

## USO DE GEMA DE OVO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES NA CONGELAÇÃO ESPERMÁTICA DE *PROCHILODUS BREVIS* E SUA INFLUÊNCIA EM PARÂMETROS CINÉTICOS

*(Use of egg yolk on Prochilodus brevis sperm freezing and its influence on kinect parameters)*

Thais Maia TORRES<sup>1\*</sup>; Priscila Silva de ALMEIDA-MONTEIRO<sup>1</sup>; Renata Vieira do NASCIMENTO<sup>1</sup>; Vanessa Alves PEREIRA<sup>1</sup>; Yasmim Maia FERREIRA<sup>1</sup>; Rômulo Roberto Ribeiro PINHEIRO<sup>2</sup>; Carminda Sandra Brito SALMITO-VANDERLEY<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará (UECE). Av. Dr. Silas Munguba, 1700. Itaperi, Fortaleza/CE. CEP: 60.740-000; <sup>2</sup>Curso de Ciências Biológicas, Lab. Biotecnologia da Reprodução de Peixes (UECE). \*E-mail: [thaismaiat@gmail.com](mailto:thaismaiat@gmail.com)

### ABSTRACT

*Prochilodus brevis* is a fish species with an important ecological and economic role. Therefore, its captive breeding, together with sperm cryopreservation, come as an alternative to improve its availability. To perform sperm cryopreservation with quality results, it is necessary to develop studies on cryomedia composition, such as non-permeable cryoprotectants. The aim of the study was to test the efficacy of two non-permeable cryoprotectants on post-thawed kinetic parameters of *Prochilodus brevis* sperm. Twenty reproductive mature *P. brevis* males were selected and induced to sperm with carp pituitary extract. The sperm was collected, and five pools were made. Pools were diluted in 5% glucose and 10% DMSO added or not with three different concentrations of egg yolk (5; 10 or 12%). The samples were placed on French straws, frozen in dry shipper and stored in liquid nitrogen. After thawing, the kinetic analyses of computer assisted sperm analysis (CASA) were performed. There were no significant differences between the total motility of the control (60.48%) and treatments (49.0; 47.8 and 51.68%, respectively). The other kinetic parameters also showed no statistical difference. Thus, there is no need to use egg yolk in the freezing of *P. brevis* sperm when using a glucose and DMSO extender.

**Key words:** Motility. Reproduction. Non-permeable cryoprotectant. Cryopreservation.

### INTRODUÇÃO

O *Prochilodus brevis* (curimatã comum) é um peixe endêmico do semiárido brasileiro e pode ser encontrado distribuído atualmente por toda a região Nordeste (CHELLAPPA *et al.*, 2009). Apresenta grande importância ecológica, visto que atua no fluxo de biomassa e energia, principalmente por ser um animal detritívoro (GURGEL *et al.*, 2012). Ademais, a espécie apresenta grande importância econômica devido a apreciação da sua ova na culinária nordestina. Dessa forma, métodos que possibilitem sua reprodução em cativeiro, como a congelação seminal, devem ser aplicados, promovendo a manutenção da espécie.

Para a realização dessa técnica, é necessário o uso de uma solução diluidora, composta por diluente e crioprotetor, que pode agir interna ou externamente à célula. Essa solução permite que a célula espermática se mantenha viável durante os processos de congelação e descongelação (SALMITO-VANDERLEY *et al.*, 2012).

Os crioprotetores de ação extracelular nem sempre estão presentes na solução diluidora e agem sem que haja penetração na célula, recobrando sua superfície e estabilizando

sua membrana (SALMITO-VANDERLEY *et al.*, 2012). Apesar da não obrigatoriedade, sua associação com o crioprotetor interno é indicada (GODINHO, 2000).

A gema de ovo é o crioprotetor externo mais utilizado e traz bons resultados para a congelação seminal de peixes, visto que protege a integridade da membrana espermática contra danos causados pelo frio, principalmente por conta de sua composição rica em ácidos graxos (CAROLSFELD *et al.*, 2003).

Dessa forma, visto que ainda não há trabalhos que apliquem o uso de crioprotetores externos para a congelação seminal de *P. brevis*, o objetivo desse estudo foi testar o uso da gema de ovo, em três diferentes concentrações, com esse propósito.

## MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade Estadual do Ceará (340620/2020). Vinte machos de *P. brevis* foram induzidos à reprodução com extrato hipofisário de carpa comum em duas doses (0,4 e 4,0mg EHC/kg peso vivo) com intervalo de oito horas entre elas. Dezesesseis horas depois, a coleta seminal foi realizada por meio de uma massagem abdominal no sentido anteroposterior. O sêmen foi coletado com o auxílio de seringas e mantidos em caixa térmica a aproximadamente 4 °C até o uso.

Cinco pools foram formados e levados a análise objetiva de motilidade total (%). Para isso, 1µL de sêmen foi colocado em uma câmara de Makler, ativado com 100µL de NaCl (125mM) e levado à análise utilizando o *Computer Assisted Sperm Analysis* (CASA) com o software *Sperm Class Analyzer*.

Uma alíquota de cada pool foi diluída (1:9 – sêmen:diluyente) em Glicose 5% e DMSO 10% associado ou não a Gema de ovo em três diferentes concentrações –5, 10 ou 12% (3 tratamentos e o controle). Após a diluição, as amostras foram envasadas em palhetas francesas de 0,25mL e mantidas sob refrigeração (~10 °C) por 10 minutos. Em seguida, as palhetas foram congeladas em *dry shipper* (-176 °C) por 15 minutos e transferidas para um botijão de nitrogênio líquido (-196 °C).

As amostras foram descongeladas em banho-maria a 30 °C por 16 segundos e analisadas, utilizando o CASA, quanto a motilidade total e parâmetros cinéticos também oferecidos pelo software: motilidade progressiva e não progressiva (%); espermatozoides rápidos, médios e lentos (%); velocidades ( $\mu\text{m s}^{-1}$ ) curvilínea (VCL), progressiva (VAP) e em linha reta (VSL). Foi analisado também o tempo de motilidade (s) com o uso de um cronometro, que foi acionado no momento da ativação espermática e parado quando não fosse observada motilidade no campo.

### Análise Estatística

A normalidade dos dados foi avaliada utilizando o teste de Shapiro-Wilk, e a homogeneidade de variância por meio do teste de Levene. Os tratamentos foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) para comparar as médias entre os tratamentos, utilizando o teste de Tukey como post hoc. Foi estabelecido um intervalo de confiança de 95%. Foi utilizado o programa SPSS (IBM Corp. Released 2011).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sêmen *in natura* apresentou uma taxa média de motilidade total de  $97,28 \pm 0,015$ . Os dados estão de acordo com o que já foi descrito para a espécie (NUNES *et al.*, 2016).

O grupo controle, sem a adição de gema de ovo em sua composição, apresentou motilidade total sem diferença estatística ( $p > 0,05$ ) em relação aos tratamentos contendo gema de ovo a 5, 10 ou 12%. Quando comparada a motilidade total entre os tratamentos, também não se observou diferença estatística (Tab. 01).

**Tabela 01:** Taxa de motilidade (%), tempo de motilidade (s) e porcentagens de motilidade progressiva e não progressiva do sêmen pós-descongelado de *P. brevis*, congelado com três diferentes concentrações de gema de ovo (5, 10 e 12%) ou sem sua adição (controle).

	Taxa de Motilidade (%)	Tempo de motilidade	Motilidade Progressiva (%)	Motilidade Não progressiva (%)
<b>Controle</b>	60,48±0,162	52,45±34,43	10,24±0,069	50,25±0,111
<b>Gema 5%</b>	49,00±0,080	39,61±07,27	06,82±0,017	42,18±0,068
<b>Gema 10%</b>	47,08±0,087	42,60±16,11	05,24±0,021	41,86±0,072
<b>Gema 12%</b>	51,68±0,074	49,60±21,75	6,00±0,025	45,64±0,057

Não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos ou entre controle e tratamentos

Em um estudo sobre o uso da gema de ovo na criopreservação seminal de *Colossoma macropomum*, foi verificado que, quando utilizado o crioprotetor interno DMSO, a motilidade total do sêmen criopreservado sem gema de ovo foi semelhante à do tratamento com 10% de gema (CARNEIRO *et al.*, 2012), assim como observado no presente estudo. Carneiro *et al.* (2012) também compararam as concentrações de 5 e 10% de gema de ovo e, nesse caso, a menor concentração apresentou os melhores resultados de motilidade. Quando testando o efeito da presença de 5% de gema de ovo em diversas combinações de solução diluidora para a congelação seminal de *Brycon orbignyanus*, Maria *et al.* (2006) constataram que todos os tratamentos contendo gema obtiveram maiores taxas de motilidade espermática.

Para a análise de tempo de motilidade, o mesmo padrão da motilidade total foi observado, em que os dados dos tratamentos e do controle foram estatisticamente semelhantes entre si ( $p > 0,05$ ; Tab. 01). Um estudo com criopreservação seminal de *Cyprinus carpio* utilizando ou não crioprotetores externos, mostrou que o tempo de motilidade foi superior para o tratamento com a gema de ovo quando comparado ao controle (YILDIZ *et al.*, 2013), diferentemente do encontrado no presente estudo. Isso pode indicar que esse crioprotetor externo atua de forma espécie-específica, tendo efeito diferente nos espermatozoides de espécies distintas.

Para os dados de motilidade progressiva e não progressiva também não foi observada diferença estatística entre os grupos ( $p > 0,05$ ; Tab. 01). O mesmo comportamento foi observado em relação aos dados de espermatozoides rápidos, médios e lentos (Tab. 02). As especificações do tipo de motilidade, bem como do modo como os espermatozoides estão se movendo, são essenciais para ter uma visão mais clara da qualidade da motilidade.

**Tabela 02:** Espermatozoides rápidos, médios e lentos (%) e velocidades curvilínea (VCL), em linha reta (VSL) e progressiva (VAP) do sêmen pós-descongelado de *P. brevis*, congelado com gema de ovo (5, 10 ou 12%) ou sem sua adição (controle).

(%)	Rápidos (%)	Médios (%)	Lentos (%)	VCL ( $\mu\text{m s}^{-1}$ )	VSL ( $\mu\text{m s}^{-1}$ )	VAP ( $\mu\text{m s}^{-1}$ )
<b>Controle</b>	4,08±0,0	16,68±0,10	39,70±0,06	38,98±12,94	17,48±9,55	25,34±12,16
<b>Gema 5</b>	2,64±0,01	10,20±0,03	36,16±0,04	35,68±1,71	14,14±1,77	20,92±2,04
<b>Gema 10</b>	1,94±0,010	8,86±0,03	36,32±0,04	32,34±3,98	13,06±3,52	19,76±16,11
<b>Gema 12</b>	2,40±0,01	10,90±0,04	38,34±0,02	34,1±6,70	13,26±4,06	20,54±21,75

Não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos ou entre controle e tratamentos

Quanto à VCL, não houve diferença nem entre as concentrações de gema de ovo, nem em relação ao controle ( $p>0,05$ ; Tab. 02). A análise de VCL é considerada essencial visto que essa velocidade é um parâmetro altamente correlacionado à taxa de fertilização (WATSON, 1995). Os parâmetros VAP e VSL obedeceram ao mesmo padrão (Tab. 02).

Caso seu uso não traga benefícios, a gema de ovo deve ser evitada devido aos problemas sanitários que pode causar, visto que, por ser de origem animal, há uma maior probabilidade de contaminação microbiana, o que pode diminuir a capacidade fertilizante do espermatozoide (BOUSSEAU *et al.*, 1998).

## CONCLUSÕES

Conclui-se que não há necessidade do uso de gema de ovo na congelação de espermatozoides de *Prochilodus brevis* quando utilizado o meio com glicose e DMSO.

## REFERÊNCIAS

- BOUSSEAU, S.; BRILLARD, J.P.; GUIENNE, B.M.L.; GUÉRIN, B.; CAMUS, A.; LECHAT, M. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. *Theriogenology*, v.50, p.699–706, 1998.
- CARNEIRO, P.C.F.; AZEVEDO, H.C.; SANTOS, J.P.; MARIA, A.N. Cryopreservation of tambaqui (*Colossoma macropomum*) semen: Extenders, cryoprotectants, dilution ratios and freezing methods. *Cryoletters*, v.33, n.5, p.285-393, 2012.
- CAROLSFELD, J.; GODINHO, H.P.; ZANIBONI FILHO, E.; HARVEY, B.J. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. *Journal of Fish Biology*, v.63, p.472-489, 2003.
- CHELLAPPA, S.; BUENO, R.M.X.; CHELLAPPA, T.; CHELLAPPA, N.T.; VAL, V.M.F.A. Reproductive seasonality of the fish fauna and limnoecology of semi-arid Brazilian reservoirs. *Limnologia*, v.39, n.4, p.325-329, 2009.

GURGEL, L.L.; VERANI, J.R.; CHELLAPPA, S. Reproductive ecology of *Prochilodus brevis* endemic fish from these miarid region of Brazil. The Scientific World Journal. p.1-7, 2012.

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

NUNES, L.T.; OLIVEIRA, M.S.; LOPES, J.T.; SOUZA, M.E.M.; PINHEIRO, R.R.R.; CAMPELLO, C.C.; SALMITO-VANDERLEY, C.S.B. Cryopreservation of *Prochilodus brevis* semen: freezing media and thawing rates. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v.37, n.3, p.1643-1654, 2016.

SALMITO-VANDERLEY, C.S.B.; VIEIRA, M.J.A.F.; LEITE, L.V.; OLIVEIRA, F.C.E.; LINHARES, F.R.A.; SALGUEIRO, C.C.M.; NUNES, J.F. Meios de congelação para conservação de sêmen de peixes da família Characidae. Ciência Animal, v.22, n.1, p.255-268, 2012.

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and assessment of their post-thawing function. Reproduction and Fertility and Development, v.7, p.871-891, 1995.

YILDIZ, C.; BOZKURT, Y.; YAVAS, I. An evaluation of soybean lecithin as an alternative to avian egg yolk in the cryopreservation of fish sperm. Cryobiology, v.67, p.91-94, 2013.