



Bioteecnologias aplicadas a truticultura



Bioteecnología aplicada la cría de truchas

Biotechnology applied to rising of trout

Yara A Tabata

Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios. Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo.
Campos do Jordão, São Paulo, Brasil.

E-mail: yara@apta.sp.gov.br

Introdução

Os salmonídeos são peixes originários do hemisfério norte, mas vários representantes deste grupo foram introduzidos no hemisfério sul onde, em alguns países, constituem uma parcela econômica significativa da pesca comercial e recreativa. A truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), uma das espécies mais cultivadas da família Salmonidae, é natural da vertente Pacífica da América do Norte e da parte ocidental da Península de Kamchatka e Bacia de Okhotsk da Rússia. O termo truta arco-íris designa tanto a forma residente em água doce (*landlocked*), quanto a forma anádroma (migratória), sendo esta última comumente denominada de *steelhead trout* (26).

Por serem espécies de águas frias, nos países situados entre os trópicos, a criação de salmonídeos se restringe as variantes *landlocked* e, dentre elas, a truta arco-íris é a mais empregada por apresentar excelentes características tanto para a aqüicultura como para a pesca esportiva. Neste artigo, o termo truta arco-íris será utilizado para se referir apenas à forma residente em água doce.

Nos trópicos, os locais favoráveis para o cultivo da truta, limitam-se às regiões de altitude onde

os rios, na maioria dos casos, apresentam pouco volume de água, associado ao baixo teor de oxigênio dissolvido decorrente da menor pressão atmosférica. Considerando que o potencial de produção de uma truticultura está diretamente relacionado a quantidade de oxigênio disponível, esses locais não possibilitam a instalação de truticulturas de grande porte, dificultando a produção em larga escala. Estas limitações impostas pela pouca disponibilidade de água obrigam o truticultor a uma exploração bastante racional dos recursos hídricos, através da otimização das instalações e da adequação do manejo, bem como da utilização de bioteecnologias que promovam o aumento da produtividade para viabilizar economicamente a atividade.

Bioteecnologias aplicadas a truticultura

As bioteecnologias mais comumente aplicadas nos cultivos comerciais são a reversão sexual e a manipulação cromossômica, que podem ser empregados para a obtenção de peixes sexualmente invertidos, ginogenéticos, androgenéticos e poliplóides (5). Estes indivíduos poderão constituir estoques monosssexos, estéreis ou endogâmicos para serem utilizados diretamente, na produção de pescado ou indiretamente, nos programas de melhoramento

genético, bem como em pesquisas nas áreas de fisiologia, imunologia, genética, etc., onde a padronização do material biológico é desejável (24).

Reversão Sexual

A maturação sexual é um dos processos biológicos que mais afetam a produtividade, uma vez que durante este período a energia para o crescimento somático é canalizada para a produção de gametas, resultando na diminuição do crescimento, da eficiência alimentar, da sobrevivência e da qualidade do pescado (4). Deste modo, a truta arco-íris tem sido tradicionalmente comercializada na forma de truta porção, com peso aproximado de duzentos e cinquenta gramas, que pode ser alcançado antes do início da atividade reprodutiva.

Nos machos, entretanto, esses problemas são mais acentuados, pois uma considerável proporção entre eles amadurece sexualmente, ainda no primeiro ano de vida, enquanto que, as fêmeas maturam somente aos dois anos de idade. Assim, o cultivo de lotes 100% femininos é vantajoso, pois se elimina o problema da maturação sexual precoce dos machos e, ao mesmo tempo, pode-se aumentar a produção de ovos com o mesmo custo de manutenção de reprodutores.

A feminização pode ser obtida através de duas estratégias: a terapia hormonal e a ginogênese (ver ginogênese em manipulação cromossômica). A feminização pela técnica hormonal pode ser conduzida, diretamente, pelo fornecimento de estrógenos durante os estágios iniciais do desenvolvimento, ou, indiretamente, pela masculinização de fêmeas genotípicas com andrógenos e posterior fertilização de óvulos normais com o sêmen dessas fêmeas masculinizadas (14).

A utilização do método indireto é o mais indicado, pois os peixes submetidos ao tratamento hormonal são em número reduzido e não são destinados ao consumo humano, mas empregados como reprodutores e, ainda, a progênie resultante é 100% feminina, pois as fêmeas revertidas, embora sejam funcionalmente machos, são genotipicamente femininas. Por outro lado, o método indireto requer mais de uma geração para a produção de lotes 100% femininos. Na implantação do método, quando

não se dispõe de ovos 100% do sexo feminino, após o tratamento hormonal é necessário realizar a separação entre as fêmeas masculinizadas e os machos normais, através do teste de progênie ou pela observação direta das gônadas. Uma vez que o primeiro lote monossexo feminino tenha sido obtido, essa identificação torna-se desnecessária, pois o tratamento de masculinização pode ser aplicado em uma parcela totalmente feminina.

O sucesso da reversão sexual depende do tipo, da natureza e da concentração do hormônio utilizado, bem como da via de administração, da época de início e da duração do tratamento. Para se promover uma reversão do sexo de modo eficiente, a administração dos esteróides sexuais deve iniciarse antes do aparecimento dos primeiros sinais da diferenciação e continuar até a fase em que a diferenciação tenha se estabelecido.

A masculinização tem sido conduzida usando-se 17 alfa-metiltestosterona (MT), que por ser sintético é mais potente do que os naturais e, portanto, a dose empregada é menor. **Por outro lado, por demandar maior tempo para ser degradado na natureza é mais nocivo ao ambiente (9).** O MT na dose de 250 µg/kg de ração, administrado durante 1000 °C (unidades térmicas acumuladas em graus centígrados dias), a partir do início da alimentação tem sido eficaz para se obter a reversão sexual de fêmeas para machos funcionais (20).

As fêmeas masculinizadas apresentam testículos morfológicamente alterados e na maioria das vezes, com ductos espermáticos ausentes, sendo necessário o sacrifício dos animais e a remoção cirúrgica das gônadas para a utilização do sêmen. Este sêmen coletado diretamente do testículo apresenta baixa motilidade e conseqüente diminuição da taxa de fertilização. A incubação do sêmen coletado diretamente dos testículos, em plasma seminal artificial melhora o poder fecundante dos espermatozoides, promovendo um aumento da eficiência no processo de produção de lotes 100% femininos (7).

Manipulação dos conjuntos cromossômicos

A manipulação dos conjuntos cromossômicos pode ser realizada durante os ciclos nucleares da divisão celular e, basicamente, compreende a subtração

ou a adição de um conjunto completo, haplóide ou diplóide, na meiose ou mitose, respectivamente. A subtração é feita pela destruição de um conjunto, ou na célula espermática ou no ovócito, enquanto que a adição é obtida pela ruptura dos fusos metafásicos durante a carioquinese, tanto no tecido somático (mitose) quanto na célula germinativa (meiose), impedindo a separação dos conjuntos cromossômicos nas células filhas (15). Três fenômenos podem ser induzidos pela manipulação dos conjuntos cromossômicos: a ginogênese, a androgênese e a poliploidia.

A ginogênese, uma forma de herança inteiramente maternal, consiste na estimulação do desenvolvimento de um ovo por um espermatozóide geneticamente inativado e posterior diploidização pela retenção do 2º corpúsculo polar, ou pelo bloqueio da primeira clivagem. A androgênese é o reverso da ginogênese, onde o embrião é formado apenas com a contribuição genética paternal, geralmente através da irradiação dos ovos antes da fertilização. O resgate da condição diplóide é obtido pelo bloqueio da primeira divisão mitótica. A indução a poliploidia consiste na produção de indivíduos contendo um número superior aos dois conjuntos cromossômicos que caracterizam a condição normal (revisão em 2).

No caso da truta arco-íris, em que a fêmea é homogamética na determinação sexual (22), a ginogênese pode ser usada para a produção de populações monossexuadas femininas. Entretanto, os indivíduos ginogenéticos, por serem de herança exclusivamente materna, apresentam maior consangüinidade, não sendo, portanto, desejáveis para o cultivo. Além disso, a produção de ginogenéticos em escala comercial é ainda impraticável, devido à alta mortalidade resultante do tratamento (21). Essas fêmeas ginogenéticas poderiam ser masculinizadas com tratamento de andrógenos e utilizadas como doadoras de sêmen, na produção de lotes 100% femininos. Este processo eliminaria o teste de progênie necessário para a distinção entre machos genotípicos e fêmeas masculinizadas (13).

A ginogênese tem sido induzida em muitas espécies de peixes com diferentes finalidades, que incluem a análise do mecanismo de determinação sexual; o mapeamento gênico, pela análise da taxa de recombinação gene-centrômero, bem como para

a produção de linhagens endogâmicas, ou clonais (Revisão em 8). O grau de consangüinidade desses embriões ginogenéticos vai depender do modo com que a diploidização é induzida. Se a diploidização ocorrer pela retenção do 2º corpúsculo polar, o grau de endogamia será determinado pela frequência de crossing-over na primeira divisão meiótica. Para algumas espécies, incluindo a truta arco-íris, esta heterozigose residual é bastante alta e, portanto, nessa espécie, a diploidização meiótica não pode ser considerada uma ferramenta eficiente para promover a endogamia (16). Contudo, se a diploidização for induzida pela inibição da 1ª clivagem mitótica (endomitose), após a duplicação do genoma haplóide, os embriões resultantes serão homozigotos para todos os loci. A reprodução ginogenética subsequente irá produzir linhagens de clones constituídas de peixes geneticamente idênticos, enquanto que “cruzamentos” entre duas indivíduos endomitóticos não relacionados irá produzir clones híbridos heterozigotos (26).

Na manipulação da ploidia (23), a triploidização tem sido mais pesquisada, pelos efeitos fisiológicos que esta técnica pode proporcionar no manejo dos estoques cultivados (1, 3). Os benefícios decorrentes da triploidização baseiam-se, principalmente, na esterilidade reprodutiva e, portanto, na prevenção das características associadas à maturação sexual. Esta esterilidade é atribuída à presença do 3º conjunto cromossômico que provoca a interrupção da divisão meiótica I na gametogênese, em consequência do pareamento irregular dos cromossomos homólogos (12), resultando em diferentes níveis de supressão do desenvolvimento gonadal (10).

Os métodos para a produção de poliplóides empregam os mesmos princípios básicos utilizados na diploidização dos ginogenéticos, mas são aplicados após a fertilização normal. Os triplóides podem ser produzidos pela supressão da metafase da meiose II, enquanto que os tetraplóides, pela ruptura da primeira clivagem mitótica (15). A triploidização pode ser conduzida, diretamente, pelo tratamento dos ovos, logo após a sua ativação, por processos físicos ou químicos e, indiretamente, pela produção de reprodutores tetraplóides e posterior cruzamento destes com os diplóides. A sobrevivência do tetraplóide, entretanto, é bastante reduzida e, além disso, apresenta problemas de fertilidade, devido ao

pareamento multivalente na meiose, resultando em falhas no desenvolvimento gonadal ou produção de gametas aneuploides (17).

A indução direta à triploidia consiste na exposição dos ovos recém fertilizados a choques térmicos, de pressão hidrostática ou a produtos químicos, que provocam a despolimerização dos microtúbulos que compõem o fuso metafásico (metáfase II da meiose), impedindo a expulsão do 2º corpúsculo polar, retendo no ovo, dois conjuntos cromossômicos maternos, resultando em um zigoto triploide (15). Dentre as técnicas de triploidização, o choque térmico quente é considerado o método mais adequado para os salmonídeos, pois além de não requerer aparelhos especializados, pode tratar grande quantidade de ovos com elevado índice de sucesso (18).

O principal interesse na produção de triploides baseia-se no crescimento mais rápido e na maior sobrevivência que os dos peixes normais, em decorrência da supressão da atividade reprodutiva. Em salmonídeos, o crescimento pré-maturação nos animais triploides é similar ou até mesmo inferior aos diplóides, entretanto, após o período de maturação, os triploides apresentam melhores índices de crescimento, de sobrevivência e da qualidade da carne, do que os diplóides (2).

Esses benefícios decorrentes da esterilidade reprodutiva são mais evidentes nas fêmeas triploides, onde a interrupção da meiose impede o desenvolvimento dos ovócitos e o aumento associado da gônada enquanto que nos machos, a condição triploide não interfere nas divisões mitóticas que ocorrem no processo de formação dos testículos. Desse modo, nos machos triploides os níveis de andrógenos são similares aos dos diplóides (6) e promovem a expressão das características sexuais secundárias (10).

A superioridade em peso das trutas triploides é estabelecida somente após o primeiro ciclo reprodutivo, portanto, ao se adotar a técnica de triploidização como uma técnica para aumentar a produção, o peso de comercialização desses animais não deverá ser inferior ao peso médio apresentado em idade de primeira reprodução. A constatação de que os machos triploides desenvolvem testículos,

ainda que inférteis e manifestam as características associadas a maturação de maneira semelhante aos diplóides, desaconselha o emprego destes nos cultivos intensivos e indicam a utilização de lotes monossexos femininos estéreis pela associação das técnicas de reversão sexual e de triploidização nos cultivos direcionados para a produção de trutas de grande porte (4, 19).

Considerações finais

A adoção dessas biotecnologias já disponíveis e a consolidação daquelas mais emergentes, como as que envolvem a transferência de genes, poderão em breve, proporcionar as ferramentas para a solução dos problemas que a aquíicultura deverá enfrentar. O desenvolvimento das técnicas moleculares tem possibilitado a identificação e a clonagem de seqüências gênicas, que codificam características de interesse comercial, em vários organismos animais ou vegetais. Este fato, combinado com o aperfeiçoamento da tecnologia da transgênese, vem ampliando as perspectivas de aplicação da biotecnologia na aquíicultura, visando a obtenção do aumento da taxa de crescimento, da eficiência da conversão alimentar, da resistência aos patógenos e estressores, da capacidade adaptativa a ambientes extremos, além de viabilizar a criação de novos produtos, através da alteração das rotas bioquímicas para aumentar a qualidade nutricional (11).

Apesar do grande potencial que representa para a aquíicultura, a tecnologia dos transgênicos ainda encontra-se em fase experimental e sua aplicação comercial está na dependência não apenas do aprimoramento das técnicas, mas, principalmente, do amadurecimento das questões éticas, ambientais, sociais e principalmente de segurança alimentar, que envolvem os organismos geneticamente modificados.

Simultaneamente ao avanço da tecnologia para a obtenção de transgênicos é necessário o desenvolvimento de medidas para evitar o impacto potencial destes animais no meio ambiente, em casos de escape acidental. Para isto, são necessários estudos mais aprofundados das respostas fisiológicas, nutricionais, imunológicas e reprodutivas, assim como o aprimoramento de metodologias de esterilização desses animais assegurando a proteção das espécies selvagens.

Referências

1. Alonso M, Tabata YA, Rigolino MG, Tsukamoto RY. Effect of induced triploidy on fin regeneration of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. J Exp Zool 2000; 287: 493-502.
2. Arai K. Genetic improvement of aquaculture finfish species by chromosome manipulation techniques in Japan. Aquaculture 2001; 197:205-228.
3. Arana S, Tabata YA; Sabino M, Blazquez FJH, Rigolino MG, et al. Differential effect of chronic aflatoxin B1 intoxication on the growth performance and incidence of hepatic lesions in triploid and diploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Arch Med Vet 2002; 34:253-263.
4. Bye VJ, Lincoln RF. Commercial methods for the control of sexual maturation in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). Aquaculture 1986; 57:299-309.
5. Foresti F. Biotechnology and fish culture. Hydrobiologia 2000; 420:45-47.
6. Kobayashi T, Sakai N, Fushiki S, Nagahama Y, Amano M. Testicular development and changes in the levels of reproductive hormones in triploid male rainbow trout. Nippon Suisan Gakkaishi 1993; 59: 981-989.
7. Kobayashi T, Fushiki S, Ueno K. Improvement of sperm motility of sex-reversed male rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by incubation in high-pH artificial seminal plasma. Environ Biol Fish 2004; 69:419-425.
8. Komen H, Thorgaard GH. Androgenesis, gynogenesis and the production of clones in fish: A review. Aquaculture 2007; 269:150-173.
9. Lee CS, Donaldson EM. General discussion on reproductive biotechnology in finfish aquaculture. Aquaculture 2001; 193:303-320.
10. Lincoln RF, Scott AP. Sexual maturation in triploid rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. J Fish Biol 1984; 25:385-392.
11. Melamed PM, Gong Z, Fletcher G, Hew CL. The potential impact of modern biotechnology on fish aquaculture. Aquaculture 2002; 204:255-269.
12. Oliveira C, Foresti F, Rigolino MG, Tabata YA. Synaptonemal complex formation in spermatocytes of the autotriploid rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Pisces, Salmonidae). Hereditas 1995; 123:215-220.
13. Olito C, Brock I. Sex reversal of rainbow trout: creating an all-female population. Prog Fish Cult 1991; 53:41-44.
14. Piferrer F. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. Aquaculture 2001; 197:229-281.
15. Purdom CE. Genetic engineering by the manipulation of chromosomes. Aquaculture 1983; 33:287-300.
16. Purdom CE. Genetics and fish breeding. Chapman & Hall, Fish and Fisheries Series 8: 1993. 277p.
17. Refstie T. Tetraploid rainbow trout produced by cytochalasin B. Aquaculture 1981; 25:51-58.
18. Solar II, Donaldson EM, Hunter GA. Induction of triploidy in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) by heat shock, and investigation of early growth. Aquaculture 1984; 42:57-67.
19. Tabata, Y.A.; M.G. Rigolino and R.Y. Tsukamoto. 1999. Produção de lotes monossexos femininos triploides de truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*. III – Crescimento até idade de primeira maturação sexual. Boletim do Instituto de Pesca 25: 67-76.
20. Tabata YA, Rigolino MG, Nagata MK. Produção de fêmeas masculinizadas de truta arco-íris com ductos espermáticos funcionais. Arquivo CD-Rom R08-46.pdf. Resumos Aqüicultura Brasil 2000; 26 nov –03 dez. Florianópolis –SC.
21. Tabata YA. Obtenção e desempenho de progênieis ginogenéticas meióticas e mitóticas de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). Tese de doutorado. Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 2004.
22. Thorgaard GH. Heteromorphic sex chromosomes in male rainbow trout. Science 1977; 196:900-902.
23. Thorgaard GH. Ploidy manipulation and performance. Aquaculture 1986; 57:57-64.
24. Thorgaard GH, Bailey GS, Williams D, Buhler DR, Kaattari SL, et al. 2002. Status and opportunities for genomics research with rainbow trout. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 2002; 133:609-646.
25. Ward RD, Jorstad KE, Maguire GB. Microsatellite diversity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), introduced to western Australia. Aquaculture 2003; 219:169-179.
26. Young WP, Wheeler PA, Fields RD, Thorgaard GH. DNA fingerprinting confirms isogeneticity of androgenetically derived rainbow trout lines. J Heredity 1996; 87:77-81.