

Criopreservação do Sêmen de Tambaqui em Criotubos: Influência da Velocidade de Descongelamento

Carlos Adriano Rocha Silva Moraes¹; Allan Charles Marques de Carvalho²; Giselle Santana Barreto¹; Flavia Hipólito de Araújo¹; Jadson Pinheiro Santos³; Hymerson Costa Azevedo⁴; Paulo César Falanghe Carneiro⁵; Rafael Venâncio de Araújo⁶, Alexandre Nizio Maria⁷

Resumo

O tambaqui *Colossoma macropomum* é uma espécie de peixe de alto valor econômico para piscicultura nacional. Técnicas de criopreservação do sêmen podem contribuir para o desenvolvimento da produção dessa espécie em cativeiro. O objetivo do estudo foi avaliar a influência do volume do criotubo e da velocidade de descongelamento sobre a cinética espermática do sêmen de tambaqui criopreservado. Amostras de sêmen de cinco reprodutores foram coletadas e diluídas em metilglicol, glicose 5% e gema de ovo. As amostras foram envasadas em recipientes de 1,6 e 5,0 mL, congeladas em botijão de vapor de nitrogênio líquido e descongeladas a 60 °C por 70 e 90 s. Após o descongelamento os parâmetros de motilidade (total e progressiva) e velocidade espermática (curvilínear - VCL, linear -VSL e média da trajetória - VAP) foram avaliados. Em média o sêmen criopreservado em criotubos de 1,6 mL apresentou maior motilidade espermática em relação ao de 5,0 mL, entretanto para os parâmetros VCL, VSL e VAP essa diferença não foi significativa. Maiores taxas de motilidade espermática e VCL foram observadas para o sêmen descongelado a 60 °C por 90 s quando comparado a 60 °C por 70 s, não sendo observada diferença significativa para o VSL e VAP. Com base nesses resultados podemos concluir que o sêmen de tambaqui criopreservado em criotubos de 1,6 mL e

¹ Graduando em Engenharia de Pesca, bolsista PIBIC, Aracaju, SE, adrianomorais01@hotmail.com.

² Mestrando em Zootecnia, Universidade Federal de Sergipe.

³ Mestrando em Biotecnologia, Universidade Federal de Sergipe.

⁴ Médico-veterinário, Doutor em Medicina Veterinária, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

⁵ Engenheiro-agrônomo, Doutor em Zootecnia, pesquisador Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

⁶ Zootecnista, pós-doutorando, Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

⁷ Zootecnista, Doutor em Zootecnia, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

descongelado a 60 °C por 90 s proporciona maior taxa de motilidade e velocidade espermática pós-descongelamento.

Palavras-chave: *Colossoma macropomum*, criotubos, velocidade de descongelamento.

Introdução

A criopreservação do sêmen é uma técnica que visa à conservação dos espermatozoides em nitrogênio líquido por tempo indeterminado. Esse processo mantém a estrutura e funcionalidade das células geneticamente viáveis e serve de instrumento para manutenção de programas genéticos e maximização do manejo de produção (PEGG, 2007).

Nos últimos anos, diversos protocolos de criopreservação do sêmen de peixes têm sido desenvolvidos para espécies oriundas das bacias hidrográficas brasileiras (VIVEIROS & GODINHO, 2009), entretanto para o sucesso do processo de criopreservação alguns detalhes devem ser observados, tais como: composição dos diluidores, formas e tipo de envase, velocidade de congelamento e descongelamento do sêmen (MARIA et al., 2011).

O tipo de recipiente utilizado no envase do sêmen é um parâmetro importante no processo de criopreservação, pois além de definir a quantidade de material biológico a ser armazenado, tem influência direta na velocidade de congelamento e descongelamento do sêmen. Estas velocidades são um fator importante para determinação de um protocolo ideal na criopreservação do sêmen (VIVEIROS & GODINHO, 2009). Dentre os recipientes utilizados no envase do sêmen para congelamento, as palhetas de 0,5 mL são as mais usadas. Essas palhetas, no entanto, apresentam algumas limitações quanto à sua utilização em larga escala, necessitando ainda a determinação de metodologias para o armazenamento de sêmen em recipientes de maior volume como macropalhetas e criotubos.

A técnica de criopreservação de sêmen em recipientes de maior volume contribui para o intercâmbio de material genético necessário para os programas de melhoramento, além de maximizar as atividades de rotina de produção de alevinos nas pisciculturas. Nesse sentido, o objetivo do estudo foi avaliar a influência do volume do criotubo e da velocidade de descongelamento sobre a cinética espermática do sêmen de tambaqui criopreservado.

Material e Métodos

O experimento foi realizado utilizando-se amostras seminais de cinco reprodutores, (peso $6,5 \pm 1,4$ Kg, comprimento $66,9 \pm 5,5$ cm). Foi realizada a indução hormonal em cada macho com 2,0 mg de extrato de hipófise de carpa/kg de peso. O sêmen foi coletado e a motilidade avaliada em microscópio óptico. Amostras que apresentaram motilidade superior a 80% foram selecionadas e adicionadas à solução de congelamento, composta por glicose 5 %, metilglicol e gema de ovo, envasadas em criotubos de 1,6 e 5 mL e congeladas em botijão de vapor de nitrogênio líquido. Os criotubos foram descongelados a 60 °C sendo testados dois tempos de imersão: 70 e 90 segundos. Análise da cinética espermática (motilidade total - MT, motilidade progressiva - MP, velocidade curvilínea - VCL, velocidade em linha reta - VSL e velocidade média da trajetória - VAP) foi feita no programa de análise computadorizada para sêmen SCA[®], após ativação com bicarbonato de sódio 125 mM (230 mOsm/kg). Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p=0,05$), através do programa Sisvar.

Resultados e Discussão

A interação entre volume do recipiente e tempo de descongelamento não foi significativa ($p>0,05$) para todos os parâmetros avaliados. Em média o sêmen criopreservado em criotubos de 1,6 mL apresentou maior motilidade espermática total e progressiva quando comparado ao de 5,0 mL, entretanto para os parâmetros de velocidade espermática (VCL, VSL e VAP) essa diferença não foi significativa. O sêmen descongelado a 60 °C durante 90 s foi superior ao descongelado a 60 °C durante 70 s para a motilidade total, motilidade progressiva e VCL. Para VSL e VAP não houve diferença significativa quando se avaliaram os dois tempos de descongelamento (Tabela 1). Deste modo, a melhor relação entre volume do recipiente e velocidade de descongelamento encontrada para a criopreservação do sêmen tambaqui foi o criotubo de 1,6 mL, descongelado a 60°C por 90 s.

Tabela 1. Parâmetros de cinética espermática para o sêmen de tambaqui criopreservado em recipientes de diferentes volumes e descongelados a 60 °C por 70 ou 90 segundos.

Parâmetros	Criotubos (mL)	Velocidade de descongelamento		
		60 °C/ 70 s	60 °C/ 90 s	Média
Motilidade Total (%)	1,6	42.6 ± 16,6	51.9 ± 8,0	47.3 ± 14,8 ^A
	5,0	34.7 ± 8,1	43.7 ± 10,2	39.2 ± 11,5 ^B
	Média	38.7 ± 14,2 ^b	47.8 ± 12,0 ^a	
Motilidade Progressiva (%)	1,6	19 ± 15,2	26.6 ± 7,8	22.8 ± 12,4 ^A
	5,0	14.7 ± 6,1	20 ± 6,9	17.4 ± 7,9 ^B
	Média	16.9 ± 11,9 ^b	23.3 ± 8,3 ^a	
VCL (µm/s)	1,6	78.2 ± 21,8	91.3 ± 12,9	84.7 ± 19,6 ^A
	5,0	77.2 ± 11,4	82.9 ± 12,1	80.0 ± 13,5 ^A
	Média	77.7 ± 18,7 ^b	87.1 ± 13,5 ^a	
VSL (µm/s)	1,6	47.4 ± 18,0	57.8 ± 14,7	52.6 ± 17,2 ^A
	5,0	49.6 ± 14,9	52.3 ± 16,5	50.9 ± 17,8 ^A
	Média	48.5 ± 17,5 ^a	55.0 ± 16,9 ^a	
VAP (µm/s)	1,6	65.5 ± 23,1	76.6 ± 20,0	71.0 ± 23,1 ^A
	5,0	63.6 ± 14,1	71 ± 14,2	67.3 ± 16,1 ^A
	Média	64.6 ± 20,5 ^a	73.8 ± 18,3 ^a	

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

Os fenômenos que requerem temperaturas e tempos de descongelamento distintos entre as espécies de peixes podem ser explicados pela necessidade de recuperação da estabilidade da membrana ou do metabolismo dos espermatozoides, sendo considerados esses parâmetros espécie-específicos (LANSHSTEINER et al., 2000).

Conclusões

O sêmen de tambaqui criopreservado em criotubos de 1,6 mL e descongelado a 60 °C por 90 s proporciona maior taxa de motilidade e velocidade espermática pós-descongelamento.

Agradecimentos

À CODEVASF e a Piscicultura Santa Clara, Propriá - SE pela disponibilização dos reprodutores. A FAPITEC e CNPq pela bolsa de PIBIC e pelo apoio financeiro.

Referências

LAHNSTEINER, F.; BERGER, B.; HORVATH, A.; URBANY, B.; WEISMANN, T. Cryopreservation of spermatozoa in cyprinid fishes. **Theriogenology**, v. 54, p. 1477-1498, 2000.

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).

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, NJ: Humana Press Inc. 2007.

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