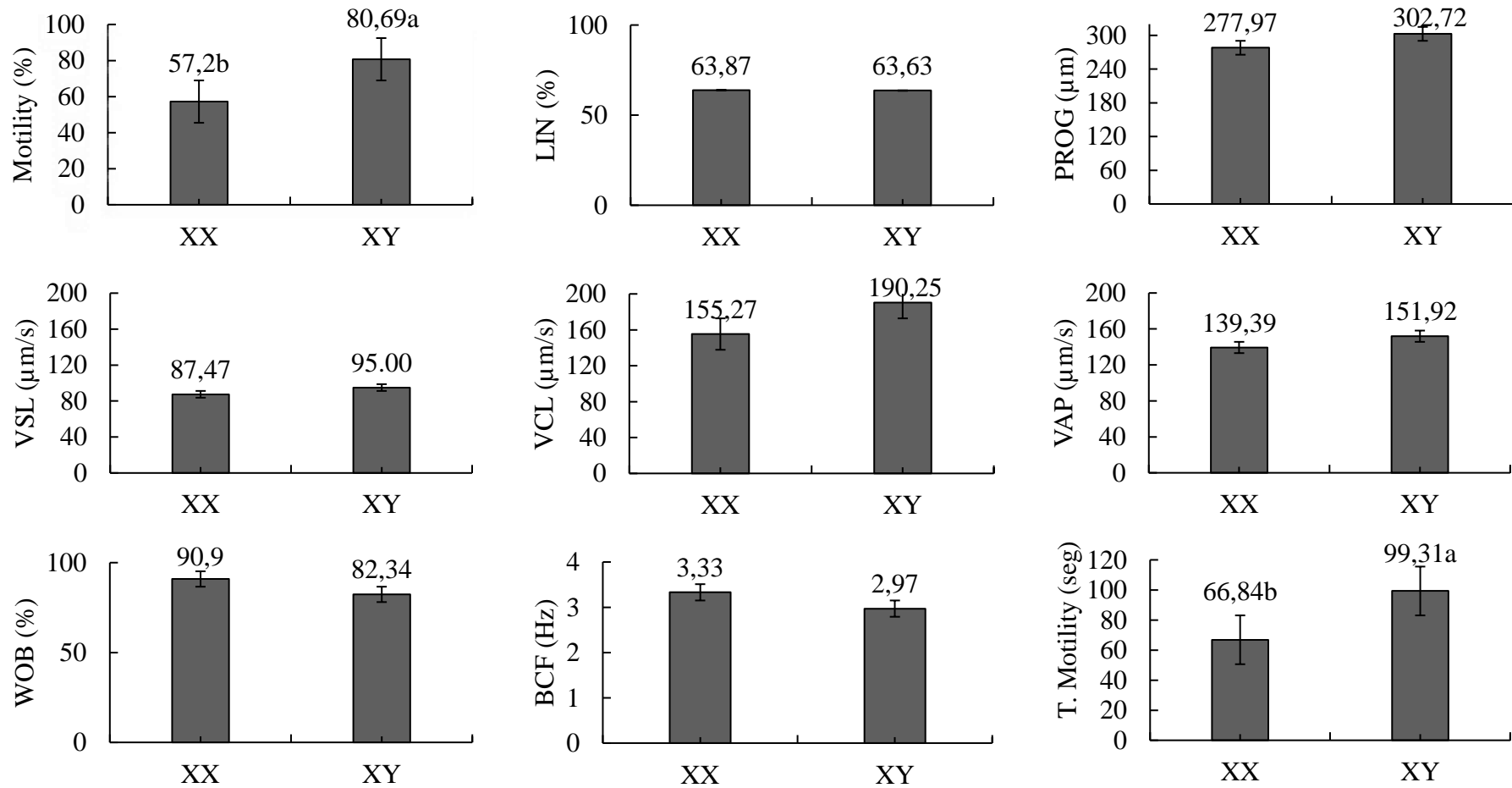


Figure 3. Mean (\pm standard deviations) sperm qualities of normal (XY) and neo (XX) male Atlantic salmon (*S. salar*) as measured by CASA analyses. LIN, linearity; PROG, Progression; VSL, straight line velocity; VCL, curvilinear velocity; VAP, average path velocity; WOB, wobble; BCF, beat cross frequency.

3. 4 Histology

The histological analysis performed by H&E staining revealed the existence of consistent differences between normal (XY) and neo-males (XX). Although the number of Sertoli cells present in 1mm^2 did not vary between the genotypes (145.75 ± 14.73 and 145.00 ± 36.28 for XX and XY, respectively), a larger area of interstitial tissue ($P < 0.05$) in the neo-male testis (Fig 4a and 4b) and, bigger size of Sertoli cells ($P < 0.05$) (Fig c) in neo-males ($30.19 \pm 3.50\mu\text{m}$) compared to normal males ($21.24 \pm 3.50\mu\text{m}$) was found. Interestingly, Sertoli cells in the neo-male testis tended to form cyst like structures, with more than two cells in a cluster (Fig 4b&c) (Table 3).

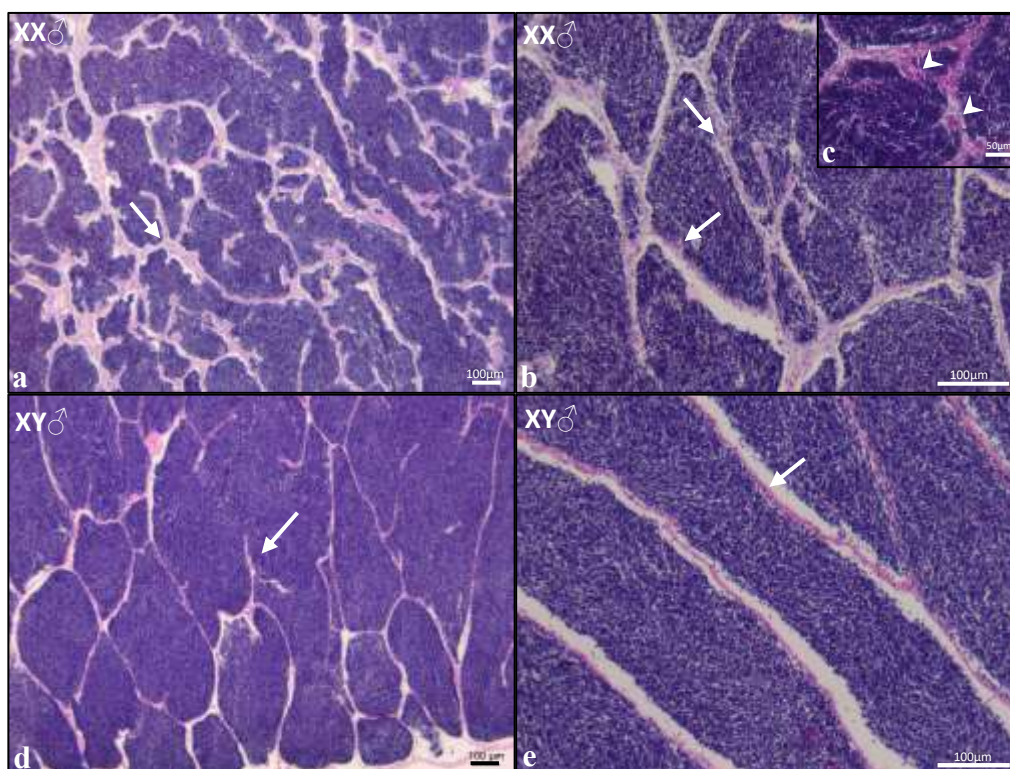


Figure 4. Hematoxylin and Eosin stained testis sections of Atlantic salmon (*S. salar*) neo- (XX) and normal (XY) males. a) Neo-male testis (5X objective), with typically large and loose interstitial tissue (arrow); b) showing the presence of hypertrophied Sertoli cells (arrow) and (c) cysts with two or more hypertrophied Sertoli cells (arrow head) at higher magnification (10 and 40X objectives respectively) d) Normal males testis (5X objective), showing typically compact interstitial tissue; and d) with regular size Sertoli cells (10X objective).

Table 3. Means (\pm standard deviations) of select histological measurements in normal (XY) and neo (XX) male Atlantic salmon (*S. salar*).

Parameter	Genotype	
	XY	XX
Interstitial tissue area (mm ² /1mm ²)	0.044 \pm 0.02 ^b	0.069 \pm 0.021 ^a
Number of Sertoli cells/1mm ²	145.00 \pm 36.28	145.75 \pm 14.73
Number TUNEL positive cells /1mm ²	33.00 \pm 5.55	36.00 \pm 2.28
Sertoli cell size (μ m ²)	21.24 \pm 3.50 ^b	30.19 \pm 3.50 ^a
Number of Sertoli cells cysts/1mm ²	1.0 \pm 0.82 ^b	8.25 \pm 2.99 ^a

*Pairs with different superscripts were significantly different from one another

The TUNEL assay shows that the most cells including hypertrophic Sertoli cells of neo-male predominantly remained non-fluorescent, suggesting that they are live and active (Figure 5).

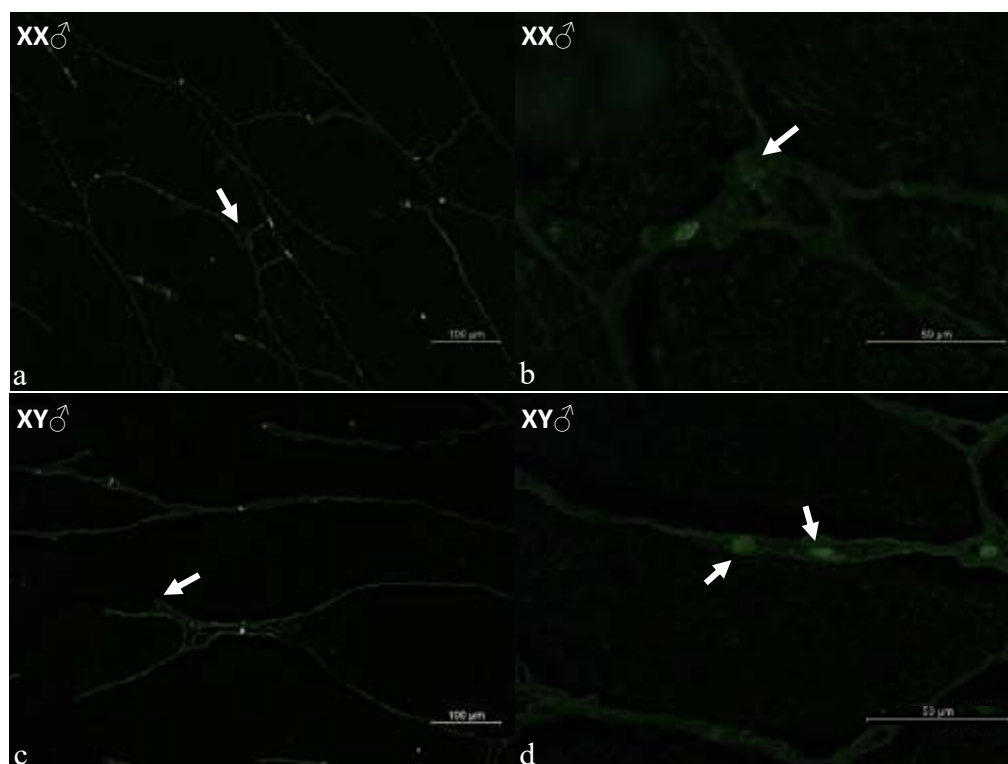


Figure 5. TUNEL assay in testis of Atlantic salmon (*S. salar*) neo-males (XX) and normal males (XY). a) Neo-male testis at low (10X objective) and b) high (40X objective) magnification showing live hypertrophied Sertoli cell (arrow); c) Normal male testis at low (10X objective) and d) high (40X objective) magnification showing a normal size dead (fluorescent) Sertoli cell (arrows). Note little or no sign of apoptotic cells (fluorescent) in both tissues.

4. Discussion

Quality of the gametes have a significant bearing not only on reliability and quality of fish seed but can also impact their performance (e.g. health and growth) in production systems and ultimately their marketability. Presented here is a comparative evaluation of mature normal (XY) and neo-male (XX) Atlantic salmon (*S. salar*) testis and the quality of their sperm. The study found important differences in the reproductive parameters of male and neo-males (XX), highlighting the inferior seminal quality for neo-males routinely used in producing monosex populations that underpin bulk of the farmed Atlantic Salmon production, such as in Tasmania, Australia. While quantification of neo-male (XX male) sperm appear unprecedented for the species, the collective observations point to opportunities for improving sperm quality via more refined hatchery production strategies, including brood stock management, their conditioning and fertilization practices.

4.1 Fish size, gonadosomatic index and gross testis morphology of XY and XX males differ significantly

As expected, the body size (length and weight) showed large differences between normal and neo-males, with latter being significantly larger and heavier. According to Galbreath et al. (1994), this discrepancy is mainly due to the different age at sexual maturity (2 and 3 years for normal and neo-males respectively). Essentially, despite neo-males expressing male phenotype of semen production, their growth and age at sexual maturation remain similar to normal females. Evolutionarily, delayed maturity at relatively larger size of *S. salar* females is attributed to production of better quality eggs and safety of nests (Foote 1989), an aspect appears genetically imprinted in the XX genotype irrespective of their functional sex. The late sexual maturation of Atlantic salmon females has been exploited from commercial point of view i.e. preferentially farmed, as they do not complete gonad development before reaching slaughter weight, have a higher rate of muscular deposition, and do not need to mobilize energy necessary for reproductive behaviour (Galbreath et al., 1994; Isler, 2009; Davidson et al., 2009; Cnaani and Levavi, 2009).

Although the absolute size of testis and semen volume of XX males was higher, the gonadosomatic index (GSI) and semen volume per weight of fish indicate that the, normal males were better primed reproductively. The observed GSI values are comparable to 4.1-8% observed by Fleming (1998), and 7.3% by Fjellidal et al. (2011) in mature XY males of the same species. Similarly, Geffen and Evans (2000) reported that normal males of rainbow trout (*O. mykiss*) were generally smaller, but had higher GSIs than neo-males. However, the

gross measures of GSI as an indicator of reproductive condition has limitations, since both body weight and somatic weight are highly variable in relation to individual condition, maturity status, environmental factors, and that in the in case of XX males this is further complicated by the observation that muscle deposition is increased compared to the gonads, reducing their GSI (Geffen and Evans, 2000; Yoneda et al., 2013). Moreover, reproductive condition, of the individual fish can influence the GSI, Orton et al. 1938) a factor likely attributing to the observed differences in this study as they were categorised stage V (gonad almost filled all the available space in the abdominal cavity) for neo-males and VI (developed gonad, with running milt) for normal males.

Presence of two symmetrical and elongated gonad lobes, each one having a well developed spermatic duct running to the caudal direction and emptying into the genital papilla is typical in normal male *S. salar* (Parmentier and Timmermans 1985). In contrast, the observed asymmetry and irregular sac shapes of the testicular lobes with poorly developed sperm ducts in neo-males is likely contributing to difficulty in obtaining semen by stripping these individuals. A well-developed sperm duct in fish, with excretory activity (steroids, lipids, monosaccharides, proteins and enzymes) for ionic balance and regulation of seminal fluid for smooth passage and expression of milt is considered necessary (Lahnsteiner et al. (1991). Interestingly, the delayed maturity and non-expression of milt by neo-males, confers a practical advantage in their unmistakable selection from a mixed pool of males and neo-males, ensuring monosex (all female) seed production. However, the forced need to extract sperm via gonad maceration contaminate mature sperm with those immature and other impurities, conceivably accounting for relatively low fertilisation efficiencies routinely encountered by hatchery managers.

4.2 Milt quality of neo-males is compromised

The pink-coloured milt observed for both genotypes is likely due to blood released by rupture of blood microcapillaries during maceration of the testis, a contamination that can reduce the semen quality (Cabrita et al., 2009). Geffen and Evans (2000) have found in *O. mykiss* lower rate of fertilization and lower motility time in semen samples removed directly from the tests of sex-reversed females when compared to sperm stripped from normal males, these differences being attributed mainly to different methods of collection and blood contamination.

Creamy consistency is also common for this type of sample, since the semen obtained has a high concentration of cells due to the extraction of a large number of immature sperm

cells and other testicular cells. This is supported by the comparable mean sperm concentration observed for both genotypes. According Dziwulska et al. (2011) and Trigo et al. (2014) the sperm count in naturally expressing milt of the Atlantic salmon is known to vary between 9.9×10^9 and 22.2×10^9 spermatozoa/mL, values much lower than those obtained in this study ($38.4 \times 10^9 \pm 1.1 \times 10^9$ spz/mL for XX and $33.2 \times 10^9 \pm 5.5 \times 10^9$ spz/mL for XY). Similar high sperm counts for normal males (22.9×10^9 spz/mL) and neo-males (21.6×10^9 spz/mL) following testicular maceration have been reported in *O. mykiss* (Kowalski et al. 2011).

The semen pH can significantly influence sperm quality (Billard 1981, Lahnsteiner et al. 1996). In this study, the semen pH of both normal and neo-males was alkaline between genotypes (8.00 ± 0.00 and 8.14 ± 0.24 for males XY and XX respectively). These values are well within optimal range for this species (e.g. Redondo- Muller et al. 1991), and similar to those observed in other species including *O. mykiss* (Islam and Akhter 2011) and *Cyprinus carpio* (Perchech-Poupard et al. 1997).

Sperm motility between different genotypes of the same fish species, have been extensively studied. For example, Fitzpatrick et al. (2005), analysed sperm motility of *Coho salmon* neo-males and suggested that the sex reversal procedure does not affect sperm quality and maturation. Similarly, Gennotte et al. (2012) have shown that neo-males (XX) and super-males (YY) sperm of Nile tilapia have similar motility to common males (XY). In contrast, differences in sperm motility between normal and neo-male males in Rainbow trout (*O. mykiss*) have been reported, but this was attributed to different collection methods (Geffen and Evans 2000). However, higher sperm motility of XX (73.1%) males compared to XY males (48.4%) reported in *O. mykiss* (Kowalski et al. 2011) using comparable sperm harvest methods has also been reported. In contrast, our observations showed that normal males were significantly motile than neo-male sperm. The reasons for such stark differences are intriguing, but could relate to species specificity and or reproductive condition including stages of gonad maturation. In any case, comparative elucidation of such differences could assist in optimising hatchery practices.

Typically, fish spermatozoa remain quiescent in the reproductive tract of males, initiating motility only after an osmotic/ionic trigger on contact with water. Upon, activation the sperm are highly motile but cease movement thereafter lasting up to 20 to 40 seconds (Cosson et al., 2008, Dziwulska et al., 2011). Comparing sperm motility of *S. salar* and *S. trutta*, three phases of initial high circular movement, followed by increasing linear movement (up to 25 seconds after activation), and eventual cessation of motility have been

recognised (Lahnsteiner et al. 2004). Apart from the % motility all other parameters of sperm motility (i.e. linearity, progression, straight-line velocity, path velocity, wobble and beat cross frequency) were comparable between the XX and XY males and were close to those previously reported (Dziewulska et al. 2011) for normal males in this species.

The duration of sperm motility of neo-males (66.84 ± 23.83 seconds) was significantly compromised compared to normal males (99.31 ± 28.03 seconds), but with values within the range established by Benau & Ternier (1980) for salmonids (*O. mykiss*, *S. trutta*, *S. fontinalis* and *S. Salar*), in where depending on the activating medium, male condition and species, they reported periods ranging from 20 seconds to five minutes. However, very variable values were found by other authors, for example, Dziewulska et al. (2011) while studying normal males of the same species obtained averages of only 30.5 seconds after activation. Cosson et al. al. (2008) attributed the variability of this parameter to different evaluation cut-off points, such as the motility count to the existence of only vibration in some cells. The probable explanations for the difference between XX and XY males observed in this study is due to higher sperm motility indices (speed and duration of motility) found for normal males.

No differences were found for the cell viability by exclusion of trypan blue. This result showed that the differences found for the spermatic motility parameters were not caused by spermatic membrane problems. According Cosson et al. (1999) and Chenoweth (2005) this analysis is very important, and can be affected by environmental and/or genetic factors and reproductive season with direct relationship to sperm motility and infertility in fish males. For example, when analysing cryopreserved semen of rainbow trout, Lahnsteiner et al. (1991) observed severe compromise in plasma membrane structure using the dye exclusion test and that these changes negatively affected the quality of the sperm.

Consistent with viability observations, although curved and broken tails were significantly higher in XX males, no significant statistical differences were found for the total structural abnormalities of sperm, suggesting that this parameter did not contribute to loss of sperm quality. However, Sanches et al. (2009), when using semen of *Salminus maxillosus* with only 35.5% normality (i.e. 64.5 % structural abnormality), observed that this is adequate unlike in mammals, where any normality <70% are considered inadequate. Streit Jr et al. (2005) obtained good results of fertilization rate when using semen of *Piaractus mesopotamicus* with total sperm abnormalities of up to 49.4%.

4. 3 Comparative testis histology of XY and XX males

The histomorphometric analysis showed consistent differences between the genotypes. While normal males had histological characteristics comparable to those found by Dzięweulska and Domagala (2003) in mature males of salmonids (*S. salar* and *S. trutta*), the XX males presented significantly higher proportion of interstitial tissue, hypertrophied Sertoli cells and cysts of epithelial hyperplasia.

The proportion of interstitial tissue higher in the neo-males testis, may have been one of the reasons for the lower GSI and semen volume per weight of XX males. A direct relationship between low sperm volume, GSI and large interstitial space of testis has been previously reported in African catfish and Nile tilapia (Schutz et al. 2005). However, if this is solely related to genotypes or influenced by other factors, such as the individual condition, maturity status needs further investigation.

A stark and contrasting feature was the presence of hypertrophied Sertoli cells and cysts of epithelial hyperplasia, with the union of two or more cells, in the testes of the XX individuals. Similar observations, have been reported in rainbow trout (*O. mykiss*) neo-male testis (Kowalski et al. 2011 and Galas et al. 2009), and in platyfish (*Xiphophorus maculatus*) subject to hormonal manipulation (Kinnberg et al. 2000b). The rate and quality of spermatogenesis are determined directly by the number and functionality of the Sertoli cells present, and hence, problems with its development are responsible for pathological processes that reduce the semen quality (Petersen and Soden 2006). This may explain the relatively poor quality of sperm encountered in neo-males. It is also possible, the final maturation is somewhat delayed or suppressed in the XX-males leading to their observed and well known inability to express milt. This however, may be overcome by physiological priming, an aspect supported by anecdotal evidence that refined hormone treatment can allow expression of milt by XX males. Nonetheless, this aspect needs systematic investigation.

The cell-death assay using TUNEL procedure showed that the Sertoli cells and epithelial hyperplasia cysts, although hypertrophied, are live and do not undergo apoptotic processes. Similar results by Kowalski et al. (2011) and Galas et al. (2009) have verified the presence of fibrous secretions on the surface of the hypertrophied cysts, indicating their activity and excretory function. These observations collectively reinforce the possibility that the histological differences may relate to delayed physiological/sexual maturity of the XX-males.

A possible explanation for changes in Sertoli cell size and organisation is likely associated with their role in steroid hormone synthesis and regulation (Kinnberg et al. 2000a). This is experimentally supported by observations of Galas et al. (2009), who used

immunohistochemistry techniques and detected a large difference in the androgen hormones production between XY and XX male rainbow trout, suggesting a deficiency in the production of these hormones in masculinized females. Given the shared histological observation between neo-male Atlantic salmon in this study and those in rainbow trout (Kowalski et al. 2011 and Galas et al. 2009), an opportunity exists to document these drivers systematically, so they can be manipulated for optimal production of high quality neo-male sperm and fish seed.

It is yet unclear if the high proportion of interstitial tissue and the presence of hypertrophied Sertoli cells and cysts of epithelial hyperplasia are solely responsible for impeding sperm expression or this is in combination with poorly developed seminiferous ducts and the irregular and asymmetrical shape of the testis. Understanding the causes and developing means to overcome these will be central to improving the sperm quality of neo-males.

4.4 Implications for hatchery production

The results of this research highlight the disparity in quality of neo-male sperm of Atlantic salmon when compared to the normal males that are routinely encountered by hatchery managers. Noting that substantial farm production of Atlantic salmon relies on using XX-male brood stock for generating monosex population of seed it is necessary that the quality of the gametes is improved. The key bottleneck is an inability of the XX males to express milt freely, likely contributed by poorly developed seminiferous ducts, irregular shape of the testes and the presence of histological features, namely hypertrophied and cyst forming Sertoli cells, that are in contrast to normal males. This typically, requires maceration of testis for collection of semen, a practice that reduces the semen quality by contaminating blood and immature cells. The relative complexity of the process of harvesting sperm, its predisposition to contaminating impurities and a physiological/genetic block to final maturation of XX males may collectively be contributing to the inconsistencies in fertilization rates the hatchery managers routinely encounter. This in combination with individual variations in maturity make it difficult to refine and develop standard and reliable hatchery protocols that consistently yield high fertilisation rates. Conceivably this has flow on to nursery and grow-out performances and ultimately to economic efficiency of the farming operations. However, the study implies that the neo-males may be amenable to physiological priming and general brood stock management practices that may lead to production of milt, without the need for euthanasia. The benefits of such an ability without

compromising the advantage of unambiguously selecting the XX-male brood stock will likely improve hatchery efficiencies, including for multiple use of valuable brood neo-males. Results and inferences of this study should serve as foundation for future investigation aimed at delineating the causes that preclude expression of milt as well as in optimising general hatchery practices.

5. Acknowledgements

This research was conducted through a partnership between the University of Maringa, University of Tasmania and Huon Aquaculture Limited, at the Inland Fisheries Service hatchery, New Norfolk, Tasmania, Australia. Critical comments from Simon Pitney and David Mitchel significantly improved the manuscript. Scholarship provide by CAPES/Brazil.

6. References

- Asche, F.; Guttormsenb, A. G.; Sebulonsenc, T.; Sissenerd, E. H. (2005) Competition between farmed and wild salmon: the Japanese salmon market. **Agricultural Economics**, v. 33, p. 333.
- Benau, D.; Turner, C. (1980) Initiation, Prolongation, and Reactivation of the Motility of Salmonid Spermatozoa. **Gamete Research**, v. 3, p.247-257.
- Billard, R. (1981) Short-term preservation of sperm under oxygen atmosphere in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Aquaculture**, v.23, p.287-293.
- Butts, I. A. E.; Litvak, M. K.; Trippel, E. A. (2010). Seasonal variations in seminal plasma and sperm characteristics of wild-caught and cultivated Atlantic cod, *Gadus morhua*. **Theriogenology**, v. 73, p. 873ions
- Bye, V. J.; and Lincoln, R. F. (1986) Commercial Methods for the Control of Sexual Maturation in Rainbow Trout (*Salmo gairdneri* R.). **Aquaculture**, v. 57, p. 299-309.
- Cabrita, E.; Robles, V.; Herráez, P. (2009). Sperm quality assessment, in: Cabrita, E. et al. (Ed.) Methods in reproductive aquaculture: marine and freshwater species. **Marine Biology Series**, p. 93-147.
- Chauvaud, L.; Cosson, J.; Suquet, M.; Billard, R. (1995) Sperm motility in turbot, *Scophthalmus maximus*, initiation of movement and changes with time of swimming characteristics. **Environmental Biology of Fishes**, v.43, p.341-349.
- Chenoweth, P. J. (2005). Genetic sperm defects. **Theriogenology**, v.64, p.457–468.

- Cnaani, A.; Levavi-Sivan, B. (2009). Sexual Development in Fish, Practical Applications for Aquaculture. **Sexual development**, v. 3, p.164–175.
- Cosson, J.; Dreanno, C.; Billard, R.; Suquet, M.; Cibert, C. (1999) Regulation of axonemal wave parameters of fish spermatozoa by ionic factors. In: The male gamete: from basic knowledge to clinical applications. C. Gagnon (Ed.). Cache River Press, Montreal, QC, Canada, pp. 161–186.
- Cosson, J.; Groison, A. L.; Suquet, M.; Fauvel, C.; Dreanno, C.; Billard, R. (2008). Studying sperm motility in marine fish: an overview on the state of the art. **Journal of applied Ichthyology**, v. 24, p. 460–486.
- Dadras, H.; Dzyuba, B.; Cosson, J.; Golpour, A.; Siddique, M. A. M.; Linhart, O. (2017) Effect of water temperature on the physiology of fish spermatozoon function: a brief review. **Aquaculture research**, v.48, p.729-740.
- Davidson, W. S.; Huang, T.; Fujiki, K.; von Schalburg, K. R.; Koop, B. F. (2009) The sex determining loci and sex chromosomes in the family *Salmonidae*. **Sexual Development**. v 3, p.78–87.
- Donaldson, E. M. (1996). Manipulation of reproduction in farmed fish. **Animal Reproduction Science**, v.42, p.381-392.
- Dziewulska, K.; Domagała, J. (2003). Histology of salmonid testes during maturation. **Reproduction Biology**. v.3, n.1, p.47-61.
- Dziewulska, K.; Rzemieniecki, A.; Domagała, J. (2011). Sperm motility characteristics of wild Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) and sea trout (*Salmo trutta m. trutta L.*) as a basis for milt selection. **Journal of Applied Ichthyology**. v. 27, p.1047–1051.
- Eisbrenner, W. D.; Botwright, N.; Cook, M.; Davidson, E. A.; Dominik, S.; Elliott, N. G.; Henshall, J.; Jones, S. L.; Kube, P. D.; Lubieniecki, K. P.; Peng, S.; Davidson, W. S. (2014) Evidence for multiple sex-determining loci in Tasmanian Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Heredity**, v.113, p.86-92.
- Elliott, N.; Kube, P. (2009). Development and early results of the Tasmanian Atlantic salmon breeding program. **Proc Assoc Advmt Anim Breed Genet**, v.18, p.362–365.
- FAO. 2016. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all**. Rome. 200 pp.
- Figuroa, E.; Valdebenito, I.; Farias, J. G. (2016). Technologies used in the study of sperm function in cryopreserved fish spermatozoa. **Aquaculture Research**, v.47, p.1691–1705.

- Fitzpatrick, J. L.; Henry, J. C.; Liley, N. R.; Devlin, R. H. (2005). Sperm characteristics and fertilization success of masculinized coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). **Aquaculture**, v.249, p.4594.
- Fjellidal, P. G.; Hansen, T.; Huang, T. (2011). Continuous light and elevated temperature can trigger maturation both during and immediately after smoltification in male Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture**, v.321, p.93.
- Fleming, I. A. (1998). Pattern and variability in the breeding system of Atlantic salmon (*Salmo salar*), with comparisons to other salmonids. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science**; v.55, p.59.
- Foote, C. J. (1989). Female mate preference in pacific salmon. **Animal Behaviour**, v.38, p.721–723.
- Galbreath, P. F.; St. Jeanb, W.; Anderson, V.; Thorgaarda, G. H. (1994). Freshwater performance of all-female diploid and triploid Atlantic salmon. **Aquaculture**, v.128, p.41-49.
- Galas, F. J.; Hejmej, A.; Glogowski, J.; Bilinska, B. (2009). Morphological and functional alterations in testes and efferent ducts of homogametic rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). **Trends in Comparative Endocrinology and Neurobiology**, v.1163, p.398–401.
- Gennotte, V.; Francois, E.; Rougeota, J.; Ponthierc, S.; Deleuzec, C. (2012). Sperm quality analysis in XX, XY and YY males of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Theriogenology**, v.78, p. 210–217.
- Geffen, A. J.; Evans, J. P. (2000). Sperm traits and fertilization success of male and sex-reversed female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v.182, p.61-72.
- Goryczko, K.; Dobosz, S.; Makinen, T.; Tomasik, L. (1991). Uv-irradiation of rainbow trout sperm as a practical method for induced gynogenesis. **Journal of Applied Ichthyology**, v.7, p.136-146.
- Hunter, G. A.; Donaldson, E. M.; Stoss, J.; Baker, I. (1983). Production of monosex female groups of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) by the fertilization of normal ova with sperm from sex-reversed females. **Aquaculture**, v.33, p.355-364.
- Islam, M. S.; Akhter, T. (2011). Tale of Fish Sperm and Factors Affecting Sperm Motility: A Review. **Advances in Life Sciences**, v.1, n.1, p.11-19.
- Isler, I. V. (2009). Biotechnology applied to salmoniculture. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.36-42.

- Johnstone, R.; Simpson, T. H.; Youngson, A. F.; Whitehead, C. (1979). Sex reversal in salmonid culture. Part. II. The progeny of sex-reversed rainbow trout. **Aquaculture**, v.18, p.13-19.
- Kavamoto, E. T.; Barnabe, V. H.; Campos, B. E. S. (1999). Anormalidades morfológicas em cultura de tilápia. Part. II. The progeny of *Prochilodus lineatus* (Steindachner, 1881) (*Osteichthyes, Characiformes, Prochilodontidae*). **Boletim do Instituto de Pesca**, v.25, p.61-66.
- Kinnberg, K.; Korsgaard, B.; Bjerregaard, P.; Jespersen, A. (2000a). Effects of nonylphenol and 17 β -estradiol on vitellogenin synthesis and testis morphology in male Platyfish *Xiphophorus maculatus*. **The Journal of Experimental Biology**, v.203, p.171–181.
- Kinnberg, K.; Korsgaard, B.; Bjerregaard, P. (2000b). Concentration-dependent effects of nonylphenol on testis structure in adult Platyfish *Xiphophorus maculatus*. **Marine Environmental Research**, v.50, p.169-173.
- Kowalski, R. K.; Sarosiek, B.; Demianowicz, W.; Judek, J.; Goryczko, K.; Dobosz, S.; Kuś, H.; Demska-Zakka, K.; Babiak, I.; Glogowski, J. (2011) Quantitative Characteristics of Rainbow Trout, *Oncorhynchus Mykiss*, Neo-Males (XX Genotype) and Super-Males (YY Genotype) Sperm. **International Journal of Biological**, v.5, n.5, p.315-322.
- Lahnsteiner, F.; Weismann, T.; Patzner, R. A. (1991). Fine structural changes in spermatozoa of the grayling, *Thymallus thymallus* (Pisces: Teleostei) during routine cryopreservation. **Aquaculture**, v.103, p.73- 84.
- Lahnsteiner, F.; Berger, B.; Weismann, T.; Patzner, R. A. (1996). Determination of semen quality of the rainbow trout, *O. mykiss*, for cryopreservation by physiological and biochemical parameters. **Journal of Applied Aquaculture**, v.2, p.99-106.
- Lahnsteiner, F.; Berger, B.; Horvath, A.; Urbanyi, B. (2004). Studies on the semen biology and sperm cryopreservation in the sterlet, *Acipenser ruthenus* L. **Aquaculture Research**, v.35, p.519-528.
- Lincoln, R. F.; Scott, A. P. (1983). Production of all-female triploid rainbow trout. **Aquaculture**, v.30, p.375-380.
- Lubzens, E.; Daube, N.; Pekarsdy, I.; Magnus, Y.; Cohen, A.; Yusefovich, F.; Feigin, P. (1997). Carp (*Cyprinus carpio* L.) spermatozoa cryobanks: Strategies in research and application. **Aquaculture**, v.155, p.13-30.
- Mataveli, M.; Moraes, G. V.; Streit jr, D. P.; Mendez, L. D. V.; Sakaguti, E. S.; Toninato, J. C.; Barbosa, R. C.; Merlini, L. (2007). Avaliação da qualidade do sêmen de tilápia do

- Nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagem chitralada, suplementada com diferentes concentrações de vitamina C. **Boletim dos Instituto de Pesca**, v.33, n.1, p.1-7.
- Orton, J. H.; Jones, J. W.; King, G. M. (1938). The male sexual stage in salmon parr (*Salmo salar L. juv.*). **Proceedings of the Royal Society B: Biological**, v.125, p.103-114.
- Parmentier, H. K.; Timmermanst, P. M. (1985). The differentiation of germ cells and gonads during development of carp (*Cyprinus carpio L.*). A study with anti-carp sperm monoclonal antibodies. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, v. 90, p.13-32.
- Parodi, J. (2014). Motility, Viability, and Calcium in the Sperm Cells. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, v.60, p.65-71.
- Parodi, J.; Ram.; RaReveco, A.; Guerra, G. (2015). Example Use of Low-Cost System for Capturing the Kinetic Parameters of Sperm Cells in Atlantic Salmon (*Salmo salar*). **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v.6, p.63-72.
- Perche-Poupard, G.; Gatti, J. L.; Cosson, J.; Jeulin, C.; Fierville, F.; Billard, R. (1997). Effects of extracellular environment on the osmotic signal transduction involved in activation of motility of carp spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.110, p.315–327.
- Petersen, C.; Soder, O. (2006). The Sertoli cell--a hormonal target and t on the osmotic signal transduction involved in activation. **Hormonal Research**, v.66, p.153.
- Redondo-Muller, C.; Cosson, M. P.; Cosson, J.; Billard, R. (1991). In vitro maturation of the potential for movement of carp spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, v.29, p.259.
- Sanches, E. G.; Oliveira, I. R.; Serralheiro, P. C. S. (2009). Crio conservação do sêmen da garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus* (lowe, 1834) (*teleostei, serranidae*) **Boletim do Instituto da Pesca**, v.35, n.3, p.389 – 399.
- Schulz, R.W.; Menting, S.; Bogerd, J.; Franrd, J. R.; Vilela, D. A.; Godinho, H. P. (2005). Sertoli cell proliferation in the adult testis ment of carp spermatozoa.involved in activation of motility of **Biology of Reproduction**, v.73, p.891 on
- Streit jr., D. P.; Moraes, G. V.; Ribeiro, R. P. (2005). Effects of three different sources of pituitary extract on gonadal inducer in male and female pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Acta Scientiarum - Animal Science**, v.27, n.4, p.439-447.
- Streit jr., D. P.; Ribeiro, R. P.; Moraes, G. V. (2005). Características reprodutivas do *Piaractus mesopotamicus*. **Bioscience Journal**, v.22, n.3, p.119-125.

- Trigo, P.; Merino, O.; Figueroa, E.; Valdebenito, I.; Sanchez, R.; Risopatron, J. (2014). Effect of short-term semen storage in salmon (*Oncorhynchus mykiss*) on sperm functional parameters evaluated by flow cytometry. **Andrologia**, v.xx, p.1–5.
- Vikingstad, E.; Andersson, E.; Hansen, T. J.; Norberg, B.; Mayer, I.; Stefansson, S. O.; Fjellidal, P. G.; Taranger, G. L. (2016). Effects of temperature on the final stages of sexual maturation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Fish Physiology Biochemischery**, v.42, p.895-907.
- Yang, H.; Hu, E.; Buchanan, J. T.; Tiersch, T. R. (2017). A Strategy for Sperm Cryopreservation of Atlantic Salmon, *Salmo salar*, for Remote Commercial-scale High-throughput Processing. **Journal of the world aquaculture society**, p.1-17.
- Yoneda, M.; Kitano, H.; Selvaraj, S.; Matsuyama, M.; Shimizu, A. (2013). Dynamics of gonadosomatic index of fish with indeterminate fecundity between subsequent egg batches: application to Japanese anchovy *Engraulis japonicus* under captive conditions. **Marine biology**, v. 160, n. 10, p. 2733-2741.

7. Supplementary material

Table 1. CASA settings used for *S. salar* semen motility analysis.

Parameter	Value
Sperm size (pixels)	5-100
Minimum track length (frames)	10
Maximum sperm velocity between frames (pixels)	90
Minimum VSL for motile ($\mu\text{m}/\text{sec}$)	3
Minimum VAP for motile ($\mu\text{m}/\text{sec}$)	20
Minimum VCL for motile ($\mu\text{m}/\text{sec}$)	25
Low VAP speed ($\mu\text{m}/\text{sec}$)	5
Maximum percentage of path with zero VAP (%)	1
Maximum percentage of path with low VAP (%)	25
Low VAP speed 2 ($\mu\text{m}/\text{sec}$)	25
Low VCL speed ($\mu\text{m}/\text{seg}$)	35
High WOB (% VAP/VCL)	80
High LIN (% VSL/VAP)	80
High WOB 2 (% VAP/VCL)	50
High LIN 2 (% VSL/VAP)	60
Frame Rate (Frames/sec)	10
Microns per 1000 pixels	1000
Print xy co-ordinates for all tracked sperm?	0
Print motion characteristics for all motile sperm?	0
Print median values for motion characteristics	0

CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES DE PEIXES

A biotecnologia a favor da produtividade

Segundo definição do dicionário Aurélio, o termo biotecnologia representa “um conjunto de processos e técnicas que visam a utilização dos conhecimentos da biologia em diversas outras áreas científicas e tecnológicas, como para o desenvolvimento agrícola”. No meio rural este termo ganha cada vez mais importância, já que por se tratar de um mercado de grande competitividade, pequenas melhorias ampliam consideravelmente os lucros da propriedade.

Na piscicultura, devido à grande relevância adquirida nas últimas décadas, as biotecnologias que visam o aumento da produtividade se tornaram mais comuns. Aplicações biotecnológicas na produção de peixes algum tempo atrás aparentavam ser ficção científica, mas a partir do fim dos anos 90, já estavam incorporadas ao dia a dia dos produtores, e proporcionaram grandes avanços. Por exemplo: A possibilidade do controle da qualidade de água e o acionamento de aeradores através de aplicativos de celular.

Especificamente para o manejo reprodutivo, as biotécnicas vêm sendo cada vez mais estudadas, principalmente no

sentido do desenvolvimento de protocolos para a reprodução em cativeiro de espécies importantes comercialmente, já que esta característica é considerada um dos pilares para o cultivo de qualquer peixe, pela necessidade da garantia da oferta constante de alevinos. Esses estudos se tornam ainda mais relevantes para espécies nativas brasileiras, que possuem pouco ou nenhum, conhecimento consolidado.

Alguns dos avanços mais recentes no desenvolvimento de biotecnologias reprodutivas de peixes incluem a criopreservação de gametas femininos (oócitos) e embriões. Esta técnica possui como objetivo principal a preservação dessas estruturas em baixas temperaturas, geralmente em nitrogênio líquido (-196°C), por longos períodos de tempo.

O primeiro estudo de criopreservação em peixes foi o congelamento de espermatozoides realizado pelo pesquisador Blaxter na década de 50, prática amplamente difundida desde então. Por outro lado, a criopreservação de oócitos e embriões ainda não é possível pois, embora tenham sido obtidos avanços metodológicos, ainda

resultam em 100% de mortalidade após o descongelamento.

O desenvolvimento de um protocolo eficaz para a criopreservação deste tipo de material revolucionará o manejo reprodutivo dos peixes em cativeiro, e impactará fortemente, em um curto período de tempo, os índices produtivos da piscicultura mundial, já que será uma importante ferramenta para:

- Preservação do material genético materno;
- Facilitação do manejo reprodutivo;
- Intercâmbio e transporte de material genético entre pisciculturas;
- Produção de alevinos em qualquer período do ano independente da estação;
- Conservação da diversidade genética e de linhagens de interesse para programas de melhoramento genético.

A existência de um banco de embriões congelados para as espécies de peixes nativas do Rio Doce-MG, amenizaria a extinção em massa desencadeada após o desastre ocorrido

Diversos pesquisadores citam que as dificuldades deste tipo de criopreservação se devem aos seguintes aspectos do embrião:

- Grande tamanho;
- Baixa superfície de absorção;
- Existência de várias membranas que dificultam o fluxo de crioprotetor e água;
- Presença de um grande saco vitelínico (correspondente à gema do ovo),

rico em gordura, com características bem diferentes do restante do tecido;

- Grande sensibilidade ao frio;
- Alta suscetibilidade à formação de cristais de gelo dentro das células, o que promove a ruptura e a desestabilização das membranas;
- Vias metabólicas incompletas que impedem a proteção aos efeitos tóxicos promovidos pelos crioprotetores;

Atualmente já se sabe que uma das principais barreiras a ser ultrapassada para o estabelecimento de um protocolo adequado de criopreservação de embriões de peixes envolve o entendimento dos mecanismos que desencadeiam a morte programada da célula (apoptose) após o descongelamento. Estes eventos ocorrem pela formação de espécies reativas de oxigênio (ERO's) no interior das células durante a criopreservação; elementos estes que provocam danos ao DNA e aumentam a produção de proteínas responsáveis pela apoptose.

Uma das formas de prevenção a formação de ERO's é a utilização de inibidores adicionados à solução crioprotetora para melhorar as taxas de sobrevivência. Para tanto, a melatonina, hormônio encontrado em todos os animais vertebrados, responsável pela regulação do sono e da reprodução, tem sido estudado como um importante agente inibidor de ERO's.

Uma pesquisa recente realizada pela Universidade Estadual de Maringá, foi a fundo no estudo da criopreservação dos embriões de peixes, tentando desvendar os enigmas do processo de morte que a envolve. Para tanto, duas diferentes doses de melatonina ($10^{-6}M$ e $10^{-3}M$) foram adicionadas à solução vitrificante de embriões de zebrafish (*D. rerio*) avaliando-se seus efeitos após o descongelamento pelas seguintes análises: 1) Formação de crio-lesões, 2) quantificação relativa da expressão dos genes envolvidos nos processos apoptóticos (anti apoptótico – *Bcl-2* e pró apoptóticos – *Bax/Caspase-3*), 3) formação de ERO's e 4) fragmentação de DNA por TUNEL. Embora a solução vitrificante não tenha protegido adequadamente todas as regiões, especialmente a camada sincicial vitelínica (figura 1), a nível molecular, a inclusão de $10^{-6}M$ de melatonina, melhorou significativamente a resposta ao processo apoptótico pós descongelamento dos embriões, principalmente quanto à expressão dos genes envolvidos na apoptose e à fragmentação do DNA (figura 2). Este resultado é muito importante pois contribuirá para a futura elaboração de um protocolo adequado para a vitrificação deste tipo de material.

Pedro Luiz de Castro
Zootecnista
Mestre em produção Animal

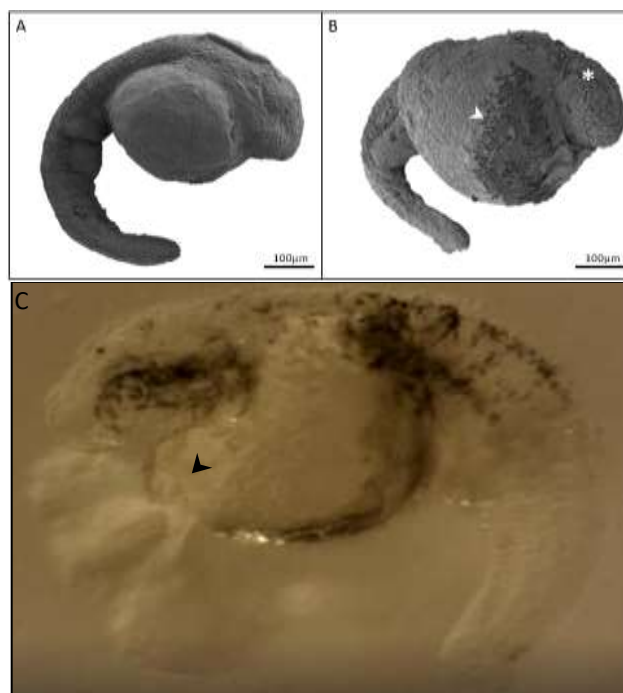


Figura 1. Crio-lesões formadas após a vitrificação. A) Grupo controle não vitrificado; B) Embrião vitrificado; seta aponta o rompimento da camada sincicial vitelínica; Asterisco aponta enrugamento da epiderme.

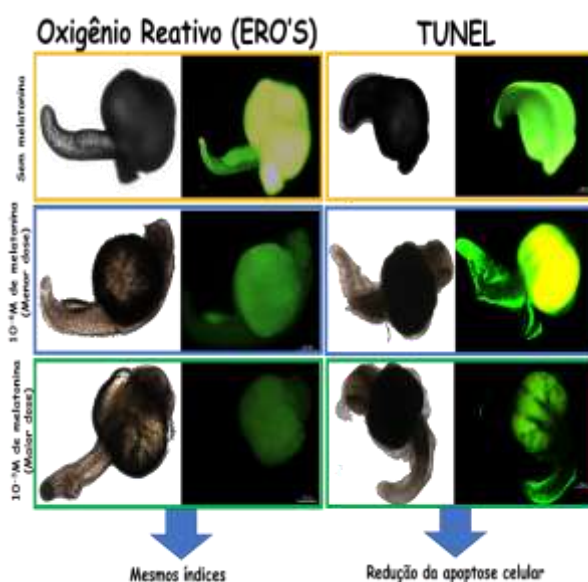


Figura 2. Análises de formação de ERO's e fragmentação do DNA em embriões de zebrafish criopreservados. Quanto maior a fluorescência emitida, maior o dano causado.

APÊNDICE A



Figura 1A. Estrutura de recirculação de água onde os reprodutores de zebrafish (*D. rerio*) foram mantidos. Fonte: Próprios autores.

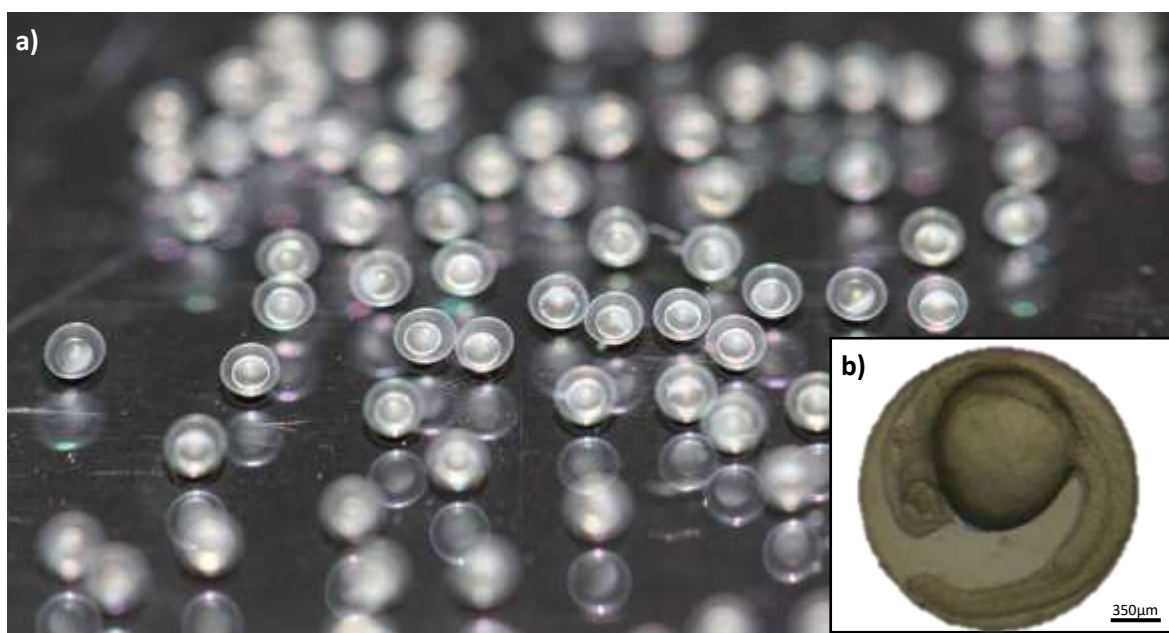


Figura 2A. Coleta de embriões de zebrafish (*D. rerio*). a) Embriões coletados logo após a desova. b) Embriões no estágio utilizado por esta pesquisa (22 a 24h pós fertilização). Fonte: Próprios autores.

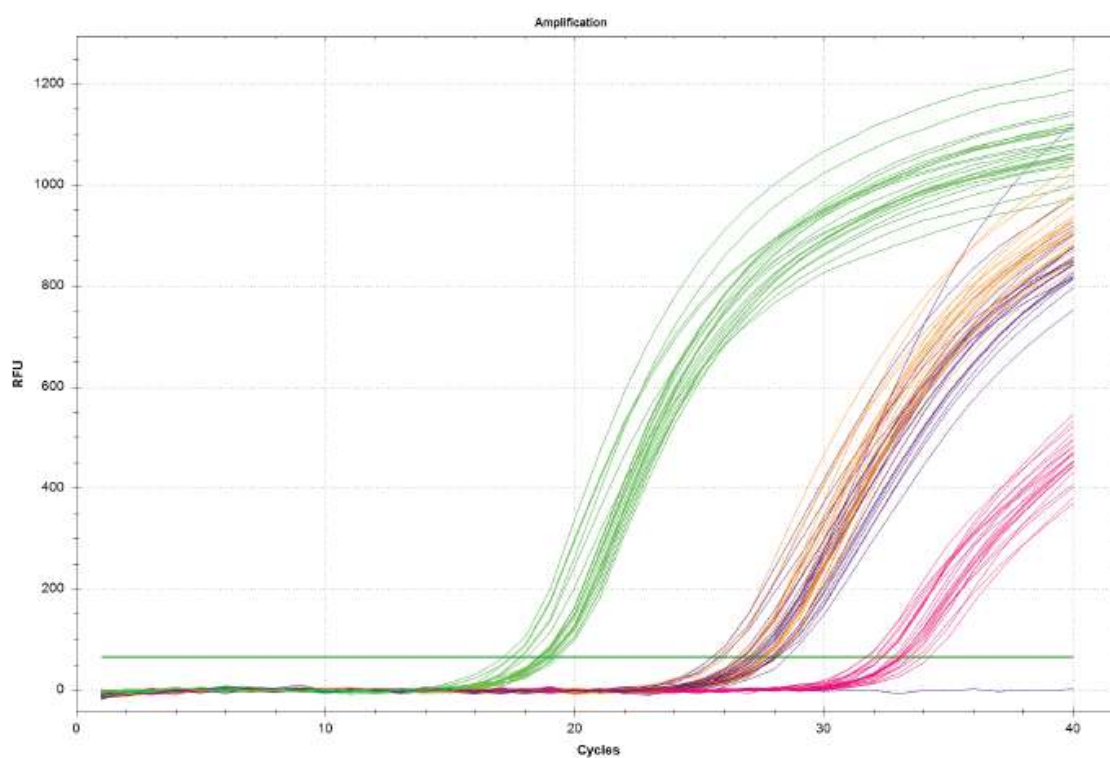


Figura 3A. Exemplo de qPCR para os genes Bcl-2 (laranja), Bax (rosa), Caspase-3 (roxo) e β -actina (verde) em embriões de zebrafish (*D. rerio*). Fonte: Próprios autores.

APÊNDICE B



Figura 1B. Tanques de manutenção dos reprodutores de salmão do Atlântico (*S. salar*). New North Folk Hatcherie, Tasmania, Austrália. Fonte: Próprios autores.

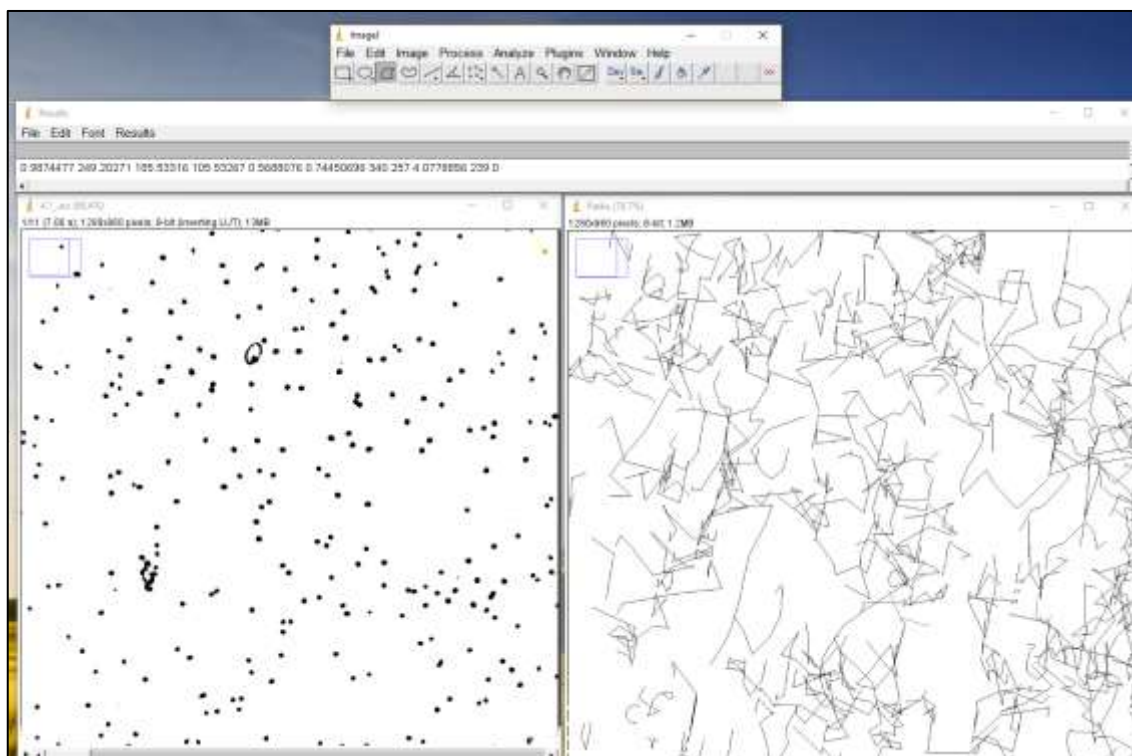


Figura 2B. Avaliação dos parâmetros de motilidade espermática utilizando o plug-in CASA no software ImageJ. Fonte: Próprios autores.

Normal	Cauda totalmente enrolada	Cauda enrolada medial	Cauda enrolada final	Cauda quebrada inicial
Cauda quebrada medial	Cauda quebrada final	Macrocefalia	Microcefalia	Cabeça degenerada
Peça intermediária degenerada	Cauda degenerada	Cauda dobrada inicial	Cauda dobrada medial	Cauda dobrada final
Gota proximal	Gota distal	Sem cauda	Sem cabeça	Cauda corrugada

Espermatozoide normal
 Anormalidade primária
 Anormalidade secundária

Figura 3B. Tabela de anormalidades primárias e secundárias para espermatozoides de peixes. Fonte: Streit jr, 2006; Mataveli, 2007; Kavamoto, 1999 e Butts et al. 2010.