

# Taxa de Diluição e Tipo de Recipiente de Envase na Criopreservação do Sêmen de Tambaqui

*Flavia Hipólito de Araujo<sup>1</sup>; Carlos Adriano Rocha Silva Moraes<sup>2</sup>; David Lopes Fernandes<sup>3</sup>; Rafael Venâncio de Araújo<sup>4</sup>; Paulo César Falanghe Carneiro<sup>5</sup>; Hymerson Costa Azevedo<sup>6</sup>; Alexandre Nizio Maria<sup>7</sup>*

## Resumo

A taxa de diluição do sêmen em relação à solução crioprotetora e o volume dos recipientes de acondicionamento são fatores que afetam a qualidade espermática do sêmen no processo de criopreservação. A resposta das diferentes espécies a esses fatores é bastante variável, e o estudo desse parâmetro é importante para o aperfeiçoamento das técnicas de criopreservação. O objetivo do estudo foi avaliar os parâmetros de cinética espermática do sêmen de tambaqui, submetido a diferentes taxas de diluição sêmen : solução crioprotetora e criopreservado em recipientes de diferentes volumes. O sêmen de nove machos foi coletado e diluído 1:1, 1:4, 1:9 ou 1:19, em solução crioprotetora (metilglicol, glicose e gema de ovo) e envasado em criotubos de 1,6 e 5,0 mL ou macropalhetas de 4,0 mL. O congelamento foi realizado em botijão de vapor de nitrogênio líquido (*dry shipper*) e o descongelamento em banho maria a 60°C por 90 s (criotubos de 1,6 e 5,0) ou 24 s (macropalheta). As amostras foram ativadas com bicarbonato de sódio 230 mM e analisadas quanto à cinética espermática através do programa Sperm Class Analyser (SCA®). As diluições 1:4 e 1:9 foram as que obtiveram melhores resultados com relação aos parâmetros de cinética espermática avaliados, não sendo detectada diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os recipientes de

<sup>1</sup> Graduando em Engenharia de Pesca, Bolsista FAPITEC/Embrapa Tabuleiro Costeiro, Aracaju, SE, flaviahipolito@hotmail.com.

<sup>2</sup> Graduando em Engenharia de Pesca, bolsista FAPITEC/Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>3</sup> Graduando em Medicina Veterinária, Bolsista Cnpq/ Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>4</sup> Zootecnista, doutor, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>5</sup> Engenheiro-agrônomo, doutor em Zootecnia, pesquisador Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>6</sup> Médico-veterinário, doutor em Medicina Veterinária, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

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

armazenamento. O sêmen de tambaqui pode ser criopreservado com sucesso quando diluído 1:4 ou 1:9 (sêmen : solução crioprotetora) e envasado em criotubos de 1,6 e 5,0 mL ou macropalhetas 4 mL.

**Palavras-chave:** *Colossoma macropomum*, criopreservação, taxa de diluição, criotubos, peixe.

## Introdução

O Tambaqui *Colossoma macropomum* é uma espécie nativa da bacia amazônica e possui grande importância na piscicultura continental do Brasil. Atualmente diversos estudos relacionados à reprodução, como indução hormonal, caracterização espermática e criopreservação do sêmen têm sido realizados (MARIA et al., 2010; 2011).

No processo de criopreservação, o sêmen é diluído em solução crioprotetora antes do congelamento, na tentativa de diminuir os danos causados as células espermáticas devido à diminuição brusca de temperatura. Essas soluções podem ser classificadas como crioprotetores intra ou extracelulares. Os intracelulares são aqueles que protegem os espermatozoides durante o congelamento e atuam na diminuição do ponto de congelamento da água, reduzindo o estresse osmótico e os efeitos da cristalização sobre a estrutura celular (LINHARES, 2012), como é o caso do glicerol, dimetilsulfoxido (DMSO) e metilglicol. Já os extracelulares são responsáveis pela proteção da membrana celular contra o choque térmico, sendo que os mais utilizados são a gema de ovo e o leite desnatado.

A proporção da diluição entre o sêmen e a solução crioprotetora, embora variável entre pesquisadores, é um detalhe metodológico importante porque pode significar um melhor aproveitamento do sêmen, na caracterização de uma possível “dose fertilizante”, como ocorre para ejaculados de mamíferos. Em peixes, esta variação também ocorre e são observadas variações em relação à qualidade espermática de uma mesma espécie em resposta a diferentes taxas de diluição empregadas. Nesse sentido, o estudo da melhor taxa de diluição do sêmen em relação à solução crioprotetora, busca uma proporção que ao mesmo tempo proteja as células contra as crioinjúrias causadas pelo processo de congelamento e maximize o número de células por recipiente de armazenamento. O uso de taxas de diluição adequadas associadas à utilização de recipientes de

armazenamento do sêmen de maior volume como criotubos e macropalhetas, contribui para o aperfeiçoamento das técnicas de criopreservação, facilitando o intercâmbio de material genético necessário para os programas de melhoramento, além de maximizar as atividades de rotina de produção de alevinos nas pisciculturas.

O objetivo do trabalho foi avaliar os parâmetros de cinética espermática do sêmen de tambaqui, submetido a diferentes taxas de diluição do sêmen em relação à solução crioprotetora, quando criopreservado em recipientes de diferentes volumes.

## Material e Métodos

Nove machos adultos pertencentes a Piscicultura Santa Clara (Propriá, SE), foram selecionados e induzidos hormonalmente. Dez horas após a indução o sêmen de cada macho foi coletado em tubos de ensaio por massagem abdominal, tomando-se os devidos cuidados para evitar contaminação por fezes, urina ou água. Para a seleção das amostras de sêmen utilizadas, inicialmente foi avaliada a presença de motilidade espermática removendo-se cinco  $\mu\text{L}$  de sêmen de cada macho e levado a visualização em lâmina sob microscópio óptico (400X) e ativadas com bicarbonato de sódio 230 mM. As amostras que apresentaram pré-ativação da motilidade foram consideradas contaminadas, sendo portanto descartadas e selecionadas apenas as que obtiveram 80% de motilidade. Depois de selecionada a amostra de sêmen foram feitos três pool, sendo cada pool composto com sêmen de três animais.

As amostras de cada pool foram diluídas nas proporções de 1:1, 1:4, 1:9 e 1:19 em solução de congelamento a base de glicose 5%, metilglicol e gema de ovo e envasados em criotubos de 1,6 e 5 mL e macropalhetas de 4 mL. Após 20 minutos de contato do sêmen com a solução de criopreservação, as amostras foram congeladas em botijão de vapor de nitrogênio líquido (dry-shipper) de acordo com o protocolo proposto por MARIA e outros, 2011. Para o descongelamento as amostras foram submetida ao banho maria a 60 °C durante 90 segundos (criotubos 1,6 e 5,0 mL) ou 24 segundos (macropalhetas 4,0 mL). Após o descongelamento a cinética espermática de cada amostra foi avaliada pelo analisador computadorizado de sêmen Sperm Class Analyzer - SCA<sup>®</sup> utilizando-se como solução ativadora o bicarbonato de sódio 230 mM. Os seguintes parâmetros foram avaliados: motilidade total (MT - %); motilidade progressiva (MP - %);

velocidade curvilinear (VCL -  $\mu\text{m/s}$ ); velocidade em linha reta (VSL -  $\mu\text{m/s}$ ) e; velocidade de trajeto (VAP -  $\mu\text{m/s}$ ). Espermatozoides que apresentaram velocidade não progressiva (entre 20 a 60  $\mu\text{m/s}$ ) foram classificados como lentos; com velocidade progressiva lenta (entre 60 e 100  $\mu\text{m/s}$ ) como média; e com velocidade progressiva rápida (acima de 100  $\mu\text{m/s}$ ) como rápida.

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados em um sistema fatorial: 4 x 3 (4 taxas de diluição sêmen : solução de criopreservação x 3 recipientes de armazenamento do sêmen). Os dados foram submetidos à análise de variância e, em caso de diferença significativa, foi aplicado o teste Tukey, com 5% de significância pelo *software* estatístico SISVAR.

## Resultados e Discussão

As diluições 1:4 e 1:9 (sêmen : solução crioprotetora) foram as que obtiveram melhores resultados com relação aos parâmetros de cinética espermática avaliados, não sendo detectada diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os recipientes de armazenamento testados (criotubos 1,6 e 5,0 e macropalhetas 4,0 mL). Os parâmetros de cinética espermática do sêmen de tambaqui pós-congelamento estão descritos na Tabela 1.

**Tabela 1.** Parâmetros de cinética espermática do sêmen de tambaqui criopreservado em recipientes de diferentes volumes submetidos a diferentes taxas de diluição sêmen: solução de criopreservação.

Parâmetro	Recipiente (Tipo/mL)	Diluição				
		1:1	1:4	1:9	1:19	
MT (%)	Criotubo 1,6	45 ± 6	54 ± 9	55 ± 6	38 ± 1	48 A
	Criotubo 5,0	46 ± 1	51 ± 2	49 ± 11	41 ± 4	47 A
	Macropalheta 4,0	49 ± 8	49 ± 11	59 ± 15	45 ± 11	50 A
	Média	46 ab	51 ab	54 a	41 b	
MP (%)	Criotubo 1,6	15 ± 7	25 ± 7	30 ± 4	11 ± 2	20 A
	Criotubo 5,0	14 ± 3	23 ± 1	22 ± 10	9 ± 3	17 A
	Macropalheta 4,0	19 ± 6	19 ± 6	29 ± 13	15 ± 7	20 A
	Média	16 bc	22 ab	27 a	12 c	
VCL ( $\mu\text{m.s}^{-1}$ )	Criotubo 1,6	67 ± 11	77 ± 6	85 ± 1	59 ± 6	72 A
	Criotubo 5,0	66 ± 7	76 ± 1	76 ± 11	56 ± 8	69 A
	Macropalheta 4,0	73 ± 7	73 ± 9	82 ± 12	63 ± 6	73 A
	Média	69 bc	76 ab	81 a	59 c	
VSL ( $\mu\text{m.s}^{-1}$ )	Criotubo 1,6	37 ± 12	51 ± 7	57 ± 3	34 ± 6	45 A
	Criotubo 5,0	37 ± 7	51 ± 1	48 ± 11	28 ± 8	41 A
	Macropalheta 4,0	44 ± 7	46 ± 9	54 ± 12	38 ± 6	45 A
	Média	39 bc	49 ab	53 a	33 c	
VAP ( $\mu\text{m.s}^{-1}$ )	Criotubo 1,6	51 ± 13	64 ± 7	72 ± 3	44 ± 6	58 A
	Criotubo 5,0	50 ± 7	64 ± 3	61 ± 12	39 ± 8	54 A
	Macropalheta 4,0	58 ± 9	60 ± 11	67 ± 12	48 ± 8	58 A
	Média	53 bc	63 ab	67 a	44 c	

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

No presente estudo a motilidade subjetivas no sêmen in natura de todos os machos foram acima de 80% sendo considerado o ideal para a criopreservação. E o volume de sêmen coletado foi de 45,4 mL.

De acordo com BALL (2001) as diferentes formas e materiais dos recipientes de armazenamento de podem resultarem em diferentes taxas de transferências de calor com congelado e descongelado, mas não foi observada diferença significativa para esses parâmetros em nenhum das diluições utilizada pra sêmen de Tambaqui, quando avaliado a cinética espermática das células.

A taxa de diluição 1:10 (sêmen: volume total) foi utilizada para sêmen pirapitinga, e a após o descongelamento obteve-se uma elevada taxa de motilidade (OLIVEIRA RT al., 2007). Já para a piracanjuba essa diluição não apresentou motilidade elevada, sendo a melhor à taxa de diluição 1:5 (MARIA et al., 2006).

Vieira (2010) encontrou para sêmen de Tambaqui a maior porcentagem de espermatozoide móveis após o descongelamento a taxa de diluição 1:3 quando utilizado diluente a base de água de coco em pó (ACP-104), no atual experimento foi observado que as diluições de 1:4 e 1:9 mostrou-se superior para os parâmetros de cinéticas espermáticas.

## Conclusão

O sêmen de tambaqui pode ser criopreservado com sucesso quando diluído 1:4 ou 1:9 (sêmen : solução crioprotetora) e envasado em criotubos de 1,6 e 5,0 mL ou macropalhetas de 4 mL. Entretanto, para um melhor aproveitamento do sêmen indica-se a utilização de criotubos de 5,0 mL e diluição 1:4, o que confere a capacidade de fertilizar um maior número de ovócitos por amostra criopreservada.

## 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**, Lawrence, US, v. 22, p. 1061-1069, 2001.

HUNTER, R. H. F. **Fisiologia e tecnologia da reprodução da fêmea dos animais domésticos**. Zaragoza, ES: Acribia, 1982.

LINHARES, F. R. A. **Efeito de diferentes taxas de diluição e protocolos de congelamento sobre a cinética e morfologia de espermatozoides de Carpa Comum (*Cyprinus carpio*) criopreservados em água de coco em pó (ACP-104)**. 2012. 81 f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2012.

MARIA, A. N.; AZEVEDO, H. C.; CARNEIRO, P. C. F. **Protocolo para Criopreservação do Sêmen de Tambaqui (*Colossoma macropomum*)**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2011. (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Comunicado Técnico, 112).

MARIA, A. N.; AZEVEDO, H. C.; SANTOS, J. P.; SILVA, C. A.; CARNEIRO, P. C. F. Semen characterization and sperm structure of the Amazon Tambaqui *Colossoma macropomum*. **Journal of Applied Ichthyology**, Berlin, v. 26, p. 779-783, 2010.

MARIA, A. N.; VIVEIROS, A. T. M.; FREITAS, R. T. F. et al. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. **Aquaculture**, Amsterdam, NL, v. 260, p. 298-306, 2006.

MILIORINI, A. B. **Ativadores e concentrações de metanol e dimetilsulfóxido na qualidade do sêmen criopreservado de curimba (*Prochilodus lineatus*)**. 2006. 113 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Lavras, MG, 2006.

OLIVEIRA, V. A.; VIVEIROS, M. T. A.; MARIA, A. N., FREITAS, F. T. R.; IZAU, A. Z. Sucesso do resfriamento e congelamento de sêmen de pirapitinga *Brycon nattereri*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 59, n. 6, p. 1509-1515, 2007.

VIEIRA, M. J. A. F.; **Caracterização do semen de tambaqui *Colossoma macropomum* (Curvier, 1818) e criopreservação em diluentes a base de água de coco em po (ACP-104)**. 2010. 114 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2010.