

# Morfologia Espermática do Sêmen de Tambaqui Criopreservado em Criotubos e Submetido a Diferentes Velocidades de Descongelamento

*Giselle Santana Barreto<sup>1</sup>; Carlos Adriano Rocha Silva Morais<sup>1</sup>; Flavia Hipólito de Araujo<sup>1</sup>; Jadson Pinheiro Santos<sup>2</sup>; Allan Charles Marques de Carvalho<sup>3</sup>; Joffeson Santos Silva<sup>4</sup>; Hymerson Costa Azevedo<sup>5</sup>; Paulo César Falanghe Carneiro<sup>6</sup>; Alexandre Nizio Maria<sup>7</sup>*

## Resumo

O objetivo do presente estudo foi avaliar alterações morfológicas nos espermatozóides de tambaqui criopreservado em diferentes recipientes e submetidos a diferentes velocidades de descongelamento. Sêmen de cinco reprodutores foi coletado em tubos de ensaio, diluído 1:9 (sêmen:solução) em solução contendo glicose 5%, metilglicol e gema de ovo, envasado em criotubos de 1,6 mL e 5,0 mL, congelado em botijão de vapor de nitrogênio líquido e descongelado em banho-maria a 60 °C por 70 e 90s. Houve interação significativa ( $P < 0,05$ ) entre o volume dos criotubos e a velocidade de descongelamento. Os menores números de alterações morfológicas nos espermatozóides foram observados nas amostras de sêmen congeladas nos criotubos de 1,6 mL quando descongeladas a 70 s. O criotubo de 5 mL, por outro lado, quando descongelado nesta mesma velocidade apresentou o maior número de alterações morfológicas. O sêmen de tambaqui criopreservado em criotubos de 1,6 mL e descongelado à 60 °C por 70 segundos proporciona menor número de alterações morfológicas nos espermatozóides.

**Palavras-chave:** *Colossoma macropomum*, criopreservação, espermatozóides, alterações morfológicas.

<sup>1</sup> Graduanda(o) em Engenharia de Pesca, bolsista PIBIC/Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, gisellesantanaa@gmail.com.

<sup>2</sup> Mestrando em Biotecnologia, Universidade Federal de Sergipe.

<sup>3</sup> Mestrando em Zootecnia, Universidade Federal de Sergipe.

<sup>4</sup> Engenheiro de Pesca, bolsista ATP, Embrapa Tabuleiros Costeiros.

<sup>5</sup> Médico-veterinário, Doutor em Medicina Veterinária, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>6</sup> Engenheiro-agrônomo, Doutor em Zootecnia, pesquisador Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>7</sup> Zootecnista, Doutor em Zootecnia, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

## Introdução

A criopreservação é uma técnica que se utiliza de temperaturas extremamente baixas para manter a estrutura e funcionalidade de células e tecidos vivos, conservando-os geneticamente viáveis e reversivelmente inertes do ponto de vista metabólico (PEGG, 2007). Os eventos ocorridos durante a criopreservação envolvem os seguintes passos: redução da temperatura, desidratação celular, congelamento e descongelamento. Estes procedimentos podem ocasionar danos às células espermáticas e estão diretamente ligados a uma soma de fatores, como mudanças na temperatura, formação de cristais de gelo intracelular e estresse osmótico (CABRITA et al., 2005), tornando-se necessária a determinação de procedimentos essenciais e específicos para cada espécie, como soluções crioprotetoras, recipientes de armazenamento e taxas de congelamento e descongelamento.

A utilização de recipientes com grande capacidade de armazenamento de sêmen (1,5 a 5 mL) em substituição às tradicionais palhetas francesas de 0,5 mL passou a ser avaliada com o objetivo de reduzir o tempo necessário para o envase, descongelamento e manipulação do sêmen em procedimentos de fertilização em grande escala (CABRITA et al., 2005). Porém, em virtude da existência de recipientes de armazenamento de sêmen com diferentes formas e materiais, variações nas propriedades de transferência de calor durante o congelamento e descongelamento têm sido observadas (YANG, 2009), influenciando diretamente a incidência de alterações morfológicas nos espermatozoides. Em decorrência disso, a avaliação da morfologia espermática em peixes reveste-se de grande importância, pois pode auxiliar na caracterização de amostras seminais, fazendo inferência ao seu potencial fertilizante e explicando insucessos de reprodutores tidos como aptos após análises convencionais de motilidade espermática (MILIORINI, 2006).

Desse modo, o objetivo do presente estudo foi avaliar as alterações morfológicas nos espermatozóides de tambaqui *Colossoma macropomum* submetidos à criopreservação em criotubos de 1,6 e 5 mL e descongelados em diferentes velocidades.

## Material e Métodos

Foram utilizadas amostras seminais de cinco machos ( $6,5 \pm 1,4$  kg;  $66,9 \pm 5,5$  cm) coletadas em tubos de ensaio por massagem abdominal 10 horas após a indução hormonal com 2,0 mg de extrato de hipófise de carpa/kg de peso. Após a coleta do sêmen, foi avaliada a motilidade subjetiva dos espermatozoides em microscópio óptico (400x), sendo selecionadas as amostras seminais que apresentavam motilidade superior a 80 %.

Posteriormente, alíquotas de sêmen foram adicionadas à solução de congelamento, composta por glicose 5%, metilglicol e gema de ovo e envasadas em criotubos de 1,6 e 5 mL para congelamento no botijão de vapor de nitrogênio líquido. Após 24 horas do congelamento, as amostras foram transferidas para botijão de nitrogênio líquido e armazenadas a  $-196^{\circ}$  C até o momento da avaliação. Os criotubos foram descongelados em banho-maria a  $60^{\circ}$ C, sendo testados dois tempos: 70 e 90 segundos. Em seguida, alíquotas do sêmen descongelado de cada tratamento foram fixadas em solução de formol-citrato na proporção de 1:1000 (sêmen:solução) para a realização de esfregaços com o corante rosa bengala na proporção 1:30 (sêmen fixado:corante). Após a secagem, os esfregaços foram visualizados em microscópio óptico (1000x com óleo de imersão) para a avaliação da morfologia espermática, sendo utilizada a seguinte classificação: macrocefalia, microcefalia, cabeça degenerada e cabeça isolada, cauda fraturada, cauda enrolada, cauda degenerada e cauda dobrada.

Os dados foram submetidos à análise de variância e, em caso de diferença significativa, foi aplicado o teste *Skott-knott*, com 5% de significância pelo *software* estatístico SISVAR.

## Resultados e Discussão

Houve interação significativa ( $P < 0,05$ ) entre o volume dos criotubos e a velocidade de descongelamento (Tabela 1). Os menores números de alterações morfológicas espermáticas foram observados nas amostras de sêmen congeladas nos criotubos de 1,6 mL quando descongeladas a  $60^{\circ}$ C por 70 s. Os criotubos de 5 mL, por outro lado, quando descongelados nesta mesma velocidade apresentaram o maior número de alterações morfológicas.

**Tabela 1.** Porcentagem (média  $\pm$  desvio-padrão) de alterações morfológicas dos espermatozoides de tambaqui congelados em criotubos de 1,6 e 5 mL e descongelados a 60°C por 70 e 90s.

Volume do criotubo	Velocidade de descongelamento	
	60°C/70s	60°C/90s
1,6 mL	44 $\pm$ 5 <sup>Aa</sup>	66 $\pm$ 11 <sup>Ab</sup>
5,0 mL	83 $\pm$ 10 <sup>Bb</sup>	65 $\pm$ 5 <sup>Aa</sup>

<sup>A-B a+b</sup> Médias seguidas por letras distintas, maiúsculas na coluna e minúsculas nas linhas, diferem entre si pelo teste de Skott-knott ( $p < 0,05$ ).

As diferentes formas e materiais dos recipientes de armazenamento de sêmen resultam em diferentes propriedades de transferência de calor durante o congelamento e descongelamento, que quando feitos de forma inadequada, podem ocasionar danos celulares devido a mudanças na temperatura, formação de cristais de gelo, injúrias oxidativas e alterações na membrana dos espermatozoides (BALL, 2001).

## Conclusões

O sêmen de tambaqui criopreservado em criotubos de 1,6 mL e descongelado à 60°C por 70 segundos proporciona menor número de alterações morfológicas nos espermatozoides.

## Agradecimentos

À CODEVASF-5ªSR e a piscicultura Santa Clara, Propriá - SE pela disponibilização dos reprodutores e ao CNPq e FAPITEC pelas concessões das bolsas PIBIC e apoio financeiro.

## Referências

BALL, B.A., VO,A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectant on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. **Journal of Andrology**, v.22, p.1061-1069, 2001.

CABRITA, E.; V. ROBLES, V.; CUÑADO, S.; WALLACE, J. C.; SARASQUETE, C.; HERRÁEZ, M. P. Evaluation of gilthead sea bream, *Sparus aurata*, sperm quality after cryopreservation in 5ml macro tubes. **Cryobiology**, v. 50, p. 273–284, 2005.

MILIORINI, A. B. **Ativadores e concentrações de metanol e dimetilsulfóxido na qualidade do sêmen criopreservado de curimba (*Prochilodus lineatus*)**. 2006. 99 f. Dissertação (mestrado em zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PEGG, D. E. Principles of Cryopreservation. In: DAY, J. G.; STACEY, G.N. (Ed.). **Methods in molecular biology: Cryopreservation and freeze-drying protocols**. 2ed. Totowa, 2007. p. 39-57.

YANG, H.; TIERSCH, T. R. Current status of sperm cryopreservation in biomedical research fish models: Zebrafish, medaka, and *Xiphophorus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 149, p. 224–232, 2009.