

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE E CRIOPRESERVAÇÃO EM FORMA DE "PELLETS"
DO SÊMEN DO BAGRE, *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840)

(Spermatozoa evaluation and cryopreservation in pellets form of "bagre", *Rhamdia hilarii*
(Valenciennes, 1840) semen.

Washington FOGLI DA SILVEIRA¹
Emico Takira KAVAMOTO¹
Massuka Yamane NARAHARA¹

RESUMO

Foram estudadas as características seminais e a criopreservação do sêmen de 10 e 6 "bagres", *Rhamdia hilarii* respectivamente, com vistas à manutenção de um banco de sêmen congelado de exemplares de valor econômico. O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Aquática do Instituto de Pesca (São Paulo). Os valores médios das características seminais foram: volume-seminal: 1,15 ml; concentração espermática: $55,80 \times 10^6/\text{mm}^3$; estimativa percentual subjetiva da motilidade espermática: 72,00% e porcentagem de espermatozoides avaliados objetivamente pelo método de coloração diferencial: 76,09%. O sêmen de cada reprodutor, diluído na proporção de 1:3, foi congelado em forma de "pellets" sobre gelo seco (-79°C) e armazenado em nitrogênio líquido (-196°C). Decorridos 30 minutos de criopreservação as amostras de sêmen descongeladas e examinadas sob microscopia de contraste de fase revelaram em média 31,94% de formas vivas. Após 36 meses de congelamento, o material apresentou uma taxa de 30% de espermatozoides móveis.

ABSTRACT

The spermatoc characteristics and the cryopreservation of 10 and 6 "bagres", *Rhamdia hilarii* sperm respectively, were studied with the purpose to maintain a semen frozen bank for artificial fertilization of freshwater fishes of economical value. This paper was carried out at Laboratório de Biologia Aquática do Instituto de Pesca, (São Paulo - Brazil). The average of spermatoc characteristics were: semen volume: 1,15 ml, spermatozoa concentration: $55,80 \times 10^6/\text{mm}^3$; spermatozoa motility: 72,00% and percentage of live spermatozoa by differential staining method: 76,09%. The semen of each male, mixed with extender at ratio of 1:3, was frozen in pellets form on dry ice (-79°C) and storage in liquid nitrogen (-196°C). Samples thawed and examined under phase-contrast microscopy presented an average of 31,94% live spermatozoa. Spermatozoa showed 30% motility 36 months after freezing.

1. INTRODUÇÃO

O melhoramento genético em animais domésticos foi desenvolvido em grande parte pela aplicação da técnica de inseminação artificial com sêmen criopreservado de reprodutores altamente selecionados. Esta técnica também poderá abrir novas oportunidades no cultivo de peixes de água doce, sobretudo ao lado do desenvolvimento dos trabalhos de pesquisa, visando a indução da reprodução em peixes com hormônios específicos.

A semelhança de HOLTZ et alii (1976), BUYUKHATIPOGLU & HOLTZ (1978), STOSS; BUYUKHATIPOGLU; HOLTZ (1978) STEIN & BAYRLE (1978), LEGENDRE & BILLARD (1980), STOSS & HOLTZ (1981 a b) que estudaram o congelamento rápido em gelo seco (-79°C) e a criopreservação em nitrogênio líquido (-196°C) do sêmen da truta arco-íris, *Salmo gairdneri*, aqui estuda-se o sêmen do bagre, *Rhamdia hilarii*.

Em nota preliminar, FOGLI DA SILVEIRA; KAVAMOTO; NARAHARA (1981) descreveram os primeiros resultados sobre a avaliação do sêmen fresco, assim como a criopreservação do material fecundante em gelo seco, da espécie considerada neste estudo, quando então assinalaram 30% de motilidade espermática.

COSER; GODINHO; RIBEIRO (1984) avaliaram antes do congelamento os sêmens do curimatã, *Prochilodus scrofa* e dourado, *Salminus maxillosus*, e verificaram cerca de 70% de células em movimentação. Após o congelamento do sêmen diluído em vapores de nitrogênio líquido, encontraram ao redor de 5% e até 40% de motilidade espermática para a primeira e segunda espécie respectivamente.

NAGASE & NIWA (1964) estudaram a congelção do sêmen de bovinos em forma de "pellets".

(¹) Pesquisadores Científicos - Seção de Biologia Aquática - Divisão de Pesca Interior - Instituto de Pesca.
Enviado para publicação em 14.05.84.

e observaram uma taxa de 45,7 e 61,8% de espermatozoides sobreviventes pós-congelamento.

FOGLI DA SILVEIRA et alii (1984) trabalhou com sêmen de truta arco-íris, *Salmo trutta* Gibbons, congelando o material em gelo seco, no entanto, não descreveu a taxa de recuperação espermática pós-congelamento.

O bagre, *Rhamdia hilarii*, apresenta período de reprodução bastante prolongado, estendendo-

se de setembro a fevereiro, com atividade reprodutiva mais intensa de novembro a dezembro (NARAHARA, 1983). Todavia nesta espécie nada existe na literatura referente a sêmen.

Este trabalho pretende estimar parâmetros sobre o volume do sêmen, concentração espermática, porcentagem de elementos vivos no sêmen, como também, preservar o material fecundante sob congelamento da referida espécie.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi desenvolvido no laboratório da Seção de Biologia Aquática do Instituto de Pesca (São Paulo), utilizando-se sêmen de 10 (dez) bagres, *Rhamdia hilarii*, capturados no rio Jaguarí, nas proximidades da cidade de Jaguariuna, Estado de São Paulo (22° 42' 38" S, 47° 00' 20" W), nos meses de novembro e dezembro de 1980.

Anotados os dados de comprimento total (cm) e peso total (g), os exemplares receberam injeções intramusculares de HCG (gonadotrofina coriônica humana) na dosagem de 2 UI/g de peso total.

Os peixes foram mantidos em caixas de cimento-amianto, contendo água na temperatura de 24°C em número de dois machos para cada caixa.

Após 8 horas, o sêmen de cada reprodutor foi coletado por massagem abdominal em tubos de centrifuga graduados em décimos de ml, os quais foram colocados em pequenos recipientes de isopor contendo água ao redor de 24°C. Procedeu-se em seguida, a avaliação quali-quantitativa do material espermático.

Através de exame macroscópico do sêmen no próprio tubo coletor, anotou-se o volume coletado. Evitou-se a utilização de material contaminado por sangue, fezes ou urina.

O exame microscópico subjetivo da motilidade dos espermatozoides, foi efetuado sob microscopia de contraste de fase (400x), após indução da atividade celular misturando-se uma gota de sêmen com pouco mais de duas gotas de água destilada em uma lâmina, sobre a qual colocou-se uma lamínula. A estimativa da porcentagem de células móveis no campo microscópico, seguiu uma escala arbitrária de 0 a 100% (SALISBURY & VANDE-MARK, 1964).

A quantidade total de espermatozoides foi obtida pela contagem celular direta em câmara hematómica de Neubauer "Improved". Antes da contagem utilizou-se a solução de formol-salina (HANCOCK, 1957) para diluir e matar os espermatozoides sem danificá-los. A pipeta para glóbulos vermelhos foi preenchida até o primeiro traço, com sê-

men fresco, o qual foi homogeneizado em 5 ml da solução citada, obtendo-se uma diluição de 1:5000. O número de espermatozoides contados no retículo da câmara hematómica foi multiplicado pelo fator 250.000, encontrando-se assim, a quantidade de células por mm³.

Para avaliação da porcentagem de espermatozoides vivos pelo método de coloração diferencial, foi empregada a técnica recomendada por BLOM (1950), que utiliza a mistura de sêmen fresco com os corantes eosina e nigrosina, e, imediata preparação de esfregaços do tipo sanguíneo. "Os espermatozoides mortos coram-se em vermelho, enquanto que os vivos permanecem não corados". De cada amostra foram contadas trezentas células (FRIBOURGH, 1966), anotando-se o número de espermatozoides corados e não corados.

Para testar se houve ou não diferença estatística significativa, entre a porcentagem da motilidade espermática subjetiva e a porcentagem de espermatozoides vivos avaliados objetivamente pelo método de coloração diferencial, foi aplicado o teste de qui-quadrado (χ^2), tendo sido estabelecido o nível de 5% para rejeição ou não da hipótese de nulidade (H₀), (GOLDSTEIN, 1965).

Com relação ao congelamento, 6 (seis) reprodutores tiveram seus sêmens congelados.

Numa primeira etapa do processo de congelamento (em seqüência a valorização do material espermático) cada amostra em recipiente de isopor contendo água a 24°C, começou a receber a cada 5 minutos cubos de gelo ao seu redor, a fim de, baixar tanto a temperatura d'água como a do sêmen para 2°C, o que foi conseguido decorridos 30 minutos.

A segunda etapa consistiu na diluição do sêmen com o diluente "V2e" preconizado por STEIN & BAYRLE (1978), na proporção de 1:3. Este meio diluente, que se encontrava também, a 2°C, foi adicionado ao sêmen de cada macho, lentamente, até completa homogeneização do material fecundante. O sêmen diluído permaneceu durante 15 (quinze) minutos sob refrigeração a 2°C (tempo de equilíbrio) para em seguida ser congelado.

TABELA 1
Características do sêmen fresco e motilidade dos espermatozoides pós-congelamento do bagre, *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840) - Laboratório de Biologia Aquática - São Paulo - novembro e dezembro - 1980

nº do peixe	SÊMEN FRESCO						nº espermatozoides vivos no volume de sêmen coletado, calculado p/ motilidade (%) (2)	nº espermatozoides vivos em 0,2 ml (2)	SÊMEN CRIO-PRESERVADO				
	volume de sêmen ml	nº total de espermatozoides por mm ³ (1)	motilidade espermática subjetiva %	espermatozoides vivos pela coloração diferencial %	nº espermatozoides vivos	motilidade espermática pós-congelamento em 12-12-80 %			nº espermatozoides pós-congelamento em cada "pellet" (1)	nº "pellets" produzidos	motilidade espermática pós-congelamento em 12-12-80 %		
											E	E	E
01	1,5	53,45	75	78,03	2,00	30	600	27					
02	0,5	45,30	80	81,02	1,81	25	540	8					
03	1,0	52,45	70	74,62	1,84	35	550	18					
08	1,5	62,50	80	81,39	2,50	40	880	25					
13	2,0	59,00	80	85,58	2,36	35	830	27					
14	0,8	52,00	70	74,86	1,82	30	550	10					
09	1,0	62,30	70	74,24	-	-	-	-					
10	1,0	59,45	60	65,78	-	-	-	-					
11	1,4	60,20	75	78,47	-	-	-	-					
12	0,8	51,30	60	66,93	-	-	-	-					
\bar{X}	1,15	55,80	72,00	76,09		31,94	660	total =					
s	0,44	5,69	7,53	6,23				115					
CV%	38,52	10,20	10,46	8,19									
			χ^2 5% = 3,84	χ^2 = 0,11									

(1) - Os valores devem ser multiplicados por 10⁶

(2) - Os valores devem ser multiplicados por 10⁹

E = "pellet" examinado

Na terceira etapa processou-se o congelamento rápido, gotejando-se 0,2 ml de sêmen diluído diretamente sobre a superfície de um bloco de gelo seco (-79°C). Desta forma, a temperatura do material declinou de 2°C a -79°C obtendo-se assim os "pellets" (NAGASE & NIWA, 1964), os quais após 15 (quinze) minutos, foram imersos diretamente em nitrogênio líquido (-196°C). Em seguida foram transferidos para "container" (MVE-MOD-APOLLO-SX 44) especial, contendo nitrogênio líquido, onde se processou a crio-preservação.

Após 30 minutos em nitrogênio líquido, tempo suficiente para se obter a congelação profunda

(-196°C), e a crio-preservação por tempo indefinido, três "pellets" de cada reprodutor foram descongelados em separado e em temperatura ambiente, numa solução de bicarbonato de sódio a 1%. Imediatamente as células espermáticas eram examinadas sob microscopia de contraste de fase (400X), para verificação da qualidade do material, recebendo classificação puramente subjetiva.

Após 36 meses do congelamento, três "pellets" de cada macho, foram examinados a fim de se verificar a recuperação do material através de motilidade dos espermatozoides, face ao tempo de conservação.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No período reprodutivo de novembro a dezembro de 1980, foram realizadas coletas de sêmen do bagre *Rhamdia hilarii*, período este que, a espécie apresenta atividade reprodutiva mais intensa.

A média de comprimento total e peso dos exemplares foi respectivamente: 21,90 cm e 89,73 g.

Os valores médios das características do sêmen fresco foram: volume de sêmen: 1,15 ml; concentração de espermatozoides: $55,80 \times 10^6/\text{mm}^3$; motilidade espermática subjetiva: 72,00% e espermatozoides vivos avaliados objetivamente pelo método de coloração diferencial: 76,09% (TABELA 1).

Pelos dados dos elementos vivos calculados, utilizando a motilidade espermática (72,00%) e espermatozoides vivos pela coloração diferencial (76,09%), observa-se que não há diferença estatística significativa entre os dois métodos de avaliação empregados, ao nível de 5% de significância ($\chi^2 = 0,12$).

No que se refere a congelação do sêmen diluído, COSER; GODINHO; RIBEIRO (1984) trabalharam com mesmo diluente e mesmo processo de congelamento, usando sêmen de curimatá, *Prochilodus scrofa* e dourado, *Salminus maxillosus* e verificaram respectivamente 5% e 40% de motilidade espermática pós-congelamento. Inere-se disto, que o sêmen de cada espécie pode comportar-se de modo diferente, quando submetido ao mesmo processo de congelamento. Neste estudo, o sêmen congelado de todos os exemplares, pelo método rápido em gelo seco e crio-preservação em nitrogênio líquido, revelou "in vitro", após descongelamento, 31,94% de espermatozoides móveis (TABELA 1).

É oportuno assinalar que, após 36 meses do congelamento (último exame em dezembro de 1983), o material apresentou uma taxa estimada em torno de 30% de espermatozoides com motilidade ativa.

4. CONCLUSÕES

- 1) Foram obtidas as características seminais do bagre, *Rhamdia hilarii* em condições de laboratório.
- 2) Verifica-se pelos resultados obtidos pós-descongelamento do sêmen da espécie estudada, que é possível a crio-preservação do material fecundante.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BLOM, E. 1950 A one-minute live-dead sperm stain by means of Eosin-Nigrosin. *Fertility and Sterility*, New York, 1 (2): 176-7.
- BUYUKHATIPOGLU, S. & HOLTZ, W. 1978 Preservation of trout sperm in liquid or frozen state. *Aquaculture*, Amsterdam, 14 (1): 49-56, May.
- COSER, A.M.; GODINHO, H.; RIBEIRO, D. 1984 Cryogenic preservation of spermatozoa from *Prochilodus*

FOGLI DA SILVEIRA, W.; KAVAMOTO, E.T.; NARAHARA, M.Y. 1985 Avaliação da qualidade e crio-preservação em forma de "pellets" do sêmen do bagre, *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840). *B. Inst. Pesca*, São Paulo, 12 (4): 7-11, dez.

- scrofa* and *Salminus maxillosus*. *Aquaculture*, Amsterdam, 37: 387-90.
- FOGLI DA SILVEIRA, W.; KAVAMOTO, E.T.; NARAHARA, M.Y. 1981 Avaliação quali-quantitativa e crio-preservação em forma de "pellets" do sêmen do bagre, *Rhamdia hilarii*. In: SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 33^o. Salvador, 1981. Resumo. . . Salvador, SBPC, p. 620.
- FOGLI DA SILVEIRA, W. et alii 1984 Primeiros resultados de fertilização com sêmen congelado da truta arco-íris, *Salmo irideus* Gibbons, no Brasil. *B. Inst. Pesca*, São Paulo, 11 (único): 131-36, Dez.
- FRIBOURGH, J.H. 1966 The application of differential staining method to low-temperature studies on goldfish spermatozoa. *The progressive fish culturist*, 28 (4): 227-31.
- GOLDSTEIN, A. 1965 *Biostatistics: an introductory text*, 2 ed. New York, MacMillan, 272 p.
- HANCOCK, J.L. 1957 The morphology of boar spermatozoa. *J. Roy Micro Soc.* 76:84.
- HOLTZ, W. et alii 1976 Preservation of trout spermatozoa for varying periods. In: FAO TECHNICAL CONFERENCE ON AQUACULTURE, 2, May-June, Kyoto, p. 1-3.
- LEGENDRE, M. & BILLARD, R. 1980 Cryoconservation du sperm de truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri* R.). *Bull. Fr. Pisc.*, Paris, 53 (278): 11-33, juil-sept.
- NAGASE, H. & NIWA, T. 1964 Deep freezing bull semen in concentrated pellet from I. Factors affecting survival of spermatozoa. In: V CONGRESSO INTERNAZIONALE PER LA RIPRODUZIONE ANIMALE E LA FECONDAZIONE ARTIFICIALE, 5, 6-13 set., Trento, p. 410-15.
- NARAHARA, M. Y. 1983 *ESTRUTURA DA POPULAÇÃO E REPRODUÇÃO DE Rhamdia hilarii (Valenciennes, 1840) (OSTEICHTHYES, SILURIFORMES, PIMELODIDAE)* 226 p. (Tese de doutoramento, Departamento de Zoológia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo).
- SALISBURY, G. W. & VANDEMARK, N.L. 1964 *Fisiología de la reproducción e inseminación artificial de los bovidos*. Trad. D. José Maria Santiago Luque. Zaragoza, Acribia, 707 p. Original inglês.
- STEIN, H. & BAYRLE, H. 1978 Cryopreservation of the sperm of some freshwater teleostes. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, Paris, 18 (4): 1073-76. (Int. Symp. Rep. Phys. Fish., 19-21 (Sept. 1977)).
- STOSS, J.; BUYUKHATIPOGLU, S.; HOLTZ, W. 1978 Short-term and cryo-preservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) sperm. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, Paris 18 (4): 1077-82. (Int. Symp. Rep. Phys. Fish., 19-21 Sep., 1977).
- STOSS, J. & HOLTZ, W. 1981a Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm. I. Effect of thawing solution, sperm density and interval between thawing and insemination. *Aquaculture*, Amsterdam, 22 (1-2): 97-104, Jan.
- STOSS, J. & HOLTZ, W. 1981b Cryopreservation of rainbow trout, (*Salmo gairdneri*) sperm II. Effect of pH and presence of a buffer in the diluent. *Aquaculture*, Amsterdam, 25 (2-3) 217-22, Aug.