

# VIABILIDADE DOS OVÓCITOS DE SURUBIM-DO-PARAÍBA APÓS DIFERENTES METODOLOGIAS DE SEPARAÇÃO: ENZIMÁTICA X MECÂNICA\*

Taís da Silva LOPES<sup>1</sup>; Danilo CANNEPELE<sup>2</sup>; Elizabeth ROMAGOSA<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Pós-doutoranda, Instituto de Pesca – APTA/SAA, São Paulo, SP [tais.peixegen@gmail.com](mailto:tais.peixegen@gmail.com)

<sup>2</sup>Companhia Energética de São Paulo, Paraibuna, SP [danilo.caneppele@cesp.com.br](mailto:danilo.caneppele@cesp.com.br)

<sup>3</sup>Instituto de Pesca – APTA/SAA, São Paulo, SP [eromagosa@pesca.sp.gov.br](mailto:eromagosa@pesca.sp.gov.br)

\*Apoio financeiro: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo 2014/21215-8).

**Palavras-chave:** ovócitos isolados; enzimas; Tripsina; Colagenase; Hialuronidase

## INTRODUÇÃO

A preservação dos recursos genéticos para a manutenção da vida aquícola tem se tornado cada vez mais relevante nos últimos anos. As populações naturais de peixes, de forma geral, estão ameaçadas, principalmente devido à pesca excessiva e poluição ambiental. Problema esse que também vem acontecendo como o surubim-do Paraíba, *Steindachmeridion parahybae*, uma espécie endêmica, natural da bacia do rio Paraibuna do Sul, SP, que está na lista do Livro Vermelho de Espécies da Fauna Brasileira (MMA, 2008), e é considerada uma das espécies em condições críticas de extinção (IBAMA, 2009).

A criopreservação de gametas de peixes possibilita a preservação do genoma de espécies ameaçadas de extinção, aumentando a representação destes animais, assim como de animais para fins de produção, evitando perdas de material genético (STREIT *et al.*, 2014). Quando se trata de ovócitos em estágios iniciais de desenvolvimento, há necessidade que um grande número de ovócitos sejam isolados dos ovários, o que faz dessa etapa um obstáculo para estudos com criopreservação destes gametas.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade dos ovócitos de surubim-do Paraíba após separação utilizando-se diferentes enzimas e concentrações *versus* separação mecânica.

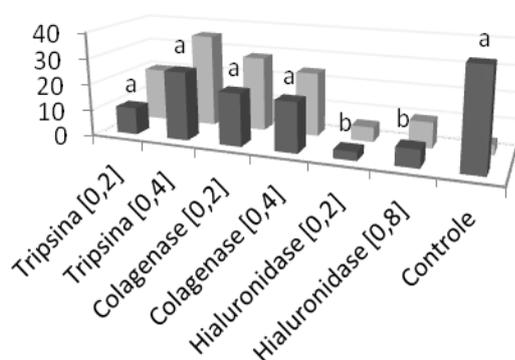
## MATERIAL E MÉTODOS

Em outubro/15, fêmeas (não-induzidas) foram anestesiadas e decaptadas para remoção dos ovários (imediatamente colocados em solução de Hank-HBSS) para, em seguida, passar por separação enzimática dos ovócitos em estágios iniciais de desenvolvimento, utilizando-se os seguintes tratamentos: T1 - Tripsina [0,2M], T2 - Tripsina [0,4M], T3 - Colagenase [0,2M], T4 - Colagenase [0,4M], T5 - Hialuronidase [0,2M], T6 - Hialuronidase [0,8M]; além de controles: negativo (CN) - usando HBSS, e positivo (CP) -

com separação mecânica. Fragmentos do mesmo tamanho (2X2cm) de ovários foram submetidos aos tratamentos em banhos de 30 minutos, com seis repetições cada. Após banho enzimático os ovócitos foram lavados três vezes com HBSS, e passaram por peneiras de diferentes malhas (0,8 mm e 1,8 mm) para separação dos ovócitos maiores. Foram considerados uma única amostra de ovócitos em estádios iniciais. Para avaliação dos resultados, foram utilizados os testes de viabilidade por coloração com Azul de Tripán (TB, 0,2% por 5 min) e maturação *in vitro* até o momento da quebra da vesícula germinativa (GVBD, incubados por 24h ou até se tornar translúcido).

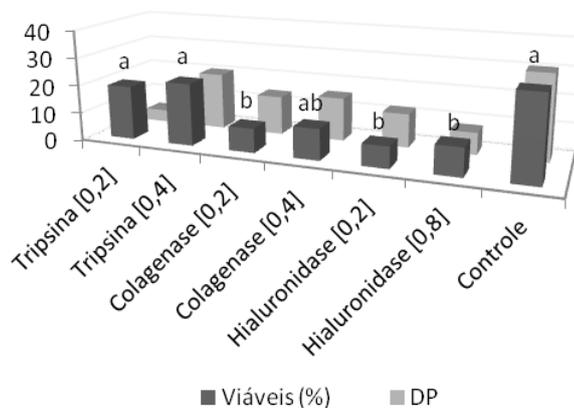
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de viabilidade dos ovócitos após tratamentos podem ser vistos nas Figuras 1 e 2. Em ambos os testes realizados (GVBD e TB) não houve diferença estatística entre o controle e as enzimas Tripsina (0,2M e 0,4M) e Colagenase (0,4M). GUAN *et al.* (2008) também avaliaram a utilização destas mesmas enzimas em diferentes concentrações para isolar ovócitos de *Danio rerio*, utilizando tempos distintos de exposição. Da mesma forma, como no presente trabalho, esses autores encontraram que a Hialuronidase foi a enzima menos eficiente na separação.



**Figura 1.** Viabilidade dos ovócitos por maturação *in vitro* (GVBD). Controle = separação mecânica. \*Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan ( $p < 0,07$ ). DP = Desvio Padrão.

Quanto à viabilidade, GUAN *et al.* (2008) encontraram o melhor resultado para o controle, seguido por Colagenase 0,4M por 10 min, e Hialuronidase 1,6M por 10 min. No presente trabalho, os testes de viabilidade não mostraram diferenças significativas entre o controle e os tratamentos com Tripsina (0,2M e 0,4M) e Colagenase (0,4M), porém numericamente a separação mecânica (controle) foi superior aos tratamentos, o que o destaca por evitar a manipulação dos ovócitos.



**Figura 2.** Viabilidade dos ovócitos por Azul de Tripán (TB). Controle = separação mecânica.

\*Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan ( $p < 0,07$ ). DP = Desvio Padrão.

Entre os métodos utilizados para avaliar a viabilidade, não foram observadas grandes diferenças para TB e GVBD, com exceção para a enzima Colagenase, com resultados menos eficientes quando utilizada a coloração por TB. GUAN *et al.* (2008) verificaram que, de forma geral, a metodologia de quebra da vesícula germinativa (GVBD) apontou menor viabilidade dos ovócitos.

Concluimos que o método mais eficiente a ser empregado na separação de ovócitos de surubim-do-Paraíba é o mecânico, seguido pelo enzimático com tripsina 0,4M por 30 min.

## REFERÊNCIAS

- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2009 *Fauna Ameaçada de Extinção, Invertebrados Aquáticos e Peixes*.
- MMA. Ministério do Meio Ambiente. 2008 *Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção*.
- STREIT JR, D.P.; GODOY, L.C.; RIBEIRO, R.P.; FORNARI, D.C.; DIGMAYER, M.; ZHANG, T. 2014 *Cryopreservation of Embryos and Oocytes of South American Fish Species*.
- GUAN, M.; RAWSON, D.M.; ZHANG, T. 2008 Development of a new method for isolating zebrafish oocytes (*Danio rerio*) from tissue masses. *Therigenology*, 69: 269-275.