

Uso do Sêmen Criopreservado de Tambaqui no Processo de Reprodução Artificial

Evelyn da Silva Santos¹; Giselle Santana Barreto¹; Carlos Adriano Silva Rocha Moraes¹; Allan Charles Marques de Carvalho²; Jadson Pinheiro Santos³; Rafael Venâncio Araújo⁴; Alexandre Nízio Maria⁵; Paulo César Falanghe Carneiro⁶

Resumo

Atualmente existem poucos estudos que possam nos fornecer dados pertinentes em relação aos protocolos de criopreservação e reprodução artificial de peixes. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a utilização do sêmen congelado de tambaqui para reprodução artificial. Foram utilizadas amostras seminais de seis reprodutores e duas fêmeas de tambaqui *Colossoma macropomum* como um. Foram avaliados parâmetros de cinética e fertilização tais como: motilidade total (MT; %), velocidade curvilínea (VCL; $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$), velocidade linear progressiva (VSL; $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) e velocidade média da trajetória (VAP; $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$). Para esta avaliação foi utilizado o software Sperm Class analyser (SCA[®]) acoplado a um microscópio óptico. As amostras foram avaliadas nos momentos 2, 4 e 6 horas para verificar o tempo de viabilidade da utilização do sêmen criopreservado. Para a fertilização foram testadas as seguintes relações espermatozoides:ovócito: 50.000:1, 100.000:1, 250.000:1, 500.000:1 e ativação com três soluções: NaHCO_3 , NaCl e a água do tanque. Os melhores valores da cinética espermática foram observados ao se utilizar as soluções de NaHCO_3 e NaCl e para os valores de velocidades (VCL,

¹ Graduando do curso de Engenharia de Pesca, Universidade Federal de Sergipe (UFS), São Cristóvão, SE, evelyn_sill@hotmail.com.

² Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Sergipe (UFS), São Cristóvão, SE,

³ Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Sergipe (UFS), São Cristóvão, SE,

⁴ Zootecnista, pós-doutorando FAPITEC/Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

⁵ Zootecnista, Doutor em Zootecnia, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

⁶ Engenheiro-agrônomo, Doutor em Zootecnia, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

VSL e VAP), apontando o NaHCO_3 como melhor ativador para todos os parâmetros avaliados. As maiores taxas para fertilização foram obtidas com os ativadores NaCl e NaHCO_3 nas relações espermatozoides:ovócito 250.000:1 e 500.000:1. Os ativadores NaCl 230 mOsm/kg e NaHCO_3 230 mOsm/kg apresentaram-se como mais adequados, permitindo o uso de relação espermatozoide:ovócito entre 100.000 e 250.000:1 de acordo com os parâmetros de cinética e fertilização avaliados.

Palavras-chave: criopreservação, *colossoma macropomum*, cinética espermática, fertilização, sêmen criopreservado.

Introdução

Os estudos sobre a reprodução artificial de peixes estão relacionados a várias questões atuais tais como: aumento do crescimento populacional e conseqüentemente da demanda por alimentos, a sobreexploração dos recursos pesqueiros e também a deficiência de dados no setor aquícola. O aprimoramento das técnicas de reprodução de peixes comerciais também visa atingir uma produção maior e um melhor resultado final aumentando a taxa de sobrevivência de peixes e alevinos, ocasionando em bons lucros ao produtor.

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é uma espécie nativa migratória da região amazônica de grande importância econômica para a piscicultura devido à grande demanda que o mercado atual exerce para produção comercial dessa espécie (CARNEIRO, 2007). Peixes migratórios não apresentam capacidade de desovar em ambientes lênticos, devido à falta de qualidades ambientais adequadas para a reprodução, como migração, profundidade ou corredeiras (MYLONAS et al., 2010 citado por SOLIS-MURGAS et al., 2011).

Portanto, a reprodução artificial dos seus ciclos reprodutivos demonstra ser uma técnica eficaz para induzir a desova e a espermição dos peixes, ocasionando numa reprodução dos mesmos em qualquer momento desejado e em condições de cativeiro. As características seminais são muito variadas entre as espécies de peixes, e a sua avaliação é de grande importância para o estabelecimento da fertilização artificial (SOLIS-MURGAS et al., 2011). Para a descrição de um perfil espermático, são analisadas as características físicas

do sêmen (volume, motilidade, vigor e concentração) e as características morfológicas dos espermatozoides (ROUTRAY et al., 2007 citado por SOLIS-MURGAS et al., 2011). É necessário o conhecimento desses valores para que se possa avaliar a qualidade do sêmen coletado e, com isso, otimizar sua utilização no processo de fertilização artificial (VIVEIROS, 2005).

A criopreservação do sêmen é uma biotécnica que permite conservar as células espermáticas sob baixas temperaturas, mantendo sua viabilidade por tempo indeterminado, possibilitando a redução de gastos com o transporte de peixes adultos e o armazenamento e conservação de material genético para uso imediato ou futuro (MARIA et al., 2009). Alguns estudos têm testado protocolos de criopreservação do sêmen de tambaqui, porém há pouca informação sobre o seu emprego nos procedimentos de fertilização artificial (LEITE, 2011; VARELA-JUNIOR et al., 2012). Portanto, o presente estudo se torna essencial visando à obtenção de um protocolo prático para a utilização de sêmen criopreservado na fertilização artificial.

Material e Métodos

Foram utilizadas amostras seminais de seis reprodutores e duas fêmeas de tambaqui *Colossoma macropomum*. Os machos foram induzidos hormonalmente com 2,0 mg de extrato bruto de hipófise/kg de peso vivo e dez horas depois, o sêmen foi coletado por massagem abdominal. Após a coleta, as alíquotas de sêmen foram ativadas com NaHCO_3 para avaliar motilidade subjetiva dos espermatozoides em microscópio óptico (400x), e selecionadas as amostras seminais que apresentaram motilidade superior a 80%. A indução hormonal das fêmeas deu-se por meio da aplicação de duas doses de extrato bruto de hipófise/kg de peso vivo (0,5 e 5 mg/kg peso corporal) em intervalo de 12 horas. Dez horas depois da última dose, os ovócitos foram extraídos por massagem abdominal.

As amostras de sêmen foram criopreservadas de acordo com o protocolo proposto por Maria et al. (2011). Foram então diluídas em solução de congelamento que continha glicose, metilglicol e gema de ovo, na proporção 1:9 (sêmen:solução). O sêmen foi envasado em palhetas que foram congeladas

em botijão de vapor de nitrogênio líquido (*dry-shipper*) e transferidas para um botijão de nitrogênio líquido (-196 °C). No descongelamento as palhetas foram imersas em banho-maria a 60 °C por 8 segundos para o processo de descongelamento e, em seguida, mantidos em refrigerador a 4-6 °C durante a análise da cinética espermática. Foram consideradas adequadas para utilização nos experimentos as amostras que apresentaram motilidade espermática superior a 50%.

Experimento parte 1

Ativação de alíquotas de sêmen com três soluções diferentes: bicarbonato de sódio 230 mOsm.kg⁻¹, cloreto de sódio 230 mOsm.kg⁻¹ ou água do tanque de contenção dos reprodutores (12 mOsm/kg) e transferidas para uma câmara *Makler*®, sendo todo o processo realizado 10 segundos após a ativação. As avaliações foram feitas automaticamente a cada cinco segundos até completar um total de 10 avaliações. Para esta avaliação foi utilizado o software *Sperm Class Analyser (SCA*®) acoplado a um microscópio óptico. Os parâmetros avaliados foram: motilidade total (MT; %), *velocidade curvilínea (VCL; μm/s)*, *velocidade linear progressiva (VSL; μm/s)* e *velocidade média da trajetória (VAP; μm/s)*. Os dados foram submetidos à análise de variância e, em caso de diferença significativa, foi aplicada a análise de regressão, ambos a 5% de significância, pelo software estatístico SISVAR.

Experimento parte 2

As amostras descongeladas foram novamente avaliadas nos momentos 2, 4 e 6 horas para verificar o tempo de viabilidade da utilização do sêmen criopreservado após o descongelamento. Adotou-se o delineamento experimental em blocos casualizados (6 blocos = 6 reprodutores), a primeira parte em esquema fatorial 10x3 (tempo pós-ativação x soluções ativadoras) em triplicata para cada tratamento. A segunda parte feita em esquema fatorial 4x3 (horas pós-descongelamento x soluções ativadoras) com triplicata para cada tratamento.

Fertilização dos ovócitos com sêmen descongelado

As amostras avaliadas na parte 1 do experimento forma descongeladas e foi realizada a avaliação da cinética espermática e a extração e quantificação dos ovócitos da fêmea. A fertilização foi realizada adicionando alíquotas de 0,5 mg de ovócitos em recipiente plástico e foram testadas as seguintes relações

espermatozoides:ovócito: 50.000:1, 100.000:1, 250.000:1 e 500.000:1. A avaliação e ativação da motilidade deu-se através da adição de 5 mL dos ativadores: NaHCO_3 230 mOsm.kg⁻¹, NaCl 230 mOsm.kg⁻¹ ou água do tanque de contenção dos reprodutores (12 mOsm.kg⁻¹). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 4x3 (relações espermatozoides:ovócito x soluções ativadoras) com quatro repetições em cada tratamento. Após fertilização, os ovos foram transferidos para incubadoras. O cálculo para taxa de fertilização foi realizado 8 horas após a fertilização e taxa de eclosão 14 horas após a fertilização.

Resultados e Discussão

A MT do sêmen descongelado não foi alterada por até 35 s após a ativação com NaHCO_3 e o valor da MT e MP do sêmen ativado com NaHCO_3 se apresenta superior ($P < 0,05$) a todos os demais tratamentos em todo o tempo avaliado (Figura 1). O mesmo para os valores de velocidades (VCL, VSL e VAP), apontando o NaHCO_3 como melhor para todos os parâmetros avaliados (Figura 2).

Os melhores valores da cinética espermática foram observados ao se utilizar as soluções de NaHCO_3 e NaCl. Essa relação pode ser justificada pelo fato das osmolaridades registradas para estas soluções (230 mOsm/kg) ser ligeiramente inferior a osmolaridade do plasma seminal de tambaqui (260.0 ± 7.3 mOsm/kg) como descrito por Maria et al. (2010).

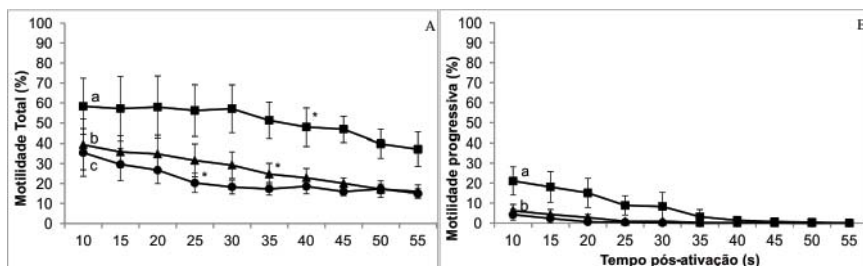


Figura 1. MT (A) e progressiva (B) do sêmen descongelado de tambaqui ativado com as soluções (■- NaHCO₃, ▲- NaCl e ●- água de tanque) e avaliado durante 55 segundos pós-ativação. Letras minúsculas indicam diferenças significativas pelo teste de *Skott-Knott* ($p < 0,05$) entre os tratamentos e dentro de cada tempo. * indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao valor em 10 s.

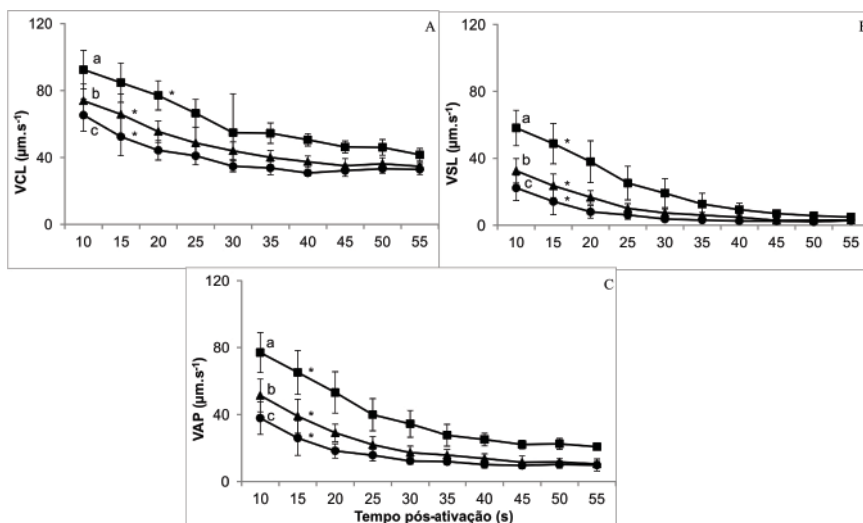


Figura 2. Velocidade curvilinear - VCL (A), velocidade em linha reta - VSL (B) e velocidade da trajetória média - VAP (C) do sêmen descongelado de tambaqui, ativado com diferentes soluções (■- NaHCO₃, ▲- NaCl e ●- água de tanque) e avaliado durante 55 segundos pós-ativação. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de *Skott-Knott* ($p < 0,05$) entre os tratamentos e dentro de cada tempo.

Fertilização de ovócitos de tambaqui com sêmen descongelado

Os resultados da água do tanque se apresentaram inferiores quando comparada aos outros ativadores para todos os parâmetros de cinética e também na fertilização independente da relação espermatozoides:ovócito testada (Tabela 6). As maiores taxas para fertilização com o sêmen criopreservado foram obtidas com os ativadores NaCl e NaHCO₃ nas relações espermatozoides:ovócito 250.000:1 e 500.000:1.

Tabela 6. Taxas de fertilização (média ± desvio-padrão) dos ovócitos de tambaqui fertilizados com sêmen descongelado.

| Ativador ¹ | Relação espermatozoides: ovócito | | | |
|-----------------------|----------------------------------|------------|-----------|-----------|
| | 50.000:1 | 100.000:1 | 250.000:1 | 500.000:1 |
| NaHCO ₃ | 48 ± 11 a* | 53 ± 10 a* | 61 ± 4 a | 69 ± 4 a |
| NaCl | 57 ± 6 a* | 58 ± 8 a* | 69 ± 6 a | 61 ± 9 a |
| Água de tanque | 33 ± 4 b | 29 ± 7 b | 33 ± 4 b | 36 ± 1 b |

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de *Skott-Knott* ($p < 0,05$); * Indica diferença significativa pelo teste Skott-Knott ($p < 0,05$) entre as relações espermatozoides:ovócito; ¹Osmolaridade: NaHCO₃ e NaCl = 230 mOsm/kg e água do tanque = 12 mOsm/kg.

As melhores taxas para eclosão obtidas com o sêmen descongelado foram obtidas a partir do uso da solução de NaCl, onde não se observou diferença significativa ($p > 0,05$) entre as relações espermatozoides:ovócito testadas. Porém com o NaHCO₃, observou-se diferença significativa ($p < 0,05$) entre as relações espermatozoides:ovócito, com maior taxa de eclosão na relação 500.000:1. Muitos os trabalhos que desenvolvem protocolos de criopreservação de sêmen focam apenas na avaliação do sucesso da fertilização, muitas vezes utilizando altas relações espermatozoides:ovócito e não levando em consideração a capacidade fecundante das amostras seminais criopreservadas (VIVEIROS et al., 2000).

Conclusões

Os ativadores NaCl 230 mOsm/kg e NaHCO₃ 230 mOsm/kg apresentam-se como ativadores adequados, permitindo o uso de relação espermatozoide:ovócito entre 100.000 e 250.000:1 de acordo com os parâmetros de cinética e fertilização avaliados.

Agradecimentos

À Embrapa pela disponibilização do laboratório onde foram realizadas as análises, à Piscicultura Santa Clara pela disponibilização dos reprodutores e à FAPITEC e CNPq pelo apoio financeiro.

Referências

CARNEIRO, P. C. F. Tecnologias de produção e armazenamento de sêmen de peixes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 31, n. 3, p. 361-366, jul./set. 2007.

MYLONAS, C. C.; FOSTIER, A.; ZANUY, S. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. **General and Comparative Endocrinology**, Denver, USA, v. 165, p. 516-534, 2010.

SOLIS-MURGAS, L. D.; FELIZARDO, V. O.; FERREIRA, M. R.; ANDRADE, E. S.; VERAS, G. C. Importância da avaliação dos parâmetros reprodutivos em peixes nativos. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 35, n. 2, p. 186-191, abr./jun. 2011.

ROUTRAY, P.; VERMA, D. K.; SARKAR, S. K.; SARANGI, N. Recent advances in carp seed production and milt cryopreservation. **Fish Physiology Biochemistry**, Namur, BE, v. 33, p. 413-427, 2007.

VIVEIROS, A. T. M. **Criopreservação de sêmen de peixes**. In: xvi CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16., 2005, Goiânia. **Anais...** Goiânia, 2005.

MARIA, A. N.; AZEVEDO, H. C.; CARNEIRO, P. C. F. Criopreservação de sêmen de peixes no contexto do agronegócio da piscicultura. In: TAVARES-DIAS,

M. (Org.). **Manejo e sanidade de peixes em cultivo**. Amapá: Embrapa Amapá, 2009. v. 1, p. 47-63.

LEITE, L. V. **Dose inseminante, embriogênese e criopreservação de sêmen de tambaqui (*Colossoma Macropomum*)**. 2011. 72 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2011.

VARELA-JUNIOR, A. S.; CORCINI, C. D.; GHELLER, S. M. M.; JARDIM, R. D.; LUCIA JUNIOR, T.; STREIT JÚNIOR, D. P.; FIGUEIREDO, M. R. C. Use of amides as cryoprotectants in extenders for frozen sperm of tambaqui, *Colossoma macropomum*. **Theriogenology**, New York, v. 78, p. 244-251, 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. 8 p. (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Comunicado Técnico, 112).

VIVEIROS, A. T. M.; SO, N.; KOMEN, J. Sperm cryopreservation of African catfish (*Clarias gariepinus*): cryoprotectants, freezing rates and sperm:egg dilution ratio. **Theriogenology**, New York, v. 54, p. 1305–1308, 2000.