

INFLUÊNCIA DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS SOBRE A MOTILIDADE E MORFOLOGIA ESPERMÁTICA PÓS DESCONGELAÇÃO DE *PROCHILODUS BREVIS*

(Influence of sulfated polysaccharides on post-thawing sperm motility and morphology of *Prochilodus brevis*)

Renata Vieira do NASCIMENTO^{1*}; Vanessa Alves PEREIRA¹; Priscila Silva de ALMEIDA-MONTEIRO¹; Yara Silvino SALES²; José Ariévilto Gurgel RODRIGUES³; Ianna Wivianne Fernandes ARAÚJO³; Carminda Sandra Brito SALMITO-VANDERLEY¹

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará (UECE). Av. Dr. Silas Munguba, 1700 - Itaperi, Fortaleza - CE, 60714-903; ²Curso de Ciências Biológicas (UECE);

³Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca (UFC).

*E-mail: renatavieiraa@hotmail.com

ABSTRACT

This research aims to verify the influence of sulfated polysaccharides, extracted from the skin of tilapia, on the after thawing motility and morphology of *P. brevis* sperm. For this, 17 males were hormonally induced to reproduce, through the application of two doses of pituitary carp extract, 0.4 and 4.0mg kg⁻¹. After the seminal collection, objective analyzes were performed and samples with motility greater than 80% were selected to form the pools. Then, the pools were frozen in solution supplemented, or not, with different concentrations of glycosaminoglycans (GAGs): 0 (control); 0.5; 1.0; 1.5; 2.0; 2.5; 3.0; 3.5; 4.0; 4.5 or 5.0mg mL⁻¹ (total of 10 treatments). The samples were placed in 0.25 mL French straws and submitted to an equilibrium time of 10 minutes at 4 °C. Then, they were kept in the dry shipper for 15 minutes and finally stored in liquid nitrogen. After 15 days, samples were thawed in a water bath at 30 °C for 16 seconds and evaluated for sperm motility and morphology. Thus, it was observed that the increase in GAGs caused a decrease in sperm motility, however the control and the concentration of 0.5mg mL⁻¹ presented very similar data. On the other hand, no decrease in normal sperm was observed with an increase in the concentration of GAGs. Therefore, it is concluded that the lowest concentration of GAGs is the most adequate to supplement the sperm freezing medium.

Key words: glycosaminoglycans, cryobiology, fish.

INTRODUÇÃO

Prochilodus brevis (Steindachner, 1875) é um peixe reofílico (Characiform, Prochilodontidae) do semiárido brasileiro, conhecido como curimatã comum. Contudo, fatores como a construção de barragens, a seca e a sobrepesca durante o período reprodutivo colocam em risco a sobrevivência da espécie (GURGEL *et al.*, 2012). Assim, estudos envolvendo técnicas de reprodução artificial, como a criopreservação seminal, vem sendo desenvolvidos a fim de otimizar o desenvolvimento da piscicultura e a conservação de *P. brevis* no ambiente natural (NUNES *et al.*, 2016).

Em estudos desenvolvidos, é percebida a boa interação dos espermatozoides de *P. brevis* com o meio de congelamento (5% de glicose e 10% de dimetilsulfóxido - DMSO) suplementado com agentes antioxidantes (ALMEIDA-MONTEIRO *et al.*, 2017). Esses resultados são promissores, uma vez que durante a criopreservação os espermatozoides ficam mais vulneráveis devido ao aumento das espécies reativas de oxigênio (CABRITA *et al.*, 2011). Assim, a suplementação do meio de congelamento com agentes antioxidantes naturais é uma estratégia interessante para melhorar a viabilidade dos espermatozoides pós-descongelamento.

Os polissacarídeos sulfatados são polímeros, que geralmente possuem ação antioxidante e apresentam-se em forma de glicosaminoglicanos (GAGs). Salles *et al.* (2017) descreveram que na pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*) existem GAGs e isso é relevante, uma vez que este é um dos peixes mais cultivados do mundo, o que gera alta produção de resíduos. Atualmente, ainda não se sabe quanto a ação antioxidante das GAGs encontradas na pele de tilápia, contudo Zhang *et al.* (2012) relatam que quando em forma de gelatina este subproduto apresenta substâncias com grande atividade antioxidante. A aplicação de GAGs na criopreservação de espermatozoides de peixes é muito recente, porém tem-se o estudo de Pereira *et al.* (2020) que descreveu resultados promissores para a conservação espermática de tambaqui (*Colossoma macropomum*). Diante disso, a pesquisa tem como objetivo verificar a influência das GAGs sobre a motilidade e morfologia espermática pós-descongelação de *P. brevis*.

MATERIAL E MÉTODOS

Seleção dos reprodutores e análise do sêmen fresco

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Animais da Universidade Estadual do Ceará (UECE; protocolo número, 09664402/2019). O experimento foi realizado em outubro/2019 em Fortaleza, Ceará, Brasil. Foram utilizados 17 machos de *P. brevis*, pertencentes ao Laboratório de Biotecnologia da Reprodução de Peixes (LBRP), localizado na Universidade Estadual do Ceará. Foi realizada indução hormonal a reprodução, coleta seminal e a análise computadorizada da motilidade espermática. Para isso, 1µL de sêmen foi colocado em uma câmara de Makler, ativado com 100µL de NaCl (125mM), e analisado no *Computer-Assisted Sperm Analysis* (CASA), utilizando o *software Sperm Class Analyzer* (SCA; Microptics®; Barcelona, Espanha). Amostras com motilidade superior de 80% foram utilizadas para formar *pools* (n=6).

Criopreservação seminal e análise espermática

Os *pools* (n=6) foram diluídos (1: 9 - sêmen: diluente) e congelados em solução contendo 5% de glicose e 10% de DMSO, que foi suplementada ou não com diferentes concentrações de GAGs: 0 (controle), 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5 e 5,0 mg mL⁻¹ (total de 10 tratamentos). A congelação e descongelação das amostras ocorreram conforme descrito por Nunes *et al.* (2016). Por fim, as amostras descongeladas foram avaliadas quanto à motilidade (descrita anteriormente) e morfologia espermática.

Para a análise da morfologia espermática, os espermatozoides foram fixados em solução de citrato de formaldeído a 4% (1:100; solução de espermatozoides: fixador) e corados com Rosa de Bengala na proporção de 1:10 (corante: sêmen fixado). Duas lâminas por amostra foram preparadas e 200 células (100 espermatozoides por lâmina) foram avaliadas em microscópio óptico (400×). A classificação morfológica dos espermatozoides foi realizada com base em Miliorini *et al.* (2011).

Análise Estatística

O grau de associação entre os parâmetros analisados e as diferentes concentrações dos GAGs foi examinado por regressão linear (PROC REG). Os dados foram expressos como média±desvio padrão das médias e o nível de significância considerado foi $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sêmen coletado foi utilizado para preparar seis *pools*, que apresentaram $94,93 \pm 4,80\%$ de espermatozoides móveis e $75,25 \pm 3,84\%$ espermatozoides normais. Os dados encontrados para sêmen fresco de *P. brevis* são semelhantes aos da literatura (NUNES *et al.*, 2016).

A taxa de motilidade total do controle foi de $50,35 \pm 11,98\%$, sendo estes resultados valores próximos aos das concentrações $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ e $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ ($47,75 \pm 10,63\%$ e $46,70 \pm 7,01\%$, respectivamente). Porém, a partir da concentração de $3,0 \text{ mg mL}^{-1}$ ($35,52 \pm 5,56\%$) até a concentração de $5,0 \text{ mg mL}^{-1}$ ($30,80 \pm 5,24\%$), observou-se um declínio na taxa de motilidade espermática (Fig. 01).

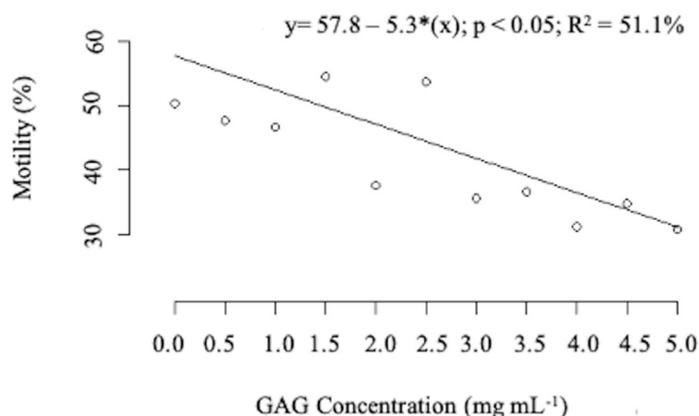


Figura 01: Influência das concentrações de glicosaminoglicanos (GAGs) na motilidade total (%) de espermatozoides criopreservados de *P. brevis* (n=6 pools).

A suplementação do meio de congelação com antioxidantes é indicada, uma vez que a criopreservação pode modificar a atividade antioxidante natural dos espermatozoides. Martínez-Páramo *et al.* (2012) afirmaram que a adição de α -tocoferol e ácido ascórbico não foi capaz de melhorar os parâmetros cinéticos espermáticos de *Dicentrarchus labrax*, mas esses antioxidantes neutralizaram o estresse oxidativo causado pela criopreservação. Da mesma forma, no presente estudo, a menor concentração de GAGs da pele de *O. niloticus* não melhorou os parâmetros cinéticos, mas pode ter sido relevante, uma vez que não foi tóxica para as células, pois o resultado foi semelhante ao controle.

Para a morfologia, não foi encontrada correlação com o aumento das concentrações de GAGs ($p > 0,05$; Tab. 01). O controle (não suplementado) apresentou $79,25 \pm 0,92\%$ de espermatozoides com morfologia normal, enquanto a maior concentração de GAGs resultou em $75,33 \pm 1,99\%$ (Tab.01). A fertilização artificial de peixes requer uma alta proporção de espermatozoides por oócito em um ambiente pequeno e controlado e, neste caso, até 50% das

anormalidades espermáticas podem ser aceitáveis (MILIORINI *et al.*, 2011). Além disso, neste estudo, o defeito mais comum dos espermatozoides foi a cauda dobrada, que pode afetar a motilidade progressiva dos espermatozoides. Porém, de acordo com Milliorini *et al.* (2011) as morfopatologias que mais afetam a motilidade do espermática e a taxa de fertilização são cauda fortemente enrolada e cauda curta.

Tab. 01: Morfologia de espermatozoides de *P. brevis* criopreservados em meio de congelação suplementado com glicosaminoglicanos (GAGs) em diferentes concentrações (n=6 pools).

Concentração das GAGs (mg mL ⁻¹)	Morfologia Espermática (%)
0	79.25 ± 0.92
0.5	75.90 ± 1.49
1.0	74.70 ± 1.49
1.5	76.80 ± 1.30
2.0	75.80 ± 1.94
2.5	77.66 ± 1.49
3.0	75.00 ± 1.75
3.5	77.33 ± 0.90
4.0	70.87 ± 1.39
4.5	75.08 ± 1.45
5.0	75.33 ± 1.99
P-valor	0.2987
Equation	Y = 77.28

Os dados expressos em média ± desvio padrão (DP). Significância estatística em p<0,05.

CONCLUSÕES

Diante disso, conclui-se que a concentração de 0,5 mg mL⁻¹ foi a mais adequada para suplementar o meio de congelação de espermatozoides de *P. brevis*.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA-MONTEIRO, P.S.; OLIVEIRA-ARAÚJO, M.S.; PINHEIRO, R.R.R.; LOPES, J.T.; FERREIRA, Y.M.; MONTENEGRO, A.R.; MELO-MACIEL, M.A.P.; SALMITO-VANDERLEY, C.S.B. Influence of vitamins C and E on the quality of cryopreserved semen *Prochilodus brevis* (Prochilodontidae, Teleostei). Semina: Ciências Agrárias, v.38, n.4, p.2669-2680, 2017.

CABRITA, E.; MA, S.; DIOGO, P.; MARTÍNEZ-PÁRAMO, S.; SARASQUETE, C.; DINIS, M.T. The influence of certain aminoacids and vitamins on post-thaw fish sperm motility, viability and DNA fragmentation. Animal Reproduction Science, v.125, n.1/4, p.189-195, 2011.

GURGEL, L.D.L.; VERANI, J.R.; CHELLAPPA, S. Reproductive ecology of *Prochilodus brevis* an endemic fish from the semiarid region of Brazil. The Scientific World Journal, v.2012, 2012.

MARTÍNEZ-PÁRAMO, S.; DIOGO, P.; DINIS, M.T.; HERRÁEZ, MP.; SARASQUETE, C.; CABRITA, E. Incorporation of ascorbic acid and a-tocopherol to the extender media to enhance antioxidant system of cryopreserved seabass sperm. *Theriogenology*, v.77, n.6, p.1129-1136, 2012.

MILIORINI, A.B.; MURGAS, L.D.S.; ROSA, P.V.; OBERLENDER, G.; PEREIRA, G.J.M.; COSTA, D.V. A morphological classification proposal for curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm damages after cryopreservation. *Aquaculture Research*, v.42, n.2, p.177-187, 2011.

PEREIRA, V.A.; ALENCAR, D.B.; ARAÚJO, I.W.F.; RODRIGUES, J.A.G.; LOPES, J.T.; NUNES, L.T.; FERREIRA, Y.M.; LOBATO, J.S.; MONTENEGRO, A.R.; SALMITO-VANDERLEY, C.S.B. Supplementation of cryodiluent media with seaweed or Nile tilapia skin sulfated polysaccharides for freezing of *Colossoma macropomum* (Characiformes: Serrasalminidae) semen. *Aquaculture*, v.528, p.1-6, 2020.

SALLES, T.C.; RODRIGUES, J.A.G.; BARCELLOS, P.G.; AMARAL, G.F.; ARAÚJO, I.W.F.; MOURÃO, P.A.S. Inhibition of thrombin generation by dermatan sulfate isolated from the skin of *Oreochromis niloticus*. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, v.12, n.1, p.98-104, 2017.

ZHANG, Y.; DUAN, X.; ZHUANG, Y. Purification and characterization of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin gelatin. *Peptides*, v.38, n.1, p.13-21, 2012.