

CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE TAMBAQUI COM ACP® ADICIONADO DE GEMA DE OVO

Liliane Veras LEITE*; Fátima de Cássia Evangelista de OLIVEIRA; Larissa Teixeira NUNES; José Ferreira NUNES; Carminda Sandra Brito SALMITO-VANDERLEY

Núcleo Integrado de Biotecnologia, Universidade Estadual do Ceará – UECE

*email: lilianeveras.bio@gmail.com

Recebido em 20 de outubro de 2011

Resumo - O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é uma espécie de grande interesse para a piscicultura brasileira. Diante desta importância econômica e ecológica, o tambaqui foi selecionado com uma das espécies aquáticas de maior interesse para a pesquisa no Brasil. Neste contexto, uma das áreas em ascensão é a criopreservação de sêmen desta espécie. A água de coco em pó (ACP®) adicionada de crioprotetores internos já vem sendo testada com sucesso como diluente na conservação de sêmen de várias espécies, inclusive tambaqui, porém ainda não foi avaliado o efeito da adição de crioprotetor externo. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da adição de gema de ovo (5% e 10%) como crioprotetor externo de espermatozoides de tambaqui. Para tanto foram utilizados 20 machos induzidos hormonalmente com estrato pituitário de carpa. O sêmen foi coletado e formado um pool de sêmen a cada cinco animais, totalizando quatro pools. O sêmen de cada pool foi diluído, formando três tratamentos, todos com solução diluidora ACP®+DMSO 10% acrescido ao não de gema de ovo (T1: sem nenhum acréscimo de gema de ovo; T2: com 5% de gema de ovo T2; e T3: com 10% de gema de ovo). O sêmen diluído foi envasado em palhetas de 0,5 ml, congelado em *Dry Shipper* por 30 min (-153°C) e posteriormente mergulhado em nitrogênio líquido. Para o descongelamento, as palhetas foram colocadas em banho maria à 37°C por 30 segundos e sua motilidade analisada em sistema computadorizado (CASA). A motilidade espermática após o descongelamento do sêmen diluído apenas com ACP®+DMSO foi de 20,3% de espermatozoides móveis, quando foi adicionado 5% e 10% de gema a motilidade diminuiu significativamente (P<0,05) para 6,5% e 5,7% de espermatozoides móveis, respectivamente. A velocidade curvilínea foi semelhante nos três tratamentos ($\pm 30\mu/s$; P>0,05). Os resultados demonstram que a adição de gema de ovo ao diluidor de criopreservação ACP®+DMSO diminui a qualidade seminal após descongelamento do sêmen de tambaqui.

Palavras-Chave: *Colossoma macropomum*, congelamento de sêmen; diluidor; crioprotetor externo

SPERM CRYOPRESERVATION OF TAMBAQUI IN IN POWDERED COCONUT WATER (ACP™) ADDED OF EGG YOLK

Abstract - *Colossoma macropomum* is one of the freshwater fish species with the greatest importance in the Brazilian aquaculture industry. In face of its economic and ecological importance, tambaqui was selected as one of the aquatic species of greatest interest for research in Brazil. Sperm Cryopreservation of this species is in evidence. The powdered coconut water (ACP™) added to internal cryoprotectants have been successfully tested as a freezing media to sperm preservation from several species, including tambaqui, but not yet evaluated the effect of addition external cryoprotectant. The objective of this research was to evaluate the effect of adding egg yolk (5% and 10%) as cryoprotectant external sperm tambaqui. Therefore, we used 20 males with hormonally induced stratum carp pituitary. Semen was collected and formed a pool of semen in five animals, a total of four pools. The semen from each pool was diluted to form three treatments, each with a diluting solution PCW™ + 10% DMSO added to the non-egg yolk (T1: no increase in egg yolk, T2: 5% egg yolk T2 and T3: 10% egg yolk). The diluted semen was packaged in 0.5 ml straws, frozen in Dry Shipper for 30 min (-153 ° C) and then dipped in liquid nitrogen. For thawing, the straws were placed in a water bath at 37 ° C for 30 seconds and motility analyzed in a computerized system (CASA). Sperm motility after thawing semen diluted only with PCW™+DMSO was 20.3% motile sperm, which added 5% and 10% yolk motility decreased significantly (P <0.05) for 6.5 % and 5.7% motile sperm, respectively. The curvilinear velocity was similar among treatments ($\pm 30\mu / s$, P> 0.05). The results show that adding the egg yolk extender for cryopreservation PCW™+DMSO decreases sperm quality after thawing semen tambaqui.

Keywords: *Colossoma macropomum*, semen freezing; seminal extender; external cryoprotectant.

Trabalho realizado com apoio financeiro do CNPq e da FUNCAP.

INTRODUÇÃO

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é um peixe migrador pertencente á ordem Characiformes, nativa da bacia Amazônica e do rio Orinoco. Entre as espécies dulciaquícolas brasileiras, o tambaqui representa a maior produção na piscicultura, superado apenas pelas espécies alóctones, tilápia (*Oreochromis niloticus*) e carpa (*Cyprinus carpio*) (Recursos..., 2007). Diante da importância econômica e ecológica, o tambaqui foi selecionado como uma das espécies aquáticas de maior interesse para pesquisa no Brasil (Queiroz et al., 2003).

As espécies migratórias dependem de mudanças ambientais sazonais para realizar a reprodução. Portanto, são particularmente sensíveis às ações antrópicas sobre seu habitat, como a construção de barragens, agricultura ou urbanização (Carolsfeld et al., 2003). Além disso, os endocruzamentos realizados na produção em cativeiro estão levando à diminuição da variabilidade genética dos plantéis (Lopes et al., 2009). Como alternativa, a criopreservação de sêmen de peixes tem sido estudada como técnica de conservação do material genético, a fim de permitir o intercâmbio de gametas entre produtores, e a disponibilidade de sêmen em períodos menos favoráveis (Maria et al., 2009).

O sucesso da criopreservação depende de muitos fatores, dentre eles a composição do diluidor, que afeta diretamente a qualidade do sêmen pós-descongelamento (Mansour et al., 2006). Os diluidores para criopreservação de sêmen são compostos por diluente(s) que devem possuir nutrientes necessários para a manutenção da célula e carrear os crioprotetores que devem proteger os espermatozoides dos efeitos maléficos do congelamento.

Os crioprotetores podem ser classificados como: intracelulares (permeáveis), indispensáveis para o sucesso da criopreservação, pois atuam desidratando e reduzindo o ponto crioscópico do interior das células dificultando a formação de cristais de gelo intracelulares que danificam a célula e extracelulares (impermeáveis) que podem ser ou não adicionados ao meio de congelamento, para auxiliar na proteção celular recobrando a superfície da célula e estabilizando a membrana (Watson, 1995).

Em estudo de criopreservação de sêmen de Characiformes, o crioprotetor interno mais utilizado é o dimetilsulfóxido (DMSO), que já foi testado com sucesso para várias espécies desta família (Godinho & Viveiros 2011). Em relação ao crioprotetor externo, a gema de ovo de galinha é a mais utilizada, pois a fosfatidilcolina (lecitina) e lipoproteínas da gema atuam recobrando a célula e estabilizando a membrana. Este crioprotetor já foi utilizada com sucesso na preservação de sêmen de Characiformes (Cruz-Casallas et al. 2006; Velasco-Santamaría et al. 2006; Carolsfeld et al. 2003).

Uma das inovações mais recentes da biotecnologia do sêmen de peixe é a utilização de água de coco em pó (ACP) como meio diluente seminal. Este é um meio natural e estéril composto por sais, proteínas, açúcares, vitaminas, gorduras neutras, além de indutores da divisão celular e diversos eletrólitos, podendo exercer uma ação benéfica sobre a conservação celular. A ACP adaptada para a criopreservação de sêmen de peixes (ACP-104) já foi testado com sucesso em várias espécies como *Brycon orbignyanus*, *Prochilodus lineatus*, *Leporinus obtusidens* (Viveiros et al., 2010), *Piaractus brachypomus* (Velásquez-Medina, 2008) e *Colossoma macropomum* (Vieira, 2010). Portanto a ACP[®] tornou-se mais uma inovação tecnológica como alternativa mercadológica para a área de reprodução de peixes (Melo et al., 2010a). Em tambaqui o ACP[®] associado à crioprotetores internos já foi testado obtendo bons resultados de motilidade espermática pós-descongelamento (Vieira 2010), porém não foi avaliado o efeito da adição de crioprotetores externos a este diluente.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da adição de gema de ovo no diluidor ACP+DMSO sobre a taxa de motilidade e velocidade dos espermatozoides após a criopreservação.

MATERIAL E MÉTODOS

SELEÇÃO DOS MACHOS E COLETA DO SÊMEN

Os animais foram selecionados do plantel do Centro de Pesquisa em Aquicultura (CPAq) do Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS), localizado no município de Pentecoste, Ceará, situando a 3°45'00" de latitude sul e 39°10'24" de longitude oeste. Para minimizar o estresse da manipulação, os animais foram sedados através da exposição à solução anestésica contendo óleo de cravo (Eugenol) diluído em álcool absoluto 1:10:1000 (eugenol:álcool:água). Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de ética para uso de animais da Universidade Estadual do Ceará (UECE).

Vinte machos adultos (idade superior a três anos; peso médio 6.12 ± 0.41 kg e comprimento médio $61,95 \pm 4,52$ cm), aptos a participar do processo reprodutivo, receberam indução hormonal através da aplicação de uma dose de extrato pituitário de carpa comum (2mgkg^{-1}) na base da nadadeira peitoral. Quatorze horas após a indução hormonal a papila urogenital dos peixes foi limpa e enxugada e o sêmen, após leve massagem abdominal, foi coletado em tubos de polietileno graduados. Imediatamente após, as amostras seminais foram avaliadas subjetivamente ao microscópio (400X). Foram selecionadas amostras seminais com ausência de motilidade após a coleta e que, após a adição de água do tanque, apresentaram motilidade espermática igual ou superior a 90%. As amostras selecionadas foram homogeneizadas para a formação de quatro *pools* de sêmen (cinco machos por *pool*). A osmolaridade de cada *pool* (mOsm kg^{-1}) foi avaliada através

de osmômetro digital de refrigeração Peltier (Roebing, Alemanha) e o pH através de papel medidor de pH. Para a avaliação da concentração espermática (espermatozóides mL^{-1}) utilizou-se a câmara hematocimétrica de Neubauer e, para tal, cada *pool* foi diluído em solução formol-citrato-1% na proporção de 1:4000 (sêmen:fixador).

CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN

Os diluidores testados neste estudo foram gerados a partir da associação dos seguintes componentes:

- a) diluente: ACP-104 (pH 7.8; 300 mOsmol);
- b) crioprotetor interno: dimetilsulfóxido (DMSO na concentração de 10%) e
- c) crioprotetores externo: gema de ovo nas concentrações de 5% ou 10%.

Essa combinação gerou três tratamentos: T1) ACP[®]+DMSO; T2) ACP[®]+DMSO+gema5% e T3) ACP[®]+DMSO+gema10%. Cada *pool* de sêmen foi subdividido para diluição em todos os tratamentos na proporção de 20% sêmen e 80% diluidor. Após a diluição as amostras foram acondicionadas em palhetas plásticas de 0.5 mL, que posteriormente foram vedadas com álcool polivinílico. As palhetas contendo o sêmen diluído foram colocadas em vapor de nitrogênio em Dry Shiper (Taylor-Wharton, CX100; -153°C) por 30 minutos e finalmente mergulhadas em nitrogênio líquido (-196°C). As amostras congeladas foram transportadas para o Núcleo Integrado de Biotecnologia (NIB) localizado na Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza, Brasil.

ANÁLISE DO SÊMEN PÓS-DESCONGELAMENTO

Quinze dias após a criopreservação as palhetas foram retiradas do nitrogênio líquido e descongeladas a 37°C por 30 segundos. Para a análise da motilidade espermática após o descongelamento, um microlitro de sêmen foi colocado em câmara de *Makler*[®] adicionado de 100 μ L de solução ativadora (NaCl 50mM). Esta câmara foi colocada no sistema computadorizado de análise seminal CASA (*Computer Assisted Sperm Analyzer* - 400 \times aumento, filtro verde, e posição pH1) para ser avaliada por meio do software SCA[®] (*Sperm Class Analyzer*[®]). Usando imagens digitalizadas das células espermáticas, o CASA analisou as propriedades de trajetória e velocidade dos espermatozóides. Foi considerada neste estudo a velocidade curvilínea (VCL) que é a velocidade da trajetória real do espermatozóide (Verstegen et al. 2002) e está relacionada com a capacidade fertilizante do sêmen de peixes (Viveiros et al., 2010).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, com um nível de significância de 0,05% (SAS, 2003).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os animais utilizados responderam positivamente à indução hormonal, pois liberaram espermas mediante massagem abdominal, após a indução hormonal. O sêmen de tambaqui apresentou coloração esbranquiçada e aspecto leitoso com volume médio de $4,3 \pm 3,1$ mL por macho, concentração de $19,2 \pm 6,29 \times 10^9$ espermatozoides/mL, pH $8 \pm 0,5$ e osmolaridade $298,2 \pm 11,7$ mOsmol. Poucas amostras apresentaram motilidade imediatamente após a coleta, indicando que não houve contaminação com água, sangue, fezes ou urina. Este fato, sugere que o método de coleta de sêmen utilizado foi adequado.

Os dados de motilidade e velocidade espermática, obtidos pelo CASA, após o descongelamento estão descritos na tabela 1. Foi observado que o sêmen tratado com ACP[®]+DMSO, sem acréscimo de gema (T1), apresentou uma média de 20,3% de espermatozoides móveis após o descongelamento. Esta taxa de motilidade é inferior à relatada por Vieira (2010) que encontrou motilidade variando de 55-65%, após o descongelamento do sêmen utilizando o mesmo diluidor (ACP[®]+DMSO). Essa diferença pode ocorrer devido às condições de manejo dos reprodutores que, no presente estudo, passaram por restrições nutricionais. Porém todos os animais utilizados neste experimento estavam sujeitos às mesmas condições, e assim, o efeito da adição da gema de ovo sobre a motilidade espermática pôde ser observado.

A adição de gema de ovo promoveu uma diminuição significativa na motilidade espermática, apresentando em média 6,5% de espermatozoides móveis no T2 (com 5% de gema), e 5,7% de espermatozoides móveis no T3 (com 10% de gema). Vale salientar que a avaliação da motilidade espermática ficou prejudicada pela presença de grumos de gema que dificultavam a movimentação dos espermatozoides e a visualização dos mesmos.

A motilidade espermática é, sem dúvida, o critério mais utilizado para avaliar a qualidade seminal, porém, com o advento de métodos computadorizados de avaliação da motilidade (CASA), outros aspectos do movimento espermático, que não podiam ser avaliados por métodos subjetivos, passaram a ser relacionados com a capacidade fertilizante do sêmen (Verstegen et al. 2002). Um desses aspectos é a velocidade espermática, principalmente a VCL (velocidade curvilínea) que apresenta alta correlação com a capacidade fertilizante do sêmen após o descongelamento (Viveiros et al., 2010). Nascimento et. al (2010) utilizaram o CASA para avaliação da motilidade e velocidade espermática de pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) após o descongelamento, e observaram que a VCL variou entre os diferentes tratamentos.

No presente estudo a VCL não foi afetada pela adição de gema, apresentado valores próximos à 30µm/s em todos os tratamentos ($p > 0,05$) (Tabela 1). Essa estabilidade da VCL

também foi relatada em trabalhos com (*Prochilodus lineatus*) cuja velocidade do sêmen descongelado permaneceu próxima á 54 $\mu\text{m/s}$, quando o sêmen foi congelado em ACP[®] ou solução de glicose (Viveiros et al, 2010).

Os resultados deste trabalho demonstram que a adição de gema de ovo ao diluidor ACP+DMSO diminui a motilidade espermática após descongelamento do sêmen de tambaqui. Portanto a adição deste crioprotetor externo não representou maior proteção aos espermatozoides.

Tabela 1: Médias \pm desvio padrão da taxa de motilidade e velocidade espermática após o descongelamento do sêmen de tambaqui em diferentes concentrações de gema de ovo.

Diluyente	Crioprotetor interno	Concentração de gema de ovo	Motilidade (%)	Velocidade ($\mu\text{m/s}$)
ACP	DMSO	0%	20,3 \pm 1,7 ^a	30,9 \pm 5,3 ^a
ACP	DMSO	5%	6,5 \pm 1,0 ^b	27,6 \pm 7,5 ^a
ACP	DMSO	10%	5,7 \pm 2,1 ^b	30,0 \pm 4,46 ^a

Letras diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos ($p < 0,05$).

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Universidade Estadual do Ceará-UECE e ao Departamento Nacional de Obras Contra as Secas -DNOCS pelo suporte ao projeto.

REFERÊNCIAS

- Carolsfeld, J., Godinho, H.P., Zaniboni-Filho, E. & Harvey, B.J. (2003). Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. *Journal of Fish Biology*. 63(2):472-489.
- Godinho, H.P. & Viveiros, A.T.M. (2011). Current Status of Sperm Cryopreservation of Brazilian Characiform Fishes. In: *Cryopreservation in Aquatic Species*, Tiersch TR, Green CC (Ed.), World Aquaculture Society. 875-884.
- Lopes, T.S., Streit-Jr, D.P., Ribeiro, R.P., Povh, J.A., Lopera-Barrero, N.M., Vargas, L., Mansour, N., Richardson, G.F. & McNiven, M.A. (2006). Effect of extender composition and freezing rate on post-thaw motility and fertility of Arctic char, *Salvelinus alpinus* (L.), spermatozoa. *Aquaculture Research*. 37:862-868.
- Maria, N.A., Azevedo, H.C. & Carneiro, P.C.F. (2009). Criopreservação de sêmen de peixes no contexto do agronegócio da piscicultura. In: *Manejo e sanidade de peixes em cultivo*, Tavares-Dias M (Org.), Embrapa Amapá, 47- 63.
- Melo, M.A.P.; Maciel, F.S.; Oliveira, F.C.E.O.; Salgueiro, C.C.M.S.; Salmito-Vanderley, C.S.B.

- & Nunes, J.F. (2010). Água de coco em pó (ACP-104[®]) na criopreservação de sêmen de pirapitinga (*Piaractus brachypomus*). In: *Seminário Nordestino de Pecuária (Pecnordeste)*. Anais...Fortaleza.
- Nascimento, A.F., Maria, A.N. Pessoa, N.O. Carvalho, M. A. M. & Viveiros, A. T. M. (2010). Out-of-season sperm cryopreserved in different media of the Amazonian freshwater fish pirapitinga (*Piaractus brachypomus*). *Animal Reproduction Science*, 118: 324-329.
- Pinto-Filho, C. & Queiroz, J.R. (2009). Diversidade genética de estoques de reprodutores de *Colossoma macropomum*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 728-735.
- Queiroz, J.F., Lourenço, J.N.P. & Kitamura, P.C. (2002). *Embrapa e a aquicultura: demandas e prioridades de pesquisa* (Embrapa and aquaculture: research demands and priorities). Brasília, Embrapa (Brazilian Agricultural Research Corporation), Brazil.
- Recursos pesqueiros (2007). *Estatística pesqueira*. Acessado em: 20 junho de 2011 em <<http://www.ibama.gov.br/>>. Brasília: IBAMA.
- Velásquez-Medina, S. (2008). *Criopreservação do sêmen de pirapitinga, Piaratus brachypomus (Pisces, Characidae)*. [Dissertação]. Fortaleza (CE): Universidade Federal do Ceará.
- Verstegen, J., Iguer-Ouada, M. & Onclin, K. (2002). Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, 57:149-179.
- Vieira, M.J.A.F. (2010). *Caracterização do sêmen de tambaqui Colossoma macropomum (Cuvier, 1818) e criopreservação em diluente a base de água de coco em pó (ACP-104)*. [Tese de Doutorado]. Fortaleza (CE): Universidade Estadual do Ceará, (2010). 114 p. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Brazil.
- Viveiros, A.T.M.; Nascimento, A.F.; Orfão, L.H. & Isaú, Z.A. (2010). Motility and fertility of the subtropical freshwater fish streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) sperm cryopreserved in powdered coconut water. *Theriogenology*, 74: 551-556.