

## VIABILIDADE DAS CÉLULAS ESPERMÁTICAS DE PEIXE-REI (*Odontesthes argentinensis*) APÓS EXPOSIÇÃO A DILUENTE COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CRIOPROTETORES

MONIKE QUIRINO DOS SANTOS<sup>1</sup>; JULIANA ALVES<sup>2</sup>; ESTELA FERNANDES  
SILVA<sup>2</sup>; ANTONIO SERGIO VARELA JUNIOR<sup>2</sup>; BERNARDO GARZIERA  
GASPERIN<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – monikequirino@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Rio Grande – varelaejas@hotmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – bggasperin@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

No Sul do Brasil há dez espécies do gênero *Odontesthes*, popularmente conhecido como peixe-rei, o qual é comumente encontrado em lagoas, rios e na região costeira da América do Sul (MORESCO, 2006). Este peixe constitui uma importante fonte na pesca local do Brasil, Uruguai e da Argentina (DE BUEN, 1953), sendo que a espécie *O. argentinensis* pode ser encontrada na região estuarina bem como na marinha costeira brasileira e, segundo SAMPAIO (2006), é um valioso recurso cuja cultura pode ser considerada promissora.

Devido à escassez de informações sobre o perfil reprodutivo da espécie e tendo em vista a importância como fonte de alimento, emprego e renda para diversos segmentos econômicos da região, verifica-se a necessidade de estudos que abordem a biologia reprodutiva do peixe-rei. Contudo, para que seja possível obter mais esclarecimentos, faz-se necessário estabelecer a melhor maneira de preservar as células espermáticas do peixe-rei, uma vez que os poucos estudos utilizando DMSO (Dimetilsulfóxido) como crioprotetor demonstram taxas de defeitos espermáticos de 60% após o descongelamento (GÁRRIZ e MIRANDA, 2013). Portanto, é de fundamental importância a identificação de diluentes e crioprotetores mais adequados a fim de obter melhores resultados referentes à viabilidade espermática. Neste contexto, as amidas podem representar uma alternativa viável, uma vez que foram consideradas superiores em comparação ao DMSO e glicerol na manutenção da viabilidade após criopreservação de sêmen de peixe Tambaqui (VARELA et al. 2012)

Após o estabelecimento de um protocolo adequado de congelamento, será possível avaliar o efeito da sazonalidade sobre a congelabilidade do sêmen. Portanto, o objetivo do presente estudo foi identificar o melhor diluente e a concentração de crioprotetor mais adequada para manutenção da viabilidade das células espermáticas para que, posteriormente, seja realizada a criopreservação do sêmen de peixe-rei.

### 2. METODOLOGIA

Inicialmente, foram comparados diversos diluentes comumente utilizados em mamíferos, sendo o diluente Mounib o único capaz de manter a viabilidade das células. Posteriormente, as células espermáticas provenientes de 11

peixes, coletadas a partir de leve pressão da região abdominal e aspiração utilizando pipetador com ponteira de 200 $\mu$ l, foram expostas por 30 minutos ao meio Mounib associado a diferentes crioprotetores: 10% de dimetilsulfóxido (DMSO), 2% de dimetilacetamida (DMA), 5% de DMA ou 8% de DMA. Após este período, as células espermáticas foram ativadas em água para que fossem avaliadas as variáveis taxa e tempo de motilidade.

A taxa de motilidade foi avaliada imediatamente após a ativação, sendo expressa como a porcentagem de espermatozoides móveis. Já o tempo de motilidade foi determinado contando-se o tempo entre a ativação até o momento em que a taxa de motilidade foi inferior a 10%. Para ambas as variáveis, a leitura foi feita em microscópio óptico de contraste de fases (400x) e as médias dos grupos foram comparadas por meio do teste estatístico de Tukey considerando um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ). Os resultados foram tabulados, demonstrando as médias, os valores mínimos e máximos bem como o desvio padrão.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A comparação entre diferentes diluentes justifica-se para identificar qual associação é capaz de manter as estruturas das células espermáticas durante o período de redução de temperatura, haja vista que os componentes presentes nos diluentes são necessários para assegurar: pH, força iônica e pressão osmótica do sêmen (CHAO, 1991). A exposição ao diluente com diferentes concentrações de crioprotetores tem como principal objetivo determinar qual associação é menos danosa para a estrutura celular, uma vez que a maioria dos crioprotetores utilizados é tóxica e altera significativamente a osmolaridade dos meios.

Como pode ser observado na tabela 1, o grupo Mounib apresentou a menor taxa de motilidade, bem como o menor tempo de motilidade quando comparado aos grupos Mounib + 10% DMSO e Mounib + DMA 2%, que expressaram as maiores taxas (11,8  $\pm$  7,2 e 11%  $\pm$  9,2, respectivamente) e os maiores tempos de motilidade (81,4  $\pm$  49,1 e 72,6  $\pm$  52,3 segundos, respectivamente). Os maiores valores obtidos nos grupos contendo crioprotetores podem ser decorrentes da maior osmolaridade dos meios, embora esta hipótese ainda não tenha sido avaliada.

**Tabela 1:** Média  $\pm$  DP (Desvio Padrão) das variáveis tempo de motilidade e taxa de motilidade espermática para diferentes concentrações de DMSO e DMA no diluente em sêmen de peixe-rei (*O. argentinensis*).

Tratamento	Tempo (s)			Taxa (%)		
	Média $\pm$ DP	Máximo	Mínimo	Média $\pm$ DP	Máximo	Mínimo
Mounib	5,4 $\pm$ 18,0 B	60,0	0,0	0,4 $\pm$ 1,5 B	5,0	0,0
Mounib + 10% DMSO	81,4 $\pm$ 49,1 A	167,0	0,0	11,8 $\pm$ 7,2 A	20,0	0,0
Mounib + DMA 2%	72,6 $\pm$ 52,3 A	147,0	0,0	11,0 $\pm$ 9,2 A	30,0	0,0
Mounib + DMA 5%	38,0 $\pm$ 48,0 AB	138,0	0,0	5,9 $\pm$ 8 AB	20,0	0,0
Mounib + DMA 8%	34,4 $\pm$ 48,2 AB	110,0	0,0	3,6 $\pm$ 5,5 AB	15,0	0,0

Valores seguidos de letras diferentes na mesma coluna demonstram diferença significativa, ao nível de 0,05% de significância, para o teste de Tukey.

Os grupos Mounib + DMA 5% e Mounib + DMA 8% não apresentaram diferença estatística em comparação aos demais grupos, sendo obtidos valores intermediários de motilidade e taxa de motilidade ( $38,0 \pm 48,0s$  vs.  $34,4 \pm 48,2s$  e  $5,9 \pm 8$  vs.  $3,6 \pm 5,5$ , respectivamente). Apesar de não haver diferença significativa, os dados sugerem que a DMA nas concentrações de 5 e 8% pode apresentar um efeito tóxico para as células espermáticas.

Embora os resultados obtidos estejam aquém do desejado, sugere-se que a utilização de DMA a 2% pode vir a ser utilizada como uma alternativa ao uso de DMSO a 10%. Cabe ressaltar que são poucos os estudos relativos ao congelamento do peixe-rei, sendo que o sêmen destes peixes parece ser bastante sensível ao congelamento (GÁRRIZ e MIRANDA, 2013). Tanto DMSO como DMA são capazes de retirar água da célula, diminuindo, assim, a temperatura de congelamento em seu interior almejando impedir a formação de cristais de gelo em nível intracelular (CAROLSFELD et al., 2003), que podem levar ao dano estrutural e até mesmo à morte da célula. Entretanto, os diferentes crioprotetores podem diferir quanto à toxicidade e eficiência durante o congelamento, sendo que as amidas podem ser menos deletérias por apresentarem baixo peso molecular e alta permeabilidade celular, o que pode minimizar a chance de lesão de membrana celular (BALL & VO 2001).

Deste modo, os resultados revelaram duas associações/concentrações de crioprotetores, dentre as utilizadas na metodologia, que poderão oferecer menor dano celular com base na superioridade de valores das variáveis taxa de motilidade e tempo de motilidade. Porém, é imprescindível que se avaliem outros crioprotetores em diferentes concentrações para obter efetiva proteção celular durante o congelamento e que, concomitantemente, ofereçam baixa toxicidade ao sistema celular.

#### 4. CONCLUSÕES

No presente estudo, as associações do diluente Mounib com 10% de DMSO bem como com DMA a 2% apresentaram os maiores resultados para as variáveis taxa de motilidade e tempo de motilidade espermática. Os resultados obtidos sugerem que estas duas associações poderão possibilitar uma proteção celular concomitante à baixa toxicidade ao sistema da célula durante a criopreservação de sêmen de peixe-rei.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALL B. A.; VO, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability, and mitochondrial membrane potential. **Journal of Andrology**, v. 22, p.1061–1069, 2001.

CAROLSFELD, J. et al. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. **Journal of Fish Biology**, London, v. 63, p. 472 - 489, 2003.

CHAO, N. H. Fish sperm cryopreservation in Taiwan: technology advancement and extension efforts. In: **International symposium on reproductive biology in aquaculture**, Taiwan, 1991. Department of Aquiculture, Taiwan Fishery Research Institute, 1991, p. 31.

DE BUEN, F. Los Pejerreyes em la fauna uruguaya, com descrição de nuevas espécies. **Boletim do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 4, p. 3 - 80, 1953.

GÁRRIZ, A.; MIRANDA, L.A. Ultrastructure of fresh and post thawed sperm of pejerrey *Odontesthes bonariensis* (Atheriniformes). **Neotropical Ichthyology**, v. 11(4), p. 831-836, 2013.

MORESCO, A; BENVENUTI, M. A. Biologia reprodutiva do peixe-rei *Odontesthes argentinensis* da região marinha costeira do Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v. 23, n. 4, p. 1168 - 1174, 2006.

SAMPAIO, L. A. Production of “pejerrey” *Odontesthes argentinensis* fingerlings: A review of current techniques. **Biocell**, Mendoza, v. 30, n. 1, p.121 - 123, 2006.

VARELA, A. S., et al. Use of amides as cryoprotectants in extenders for frozen sperm of tambaqui, *Colossoma macropomum*. **Theriogenology**, v. 78, p. 244-251, 2012.