

## PROTOCOLO DE CRIOPRESERVAÇÃO SEMINAL DE JUNDIÁ AMAZÔNICO (*Leiarius marmoratus*) ASSOCIANDO BTS E DIMETILSULFÓXIDO

NATHÁLIA WACHOLZ KNABAH<sup>1</sup>; STELA MARI MENEGHELLO GHELLER<sup>2</sup>;  
GEÓRGIA DA CRUZ TAVARES<sup>2</sup>; RAFAEL MIELKE BARBOSA<sup>2</sup>; ANTONIO  
SERGIO VARELA JUNIOR<sup>4</sup>; CARINE DAHL CORCINI<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – UFPEL – Pelotas/RS – [nathaliaknabah@gmail.com](mailto:nathaliaknabah@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – UFPEL – Pelotas/RS

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – UFPEL, REPROPEL – Pelotas/RS – [corcinicd@gmail.com](mailto:corcinicd@gmail.com)

<sup>4</sup>Universidade Federal de Rio Grande – FURG- Rio Grande/RS

### 1. INTRODUÇÃO

A espécie *L. marmoratus* é um peixe de água doce, nativo da América do Sul, com grande importância econômica, utilizado para criação de peixes híbridos, (Pintado-da-Amazônico), resultante do cruzamento do macho *L. marmoratus* e a fêmea *Pseudoplatystoma punctifer*. Devido ser uma espécie onívora, reduz o canibalismo entre as larvas, fator de grandes perdas nas larviculturas de *Pseudoplatystoma*.

A criopreservação espermática tem importante papel na hibridação e na preservação da espécie, é uma técnica indispensável na rotina de reprodução induzida e no melhoramento genético, possibilitando o controle reprodutivo de várias espécies e está em amplo desenvolvimento em peixes (Mins et. al 2000). Bedore (1999) observou que DMSO é um dos melhores crioprotetores para espécies de peixe de água doce, apesar de sua elevada toxicidade que segundo Leung e Jamielson (1991) pode ser suprida pela adição de carboidratos no diluente. A utilização de Beltsville Thawing Solution (BTS) é citado por diversos autores em seus trabalhos, pois apesar de ser um diluente indicado principalmente para suínos, sua fórmula possui componentes que nutrem a célula espermática, proporcionam um microambiente osmoticamente favorável e protege a membrana citoplasmática pela face intracelular durante o congelamento.

Sendo assim, objetivo deste estudo foi testar um protocolo de criopreservação para o Jundiá Amazônico (*L. marmoratus*) associando meio diluente BTS, com diferentes concentrações de DMSO (5,10,15,20%), e uma curva de congelamento utilizando dry shipp, sobre parâmetros de *in vitro* de qualidade espermática.

### 2. METODOLOGIA

Foram utilizados neste estudo oito animais, após a indução hormonal com extrato de hipófise de carpa (1 mg/kg). As amostras foram diluídas na proporção de 1:9 (sêmen: diluente) em solução base diluente BTS (Pursel & Johnson 1975) e diferentes concentrações DMSO e envasadas em palhetas de 250 µL (Varela JR. et al. 2012). Em seguida, as amostras foram congeladas por 12 horas em um botijão dry-shipper (Taylor-Wharton, modelo CP 300 *dry shipper* (Taitson et al. 2008), onde permaneceram, por 12hs e então transferidas e armazenadas em nitrogênio líquido (-196 °C).

O descongelamento foi realizado em banho – maria (40°C/8 segundos). Seguido de análises integridade de membrana plasmática com coloração de iodeto de propídio e diacetato de carboxifluoresceína (Harrison & Vickers, 1990).

As células que apresentavam fluorescência verde serão consideradas íntegras, enquanto as células com fluorescência vermelha ou verde/vermelha indicarem células com membranas lesadas.

A integridade de DNA, com coloração de acridine e orange (Bencharif et al., 2010), células com fluorescência verde serão considerados com o DNA íntegro, enquanto aqueles com fluorescência vermelha ou laranja considerados com o DNA não íntegro. As análises de integridade de membrana e DNA foram analisadas em aumento de 400x em microscópio de epifluorescência (Olympus BX 51, América INC, São Paulo, SP), utilizando-se filtro WU com excitações de 450-490 nm e emissão de 516-617 nm.

O tempo de motilidade espermática foi estimado após ativação seminal utilizando solução de ativação NaHCO<sub>3</sub> 119 mM (Carolsfield et al., 2003) e sêmen (4:1) respectivamente, em uma lâmina de microscopia óptica sendo recoberta por lamínula. Analisando o tempo em segundos (uso de timer) até a redução da motilidade próxima de 10%.

Todos os dados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (S.E.M.). Todas as análises foram realizadas no software Statistix 9.0 (2010).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

E frente às avaliações realizadas após o descongelamento não houve diferença estatística ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos contendo as diferentes concentrações de DMSO (Tabela 1).

Isso pode ter ocorrido pelo fato do DMSO interagir com os fosfolipídios estruturais da membrana espermática, mantendo a propriedade de transporte de água em temperaturas abaixo do 0°C, reduzindo a formação de cristais de gelo, por diminuir o ponto de congelamento do fluido intracelular durante o processo de criopreservação. Assim, principal atuação do DMSO é em nível intracelular, justificando os resultados encontrados no DNA, sendo a membrana plasmática protegida pelos açúcares presentes no BTS, devido a sua composição ser composta de 80% de glicose que auxilia na nutrição da célula espermática, e a presença de íons que em um meio de congelamento auxilia no controle da pressão osmótica durante a desidratação celular (Kopeika e Kopeika 2008), proporcionando um microambiente osmoticamente favorável e a proteção da face intracelular da membrana plasmática (Murgas et.al. 2007).

Tabela 1: Tempo de motilidade, integridade de membrana e DNA das células espermáticas de Jundiá-Amazônico frente a diferentes concentrações de DMSO.

Diluentes	Integridade		Tempo motilidade (segundos)
	Membrana (%)	DNA	
DMSO 5%	33.2 $\pm$ 4,8	70 $\pm$ 22.6	52.2 $\pm$ 5.2
DMSO 10%	28 $\pm$ 3.1	105 $\pm$ 23.6	46 $\pm$ 5.7
DMSO 15%	31.5 $\pm$ 5	60 $\pm$ 12.8	50.2 $\pm$ 8.1
DMSO 20%	42 $\pm$ 6.7	110 $\pm$ 44.1	66 $\pm$ 2

### 4. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos frente às diferentes concentrações de DMSO não se observou diferença estatística, porém essas concentrações não interferiram na integridade de membrana e DNA dos espermatozoides de *L. marmoratus*, assim como não alteraram o tempo de motilidade, podendo ser utilizadas na criopreservação seminal de Jundiá Amazônico.

Ainda são necessários mais estudos a cerca desse objetivo.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEDORE, A.G. **Características e criopreservação do sêmen de pacu-caranha (*Piaractus mesopotamicus*) e de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 1999. 53p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) - Universidade Federal de Minas Gerais, 1999.
- BENCHARIF, D., AMIRAT-BRIAND, L., GARAND, A., ANTON, M., SCHMITT, E., DESHERCES, S., DELHOMME, G., LANGLOIS, M.L., BARRIÈRE, P., DESTRUMELLE, S., VERA-MUNOZ, O., TAINURIER, D., 2010a. Freezing canine sperm: Comparison of semen extenders containing Equex® and LDL (Low Density Lipoproteins). **Animal Reproduction Science**. 119, 305-313.
- CAROLSFIELD, J.; GODINHO, H.P.; ZANIBONI FILHO, E.; HARVEY, B. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. **Journal of Fish Biology**, 63, 472-489. 2003.
- HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal Reproduction and Fertility**, 88, 343-352. 1990.
- KOPEIKA E, KOPEIKA J. Variability of sperm quality after cryopreservation in fish. In: Alavi SMH, Cosson JJ, Coward K, Rafiee G (eds) Fish spermatology. **Alpha Science Ltd**, Oxford, pp 347–396, 2008.
- LEUNG, L.K.P.; JAMIESON, B.G.M. Live preservation of fish gametes. In: JAMIESON, B.G.M. (Ed.). **Fish evolution and systematics: evidence from spermatozoa**. Cambridge: Cambridge University Press, 1991. p.245-269.
- MINS, S.D.; TSVETKOVA, L.I.; BROWN, G.G. et al. Cryopreservation of sperm of sturgeon and paddlefish. In: TIERSCH, T.R.; MAZIK, P.M. (Eds). Cryopreservation in aquatic species. **Baton Rouge: World Aquaculture Society**, 2000. p.123-129.
- MURGAS, L.D.S.; MILIORINI, A.B.; FREITAS, R.T.F. et al. Criopreservação do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) mediante adição de diferentes diluidores, ativadores e crioprotetores. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, p.526-531, 2007.
- PURSEL, VG & LA JOHNSON. 1975. Freezing of boar spermatozoa: Fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. **Jornal Animal Science**, 40: 99-102.
- TAITSON, PF, E CHAMI & HP GODINHO. 2008. Gene banking of the neotropical fish *Leporinus obtusidens* (Valenciennes, 1836): A protocol to freeze its sperm in the field. **Anim. Reprod. Sci.**, 105: 283–291.
- VARELA JUNIOR., A.S.; CORCINI, C.D.; GHELLER, S.M.M.; JARDIM, R.D.; LUCIA, T.; STREIT JR., D.P.; FIGUEIREDO, M.R.C. Use of amides as cryoprotectants in extenders for frozen sperm of tambaqui, *Colossoma macropomum*. **Theriogenology**, 78, 244-251. 2012.
- VARELA JUNIOR, A.S; CORCINI, C.D; STREIT JR, D.P; RIZZOTO G; JARDIM, R.D; LUCIA JUNIOR, T; FIGUEIREDO, M,R,C. Efeito crioprotetor de diferentes concentrações do dimetilsulfóxido no congelamento de sêmen de tambaqui *Colossoma macropomum*. **Atlantica**, Rio Grande, 34(2) 129-137, 2012.



ANAIS DA 66ª REUNIÃO ANUAL DA SBPC - RIO BRANCO, AC - JULHO/2014  
**Estratégias de valorização da piscicultura de espécies nativas amazônicas.**  
Acessado em 03 out. 2017. Online. Disponível em:  
[http://www.sbpnet.org.br/livro/66ra/PDFs/arq\\_3319\\_1213.pdf](http://www.sbpnet.org.br/livro/66ra/PDFs/arq_3319_1213.pdf)