

CAPÍTULO 1 - REPRODUÇÃO DE PEIXES: INDUÇÃO HORMONAL DE PEIXES REOFÍLICOS

Jéssica Antonia Cardoso Mendes

Mestre em Zootecnia (UFMA) e
Doutoranda PPG Ciência Animal,
Universidade Estadual do Maranhão
E-mail: Jessica.cardoso.zootec@gmail.com
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1327-5797>

Karuane Sartunino da Silva Araújo

Mestre em Ciências da Saúde (UFT)
Doutoranda PPG Ciência Animal
Universidade Estadual do Maranhão
E-mail: karuane@hotmail.com
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3122-6868>

Julio de Sousa Silva

Graduando em Ciência Animal
Universidade Federal do Maranhão/ Campus Chapadinha
E-mail: julio.ss@discente.ufma.br
ORCID: <https://orcid.org/0009-0009-9050-2779>

Ricardo Souza Oliveira

Engenheiro de Pesca, Mestrando PPG Ciência Animal
Universidade Estadual do Maranhão
E-mail: ricardossouzaoliveira@gmail.com
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6955-3442>

Lívia Thereza Silva Rocha

Graduada em Zootecnia (UFMA)

Universidade Federal do Maranhão/ Campus Chapadinha

E-mail: liviarocha041@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0009-0008-3925-2607>

German Augusto Murrieta Morey

Pós-doutorado em Parasitologia de Peixes pela Universidade Federal do Paraná (UFPR), Instituto de Investigação da Amazonia

Peruana (IIAP)

Iquitos, Loreto-Perú

Programa de Pós-graduação em Ciência Animal (PPGCA)

da Universidade Estadual do Maranhão

E-mail: germantiss1106@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6244-265412>

Diego Carvalho Viana

Doutor em Ciências (USP), Professor (UEMASUL) e do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (PPGCA/UEMA).

E-mail: diego_carvalho_@hotmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3302-9892>

RESUMO: No Brasil, estudos sobre reprodução artificial de peixes, têm décadas, mas apenas recentemente focaram em melhoramento genético e conservação do sêmen de espécies nativas. A diversidade genética está ameaçada por destruição de habitats, pesca predatória e poluição, demandando programas para fertilização artificial, criopreservação e melhoramento genético. Mudanças climáticas e características ambientais podem afetar a reprodução natural, tornando a fertilização artificial essencial. Este material apoia produtores e pesquisadores com informações precisas das técnicas de inseminação artificial. Utilizando pesquisas das últimas décadas, investigou-se o manejo dos peixes, ovos e sêmen, correlacionando com taxa de fecundação,

qualidade dos espermatozoides, idade dos peixes e Hora grau. Demonstram-se técnicas como indução hormonal via hipofiseação ou hormônios sintéticos, cálculo de doses hormonais, manejo pré e pós-extrusão, taxa de fecundação, eclosão e incubação de ovos. Aborda-se também o manejo para evitar contaminações que podem prejudicar a qualidade dos ovos, envolvendo todo o processo para máxima eficiência na reprodução de peixes.

Palavras-chave: Criopreservação, Indução Hormonal, Piscicultura, Peixes Reofílicos.

FISH REPRODUCTION: HORMONAL INDUCTION OF RHEOPHILIC FISH

ABSTRACT: In Brazil, studies on the artificial reproduction of fish, have been ongoing for decades, but only recently have they focused on genetic improvement and the conservation of semen from native species. Genetic diversity is threatened by habitat destruction, overfishing, and pollution, necessitating programs for artificial fertilization, cryopreservation, and genetic enhancement. Climate change and environmental factors can affect natural reproduction, making artificial fertilization essential. This material provides precise information on artificial insemination techniques to support producers and researchers. Drawing on research from recent decades, the management of fish, eggs, and semen was investigated, correlating with fertilization rate, sperm quality, fish age, and degree hours. Techniques such as hormonal induction via hypophysation or synthetic hormones, hormonal dose calculation, pre- and post-extrusion management, fertilization rate, egg hatching, and incubation are demonstrated. Additionally, management to prevent contamination that may affect egg quality is addressed, encompassing the entire process

for maximum efficiency in fish reproduction.

Keyword: Cryopreservation, Hormonal Induction, Fish Farming, Rheophilic Fish.

INTRODUÇÃO

Os peixes têm um impacto significativo na saúde e no equilíbrio dos ecossistemas aquáticos. Como observado por Alpizar et al. (2017), eles desempenham papel importante na cadeia alimentar aquática, algumas espécies são forrageadores e são importantes para a regulação de outras espécies por serem pilotos como predadores e presas.

Durante últimos anos, no entanto, o interesse em espécies reofílicas aumentou significativamente (Kupren *et al.*, 2008; Nowosad *et al.*, 2014; Targońska *et al.*, 2011), devido à ameaça de perda da diversidade e extinção total de espécies. A perda de áreas de desova causada pela poluição do ambiente aquático ou pela regulação dos rios é a principal causa da perda da diversidade.

Outro fator que influenciam na eficiência da desova é a temperatura. Segundo Nowosad *et al.* (2014), a flutuação de temperatura tem um impacto negativo na eficiência de desovam, incluindo o sucesso da ovulação e a taxa de sobrevivência do embrião. Além de melhorar as condições ambientais, a produção de reprodutores baseados na reprodução artificial, incubação e criação inicial em condições controladas é uma das soluções possíveis para proteger os peixes ribeirinhos (Cejko *et al.*, 2012; Kujawa *et al.*, 2015; Kupren *et al.*, 2014).

A reprodução artificial também é um elemento necessário para o desenvolvimento de técnicas de engenharia genômica e criopreservação de sêmen (Kucharczyk, 2019;

Nowosad *et al.*, 2015) que pode ser útil para a proteção do pool genético.

Portanto, é importante atualização sobre estudos reprodutivos e técnicas em peixes, visto que a manutenção sustentável dos ecossistemas aquáticos é essencial, assim como conhecer e compreender estudos reprodutivos e métodos de reprodução de peixes visando garantir a reprodução de peixes reofílicos, mesmo em cativeiro. Visto que estes dependem de ambientes de água corrente, como rios e riachos, para crescer e se reproduzir, são chamados de espécies migradoras necessitam basicamente de três tipos de ambiente dentro da bacia hidrográfica, para completar seu ciclo de vida: área de desova, de crescimento e de alimentação (Kujawa *et al.*, 2015), são os peixes Reofílicos, chamados “peixe de piracema”, sobem os rios entre setembro e outubro para desovar entre novembro e janeiro, e de fecundação externa, exemplo: dourados, pacus, curimatás, tambaquis, tabaranas dentre outros.

Deste modo, é indispensável a utilização de métodos alternativos de cultivo com o intuito complementar a produção natural. Para a realização da reprodução artificial em peixes, pode-se utilizar várias técnicas, tais como indução hormonal, desova em ninhos artificiais e incubação artificial, dentre outros. O objetivo desta revisão é fornecer orientações práticas sobre os procedimentos de manipulação do sêmen seja para produção animal ou conservação de espécies extinção.

Caracterização dos peixes reofílicos

Os peixes são animais vertebrados que habitam ambientes aquáticos de água salgada ou doce. Pertencem a

superclasse Pisces, filo Chordata, subfilo Vertebrata (Pasck; Lanzendorf, 2017) que abrange cerca de 33.000 espécies no mundo, entre essas aproximadamente 5.000 espécies encontram-se em território brasileiro (Agostinho *et al.* 2005). Os peixes são classificados principalmente em Actinoptergii (peixes ósseos), Elasmobranchi (peixes cartilagosos) e ciclóstomos (peixes sem mandíbulas) (Pasck; Lanzendorf, 2017). Sua alimentação é extremamente diversificada, podendo ser herbívoros, carnívoros, onívoros, detritívoros e ilíofagos.

Os peixes são ectodérmicos (Pasck; Lanzendorf, 2017) e seu tamanho varia desde 7,9 mm em *Paedocypris progenetica* dos pântanos da ilha de Sumatra, até cerca de 20 m no *Rhincodon typus* (tubarão-baleia) (Faria *et al.*, 2009). Os peixes servem de alimento para diversas espécies, principalmente para os seres humanos (Pasck; Lanzendorf, 2017), por ser um alimento saudável e nutritivo para fortalecimento do organismo.

Idealmente, em condições de cativeiro, machos e fêmeas seriam capazes de amadurecer sexualmente e apresentar comportamento de acasalamento que leva a liberação sincronizada de gametas, no caso da fertilização externa, como maioria dos peixes (Mylonas *et al.*, 2017). Porém, o crescimento corporal e a reprodução destes animais podem ser influenciados por diversos fatores, dentre eles, os fatores climáticos.

A temperatura é responsável por determinar o metabolismo dos peixes, seguido pelas atividades fisiológicas, em especial a fase de reprodução. A redução ou o aumento da temperatura corpórea em relação a temperatura ideal determinada para cada espécie, provocam mudanças fisiológicas no funcionamento do organismo, entre elas a

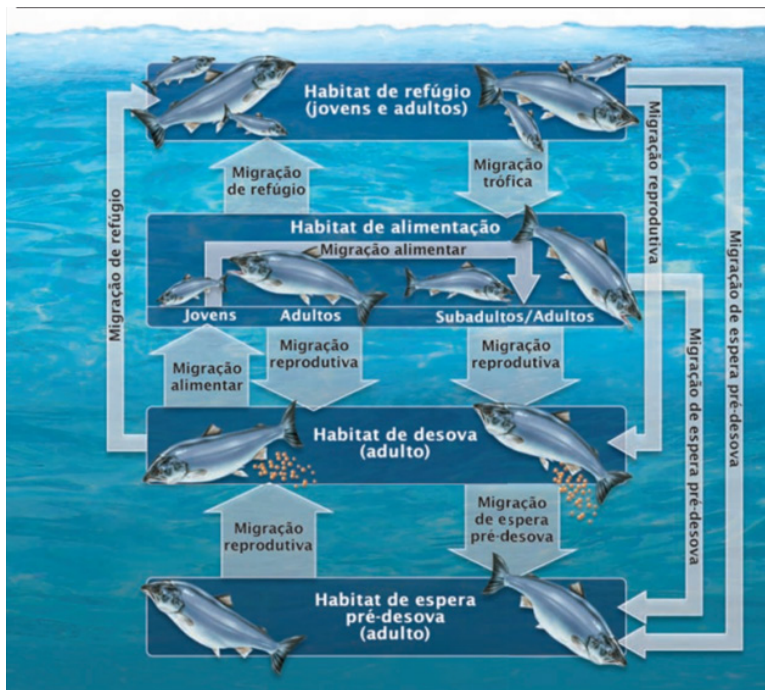
redução da fecundidade e atraso na maturação gonadal (Rebouças *et al.*, 2014).

As gonadotrofinas secretam uma série de hormônios que atuam como fatores-chave para a regulação da reprodução. Entre eles, os hormônios gonadotróficos (GTHs), hormônio folículo estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante hormônio (LH) (Nagahama; Yamashita, 2008). Por transporte na corrente sanguínea, FSH e LH chegam às gônadas e, em ambos os sexos, eles promovem o desenvolvimento de células germinativas e a produção de hormônios esteróides sexuais (Hafez *et al.*, 2004; Ljubobratović *et al.*, 2019).

A reprodução dos peixes reofílicos, é afetada pelo ambiente, pois estes precisam realizar a migração no período da piracema (Figura 1), para se reproduzirem em ambiente natural; em situação de cativeiro a reprodução espontânea, é comprometida, não ocorrendo a espermiacção ou desova (Crepaldi *et al.*, 2006).

Desta forma, os procedimentos de fertilização artificial envolvendo a coleta manual de sêmen e a desova induzida apresenta mérito significativo, podendo ser utilizada para tratar problemas reprodutivos, disfunção ou para manter a saúde, a diversidade genética da população, permitindo o acasalamento 1:1 entre indivíduos superiores, de modo que a reprodução seletiva possa ocorrer de forma eficaz. Além disso, o esperma criopreservado também pode ser usado para produção de sementes, resultando na utilização efetiva dos recursos genéticos (Judycka *et al.*, 2019).

Figura 1. Modelo dos padrões de migrações de peixes de piracema.



Fonte: ÁGUAS, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais, Godinho e Pompeu, 2003

Outros benefícios estão relacionados ao grande número de embriões que podem ser produzidos com estágios de desenvolvimento harmonizados. Isso implica que os embriões podem ser disponibilizados para tratamento de microinjeção imediatamente após a fertilização, que envolve a injeção de regentes no estágio de uma célula. A microinjeção é uma nova tecnologia crítica para edição do genoma, gerenciamento da expressão gênica por morfolino antisense oligo (MO) e visualização celular (Goto *et al.*, 2019), podendo também haver o nascimento de uma espécie

em extinção através de uma barriga de aluguel. Além de proporcionar maior produção e produtividade na criação, melhorando os resultados e, conseqüentemente, os lucros dos piscicultores.

Reprodução natural e artificial

A reprodução é um dos indicadores determinantes para manter a diversidade aquática. Desta forma, o monitoramento do estado ambiental deve ser realizado através da avaliação da qualidade da água e do esperma dos peixes. Até o momento, várias análises foram aplicadas e provaram ser úteis nesta tarefa. Entre eles, os parâmetros de motilidade espermática (velocidade espermática), a concentração espermática, volume, pH e osmolalidade do plasma seminal são os principais indicadores de qualidade do esperma medidos no esperma dos peixes (Kowalski; Cejko, 2019). No entanto, outros parâmetros também determinam o potencial de fertilização do esperma.

Embora, um número relativamente elevado de biomarcadores de qualidade espermática tenha sido relatado ao longo dos anos, em diversas espécies de peixes, a motilidade espermática, é hoje considerado o melhor biomarcador para espermatozóides de peixes (Gallego *et al.*, 2018).

Além disso, a integração do DNA, a estabilidade da membrana, o *status* das mitocôndrias e a atividade enzimática são parâmetros adicionais de grande importância para a função espermática (Kowalski; Cejko, 2019). A medição de todos esses parâmetros no esperma dos peixes fornece um conhecimento complexo sobre a fertilidade dos reprodutores e ajuda a melhorar os protocolos de

manutenção dos reprodutores, bem como o manejo dos gametas e os processos de fertilização.

São vários processos, técnicas e protocolos utilizados com sucesso na reprodução assistida, mas a escolha da melhor opção varia de acordo com as características da criação, das espécies produzidas, das instalações, características climáticas (Sousa, 2008). Atualmente, as técnicas mais utilizadas consistem, basicamente, no controle da fecundação, no acompanhamento dos processos de incubação e produção de larvas e alevinos, para que haja maior produção e maior taxa de sobrevivência superior dos alevinos por desova.

A reprodução de peixes pode ocorrer através de dois métodos, o natural e o artificial. Em ambos os métodos, uma das principais características que se deve ter máxima atenção, é o estado funcional das gônadas, isso diferenciará os peixes juvenis dos adultos (Pereira *et al.*, 2017; Valencia *et al.*, 2020). A transição para a idade da maturidade sexual é referida como puberdade e o sistema endócrino predominantemente responsável pela regulação dos processos reprodutivos é o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HHG) (Munoz-Cuetoa *et al.*, 2020).

Este processo de transição de peixes juvenis para adultos inicia após a diferenciação sexual, desde o aparecimento do espermatozóide em machos e oócitos vitelogênicos nas fêmeas, atingindo a primeira espermiacção e ovulação, respectivamente (Schulz; Miura, 2002; Nguyen *et al.*, 2020).

De acordo com Valência *et al.* (2020), o processo de maturação sexual parece depender de uma série de fatores genéticos, metabólicos e de estímulos ambientais.

Entre os sinais metabólicos, sabe-se que os

hormônios esteróides sexuais (progestágenos, andrógenos e estrogênios), estão envolvidos ou aceleram a maturação do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HHG) (Levavi-Sivan *et al.*, 2010), atuando na diferenciação sexual e manutenção de tecidos e gametogênese, além de regular o desenvolvimento das características sexuais secundárias e comportamento reprodutivo, sinalizando o hipotálamo e hipófise seu “status” sexual (Zohar *et al.*, 2010), comprovando assim a participação no desenvolvimento puberal dos peixes.

No caso da reprodução em sistemas de cultivo, os peixes sofrem a mesma influência dos fatores bióticos, como temperatura, luz, podendo também haver interferência pela alimentação, densidade de estocagem e manejo.

Segundo Rotili *et al.* (2022), *Arapaima Gigas* apresentam baixas concentrações do hormônio reprodutivo, 17 β estradiol em fêmeas imaturas (150 ng/mL) em comparação com aquelas do estágio de maturação (1200 ng/mL), o que confere alteração semelhante em ambiente natural (Amaral *et al.*, 2019). Já a piracanjuba (*B. orbignyanus*), peixe de piracema, independente do estágio de maturação, requerem indução hormonal para se reproduzir em cativeiro, os estágios da evolução gônadal e testicular são ser semelhantes à outros peixes reofílicas (Bashiyo-Silva *et al.*, 2016).

Em ambiente natural, após a maturidade fisiológica, a reprodução pode ocorrer naturalmente, onde a fêmea lança os óvulos sobre um substrato, podendo ser sobre raízes aquáticas, pedrisco, ou no próprio corpo d'água, logo em seguida, o macho lança o esperma para que haja a fecundação e, posteriormente, eclosão dos ovos, podendo haver variações na forma de nascimento dos filhotes.

De acordo com Blackburn (1999), do ponto de vista da

reprodução, por causa da variação na forma de nascimento dos filhotes os peixes são classificados em:

- Ovíparos: os filhotes se desenvolvem fora do corpo da mãe, dentro do ovo que contém os nutrientes necessários. Mais de 90% dos peixes pertencem a essa categoria.

- Vivíparos: os filhotes se desenvolvem dentro do corpo da mãe recebendo diretamente dela os nutrientes necessários.

- Ovovivíparos: ocorre uma combinação das duas formas, isto é, os filhotes se desenvolvem dentro do ovo e dentro do corpo da mãe. Na hora do nascimento, os filhotes saem do ovo.

Já a reprodução artificial ocorre quando há intervenção nesse processo natural, para que a produção seja numericamente maior e de melhor qualidade, resultando em elevada lucratividade para o piscicultor, dado que na reprodução natural pode ocorrer perda de ovos.

A indução hormonal é um estímulo exógeno que permite a maturação final das gônadas (desenvolvimento e liberação dos ovócitos nas fêmeas e espermatozoides pelos machos) em cativeiro (Judycka *et al.*, 2019).

Outra forma de indução é o uso do fotoperíodo, a biologia reprodutiva está vinculada às alterações e interações ambientais, é o que apresenta maior influência nos processos fisiológicos dos peixes. Isso acontece porque a exposição dos peixes a dias mais luminosos ou a sistemas de iluminação artificial desencadeiam processos diários de secreção de hormônios na corrente sanguínea, atingindo as gônadas.

Portanto, a reprodução artificial pode ser associada com iluminação artificial. Neste tipo de reprodução é possível utilizar várias técnicas, processos e métodos, cabendo ao piscicultor definir qual o melhor, de acordo com as condições

de sua criação, peixes e instalações.

Independente da técnica escolhida, a reprodução artificial consiste no controle da fecundação e acompanhamento dos processos de incubação e produção de larvas e alevinos, com a finalidade de se obter maiores índices na produção e boas taxas de sobrevivência dos alevinos.

Na reprodução induzida, usa-se hormônios hipofisários para a indução do processo de desova, o hormônio mais utilizado é o extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC), neste método, utiliza-se a glândula da hipófise extraída de peixes como a carpa ou salmão. Porém, a hipófise de outros peixes e até mesmo de outros animais, como rãs, aves e mamíferos, podem ser utilizadas. Essa glândula pode ser utilizada *in natura* ou desidratada. Ela é macerada, dissolvida em soro fisiológico e injetada nos reprodutores, de acordo com o peso do peixe. Outros hormônios também podem ser utilizados, como os hormônios sintéticos, hCG (hormônio coriônico gonadotrófico), GnRH (Hormônio libertador de gonadotrofinas) e o LH-RH (hormônio liberador luteinizante) (Targońska *et al.*, 2010).

Uma das grandes vantagens da reprodução artificial utilizando incubadoras é a proteção e os cuidados que podemos proporcionar para os alevinos, com isso, um pequeno número de reprodutores serão suficientes para obtenção de uma grande quantidade de alevinos. Portanto, será necessário um pequeno número de reprodutores, para obter uma grande quantidade de alevinos.

O processo de reprodução artificial dos peixes consiste na manipulação de reprodutores, que são capturados para a coleta dos óvulos e sêmen. Um critério muito importante é a seleção dos reprodutores, sendo necessário seguir 5 passos

importantes de acordo com Querol *et al.* (2015):

Sexagem: Identificar os machos e as fêmeas antes do manejo reprodutivo através de características exclusivas de cada espécie como morfologia, coloração, entre outras.

Comprimento e peso: Verificar se os animais já atingiram o tamanho ou peso mínimo reprodutivo indicado para cada espécie.

Idade: Verificar se os peixes já atingiram a idade reprodutiva.

Estádio de maturação gonadal: Identificar através da análise dos ovócitos se estão maduros e prontos à reprodução.

O período reprodutivo, ou seja, a maturação sexual varia de acordo com a espécie, sexo, idade e peso a maturação reprodutiva, por exemplo, o Tambaqui alcança a maturidade sexual com peso vivo de 4 a 8 kg, idade da fêmea, 4 a 5 anos e macho 3 a 4 anos (Tabela 1); para o uso na reprodução os peixes devem ser selecionados pela observação da liberação de pequena quantidade de sêmen após massagem abdominal.

Tabela 1. Maturidade sexual das principais espécies reoflílicas comerciais.

Nome	Hábito alimentar	Desova	°C de cultivo	Maturidade sexual	Principal região de cultivo
Tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>)	Onívoro	Total	25 - 28°C	Fêmea: 4 - 5 anos Macho: 3 - 4 anos	Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste
Lambari (<i>Astyanax spp.</i>)	Onívoro,	Parcelada	24 - 26°C	Entre 4 a 6 meses.	Todas as regiões do Brasil

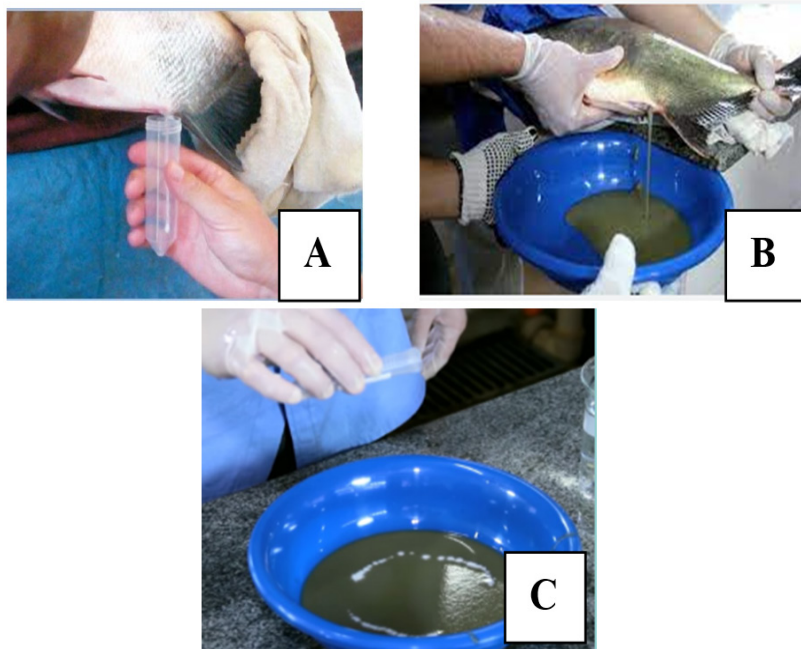
Pacu (<i>Piaractus</i>)	Onívoro	Total	25 - 29°C	Fêmea: 4- 5 anos Macho: 3- 4 anos	Sudeste e Centro- Oeste
Pintado	Carnívoro	Total	24 - 30°C	Fêmea: 3 anos Macho: 2 anos	Centro- Oeste, Sudeste e Sul
Cachara	Carnívoro	Total	24 - 30°C	Fêmea: 3 anos Macho: 2 anos	Centro- oeste, Sudeste e Sul
Dourado (<i>Salminus brasilienis</i>)	Carnívoro	Total	25°C	Fêmea: 2 - 3 anos Macho: 4 meses a 1 ano	Sul e Sudeste

Fonte: Dalmass *et al.* (2016).

Para a coleta de material, os peixes precisam ser capturados do meio natural (rios, lagos, represas ou barragens), utilizando-se tanques rede e transfish para evitar ao máximo o stress dos animais e a proliferação de doenças como consequência. Ou adquirir de pisciculturas licenciadas. Porém, se houver o desenvolvimento produtivo de reprodutores e matrizes, faz-se necessário a construção de tanques próprios para estes animais, estes só devem ser transportados para os tanques de reprodução após atingirem idade de maturação das gonada.

O sêmen dos machos com maturidade sexual pode ser obtido após indução hormonal, através do método de sucção com seringa ou de espermiacção direta, que consiste, basicamente, em “espremer” ou massagear o abdome do peixe, no sentido cranial-caudal, de maneira que este possa expelir os espermatozoides. Para a coleta dos óvulos, utiliza-se a mesma técnica (Figura 2A-C).

Figura 2. Manejo para coleta de óvulos. A) Espermiação. B) Extrusão de ovos em cachara. C) Fertilização.



Fonte: Fernando Kubitza (2017).

Após a coleta de ovócitos e sêmen, deve ser avaliado a motilidade e viabilidade espermática através de microscópio óptico no aumento de 400x. O volume de sêmen produzido varia de acordo com a espécie, em Tambaqui o volume de sêmen é relativamente grande, entre 7 a 13 ml/coleta (Maria *et al.*, 2010).

Técnica de hipofisação

A hipofisação é uma técnica bastante utilizada mundialmente para induzir a reprodução de peixes

reofílicos. Estes compreendem a maior parte das espécies de peixes nativos do Brasil que quando mantidos em condições de confinamento não conseguem se reproduzir espontaneamente (Crepaldi *et al.* 2006) em função do bloqueio do desenvolvimento gonadal acarretado pela privação do comportamento migratório (Crepaldi *et al.*, 2006).

As vantagens da hipofiseção se devem pela simplicidade da técnica e eficiência, o método não requer instalações ou instrumentos sofisticados para a coleta, armazenamento das glândulas e para a preparação do extrato hipofisários (Querol *et al.*, 2013). Os materiais utilizados para o preparo do extrato hipofisários são: balança, régua (paquímetro), seringas, macerador, hormônio, soro fisiológico.

Para melhor compreender a importância deste método na indução hormonal através do extrato de hipófise, é necessário relatar a importância da glândula hipofisária. A hipófise é uma glândula que serve de intermédio entre o sistema nervoso central e as gônadas (aparelhos reprodutores) dos peixes, machos e fêmeas. A principal função da glândula da hipófise é a produção e o armazenamento de diversos hormônios. Ela está situada na base do cérebro ao qual é ligada através de um pedúnculo. Em época de reprodução dos peixes esta glândula desempenha papel importante na ovulação em fêmeas e na espermiacção em machos.

De acordo com Querol *et al.* (2013), a quantidade de hormônio presente na glândula é proporcional aos períodos de desova dos peixes, variando entre quantidades máximas e nulas. Portanto, para utilização comercial da hipófise, os peixes doadores devem apresentar tamanho e peso indicativo de idade reprodutiva, conseqüentemente, apresentando um

satisfatório desenvolvimento gonadal, portanto, a coleta da hipófise deve ser realizada momento pré-ovulação.

Esta técnica de hipofisação permite tanto a utilização de produtos naturais, como extrato de hipófise extraído da glândula pituitária de peixes, aves, rãs e gonadotrofina coriônica humana (HCG), quanto de substâncias sintéticas, como os análogos de hormônios liberadores de gonadotrofinas (GnRH) e de antagonistas dos hormônios bloqueadores de receptores da dopamina. Essas substâncias sintéticas quando associadas dão origem aos hormônios comerciais, como por exemplo, o OvopelR, OvaprimR e ConceptalR.

O hormônio natural, utilizando o extrato hipofisário de peixe, normalmente de carpa comum e o OVOPELR, são muito utilizados em virtude de suas vantagens, destacando-se a praticidade da técnica, utilização de instrumentos comuns, facilidade de cálculo da dosagem, além de dispensar a refrigeração no armazenamento.

Os peixes reprodutores acondicionados em viveiros são capturados e selecionados obedecendo alguns critérios, que são indispensáveis para o sucesso na produção de alevinos, tais como: boa conformação corporal, aspecto saudável, livre de enfermidades, com escamas e nadadeiras integras, fêmeas com ventre abaulado e papila genital avermelhada e inchada e machos liberando sêmen. Após a captura e seleção, são transportados para o laboratório com auxílio de caixas, baldes, toalhas molhadas e sacos plástico contendo água, sal e anestésico com o intuito de evitar traumas e estresse no decorrer do trajeto. No laboratório os animais são separados por sexo e inseridos em aquários com sistema de água aberto e baixa densidade, a fim de facilitar o manejo e aplicação das doses hormonais (Dalmass *et al.*,

2016).

A dosagem de extrato de hipófise ou hormônio sintético tipo “OVOPELR” a ser administrada nos reprodutores, é calculada a partir do peso vivo e sexo do animal. Em fêmeas a proporção utilizada é de 5,5 mg/kg e em machos é de 1- 2,5 mg/kg. Estas dosagens são as principais utilizadas na reprodução de peixes reofilicos, entretanto as mesmas podem ser alteradas conforme a exigência apresentada por cada espécie, bem como o intervalo de aplicação (Crepaldi *et al.*, 2006).

De acordo com Leite *et al.* (2013), avaliando a dose inseminante e embriogênese na fertilização artificial de tambaqui (*Colossoma macropomum*), fonde a fertilização artificial foi testada nas proporções de espermatozoides/ovócito de D1-50.666; D2-75.999; D3-101.332; D4-126.665; D5-151.998, onservaram que que o desenvolvimento embrionário de tambaqui obedece ao esperado para peixes com ovostelolócitos e recomenda-se o uso da dose inseminante de aproximadamente 100.000 espermatozoides/ovócito na rotina de fertilização artificial dessa espécie.

De modo geral, a grande maioria dos estudos usualmente mostra dosagens de 0,5 e 5,0 mg de hipófise por Kg vivo dos exemplares de reprodutores, sendo que os machos recebem uma única dose, simultaneamente a segunda dose da fêmea podendo variar de espécie para espécie conforme Pereira *et al.* (2005).

Depois do cálculo, para a preparação do extrato bruto de hipófise, as glândulas são desidratadas e conservadas a seco, devem ser maceradas a quantidade resultante com vaselina, com auxílio de um bastão ou pistilo em gral de porcelana (ou recipiente de vidro) até que todo o conteúdo se desintegre e se transforme em uma massa (Bock; Padovani,

2000). Em seguida dilui-se o extrato de hipófise, EBCH, ou OVOPELR em solução fisiológica (1 ml de soro para cada 4 mg de extrato) para facilitar a aplicação via seringa na base da inserção da nadadeira peitoral, na direção crânio-caudal (Dalass *et al.*, 2016). Após a preparação do extrato hipofisário, a solução deverá permanecer em repouso por 5 minutos, após este período, a mesma estará pronta para aplicação.

Figura 3. Indução hormonal em Tambaqui
(*C. macropomum*)



Fonte: Tambaplus

No guia de indução hormonal, realizado por Dallas *et al.* (2016), recomendam que as fêmeas recebam inicialmente 10% da dose hormonal total (dose preparatória), cuja função é estimular a migração da vesícula germinal (Figura 3). Após um intervalo de 8-12 horas, as fêmeas recebem a segunda dose (90% da dose hormonal total), sendo esta responsável

por induzir a quebra da vesícula germinal, ovulação e desova. A aplicação é feita na base inferior da nadadeira peitoral num ângulo de 45°. Já os machos, recebem uma única, no momento da segunda dose das fêmeas, que tem como objetivo aumentar o volume seminal (Nizzio Maria *et al.*, 2011).

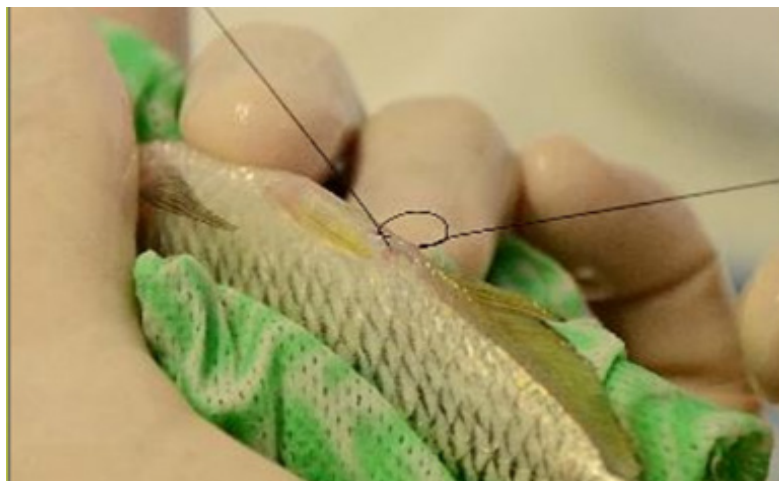
Para que a indução hormonal ocorra de maneira eficaz, a fim de evitar qualquer situação que promova estresse nos animais e conseqüentemente um possível comprometimento da desova, são necessários alguns cuidados, como: realizar a aplicação das doses hormonais nos reprodutores no interior dos aquários, sem removê-los da água, evitando assim a perda de muco e escamas, outra forma é removê-los rapidamente com o uso de uma toalha molhada para evitar a perda de muco e escamas. Caso os peixes sejam retirados dos tanques de reprodução e levados para uma base especificamente confeccionada para proteger os peixes durante aplicação do extrato de hipófise. Nesta etapa deve-se adotar medidas para que os reprodutores não sofram qualquer tipo de lesão física, que venham a interferir no processo de indução. A parte corporal mais utilizada para a injeção do extrato hipofisário é a base da nadadeira peitoral, porém para a hipófise extraída das palometas, é indicado a aplicação no músculo, logo abaixo da nadadeira dorsal sendo mais eficaz e aparentemente reduziu o stress no animal.

Após a aplicação do hormônio, devem-se monitorar regularmente os animais após a administração da última dose hormonal. Também se pode realizar um ponto cirúrgico no poro urogenital da fêmea, para que as desovas aconteçam no momento desejado.

É importante destacar que no momento da realização da sutura (Figura 4) assim como da extrusão, é indispensável

o uso de um anestésico que tem o objetivo de reduzir os danos físicos, tanto aos peixes como ao operador, além de facilitar o manejo. Um exemplo de anestésico que vem sendo utilizado regularmente nas pisciculturas é o óleo de cravo, cuja dose correta a ser utilizada ainda não foi definida, porém, algumas pisciculturas utilizam uma solução contendo 20 ml de óleo de cravo diluído em 500 ml de álcool, após esta diluição, utilizam-se 10 ml da solução para cada 200 litros de água (Vidal *et al.*, 2008).

Figura 4. Ponto no poro urogenital.



Fonte: VIDAL *et al.* (2008)

Após o preparo da solução, os peixes são colocados no recipiente com o anestésico até que atinjam o estágio de anestesia cirúrgica. Depois da realização de todo o processo de indução, os peixes devem ser colocados no tanque para que se recuperem do efeito anestésico (Tabela 2).

Tabela 3. Os principais anestésicos e as formas de utilização dos anestésicos mais comumente encontrados no Brasil.

Anestésico	Preparo da solução
MS-222	Dissolvido diretamente na água.
Benzocaína	Dissolvida em acetona ou álcool, posteriormente misturada na água.
Quinaldina	Diluída em acetona ou álcool, posteriormente misturada na água.
2-Fenoxietanol	Diluído diretamente na água.
Mentol	Dissolvido em acetona ou álcool, posteriormente misturada na água.
Óleo de Cravo	Diluído diretamente na água

Fonte: Adaptado de Vicente (2014).

1.2.4 Processo de remoção e conservação da glândula pituitária

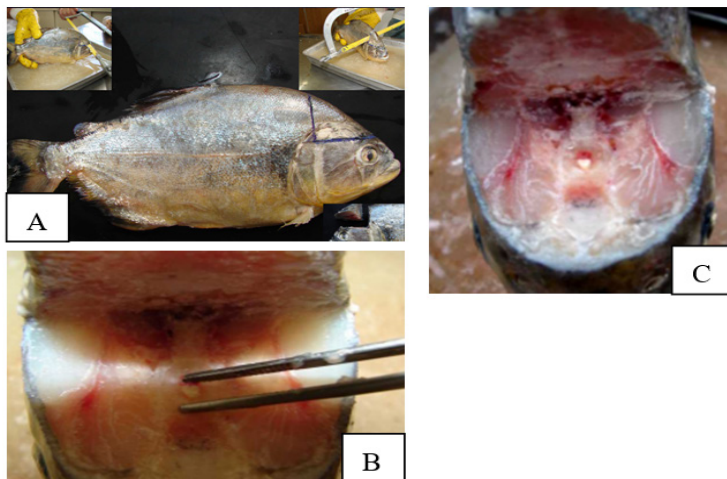
A hipofiseção, por tratar-se de uma técnica econômica e eficaz, é caracterizada pela simplicidade dos materiais utilizados principalmente na remoção da glândula, de fácil retirada, quando o Piscicultor praticar a extração a campo. Os itens necessários para a preparação, o armazenamento e a conservação da hipófise, são listados a seguir: tesoura, pinça, serra fita, vidro de relógio, cuba de inox com parafina, frasco de vidro, acetona pura, rolha, algodão, papel filtro,

sílica gel e etiqueta para coletar a data de coleta.

A primeira etapa para coleta a glândula da hipófise, ocorre fazendo-se uma abertura do crânio do peixe e identificação da localização da glândula, para que posteriormente se possa realizar a extração. Com relação a abertura do crânio, são realizadas duas fissuras, com o objetivo de se retirar a cobertura do cérebro, facilitando desta forma, a identificação da hipófise para o ato de extração (Figura 5).

Alguns cuidados importantes devem ser tomados para que a mesma não seja danificada, de forma, que não influencie na quantidade e qualidade do hormônio presentes na glândula. Após extração, a hipófise é rapidamente imersa em um recipiente contendo acetona pura, permanecendo por um período inicial de conservação de 12 horas, consistindo em um dos principais passos para o sucesso da indução hormonal.

Figura 5. (A) Ilustração dos cortes na parte frontal do crânio do peixe para remoção da caixa craniana. (B) Localização da glândula. (C) Extração da glândula hipofisária com pinça.



Fonte: Querol *et al.* (2013)

No processo de conservação, usa-se a acetona, que têm como principais funções desidratar as hipófises e eliminar o material lipídico (gordura) existente, restando naturalmente a carga hormonal utilizada para reprodução. As etapas de conservação e secagem das hipófises devem ser seguidas à risca, pois são importantes para o processo de armazenamento e qualidade dos hormônios. O conteúdo inicial de acetona pura onde as glândulas foram imersas na etapa de extração, deve ser retirado e um novo conteúdo de acetona pura é adicionado, para melhor desidratação. Após um intervalo de aproximadamente 12 a 24 horas as glândulas já podem ser processadas. Cabe ressaltar que para a preparação do extrato, as hipófises devem permanecer por

um período de 30 minutos em temperatura ambiente antes da maceração.

Antes do armazenamento é importantíssimo que seja retirado o máximo de umidade ainda presente nas glândulas. Esse procedimento pode ser realizado usando o papel filtro onde as hipófises permanecem em temperatura ambiente durante 30 minutos. Conforme Woynarovich e Horvath (1983), as hipófises podem durar anos se armazenadas, se forem armazenadas de forma correta. Em laboratório ou a campo as hipófises podem ser armazenadas em frascos de vidros, com uma camada de algodão, uma bolsa contendo sílica gel e devidamente arrolhadas, para evitar a entrada de umidade e contaminação por fungos e outros microrganismos.

Hora-grau das espécies na indução hormonal

Finalizado o processo de indução hormonal, os peixes necessitam de um período de tempo, determinado pela temperatura da água, espécie do peixe, tipo e dosagem do hormônio, para se tornarem aptos a desova (fêmeas) e a liberação de sêmen pelos machos (Dalmass *et al.*, 2016). Para isso, é fundamental que o produtor conheça a Hora-grau da espécie utilizada. A Hora-grau estabelece aproximadamente o momento provável que os peixes reprodutores levarão para desovar em função da temperatura do sistema em que estão alojados. Esse valor altera conforme a fisiologia reprodutiva de cada espécie, de forma que para tambaqui o valor acumulado da medição de temperatura varia entre 200 a 300 Hora grau (Streit Jr. *et al.*, 2012).

De acordo com Sousa e Castro (2014), multiplicando-se o tempo (h) pelo valor médio da temperatura, obtiverem

resultados variando entre 230 a 253 Hº e 221 a 247 Hº, para os turnos diurno e noturno, respectivamente. As aferições de temperaturas realizadas durante o processo de hora-grau completaram um total de 8 horas consecutivas de monitoramento. Kubitzka (2004) relata que a ovulação de Tambaqui (*C. Macropomum*) pode ocorrer a partir de 200 Hº. Porém, Galvão (2009) trabalhando com a mesma espécie verificou a ovulação desses peixes ocorre a partir de 240 Hº, valores bem próximos aos encontrados por Sousa e Castro (2014). Portanto, os valores limites em hora-grau estipulados para o momento aproximado da ovulação das matrizes de tambaqui, são 200 e 300 Hº (Kubitzka, 2004; Streit Jr. *et al.*, 2012; Leite *et al.*, 2013).

Quanto maior a temperatura da água, mais rápido o animal irá realizar a liberação dos gametas. Além do produtor está atento a Hora-grau da espécie utilizada, deve atentar-se aos sinais comportamentais (natação em carrocél, ruídos e espasmos musculares) apresentados pelas fêmeas no momento da ovulação (Andrade; Yasui, 2003). A seguir na Tabela 4, os valores de hora-grau das espécies reofílicas.

Tabela 4. Hora-grau das principais espécies reofílicas.

Espécie	Hora-Grau
	180 - 230
Cachara (<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>)	
Dourado (<i>salminus</i>)	120 - 150
Lambari (<i>Tradescantia zebrina</i>)	180 - 220
Pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>)	200 - 230

Pintado 180 – 230
(*Pseudoplatystoma corruscans*)

Tambaqui 200 – 240
(*Colossoma macropomum*).

Org: Autores (2024)

1.2.6 Processo de desova em fêmeas e coleta do sêmen

O método de coleta do material utilizado para a fertilização pode ser através da técnica seminatural ou extrusão. Após a ovulação, as matrizes são retiradas cuidadosamente dos aquários e colocadas sobre uma superfície macia ao qual são submetidas a um método denominado extrusão, que consiste na realização de uma massagem abdominal no sentido encéfalo-caudal para induzir a saída dos óvulos pela papila urogenital (Zaniboni Filho; Weingartner, 2007) (Figura 6).

Figura 6. Extrusão de ovos em peixe.



Fonte: Christofolletti (2013).

Posterior à extrusão, o sêmen é distribuído uniformemente sobre os óvulos e com uma pena de ave ou espátula de silicone o conteúdo é misturado delicadamente por aproximadamente 2 minutos ou até que tudo esteja bem homogêneo (Dalass *et al.*, 2016). Em seguida, adiciona-se a água para ativar os espermatozoides e hidratar os óvulos, promovendo a fecundação, a água utilizada deve ser a água da incubadora, onde os óvulos serão acondicionados. Os ovos fertilizados serão transferidos para incubadoras, onde permanecem até o momento da eclosão.

Antes da transferência, os ovócitos hidratados e fertilizados em bacias são “lavados”, retirando-se a água da bacia com sêmen e coloca-se água novamente, este método é empregado para a remoção do sêmen. Com o intuito de evitar uma significativa redução da taxa de fertilização, é indispensável a utilização de vasilhas de plástico atóxico, secas e limpas, visto que ambos os gametas liberados inativos serão ativados na presença de água.

Os ovos devem ser incubados em incubadoras apropriadas de fluxo contínuo, até o estágio larval ou até atingir a fase de alevinagem. Com este procedimento no processo reprodutivo, são obtidas melhores taxas de crescimento, menor índice de mortalidade e peixes mais saudáveis. Outra análise que pode ser realizada é sobre análise da taxa de fecundidade, para esta avaliação, coleta-se uma amostra de ovos após 8 h de incubação, contando-se 100 ovos e observando quantos estão viáveis, o desenvolvimento dos ovos depende da temperatura da água.

Existem diversos tipos de incubadoras, mas, de uma maneira geral, estas são responsáveis pelo bom desenvolvimento dos ovos, que devem ser mantidos em condições de sanidade adequadas. As incubadoras devem

ter a capacidade de manter a temperatura apropriada (que pode variar de acordo com a espécie de peixe) e fornecer uma alta concentração de oxigênio, de maneira intermitente. Além disso, a água deve ser limpa e ter o seu fluxo controlado, para que sejam evitados possíveis danos aos ovos.

Um cuidado extra é o controle da vazão da água e a aeração para que os ovos não fiquem parados no fundo ou presos nas bordas da incubadora, evitando-se assim que ovos não fecundados se fixem aos fecundados. Ovos não fecundados tendem a apresentar rápido crescimento de fungos e bactérias, fatores que são prejudiciais ao desenvolvimento dos ovos fecundados. Como exemplo podemos citar o Tambaqui, seus os ovos eclodem de 12 a 20 h após o início da incubação. As larvas permanecem na incubadora entre 6 a 10 dias, quando atingem a fase de pós-larvas e podem ser transferidas para outros tanques de larvicultura ou viveiros de alevinagem (Crepaldi *et al.*, 2006).

Outra metodologia realizada para a desova de peixes é a Seminatural. Na técnica de reprodução Seminatural, os machos e as fêmeas, previamente induzidos com hormônio, são colocados juntos no mesmo ambiente e liberam os gametas de forma natural. Após os espermatozoides fertilizarem os óvulos, os ovos podem ser transferidos para a incubadora ou podem permanecer no mesmo ambiente em que estavam.

Manejo na incubação dos óvulos fertilizados: zigoto

Incubação é a fase de desenvolvimento do ovo até a forma de larva. Com a fertilização, temos uma nova célula chamada ovo ou zigoto possuindo a metade das informações genéticas paterna e materna. O zigoto começa, então a se

dividir e dividir até formar o embrião que continuará o seu desenvolvimento até o nascimento. A incubação é uma fase que tem por objetivo garantir o desenvolvimento embrionário até a eclosão ou até o início da fase de larvicultura.

O sucesso da incubação depende basicamente da qualidade da água:

- Temperatura – ideal para cada espécie;
- pH – entre 7 e 8;
- Dureza e Alcalinidade – acima de 30 mg/L;
- Oxigênio dissolvido – acima de 5 mg/L.

A temperatura é um fator fundamental para o desenvolvimento embrionário (Pauly; Pullin, 1988). O efeito de outros fatores que influenciam no desenvolvimento do ovo é menos estudado, não existindo nenhuma série de dados que possam ser usados para identificar tal fatores e quantificar os efeitos nas diversas espécies de peixe. A única exceção é o tamanho do ovo, que é usualmente quantificada em diâmetro.

Em relação ao tamanho e tempo de desenvolvimento do ovo de peixes que se reproduzem em cativeiro, uma atenção especial, pois influenciam o desenho do equipamento de incubação, a gestão e a cultura de todos os estádios de desenvolvimento em cativeiro. Por exemplo, ovos pequenos, menor de 1mm produzem larvas pequenas, com bocas pequenas e são assim mais difíceis de alimentar do que larvas grandes.

Outro fator a ser considerado é o período de incubação, a vazão da água e a aeração (Figura 7), estes devem ser controlados para que os ovos ou zigotos não fiquem parados no fundo ou presos nas bordas da incubadora, evitando-

se fixação dos ovos não fecundados aos ovos fecundados (Figura 8).

Figura 7. Larvas de Curimatá (*Prochilodus lineatus*).
A) Incubadoras com vazão de água e aeração contínua.
B) Larva de peixe recém-eclodida apresentando saco vitelínico.



Fonte: Jéssica Antonia C. Mendes (2024)
Local: Codevasf, Petrolina-PE.

Figura 8. Larvas de Curimatá (*Prochilodus lineatus*). A) Larvas recém-eclodida apresentando saco vitelínico. B) ovos ou zigotos parados no fundo da incubadora, e fixação dos ovos não fecundados aos ovos fecundados.



Fonte: Jéssica Antonia C. Mendes (2024)
Local: Codevasf, Petrolina-PE.

O período de incubação é dependente da espécie, por exemplo, a eclosão dos ovos de Tambaqui ocorre entre 12 a 20 horas após o início da incubação. As larvas permanecerão na incubadora por um período de 6 a 10 dias, até que as larvas atingem a fase de pós-larvas e possam ser transferidas para os tanques de larvicultura ou viveiros de alevinagem.

Larvicultura

No início da larvicultura, é imprescindível que se forneça alimento vivo para promover maior disponibilidade de nutrientes e assim, possibilitar um rápido desenvolvimento das estruturas digestórias nos peixes, na fase pós-larva. O momento em que se inicia a busca por alimento exterior é quando a bexiga natatória se enche de ar e a vesícula vitelínica está com 20 a 30 % de sua reserva energética, portanto, nesta fase é a presença de vitelo que assegura a sobrevivência devido à dificuldade que existe em encontrar uma partícula de alimento vivo ou inerte que lhe possibilite ingerir os nutrientes e a energia necessária para seu desenvolvimento (Cantelmo; Senhorini, 1989).

O fornecimento de alimento vivo para as pós-larvas nos viveiros, deve ser realizado com o preparo prévio deste, sendo necessário realizar o manejo de secagem, desinfecção, correção do pH e adubação. Através deste programa de fertilização orgânica e inorgânica, ocorre a otimização dos aspectos nutricionais de zooplâncton, fornecendo também, condições ideais para o desenvolvimento fitoplâncton e outros microrganismos presentes no viveiro, fonte de alimento essencial para o desenvolvimento inicial dos peixes.

A alimentação artificial pode ser iniciada após o décimo dia de vida das larvas, sendo importante o seu fornecimento

várias vezes ao dia. Semanalmente é capturada uma amostra dos indivíduos para avaliar seu desenvolvimento e calcular a quantidade de ração a ser administrada.

As pós-larvas têm baixa capacidade de movimentação, para alimentá-las com a ração, esta deve ser distribuída de maneira uniforme sobre a superfície do tanque ou viveiro. O manejo adequado durante as fases de larva e de pós-larva é essencial, pois se trata de períodos em que esses organismos são muito sensíveis às variações e condições ambientais.

Protocolo para criopreservação do sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*)

Os estudos com a criopreservação seminal de peixes neotropicais começaram no Brasil em meados dos anos 80, em algumas espécies nativas (Coser *et al.* 1984; Coser *et al.* 1987; Kavamoto *et al.* 1989). Já no início dos anos 90 mais trabalhos foram publicados com a mesma temática (Carolsfeld *et al.*, 1990). Porém, ocorreu uma lacuna de quase dez anos sem pesquisas nas pesquisas sobre criopreservação no Brasil. Somente no final da década de 90, publicou-se novamente um trabalho que tratou sobre a técnica com a espécie *C. macropomum* (Farias *et al.*, 1999), os estudos foram retomados com maior ênfase no início dos anos 2000, tendo como marco, o estudo conduzido por Carolsfeld *et al.* (2003), onde pesquisaram a criobiologia de espécies nativas, apresentando protocolos para criopreservação de seis espécies nativas, em 2014, pelo menos 15 espécies nativas tem um protocolo que pode ser utilizado no congelamento de sêmen (Viveiros *et al.*, 2014).

Em relação ao tambaqui, peixe nativo de grande importância comercial no Brasil, a criação e organização

de bancos de germoplasma serão úteis tanto no suporte a programas de recuperação de populações naturais ameaçadas de extinção, quanto no auxílio ao melhoramento genético das espécies. Além disso, a conservação dos recursos genéticos animais existentes na natureza é fundamental para a preservação da base genética, especialmente quando se pensa na existência de genes e combinações genéticas únicas que podem ser úteis no futuro (Villela *et al.*, 2009).

A forma de preservar a genética destes animais, é através da coleta de sêmen por indução hormonal e criopreservação, onde permite-se à conservação de material biológico em nitrogênio líquido (N₂L) a -196°C. Esta temperatura negativa permite com que a estrutura e funcionalidade das células e tecidos vivos sejam mantidas, portanto, geneticamente viáveis e reversivelmente inativas do ponto de vista metabólico (Pegg, 2007). Apresentando diversas vantagens, dentre elas a conservação de material genético de animais selvagens oriundos de locais distantes e de difícil acesso, eliminação do problema causado pela assincronia na maturidade gonadal entre machos e fêmeas, utilização de gametas de animais selecionados em programas de melhoramento ou manipulados geneticamente (triplóides, clones e transgênicos), diminuição de custos e riscos de transporte de animais vivos, e estabelecimento de programas de hibridização utilizando peixes com diferentes períodos reprodutivos (Viveiros, 2005; Maria *et al.*, 2009).

Procedimentos para congelamento e descongelamento do sêmen - este procedimento foi elaborado pelo laboratório de biotecnologia da reprodução animal da EMBRAPA tabuleiros costeiros (LABRA)

Após a coleta do sêmen, este deve ser avaliado, em microscópio óptico, no aumento de 400x, por meio da mensuração da motilidade e viabilidade espermática. É realizado o congelamento do sêmen de tambaqui em botijão de vapor de N₂, este botijão também pode ser chamado de Dry shipper, que deve ser preparado da seguinte forma:

- i) Adicionar N₂L lentamente no botijão;
- ii) Parar de encher quando o nível atingir o pescoço do botijão;
- iii) Repetir o procedimento até que o nível de N não diminua mais. O material esponjoso existente na parede do botijão permite a absorção e conservação do N₂L, liberando apenas o vapor para a parte central onde ficarão armazenadas as doses dentro de uma caneca com as raquetes de 0,5 ml;
- iv) Manter o botijão cheio por 24 horas para a máxima absorção de N₂L e;
- v) Passado o período de 24 h, retirar todo o excesso de N₂L emborcando o botijão.

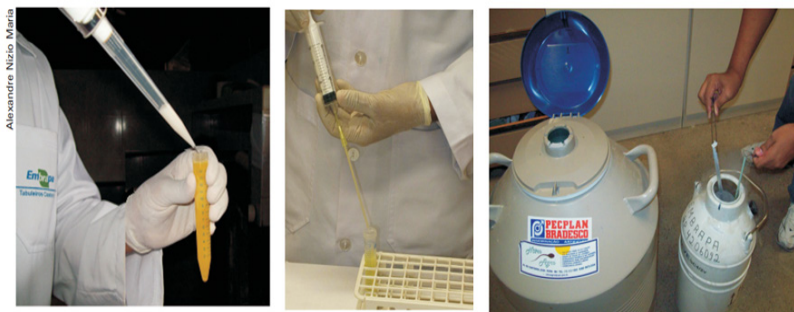
No dia do processamento do sêmen, a solução de congelamento deve ser preparada com antecedência. Em um recipiente seco e estéril acrescentar solução glicosada (75%), metilglicol (10%) e gema de ovo (5%).

A solução deve ser misturada por meio de agitação até que fique homogênea, posteriormente acrescenta-se o sêmen (10%) e mistura-se delicadamente. A proporção final é 7,5 partes de solução glicosada, 1 parte de metilglicol, 0,5

partes de gema de ovo e uma parte de sêmen. Após a adição do sêmen à solução de congelamento, é realizado o envase e congelamento dentro do tempo de no máximo 20 minutos. Todos os meios devem estar no isopor com gelo na mesma temperatura do sêmen.

Em seguida o sêmen diluído é aspirado para as palhetas de 0,5 mL, e estas são fechadas com esferas metálicas ou plásticas, álcool polivinílico ou com seladores térmicos, colocadas em raques e para então serem transferidas para no botijão de vapor de N₂L (Figuras 9).

Figura 9. A) Adição do sêmen a solução diluidora; B) Envase do sêmen nas palhetas de 0,5 ml; C) Transferência das raques para o botijão de N₂L.



Fonte: EMBRAPA tabuleiros costeiros (LABRA).

Após o período de 20-24 horas, todas as raques contendo as palhetas com sêmen devem ser transferidas para o botijão de armazenamento contendo N₂L. Para realizar a operação de transferência das raques de forma rápida e segura devem-se colocar os botijões um ao lado do outro (Figura 8). Para realizar este procedimento, é necessária ajuda de outra pessoa para levantar a caneca do

dry shipper apenas o suficiente para apanhar a raque a ser transferida. Esta caneca deve ser abaixada imediatamente até o fundo do botijão logo após o procedimento. Enquanto isso, uma segunda pessoa levanta a caneca do outro botijão, de armazenamento, o suficiente para introduzir a raque que deverá ser imersa imediatamente no N₂L. Esta operação deve ser efetuada o mais rápido possível, para evitar que o sêmen congelado seja exposto à temperatura ambiente por período superior a 10 segundos.

Em relação a etapa de utilização de sêmen criopreservado, descongelar no máximo cinco palhetas simultaneamente. Após as palhetas serem retiradas do botijão, estas devem ser mergulhadas imediatamente em água a 60°C por 08 segundos. Após este período, as palhetas devem ser enxutas com papel toalha, para posterior corte das extremidades com tesoura para que o sêmen esorra livremente.

O sêmen descongelado deve ser colocado em recipiente seco e deve ser usando o mais rápido possível para garantir sua viabilidade dos espermatozoides. A qualidade do sêmen descongelado deve ser avaliada em microscópio óptico, no aumento de 400x, da mesma forma que foi feita antes do congelamento, sendo considerada uma amostra de boa qualidade aquela que tiver motilidade e viabilidade superior a 50%.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A produção de peixes de forma mais intensiva, têm apresentado importância, cada vez maior, tornando imprescindível que os criadores aprimorem as técnicas de produção e manejo necessárias para assegurar o êxito e

alta produtividade, garantindo alevinos de qualidade para povoamento e repovoamento do sistema produtivo.

As técnicas de reprodução artificial possibilitam o suprimento de ovos para uma grande variedade de peixes destinados à criação em cativeiro em sistemas intensivos e superintensivos. Essas técnicas tornam igualmente possível introduzir várias espécies importantes em áreas geográficas separadas. Além disso, permitem a incubação e a eclosão de ovos e sua criação em condições protegidas, independentemente das condições climáticas.

A coleta correta de sêmen de peixe torna possível a padronização e refinamento das técnicas de criopreservação, uma ferramenta na conservação da diversidade e melhoramento genético de peixes. Com o devido planejamento, as instituições de pesquisa nacionais podem, em alguns anos, estar prontas para fornecer ao setor produtivo, a tecnologia necessária para estimular o surgimento de um novo segmento do agronegócio no Brasil, representado por empresas privadas voltadas à comercialização de sêmen de peixes de alto desempenho zootécnico.

REFERÊNCIAS

AGOSTINHO, Â. A.; THOMAZ, S. M.; GOMES, L. C. Conservação da biodiversidade em águas continentais do Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, p. 70-78, 2005.

ALPIZAR, D. *et al.* **O papel dos peixes no funcionamento ecológico da bacia do rio Mekong**. Em Peixes e Pescas da Bacia do Rio Mekong (pp. 189-209). 2017.

ANDRADE, D. R.; YASUI, G. S. Manejo da reprodução natural e

artificial e sua importância na produção de peixes no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, n. 2, p. 166-172, 2003.

AMARAL, J. S.; VENTURIERI, R. L.; MOREIRA, R. G. Gonadal steroids and energy availability during ovarian maturation stages of the Amazonian pirarucu *Arapaima gigas* (Teleostei: Osteoglossidae) in the wild. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**. v. 230, p. 106-114, 2019.

BASHIYO-SILVA, C.; COSTA, R. S.; RIBEIRO, D. C.; SENHORINI, J. A.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R.; NINHAUS-SILVEIRA, A. Hormonal induction of *Brycon cephalus* (Characiformes, Characidae) to spermiation using D-ala6, pro9net-mGnRH + metoclopramide. **Zygote**. v. 24, p. 319-325, 2016.

BLACKBURN, D. G. **Viviparity and oviparity**: Evolution and reproductive strategies. 1999. *In*: KNOBIL, E.; NEILL, J. (Eds.), Encyclopedia of reproduction (pp. 994–1003).

BOCK, C. L.; PADOVANI, C. R. Considerações sobre a reprodução artificial e alevinagem de pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) em viveiros. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 22, n. 2, p. 495-501, 2000.

CAROLSFELD, J.; HARVEY, B.; SILVEIRA, W. F.; KAVAMOTO, E. T.; RAMOS, S. M.; SILVEIRA, A. N. Criopreservação do semen de pacu, *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887. **Boletim Técnico CEPTA**, v. 3, p. 1-4, 1990.

CARPENTER, S.R. et al. Impacto do carbono orgânico dissolvido, fósforo e pastoreio na biomassa fitoplanctônica e na produção em lagos experimentais. **Limnologia e**

Oceanografia, v. 61, n. 2, p. 527-545, 2016.

CEJKO, B. I, TARGOŃSKA, K., KOWALSKI, R. K, ZARSKI, D., SAROSIEK, B., KUCHARCZYK, D., GLOGOWSKI, J. A eficácia das preparações hormonais (Ovopel, Ovaprim, LHRHa, hCG e CPE) na estimulação da espermiacão em dace *Leuciscus leuciscus* (L.). **Journal of Applied Ichthyology**, v. 28, n. 6, 2012.

CHRISTOFOLETTI, J. Reprodução de peixes. Embrapa Fisheries and Aquaculture. 2013. Acessado em: 11 de Abril de 2024. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/en/busca-de-imagens/-/midia/1095007/reproducao-de-peixes>>.

COSER, A. M.; GODINHO, H.; RIBEIRO, D. Cryogenic preservation of spermatozoa from *Prochilodus scrofa* and *Salminus maxillosus*. **Aquaculture**, v. 37, n. 4, p. 387-390, 1984.

COSER, A.; GODINHO, H.; TORQUATO, V. Criopreservação do sêmen do peixe piau *Leporinus silvestrii* (Boulanger, 1902). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 39, n. 1, p. 37-42, 1987.

CREPALDI, D. V.; FARIA, P. M. C.; TEIXEIRA, E. A.; RIBEIRO, L. P.; COSTA, A. A. P.; MELO, D. C.; MORAES, V. E. Utilização de hormônios na reprodução induzida do surubim (*Pseudoplatystoma* spp). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 30, n. 4, p. 168-173, 2006.

DALMASS, F.; CARRARI, I.; CESCA, I.; NOVAKI, M.: NOVAKI, M. **Guia de Indução Hormonal de Peixes Reofílicos**. Curitiba: Instituto GIA, 2016.

FARIAS, J. O.; NUNES, J. F.; CARVALHO, M. A. M.; SALGUEIRO, C. C. M. Avaliação " In Vitro" e " In Vivo" do Sêmen de Tambaqui (*Colossoma macropomum*) Conservado a Temperatura Ambiente e Criopreservado em Água de Coco. **Revista Científica de Produção Animal**, v. 1, n. 1, p. 44-58, 1999.

FARIA, V. V.; VENANCIO, I. M.; BASILIO, T. H.; SILVEIRA, L. M.; JUCÁ-QUEIROZ, B.; GADIG, O. B.; FURTADONETO, M. A. Captura incidental de um tubarão-baleia, *Rhincodon typus* (*Orectolobiformes, Rhincodontidae*), na costa do Ceará, Nordeste do Brasil. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, v. 4, n. 4, p. 599-604, 2009.

FOGLI DA SILVEIRA, W.; KAVAMOTO, E. T.; CESTAROLLI, M. A.; GODINHO, H. M.; RAMOS, S. M.; SILVEIRA, A. N. Avaliação espermática, preservação criogênica e fertilidade do sêmen do pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), proveniente de reprodução induzida. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 17, p. 1-3, 1990.

GALLEGO V.; ASTURIANO, J. F. Sperm motility in fish: technical applications and perspectives through CASA-Mot systems. **Reproduction and Fertility**, v. 30, n. 6, p. 820-832, 2018.

GALVÃO, G. A. Histomorfometria gonadal comparada de *Astyanax lacustris* (Lütken, 1875) E *Psellogrammus kennedyi* (Eigenmann, 1903) (*Characiformes, characidae*) em um reservatório do semiárido brasileiro. Dissertação apresentada à Universidade Federal do Vale do São Francisco. **Mestrado em Ciências Veterinárias**. Petrolina, Pernambuco, 2015.

GOTO, R.; SAITO, T.; MATSUBARA, T.; YAMAHA, E.

Microinjection of marine fish eggs. In *Microinjection. Methods in Molecular Biology*, v. 1874, p. 475-487, 2019.

HAFEZ, E. S. E.; JAINUDEEN, M. R.; ROSNINA, E. Y. In: HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. (Eds.). **Hormônios, Fatores de Crescimento e Reprodução**. 7 ed. Reprodução animal, Manole. 2004.

JUDYCKA, S.; NYNCA, J.; CIERESZKO, A. Opportunities and challenges related to the implementation of sperm cryopreservation into breeding of salmonid fishes. **Theriogenology**, v. 132, p. 12-21, 2009.

KAVAMOTO, E. T.; SILVEIRA, W. F.; GODINHO, H. M.; ROMAGOSA, E. Fertilização em *Prochilodus scrofa* Steindachner 1881, com sêmen criopreservado em nitrogênio líquido. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 16, n. 1, p. 29-36, 1989.

KOWALSKI, R. K.; CEJKO, B. I. Sperm quality in fish: Determinants and affecting factors. **Theriogenology**, v. 1, n. 135, p. 94-108, 2019.

KUCHARCZYK, D.; NOWOSAD, J.; KUCHARCZYK, D. J.; KUPREN, K.; TARGOŃSKA, K.; WYSZOMIRSKA, E.; KUJAWA, R. Out-of-season artificial reproduction of common dace (*Leuciscus leuciscus* L.) under controlled conditions. **Animal Reproduction Science**, v. 202, p. 21-25, 2019.

KUJAWA, R.; FURGAŁA-SELEZNIOW, G.; MAMCARZ, A.; LACH, M.; KUCHARCZYK, D. Influência da temperatura no crescimento e sobrevivência de larvas sichel *Pelecus cultratus* criadas em condições controladas. **Pesquisa Ictiológica**, v. 62, n. 2, p. 1-10, 2016.

KUPREN, K.; MAMCARZ, A.; KUCHARCZYK, D.; PRUSIŃSKA, M.; KREJSZEFF, S. Influência da temperatura da água no tempo de incubação dos ovos e no desenvolvimento embrionário de peixes do gênero *Leuciscus* Polish. **Journal of Natural Sciences**, v. 23, p. 1-10, 2008.

LEITE, L. V.; MELO, M. A. P.; OLIVEIRA, F. C. E.; PINHEIRO, J. P. S.; CAMPELLO, C. C.; NUNES, J. F.; SALMITO-VANDERLEY, C. S. B. Determination of insemination dose and embryonic development in the artificial fertilization of tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 65, n. 2, p. 1-10, 2013.

LEVAVI-SIVAN, B.; BOGERD, J.; MANANˆOS, E.; GOMEZ, A.; LAREYRE, J. J. Perspectives on fish gonadotropins and their receptors. **General and Comparative Endocrinology**, v. 165, p. 412-437, 2010.

LJUBOBRATOVIĆ, U.; P´ETER, G.; SANDOR, Z.; KUGYELA, N.; RONYAI, A. The effect of hormonal preparation (gonadotropins vs. gonadoliberins) on pre-seasonally obtained eggs and larvae quality in pikeperch (*Sander lucioperca* L.). **Aquaculture International**, v. 27, p. 1009-1024, 2019.

MUNOZ-CUETOA, J. A.; ZMORAB, N.; PAULLADA-SALMERONA, J. A.; MARVELB, M.; MANANOSC, E.; ZOHARB, Y. The gonadotropin-releasing hormones: Lessons from fish. **General and Comparative Endocrinology**, v. 291, p. 1-9, 2020.

MYLONAS, C. C.; DUNCAN, N. J.; ASTURIANO, J. F. Hormonal manipulations for the enhancement of sperm production in

cultured fish and evaluation of sperm quality. **Aquaculture**, v. 472, p. 21-44, 2016.

NAGAHAMA, Y.; YAMASHITA, M. **Regulation of oocyte maturation in fish**. *Develop. Growth Differ.* 50 p, 2008.

NGUYEN, A. T.; CHIA, J. H.; KAZETO, Y.; WYLIE, M. J.; LOKMAN, P. M. Indução do desenvolvimento de oócitos em enguias pré-vitelogênicas, *Anguilla australis*. **Endocrinologia Geral e Comparada**, v. 291, p. 113404, 2020.

NOWOSAD, J.; TARGOŃSKA, K.; CHWALUCZYK, R.; KASZUBOWSKI, R.; KUCHARCZYK, D. Efeito da temperatura na eficácia da reprodução artificial de dace [Cyprinidae (*Leuciscus leuciscus* (L.) em condições de laboratório e de campo. **Journal of Thermal Biology**, v. 45, p. 62-68, 2014.

PEREIRA, A. F.; ANDRADE, S. F.; SANTOS, J. E.; RIZZO, E.; SATO, Y.; BAZZOLI, N. Comparative morphology of gonads from six species of fish belonging to the family Anostomidae (*Characiformes: anostomidae*). **Revista de Biología Tropical**, v. 65, p. 713-723, 2017.

PEREIRA, J. R.; GIRARDI, L.; AQUINO-SILVA, M. R.; FIORINI, M. P. Reprodução induzida em Lambari: *Astyanax bimaculatus* (linnaeus, 1758). **Resumos do VII Congresso de Ecologia do Brasil**, Caxambu, Minas Gerais.

REBOUÇAS, P. M.; LIMA, L. R. D.; DIAS, I. F.; BARBOSA FILHO, J. A. D. Influência da oscilação térmica na água da piscicultura. **Journal of Animal Behaviour and Biometeorology**, v. 2, p. 35-42, 2014.

ROTILI, D. A.; FORNARI, D. C.; ZARDO, E. L.; MUELBERT, J. R. E.; BERNARDI, M.; SILVA, D. H. S.; STREIT JR. D. O. P. Sex steroid levels in females and males of *Brycon orbignyanus* throughout different juvenile and adult ages and during induction hormone in the mature females. **Aquaculture**, v. 548, p. 737695, 2022.

SOUZA, L. M. Avaliação da atividade reprodutiva dos teleósteos capturados por rede de arrasto na comunidade de Enseada, São Francisco do Sul, litoral norte de Santa Catarina. **Dissertação (Mestrado)**. Universidade Federal do Paraná. 99p. 2008.

SCHULZ, R. W.; MIURA, T. Spermatogenesis and its endocrine regulation. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 26, p. 43-56, 2002.

TARGOŃSKA, K. Controlled reproduction of asp, *Aspius aspius* (L.) using luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) analogues with dopamine inhibitors. **Aquaculture**, v. 306, p. 407-410, 2010.

TARGOŃSKA, K., KUPREN, K., ŻARSKI, D., KRÓL, R., KUCHARCZYK, D. Influence of thermal conditions on successful ide (*Leuciscus idus* L.) artificial reproduction during spawning season. **Italian Journal of Animal Science**, v. 10, p. 209-212, 2011.

WOYNAROVICH, E.; HORVATH, L. **Propagação artificial de peixes de águas tropicais**: manual de extensão. Brasília: Escopo, 220p, 1983.

WIPFLI, M. S. et al. Produtividade aquática e subsídios

de carbono terrestre em riachos do centro-sul do Alasca: evidências do conteúdo de ^{13}C em aranhas ribeirinhas. **Jornal da Sociedade Bentológica Norte-Americana**, v. 27, n. 3, p. 675-690, 2018.

VALENCIA, A., ADRIEU, J., MUTUA, A.N., MAREN, I.C., ZARRAGOITIA, O. Transcription pattern of reproduction relevant genes along the Brain-PituitaryGonad axis of female, male and intersex thicklip grey mullets, *Chelon labrosus*, from a polluted harbor. **General and Comparative Endocrinology**, v. 287, p.1-7, 2020.

VIDAL, L. V. O.; ALBINATI, R. C. B.; ALBINATI, A. C. L.; LIRA, A. D. D.; ALMEIDA, T. R. D.; SANTOS, G. B. Eugenol como anestésico para a tilápia-do-nilo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, p. 1069-1074, 2008.

VIVEIROS, A.; ORFÃO, L.; LEAL, M. **Biologia e Conservação de Espermatozoides**. In: BALDISSEROTTO, B.; CYRINO, J. E. P. et al. (Ed.). *Biologia e Fisiologia de Peixes Neotropicais de Água Doce*. Joboticabal: FUNEP/UNESP, 2014. cap. 15, p. 307-327.

ZANIBONI FILHO, E.; WEINGARTNER, M. Técnicas de Indução da reprodução de peixes migradores. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, p. 367-373, 2007.

ZOHAR, Y.; MUNOZ-CUETO, J. A.; ELIZUR, A.; KAH, O. Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. **General and Comparative Endocrinology**, v. 165, p. 438-455, 2010.

