

Protocolo para Criopreservação do Sêmen de Tambaqui (*Colossoma macropomum*)

Alexandre Nizio Maria¹
Hymerson Costa Azevedo²
Paulo César Falanghe Carneiro³

Paulo César Falanghe Carneiro



O tambaqui *Colossoma macropomum* é um peixe cultivado em vários países da América do Sul como Brasil, Peru, Bolívia e Colômbia. Sob condições naturais realiza migração reprodutiva durante a estação chuvosa, entre novembro e fevereiro (VIEIRA et al., 1999), período em que ocorrem profundas mudanças em seus níveis hormonais circulantes. O tambaqui, como outras espécies migradoras, quando mantido em cativeiro, não apresenta resposta adequada do sistema endócrino, pois alguns estímulos ambientais não estão presentes, resultando em reduzido volume de sêmen e baixa qualidade espermática (VALDEBENITO, 2008). Os reprodutores, quando mantidos em cativeiro, dependem da aplicação de hormônios para induzir a espermiacção e desova, e com isso completar seu ciclo reprodutivo em condições artificiais controladas.

No Brasil, estudos sobre a propagação artificial do tambaqui vêm ocorrendo desde meados da década de 70, porém somente nos últimos anos que se iniciaram os primeiros esforços para conservação do sêmen e melhoramento genético da espécie. Com a constante ameaça de perda da diversidade genética das populações de peixes nativos, devido a problemas como destruição de matas ciliares, pesca predatória, construção de barragens

hidroelétricas e poluição dos ecossistemas aquáticos, torna-se importante o estabelecimento de programas que visem o armazenamento de gametas em longo prazo. A criação e organização de bancos de germoplasma do tambaqui serão úteis tanto no suporte a programas de recuperação de populações naturais ameaçadas quanto no auxílio ao melhoramento genético. A conservação dos recursos genéticos animais existentes na natureza é fundamental para a preservação da base genética, especialmente quando se pensa na existência de genes e combinações genéticas únicas que podem ser úteis no futuro (VILLELA et al., 2009).

A criopreservação é uma técnica que visa à conservação de material biológico em nitrogênio líquido (N₂L) a -196°C. Nesta temperatura a estrutura e funcionalidade das células e tecidos vivos são mantidas, conservando-as geneticamente viáveis e reversivelmente inativas do ponto de vista metabólico (PEGG, 2007). Esta técnica apresenta diversas vantagens como: conservação de material genético de animais selvagens oriundos de locais distantes e de difícil acesso; eliminação do problema causado pela assincronia na maturidade gonadal entre machos e fêmeas; utilização de gametas de animais selecionados em programas de melhoramento

¹ Zootecnista, Doutor em Zootecnia, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, niziomaria@cpatc.embrapa.br.

² Médico-veterinário, Doutor em Reprodução Animal, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, hymerson@cpatc.embrapa.br.

³ Engenheiro-agrônomo, Doutor em Zootecnia, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, paulo@cpatc.embrapa.br.

ou manipulados geneticamente (triplóides, clones e transgênicos); diminuição de custos e riscos de transporte de animais vivos, e estabelecimento de programas de hibridização utilizando peixes com períodos reprodutivos diferentes (VIVEIROS, 2005; MARIA et al., 2009).

O desenvolvimento de protocolos de criopreservação de sêmen do tambaqui e conseqüentemente seu uso, depende da padronização de métodos mais adequados de coleta e diluição, determinação de diluidores e crioprotetores mais eficazes e, definição do tempo de equilíbrio e taxas de resfriamento e descongelamento específicas. O uso de protocolos de criopreservação desenvolvidos para outras espécies, não garante o sucesso e a replicação dos resultados para o tambaqui. Assim, o objetivo desta publicação é descrever um protocolo adequado para criopreservação do sêmen desta espécie, a partir de estudos realizados pelos pesquisadores do Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal da Embrapa Tabuleiros Costeiros (LABRA).

Manejo dos peixes, indução hormonal, coleta e armazenamento do sêmen

a) Durante o período reprodutivo, machos adultos (4-8 kg) devem ser selecionados pela observação da liberação de pequena quantidade de sêmen após massagem abdominal. Os machos desta espécie criados no nordeste do Brasil podem produzir sêmen durante quase o ano todo, de novembro a junho (SILVA; PINHEIRO, 1989). Nas regiões norte e sudeste o período reprodutivo do tambaqui corresponde ao dos peixes de piracema da região, isto é, de novembro a fevereiro (FERRARI et al., 1999; VIEIRA et al., 1999).

b) Os peixes selecionados devem ser submetidos à indução hormonal (Figuras 1, 2, 3 e 4) por meio de injeção intramuscular de duas doses de extrato de hipófise de carpa comum - EHC (0,25 mg e 2,5 mg por kg de peso, aplicados em intervalo de 8 horas) (MARIA et al., 2011).

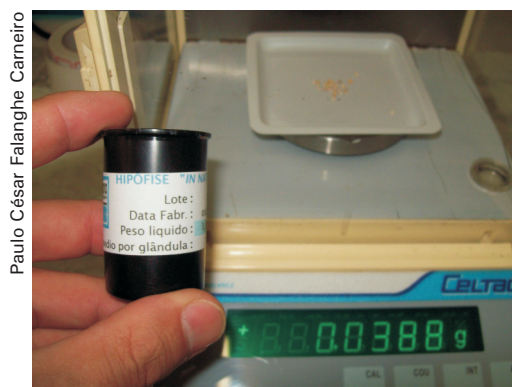


Figura 1. Pesagem da hipófise.



Figura 2. Maceração.



Figura 3. Adição de solução fisiológica.



Figura 4. Aplicação do extrato de hipófise.

Para realização deste procedimento os peixes devem ser contidos no próprio tanque com auxílio de um puçá. Quando os animais são mantidos em água com temperatura entre 26 e 28°C o melhor momento para a coleta do sêmen é entre 10 e 12 horas após a segunda aplicação do EHC.

c) No momento favorável à espermiacção induzida, retirar o reprodutor da água e cobrir seus olhos com toalha úmida para mantê-lo quieto. No caso de animais de grande porte, primeiramente anestesiá-los, para reduzir o estresse do manejo. Para este procedimento o reprodutor deve ser transferido para caixas d'água contendo eugenol na dosagem de 65 mg por litro de água (ROUBACH et al., 2005) (Figura 5).



Paulo César Falanghe Carneiro

Figura 5. Anestesia antes da coleta de sêmen.

d) Para a coleta do sêmen, retirar o macho da água e colocá-lo deitado sobre uma superfície plana e macia. A região abdominal deve ser seca com papel toalha pois não pode haver contato da água com o sêmen, fato que ativaria a motilidade dos espermatozóides e invalidaria sua criopreservação. A coleta pode ser feita por duas pessoas. A primeira mantém o animal imóvel com o auxílio de uma toalha seca, enquanto a outra pessoa massageia o abdome no sentido crânio-caudal com uma das mãos e com a outra coleta o sêmen em tubos de vidro ou seringas (Figura 6).



Paulo César Falanghe Carneiro

Figura 6. Massagem abdominal para coleta de sêmen. Como o volume de sêmen é relativamente grande 7 a 13 mL; (MARIA et al., 2010) a coleta pode ser feita em três ou quatro recipientes para evitar contaminação da amostra com urina ou fezes. Se isso ocorrer, a alíquota

deve ser descartada. Os tubos ou seringas com o sêmen devem ser colocados em uma caixa de isopor com gelo, evitando sempre o contato direto com o mesmo (Figuras 7 e 8).



Alexandre Nizio Maria

Figura 7. Tubo com sêmen.



Alexandre Nizio Maria

Figura 8. Armazenamento de amostras de sêmen em caixa de isopor com gelo.

e) Após a coleta, os reprodutores devem retornar a um tanque com renovação de água constante para recuperação da sua condição normal.

Avaliação do sêmen antes do congelamento

a) A qualidade seminal pode ser avaliada em microscópio óptico, no aumento de 400x, por meio da mensuração da motilidade e viabilidade espermática (Figura 9).

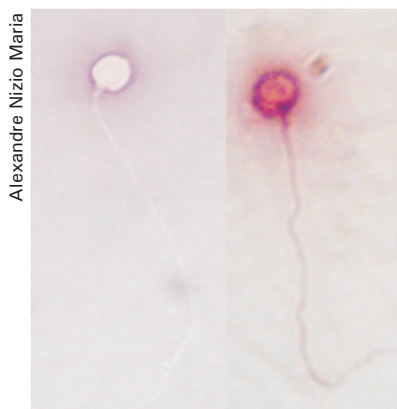


Alexandre Nizio Maria

Figura 9. Avaliação da motilidade e viabilidade espermática através de microscópio óptico.

Para determinação da motilidade, proceder da seguinte forma: colocar uma gota de sêmen em uma lâmina de vidro para comprovar que os espermatozoides estão imóveis. Qualquer movimento sugere contaminação com água, sangue ou urina e a amostra deve ser descartada. Ativar o movimento espermático adicionando solução de bicarbonato 125 mM (1,05%) ao sêmen e avaliar a motilidade de forma subjetiva. A motilidade pode ser medida de forma subjetiva anotando-se o percentual de espermatozoides em movimento logo após a ativação (0 a 100%). Somente amostras de sêmen com pelo menos 70% das células em movimento devem ser utilizadas para criopreservação.

b) A avaliação da viabilidade espermática é realizada com o auxílio de corante a base de eosina-nigrosina, que diferencia células viáveis e não viáveis. Uma gota de sêmen e duas gotas do corante devem ser depositadas em uma lâmina de vidro e misturadas. Posteriormente, fazer um esfregaço na lâmina tomando-se o cuidado de completar toda a operação no máximo em um minuto. A contagem dos espermatozoides é realizada em microscópio óptico, em objetiva de imersão (aumento de 1000x). Os espermatozoides não viáveis coram de vermelho-róseo, enquanto os viáveis permanecem não corados (Figura 10).



Alexandre Nizio Maria

Figura 10. Célula viável à esquerda e não viável à direita, observadas em aumento de 1000x.

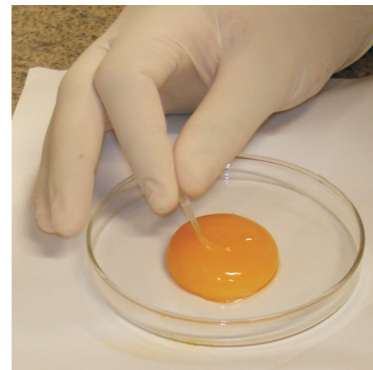
Devem ser contadas cerca de trezentas células para o cálculo da percentagem de espermatozoides vivos, não corados. Somente amostras de sêmen com pelo menos 70% de células vivas, ou viáveis, devem ser utilizadas na criopreservação.

Procedimentos para congelamento e descongelamento do sêmen

a) O congelamento do sêmen de tambaqui deve ser feito em botijão de vapor de nitrogênio, conhecido como dry shipper, que deve ser preparado da seguinte forma: i) adicionar N_2L lentamente no botijão; ii) parar de encher

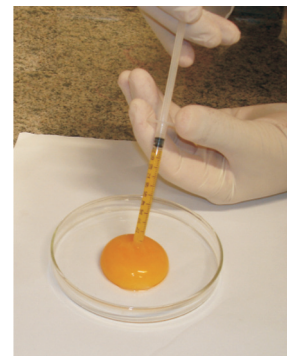
quando o nível atingir o pescoço do botijão; iii) repetir o procedimento até que o nível não diminua mais. O material esponjoso existente na parede do botijão absorve e conserva o N_2L , liberando apenas o vapor para a parte central onde ficarão armazenadas as doses dentro de uma caneca; iv) manter o botijão cheio por 24 horas para a máxima absorção de N_2L e; v) passado este período, retirar todo o excesso de N_2L emborcando o botijão.

b) No dia do processamento do sêmen, a solução de congelamento deve ser previamente preparada. Em um recipiente seco e estéril acrescentar solução glicosada (75%), metilglicol (10%) e gema de ovo (5%) (Figuras 11, 12 e 13).



Alexandre Nizio Maria

Figura 11. Abertura da membrana vitelínica para coleta da gema do ovo.



Alexandre Nizio Maria

Figura 12. Coleta da gema de ovo.



Alexandre Nizio Maria

Figura 13. Adição dos componentes da solução de congelamento.

Misturar a solução por meio de agitação até que fique homogênea (Figura 14).



Alexandre Nizio Maria

Figura 14. Agitação da solução de congelamento.

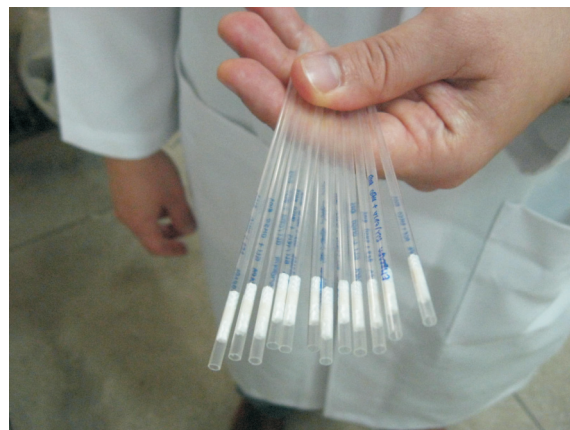
Em seguida acrescentar o sêmen (10%) e misturar delicadamente (Figura 15). A proporção final é 7,5 partes de solução glicosada, 1 parte de metilglicol, 0,5 partes de gema de ovo e uma parte de sêmen. Após a adição do sêmen à solução de congelamento, realizar o envase e congelamento em até 20 minutos. Todos os meios devem estar no isopor com gelo na mesma temperatura do sêmen.



Alexandre Nizio Maria

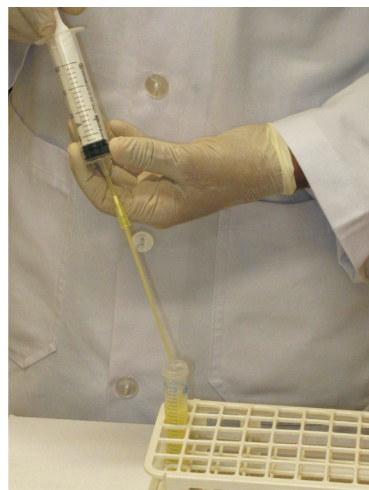
Figura 15. Adição do sêmen a solução diluidora.

c) Aspirar o sêmen diluído para as palhetas de 0,5 mL, fechá-las com esferas metálicas ou plásticas, álcool polivinílico ou com seladores térmicos, colocá-las em raques e inseri-las no botijão de vapor de N₂L (Figuras 16, 17 e 18).



Alexandre Nizio Maria

Figura 16. Palhetas de 0,5 mL.



Alexandre Nizio Maria

Figura 17. Envase do sêmen nas palhetas.



Alexandre Nizio Maria

Figura 18. Congelamentos das palhetas nas raques dentro botijão de vapor de N₂L.

d) Após 20-24 horas transferir todas as raques contendo as palhetas com sêmen para o botijão de armazenamento contendo N₂L. Para realizar a operação de transferência das raques de forma rápida e segura devem-se colocar os botijões um ao lado do outro (Figura 19).



Figura 19. Transferência das raques para o botijão de N_2L .

Uma pessoa levanta a caneca do dry shipper apenas o suficiente para apanhar a raque a ser transferida, abaixando-a imediatamente até o fundo do botijão logo após o procedimento. Enquanto isso, uma segunda pessoa levanta a caneca do outro botijão, de armazenamento, o suficiente para introduzir a raque que deverá ser imersa imediatamente no N_2L . Esta operação deve ser efetuada com rapidez, evitando que o sêmen congelado seja exposto à temperatura ambiente por mais de 10 segundos.

e) Para o uso do sêmen criopreservado, descongelar no máximo cinco palhetas simultaneamente. As palhetas retiradas do botijão devem ser mergulhadas imediatamente em água a $60^\circ C$ por oito segundos (Figura 20).



Figura 20. Descongelamento das doses de sêmen.

Após este período, enxugá-las com papel toalha e cortar uma das extremidades com tesoura para que o sêmen escoe livremente (Figura 21).



Figura 21. Corte de uma das extremidades da palheta para retirada do sêmen.

Armazenar o sêmen descongelado em recipiente seco usando-o o mais rápido possível para garantir sua viabilidade.

Obs: As canecas com as raques não devem ser levantadas a uma altura superior a do gargalo do botijão, devendo permanecer nesta posição no menor tempo e número de vezes possíveis. Se for necessário tempo adicional, deve-se descer a caneca durante pelo menos 15 segundos para que volte à temperatura do N_2L .

f) A qualidade do sêmen descongelado deve ser testada da mesma forma que foi feita antes do congelamento, sendo considerada uma amostra de boa qualidade aquela que tiver motilidade e viabilidade superior a 50%.

Materiais

Os materiais necessários para realização deste protocolo e sua função estão descritos detalhadamente na Tabela 1.

Tabela 1. Procedimentos e materiais necessários para indução hormonal, coleta e criopreservação do sêmen de tambaqui.

Procedimento	Item	Função
Indução hormonal	Hipófise de carpa	Promover a hidratação testicular facilitando a coleta do sêmen
	Cadinho e pistilo	Maceração da hipófise para preparo do extrato
	Solução fisiológica 0,9%	Veículo para preparação do extrato de hipófise de carpa (EHC)
	Seringa de 5 mL com agulha	Aplicação do EHC
Coleta e armazenamento do sêmen	Puçá	Auxiliar na captura do peixe
	Eugenol (óleo de cravo)	Anestesiando os peixes
	Papel toalha	Secar as nadadeiras antes da coleta de sêmen
	Tubos de vidro ou seringas	Recipientes para coleta de sêmen
Avaliação do sêmen	Caixa de isopor com gelo	Manter o sêmen refrigerado durante a manipulação
	Solução de eosina-nigrosina (eosina 5%; nigrosina 10%)	Corar os espermatozoides para avaliação da viabilidade espermática
	Bicarbonato 1,05% (105g de bicarbonato por litro de água)	Ativar a motilidade espermática
Congelamento do sêmen	Microscópio e lâminas	Avaliar a motilidade e viabilidade espermática
	Solução glicosada a 5% estéril (Glicose 5%)	Componentes para formulação da solução diluidora do sêmen
	Gema de ovo	
	Metilglicol (Éter metílico do etilenoglicol)	Materiais utilizados na preparação das soluções de congelamento
	Tubos de vidro, béquer e proveta	
	Palhetas de 0,5 mL	Acondicionar o sêmen diluído
	Esferas metálicas ou plásticas, álcool polivinílico ou seladores térmicos	Vedar as palhetas
	Raques	Armazenar as palhetas com sêmen
	Nitrogênio líquido (N ₂ L)	Abastecer o botijão de vapor de N ₂ L (dry shipper) e o botijão de armazenamento
	Botijão de vapor de N ₂ L, dry shipper	Congelar as doses de sêmen
Descongelamento do sêmen	Botijão de armazenamento	Armazenar as doses de sêmen congeladas
	Pinça	Retirar as doses de sêmen dos botijões
	Banho Maria com água a 60°C	Descongelar as palhetas
	Papel toalha	Secar as palhetas
	Tesoura ou cortador de palhetas	Cortar as extremidades das palhetas para retirada do sêmen
	Recipiente de vidro ou plástico	Depositar o sêmen descongelado

Considerações finais

A padronização e refinamento das técnicas de criopreservação serão fundamentais quando o sêmen de animais melhorados geneticamente estiver disponível para utilização na piscicultura. Com o devido planejamento, as instituições de pesquisa nacionais podem, em alguns anos, estar prontas para fornecer ao setor produtivo, a tecnologia necessária para estimular o surgimento de um novo segmento do agronegócio no Brasil, representado por empresas privadas voltadas à comercialização de sêmen de peixes de alto desempenho zootécnico. Além disso, estas tecnologias poderão ser cada vez

mais utilizadas como ferramentas na conservação da diversidade genética de peixes. O tambaqui é uma espécie nativa criada comercialmente em vários estados brasileiros e que participa atualmente de um programa de melhoramento genético em nível nacional. Informações sobre os procedimentos mais adequados e padronizados de manipulação do sêmen desta espécie certamente contribuirá para o avanço tecnológico de sua produção em cativeiro.

Referências

- FERRARI, V. A.; LUCAS, A. F. B.; RAMOS, R. O. et al. Sobrevivência e maturação gonadal do tambaqui *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818, em ambiente protegidos (estufa). **Boletim Técnico do CEPTA**, Pirassununga, v. 12, p. 1-11, 1999.
- MARIA, A. N.; AZEVEDO, H. C.; CARNEIRO, P. C. F. Criopreservação de sêmen de peixes no contexto do agronegócio da piscicultura. In: TAVARES-DIAS, M. (Org.). **Manejo e sanidade de peixes em cultivo**. Amapá: Embrapa Amapá, 2009. v. 1, p. 47- 63.
- MARIA, A. N.; AZEVEDO, H. C.; SANTOS, J. P. et al. Hormonal induction and semen characteristics of tambaqui *Colossoma macropomum*. **Zygote**, Cambridge, p.1-5, 2011.
- MARIA, A. N.; AZEVEDO, H. C.; SANTOS, J. P. et al. Semen characterization and sperm structure of the Amazon tambaqui *Colossoma macropomum*. **Journal of Applied Ichthyology**, Berlin, v. 26, p. 779-783, 2010.
- PEGG, D. E. Principles of Cryopreservation. In: DAY, J. G.; STACEY, G. N. (Ed.). **Methods in molecular biology: cryopreservation and freeze-drying protocols**. 2. ed. Totowa: Humana Press Inc. 2007.
- ROUBACH, R.; GOMES, L. C.; FONSECA, F. A. L. et al. Eugenol as an efficacious anaesthetic for tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier). **Aquaculture Research**, Oxford, v. 36, p. 1056-1061, 2005.
- SILVA, M. C.; PINHEIRO, J. L. P. Cultivo de *Colossoma* na CODEVASF (situação atual). In: HERNANDEZ, R. A. (Ed.). **Cultivo de Colossoma**. Bogotá: Ed. Guadalupe, 1989. p. 259-275.
- VALDEBENITO, I. Terapias hormonales utilizadas en el control artificial de la madurez sexual en peces de cultivo: una revisión. **Archivos de Medicina Veterinaria**, Valdivia, v. 40, p. 115-123, 2008.
- VIEIRA, F. E.; ISAAC, V. J.; FABRÉ, N. N. Biologia reprodutiva do tambaqui, *Colossoma macropomum* CUVIER, 1818 (Teleostei, Serrasalmidae), no baixo Amazonas, Brasil. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 29, p. 625-638, 1999.
- VILLELA, L. C. V.; PAIVA, S. R.; FACÓ, O. et al. **Conservação *In situ* de recursos genéticos animais no Brasil: espécies de pequeno porte**. Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos, 2009. 41 p. (Embrapa Caprinos e Ovinos. Série Documentos, 94). Memória Descritiva do 1º Workshop.
- VIVEIROS, A. T. M. Criopreservação de sêmen de peixes. In: XVI CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16., 2005, Goiânia. **Anais...** Goiânia, 2005. 1 CD-ROM.

Comunicado Técnico, 112

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Tabuleiros Costeiros

Endereço: Avenida Beira Mar, 3250, CP 44,
CEP 49025-040, Aracaju - SE.

Fone: (79) 4009-1344

Fax: (79) 4009-1399

E-mail: sac@cpatc.embrapa.br

Disponível em http://www.cpatc.embrapa.br/publicacoes_2011/cot_112.pdf

1ª edição (2011)

Comitê de publicações

Presidente: Ronaldo Souza Resende.

Secretária-executiva: Raquel Fernandes de Araújo Rodrigues

Membros: Edson Patto Pacheco, Élio César Guzzo, Hymerson Costa Azevedo, Ivênio Rubens de Oliveira, Joézio Luiz dos Anjos, Josué Francisco da Silva Junior, Luciana Marques de Carvalho, Semíramis Rabelo Ramalho Ramos e Viviane Talamini.

Expediente

Supervisora editorial: Raquel Fernandes de Araújo Rodrigues

Tratamento das ilustrações: Nathalie de Góis Paula

Editoração eletrônica: Nathalie de Góis Paula