

CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE *Colossoma macropomum* - COMPARAÇÃO DE TAXAS DE MOTILIDADE E FERTILIZAÇÃO ENTRE AMOSTRAS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE DIMETILSULFÓXIDO

Rizzoto, Guilherme¹; Varela, A.S. Jr. ²; Streit, D.P. Jr.³ ; Figueiredo, M.R.C. ²;
Corcini, C.D.¹

¹Grupo de pesquisa ReproPel, Universidade Federal de Pelotas, ²Universidade Federal de Rio Grande,
³Universidade Federal do Rio Grande do Sul. E-mail: guilhermerizzoto@hotmail.com
Campus Universitário s/n – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900, Brasil-Pelotas/RS.

1 INTRODUÇÃO

O tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), é um peixe nativo da bacia amazônica, sendo considerado o segundo maior peixe de escamas do rio Amazonas (Goulding & Carvalho, 1982). É também um dos peixes mais produzidos comercialmente, devido a suas características especiais como rusticidade, sabor, fácil cultivo e rápido crescimento, além de hábito alimentar diversificado (Lovshin, 1985). O maior entrave para a produção comercial é a criação de reprodutores, pois em condições experimentais pode levar 3,5 anos para que o animal inicie sua vida reprodutiva chegando a custar U\$5,13/Kg (Chabalin et al, 1993).

A criopreservação seminal é uma ferramenta importante na piscicultura, apesar da dificuldade da produção de reprodutores devido ao grande dispêndio de tempo e aplicação de capital, traz benefícios como conservação da variabilidade genética em populações domesticadas e a facilidade no estabelecimento de programas de melhoramento genético (Suquet et al, 2000), além da possibilidade de armazenamento de gametas em banco de germoplasma.

Em peixes, diferentemente das outras espécies que serviram de embase para seus métodos de avaliação seminal como o mamífero, por exemplo, existe a necessidade de um diluente seminal isosmótico (Chambeyron & Zohar, 1990), pois caso contrário poderá acarretar na ativação prévia das células espermáticas. Ressaltando, portanto, a necessidade de desenvolver soluções alternativas de crioprotetores para que as perdas na qualidade seminal pós-descongelamento sejam mínimas. Neste trabalho objetivou-se avaliar o efeito de diferentes concentrações do crioprotetor Dimetilsulfóxido (DMSO) sobre as taxas de fertilização e motilidade de sêmen criopreservado de *C. Macropum*.

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

O experimento foi desenvolvido durante a estação reprodutiva (dezembro a fevereiro) do ano de 2010. Foram utilizados dezesseis reprodutores de *Colossoma macropum*, que permaneceram em viveiros sob condições ambientais e dieta padronizada fornecida três vezes por semana. O sêmen foi coletado em um tubo cônico de 15 ml exclusivo para cada animal, através de massagem abdominaevitando-se a extrusão de fezes e/ou urina para impedir a contaminação e ou prévia ativação das amostras. A motilidade de cada amostra foi avaliada antes da criopreservação (95,7+- 2%) e foram descartadas as amostras que apresentavam

motilidade menor que 80%, contaminação e/ou prévia ativação espermática por urina, água ou fezes.

A diluição das amostras foi com Beltsville Thawing Solution (BTS) na proporção de 1/9(v/v) acrescido de 5, 10(controle) 15 e 20 % de DMSO. No método de criopreservação utilizado, as amostras permaneceram 10 min a 5 cm do N₂L em palhetas de 250 µl e posteriormente imersas no mesmo, e depois armazenadas em botijão de nitrogênio a -196°C.

Para avaliar a taxa de fertilização foram utilizadas 16 fêmeas, uma para cada macho, das quais os óvulos foram extrusados por massagem abdominal e dividida em alíquotas para os diferentes tratamentos. As amostras de sêmen foram descongeladas em banho-maria a 45°C por 5 segundos, e como controle foi utilizado sêmen fresco, coletado de dois machos no momento da execução do teste para assegurar a qualidade dos óvulos. O acompanhamento dos estágios de desenvolvimento se deu através de um estereomicroscópio e a avaliação ocorreu após 8 horas, sendo considerado o número total de ovos fertilizados sobre o total de embriões avaliados, e o final expresso em percentual.

Para realizar a análise estatística, foi utilizado o software Statistix 9.0 (2008), as diferentes concentrações do crioprotetor foram consideradas fatores independentes e as variáveis motilidade e taxa de fertilização classificadas como fatores dependentes. Foi realizada a análise de normalidade para ambas as variáveis dependentes pelo teste de Shapiro-Wilk. Em seguida o teste de Tuckey foi realizado para análise de variância e subsequente comparação entre as médias. Todos os dados foram expressos em média ± erro padrão da média (S.E.M.)

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre os resultados observados, os tratamentos com DMSO nas concentrações de 5, 10 e 15% não apresentaram diferença estatística entre si em relação a taxa de motilidade, e o tratamento com 20% apresentou o pior resultado ($p < 0,05$) (Fig. 1). Apesar de o Dimetilsulfóxido ser considerado dentre os crioprotetores o que apresenta uma das menores citotoxicidades (Jamieson, 1991) e já ter tido sua eficiência comprovada em diversas espécies (Menezes et al ,2008; Viveiros & Godinho, 2009), no presente trabalho na concentração de 20% houve uma redução da motilidade espermática, fato este possivelmente explicado pelo seu efeito citotóxico potencializado quando utilizado em concentrações elevadas (Rana, 1955).

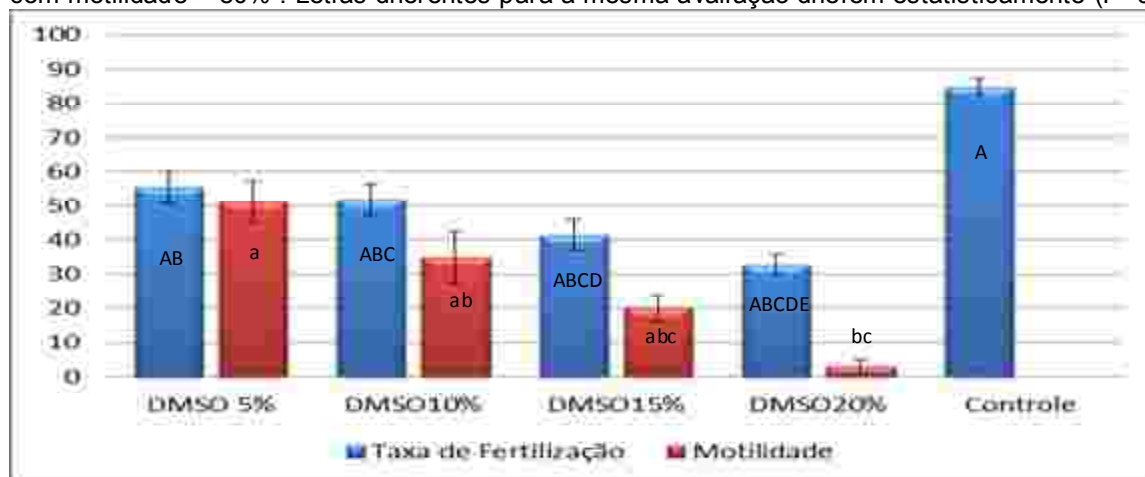
A taxa de motilidade é uma das principais análises utilizadas para avaliação seminal, já sendo também correlacionada no pós-descongelamento com citotoxicidade e qualidade do efeito crioprotetor do composto usado em sêmen de piau-açu - *Leporimus macrocephalus* (Ribeiro & Godinho,2003). Portanto, o efeito citotóxico é um dos principais fatores a ser trabalhado devido limitar o uso de altas concentrações de crioprotetores. Mesmo respeitando as variações espécie-específicas tal afirmação indica que no sêmen podem ocorrer pequenas alterações na concentração suportável e ou maior ou menor sensibilidade a diferentes crioprotetores.

As taxas de fertilização não diferiram estatisticamente do grupo controle (Fig 1). Segundo Rana & MacAndrew (1989), a taxa de fertilização dos ovos é sem dúvida o mais apropriado e prático critério nos protocolos de avaliação para a criopreservação de espermatozoides uma vez que irá depender tanto da capacidade

fisiológica como bioquímica da célula espermática, além da integridade do material genético e organelas do espermatozoide. Tais características muitas vezes podem ser mascaradas quando ocorrem somente análises andrológicas ditas físicas como, por exemplo, concentração e morfologia espermática, análises estas que tem potencial indicador, mas não são suficientes quando sozinhas para avaliar a qualidade seminal e o macho reprodutor.

Com a obtenção de um resultado positivo pós-descongelamento em relação à motilidade e taxa de fertilização, o objetivo deste trabalho e de diversos outros na busca de melhorias no método de manutenção e criopreservação seminal em peixes é atingido e corrobora para um maior desenvolvimento na piscicultura, conquistando maior espaço entre os setores de produção.

Figura 1 - Taxa de fertilização (%) e motilidade espermática (%) (média \pm erro padrão da média) obtidas de sêmen de *Colossoma macropomum* descongelado, com 5, 10, 15 e 20 % de DMSO. O grupo controle utilizado na análise de taxa de fertilização era constituído de sêmen fresco com motilidade > 80% . Letras diferentes para a mesma avaliação diferem estatisticamente ($P < 0,001$)



4 CONCLUSÃO

Conclui-se, portanto, que a criopreservação com 5, 10 e 15 % de DMSO é a mais indicada para manter as características fisiológicas e estruturais do sêmen de *Colossoma macropomum* descongelado, e manter uma boa taxa de fertilização.

5 REFERÊNCIAS

CHABALIN, E.; FERRARI, V. A., GASPAR, L. A. F. B. *Custo de formação de reprodutores de tambaqui, Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) em monocultura experimental. **Boletim técnico do CEPTA**, Brasil, v.6, p.57,67,1993

CHAMBEYROM, F. & ZOHAR. A diluent for sperm cryopreservation of gilthead seabream, *Sparus aurata*. **Aquaculture**, v. 90, p. 345-352, 1990.

GOULDING, M. & CARVALHO, M. L. Life history and management of the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characidae): an important Amazonian food fish. **Revista Brasileira de Zoologia** v.1, p.107-133, 1982.

Jamieson, G.M.; Leung, L.K.P.; Live preservation of fish gametes. In: Jamieson, G.M. (Ed.). *Fish evolution and systematics: evidence from spermatozoa*. Cambridge: **University Press**. p.245-95, 1991.

LOVSHIN, L.L, Situacion del cultivo de *Colossoma sp* em Sul América. **Revista Latino Americana de Aquicultura**, Lima, Peru, p.23-32, 1980.

MENEZES, J. T. B.; QUEIROZ, L. J. ;DORIA, C. R.C.; MENEZES, J. B. Jr . Avaliação espermática pós-descongelamento em tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). **Acta Amazonica**, Manaus, Brasil, v.38, p.366-368, 2008.

RANA, K. Preservation of gametes. In: Bromage, N.R.; Roberts, R.J. (Eds.) *Broodstock management and egg and larval quality*. Londres: **Blackwell Science**, p.53-75, 1995.

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

RIBEIRO, R.I.M.A.; GODINHO, H.P., Criopreservação do sêmen testicular do teleósteo piau-açu *Leporinus macrocephalus*. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, Brasil, v.55(1), p.1-7.2003.

SUQUET, M.; DREANNO, C.; FAUVEL, C.; COSSON, J.; Billard, Cryopreservation of sperm in marine fish. **Aquaculture Research**, v.31, p.231-243, 2000.

VIVEIROS, A.T.M.; GODINHO, H.P. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. **Fish Phys. Bioch.**, v.35, p.137-150, 2009.