

TREALOSE NA CRIOPRESERVAÇÃO SEMINAL DE JUNDIÁ AMAZÔNICO (*LEIARIUS MARMORATUS*)

CRISTIANE COUTINHO DA COSTA¹; STELA MARI MENEGHELLO GHELLER²;
EDENARA ANASTÁCIO DA SILVA²; ANTONIO SERGIO VARELA JUNIOR²;
GEÓRGIA DA CRUZ TAVARES²; CARINE DAHL CORCINI³

¹Universidade Federal de Pelotas – UFPEL – Pelotas/RS – costa.cc@outlook.com

²Universidade Federal de Pelotas – UFPEL – Pelotas/RS

³Universidade Federal de Pelotas – UFPEL, REPROPEL – Pelotas/RS – corcincd@gmail.com

⁴ Universidade Federal de Rio Grande – FURG- Rio Grande/RS – varelaejas@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

O Jundiá Amazônico (*L. marmoratus*) é um peixe de água doce com comportamento reofilico quando presente na natureza, sofrendo as interferências ocasionadas no ambiente. Em cativeiro se faz necessário a indução hormonal para produção de gametas (Escobar e Monjica, 1997). A criopreservação seminal em peixes é uma ferramenta da biotecnologia e contribui para a otimização da produção (Kopeika e Kopeika 2008). A criopreservação tem beneficiado a produção de pescado, estudos ainda buscam diminuir e eliminar os fatores que reduzem a viabilidade e a fertilidade do espermatozoide após descongelação (Streit Jr et al, 2009).

Na busca da padronização da criopreservação desta espécie, os crioprotetores externos podem auxiliar minimizando as perdas da qualidade seminal, agindo diretamente sobre as organelas espermáticas (Holt, 2000), a trealose (glicose + glicose), auxilia na desidratação celular pela sua hiperosmolaridade, reduzindo a formação de cristais de gelo intracelular, favorecendo a redução das crioinjúrias da criopreservação conforme demonstrado em outras espécies (Aisen et al., 2005).

O objetivo do estudo foi avaliar o efeito de diferentes concentrações de trealose sobre parâmetros de qualidade seminal *in vitro*.

2. METODOLOGIA

Foram utilizados reprodutores (n=8), durante a estação reprodutiva (novembro/dezembro). Para obtenção de sêmen, foi aplicada uma dose intramuscular de extrato de hipófise de carpa (1mg/kg), na coleta a papila urogenital foi cuidadosamente seca com papel toalha e o sêmen coletado através

de massagem abdominal (Billard et al., 1995). Apenas as amostras com motilidade espermática superior a 80% após ativação foram criopreservadas.

As amostras foram diluídas em BTS, na proporção 1:9 (sêmen: diluente) em solução base diluente Beltsville Thawing Solution (BTS) (Pursel & Johnson 1975) e diferentes concentrações trealose (50, 100, 150, 200mM) e envasadas em palhetas de 250 µL. Foram congeladas por 12 horas em um botijão dry-shipper (Taylor-Wharton, modelo CP 300 *dry shipper* (Taitson et al. 2008), permanecendo por 12 hs sendo transferidas e armazenadas em nitrogênio líquido (-196 °C).

Para descongelamento, das palhetas utilizou-se banho-maria (40°C/ 8seg) e analisou-se a qualidade seminal. Foram descongeladas, duas amostras de palhetas de tratamento de cada macho, diluídas novamente em 400µL de BTS (1:3) a fim de diminuir a toxicidade do crioprotetor a temperatura de 22 °C.

Após ativação seminal com a solução de ativação NaHCO₃ 119 mM (Carolsfield et al., 2003) na proporção 4:1, em uma lâmina de microscopia óptica, recoberta por lamínula. Foram analisadas as variáveis no sistema CASA (Computer Assisted Sperm Analysis): motilidade total e motilidade progressiva.

O período de motilidade espermática: um cronômetro acionado quando colocado 1 µL de sêmen em contato com 4µL de solução de ativação (NaHCO₃ 119 mM) em uma lâmina de microscopia ótica registrando o tempo decorrido até que a taxa de motilidade tenha porcentagem de 10%.

Todas as variáveis foram analisadas no software Statistix 2013, com análise de Tukey.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quando se analisou motilidade total e progressiva, o tratamento contendo concentração de trealose de 50 Mm, demonstrou resultados inferiores aos tratamentos com concentrações de 150 Mm e 200Mm, porém não diferindo do tratamento com 100mM. E amostras criopreservadas com 200 Mm de trealose apresentaram resultados superiores nesses parâmetros que os demais tratamentos testados. No período de motilidade, não se observou diferença estatística entre os tratamentos (Tabela 1).

O efeito da utilização da trealose na criopreservação de células espermáticas de *L. marmoratus* era desconhecida, e neste estudo pode-se observar que a concentração de 200 Mm apresentou taxas de motilidade

espermática superiores as demais concentrações testadas. O efeito crioprotetor da trealose é atribuído a sua osmolaridade e as interações específicas com os fosfolípidios presentes na membrana plasmática (Bakás & Disalvo 1991).

Tabela 1. Efeito de diferentes concentrações de trealose (50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM), em amostras de sêmen de jundiá amazônico (*L. marmoratus*), criopreservadas sobre parâmetros motilidade espermática analisados no CASA (Computer Assisted Sperm Analysis), Motilidade total (MOT), motilidade progressiva (MOP), (média \pm erro padrão da média) e período de motilidade espermática (PM).

	Trealose 50mM	Trealose 100mM	Trealose 150mM	Trealose 200mM
MOT (%)	13.6 \pm 1.9 ^C	18.6 \pm 1.7 ^{BC}	22.9 \pm 1.4 ^B	31.4 \pm 1.8 ^A
MOP (%)	9.5 \pm 1.6 ^C	15.3 \pm 1.4 ^{BC}	17.7 \pm 1.5 ^B	26.3 \pm 1.8 ^A
PM (s)	65.7 \pm 14.1	51.8 \pm 11.5	52.8 \pm 11.4	84.2 \pm 11.5

Letras distintas demonstram diferença estatística nas linhas (P<0.05). tempo de motilidade (TM).

4. CONCLUSÕES

Pelo presente estudo conclui-se que a concentração de 200mM de trealose apresentou resultados superiores aos demais tratamentos na manutenção da qualidade seminal de jundiá amazônico (*L. marmoratus*), após criopreservação nos parâmetros *in vitro* analisados neste estudo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BAKÁS, L.S.; DISALVO, E.A. Effect of encapsulated Ca²⁺ on the surface properties of curved phosphatidylcholine bilayers. **Biochim Biophys Acta**, 1065: 114-120, 1991.

ESCOBAR, L. & MOJICA, H.O. Ensayos preliminares de reproducción inducida del yaque, *Leiarius marmoratus* (Gill, 1870) (Pisces: Siluriformes: Pimelodiade) en la Orinoquía colombiana. Bol. Cien. INPA, 5: 9- 26. 1997.

HOLT, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, 53, 47-58, 2000.



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

PURSEL, VG & LA JOHNSON. 1975. Freezing of boar spermatozoa: Fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. **Journal 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. **Animal Reproduction Science**, 105: 283–291.