

CRIOPRESERVAÇÃO DO ESPERMATÓFORO E DA MASSA ESPERMÁTICA DO CAMARÃO BRANCO *Litopenaeus schmitti* POST-MORTEM*

Andrea BAMBOZZI Fernandes¹; Luciana Antunes de MATTOS²; Marco Roberto Bourg de MELLO³; Lidia Miyako Yoshii OSHIRO⁴

RESUMO

O presente trabalho foi realizado em duas etapas; a primeira para avaliar a eficiência de dois protocolos de resfriamento (A e B) utilizando glicerol (10%) como crioprotetor e, a segunda, a eficiência de dois crioprotetores (glicerol e dimetilsulfóxido - DMSO a 10%) e o tempo (30, 60 e 90 dias de estocagem em nitrogênio líquido) para a criopreservação da massa espermática e espermatóforo de camarões *post mortem* da espécie *Litopenaeus schmitti*. O protocolo A apresentou velocidade de resfriamento de 0,5°C min⁻¹ até alcançar -32°C e o protocolo B, 20°C min⁻¹ até alcançar -120°C, sendo os materiais posteriormente transferidos para o nitrogênio líquido (N₂L). A viabilidade espermática foi avaliada por meio do esfregaço de sêmen corado com eosina-nigrosina. A curva que resultou na maior média de sobrevivência espermática foi a do protocolo A (50,9%). Portanto, para o segundo experimento foi utilizado o protocolo A; entretanto, neste não houve diferença entre os crioprotetores para a massa espermática, contudo, o tempo influenciou na sobrevivência. Foi observada diferença entre os crioprotetores e a influência do tempo na sobrevivência espermática dos espermatóforos criopreservados. O glicerol a 10% foi mais eficiente para a criopreservação dos espermatóforos, porém, para as massas espermáticas, ambos podem ser utilizados.

Palavras chave: Protocolos; massa espermática; espermatóforo; dimetilsulfóxido; glicerol

POST-MORTEM SPERMATOPHORE AND SPERM CRYOPRESERVATION OF THE WHITE SHRIMP *Litopenaeus schmitti*

ABSTRACT

This study was carried out in two phases; the first to evaluate the viability of two cooling protocols (A and B) using glycerol (10%) as a cryoprotectant and the second, the efficiency of two cryoprotectants (10% glycerol and DMSO) and times (30, 60 and 90 days of storage in liquid nitrogen) for the cryopreservation of *post-mortem* sperm mass and spermatophores of the shrimp *Litopenaeus schmitti*. The protocol A presented a cooling rate of 0.5°C min⁻¹ until reaching -32°C and protocol B, 20°C min⁻¹ until reach -120°C, after which the samples were transferred to liquid nitrogen (N₂L). The sperm viability was assessed by smearing the semen stained with eosin-nigrosin. The curve resulted in higher mean sperm survival was Protocol A (50.9%). Therefore, for the second experiment, the protocol A was used, however there was no difference between the cryoprotectants for sperm mass, although the influence on survival time. Difference was observed between the cryoprotectants and the influence of time on sperm survival of cryopreserved spermatophores. Glycerol 10% was more efficient for cryopreservation of spermatophore, but for the masses sperm, both can be used.

Keywords: Protocols; sperm mass; spermatophore; dimethyl sulfoxide, glycerol

Artigo Científico: Recebido em 21/05/2013 – Aprovado em 17/11/2013

¹ Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ. Rodovia BR 465, Km 7 – CEP: 23890-000 – Seropédica – RJ – Brasil. e-mail: abambozzi@yahoo.com.br (autora correspondente)

² Estação de Biologia Marinha, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ

³ Departamento de Avaliação e Reprodução Animal/Instituto de Zootecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ

⁴ Estação de Biologia Marinha, Departamento de Produção Animal/Instituto de Zootecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ

* Apoio financeiro: FAPERJ, CAPES

INTRODUÇÃO

A criopreservação do espermatóforo (estrutura de armazenamento dos espermatozoides) é um método valioso na restauração de espécies em perigo de extinção, bem como uma técnica para manipulação reprodutiva e a melhoria genética do camarão (MEMON *et al.*, 2012). BART *et al.* (2006) e VUTHIPHANDCHAI *et al.* (2007) obtiveram taxas de sobrevivência satisfatórias (respectivamente, 79,9% e 27,3%) de espermatóforos de camarões *Penaeus monodon* criopreservados e mantidos em nitrogênio líquido por 2 e 210 dias, respectivamente.

Independentemente da técnica, todos os métodos de criopreservação necessitam de crioprotetores, que permitem uma redução do ponto de solidificação das soluções durante o congelamento (FULLER *et al.*, 2004). Os crioprotetores são divididos em duas categorias, permeáveis e não permeáveis (SANTOS *et al.*, 2008), podendo ser usados separadamente ou associados para diferentes tipos de protocolo de criopreservação. Os crioprotetores permeáveis protegem as organelas das células durante o resfriamento, os quais são constituídos por moléculas com baixo peso molecular, que permitem atravessar as membranas celulares com relativa facilidade, sendo os mais empregados: dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol, propanodiol, etilenoglicol e propilenoglicol (GONÇALVES *et al.*, 2008). Contrariamente, os não permeáveis possuem alto peso molecular, o que impossibilita a permeabilidade através das membranas celulares, sendo utilizados para reduzir a formação de gelo intracelular, facilitando a desidratação das células e protegendo a membrana (HOVATTA, 2005).

Durante o congelamento, à medida que as células são resfriadas a temperaturas entre -5 e -15°C, ocorre, inicialmente, a formação de gelo no meio extracelular (MAZUR *et al.*, 1984). Com a contínua redução da temperatura, a quantidade de gelo aumenta e os solutos concentram-se no meio extracelular, criando um gradiente osmótico (ELMOAZZEN, 2000). A partir desse estágio, os eventos físicos subsequentes dependem da velocidade de resfriamento. Logo, se a taxa de resfriamento for alta, a desidratação celular não

será adequada devido à formação de cristais de gelo intracelular, levando a morte do espermatozoide. Por outro lado, se a taxa de resfriamento for baixa, ocorrerá uma desidratação excessiva da célula, levando a um aumento da concentração de soluto (efeito solução) que também é prejudicial ao ambiente celular (MAZUR, 1985; FRIEDLER *et al.*, 1988). No entanto, independentemente da velocidade de resfriamento, danos celulares poderão ocorrer (ELMOAZZEN, 2000).

Tanto a análise morfológica quanto a motilidade espermática têm sido apontadas por muitos autores como importante ferramenta para avaliar a qualidade do sêmen (VERSTEGEN *et al.*, 2002; MATOS *et al.*, 2008). A avaliação dos espermatozoides maduros em crustáceos se torna mais complexa quando comparada a vertebrados. Isso se deve à ausência de flagelos e, por conseguinte, de motilidade, impossibilitando a sua avaliação por meio dos batimentos flagelares. Portanto, em camarões peneídeos, a contagem dos espermatozoides e suas avaliações macroscópicas são utilizadas para caracterizar o potencial reprodutivo (WANG *et al.*, 1995). Assim, diferentes técnicas são utilizadas para avaliar a viabilidade espermática como, por exemplo, a “técnica de exclusão”, com a utilização do corante eosina-nigrosina (JEYALECTUMIE e SUBRAMONIAM, 1989; NIMRAT *et al.*, 2006), o corante “trypan blue” (WANG *et al.*, 1995; BRAVANISHANKAR e SUBRAMONIAM, 1997), a ligação do espermatozoide-ovo (BEHLMER e BROWN, 1984), análises bioquímicas (BRAVANISHANKAR e SUBRAMONIAM, 1997), indução a reação acrossômica do espermatozoide (ANCHORDOGUY *et al.*, 1988; PONGTIPPATEE *et al.*, 2007) e avaliação da fertilização por meio de inseminação artificial (AKARASANON *et al.*, 2004; BART *et al.*, 2006; VUTHIPHANDCHAI *et al.*, 2007).

CASTELO-BRANCO *et al.* (2014) avaliou dois tempos de equilíbrio (10 e 30 minutos) e dois crioprotetores (glicerol e DMSO a 5 e 10%) em massa espermática de camarões *Litopenaeus schmitti* frescos. Neste experimento, o autor não observou diferença entre os tempos nem entre as concentrações dos mesmos; posteriormente criopreservou a massa espermática em glicerol a 5 e 10%, não havendo também diferença na

sobrevivência espermática dos espermatozoides criopreservados nestas concentrações. O camarão *Litopenaeus schmitti*, objeto deste estudo, é uma espécie abundante nas pescas artesanais na Baía de Sepetiba - RJ.

O uso de machos *post mortem* em cativeiro visa o maior aproveitamento dos mesmos e menores custos, desde que os machos sejam comprovadamente livres de patógenos. A utilização dos espermatozoides destes animais constitui uma nova alternativa para o emprego da criopreservação e utilização futura do material genético por apresentarem espermatozoides viáveis.

O presente trabalho é pioneiro em utilizar sêmen ou espermátóforo de decápodos *post mortem* para a criopreservação, visando maximizar a utilização do potencial reprodutivo dos camarões machos, pois os demais estudos utilizaram espermátóforos ou massas espermáticas oriundos de animais vivos.

Dessa forma, o presente estudo teve como objetivos avaliar: i) a viabilidade de dois protocolos de congelamento utilizando glicerol a 10%; ii) a eficiência de dois crioprotetores (glicerol e DMSO, ambos a 10%), tanto na criopreservação da massa espermática como do espermátóforo; iii) o tempo de estocagem em nitrogênio líquido (30, 60 e 90 dias).

MATERIAIS E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados com machos adultos de *L. schmitti* oriundos da pesca artesanal na Baía de Sepetiba (Saco da Pombeba - 23°3'13.91"S; 43°54'44.93"W), sendo os espécimes utilizados 48 h *post mortem*. O primeiro ensaio foi realizado em fevereiro/2011, utilizando-se 55 machos, objetivando-se avaliar o melhor protocolo para congelamento. Após essa avaliação, foi realizado o segundo ensaio, em agosto/2011, com 65 machos.

Foi empregado um equipamento para criopreservação (TK Equipamentos para reprodução, modelo - TK 3000 compacta SE - Brasil) computadorizado, com vários protocolos para criopreservação de sêmen e embriões, sendo a temperatura controlada de acordo com o protocolo selecionado.

No primeiro ensaio, os tratamentos foram distribuídos em delineamento experimental inteiramente casualizado, em arranjo fatorial duplo (2x2), com cinco repetições, sendo os fatores de estudo: dois protocolos de congelamento (duas curvas de congelamento) com dois níveis (massa espermática e espermátóforo) utilizando apenas o glicerol a 10%. Para o segundo foi utilizado o delineamento em blocos inteiramente casualizados (dias de congelamento) em arranjo fatorial 2x4, com 10 repetições, para testar os efeitos de dois crioprotetores (glicerol e DMSO) e quatro tempos com relação à sobrevivência espermática: 0 (não congelado, fresco ou controle), 30, 60 e 90 dias (tempo de permanência do material criopreservado e mantido em nitrogênio líquido).

Inicialmente, foram tomados o peso e o comprimento dos animais (comprimento total e comprimento da carapaça) por meio de balança analítica de precisão 0,001 g e paquímetro digital, respectivamente. O comprimento total consistiu na medida da extremidade do rostró até a extremidade do telson. O comprimento da carapaça foi medido da base do pedúnculo ocular até a extremidade posterior da carapaça.

Foram utilizados 65 espermátóforos de machos maduros no período de intermuda, selecionados de acordo com as especificações segundo o padrão de qualidade sugerido por PÉREZ-JAR (2005) em relação à sua aparência: brancos, grandes e túrgidos.

Os espermátóforos completamente maduros foram removidos pela técnica de leve compressão abdominal (ARCE *et al.*, 1999 e NIMRAT *et al.*, 2006); em seguida; foram medidos com paquímetro com precisão de 0,01 mm e pesados em balança analítica com precisão 0,001 g.

As massas espermáticas foram extrusadas por meio de leve compressão na extremidade posterior do espermátóforo; em seguida, tanto os espermátóforos quanto as massas espermáticas foram imersos em 0.5 mL de solução salina livre de cálcio (Tabela 1). Posteriormente, ambos foram imersos em glicerol 10%, diluídos em solução salina livre de cálcio (VUTHIPHANDCHAI *et al.*, 2007), à temperatura ambiente (25°C) por 30 minutos (tempo de equilíbrio).

Tabela 1. Composição da solução salina para imersão dos espermátóforos e massa espermática.

Reagentes	Quantidade
NaCl	2,163 g
KCl	0,112 g
H ₃ BO ₃	0,053 g
NaOH	0,019 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,493 g
H ₂ O destilada	100 mL q.s.p.

A viabilidade espermática foi avaliada por meio do esfregaço de sêmen corado com eosina-nigrosina (Sigma N4763 e E6003, respectivamente), segundo JEYALECTUMIE e SUBRAMONIAM (1989), com pequena modificação, onde foram adicionados 25 µL de eosina a 0,5% e 25 µL de nigrosina a 10%, em 50 µL de solução espermática. Após a homogeneização de 100 µL resultantes de solução corada, realizou-se o esfregaço em lâmina de microscopia para observação em microscópio óptico. A porcentagem média para a viabilidade espermática foi calculada por meio da contagem de células vivas e mortas (mínimo de 100 células por lâmina, sendo duas réplicas por amostra). As células mortas apresentaram-se coradas pela eosina (róseas) e as vivas não apresentavam coloração, mostrando-se translúcidas em contraste com o fundo arroxeadado da nigrosina.

Primeira Etapa: Avaliação de duas Curvas para a definição de um Protocolo

Para o protocolo A foram utilizados machos com peso médio de 22,80 ± 3,87 g, comprimento total médio de 13,59 ± 0,81 cm e comprimento da carapaça médio de 2,96 ± 0,2 cm. O comprimento e o peso médios dos espermátóforos foram 0,87 ± 0,1 cm e 0,14 ± 0,03 g, respectivamente. Para o protocolo, B os animais apresentaram peso médio de 22,75 ± 2,05 g, comprimento total médio de 13,52 ± 0,59 cm e comprimento da carapaça médio de 2,97 ± 0,09 cm. O comprimento e o peso médios dos espermátóforos foram 0,84 ± 0,05 cm e 0,15 ± 0,11 g, respectivamente.

As massas espermáticas foram colocadas em palhetas francesas plásticas (IMV®) com capacidade de 0,5 mL e os espermátóforos em

criotubos (IMEC) de 2,0 mL. Ambos permaneceram em equilíbrio por 30 minutos em glicerol 10% (Sigma, G6279), segundo CASTELO-BRANCO *et al.* (2014), à temperatura ambiente (25°C), e posteriormente foram criopreservados, utilizando os protocolos mencionados a seguir.

O protocolo A do equipamento Compacta TK 3000 (SALAZAR *et al.*, 2008) realizou a criopreservação em duas etapas, onde inicialmente ocorreu a estabilização a -6°C e, posteriormente, a inserção das palhetas e criotubos, contendo a solução de massa espermática e espermátóforo, respectivamente, e o crioprotetor. Após dois minutos, realizou-se o procedimento de “seeding” (indução artificial da cristalização de gelo, geralmente através do contato de uma pinça previamente imersa em nitrogênio líquido (N₂L), no sentido de evitar o super-resfriamento das células). Em seguida, a máquina foi novamente estabilizada por 10 minutos. Posteriormente, iniciou-se a redução da temperatura de -6°C a -32°C, a uma velocidade de resfriamento de 0,5°C min⁻¹. As amostras permaneceram por mais 8 minutos no equipamento antes de serem transferidas para o nitrogênio líquido (-196°C) (Tabela 2).

Tabela 2. Protocolos (A e B) utilizados para criopreservação da massa espermática e do espermátóforo do camarão branco *Litopenaeus schmitti*.

Protocolo A	
Início - a partir do 1º patamar	
Temperatura 1º patamar	- 6°C
“Seeding”	2 min
Tempo por rampa	10 min
Rampa	0,5°C min ⁻¹
Temperatura 2º patamar	- 32°C
Tempo 2º patamar	5 min
Transferência para o N ₂ L	- 196°C
Protocolo B	
Início - a partir da temperatura ambiente	
Rampa Positiva	0,5°C min ⁻¹
1º Patamar	+ 5°C
Rampa Negativa	20°C min ⁻¹
Patamar Final	- 120°C
Transferência para o N ₂ L	- 196°C

O protocolo B teve início a partir da temperatura ambiente, sendo esta reduzida numa

velocidade de $0,5^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até alcançar 5°C (fase positiva). Na fase negativa, marcada pela introdução do nitrogênio líquido no recipiente da máquina de criopreservação e posterior imersão dos criotubos, a temperatura foi reduzida numa velocidade de $20^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até alcançar -120°C , quando então o material foi imerso em N_2L .

Concluídos os tempos de estocagem em N_2L (30, 60 e 90 dias), as massas espermáticas foram retiradas e imediatamente imersas em banho maria a 20°C por 10 segundos para o descongelamento (SALAZAR *et al.*, 2008). Os espermátóforos foram imersos em água a 30°C por dois minutos (BART *et al.*, 2006; VUTHIPHANDCHAI *et al.*, 2007).

Segunda Etapa: Crioprotetores e tempo de estocagem em N_2L

O peso médio dos animais foi de $29,86 \pm 3,19$ g, o comprimento total médio de $15,03 \pm 0,56$ cm e o comprimento da carapaça médio de $3,19 \pm 1,15$ cm. O comprimento e o peso médios dos espermátóforos foram $0,96 \pm 0,07$ cm e $0,19 \pm 0,02$ g, respectivamente.

O período experimental ocorreu durante cinco dias consecutivos. Diariamente foram retirados os espermátóforos de 13 machos, totalizando 130 espermátóforos.

Nesta etapa foram criopreservadas duas amostras por dia para cada tratamento, totalizando 10 repetições, avaliando-se diariamente duas amostras referentes ao controle durante o período de congelamento.

A criopreservação das massas espermáticas e dos espermátóforos foi realizada com 10% de glicerol (1,36 M) e 10% DMSO (1,40 M) (Sigma, D4540), ambos a 10 %, utilizando-se o protocolo definido na primeira fase experimental. As massas espermáticas foram inseridas em palhetas plásticas de 0,5 mL e posteriormente vedadas com álcool polivinílico. Os espermátóforos foram colocados em criotubos com capacidade para 2,0 mL. Ambos permaneceram nas respectivas soluções crioprotetoras por 30 minutos, antes de serem transferidas para o equipamento de criopreservação.

O descongelamento foi realizado seguindo o mesmo procedimento efetuado na primeira etapa experimental.

Análise Estatística

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade (Shapiro-Wilk; $\alpha = 5\%$) e homocedasticidade (Levene; $\alpha = 5\%$) das variâncias. Na primeira etapa (avaliação de duas curvas de congelamento), utilizou-se a Análise de Variância (ANOVA; $\alpha = 5\%$) para testar a viabilidade dos protocolos. Esta mesma análise foi utilizada na segunda etapa do experimento (comparação entre crioprotetores de acordo com os tempos de estocagem) para a comparação das médias de sobrevivência espermática da massa (Glicerol e DMSO), enquanto as médias de sobrevivência para os espermátóforos criopreservados em DMSO foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis ($\alpha = 5\%$); além disso, foi realizada a análise de regressão linear, para testar a relação entre a sobrevivência espermática (massa e espermátóforo) e o tempo de criopreservação. O coeficiente angular de cada reta ("*b*") foi submetido ao teste t de Student ($H_0: b = 1$; $\alpha = 5\%$). As declividades e os interceptos das regressões obtidas para as massas e para os espermátóforos foram analisadas pela análise de covariância (ANCOVA; $\alpha = 5\%$). Todas as análises foram realizadas utilizando-se o pacote estatístico SAEG v.9.1 (UFV, 2007). As parcelas perdidas foram corrigidas pela equação:

$$y = \frac{k.T + r.B - G'}{(k - 1)(r - 1)}$$

onde:

y = valor estimado da parcela;

k = número de tratamentos;

r = número de blocos (dias de congelamento);

T = total das parcelas do tratamento com parcela perdida;

B = total das parcelas do bloco com a parcela perdida;

G' = soma de todas as parcelas existentes no experimento.

RESULTADOS

Definição do protocolo para criopreservação

A sobrevivência espermática média foi significativamente superior com o protocolo A (50,96%) quando comparada ao B (7,13%) (Tabela 3).

Tabela 3. Valores médios e desvios padrões das curvas de resfriamento da massa espermática e do espermatóforo (SPTF) de *Litopenaeus schmitti*.

Curvas de resfriamento	SOBREVIVÊNCIA ESPERMÁTICA (%)		
	MASSA	SPTF	MÉDIA
PROTOCOLO A (-32°C)	43,57 ± 15,74	58,35 ± 20,74	50,96 ± 19,5 ^a
PROTOCOLO B (-120°C)	1,99 ± 3,48	12,26 ± 16,05	7,13 ± 12,55 ^b

Médias seguidas de letras diferentes nas colunas diferem entre si pelos testes F, a 5% de significância.

Avaliação dos crioprotetores e métodos (massa espermática e espermatóforo) para criopreservação

De acordo com a análise de covariância, as regressões de sobrevivência dos espermátóforos diferiram significativamente em relação aos crioprotetores. Sendo assim, os interceptos das duas retas diferiram entre si ($p = 0,0414$), demonstrando a presença de duas equações. Contrariamente, a relação entre a sobrevivência da massa criopreservada em glicerol e DMSO em função do tempo de estocagem em N₂L (30, 60 e

90 dias) foi demonstrada por uma única equação, uma vez que tais regressões não diferiram significativamente quanto aos seus interceptos ($p = 0,6130$) e declividades ($p = 0,2855$).

Quando analisada a sobrevivência ao longo do tempo, pôde-se perceber uma queda na sobrevivência espermática à medida que o tempo de estocagem aumentou de 30 para 90 dias ($p = 0,0000$), sendo esse padrão decrescente demonstrado pela inclinação da linha de tendência dessas massas espermáticas (Figura 1).

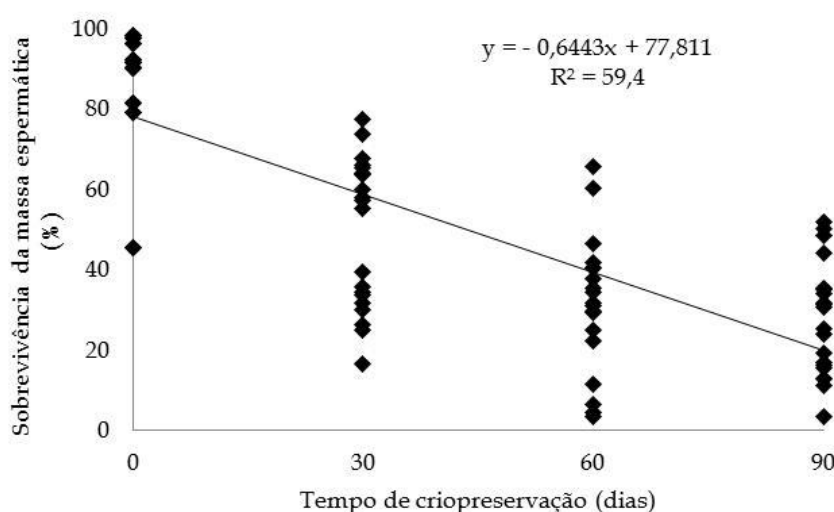


Figura 1. Sobrevivência espermática das massas de *Litopenaeus schmitti* criopreservadas por 30, 60 e 90 dias utilizando como crioprotetores o glicerol e DMSO, armazenadas em nitrogênio líquido.

No tempo zero (0), considerando a contagem a fresco (grupo controle), a sobrevivência espermática foi superior em relação às massas espermáticas criopreservadas em glicerol e DMSO.

Com relação aos espermátóforos criopreservados, foram observadas diferenças

não somente entre os crioprotetores ($p = 0,0043$), mas entre os tempos testados na sobrevivência espermática ($p = 0,0248$). Porém, não houve interação entre os crioprotetores e os tempos ($p = 0,7779$). Assim como observado para a massa espermática, a sobrevivência dos espermátóforos decresceu em relação ao tempo de estocagem ($p = 0,0000$) (Figura 2).

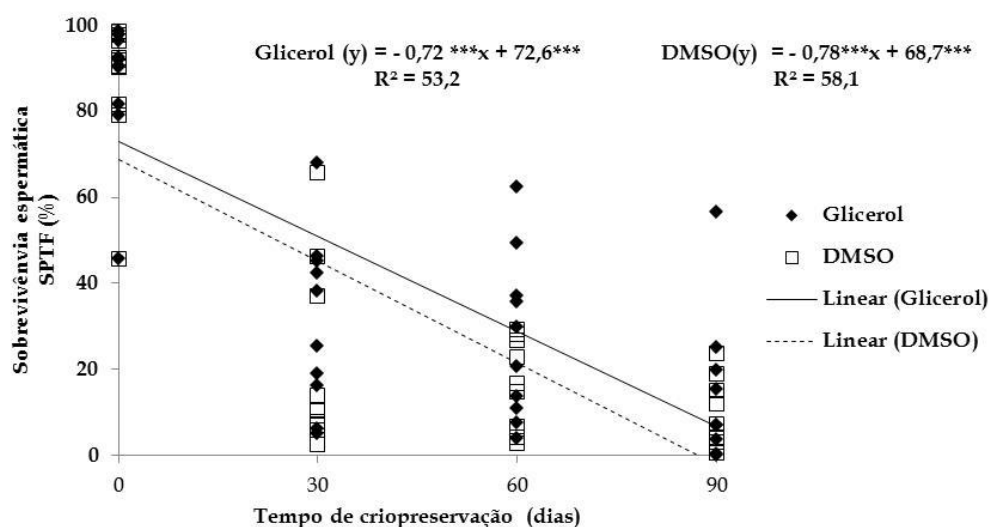


Figura 2. Sobrevivência espermática dos espermatóforos (SPTF) de *Litopenaeus schmitti* criopreservados por 30, 60 e 90 dias, utilizando como crioprotetores o glicerol e o DMSO armazenados em nitrogênio líquido. (***) diferença significativa, $\alpha = 5\%$)

A sobrevivência média dos espermatozoides das massas espermáticas e dos espermatóforos criopreservados em Glicerol e DMSO a 10% encontra-se na Figura 3.

A sobrevivência espermática das massas criopreservadas em glicerol (10%) no período de 30 dias foi superior em relação aos demais tempos (60 dias; $p = 0,0113$; 90 dias $p = 0,0040$), porém não foi observada diferença significativa entre 60 e 90 dias ($p = 0,5963$). Não foram encontradas diferenças na sobrevivência das massas

espermáticas durante o período de criopreservação em DMSO (10%) (30 dias; $p = 0,1728$; 60 dias; $p = 0,1255$; 90 dias; $p = 0,2474$).

A sobrevivência espermática dos espermatóforos criopreservados em glicerol (10%) foi superior no período de 30 dias quando comparada com 90 dias em N_2L ($p = 0,0451$). Entretanto, quando foram criopreservados em DMSO (10%), não houve diferença significativa na sobrevivência durante os períodos de manutenção em N_2L ($p = 0,0992$).

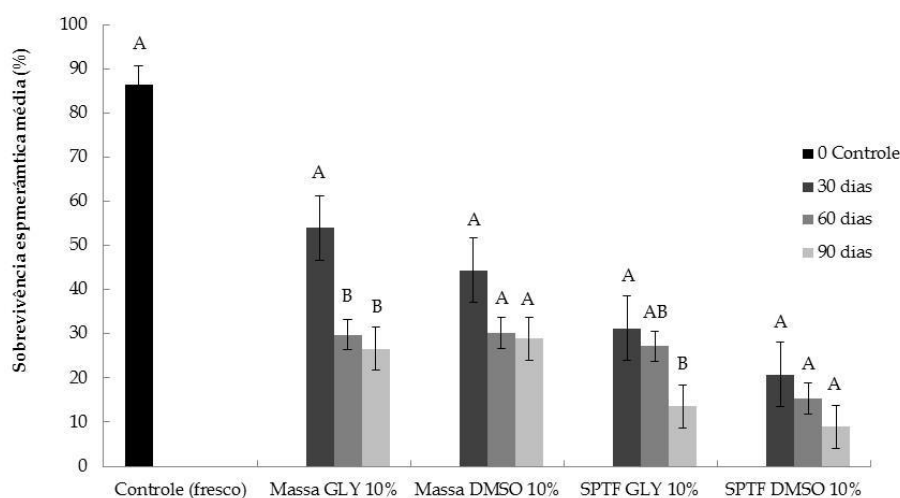


Figura 3. Porcentagem média de sobrevivência espermática das massas espermáticas e dos espermatóforos de *Litopenaeus schmitti* criopreservados em glicerol e DMSO a 10% por 0 (controle), 30, 60 e 90 dias. Os valores assinalados com letras iguais, não denotam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os tempos.

DISCUSSÃO

De acordo com WANG *et al.* (1995), a contagem dos espermatozoides e suas avaliações macroscópicas são utilizadas para caracterizar o potencial reprodutivo em camarões peneídeos.

A principal preocupação em relação aos espermatozoides que tenham sido submetidos à criopreservação é se estes apresentam qualidade, em termos de viabilidade, quando comparados aos frescos. Embora a fertilização seja um critério final em que a qualidade dos espermatozoides descongelados pode ser avaliada, este método é pouco prático, uma vez que a maturação das fêmeas em cativeiro torna-se difícil para a espécie *L. schmitti*.

A viabilidade espermática verificada no presente estudo reduziu com o aumento do tempo de permanência, tanto do espermatóforo quanto da massa espermática em N₂L. Este resultado pode indicar a influência do tempo na queda do metabolismo dos espermatozoides. Várias suposições podem ser inferidas como a perda de proteínas, lipídeos ou carboidratos durante a manutenção das amostras em N₂L, como foi observado por YOO *et al.* (1987), quando verificou a perda de proteínas pela membranas celulares dos espermatozoides do fluido seminal criopreservado de salmão. JEYALECTUMIE e SUBRAMONIAM (1989) observaram o declínio de carboidratos e proteínas em espermatozoides do caranguejo *Scylla serrata* (Forsk., 1775) a -4°C.

Os resultados indicaram que a taxa de resfriamento é um fator crítico na criopreservação do espermatozoide de *L. schmitti*, sendo o mesmo observado por LEZCANO *et al.* (2004) para *Litopenaeus vannamei*.

A menor sobrevivência verificada no protocolo B, utilizado no presente estudo, provavelmente ocorreu devido às crioinjúrias causadas pela formação de cristais de gelo intracelular (não houve, neste caso, a desidratação adequada da célula durante o processo de congelamento), originada pelo congelamento rápido, tornando a membrana celular mais sensível às mudanças osmóticas.

BART *et al.* (2006) congelaram espermatóforos de *Penaeus monodon* em duas etapas: na primeira, a temperatura baixou 15°C min⁻¹ até alcançar

-10°C; posteriormente a queda foi de 2°C min⁻¹, diminuindo de -10°C para -80°C e, finalmente, os espermatóforos foram imersos em N₂L, permanecendo criopreservados por 48 h. Estes autores utilizaram como agentes crioprotetores, DMSO, metanol e etilenoglicol, nas concentrações de 5 e 10%, sendo o melhor resultado observado com DMSO a 5%, obtendo 79,7% de sobrevivência espermática. À medida que aumentaram a concentração dos crioprotetores para 10%, a sobrevivência espermática foi reduzida. Portanto, a sobrevivência elevada dos espermatozoides provavelmente ocorreu devido ao reduzido tempo de exposição dos espermatóforos em N₂L, o que torna difícil a comparação com os resultados obtidos no presente estudo.

Ao trabalharem com duas velocidades de congelamento (rápida e lenta), LEZCANO *et al.* (2004) verificaram que mais de 98% das células espermáticas de *L. vannamei* foram destruídas quando submetidas a uma velocidade de redução de 10°C min⁻¹. No entanto, quando a velocidade da queda da temperatura foi superior a 5°C min⁻¹, as células espermáticas descongeladas de *Sicyonia ingentis* foram danificadas (ANCHORDOGUY *et al.*, 1988), concordando com o protocolo B do presente estudo. Estes autores relatam que a queda da sobrevivência espermática em função da velocidade de resfriamento ("fast freezing") se deve à ruptura da membrana celular, ao contrário do que ocorre com a baixa taxa de resfriamento ("slow freezing"). CHOW *et al.* (1985) também relataram a influência negativa do resfriamento rápido sobre a viabilidade do espermatozoide em *Macrobrachium rosenbergii*.

O congelamento lento do sêmen foi bem sucedido com outras espécies de decápodos, como *S. ingentis* (ANCHORDOGUY *et al.*, 1988), *S. serrata* (JEYALECTUMIE e SUBRAMONIAM, 1989), *L. vannamei* (LEZCANO *et al.*, 2004) e *M. rosenbergii* (CHOW *et al.*, 1985; AKARASANON *et al.*, 2004); concordando com os resultados do presente estudo para o protocolo A, em que a velocidade da queda de temperatura foi de 5°C min⁻¹ até atingir -32°C.

JEYALECTUMIE e SUBRAMONIAM (1989), ao criopreservarem espermatóforos de *S. serrata* a -196°C, -79°C e -4°C por até 30 dias obtiveram até 95% de sobrevivência espermática em glicerol e

89% para o DMSO, corroborando com o presente estudo, no qual experimentos com glicerol apresentaram maior sobrevivência espermática (31,18%) em relação ao DMSO (20,74%). Embora PARKS e GRAHAM (1992) tenham sugerido que o glicerol interfere na extremidade hidrofílica dos fosfolípidos das membranas celulares, conduzindo ao dano das mesmas, esta informação não está de acordo com os resultados encontrados no presente estudo, em que o glicerol mostrou ser o melhor agente crioprotetor para o espermátóforo, quando comparado ao DMSO.

LEZCANO *et al.* (2004) criopreservaram por 2-3 dias espermátóforos, massa espermática e a suspensão espermática em DMSO, metanol, glicerol e etilenoglicol a 10% em duas curvas (rápida e lenta). Os autores observaram uma variação na taxa de sobrevivência espermática de acordo com o crioprotetor e o tipo de material criopreservado. A melhor sobrevivência foi obtida com a massa espermática, utilizando metanol e etilenoglicol a 10%, com 45% e 27% de células normais (presença de espinho), respectivamente, no congelamento lento de $0,5^{\circ}\text{C min}^{-1}$. Esses autores observaram a menor taxa de sobrevivência para o glicerol (~25%) e DMSO (~32%). Para os espermátóforos, os autores verificaram a sobrevivência de aproximadamente 11% em glicerol e 15% em DMSO. Contrariamente, no presente estudo, foram encontrados resultados superiores, sendo a sobrevivência para as massas espermáticas criopreservadas em glicerol de 53,98%, em 30 dias de manutenção em N_2L , e 44,40% em DMSO (protocolo A). Para os espermátóforos criopreservados por 30 dias, a sobrevivência foi 31,18% em glicerol e 20,74% em DMSO.

As diferentes taxas de sobrevivência obtidas para a massa espermática e o espermátóforo podem ser explicadas pela utilização de distintas metodologias de descongelamento; entretanto, SALAZAR *et al.* (2008) relataram que a parede do espermátóforo pode servir de barreira, interferindo no efeito do crioprotetor sobre a célula. Tal inferência corrobora com os resultados do presente estudo, uma vez que se verificou menor sobrevivência espermática dos espermátóforos em relação às massas espermáticas criopreservadas. Outro fato que pode ser levado em consideração é que o material

adesivo que envolve os espermatozoides das massas espermáticas pode contribuir para a proteção contra os danos do congelamento e para a mudança da osmolaridade nas mesmas.

SALAZAR *et al.* (2008), utilizando protocolo semelhante ao do presente estudo (protocolo A), criopreservaram massa espermática, por 72 h, utilizando metanol 10% e obtiveram maior sobrevivência (60%) em relação aos espermátóforos (~25%). Estes resultados foram semelhantes ao do presente estudo, porém utilizando-se o glicerol e o DMSO a 10% no período de 30 dias.

ANCHORDOGUY *et al.* (1988), estudando a toxicidade de diferentes crioprotetores, observaram a superioridade para o DMSO (5%) em relação aos demais crioprotetores utilizados (glicerol, sacarose, prolina e trealose). Tal resultado difere do presente estudo com *L. schmitti*, devido à ausência de diferenças entre os crioprotetores (glicerol e DMSO a 10%) para a massa espermática, porém, corrobora com GWO (2000), afirmando que a escolha do crioprotetor depende da espécie de crustáceo.

LEENA GRACE e NATARAJAN (2003) verificaram que a combinação dos crioprotetores glicose, glicerol, DMSO e metanol para a criopreservação do sêmen de *Penaeus monodon* (Fabricius, 1798) por 30 dias resultou em 92,3% de sobrevivência espermática para glicose/metanol (considerada superior) e 86,5% (considerada boa) para o glicerol isoladamente; já para o DMSO foi considerado moderado.

VUTHIPHANDCHAI *et al.* (2007) também testaram um protocolo de criopreservação de espermátóforos de *P. monodon* e três métodos de descongelamento. Dentre os agentes crioprotetores testados (DMSO, etilenoglicol, propilenoglicol, formamida e metanol nas concentrações 5, 10, 15 e 20%), o DMSO a 5% foi o que apresentou o melhor resultado no teste de toxicidade. Esses autores, posteriormente, avaliaram diferentes velocidades de queda da temperatura e observaram a melhor sobrevivência espermática com a redução mais lenta da temperatura, confirmando os resultados do presente estudo para o protocolo A em que a temperatura final foi de -32°C . Os autores criopreservaram os espermátóforos em DMSO a

5% por 210 dias em N₂L e verificaram queda na sobrevivência a partir de 60 dias (87,3%) e 90 dias (53,3%), confirmando os resultados do presente estudo. Embora os resultados de viabilidade obtidos por esses autores sejam superiores em relação ao atual estudo, também houve o efeito negativo do tempo sobre a sobrevivência espermática.

Segundo MONTROYA (2001), ocorre uma redução da qualidade dos espermátóforos em *Litopenaeus setiferus*, *L. stylirostris* e *L. vannamei*, quando os mesmos estão em cativeiro, influenciando na qualidade espermática em machos maduros. Estas observações são importantes para a continuidade dos esforços em relação à criopreservação, uma vez que, por meio desta biotecnologia, a preservação tanto do espermátóforo quanto da massa espermática poderia beneficiar não somente a conservação dos estoques genéticos masculinos, mas também as aplicações em avanços tecnológicos, como por exemplo, a manipulação genética, o que beneficiaria tanto a preservação da espécie como a aquicultura.

Assim como no presente estudo, BRAY e LAWRENCE (1998) não observaram diferenças na morfologia dos espermatozoides (contagem espermática e células anormais) de *L. vannamei* quando mantiveram o vaso deferente e a ampola terminal a 15°C por 36 h, demonstrando a possibilidade de utilização de sêmen *post mortem*.

Como visto anteriormente, os crioprotetores podem ser utilizados isoladamente ou em combinação; portanto, sugere-se a inclusão de crioprotetores não permeáveis (gema de ovo, leite, sacarose ou trealose), que já estão sendo usados em mamíferos e em alguns trabalhos com crustáceos, na tentativa de melhorar a sobrevivência espermática após a criopreservação. Além dos crioprotetores internos e externos, outros fatores como a taxa de resfriamento e a temperatura de descongelamento podem melhorar e/ou otimizar os resultados aqui descritos.

CONCLUSÕES

Tanto o glicerol como o DMSO podem ser utilizados na criopreservação da massa espermática de *L. schmitti*, entretanto para a

criopreservação do espermátóforo, sugere-se a utilização do glicerol a 10%.

A utilização dos espermatozoides de animais 48 h *post mortem* de *L. schmitti*, para a criopreservação foi constada nesse estudo, sendo uma nova alternativa para o uso futuro do material genético, desde que os machos *post mortem* estejam comprovadamente livres de patógenos.

REFERÊNCIAS

- AKARASANON, K.; DAMRONGPHOL, P.; POOLSANGUAN, W. 2004 Long-term cryopreservation of spermatophore of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Aquaculture Research*, 35: 1415-1420.
- ANCHORDOGUY T.; CROWE J.H.; GRIFFIN F.J.; CLARK, W.H. 1988 Cryopreservation of sperm from the marine shrimp *Sicyonia ingentis*. *Cryobiology*, 25: 238-43.
- ARCE, S.M.; MOSS, S.M.; ARGUE, B.J. 1999 Artificial insemination and spawning of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*: implications for a selective breeding program. *UJNR Technical Report*, 28: 5-8.
- BART, A.N.; CHOOSUK, S.; THAKUR, D.P. 2006 Spermatophore cryopreservation and artificial insemination of black tiger shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius). *Aquaculture Research*, 37: 523-528.
- BEHLMER, S.D.; BROWN, G. 1984 Viability of cryopreserved spermatozoa of the horseshoe crab, *Limulus polyphemus* L. *International Journal Invertebrate Reproduction Development*, 7: 193-199.
- BRAVANISHANKAR, S. e SUBRAMONIAM, T. 1997 Cryopreservation of spermatozoa of the edible mud crab *Scylla serrata* (Forsk.). *Journal of Experimental Zoology*, 277: 326-336.
- BRAY, W.A. e LAWRENCE, A.L. 1998 Male viability determinations in *Penaeus vannamei*: evaluation of short-term storage of spermatophores up to 36 h and comparison of Ca-free saline and seawater as sperm homogenate media. *Aquaculture*, 160: 63-67.
- CASTELO-BRANCO, T.C.; BAMBOZZI, A.F.; OSHIRO, L.M.Y.; MELLO, M.R.B. 2014 Cryopreservation and sperm storage of the

- white shrimp. *Boletim do Instituto de Pesca*, 40(1): 17-22.
- CHOW, S.; TAKI, Y.; OGASAWARA, Y. 1985 Cryopreservation of spermatophore of the fresh water shrimp, *Macrobrachium rosenbergii*. *The Biological Bulletin*, 168: 471-5.
- ELMOAZZEN, H.Y. 2000 Parameters affecting water permeability across biological cell membranes. 141p.- Dissertação de mestrado. University of Alberta (Edmonton). Disponível em: <http://www.collectionscanada.gc.ca/obj/s4/f2/dsk1/tape3/PQDD_0009/MQ60118.pdf>
- FRIEDLER, S.; GIUDICE, S.C.; LAMB, E.J. 1988 Cryopreservation of embryos and ova. *Fertility and Sterility*, 49: 743-764.
- FULLER, B.J.; LANE, N.; BENSON, E.E. 2004 Life in the frozen state. In: MAZUR, P. *Principles of Cryobiology*. CRC Press. p.3-65.
- GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. 2008 *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. 2ª ed. São Paulo: Roca. 408p.
- GWO, J.C. 2000 Cryopreservation of aquatic invertebrate semen: a review. *Aquaculture Research*, 31: 259-271.
- HOVATTA, O. 2005 Methods for cryopreservation of human ovarian tissue. *Reproductive Bio Medicine Online*, 10: 729-734.
- JEYALECTUMIE, C. e SUBRAMONIAM, T. 1989 Cryopreservation of spermatophores and seminal plasma of the edible crab *Scylla serrata*. *Biological Bulletin*, 177: 247-253.
- LEENA GRACE, B. e NATARAJAN, P. 2003 Cryopreservation of *Penaeus monodon* (Fabricius, 1798) spermatozoa. *Indian Journal of Fisheries*, 50(3): 415-419.
- LEZCANO, M.; GRANJA, C.; SALAZAR, M. 2004 The use of flow cytometry in the evaluation of cell viability of cryopreserved sperm of the marine shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Cryobiology*, 48: 349-56.
- MATOS, D.L.; ARAÚJO, A.A.; ROBERTO, I.G.; TONIOLLI, R. 2008 Análise computarizada de espermatozoides: revisão de literatura. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 32(4): 225-232.
- MAZUR, P. 1985 Basic concepts in freezing cells. In: JOHNSON L.A. e LARSSON K. (eds.) *Proceedings of the First International Conference on Deep Freezing of Boar Semen*. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences. p.91-111.
- MAZUR, P.; RALL, W.F.; LEIBO, S.P. 1984 Kinetics of water loss and the likelihood of intracellular freezing in mouse ova. Influence of the method of calculating the temperature dependence of water permeability. *Cell Biophysics*, 6: 197-213.
- MEMON, A.J.; TALPUR, A.D.; KHAN, M.I.; FARIDDUDIN, M.O.; SAFIAH, J. 2012 Optimization of spermatophores cryopreservation protocolo of banana shrimp (*Penaeus merguensis*) (De Man, 1888). *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 11(10): 1688-1704.
- MONTOYA, J.M. 2001 *Controlled reproduction of penaeid shrimp: a contribution to its improvement*. 149p.
- NIMRAT, S.; SIRIBOONLAMOM, S.; ZHANG, S.; XU, Y.; VUTHIPHANDCHAI, V. 2006 Chilled storage of white shrimp (*L. vannamei*) spermatophores. *Aquaculture*, 261: 944-951.
- PARKS, J.E. e GRAHAM, J.K. 1992 Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, 38: 209-222.
- PÉREZ-JAR, L. 2005 *Fisiología y calidad reproductiva de machos de camarón blanco Litopenaeus schmitti en condiciones de cautiverio*. La Paz. 150p. (Tese de Doutorado. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste). Disponível em: <http://www.oceandocs.org/bitstream/1834/1544/1/Tesis_Doctorado_Lou_rdes_Perez_Jar.pdf>
- PONGTIPPATEE, P.; VANICHVIRIYAKIT, R.; CHAVADEJ, J.; PLODPAI, P.; PRATOOMCHART, B.; SOBHON, P.; WITHYACHUMNARNKUL, B. 2007 Acrosome reaction in the sperm of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Decapoda, Penaeidae). *Aquaculture Research*, 38: 1635-1644.
- SALAZAR, M.; LEZCANO, M.; GRANJA, C. 2008 Protocol for cryopreservation of *Penaeus vannamei* sperm cells. In: CABRITA, E.; ROBLES, V.; HERRÁEZ, P. *Methods in Reproductive*

- Aquaculture. Marine and Freshwater Species*. Boca raton, FL, CRC Press, p.505-508.
- SANTOS, R.R.; CELESTINO, J.J.H.; LOPES, C.A.P.; MELO, M.A.P.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, JR. 2008 Criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais de animais domésticos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 32: 9-15.
- UFV - UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA. 2007 SAEG – Sistema de análises estatísticas e genéticas. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2007. Manual do usuário, 150p. (versão 9.1).
- VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. 2002 Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, 57: 149-179.
- VUTHIPHANDCHAI, V.; NIMRAT, S.; KOTCHARAT S.; BART, A.N. 2007 Development of a cryopreservation protocol for long-term storage of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) spermatophores. *Theriogenology*, 68: 1192-1199.
- WANG, Q.Y.; MISAMORE, M.; JIANG, C.Q.; BROWDY, C.L. 1995 Egg water induced reaction and biostain assay of sperm from marine shrimp *Penaeus vannamei*: dietary effects on sperm quality. *Journal of the World Aquaculture Society*, 26: 261-271.
- YOO, B.Y.; RYAN, M.A.; WIGGS, A.J. 1987 Loss of protein from spermatozoa of Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) because of cryopreservation. *Canadian Journal of Zoology*, 65: 9-13.