

CRIOPRESERVAÇÃO SEMINAL DO BAGRE (*Rhamdia quelen*).

CAROLINA VIÉGAS PINTO¹; IZANI ACOSTA BONEL ²; CARINE DAHL CORCINI³; ANTÔNIO SÉRGIO VARELA JUNIOR ⁴.

¹Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) 1 – carolinaviehas18@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) – izanibonel@hotmail.com

³ Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) – corcincid@gmail.com

⁴Universidade Federal de Rio Grande (FURG)–varelajras@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O jundiá (*Rhamdia quelen*) é um bagre amplamente distribuído pela América do Sul BALDISSEROTTO et al. (2020). E na piscicultura geralmente, apresentam alto potencial de consumo, sendo representativos na produção pesqueira de águas interiores em algumas regiões, devido a seu rendimento e qualidade da carne (REID, 1983). Desta forma se tornando um dos bagres com grande potencial para aquicultura (VALLADÃO et al., 2018). No Brasil, a produção total de pescado chega a cerca de 1,6 milhões de toneladas por ano, e a aquicultura responde por cerca de 50% disso (FAO, 2022.) Porém para um melhor aproveitamento desta espécie na piscicultura, são necessários mais estudos, pois são poucos as pesquisas com a espécie na área, principalmente no que diz respeito à inseminação artificial e a máxima utilização dos gametas disponíveis e a qualidade e viabilidade destes para uma maior satisfação dos produtores destes animais (BOMBARDELLI et al., 2006). Por isso, o desenvolvimento de técnicas aplicadas à reprodução vem assumindo papel relevante na aquicultura e na conservação de recursos genéticos (MURGAS et al., 2004).

Uma questão importante na reprodução é a criopreservação, que é caracterizada como a preservação da viabilidade do material biológico em temperaturas extremamente baixas, abaixo de -80°C ou de -140°C (BAUST et al, 2009). O congelamento de sêmen de peixes foi obtido com sucesso pela primeira vez nos anos 50 (BLAXTER, 1953), sendo usada até os dias de hoje, de forma viável para muitas espécies de peixes. Para realizar o congelamento, utiliza-se do recurso dos crioprotetores, a fim de evitar ao máximo danos a célula espermática. Os crioprotetores são solventes orgânicos que agem protegendo as células e tecidos no momento de queda abrupta de temperatura (CHIAN et al., 2004). E existem dois principais tipos de crioprotetores: Extracelular e intracelular. O intracelular, é uma substância química não tóxica para os gametas que simplesmente retira a água da célula e diminui a temperatura na qual o interior da célula é congelado, impedindo a formação de cristais de gelo. (CAROLSFELD; HARVEY, 1999). O objetivo deste trabalho é avaliar os efeitos de diferentes crioprotetores intracelulares na criopreservação seminal do Jundiá (*Rhamdia quelen*).

2. METODOLOGIA

Os animais foram obtidos em uma propriedade particular, localizada na zona rural no município de Pelotas, e levados para o laboratório de ictiologia da Universidade Federal de Pelotas. Onde os animais foram aclimatados e as coletas foram realizadas durante a estação reprodutiva. A coleta de sêmen foi realizada

através de massagem abdominal, evitando a contaminação por fezes e /ou urina GODINHO et al. (2003). NO qual foram coletados somente ejaculados que apresentaram, pelo menos, 80% de motilidade espermática e 90% de espermatozóides com morfologia normal. Amostras contaminadas por urina, fezes e que apresentassem motilidade antes da ativação foram descartadas. Nos dias de realização dos experimentos as amostras após coletadas, eram levadas para o laboratório de Andrologia da mesma Universidade.

Para esse experimento foram utilizados crioprotetores intracelulares, mais precisamente do grupo dos alcóois 3 tipos: DMSO (Dimetilsulfóxido), Metilglicol, Glicerol. No qual cada álcool foi diluído em BTS, para formar a solução crioprotetora, as concentrações utilizadas: concentração 1: 5%; concentração 2: 7,5 %; Concentração 3 :10 %; Concentração 4: 12,5 %, concentração 5: 15 %. Logo as amostras foram envasadas palhetas de 250 µl para cada tratamento e concentração, sempre em duplicata. As palhetas foram previamente identificadas com o número do macho, tratamento e concentração, importante ressaltar que foram pintadas com cores diferentes para uma melhor diferenciação. Após, foram colocadas em contato com o vapor do nitrogênio líquido, para realizar a curva de congelamento, e depois postas em contato direto com o nitrogênio, a seguir colocadas em racks e levadas ao botijão. Após algum tempo as amostras passaram pelo processo de descongelamento, na qual as palhetas eram retiradas do botijão de nitrogênio identificadas e levadas ao banho maria, na temperatura de 25 graus, por 30 segundos (ADAMS et al., 2015). Após as amostras eram retiradas e transferidas para eppendorfs, e novamente diluídas a solução em Beltsville Thawing Solution (BTS). Foram realizadas dois principais tipos de análises motilidade e citometria. As análises de motilidade foram realizadas no equipamento Sperm Vision que é um sistema computadorizado de avaliação seminal, para análise automática de motilidade e concentração de espermatozóides. Os parâmetros espermáticos analisados foram: motilidade total (MT); motilidade progressiva (MP); motilidade progressiva; distância média do traçado (DAP); distância em linha curva (DCL) e em linha reta (DSL); velocidade média do traçado (VAP); velocidade curvilínea (VCL), velocidade média do caminho (VAP), velocidade em linha reta (VSL), retidão do caminho espermático (STR), oscilação (WOB) e frequência cruzada de batimento (BCF). As amostras foram ativadas com água a e realizadas em até 30 segundos após á ativação.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de motilidade espermática pós-descongelamento encontram-se na Tabela.1, os mesmos são uma análise estatística dos dados referentes apenas um dos crioprotetores utilizados neste estudo o glicerol, sendo desta forma uma análise parcial dos dados.

Tabela 1. Motilidade pós-descongelamento das células espermáticas do *Rhamdia quelen*, utilizando o crioprotetor glicerol.

GLI	C1	C2	C3	C4	C5
Mot tot	26,9±2,33 ^A	28,0± 3,04 ^A	23,5±2,52 ^A	24,0±2,64 ^A	19,1±2,20 ^A
Mot prog	22,9± 2,27 ^A	21,2±2,64 ^A	19,2±2,40 ^A	18,5±2,27 ^A	14,7±2,24 ^A
DAP	13,7±0,62 ^A	13,8±0,93 ^A	14,0±0,53 ^A	12,7±0,53 ^A	12,9±0,65 ^A
DCL	15,4±0,67 ^A	16,5±0,96 ^A	16,4±0,57 ^A	15,9±0,64 ^A	15,9±0,82 ^A
DSL	12,1±0,61 ^A	11,8±0,90 ^A	12,0±0,54 ^A	10,7±0,45 ^A	10,7±0,63 ^A
VAP	29,6± 1,34 ^A	30,5±2,06 ^A	31,1±1,17 ^A	27,4±1,13 ^A	28,9±1,44 ^A
VCL	33,2± 1,45 ^A	36,4±2,16 ^A	36,4±1,29 ^A	34,5±1,41 ^A	35,8±2,01 ^A
VSL	26,1±1,32 ^A	26,1±2,00 ^A	26,7±1,17 ^A	23,1±0,96 ^A	23,8±1,34 ^A
STR	0,86±6,89 ^A	0,8±0,01 ^{AB}	0,8±8,57 ^A	0,8±0,01 ^{AB}	0,7±0,02 ^B
WOB	0,8±8,44 ^A	0,8±0,01 ^A	0,8±0,01 ^A	0,7±0,02 ^A	0,7±0,03 ^A
ALH	0,9±0,05	1,2±0,07 ^A	1,4±0,1 ^A	1,0±0,08 ^A	1,4±0,10 ^A
BCF	22,1±0,63 ^A	22,1±0,82 ^A	25,3±1,10 ^A	22,3±0,92 ^A	24,7±1,40 ^A

motilidade total (MT); motilidade progressiva (MP); motilidade progressiva; distância média do traçado (DAP); distância em linha curva (DCL) e em linha reta (DSL); velocidade média do traçado (VAP); velocidade curvilínea (VCL), velocidade média do caminho (VAP), velocidade em linha reta (VSL), retidão do caminho espermático (STR), oscilação (WOB) e frequência cruzada de batimento (BCF), glicerol (GLI), concentração 1 (c1), concentração 2 (c2), concentração 3 (c3), concentração 4 (c4), concentração 5 (c5).

Os parâmetros mais comumente utilizados para avaliação espermática referentes a motilidade, são a motilidade total e progressiva. Os dados avaliados para motilidade total apresentaram uma pequena diferença estatística, sendo imperceptível para o teste de Tukey, o qual os dados foram submetidos.

Em relação à motilidade total, vale destacar a superioridade nas concentrações 4 e 1% de glicerol. Considerando a análise da motilidade progressiva também apresentada na tabela 1, houve uma diferença sutil entre as concentrações, a concentração 1 de 5% foi superior, sendo a segunda de 7,5%, apresentou valores melhores, em relação as demais concentrações. Esses fatos indicam que os melhores resultados, dentre as possibilidades testadas, quanto à motilidade total e progressiva, estão nas menores concentrações de glicerol.

Porém como os dados mostram para todos demais parâmetros analisados, que se encontram na tabela á cima, revelando uma diferença estatística praticamente irrelevante, salvo o parâmetro de análise de retidão do caminho espermático (STR). Fica claro que o crioprotetor glicerol não é o mais indicado para á espécie, outros crioprotetores podem gerar efeitos mais desejáveis, como por exemplo o crioprotetor Dimetilsulfóxido (DMSO), e o metanol. Corso (2014) conseguiu bons resultados de motilidade em R. quelen usando Beltsville Thawing Solution (BTS) como diluidor e metanol como crioprotetor, na proporção de 1:3 (sêmen: diluente). Já Araújo et al. (2011) recomendam o uso do crioprotetor DMSO com diluente BTS para *Steindachneridion parahybae* pois este proporciona altos rendimentos na qualidade do esperma após o descongelamento.

4. CONCLUSÕES

Conclui-se que o glicerol não é o melhor crioprotetor para a espécie jundiá (*Rhamdia quelen*), sendo que outros crioprotetores como por exemplo o Dimetilsulfóxido (DMSO), e o metanol, podem ser mais benéficos para o processo de criopreservação das células espermáticas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, G. O. et al. Bioremediation, Biostimulation and Bioaugmentation: A Review. **International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation**, v. 3, n. 1, p. 28-39, 2015.
- ARAÚJO, Rafael Venâncio de. Fertility, **velocities and motility of Surubim-do-paraíba Steindachneridion parahybae (Siluriformes) sperm cryopreserved in lactose and lactose-free media**. In: **Motilidade, velocidade e fertilidade do sêmen de surubimdo-paraíba Steindachneridion parahybae (Siluriformes) criopreservado em diferentes diluidores**. 2011. 93p., p. 67-93. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- BALDISSEROTO, B., et al. Biology and Physiology on Freshwater Neotropical Fish. **Elsevier**. 344p. 2020.
- BOMBARDELLI Robie Allan et al. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimardm, 1824). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.4, p.1251-1257, 2006.
- BAUST, J. G. The management of mammalian cells at low temperature. **Cell Preservation Technology**, New Rochelle, v. 6, p. 111-112, 2009.
- BLAXTER, J. H. S. Sperm storage and cross-fertilization of spring and autumn spawning herring. *Nature*, London, v. 172, p. 1189-1190, 1953.
- CAROLSFELD, D. J.; HARVEY, B. Conservação de recursos genéticos de peixes: teoria e prática. Tradução de H. P. Godinho. Victoria, Canadá: Worl Fishe Trust. Curso de treinamento brasileiro. 47 p, 1999.
- CHIAN, R.C.; KUWAYAMA, M.; TAN, L.; TAN, J.; KATO, O.; NAGAI, T. High survival rate of bovine oocytes matured in vitro following vitrify cation. **The Journal of Reproduction and Development**, Tokyo, v. 50, n. 6, p. 6696, 2004.
- CORSO, Maira Nesello. **Cortisol plasmático e qualidade seminal de Rhamdia quelen após uso de diferentes concentrações do anestésico eugenol**. 2014. 54f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2014.
- FAO. FAO publications catalogue [Online] 2022: Available at: <https://www.fao.org/3/cb2429en/online/cb2429en.html> Accessed: 30.set .2024.
- MURGAS L.DS, Miliorini AB, Franciscatto RT, Maria AN. Viabilidade espermática do sêmen de Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) resfriado a 4°C. **Rev Bras Zootec**, v.33, n.6, p.1361-1365, 200.
- REID. S, L. La biologia do los bagres rayados *Pseudoplatystoma fasciatum* Y *Pseudoplatystoma tigrinus* em la cuenca del rio Apure, Venezuela. *Unellez de Ciencia y Tecnologia*, Barinas, v 1, p. 13-41, 1983.
- VALLADÃO, ~ GMR, Gallani, SU, Pilarski, F., 2018. Peixes sul-americanos para aquicultura continental. **Rev. Aquac**. 10, 351–369.