

Criopreservação de Sêmen de Peixe

O congelamento de sêmen de peixes foi realizado pela primeira vez por Blaxter, em 1953, para realizar o cruzamento de duas “populações” de arenques que se reproduziam em períodos diferentes do ano. A partir desta experimentação pioneira seguiram-se muitas outras e mais recentemente, com a preocupação de conservar a diversidade genética de espécies de valor econômico ameaçadas de extinção (CAROSFELD et al., 2003) como consequência da sobre-exploração, das alterações ambientais promovidas por desmatamento, mineração, poluição industrial e agrícola, dos usos conflitantes das águas (irrigação, produção de energia elétrica), dos represamentos, da introdução de espécies exóticas e pelas mudanças climáticas advindas do aquecimento global. As espécies de água doce mais ameaçadas geralmente são as de valor econômico, de hábitos reofílicos e que realizam longas migrações ascendentes para reprodução.

Uma vez que a pesca não atende ao consumo mundial de pescado, há uma crescente demanda pela indústria de aquicultura para suprir a produção pesqueira (HUNTER; ROBERTS, 2000). Dessa forma, na atualidade, o congelamento de sêmen torna-se importante não apenas para a conservação da diversidade genética em si, mas também pela necessidade de manutenção da variabilidade genética para os programas de melhoramento genético de espécies para cultivo.

Corumbá, MS
Outubro, 2009

A problemática da conservação/criopreservação

A criopreservação de sêmen (congelamento de sêmen em nitrogênio líquido) é uma das possibilidades de responder à ameaça de extinção de espécies pelas diferentes causas enumeradas acima, quando a variabilidade genética torna-se tão reduzida que as espécies tornam-se incapazes de responder às condicionantes ambientais. Entretanto, os bancos de sêmen criocongelados devem ser implantados antes que uma dada espécie esteja realmente em extinção, pois muitas vezes, nessas condições, não haverá variabilidade genética suficiente para a recomposição.

Autores

Emiko Kawakami de Resende
PhD., Embrapa Pantanal
CP 109,
79320-900 Corumbá, MS
emiko@cpap.embrapa.br

Débora Karla Silvestre Marques
PhD., Embrapa Pantanal
CP 109,
79320-900 Corumbá, MS
marques@cpap.embrapa.br

Número efetivo para conservação

O número de parentais que realmente contribuem para a produção da geração seguinte é denominada de número efetivo de reprodutores ou tamanho efetivo da população. A fórmula utilizada para esse cálculo é:

$$= NmNf/Nm + Nf$$

onde

Nm e Nf são o número de reprodutores machos e fêmeas, assumindo-se que os indivíduos são provenientes de populações não relacionadas e contribuem igualmente para a reprodução.

Em geral, o tamanho efetivo da população é de 50 casais, ou 50 do sexo menos numeroso, para evitar os perigos do endocruzamento. O banco de semen é um meio adequado de manter um tamanho efetivo de população para efeitos de conservação sem a manutenção de grandes estoques de reprodutores, pois amostras congeladas de sêmen de muitos machos podem ser utilizadas para fertilizar os ovócitos. Ao implantar um banco de sêmen de populações selvagens devem ser coletados, no mínimo, o sêmen de 50 machos (CAROSLFELD et al., 2003).

Exemplos de aplicação de bancos de sêmen

Bancos de sêmen congelados de peixes podem disponibilizar o sêmen de muitos machos rapidamente para fertilização. Se adequadamente coletados e congelados, com a devida caracterização genética, podem ser utilizados para programas de recomposição de populações silvestres ameaçadas de extinção ou para programas específicos de melhoramento genético para atendimento a critérios de aumento nas taxas de crescimento, resistência a doenças ou com propriedades funcionais específicas desejadas.

Princípios básicos de criobiologia

O que acontece quando uma célula é congelada?

Todas as células respondem da mesma forma quando são esfriadas a temperaturas inferiores a 0°C. O gelo começa a se formar fora da célula e conforme a temperatura continua a diminuir, a célula começa a desidratar, ou seja, começa a perder água. Se o resfriamento é muito lento, a célula pode perder água suficiente de forma a não se congelar internamente. Normalmente, entretanto, a desidratação da célula é insuficiente para impedir a formação de gelo no seu interior, o que causa a sua morte a não ser que medidas extras sejam tomadas para a sua proteção. A morte da célula é causada pela água intracelular que, ao congelar, forma cristais de gelo que rompem as estruturas celulares.

Como prevenir os estragos do congelamento?

1. Ajustando a velocidade do

resfriamento – uma velocidade muito baixa de resfriamento permite à célula perder água de forma a não ter água intracelular quando ocorre o congelamento. Entretanto, isto pode ser utilizado apenas para os glóbulos vermelhos do sangue que possuem permeabilidade muito alta à água. Para todos os demais tipos de célula, a velocidade de resfriamento requerida é tão baixa que se torna inviável na prática, de forma que outros mecanismos necessitam ser desenvolvidos.

2. Adicionando crioprotetores (intra e extracelular) – Uma forma muito mais prática de proteger as células contra a formação de gelo intracelular é colocá-las em soluções crioprotetoras. Um crioprotetor intracelular é uma substância química não-tóxica para os gametas que desloca a água intracelular e diminui a temperatura em que o interior da célula congela, interferindo com a formação de cristais de água. Crioprotetores comuns são o DMSO (dimetil-sulfóxido), glicerol e metanol. O crioprotetor extracelular reveste a superfície celular e estabiliza a membrana, auxiliando a minimizar e reparar os danos oriundos do congelamento. Geralmente é utilizada a gema de ovo, que, quando fresca, contém uma variedade de ácidos graxos, antioxidantes e outras substâncias ativas desconhecidas que auxiliam a prevenir os efeitos do congelamento. Todos os crioprotetores devem ser relativamente não tóxicos ao sêmen ou ovos e facilmente removíveis quando descongelados.

Importância da velocidade de descongelamento

Células que tenham sido protegidas com crioprotetores e resfriadas de forma adequada podem mesmo assim morrer se elas forem descongeladas muito rápida ou lentamente. O descongelamento é o oposto do congelamento: as células precisam de tempo para se re-hidratarem, mas também necessitam se descongelar rápido o suficiente para que os cristais de gelo não se formem durante o processo e se tornem grandes o suficiente para matá-las. Com sêmen de peixe, a melhor taxa de sobrevivência é obtida

aquecendo o mais rápido possível (MIGRATORY..., 2000), mas existem exceções e nesses casos, a melhor taxa de descongelamento é obtida por tentativa e erro.

Temperatura de estocagem

Na prática existem apenas dois congelantes para efetuar o criocongelamento de células vivas: gelo seco (-79°C) e nitrogênio líquido (-196°C). As células podem ser congeladas muito bem com gelo seco e foi uma técnica muito utilizada para congelar sêmen de peixe na forma de pellets (Blaxter, 1953). Entretanto, para estocagem de longo prazo como banco de genes, há necessidade de temperaturas inferiores a -180°C, possível de ser alcançado apenas com nitrogênio líquido. O vapor de nitrogênio líquido é um resfriante muito prático de forma que o nitrogênio pode ser utilizado tanto para resfriar como para estocar material biológico. As palhetas utilizadas para congelar sêmen bovino são as mais práticas para congelar e estocar sêmen de peixes.

Duração e viabilidade

Os processos biológicos ou químicos não ocorrem a -196°C, de forma que, teoricamente, o tempo de estocagem seria ilimitado. Como a criopreservação existe apenas desde 1949, não há como saber efetivamente a duração, mas o sêmen bovino criopreservado no Reino Unido em 1952 foi recentemente descongelado e usado para produzir bezerras saudáveis (HARVEY, 1993), o que nos dá algumas pistas e segurança na metodologia empregada. A causa mais provável de deterioração durante a estocagem é a falta de manutenção dos botijões com nitrogênio líquido suficiente para que não ocorra o descongelamento. Uma outra causa é o manuseio freqüente dos raquis onde estão as palhetas, sem o cuidado necessário, onde podem ocorrer breves exposições a temperaturas mais elevadas, que pode levar à perda de qualidade do sêmen congelado.

Motilidade do esperma e ativação

O espermatozóide do peixe mantém-se imóvel no testículo e se torna móvel quando é eliminado e entra em contato com a água, ocasião em que nada e penetra no ovócito, fecundando-o. A motilidade resulta da redução drástica da pressão osmótica ao entrar em contato com a água, mas também pela redução, por diluição, das altas concentrações de potássio no testículo (HARVEY, 1993). O processo que leva à movimentação é denominado de ativação. Normalmente a ativação é irreversível e dura por um período de tempo muito curto. Após esse tempo, a energia do espermatozóide se esgota e ele se torna incapaz de qualquer fecundação, de forma que, nesse período ativado, o espermatozóide tem que entrar rapidamente em contato com o ovócito e para fins de criopreservação, logicamente, deve ser congelado antes de ser ativado.

O sêmen coletado pode se manter inativo enquanto não entrar em contato com água ou outra solução diluidora como urina. Dessa forma, é extremamente importante que o sêmen a ser congelado não entre em contato com água ou urina durante a sua coleta. Entretanto, uma solução aquosa geralmente é utilizada para colocar os crioprotetores em contato com o sêmen, de forma que a mesma deve ser formulada para não ativar o espermatozóide, o que geralmente é conseguido adicionando-se glicose no diluente para aumentar a pressão osmótica e impedir a ativação (CAROSFELD et al., 2003).

Existem, entretanto, diferenças específicas na ativação. O espermatozóide de salmão e truta nada vigorosamente por menos de um minuto. Em outras espécies como a tilápia e o dourado (*Salminus brasiliensis*), a motilidade se mantém por diversos minutos.

Como congelar sêmen de peixes?

Os crioprotetores freqüentemente utilizados para proteção intra-celular são o DMSO (dimetil sulfoxido), glicerol e metanol. Geralmente são utilizados em concentrações entre 5% e 10% após a diluição com o sêmen. Gema de ovo e leite em pó integral são mais comumente utilizados como crioprotetores extracelulares. A glicose (5%) é usada geralmente para aumentar a pressão osmótica do diluente. A gema de ovo tende a se precipitar rapidamente nos diluentes, de

forma que deve ser bem agitada antes de ser adicionada ao sêmen. DMSO e outros crioprotetores intracelulares aquecem consideravelmente quando são dissolvidos, de forma que devem ser resfriados antes de adicionar ao sêmen, o que pode ser conseguido mantendo-os em locais refrigerados como geladeiras ou bolsas térmicas (CAROSFELD et al., 2003).

Fórmulas genéricas para peixes tropicais

Um diluente básico excelente para peixes tropicais é 10% de DMSO em 5% de glicose ao qual uma gema de ovo deve ser adicionada um pouco antes do uso (uma gema por 150 ml de diluente). A proporção de diluente para sêmen deve ser de 3 a 5 partes de diluente para uma parte de sêmen fresco. A solução de DMSO/glicose pode ser estocada em geladeira por um tempo, mas uma vez que a gema de ovo seja adicionada, deve ser usada no mesmo dia. Esse tipo de diluente foi/está sendo usado com sucesso para congelar sêmen de peixes de escama como pacu (*Piaractus mesopotamicus*), dourado (*Salminus brasiliensis*), piraputanga (*Brycon hilarii*), piau (*Leporinus elongatus*) (CAROSFELD et al., 2003; BENITES, não publicado) e curimatá (*Prochilodus lineatus*) (SILVA, 2000; CAROSFELD et al., 2003). Para os peixes de couro tem sido utilizadas soluções com metanol e leite em pó integral (CAROSFELD et al., 2003).

Como realizar a coleta e o congelamento de sêmen de peixes tropicais

1- Captura

A captura de peixes para extração de sêmen geralmente é feita em locais e períodos do ano onde podem ser encontrados machos prontos para a reprodução. No caso dos peixes migradores do Pantanal, por exemplo, geralmente são encontrados nas cabeceiras dos rios entre o final e começo de ano, no período das chuvas. Dependendo da espécie, são capturadas com tarrafas como os curimatás e piraputangas. No caso dos dourados e grandes bagres podem ser

utilizados ainda anzóis de galho, onde uma extremidade fica amarrada a um galho de árvore da vegetação ciliar ou em estacas fincadas nas margens (onde há ausência de mata ciliar) e a outra contém um anzol grande, proporcional ao tamanho do peixe que se queira capturar, geralmente iscada com iscas vivas ou com pedaços de peixes. Ao serem capturados, se forem muitos exemplares ao mesmo tempo, os peixes devem ser mantidos na água em sacos de contenção.

2- Etapas para extração e congelamento do sêmen

Uma vez capturado o macho, o mesmo deve ter a sua região cefálica encoberta para reduzir o stress. Deve ser manuseado com cuidado para que elimine fezes e urina antes do processo de extração do sêmen. Para a liberação do sêmen, apertar delicadamente a região abdominal de frente para trás até as proximidades do poro urogenital. Se o macho estiver pronto há liberação de sêmen. Para algumas espécies, a liberação de sêmen ocorre juntamente com a liberação de urina e quando isso acontece, o material deve ser descartado. O sêmen deve ser coletado em tubos graduados, de forma a poder se colocar a solução de crioproteção na proporção de 3 para um de sêmen. Essa solução, contendo o sêmen, deve ser aspirada em palhetas numeradas e registrada em ficha específica para posterior recuperação das informações pertinentes. As palhetas devem ser colocadas em globetes identificados que, por sua vez, também recebe identificação e vai para resfriamento em vapor de nitrogênio líquido, onde deve permanecer até a estabilização da temperatura de resfriamento que geralmente ocorre em 7 minutos (CAROSFELD et al., 2003). Uma vez que o material esteja resfriado pode ser transferido para o botijão de nitrogênio líquido onde pode permanecer estocado, a princípio, "ad eternum".

Para cada exemplar do qual se extraia sêmen deve-se coletar também uma porção de nadadeira a fim de realizar a caracterização genética, importante tanto em programas de conservação de diversidade como de melhoramento genético em aqüicultura.

Em laboratório, deve se realizar manutenção periódica do nível de nitrogênio líquido nos botijões, condição para manutenção "ad-eternum" do sêmen congelado.

Banco de sêmen de peixes do Pantanal

O processo de congelamento de sêmen de peixes iniciou-se no ano de 2000 e atualmente contém sêmen congelado de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), dourado (*Salminus brasiliensis*), piraputanga (*Brycon hilarii*), pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) e cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum*), provenientes dos rios Taquari e Miranda. Esse banco de sêmen de peixes do Pantanal encontra-se na Embrapa Pantanal, localizada em Corumbá, Mato Grosso do Sul.

Conclusões

A metodologia de congelamento adaptada e utilizada para o sêmen de peixes migradores do Pantanal tem se mostrado eficiente, mantendo a motilidade para usos futuros. Entretanto, cuidados são necessários para verificação efetiva da qualidade do reprodutor e na coleta do sêmen.

Agradecimentos

Ao World Fisheries Trust e CIDA/Canadá pela transferência de tecnologia para o congelamento de sêmen de peixes e material básico para iniciar a implantação do banco de sêmen de peixes do Pantanal.

Referências

BENITES, C. Fertilização de ovócitos com sêmen criopreservado de pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por chgeral@cpap.embrapa.br em 19 maio 2004.

BLAXTER, J.H.F. Sperm storage and cross fertilization of spring and autumn spawning herring. **Nature**, v.172, p.1189-1190, 1953.

CAROSFELD, J.; H. P. GODINHO; E. ZANIBONI FILHO; HARVEY. B.J Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. **J. Fish Biol.**, v. 63, p. 472-489, 2003.

HARVEY, B. Cryopreservation of Fish Spermatozoa. In: CLOUD, G. H. **Genetic conservation of salmonid fishes**. New York: Plenum Press, 1993.

HUNTER, B. J., ROBERTS, D. C. K. Potential impact of the fat composition of farmed fish on human health. **Nutrition Research**, v.20, n.7, p. 1047-1058, 2000.

MIGRATORY fish conservation. Canadá: World fisheries trust, 2000. 74 p. CIDA Technology Transfer Project n.204-19777. Narrative Reports III e IV. October, 1998-January, 2000.

SILVA, E. B. **Avaliação comparativa da utilização do sêmen criopreservado e fresco na fertilização dos óvulos de curimatã *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1847)**. 2000. 49 f. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2000.

COMO CITAR ESTE DOCUMENTO

RESENDE, E. K. de.; MARQUES, D.K.S. **Criopreservação de sêmen de peixe**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2009. 5 p. (Embrapa Pantanal. Circular Técnica, 84). Disponível em: <http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/download.php?arq_pdf=CT84>. Acesso em: 30 nov 2009.

Circular Técnica, 84

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Pantanal
Endereço: Rua 21 de Setembro, 1880
Caixa Postal 109
CEP 79320-900 Corumbá, MS
Fone: 67-32345800
Fax: 67-32345815
Email: sac@cpap.embrapa.br

1ª edição
1ª impressão (2009): formato digital

Comitê de Publicações

Presidente: *Thierry Ribeiro Tomich*
Secretário-Executivo: *Suzana Maria Salis*
Membros: *Debora Fernandes Calheiros*
Marçal Henrique Amici Jorge
Jorge Antônio Ferreira de Lara
Regina Célia Rachel

Expediente

Supervisor editorial: *Suzana Maria Salis*
Normatização Bibliográfica: *Viviane de Oliveira Solano*
Tratamento das ilustrações: *Regina Célia Rachel*
Editoração eletrônica: *Regina Célia Rachel*