

Avaliação espermática pós-descongelamento em tambaqui, *Collossoma macropomum* (Cuvier, 1818)

Jenner Tavares Bezerra MENEZES^{1*}, Luiz Jardim de QUEIROZ², Carolina Rodrigues da Costa DORIA², Jaire Bezerra MENEZES JR¹

RESUMO

Este estudo testa procedimentos de congelamento do sêmen de tambaqui, *Collossoma macropomum*, e eficiência na fertilização de ovócitos. Sêmen de um reprodutor induzido hormonalmente foi amostrado e armazenado em tubos de ensaio. O material foi diluído em soluções crioprotetoras (dimetilacetamida [DMA], dimetilsulfóxido [DMSO], metanol, propilenoglicol e etilenoglicol) (proporção de 1:3; sêmen:diluyente), e submetido a procedimentos de rotina de congelamento. A motilidade foi avaliada antes e depois deste procedimento. Testes de fertilização foram feitos com o sêmen criopreservado. A motilidade pré-congelamento foi de 80% e após o congelamento foi de 20-25% para propilenoglicol e etilenoglicol, 5-10% para DMSO e 5% para DMA e metanol. A fertilização foi de 76% e 88% para propilenoglicol e etilenoglicol, respectivamente.

PALAVRAS-CHAVE: Criopreservação, Sêmen, Tambaqui.

Sperm evaluation of tambaqui, *Collossoma macropomum* (Cuvier, 1818), after thawing

ABSTRACT

This work tests freezing procedures of tambaqui, *Collossoma macropomum*, and efficiency in egg fertilizing. Sperm of a hormonally induced reproducer was collected and stored in assay pipes. The material was diluted in cryoprotectant solutions (dimetilacetamida [DMA], dimetilsulfóxido [DMSO], metanol, propilenoglicol e etilenoglicol) (1:3 ratio: sperm:diluting), and subjected to routine freezing procedures. The motility was evaluated before and after this procedure. Fertilization tests were made with cryopreserved sperm. The motility was evaluated before and after these tests. Fertilization tests were made with the cryopreserved semen. The pre-freezing motility was 80%, and after freezing, it was 20-25% for propilenoglicol and etilenoglicol, 5-10% for DMSO and 5% for DMA and methanol. The fertilization was 76% and 88% for propilenoglicol and etilenoglicol, respectively.

KEYWORDS: Cryopreservation, Sperm, Tambaqui,

¹ Bolsista CNPQ/FINEP. Central Produtora de Alevinos - CPA. Rua Padre Chiquinho, 1493. Pedrinhas. CEP 78903-038, Porto Velho - RO - Brasil. e-mail: jenner@biofish.com.br

² Universidade Federal de Rondônia (UNIR); Laboratório de Ictiologia e Pesca. BR 364, Km 9,5. CEP 78900-000. Porto Velho - RO - Brasil. e-mail: luizjq@yahoo.com.br

Bancos de sêmen de peixes são arquivos de material genético congelado cuja utilização é essencial em pisciculturas e em programas de conservação de espécies ameaçadas (Ribeiro & Godinho, 2003). Dentre os diversos benefícios desta técnica, pode-se destacar a exclusão da assincronia reprodutiva entre fêmeas e machos, conservação da variabilidade genética em populações domesticadas e a facilidade no estabelecimento de programas de melhoramento genético (Suquet *et al.*, 2000; Carolsfeld *et al.*, 2003; Ribeiro & Godinho, 2003).

O sucesso da criopreservação depende da utilização de soluções crioprotetoras adequadas e em concentrações ideais (Horváth & Urbányi, 2000) e as taxas de motilidade após o descongelamento e os testes de fertilização são os critérios mais adequados para avaliar o sucesso da criopreservação (Chao *et al.*, 1987; Godinho *et al.*, 2003).

A criopreservação espermática é uma técnica importante na aqüicultura e tem produzido contribuições significativas na preservação a longo prazo do sêmen para reprodução artificial de muitas espécies de peixes, como, por exemplo, o dourado (*Salminus maxillosus*; Cóser *et al.*, 1984); a piracanjuba (*Brycon orbignyanus*; Bedore, 1999); o bagre africano (Viveiros *et al.*, 2000) e a tilápia-nilótica (*Oreochromis niloticus*; Godinho *et al.*, 2003).

Colossoma macropomum, conhecido vulgarmente por tambaqui, é uma espécie pertencente à subfamília Serrasalminae, dentro da família Characidae (Jegú, 2003) e trata-se do segundo maior peixe de escama da América do Sul (Isaac & Ruffino, 2000). É uma espécie bastante apreciada por comunidades tradicionais na Amazônia e tem sido explorado pela pesca comercial na Amazônia desde o século XIX. No entanto, a produção desta espécie pela pesca comercial tem sofrido considerável diminuição em toda a Amazônia em virtude do grande esforço de pesca investido (Batista & Petrere Jr., 2003). Para suprir a demanda desta espécie, intensos esforços têm sido investidos para o cultivo em cativeiro (Santos *et al.*, 2006).

A busca por técnicas cada vez mais apuradas de preservação de sêmen de peixes vem de encontro às questões ecológicas e econômicas. Diversos fatores como o aumento da demanda alimentar, destruição das matas ciliares, represamento de rios, pesca predatória e a poluição dos ecossistemas aquáticos, acarretaram o desaparecimento de algumas espécies e a redução de populações de espécies de importância econômica e ecológica (Maria, 2005). Diante disso, o presente trabalho objetiva testar procedimentos de congelamento do sêmen do tambaqui e sua eficiência na fertilização de ovócitos e foi realizado na Central Produtora de Alevinos – CPA de propriedade da Secretaria Estadual de Agricultura do Estado de Rondônia.

Para a realização dos testes propostos, primeiramente induziu-se com hormônio, solução de hipófise (1 mg.Kg⁻¹),

o reprodutor selecionado. Após oito horas, o sêmen foi extraído do reprodutor através de massagem abdominal antero-posterior e coletado separadamente em tubos de ensaio graduado, os quais foram colocados em água à temperatura de 28°C e protegidos de luz.

Para determinar as características do sêmen e a concentração espermática, o sêmen foi diluído em solução ativadora, bicarbonato de sódio 1% (Murgas *et al.*, 1998) na proporção de 1:1000 (sêmen:solução) e contados em Câmara de Neubauer. A motilidade espermática antes do congelamento foi avaliada com auxílio de microscopia óptica utilizando aumento de 400 X.

O material seminal foi diluído em diferentes soluções crioprotetoras (dimetilacetamida [DMA], dimetilsulfóxido [DMSO], metanol, propilenoglicol e etilenoglicol) na proporção de 1:3 (sêmen:dilúente). Logo após, foi envasado em palhetas de 0,5 ml e colocado em contato com vapor de nitrogênio líquido em recipiente criogênico “termo seco” canadense. Posteriormente, as palhetas foram transferidas para botijões criogênicos convencionais e submersas no nitrogênio líquido, onde foram armazenadas e congeladas em vapores de nitrogênio líquido em um container tipo cryopack. A seguir, o material foi transferido para um container “tipo líquido” a -196°C. O processo de criopreservação baseou-se no protocolo de Harvey (2000).

Para o processo de descongelamento, o material foi submetido à temperatura de 36 °C em banho-maria por 10 segundos. Foi utilizado como ativador de motilidade espermática pós-congelamento bicarbonato de sódio 1% (Murgas *et al.*, 1998). A avaliação da motilidade foi realizada em lâmina com uma gota de sêmen e uma gota do ativador de motilidade espermática, com auxílio de microscópio (aumento de 400 X). A valorização da motilidade dos espermatozoides baseou-se na estimativa da porcentagem de células móveis no campo focalizado, segundo a escala arbitrária de 0 a 100%. Após, testes de fertilização foram feitos com o sêmen criopreservado, segundo metodologia descrita por Ribeiro & Godinho (2003).

Os resultados demonstraram que o sêmen do tambaqui apresenta uma coloração leitosa e textura acentuadamente viscosa e uma concentração espermática média em torno de 35 bilhões de espermatozoides por mililitro. Para a pirapitinga, *Piaractus mesopotamicus*, espécie muito próxima filogeneticamente do tambaqui (Géry, 1977), Fogli da Silveira *et al.* (1990) encontraram uma concentração espermática de quase 29 bilhões de espermatozoides/ml, valor próximo ao encontrados para o tambaqui.

Segundo Billard *et al.* (1993), a concentração espermática é um dos principais parâmetros para avaliar a qualidade espermática de peixes. No entanto, Maria (2005) afirma que não é considerada uma medida específica da capacidade

de fertilização do sêmen e pode variar muito dentro de determinadas espécies de peixes, num mesmo indivíduo ao longo da vida, e com o método de indução da espermição.

A motilidade do sêmen de tambaqui pré-congelamento foi de 80%. Os resultados aqui constatados são semelhantes aos encontrados por Franciscatto *et al.* (2001) que, trabalhando com a piapara (*Leporinus obtusidens*), obtiveram 88,21% de motilidade média do sêmen *in natura*. Por outro lado, Murgas *et al.* (2003) encontraram um valor médio para a motilidade do sêmen *in natura* de *Brycon orbignyanus* de 97,77%.

Os crioprotetores que mostraram melhores resultados pós-descongelamento foram o etilenoglicol e o propilenoglicol (Tabela 1). Godinho *et al.* (2003), ao avaliar a motilidade pós-descongelamento do sêmen da tilápia-nilótica (*Oreochromis niloticus*), verificaram que o etilenoglicol apresentou taxa de apenas 5,8%, sendo umas das menores encontradas pelos autores.

Por outro lado, os crioprotetores com desempenho inferior foram o DMA e o metanol (Tabela 1). O DMA é utilizado em pouca escala (Godinho *et al.*, 2003), embora tenha sido empregado com sucesso no bagre-africano *Clarias gariepinus* (Horváth e Urbányi, 2000), enquanto o metanol é considerado o mais adequado para a criopreservação de sêmen de tilápias (Harvey, 1983).

O DMSO apresentou resultado intermediário aos anteriores (Tabela 1), apesar de comumente ser considerado o melhor crioprotetor, sendo referido até mesmo como “crioprotetor universal” (Chao & Liao, 2001). Este crioprotetor tem sido utilizado com bastante sucesso em distintas espécies de peixes, tal como em *Macrozoarces americanus* (Yao *et al.*, 2000)

Segundo Rana & MacAndrew (1989), a taxa de fertilização dos ovos é sem dúvida o mais apropriado e prático critério nos protocolos de avaliação para a criopreservação de espermatozoides.

Os testes de fertilização foram feitos apenas com o sêmen criopreservado com soluções que mostraram melhores desempenhos de motilidade pós-descongelamento. Para o propilenoglicol a taxa de fertilização foi de 76% e para o etilenoglicol o valor se elevou para 88%, sendo estes valores considerados satisfatórios, uma vez que se encontram próximos

ao valor encontrado pré-congelamento. Ribeiro & Godinho (2003) encontraram taxa de fertilização em sêmen de piaçu (*Leporinus macrocephalus*) criopreservado com DMSO de 84,3%, valor semelhante aos encontrados neste trabalho para o tambaqui.

Esses resultados mostram o potencial econômico da criopreservação de sêmen do tambaqui, pois poderá reduzir problemas de assincronia reprodutiva e consangüinidade, maior produção e resistência dos indivíduos, facilidade no estabelecimento de melhoramento genético e maior economia de sêmen comparado à reprodução induzida com sêmen fresco.

A preservação dos gametas tem papel relevante, sobretudo na instalação de programas genéticos e possibilitando a formação de bancos genéticos de espécies ameaçadas, como o tambaqui (Harvey, 1982).

Desta forma, este estudo constitui um importante passo para o desenvolvimento do procedimento de criopreservação, o qual proverá o manejo de técnicas e aumento do potencial do cultivo comercial do tambaqui.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq e ao FINEP pelo suporte financeiro ao projeto.

BIBLIOGRAFIA CITADA

- Batista, V.S.; Petrere Jr., M. 2003. Characterization of the commercial fish production landed at Manaus, Amazonas state, Brazil. *Acta amazonica*, 33(1): 53-66.
- Bedore, A.G. 1999. *Características e criopreservação do sêmen de Pacuaranha, Piaractus mesopotamicus e de Piracanjuba, Brycon orbignyanus*. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 53pp.
- Billard, R.; Cosson, J.; Laurence, W.C. 1993. Motility of fresh and aged halibut sperm. *Aquat. Living Resour.*, 6: 67-75.
- Carolsfeld, J.; Godinho, H.P.; Zaniboni Filho, E.; Harvey, B. J. 2003. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. *Journal of Fish Biology*, 63: 472-489.
- Chao, N.H.; Chao, W.C.; Liu, K.C.; Liao, I.C. 1987. The properties of tilapia sperm and its cryopreservation. *J. Fish Bio.*, 30: 107-118.
- Chao, N.H.; Liao, I.C. 2001. Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos. *Aquaculture*, 197: 161-189.
- Cóser, A.M.; Godinho, H.P.; Ribeiro, D.M. 1984. Cryogenic preservation of spermatozoa from *Prochilodus scrofa* and *Salminus maxillosus*. *Aquaculture*, 37: 387-390.
- Fogli da Silveira, W.; Kavamoto, E.T.; Cestarolli, M.A.; Godinho, H.M.; Ramos, S.M.; Silveira, A.N. 1990. Avaliação espermática, preservação criogênica e fertilidade do sêmen do pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), proveniente de reprodução induzida. *B. Inst. Pesca*, 17: 1-13.

Tabela 1 - Valores percentuais da motilidade espermática de tambaqui (*Colossoma macropomum*) após o congelamento com diferentes crioprotetores.

Crioprotetor	Motilidade pós-descongelamento (%)
DMA	< 5
DMSO	5 – 10
Etilenoglicol	20 – 25
Propilenoglicol	20 – 25
Metanol	< 5

- Franciscatto, R.T.; Murgas, L.D.S.; Silva, M.O.B. 2001. Características seminais e taxa de fertilidade em piaparas (*Leporinus obtusidens*). *Anais do 13º Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Lavras*, p. 297.
- Géry, J. 1997. *Characoids of the world*. T.F.H. Publications, New Jersey. 672pp.
- Godinho, H.P.; Amorim, V.M.C.; Peixoto, M.T.D. 2003. Criopreservação do sêmen de tilápia-nilótica *Oreochromis niloticus* var. Chitralada: crioprotetores, soluções ativadoras e refrigerador criogênico. *R. Bras. Zootec*, 32(6): 1537-1543.
- Harvey, B. 2000. The application of cryopreservation on fish genetic conservation. In.: Tiersch, T.R. & Marzik, P.M. (Eds.). *Advances in world aquaculture*. Baton Rouge/World Aquaculture Society, Los Angeles. p. 332-337.
- Horváth, A.; Urbányi, B. 2000. The effect of cryoprotectants on the motility and fertilizing capacity of cryopreserved African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) sperm. *Aquac. Res.*, 23:17-324.
- Isaac, V.J.; Ruffino, M.L. 2000. Informe estatístico do desembarque pesqueiro na cidade de Santarém, PA: 1992 – 1993. In.: Fischer, C. F. (Ed.). *Recursos pesqueiros do Médio Amazonas: biologia e estatística pesqueira*. IBAMA/GTZ/GOPA, Brasília. p. 225-280.
- Jegú, M. 2003. Subfamily Serrasalminae (Pacu and Piranhas). In.: Reis, R. E.; Kullander, S. O., & Ferraris Jr., C.J. (Orgs.). *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America*. EDIPUCRS, Porto Alegre. p. 182-196.
- Maria, A.N. 2005. Diluidores e crioprotetores no resfriamento e congelamento do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Lavras. Lavras. 71pp.
- Murgas, L.D.S.; Franciscatto, R.T.; Santos, A.G.O. 2003. Avaliação espermática pós-descongelamento em piracanjuba (*Brycon orbignyanus*, Valenciennes, 1849). *Rev. Bras. Zootec.*, 32 (6): 1810-1814.
- Murgas, L.D.S.; Gualhanone, A.; Silva, M.O.B. 1998. Calidad seminal del pez piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) post-descongelación. *Anales de Veterinaria de Murcia*, 17:8-16.
- Rana, K.J.; McAndrew, B.J. 1989, The viability of cryopreserved tilapia spermatozoa. *Aquaculture*, 76(3/4): 335-345.
- Ribeiro, R.I.M.A.; Godinho, H.P. 2003. Criopreservação do sêmen testicular do teleosteo piau-açu *Leporinus macrocephalus*. *Arg. Bras. Med. Vet. Zootec*, 55(1): 1-7.
- Santos, G.M.; Ferreira, E.J.G.; Zuanon, J. 2006. *Peixes comerciais do Médio Amazonas - Região de Santarém, PA*. Imprensa Oficial, Brasília. 211 pp.
- Suquet, M.; Dreanno, C.; Fauvel, C.; Cosson, J.; Billard, R. 2000. Cryopreservation of sperm in marine fish. *Aquaculture Research*, 31:231-243.
- Viveiros, A.T.M.; So, N.; Komen, J. 2000. Sperm cryopreservation of African catfish, *Clarias gariepinus*: cryoprotectants, freezing rates and sperm:egg dilution ratio. *Theriogenology*, 54(9): 1395-1408.
- Yao, Z.; Crim, L.W.; Richardson, G.F.; Emerson, C.J. 2000. Motility, fertility and ultrastructural changes of ocean pout (*Macrozoarces americanus* L.) sperm after cryopreservation. *Aquaculture*, 181: 361-375.

Recebido em 27/03/2007

Aceito em 26/03/2008