

LIPOPROTEINA DE BAIXA DENSIDADE E TREALOSE COMO NÃO PENETRANTE CRIOPROTETORES EM EXTENSORES DE ESPERMA CONGELADO DO TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*).

PAULA MOREIRA DA SILVA¹; ANTONIO SERGIO VARELA JUNIOR²; DANILO PEDRO STREIT JUNIOR³; STELA MARI MENEGHELLO 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, escalado na região Sul americana CHELLATA 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 programas de melhoramento genético. A perpetuação da variação genética da espécie de *C. macropomum* é necessária para aqüicultura, especialmente na natureza onde as populações estão ameaçadas por barragens LOPES et al. (2009).

E a preservação do material genético das espécies de peixes pode ser feita através da criopreservação de espermatozoides SUQUET et al. (2000). MARTÍNEZ- PÁRAMO et al. (2009). O glicerol, o etileno glicol, metanol, e dimetilsulfóxido (DMSO) são crioprotetores penetrantes tradicionais incluídos nos extensores de esperma, de peixes, congelado HORVAT; URBÁNYI (2000), VIVEIROS; GODINHO (2009), embora as amidas, tais como dimetilformamida e metilformamida 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), SALAMON; MAXWELL (2000). A gema do ovo é amplamente usada como um crioprotetor, e muito da sua eficiência é atribuída ao seu teor de lipoproteína de baixa densidade (LDL), que adere a membrana do espermatozoide BERGERON et al. (2004), formando película interfacial entre os ácidos graxos e a água ANTON et al. (2003). E os diluentes incluindo a LDL estão relacionados aos efeitos positivos na motilidade do espermatozoide após o descongelamento, em muitas espécies de mamíferos MOUSSA et al. (2002) , JIANG et al.(2007), VARELA JR et al. (2009), TONIETO et al. (2010), mas ainda não havia sido testado em espermas de peixe.

Por isso o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da LDL 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 cônico 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 25° 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. Foi avaliada também a concentração espermática, com uma câmara de Neubauer.

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 LDL contido em quatro concentrações (4%, 8%, 12%, e 16%) e 10 % de DMSO. A LDL foi obtida a partir da gema de ovo de galinha.

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 ressuspenso em 400 μ L de BTS(1:3, v/v) a 22°C em um tubo cônico 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 vermelho 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 $4,7 \pm 0,2$ mL. Concentração espermática foi de $8,6 \pm 0,2 \times 10^9$ / mL, com a motilidade espermática de $96,0 \pm 2,2$ % e período de motilidade de $98,0 \pm 6,0$ s.

Diluidor incluindo 12% e 16% LDL apresentaram melhor viabilidade espermática em comparação ao controle ($P < 0,05$), mas tanto a motilidade

espermática e o período de motilidade foram reduzidos ($P < 0,05$) para estes tratamentos (Tabela 1).

Tabela 1: Motilidade pós-descongelamento, período motilidade e viabilidade para *Colossoma macropomum* esperma congelado no extensor com distintas concentrações de lipoproteína de baixa densidade (LDL) *

Diluyente	Motilidade espermatica (%)	Periodo motilidade (s)	de Viabilidade Espermatica (%)
10% DMSO	35.0 ± 2.2 ^a	19.6 ± 1.7 ^a	47.2 ± 4.3 ^b
10% DMSO + 4% LDL	11.0 ± 2.8 ^b	12.1 ± 2.7 ^{ab}	65.0 ± 4.1 ^{ab}
10% DMSO + 8% LDL	8.0 ± 2.2 ^b	11.4 ± 2.8 ^{ab}	66.7 ± 4.3 ^{ab}
10% DMSO + 12%LDL	5.0 ± 2.0 ^b	6.8 ± 2.0 ^b	79.3 ± 2.7 ^a
10% DMSO + 16%LDL	3.0 ± 1.1 ^b	4.8 ± 1.7 ^b	79.3 ± 3.3 ^a

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

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

4. CONCLUSÕES

A inclusão de 12% e 16% no LDL extensores para esperma congelado de *C. macropomum* foi associada com uma melhor viabilidade espermática pós-descongelamento e integridade e funcionalidade mitocondrial, mas também para a fertilização reduzida e taxas de eclosão.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

SUQUET, M.; DREANNO, C.; FAUVEL, C.; COSSON, J.; BILLARD, R. Cryopreservation of sperm in marine fish. **Aquaculture Research**, v.31, p.231-243, 2000.

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

VARELA Jr, A.S.; CORCINI, C.D.; GHELLER, S.M.M.; JARDIM, R.D.; LUCIA, T. Jr.; STREIT Jr, D.P.; 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.

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

BERGERON, A.; CRÊTE, M.H.; BRINDLE, Y.; MANJUNATH, P. Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major protein of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. **Biology of Reproduction**, v.70, p.708-717, 2004.

ANTON, M.; MARTINEI, V.; DALGALARRONDO, M.; BEAUMAL, V.; DAVIDBRIAND, E.; RABESONA, H. Chemical and structural characterization of low-density lipoproteins purified from hen egg yolk. **Food and Chemical Toxicology**, v.83, p.175-183, 2003.

MOUSSA, M.; MARINET, V.; TRIMECHE, A.; TAINTURIER, D.; ANTON, M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v.57, p.1695-1706, 2002.

JIANG Z, L.; LI, Q. W.; HU, J. H.; LI, W. Y.; ZHAO, H. W.; ZHANG, S. S. Improvement of the quality of boar cryopreservation semen by supplementing with low density lipoprotein in diluents. **Cryobiology**, v.54, p. 301-304, 2007.

VARELA Jr, A.S.; CORCINI, C.D.; ULGUIM, R.R.; ALVARENGA, M.V.F.; BIANCHI, I.; CORRÊA, M.N.; LUCIA, T. Jr.; DESCHAMPS, J.C. Effect of low density lipoprotein on the quality of cryopreserved dog semen. **Animal Reproduction Science**, v.115, p.323-327, 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.; LOPERA-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.728-35, 2009.

TONIETO, R.A.; GOULARTE, K.L.; GASTALI, G.D.A.; SCHIAVON, R.S.; DESCHAMPS J.C.; LUCIA, T. Jr. Cryoprotectant effect of trehalose and low-density lipoprotein in extenders for frozen ram semen. **Small Ruminant Research**, v.93, p.206-209, 2010.