

TREALOSE COMO CRIOPROTECTOR NÃO PENETRANTE EM SÊMEN CONGELADO DE TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*).

**PAULA MOREIRA DA SILVA¹; ANTONIO SERGIO VARELA JUNIOR²; DANILo
PEDRO STREIT JUNIOR³; STELA MARI GHELLER⁴; CARINE DAHL CORCINI⁴**

¹ ReproPEL- Universidade Federal de Pelotas – paulamoreiras@bol.com.br

² Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Rio Grande- antoniovarela@furg.br

³ Departamento de Zootecnia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul-

⁴ ReproPEL- Universidade Federal de Pelotas – stelagheller@hotmail.com corcinicd@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O Tambaqui (*C. macropomum*, Curvier, 1818) é uma espécie migratória de água doce, e a segunda maior espécie, de peixe, da região Sul americana (CHELLAPA et al, 1995). É de fácil manuseio, alcançando altas produtividades sob aquicultura intensiva, além de ser uma espécie nativa brasileira com maior produção (MARIA et al., 2012). Assim, é a espécie preferida para estudos recentes relacionados à reprodução (Varela Jr et al., 2012), pois espécies migratórias, como tambaqui, têm alta fecundidade (VIEIRA, 2011). A perpetuação da espécie de *C. macropomum* é necessária para aquicultura, especialmente na natureza onde as populações estão ameaçadas (LOPES et al., 2009).

Criopreservação de espermatozoides é um dos métodos mais utilizados para preservação do material genético e a eficiência da utilização técnica depende da capacidade de proteger as células de danos durante o congelamento, e para inibir a toxicidade química e osmótica para as células espermáticas (SQUIRES et al., 2004). O uso de agentes crioprotetores internos e externos em diluentes para congelamento de sêmen visa proteger o esperma. O glicerol e dimetilsulfóxido (DMSO) são crioprotetores penetrantes tradicionais, utilizados para sêmen, de peixes, congelado reportado por HORVAT; URBÁNYI (2000), embora as amidas, como a dimetilformamida foram recentemente utilizadas como crioprotetores penetrantes para esperma congelado de *C. macropomum* (VARELA JR. et al, 2012).

Crioprotetores não penetrantes também estão incluídos nos extensores, com o objetivo de estabilização da membrana espermática (Holt, 2000). Quando adicionados a diluentes, os açúcares podem atuar como substratos energéticos ou crioprotectores não penetrantes (HOLT, 2000). A trealose é um desses açúcares, que reduz possíveis efeitos negativos do fluxo de água através da membrana durante o congelamento de esperma (YILDIZ et al., 2000), tais como a formação de cristais de gelo intracelulares (AISEN et al., 2002, 2005). Além disso, a trealose interage com os fosfolipídios da membrana e proteínas, dando mais flexibilidade para a membrana de espermatozoides contra lesões causadas pelo congelamento relacionadas com a ocorrência de espécies reativas de oxigênio reportado por AISEN et al. (2002) e BUCAK et al (2007). Embora a inclusão de trealose em diluentes para sêmen congelado poder estar relacionada à melhoria na qualidade do esperma pós-descongelamento em muitas espécies reportado por YILDIZ et al.(2000); SZTEIN et al.(2001); ABOAGLA ; TERADA (2004); AISEN et al. (2005) e BUCAK et al. (2007), o seu uso ainda é controverso, pois alguns estudos não relataram tal benefício (SQUIRES et al, 2004 e TUNCER et al. , 2011). No entanto, sua eficiência como crioprotetor para o esperma congelado de espécies de peixes de água doce ainda é desconhecida.

Por isso o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da trealose como crioprotetores sobre a qualidade pós-descongelamento sêmen de *C. macropomum*.

2. METODOLOGIA

O experimento foi realizado em uma fazenda comercial localizada em Pimenta Bueno, RO, Brasil, durante o período reprodutivo da espécie. Foram utilizados 10 machos, mantidos em tanques e alimentados três vezes por semana, por uma dieta comercial com proteína bruta de 40% e 2.900 kcal de energia metabolizável/ kg.

Após captura cada macho, utilizado para coleta de sêmen, recebeu extrato pituitário na sua região dorsal (1mg/kg) diluído em 0,5 de solução salina estéril (NaCl a 0,9%).

Os machos foram mantidos em dois tanques com uma coluna de água de 0,7 m por 6,5 h. Em seguida as papilas urogenitais foram limpas e secas com papel toalha e o esperma foi coletado com um tubo côncico de 15 ml, por massagem abdominal, evitando a extrusão simultânea de fezes e urina para evitar contaminação.

Foram avaliados motilidade e vigor, antes do congelamento do sêmen, colocando 1 μ l de esperma e 44 μ l de água destilada a 25º C em uma lâmina coberta com uma lamínula, utilizando microscopia de contraste de fase, com ampliação 200X. Para serem processadas todas as amostras tinham que apresentar pelo menos 80% de motilidade espermática, 10 seg. após a ativação. O período de motilidade espermática foi considerado como o intervalo de ativação para o esperma momento parou de se mover

Criopreservação do esperma:

Foi usado o Beltsville Thawing Solution (BTS), as amostras de sêmen foram diluídas a 1/9 (v/v).

O tratamento controle consistiu BTS, incluindo 10 % de DMSO como crioprotetor penetrante. E os outros 4 tratamentos usou-se trealose a 50 mM, 100 mM, 150 mM e 200 mM foi adicionado para a BTS.

Essas amostras foram armazenadas em palhetas de 250 μ L e estabilizadas a temperatura ambiente, durante 2 min. Posteriormente as palhetas foram expostas ao vapor de nitrogênio líquido (-80°C) e permaneceram por 12 h e foram armazenadas em nitrogênio líquido (-196°C) durante pelo menos 15 d.

Avaliações subseqüentes de qualidade do esperma pós-descongelamento, foram realizadas no ReproPel/RAC. As amostras de esperma foram descongeladas em banho de água a 45°C durante 5 segundos e ressuspensas em 400 μ L de BTS(1:3, v/v) a 22°C em um tubo côncico de 1,5 ml para que os efeitos tóxicos do crioprotetor seja minimizado. A viabilidade do esperma foi avaliada pela contagem de 200 células de esperma com um microscópio de Epifluorescência, com ampliação de 400 vezes.

A viabilidade foi avaliada utilizando as sondas de diacetato de carboxifluorescência (CFDA) e de iodeto de propídio (PI). O espermatozóide considerado viável apresentou fluorescência verde, enquanto aqueles que apresentaram fluorescência vermelha ou verde e vermelha foram considerados inviáveis.

Os dados foram analisados no software statistix 9.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O volume coletado de esperma fresco foi de $6,6 \pm 0,6$ mL. Concentração espermática foi de $8,2 \pm 0,5 \times 10^9$ / mL, com a motilidade espermática de $98,0 \pm 1,3$ % e período de motilidade de $96,2 \pm 6,8$ s.

Extensores incluindo 100 mM e 150 mM de trealose apresentaram melhor viabilidade espermática, motilidade espermática e período de motilidade em comparação ao controle ($P<0,05$) (Tabela 1).

Tabela 1: Motilidade pós- descongelamento, período de motilidade e viabilidade para esperma congelado de *Colossoma macropomum* no extensor com distintas concentrações de trealose *

Diluente	Motilidade	Período	de	Viabilidade
	espermática (%)	motilidade (s)		Espermática (%)
10% DMSO	14.0 \pm 2.4 ^{ab}	17.3 \pm 2.4 ^b		42.5 \pm 2.8 ^b
50 mM Trehalose	9.0 \pm 2.6 ^b	15.7 \pm 3.6 ^b		50.0 \pm 5.1 ^{ab}
100 mM Trehalose	26.5 \pm 3.2 ^a	38.4 \pm 2.6 ^a		62.7 \pm 3.8 ^a
150 mM Trehalose	20.5 \pm 1.7 ^a	35.5 \pm 2.1 ^a		66.4 \pm 2.9 ^a
200 mM Trehalose	8.5 \pm 1.7 ^b	12.6 \pm 2.7 ^b		59.8 \pm 3.6 ^{ab}

* n = 250 (10 X 5 peixes tratamentos X 5 repetições por tratamento).

A,^b Means \pm EPM tendo expoentes distintos diferem na coluna, pelo menos, $P <0,05$.

No presente estudo, a inclusão de 100 mM e 150 mM de trealose apresentou efeitos positivos sobre o sêmen, pós-descongelamento, em comparação com o tratamento controle, incluindo apenas DMSO. A trealose contribui com uma atividade anti-oxidante, reduzindo o consumo de peroxidação lipídica, o que resulta em melhoria da viabilidade do esperma, além de promover a desidratação das células e influencia o padrão de cristalização dos canais de solutos presentes em porções de água descongelada do extensor conduzindo à redução da formação de cristais de gelo, impedindo o rompimento da membrana celular e beneficiando a integridade desta.

4. CONCLUSÕES

A inclusão de trealose, especialmente a 150 mM, foi eficiente na preservação da qualidade espermática pós-descongelação.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AISEN, E.G.; MEDINA, V.H.; VENTURINO, A. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. **Theriogenology**, v.57, p.1801-1808, 2002.

AISEN, E.; QUINTANA, M.; MEDINA, V.; MORELLO, H.; VENTURINO, A. Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders. **Cryobiology**, v.50, p. 239-249, 2005.

BUCAK, M.N.; ATESSAHIN, A.; VARISLI, O.; YUCE, A.; TEKIN, N.; AKCAY, A. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen:

microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. **Theriogenology**, v.67, p.1060–1067, 2007.

CHELLAPA, S.; CHELLAPA, N.T.; BARBOSA, W.T. HUNTIGORD, F.A.; BEVERIDGE, M.C.M. Growth and production of the Amazonian Tambaqui in fixed cages under different feeding regimes. **Aquacult Intern**, v.3, p.11-21, 1995.

HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v.62 p.3-22, 2000.

HORVATH, A.; URBANYI, B. The effect of cryoprotectants on the motility and fertilizing capacity of cryopreserved African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell 1822) sperm. **Aquacult Res**, v.31, p.317–24, 2000.

MARTINEZ-PÁRAMO, S.; PÉREZ-CEREZALES, S.; GÓMEZ-ROMANO, F.; BLANCO, G.; SÁNCHEZ, J.A.; HERRÁEZ, M.P. Cryobanking as tool for conservation of biodiversity: effect of brown trout sperm cryopreservationon the male genetic potential. **Theriogenology**, v.71, p.594–604, 2009.

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.

LOPES, T.S.; STREIT, Jr. D.P.; RIBEIRO, R.P.; POVH, J.A.; OPERA-BARRERO, N.M.; VARGAS, L.; PINTO FILHO, C.; QUEIROZ, J.R.. Genetic variability of tambaqui (*Teleostei: Characidae*) from different regions of Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Animal Science**, v.61, p.728 –735, 2009.

SQUIRES, E.L.; KEITH, S.L.; GRAHAM, J.K. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.62, p.1056–1065, 2004.

TUNCER, P.B.; SARIÖZKAN, S.; BUCAK, M.N.; ULUTAS, P.A.; AKALIN, P.P.; BÜYÜKLEBLEBICI, S.; CANTURK, F. Effect of glutamine and sugars after bull spermatozoa cryopreservation. **Theriogenology**, v.75, p.1459-1465, 2011.

VARELA, Jr. AS.; CORCINI, C.D.; GHELLER, S.M.M.; JARDIM, R.D.; LUCIA, Jr.T.; STREIT, Jr.DP.; FIGUEIREDO, M.R.C.; Use of amides as cryoprotectants in extenders for frozen sperm of tambaqui, *Colossoma macropomum*. **Theriogenology**, v.78 p.244-251, 2012.

YILDIZ, C.; KAYA, A.; AKSOY, M.; TEKELI, T. Influence of sugar supplement action of the extender on motility viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. **Theriogenology**, v. 54, p.579–785, 2000.

VIEIRA, M.J.A.F.; CARVALHO, M.A.M.; SALMITO-VANDERLEY, C.S.B.; SALGUEIRO C.C.M.; VIVEIROS, A.T.M.; MOURA, A.A.A.N.; NUNES, J.N. Características do sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*) em latitude equatorial. **Archivos de Zootecnia**, v.60,p. 1263-1270, 2011.