

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**CARACTERIZAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE
TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*) EM DIFERENTES
CRIOPROTETORES**

Dayane Regina Lenz
Orientador: Emmanuel Arnhold

GOIÂNIA
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**CARACTERIZAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE
TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*) EM DIFERENTES
CRIOPROTETORES**

Dayane Regina Lenz
Orientador: Emmanuel Arnhold

GOIÂNIA
2014



Termo de Ciência e de Autorização para Disponibilizar as Teses e Dissertações Eletrônicas (TE-DE) na Biblioteca Digital da UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás–UFG a disponibilizar gratuitamente através da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações – BDTD/UFG, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor: **Dayane Regina Lenz** E-mail: **day_pesk@hotmail.com**

Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? Sim Não

Vínculo Empregatício do autor: Agência de fomento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás

País: **Brasil** UF: **GO** CNPJ: **08.156.102/0001-02** Sigla: **Fapeg**

Título: Caracterização e criopreservação de sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*) em diferentes crioprotetores Palavras-chave: **sêmen, Colossoma macropomum, congelamento**

Título em outra língua: **Characterization and cryopreservation of semen of tambaqui (*Colossoma macropomum*) in different cryoprotectants**

Palavras-chave em outra língua: **semen, Colossoma macropomum, cryopreservation**

Área de concentração: **Produção animal** Data defesa: (dd/mm/aaaa) **10/03/2014**

Programa de Pós-Graduação: **Ciência Animal**

Orientador(a): **Emmanuel Arnhold** E-mail: **emmanuelarnhold@yahoo.com.br**

Co-orientador(1): **Maria Lucia Gambarini Meirinhos** E-mail: **mlgambarini@hotmail.com**

Co-orientador(2): **Fernanda Gomes de Paula** E-mail: **ferdepaulazootec@yahoo.com.br**

3. Informações de acesso ao documento:

Liberação para disponibilização?¹ total parcial

Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:

[] Capítulos. Especifique:

[] Outras restrições:

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Goiânia 9 de dezembro de 2014


Assinatura do(a) autor(a)

DAYANE REGINA LENZ

**CARACTERIZAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE
TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*) EM DIFERENTES
CRIOPROTETORES**

Dissertação apresentada para obtenção
do grau de Mestre em Ciência Animal
junto à Escola de Veterinária e Zootecnia
da Universidade Federal de Goiás.

Área de Concentração:

Produção Animal

Orientador:

Prof. Dr. Emmanuel Arnhold

Comitê de Orientação:

Prof.^a Dr.^a Maria Lúcia Gambarini Meirinhos

Prof.^a Dr.^a Fernanda Gomes de Paula

GOIÂNIA

2014

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)
GPI/BC/UFG**

Lenz, Dayane Regina.
L575c Caracterização e criopreservação de sêmen de tambaqui
(*Colossoma macropomum*) em diferentes crioprotetores
[manuscrito] / Dayane Regina Lenz. - 2014.
viii, 48 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Emmanuel Arnhold
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás,
Escola de Veterinária e Zootecnia, 2014.
Bibliografia.

1. Piscicultura - Reprodução 2. Tambaqui - Reprodução
Artificial 3. *Colossoma macropomum* 4. Peixes -
Fertilização artificial. I. Título.

CDU - 639.3.034

DAYANE REGINA LENZ

Dissertação defendida e aprovada em **10/03/2014**, pela Banca Examinadora constituída pelos professores:



Prof. Dr. Emmanuel Arnhold
(ORIENTADOR (A))



Prof. Dr. Adilson Reidel - IFPR/PR



Prof. Dr. Milton Luiz Moreira Lima - EVZ/UFG

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Paulo e Tania,
aos meus sobrinhos Amanda, Felipe, Isabela e Gustavo.

AGRADECIMENTOS

À Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal pela oportunidade de crescimento acadêmico e intelectual.

Ao professor Dr. Emmanuel Arnhold por me orientar na realização desse trabalho, além da confiança depositada em mim e minhas ideias e auxiliar para que se tornassem realidade.

Ao setor de piscicultura da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, à professora Dra. Fernanda Gomes de Paula por proporcionar a realização física do experimento e aos estagiários do setor pelo auxílio nas coletas de sêmen.

À professora Dra. Maria Lúcia Gambarini Meirinhos pela fundamental contribuição no desenvolvimento do experimento, pela paciência, atenção e dedicação, por todas as conversas e conselhos.

Aos amigos Tayrone Freitas Prado, pelo auxílio na avaliação do sêmen, e Mayanny Carla de Carvalho Lima, que se mostrou uma verdadeira companheira pra todas as horas, me ajudando sempre e me lembrando das coisas que eu esquecia, que além do braço direito foi o braço esquerdo também. Sem vocês a realização desse trabalho não seria possível.

Ao meu parceiro de vida André de Moura Victório por me apoiar em todos os momentos, por não me deixar desistir todas as vezes em que eu disse que não queria mais.

À Fapeg pelo financiamento da pesquisa.

À CAPES pela bolsa de estudos concedida.

A todos que não citei, mas que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho. Muito Obrigada.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível”.

Charles Chaplin

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	3
1 INTRODUÇÃO	3
2 REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1 Tambaqui (<i>Collossoma macropomum</i>)	5
2.2 Criopreservação de sêmen de peixes	7
2.2.1 Colheita de sêmen	8
2.2.2 Soluções crioprotetoras.....	9
2.2.2.1 Crioprotetores intracelulares	9
2.2.2.2 Diluentes e crioprotetores extracelulares	10
2.2.3 Congelamento	11
2.2.3.1 Envase	11
2.2.3.2 Taxa de congelamento	12
2.2.4 Descongelamento	13
2.3 Parâmetros de avaliação seminal	14
3 OBJETIVOS	16
3.1 Objetivo geral	16
3.2 Objetivos específicos	16
REFERÊNCIAS.....	17
CAPÍTULO 2 – CARACTERIZAÇÃO DO SÊMEN DE TAMBAQUI NA ÉPOCA REPRODUTIVA	21
RESUMO.....	21
ABSTRACT	22
1 INTRODUÇÃO	23
2 METODOLOGIA.....	25
2.1 Colheita de sêmen	25
2.2 Avaliação quantitativa e qualitativa do sêmen.....	26
2.3 Delineamento experimental.....	27
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4 CONCLUSÃO.....	31
REFERÊNCIAS.....	32
CAPÍTULO 3 – CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE TAMBAQUI EM DIFERENTES CRIOPROTETORES	34
RESUMO.....	34

ABSTRACT	35
1 INTRODUÇÃO	36
2 METODOLOGIA.....	38
2.1 Colheita de sêmen	38
2.2 Criopreservação	39
2.3 Descongelamento	40
2.4 Avaliação do sêmen <i>in vivo</i>	40
2.4 Delineamento experimental.....	41
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4 CONCLUSÃO.....	46
REFERÊNCIAS.....	47

RESUMO

Objetivou-se com o trabalho caracterizar o sêmen de tambaqui durante a época reprodutiva e avaliar a eficiência de quatro crioprotetores adicionados ao meio diluidor na criopreservação do sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*) e definir o melhor protocolo de descongelamento. Foram realizadas três coletas com intervalos regulares de amostras de sêmen (*pool*) de dez reprodutores. Na primeira etapa do experimento foi realizada a caracterização do sêmen *in natura*, sendo submetido a análises de rotina em microscopia óptica: motilidade, vigor espermático, tempo de vida e contagem do número de espermatozoides. Na segunda etapa do experimento foi realizada a criopreservação do sêmen. Os crioprotetores testados foram: glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF) e metanol, na proporção de 10,0%. Para a avaliação da viabilidade e comparação dos tratamentos foi realizado o teste *in vivo* das amostras pós-descongelamento em três protocolos diferentes para cada crioprotetor, em que foram testados os tempos de descongelamento de 15, 30 e 45 s, na temperatura de 30°C, totalizando 12 tratamentos com cinco repetições. As variáveis quantitativas foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey e as variáveis qualitativas ao teste de Friedman, com significância de 0,05. Não foram observadas diferenças significativas ($p>0,05$) para a maioria dos parâmetros avaliados. A concentração espermática foi maior na primeira coleta (14,54 bilhões de espermatozoides/mL) e o tempo de vida diminuiu ao final do experimento. O meio crioprotetor contendo metanol com descongelamento por 30 s foi o tratamento que apresentou os melhores resultados de fertilização (77,65%).

Palavras chave: sêmen, *Colossoma macropomum*, congelamento.

ABSTRACT

The objective of the study is to characterize the semen of tambaqui *Colossoma macropomum* during the breeding season and to evaluate the efficiency of four cryoprotectants added to the extender on sperm cryopreservation of tambaqui and to define the best protocol for thawing. Three semen samples were collected at regular intervals from ten males (pool). In the first stage of the experiment the characterization of semen in natura was performed and it was subjected to the routine analysis in optical microscopy: motility, vigor, life time and counting the number of spermatozoa. In the second stage of the experiment cryopreservation of semen was performed. The cryoprotectants glycerol, dimethylsulfoxide (DMSO), dimethylformamide (DMF) and methanol were tested at a ratio of 10.0%. For the assessment of viability and comparison of treatments testing of post-thaw samples in vivo was performed in three different protocols for each cryoprotectant, in thawing time 15, 30 and 45 seconds, 30°C temperature, totalizing 12 treatments with five replicates each. Quantitative variables were subjected to analysis of variance (ANOVA) and Tukey test while qualitative variables were subjected to the Freedman test with 0.05 significance. No significant differences ($p > 0.05$) were observed for most of the evaluated parameters. The sperm concentration was higher in the first sampling (14.54 billion sperm / mL) and the lifetime decreased at the end of the experiment. The cryoprotectant medium containing methanol and thawing for 30 s was the treatment that showed the best results fertilization (77.65%).

Keywords: semen, *Colossoma macropomum*, cryopreservation.

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 INTRODUÇÃO

A aquicultura mundial vem crescendo em números e expandindo fronteiras ano após ano, sendo o setor de produção de alimentos de origem animal com o maior crescimento. Segundo dados da FAO (2012) de 1970 a 2008 a produção mundial em aquicultura tem crescido 8,3% em média, sendo que os países da América Latina e Caribe são os que apresentam maior taxa de crescimento. A produção aquícola brasileira acompanha esse crescimento, que desde 1995, está acima da média mundial com 21,1% ao ano, enquanto a mundial cresceu cerca de 9,5% ao ano, no período de 1991 a 2004 (BOSCARDIN, 2008). Mudanças no hábito alimentar da população tem contribuído para o crescimento do setor, já que cada vez mais pessoas têm optado pelo consumo de alimentos nutricionalmente mais saudáveis, e o pescado constitui uma fonte de alimento de alto valor biológico.

Atualmente, a piscicultura vem despertando interesse, pois é uma maneira econômica de se produzir alimento nobre, de alto valor nutritivo, em curto espaço de tempo. O Brasil apresenta potencial crescimento no setor, pois possui vasta área de lâmina d'água, pela construção de reservatórios e pelo desenvolvimento de políticas governamentais de incentivo aos usos múltiplos das águas, além de apresentar grande número de espécies potenciais para cultivo.

Os peixes redondos são considerados os peixes nativos de maior potencial para a piscicultura, por serem espécies altamente apreciadas pela excelência de sua carne, habilidade no ganho de peso, rusticidade e adaptabilidade aos ecossistemas aquaculturais, além de apresentarem grande importância na pesca comercial em suas regiões de origem (OLIVEIRA et al., 2004).

O conhecimento das táticas reprodutivas é fundamental para a compreensão das estratégias do ciclo da vida, bem como, para nortear medidas de administração, manejo e preservação frente a impactos, como exaustão dos estoques naturais (VAZZOLER & MENEZES, 1992).

O tambaqui, assim como a maioria das espécies de peixes cultiváveis no Brasil, não se reproduz espontaneamente em cativeiro e necessitam ainda de uma série de aportes científicos e tecnológicos para colocá-las em um patamar de viabilidade zootécnica e econômica, principalmente no que se refere às táticas reprodutivas e o desenvolvimento de biotecnologias aplicadas à reprodução artificial de peixes, o que é fundamental quando se pretende inserir espécies nativas na produção em escala comercial (BOSCARDIN, 2008).

A criopreservação do sêmen de peixes é uma técnica que pode otimizar a rotina dentro dos laboratórios de reprodução, além de permitir a conservação de material genético. Pesquisas vêm sendo realizadas a respeito da criopreservação de sêmen de peixes (GODINHO et al., 2003; MARIA et al., 2006; MURGAS et al., 2007; STREIT JÚNIOR, et al., 2009; GALO et al., 2011; VIVEIROS et al., 2012), porém os resultados obtidos ainda estão sujeitos a variações. Para permitir que a criopreservação de sêmen de peixes se torne uma prática eficiente e rotineira em larga escala dentro do setor produtivo, há necessidade de maior aporte de informações e avanços tecnológicos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tambaqui (*Colossoma macropomum*)

O tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) possui a seguinte classificação sistemática segundo GRAÇA & PAVANELLI (2007):

Classe Osteichthyes = Actinopterygii

Superordem Ostariophysi

Ordem Characiformes

Família Characidae

Subfamília Serrasalminae

Gênero *Colossoma* (Eigenmann & Kennedy, 1903)

Espécie *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818)

É um dos peixes mais importantes da piscicultura brasileira, em especial nas regiões Norte e Nordeste (MUNIZ et al., 2008). É nativo da bacia Amazônica e considerado o segundo maior peixe de escamas do rio Solimões e do Amazonas (GOULDING & CARVALHO, 1982). Pode atingir 1,0 m de comprimento padrão e pesar 30,0 kg (ARAUJO-LIMA & GOMES, 2005). Apresenta facilidade na produção de alevinos e rápido crescimento, o que fizeram com que essa espécie seja uma das mais populares na piscicultura brasileira, sendo a espécie nativa mais cultivada no Brasil (KUBITZA, 2004).

De acordo com ARAUJO-LIMA & GOMES (2005) o habitat do tambaqui é caracterizado por água ricas em nutrientes, com temperaturas médias entre 25 e 34°C e abundância de áreas alagáveis.

Possuem dentes molariformes, que lhe permitem triturar sementes, castanhas, frutos, caramujos, dentre outros alimentos que compõem a sua dieta natural (KUBITZA, 2004). Os adultos se alimentam principalmente durante a enchente e a cheia e migram no rio durante a vazante e a seca, sendo que neste período raramente se alimentam, devido à escassez de frutas e plâncton no rio

(ARAUJO-LIMA & GOMES, 2005). Na fase de pós-larva e alevino, o tambaqui é planctófago e estende este hábito alimentar para as fases juvenil e adulta no caso de haver carência de alimentos. Quando em cativeiro, aceita bem ração, grãos e subprodutos agro-industriais (OLIVEIRA et al., 2004).

A espécie é rústica e capaz de resistir a baixas concentrações de oxigênio dissolvido na água (~1,0 mg/L) (VAL & ALMEIDA-VAL, 1995), sendo recomendados para um bom crescimento valores superiores a 3,0 mg/L (ARAUJO-LIMA & GOMES, 2005).

Adapta-se bem ao confinamento, apresentando rápido crescimento e, dependendo do sistema de manejo utilizado e disponibilidade de alimento, alcança de 700,0 a 900,0 g ou mais no primeiro ano e 1,5 a 3,0 kg ou mais no segundo ciclo de criação, além de ser a espécie mais indicada para o policultivo, pela sua capacidade de aceitar vários tipos de alimentos. Em ambiente de cultivo, atinge a maturidade sexual por volta do terceiro ano de vida (OLIVEIRA et al., 2004).

É uma espécie que realiza migrações reprodutivas, com desenvolvimento ovocitário sincrônico e desova total e sazonal que se estende pelo período de outubro a fevereiro na sua região de origem. A fecundação dos ovócitos ocorre em meio externo e não realiza cuidado parental (VIEIRA et al., 1999).

Somente se reproduz em águas ricas em nutrientes que, na Amazônia, são os rios de águas barrentas, com condições físicas e químicas da água bastantes estáveis em toda coluna d'água próxima à margem, com temperatura variando de 28,5 a 29°C (ARAUJO-LIMA & GOMES, 2005) e concentração de oxigênio dissolvido superior a 4,0 mg/L (FORSBERG et al., 1988).

Como não se reproduz espontaneamente em cativeiro, a reprodução desta espécie, como na maioria dos peixes migradores, é induzida com a utilização de hormônios (ARAUJO-LIMA & GOMES, 2005).

2.2 Criopreservação de sêmen de peixes

A reprodução artificial em peixes necessita de uma grande quantidade de espermatozoides de boa qualidade disponível para o momento da fertilização. São muitas as razões que justificam a coleta e o armazenamento de sêmen de boa qualidade para o uso futuro: melhora a conveniência da inseminação artificial, facilita a rotina dentro de laboratório de reprodução, reduz o estresse nos reprodutores machos, causado pelas repetidas coletas de amostras, resolve o problema de desovas assíncronas, além da manutenção da variabilidade genética para os programas de melhoramento de espécies para cultivo e de populações naturais (CAROSFELD et al., 2003; VIVEIROS & GODINHO, 2009).

Técnicas de criopreservação de sêmen em pisciculturas são utilizadas de forma mais intensa na manutenção das características genéticas de reprodutores, visando a redução dos custos com manutenção do estoque de animais, porém preservando a variabilidade genética da população, também como forma de redução dos gastos com hormônios, além de proporcionar melhor atenção as fêmeas durante os preparativos para desova (CARNEIRO, 2007).

A criopreservação de sêmen é uma técnica baseada na retirada do excesso de água do interior das células espermáticas, o que evita a formação de cristais de gelo intracelulares, que podem causar danos aos espermatozoides. Além disso, a temperatura de congelamento em nitrogênio líquido (-196°C), a viabilidade das células é mantida por período indeterminado o que permite o uso futuro do material genético armazenado (CARNEIRO, 2007).

O processo de criopreservação envolve a diluição do sêmen em solução que deve conter diluidor, crioprotetor intracelular e crioprotetor extracelular, a qual não devem promover a ativação das células espermáticas, mas sim permitir o armazenamento adequado (MARIA & CARNEIRO, 2012).

Os protocolos de criopreservação se baseiam na avaliação e determinação do melhor agente crioprotetor, aditivos e taxas de congelamento e descongelamento, que são modificados de espécie para espécie quando se pretende estabelecer o melhor protocolo de criopreservação (ANDREEV et al., 2009).

O processo da criopreservação de sêmen de peixes normalmente consiste de etapas, são elas: colheita do sêmen, adição de diluidores e crioprotetores, envase, congelamento e armazenamento e descongelamento. Posteriormente pode ser realizada a fertilização dos ovócitos, como normalmente realizada na rotina de laboratórios de reprodução artificial de peixes (MARIA & CARNEIRO, 2012).

2.2.1 Colheita de sêmen

Apesar do sêmen das espécies de peixes apresentarem características diferentes entre si, uma característica é comum para a maioria delas: os espermatozoides são imóveis e inativos dentro dos testículos, sendo ativados somente em contato com a água (CARNEIRO, 2007).

A ativação é irreversível e dura pouco tempo, devido às baixas reservas energéticas dos espermatozoides que são exauridas rapidamente, variando de poucos segundos a pouco mais de um minuto, na maioria das espécies de peixe. Após esse período o espermatozoide perde mobilidade e a capacidade de fecundar o óvulo (CARNEIRO, 2007).

Durante a colheita do sêmen há a possibilidade de contaminação com urina, que tem relação com a qualidade do esperma de peixes de água doce, pois a mesma promove ativação parcial da motilidade dos espermatozoides, já que o ducto espermático e o ducto urinário encontram-se no ducto eferente com uma abertura através da papila urogenital. Quanto maior a porcentagem de urina no sêmen, menor a motilidade dos espermatozoides ao longo do tempo. Uma solução para tal situação seria a colheita de sêmen por inserção de cateter ou sonda uretral diretamente nos testículos, ou ainda, a colheita com seringa em que pode ser observada a expulsão de jatos de urina durante a extrusão do sêmen, com a possibilidade de descarte de amostras contaminadas (NYNCA et al., 2012)

Diante disso, a colheita do sêmen deve ser realizada em meio seco, sem contaminação por água ou urina, para que não seja ativado antes do congelamento e conseqüentemente perca a viabilidade. Amostras

prematuramente ativadas devem ser descartadas (VIVEIROS & GODINHO, 2009).

2.2.2 Soluções crioprotetoras

Na criopreservação de sêmen a adição de soluções crioprotetoras é necessária para a proteção dos danos causados pelo congelamento, como formação de cristais de gelo intracelular e desidratação excessiva (YANG & TIERSCH, 2009). Os crioprotetores de sêmen podem ser divididos em intracelulares e extracelulares em função da capacidade de penetração na membrana celular (SURQUET et al., 2000).

2.2.2.1 Crioprotetores intracelulares

Crioprotetores intracelulares são substâncias químicas não tóxicas capazes de penetrar nas células e retirar a água e diminuir a temperatura de congelamento no seu interior, o que impede que se formem cristais de gelo intracelulares que causam danos irreversíveis às células durante o congelamento (CARNEIRO, 2007).

As soluções crioprotetoras intracelulares mais utilizadas para criopreservação de sêmen de peixes são o dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol e metanol, porém algumas outras substâncias foram estudadas para algumas espécies (SUQUET et al., 2000). Para criopreservação de sêmen de espécies de água doce brasileiras, o crioprotetor mais utilizado é o DMSO, geralmente em concentrações de 5% a 15% (VIVEIROS & GODINHO, 2009).

Apesar da ampla utilização do DMSO, principalmente para salmonídeos, como truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (YOUNG et al., 2009) e esturjões (HORVÁTH et al., 2008), além de demonstrar melhores resultados na criopreservação de espécies marinhas (SUQUET et al., 2000), estudos foram realizados a fim de comparar a ação do DMSO e de diferentes crioprotetores (LE et al., 2011; VIVEIROS et al., 2011; VARELA JÚNIOR et al., 2012).

Altas concentrações de crioprotetor deveriam promover maior proteção para as células espermáticas durante o armazenamento, porém, podem se tornar tóxicas ou letais para os espermatozoides, desse modo, a concentração da solução crioprotetora deve promover um balanço ideal, de forma que proteja os espermatozoides das crioinjúrias sem ser tóxica (YANG & TIERSCH, 2009).

CUERVAS-URIBE et al. (2011) avaliaram a toxicidade dos crioprotetores metanol, DMSO, dimetilacetamida, propanodiol e metilglicol nas concentrações de 5%, 10%, 20% e 30% sobre espermatozoides de bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) e concluíram que concentrações acima de 20% foram tóxicas.

2.2.2.2 Diluentes e crioprotetores extracelulares

Para a execução do método de congelamento de sêmen, primeiramente deve-se escolher o diluente apropriado, comumente solução salina ou a base de glicose, com osmolaridade ideal (VIVEIROS et al., 2012). O diluente deve apresentar características próximas ao plasma seminal e tem a função de preservar a capacidade de fertilização dos espermatozoides por meio do controle de pH, osmolaridade, concentração de íons e, em alguns casos, atuando como fonte de energia (YANG & TIERSCH, 2009).

Como cada espécie possui especificidades das características seminais, é necessário que haja o ajuste da solução diluidora utilizada para a criopreservação do sêmen para cada espécie, respeitando suas características e não promovendo a ativação dos espermatozoides quando entram em contato com o meio diluidor (SALMITO-VANDERLEY et al., 2012).

Os crioprotetores extracelulares são substâncias que revestem a célula e protegem a membrana celular dos danos causados pela criopreservação e normalmente são adicionados ao meio de diluição do sêmen (CARNEIRO, 2007).

Gema de ovo e leite em pó são as substâncias frequentemente adicionadas ao meio diluidor como seu componente básico, tipicamente em combinação com glicose (VIVEIROS & GODINHO, 2009). A ação crioprotetora da gema de ovo está relacionada à presença de lecitina e lipoproteínas e caseína no

leite que protegem os espermatozoides do choque térmico durante o processo de criopreservação (MIES FILHO et al., 1982).

De modo geral, diluente contendo 5% de glicose, 10% de DMSO e 10% de gema de ovo é efetivo para criopreservação de sêmen de espécies de Characiformes, enquanto que diluentes contendo 10% de metanol e 15% de leite em pó são mais efetivos na criopreservação de sêmen de Siluriformes como pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) (CAROSFELD et al., 2003).

Em estudo realizado com criopreservação de sêmen de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), variedade Chitralada, com diferentes diluentes, GODINHO et al. (2003) observaram que combinações de DMSO com gema de ovo e metanol com leite em pó são igualmente adequadas como soluções diluentes na criopreservação de sêmen para a espécie.

Gema de ovo adicionada às soluções crioprotetoras proporciona melhores resultados após o descongelamento de sêmen de bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*) (BUTTS et al., 2010) e curimba (*Prochilodus lineatus*), causando menos anormalidades morfológicas nos espermatozoides após o descongelamento (FELIZARDO et al., 2010).

Além de promover a proteção das células espermáticas durante o armazenamento a baixas temperaturas, a gema de ovo ainda auxilia na avaliação qualitativa dos espermatozoides após o descongelamento, pois facilita a visualização da motilidade espermática (VIVEIROS et al., 2011).

2.2.3 Congelamento

2.2.3.1 Envase

Vários tipos de recipientes são utilizados para envasar o sêmen de peixes, entre eles, palhetas francesas de 0,25 e 0,5 mL, macropalhetas, criotubos, sacos e tubos plásticos de volume variável, geralmente entre 1,0 e 5,0 mL (MARIA & CARNEIRO, 2012). A maioria dos estudos, principalmente com

espécies brasileiras, realizados utilizam para envase palhetas francesas com volume de 0,5 mL (VIVEIROS et al., 2009).

Palhetas de pequeno volume podem ser ideais para a fertilização de pequenas quantidades de ovócitos, porém, para espécies que possuem alta taxa de fecundidade e, conseqüentemente, produzem grande número de ovócitos são necessários maiores volumes de sêmen para a fertilização. Nesse caso, a criopreservação do sêmen em recipientes de maior volume pode ser útil, pois possuem maior capacidade de armazenamento, o que facilita a manipulação no processo de descongelamento e fertilização (MARIA & CARNEIRO, 2012).

Para que um recipiente seja utilizado no armazenamento do sêmen criopreservado deve ser de fácil aquisição no mercado, livre de contaminantes, possibilitar a identificação de amostras e com volume adequado para utilização em escala comercial, além de transmitir a temperatura uniformemente, para que cause o mínimo de danos aos espermatozoides no momento do descongelamento (MARIA & CARNEIRO, 2012).

2.2.3.2 Taxa de congelamento

A taxa de congelamento é um fator importante no processo de criopreservação, pois pode influenciar diretamente na extensão dos danos causados nos espermatozoides e no sucesso do procedimento (ANDREEV et al., 2009).

Quando os espermatozoides são submetidos a temperaturas menores que 0°C há a formação de cristais de gelo extracelulares e aumento na concentração de sais no líquido extracelular. Como a água do meio intracelular não congela inicialmente, há perda de água para o meio extracelular e desidratação progressiva dos espermatozoides. Se a velocidade de congelamento for lenta, o aumento da concentração de sais no meio intracelular causado pela desidratação pode causar danos aos espermatozoides. Se a velocidade de congelamento for muito rápida há a formação de cristais de gelo intracelulares, o que também causa danos aos espermatozoides. Desta forma, a taxa de congelamento deve manter um equilíbrio entre velocidade de congelamento e

desidratação da célula, para que os danos causados aos espermatozoides no momento do congelamento sejam os mínimos possíveis (SALMITO-VANDERLEY et al., 2012).

A criopreservação de sêmen de peixes, na maioria das vezes, é realizada iniciando o processo com o resfriamento do sêmen a temperatura de geladeira, aproximadamente 5°C, seguido pelo envase e inserção do recipiente de envase em botijões do tipo *dry shipper*. São botijões carregados com nitrogênio líquido 24 horas antes do procedimento de criopreservação, momento em que é retirado o excesso de líquido, mantendo apenas nitrogênio na forma de vapor, apresentam taxas de congelamento que variam entre -20 e -45°C/min, com estabilização na temperatura de -180°C em aproximadamente três minutos (TAITSON et al., 2008).

O processo também pode ser automatizado, com a utilização de máquinas de congelamento de sêmen, em que a taxa de congelamento é pré-definida, o que confere maior uniformidade no congelamento e confiabilidade ao processo (CARNEIRO, 2007).

Para o processo de criopreservação espermática deve-se considerar a interação entre a solução crioprotetora, os diluentes e a taxa de congelamento, pois taxas de congelamento apropriadas para uma solução, podem não surtir os melhores resultados ou ter diferenças significativas em outras (BUTTS et al., 2010). Além disso, os espermatozoides de algumas espécies podem apresentar bons resultados com amplo espectro de taxas de congelamento, apresentando maior tolerância ao processo (SUQUET et al., 2000).

2.2.4 Descongelamento

O descongelamento é o processo inverso ao congelamento, é a etapa em que ocorre a reidratação celular. Assim como no congelamento, a velocidade deve ser controlada, pois não deve permitir que pequenos cristais intracelulares aumentem de tamanho a ponto de causar danos às células (CARNEIRO, 2007).

Desta forma, a taxa de descongelamento e protocolo de criopreservação devem ser determinados para cada espécie. Para espécies

tropicais o descongelamento, normalmente, é realizado com a imersão do recipiente com sêmen criopreservado em água a temperatura de 45 a 60°C por um período de três a oito segundos (CARNEIRO, 2007).

2.3 Parâmetros de avaliação seminal

As características seminais podem variar dentro de plantel de reprodutores, ou até para o mesmo animal, dependendo do período e da frequência de colheita dentro da estação reprodutiva. De forma que a avaliação espermática deve ser realizada para caracterizar qualitativamente e quantitativamente o sêmen dos diferentes reprodutores, o que permite a seleção de sêmen de melhor qualidade para ser submetido ao processo de fertilização dos ovócitos ou criopreservação (CABRITA et al., 2010).

A avaliação da qualidade do sêmen pode ser realizada de várias maneiras, a forma com que decide realizar depende, basicamente, da complexidade da metodologia e da disponibilidade de recursos para realizá-la (RURANGWA et al., 2001).

A motilidade espermática é um dos parâmetros mais utilizados para avaliar a qualidade espermática, pois os espermatozoides devem apresentar capacidade de ativação da motilidade em contato com a água para que possam atingir os ovócitos no momento da fertilização, além do tempo de duração de motilidade. A motilidade espermática reflete as alterações presentes nas estruturas celulares responsáveis pela ativação e manutenção da motilidade progressiva, tais como a integridade mitocondrial, produção de ATP (adenosina trifosfato), ativação dos canais de proteínas da membrana plasmática e estrutura flagelar (BOBE & LABBÉ, 2010; CABRITA et al., 2010).

DZIEWULSKA et al. (2011) encontraram correlação positiva entre a taxa de motilidade dos espermatozoides e a velocidade espermática com o sucesso da fertilização, em que maiores velocidades de movimentação dos espermatozoides promoveram maiores taxas de fertilização de ovócitos.

A motilidade é avaliada diretamente no microscópio no momento em que a solução ativadora é adicionada à amostra de sêmen e imediatamente é

iniciada a movimentação dos espermatozoides no campo óptico. Tradicionalmente, a motilidade espermática é estimada através de método subjetivo, em que a porcentagem de espermatozoides móveis no campo óptico é determinada por avaliador experiente (SUQUET et al., 2000).

Outro parâmetro usualmente utilizado para avaliação da qualidade do sêmen *in vitro* é o vigor espermático. Deve ser avaliado juntamente com a motilidade dos espermatozoides. O vigor determina a qualidade da movimentação apresentada pelos espermatozoides, levando em consideração a velocidade de movimentação e a progressão do movimento. O vigor é determinado em uma escala de zero a cinco, em que o escore 0 é atribuído aos espermatozoides que não apresentam movimentação e o escore 5 aos espermatozoides que apresentam movimentação rápida e com maior progressão do movimento (GARNER & HAFEZ, 1995).

A determinação do volume de sêmen produzido e a concentração de espermatozoides são informações importantes na prática da reprodução artificial de peixes, pois servem de base para a quantidade de sêmen que deve ser utilizada para realizar a fecundação, de modo a se trabalhar com a dose inseminante ideal para cada espécie. Dessa forma, é possível melhorar as taxas de fertilização e promover o uso racional do plantel de reprodutores (SANCHES et al., 2011). São parâmetros que podem variar para espécies que realizam migrações na estação reprodutiva ou pela utilização de hormônios para a indução da reprodução em cativeiro (VIVEIROS & GODINHO, 2009). Os peixes produzem quantidade variável de gametas, de maneira geral, a produção de espermatozoides é dez vezes maior do que a de mamíferos (BILLARD, 1990).

Ensaio de fertilização de ovócitos é o método que produz resultados mais importantes do ponto de vista prático, porém não é realizado em todos os estudos, pela variação da qualidade dos óvulos entre fêmeas, o que pode produzir valores de taxa de fertilização de ovócitos variáveis. Além disso, deve ser determinada a dose inseminante mínima para cada espécie, para que a taxa de fertilização apresente resultados mais confiáveis (SUQUET et al., 2000).

A taxa de fertilização obtida com o uso do sêmen criopreservado é utilizada para avaliar a qualidade do sêmen após o descongelamento e a viabilidade do protocolo de criopreservação (HORVÁTH et al., 2008).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar qualitativa e quantitativamente o sêmen de tabaqui em função da variação temporal na época reprodutiva e comparar o efeito de quatro crioprotetores e três tempos de descongelamento sobre a viabilidade de sêmen de tabaqui criopreservado.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a variação da qualidade e de volume produzido do sêmen de tabaqui durante a época reprodutiva;
- Avaliar a qualidade do sêmen de tabaqui após processo de criopreservação em quatro tipos de crioprotetores intracelulares e três tempos de descongelamento;

REFERÊNCIAS

- 1 ANDREEV, A. A.; SADIKOVA, D. G.; GAKHOVA, E. N.; PASHOVKIN, T. N.; TIKHOMIROV, A. M. Congelation of cryoprotective solutions and cryopreservation of fish sperm. **Biophysics**, v. 54, n. 5, p. 612-616, 2009.
- 2 ARAUJO-LIMA, C. A. R. M.; GOMES, L. C. Tambaqui (*Colossoma macropomum*). In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. (Orgs.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: UFSM, p. 175-202, 2005.
- 3 BILLARD, R. Artificial insemination in fish. In: LAMMING, G. E. (Org). **Physiology of reproduction**. New York: Marshall's, p.870-887, 1990.
- 4 BOBE, J.; LABBÉ, C. Egg and sperm quality in fish. **General and Comparative Endocrinology**, v. 165, p. 535-548, 2010.
- 5 BOSCARDIN, N. R. A. Produção aquícola brasileira. In: OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. R.; SOTO, D. (Eds.). **Aquicultura no Brasil: o desafio é crescer**. Brasília: FAO, p. 27-72, 2008.
- 6 BUTTS, I. A. E.; LITVAK, M. K.; KASPAR, V.; TRIPPEL, E. A. Cryopreservation of Atlantic cod *Gadus morhua* L. spermatozoa: effects of extender composition and freezing rate on sperm motility, velocity and morphology. **Cryobiology**, v. 61, p. 174-181, 2010.
- 7 CABRITA, E.; SARASQUETE, C.; MARTÍNEZ-PÁRAMO, S.; ROBLES, V.; BEIRÃO, J.; PÉREZ-CEREZALES, S.; HERRÁEZ, M. P. Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. **Journal of Applied Ichthyology**, v.26, p. 623-635, 2010.
- 8 CARNEIRO, P. C. F. Tecnologias de produção e armazenamento de sêmen de peixes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 3, p. 361-366, 2007.
- 9 CAROSFELD, J.; GODINHO, H. P.; ZANIBONI FILHO, E.; HARVEY, B. J. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. **Journal of Fish Biology**, v. 63, p. 472-489, 2003.
- 10 CUERVAS-URIBE, R.; LEIBO, S. P.; DALY, J.; TIERSCH, T. R. Production of channel catfish with sperm cryopreserved by rapid non-equilibrium cooling. **Cryobiology**, v. 63, p. 186-197, 2011.
- 11 DZIEWULSKA, K.; RZEMIENIECKI, A.; CZERNIAWSKI, R.; DOMAGALA, J. Post-thawed motility and fertility from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) sperm frozen with four cryodiluents in straws or pellets. **Theriogenology**, v. 76, p. 300-311, 2011.
- 12 FAO – ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA AGRICULTURA E ALIMENTAÇÃO. **El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2010**.

- [online]. Roma: FAO, 2010. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/013/i1820s/i1820s.pdf>. Acesso em: 30 mar. 2012.
- 13 FELIZARDO, V. O.; MELLO, R. A.; MURGAS, L. D. S.; ANDRADE, E. S.; DRUMOND, M. M.; ROSA, P. V. Effect of cryopreservant combinations on the motility and morphology of curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 122, p. 259-263, 2010.
 - 14 FORSBERG, B. R., DEVOL, A. H., RICHEY, J. E., MARTINELLI, L. A., SANTOS, H. Factors controlling nutrient concentrations in Amazon foodplain lakes. **Limnology and Oceanography**, v. 33, p. 41-56, 1988.
 - 15 GALO, J. M.; STREIT JR, D. P.; SIROL, R. N.; RIBEIRO, R. P.; DIGMAYER, M.; ANDRADE, V. X. L.; EBERT, A. R. Spermatic abnormalities of piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849) after cryopreservation. **Brazilian Journal of Biology**, v. 71, n. 3, p. 693-699, 2011.
 - 16 GARNER, D. L.; HAFEZ, E. S. E. Espermatozoides e plasma seminal. In: HAFEZ, E. S. E. (Ed). **Reprodução animal**. São Paulo: Manole, p.167-190, 1995.
 - 17 GODINHO, H. P.; AMORIM, V. M. C.; PEIXOTO, M. T. D. Criopreservação de sêmen de tilápia-nilótica *Oreochromis niloticus*, var. Chitralada: crioprotetores, soluções ativadoras e refrigerador criogênico. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 6, p. 1537-1543, 2003.
 - 18 GOULDING, M.; CARVALHO, M. L. Life history and management of the tambaqui (*Colossoma macropomum*, characidae): An important Amazonian foodfish. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 1, n. 1, p. 107-138, 1982.
 - 19 GRAÇA, W. J. da; PAVANELLI, C. S. **Peixes da Planície de inundação do alto Rio Paraná e áreas adjacentes**. Maringá: EDUEM. 241 p., 2007.
 - 20 HORVÁTH, A.; WAYMANZ, W. R.; DEANS, J. C.; URBÁNYI, B.; TIERSCH, T. R.; MIMS, S. D.; JOHNSON, D.; JENKINS, J. A. Viability and fertilizing capacity of cryopreserved sperm from three North American acipenseriform species: a retrospective study. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 24, p. 443-449, 2008.
 - 21 KUBITZA, F. Coletânea de informações aplicadas ao cultivo do tambaqui, do pacu, e de outros peixes redondos. **Panorama da Aquicultura**, v. 14, n. 82, p. 27-39, 2004.
 - 22 LE, M. H.; LIM, H. K.; MIN, B. H.; PARK, M. W.; CHANG, Y. J. Semen cryopreservation of yellow croaker *Larimichthys polyactis*. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 21, p. 789-797, 2011.
 - 23 MARIA, A. N.; CARNEIRO, P. C. F. Criopreservação de sêmen de peixes no Brasil: estado da arte e perspectivas futuras. **Ciência Animal**, v. 22, n. 1, p. 124-131, 2012.

- 24 MARIA, A. N.; VIVEIROS, A. T. M.; FREITAS, R. T. F.; OLIVEIRA, A. V. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) sêmen, na endangered Brazilian teleost fish. **Aquaculture**, v. 260, p. 298-306, 2006.
- 25 MIES FILHO, A.; DUTRA, J.; GIRAO, R. N. Congelação do sêmen ovino na primavera. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 5, p. 27-57, 1982.
- 26 MUNIZ, J. A. S. de M., CATANHO, M. T. J. de A., SANTOS, A. J. G. dos. Influência do fotoperíodo natural na reprodução induzida do Tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 34, n. 2, p. 205-211, 2008.
- 27 MURGAS, L. D. S.; MILIORINI, A. B.; FREITAS, T. F.; PEREIRA, G. J. M. Criopreservação de sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) mediante adição de diferentes diluidores, ativadores e crioprotetores. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 3, p. 526-531, 2007.
- 28 OLIVEIRA, A. M. B. M. S.; CONTE, L.; CYRINO, J. E. P. Produção de Characiformes autóctones. In: CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALLOSSI, D. M.; CASTAGNOLLI, N. (Eds.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, p. 217-238, 2004.
- 29 RURANGWA, E.; VOLCKAERT, F. A. M.; KIME, G. D. E.; OTLEVIER, F. Quality control of refrigerated and cryopreserved semen using computer-assisted sperm analysis (CASA), viable staining and standardized fertilization in african catfish (*Clarias gariepinus*). **Theriogenology**, v. 55, p. 751-769, 2001.
- 30 SALMITO-VANDERLEY, C. S. B.; VIEIRA, M. J. A. F.; LEITE, L. V.; OLIVEIRA, F. C. E.; LINHARES, F. R. A.; SALGUEIRO, C. C. M.; NUNES, J. F. Meios de congelação para conservação de sêmen de peixes da família Characidae. **Ciência Animal**, v. 22, n. 1, p. 255-268, 2012.
- 31 SANCHES, E. A.; MARCOS, R. M.; BAGGIO, D. M.; TESSARO, L.; BALEN, R. E.; BOMBARDELLI, R. A. Estimativa da concentração espermática do sêmen de peixe pelo método do espermatócrito. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 6, p. 1163-1167, 2011.
- 32 STREIT JÚNIOR, D. P.; OLIVEIRA, A. C.; RIBEIRO, R. P.; SIROL, R. N.; MORAES, G. V.; GALO, J. M.; DIGMAYER, M. Motilidade, vigor e patologias seminal in natura e pós-criopreservação de *Piaractus mesopotamicus*. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 35, n. 2, p. 159-167, 2009.
- 33 SUQUET, M.; DREANNO, C.; FAUVEL, C.; COSSON, J.; BILLARD, R. Criopreservation of sperm in marine fish. **Aquaculture Research**, v. 31, p. 231-243, 2000.
- 34 TAITSON, P. F.; CHAMI, E.; GODINHO, H. P. Gene banking of the neotropical fish *Leporinus obtusidens* (Valenciennes, 1836): A protocol to freeze its sperm in the field. **Animal Reproduction Science**, v. 105, p. 283-291, 2008.

- 35 VAL, A. L.; ALMEIDA-VAL, V. M. F. **Fishes of Amazon and Their Environment: Physiological and Biochemical Aspects**. Berlin: Springer Verlag, 224p., 1995.
- 36 VARELA JÚNIOR, A. S.; CORCINI, C. D.; GHELLER, S. M. M.; JARDIM, R. D.; LUCIA JÚNIOR, T.; STREIT JÚNIOR, D. P.; FIGUEIREDO, M. R. C. Use of amides as cryoprotectants in extenders for frozen sperm of tambaqui, *Colossoma macropomum*. **Theriogenology**, v. 78, p. 244–251, 2012.
- 37 VAZZOLER, A. E. A. de M.; MENEZES, N. A. Síntese de conhecimentos sobre o comportamento reprodutivo dos Characiformes da América do Sul (Teleostei, Ostariophysii). **Brazilian Journal of Biology**, v. 52, p. 627-640, 1992.
- 38 VIEIRA, E. F.; ISAAC, C. V. J.; FABRÉ, N. N. Biologia reprodutiva do tambaqui, *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 (Teleostei, Serrasalmidae) no Baixo Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 29, n. 4, p. 625-638, 1999.
- 39 VIVEIROS, A. T. M.; ORFÃO, L. H.; NASCIMENTO, A. F.; CORRÊA, F. M.; CANEPPELE, D. Effects of extenders, cryoprotectants and freezing methods on sperm quality of the threatened Brazilian freshwater fish pirapitinga-do-sul *Brycon opalinus* (Characiformes). **Theriogenology**, v. 78, p. 361-368, 2012.
- 40 VIVEIROS, A. T. M.; AMARAL, T. B.; ORFÃO, L. H.; ISAU, Z. A.; CANEPPELE, D.; LEAL, M. C. Sperm cryopreservation of tiete tetra *Brycon insignis* (Characiformes) effects of cryoprotectants, extenders, thawing temperatures and activating agents on motility features. **Aquaculture Research**, v. 42, p. 858-865, 2011.
- 41 VIVEIROS, A. T. M.; GODINHO, H. P. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 35, p. 137-150, 2009.
- 42 VIVEIROS, A. T. M.; ORFÃO, L. H.; MARIA, A. N.; ALLAMAN, I. B. A simple, inexpensive and successful freezing method for curimba *Prochilodus lineatus* (Characiformes) semen. **Animal Reproduction Science**, v. 112, p. 292-300, 2009.
- 43 YANG, H.; TIERSCH, T. R. Current status of sperm cryopreservation in biomedical research fish models: Zebrafish, medaka, and Xiphophorus. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 149, p. 224-232, 2009.
- 44 YOUNG, W. P.; FRENYES, K.; WHEELER, P. A.; THORGAARD, G. H. No increase in developmental deformities or fluctuating asymmetry in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) produced with cryopreserved sperm. **Aquaculture**, v. 289, p. 13-18, 2009.

CAPÍTULO 2 – CARACTERIZAÇÃO DO SÊMEN DE TAMBAQUI NA ÉPOCA REPRODUTIVA

RESUMO

Objetivou-se com o presente trabalho caracterizar qualitativamente e quantitativamente o sêmen de tambaqui durante a estação reprodutiva. Foram realizadas três coletas, com intervalos regulares de aproximadamente 30 dias na estação reprodutiva de 2012/2013. Foram utilizados dez reprodutores de no mínimo três anos de idade. Para a coleta de sêmen foi realizada indução hormonal com extrato de hipófise de carpa, a extração do sêmen ocorreu por massagem abdominal. Após coletado, o sêmen foi submetido a avaliações de motilidade, vigor, tempo de vida, volume do ejaculado e concentração espermática. As variáveis quantitativas foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey e as variáveis qualitativas ao teste de Freedman, com significância de 0,05. Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) para a maioria dos parâmetros avaliados. A concentração espermática foi maior na primeira coleta (14,54 bilhões de espermatozoides/mL) e o tempo de vida diminuiu ao final do experimento.

Palavras-chave: espermograma, *Colossoma macropomum*, espermatozoide.

ABSTRACT

This study aims to qualitatively and quantitatively characterize the semen tambaqui *Colossoma macropomum* during the breeding season. Three samplings were made at regular intervals of approximately 30 days in 2012/2013 breeding season. Ten adult male of at least three years old age were used. To collect the semen hormonal induction was performed with carp pituitary extract, the extraction of semen occurred by abdominal massage. After collected the semen was subjected to evaluation of motility, vigor, life time, ejaculate volume and sperm concentration. Quantitative variables were subjected to analysis of variance (ANOVA) and Tukey test while qualitative variables were subjected to the Freedman test with 0.05 significance. No significant differences ($p > 0.05$) were observed for most of the evaluated parameters. The sperm concentration was higher in the first sampling (14.54 billion sperm / mL) and the lifetime decreased at the end of the experiment.

Keywords: semen analysis, *Colossoma macropomum*, espermatozoa.

1 INTRODUÇÃO

O conhecimento dos parâmetros seminais é fundamental no estudo da reprodução de peixes, pois informações a respeito das características dos espermatozoides permitem que se tenha conhecimento sobre a biologia reprodutiva de uma espécie, tanto para fins de conservação, quanto para a produção de formas jovens em cativeiro (LAHNSTEINER, 2003). No entanto, o conhecimento a respeito da biologia reprodutiva e caracterização seminal está restrito a algumas espécies, ainda que, dentre os vertebrados, os peixes possuem a maior variabilidade de características seminais e hábitos reprodutivos (SHULZ et al., 2010).

Na maioria dos teleósteos, as características seminais podem variar durante a época reprodutiva de uma espécie, ou até mesmo de animal para animal dentro de uma mesma espécie. A variação dessas características é influenciada, principalmente, pelos ciclos da natureza, como temperatura, regime de chuvas e fotoperíodo, fazendo com que haja variação de qualidade e quantidade de sêmen produzida pelos reprodutores (CHOWDHURY & JOY, 2007).

A qualidade do sêmen é um dos fatores determinantes para o sucesso da fertilização dos ovócitos, já que deve-se disponibilizar de espermatozoides de boa qualidade em quantidade suficiente para uma dose inseminante mínima e taxa de fertilização máxima (RURANGWA et al., 2004).

Segundo BILLARD et al. (1995) a motilidade espermática progressiva, duração da motilidade e o vigor espermático, que é caracterizado pela velocidade em que os espermatozoides se movimentam, são fatores que devem ser avaliados na determinação da qualidade dos espermatozoides.

Informações básicas como o volume de sêmen e a concentração espermática, são essenciais para se determinar como serão conduzidas as atividades de reprodução artificial de peixes em cativeiro, podendo-se determinar, por exemplo, a diluição do sêmen e a razão entre machos e fêmeas no manejo reprodutivo (MARIA et al., 2010).

Ainda que vários estudos foram realizados sobre as características seminais de algumas espécies brasileiras (STREIT JÚNIOR et al., 2006;

SANCHES et al., 2009; SANCHES et al., 2010; ROMAGOSA et al., 2010), estudos a respeito da caracterização do sêmen do tambaqui e sua variação sazonal ainda são escassos (MARIA et al., 2010; VIEIRA et al., 2011).

Desse modo, o objetivo do presente trabalho é caracterizar o sêmen de tambaqui durante a estação reprodutiva, a fim de fornecer informações que baseiem o manejo reprodutivo da espécie em cativeiro.

2 METODOLOGIA

O experimento foi realizado no período de dezembro de 2012 a fevereiro de 2013, nos setores de Piscicultura e de Reprodução Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás (EVZ-UFG), *Campus II – Samambaia*, em Goiânia-GO.

2.1 Colheita de sêmen

Foram selecionados dez exemplares machos da espécie tambaqui, sexualmente maduros, com idade mínima de três anos, que liberaram sêmen com leve pressão abdominal sem indução hormonal. Após a seleção, os indivíduos foram identificados por fio de cobre revestido de pvc colorido na nadadeira dorsal, pesados e encaminhados ao laboratório de reprodução de peixes do setor de Piscicultura da EVZ-UFG, onde foram acondicionados em caixas d'água de volume de 1000 L com fluxo de água contínuo e submetidos à indução hormonal com extrato bruto de hipófise de carpa, na quantidade de 2,0 mg/kg de peso vivo, diluído em solução salina de NaCl 0,9%, na quantidade de 0,5 mL/kg de peso vivo e aplicado via intraperitoneal.

Decorridas 12 horas da indução hormonal os indivíduos foram envoltos em toalha úmida e submetidos à extrusão dos gametas por pressão abdominal no sentido céfalo-caudal, realizada em meio seco, sem presença de água, urina ou sangue. O sêmen foi coletado em seringas graduadas de 10,0 mL previamente identificadas com o nome da cor de identificação de cada reprodutor e o número da amostra coletada. Foram coletadas sucessivas amostras até que não houvesse mais liberação de sêmen, de modo que a quantidade de sêmen liberada por cada reprodutor fosse exaurida.

Para cada amostra foi realizado o teste de contaminação, que consistiu em avaliar a motilidade espermática com o auxílio de microscópio óptico com aumento de 400X, em que foram rejeitadas as amostras que apresentaram mais de 1,0% de motilidade no campo óptico sem a ativação com água.

Atestada a viabilidade das amostras, o sêmen foi acondicionado em caixa térmica com gelo, na temperatura de aproximadamente 5,0°C e transportado ao setor de Reprodução Animal da EVZ-UFG para avaliação da qualidade.

Após a primeira coleta os reprodutores foram acondicionados em viveiro de 50 m² de área de lâmina d'água, previamente desinfetados e adubados e com renovação de água constante, onde foram mantidos durante o período de coletas, sendo retirados apenas para o manejo reprodutivo. A alimentação dos reprodutores foi realizada uma vez a cada dois dias, no final da tarde, com ração extrusada, de 42% de proteína bruta e *pellets* de 10-12 mm, na taxa de 0,5% do peso vivo.

Foram realizadas três coletas com intervalos regulares de aproximadamente 30 dias entre coletas, em que foram utilizados os mesmos animais.

2.2 Avaliação quantitativa e qualitativa do sêmen

Primeiramente foi realizada a mensuração da quantidade de sêmen liberada por cada reprodutor em mL para a verificação da variação da quantidade de sêmen liberada em função do tempo numa mesma época de reprodução.

Para cada amostra viável de sêmen foi realizada a avaliação de motilidade espermática, em que, em uma lâmina para microscopia, foi colocado 0,01 mL de cada amostra viável de sêmen e ativada com água de torneira na proporção de 1:20 (sêmen:água) e sobre esta uma lamínula que foi observada em microscópio óptico pré-ajustado na objetiva de 400X, em que foi determinada subjetivamente a porcentagem de espermatozoides móveis no campo de visão.

O vigor espermático foi avaliado subjetivamente de acordo com a robustez de movimentação celular, atribuindo-se um escore de zero a cinco, em função da velocidade e progressão de movimento dos espermatozoides, de modo que, quando todos os espermatozoides se apresentam imóveis, atribui-se o vigor de 0, ao passo, que quando os espermatozoides apresentavam rápida movimentação e progressão contínua, atribui-se ao vigor o escore 5.

O tempo de vida foi estimado com cronômetro, disparado no momento da ativação e parado quando o último espermatozoide do campo de visão cessou sua movimentação.

Para a determinação da concentração espermática, o sêmen foi diluído na proporção de 1:4000 em solução de formol salina tamponada (10,0%) e realizada a contagem na câmara hematimétrica de Neubauer, para a determinação do número de espermatozoides por mL de sêmen de cada amostra.

2.3 Delineamento experimental

O experimento foi realizado em delineamento em blocos casualizados, sendo tomado como tratamento a época de colheita das amostras e os blocos cada reprodutor, perfazendo três tratamentos e dez blocos. As variáveis quantitativas foram submetidas à análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey. A variável qualitativa foi submetida ao teste de Friedman. Foi realizada a análise de correlação entre os pares de parâmetros quantitativos avaliados. Foi adotado nível de 0,05 de significância em todos os testes, que foram realizados com o auxílio do *software* R (R DEVELOPEMENT CORE TEAM, 2012).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos parâmetros qualitativos e quantitativos avaliados durante a realização do experimento estão apresentados na tabela 1.

TABELA 1 – Médias dos parâmetros seminais avaliados de tabaqui nas três coletas realizadas e valor de probabilidade da análise de variância.

Variável	Coleta			P
	dez/12	jan/13	fev/13	
Volume de sêmen (mL)	8,28	8,51	6,00	0,0685
Motilidade espermática (%)	80,00	84,00	84,78	0,1594
Vigor espermático*	4,10/4,00	3,80/4,00	4,11/4,00	0,3772
Tempo de vida (s)	158,33 ab	267,80 a	98,47 b	0,0055
Concentração espermática (bilhões/mL)	14,54 a	3,73 c	8,36 b	<0,001

Médias seguidas de letras diferentes são diferentes pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

*Teste de Freedman foi utilizado para comparação de médias, os dados apresentados são a média seguida da mediana.

Não foi observada diferença no volume de sêmen, motilidade espermática e vigor espermático durante a época em que foram realizadas as coletas das amostras.

Já o tempo de vida dos espermatozoides foi diferente entre os meses de janeiro e fevereiro de 2013, com médias de 267,80 s e 98,47 s respectivamente.

O tempo de vida é um parâmetro de avaliação da qualidade dos espermatozoides. BILLARD & COSSON (1992), observaram que amostras coletadas no início e ao final da época de reprodução, geralmente não são de boa qualidade. Os autores atribuem a baixa qualidade no final do período reprodutivo ao envelhecimento dos espermatozoides nos testículos, o que pode gerar alterações morfológicas nos espermatozoides.

Acredita-se que possa ter havido algum dano a integridade da mitocôndria dos espermatozoides, já que a mitocôndria está relacionada à manutenção das reservas de ATP e conseqüentemente a duração motilidade dos espermatozoides (SUQUET et al., 2000).

A fertilização dos gametas ocorre rapidamente, geralmente em períodos menores de um minuto, porém resultados de pesquisas que avaliam o tempo de viabilidade dos espermatozoides são difíceis de serem comparados, pois alguns autores consideram a perda de motilidade em diferentes porcentagens de espermatozoides móveis. SANCHES et al. (2010) observaram que para jundiá cinza, após 35 s de ativação somente 25,59% dos espermatozoides apresentavam motilidade, assim como para dourado, em que a motilidade dos espermatozoides variou entre 30 e 40 s (SANCHES et al., 2009), e tempo de vida de espermatozoides de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) de 50,3 s (STREIT JÚNIOR et al., 2006).

A concentração espermática variou durante o período de coleta, sendo que as amostras coletadas no mês de dezembro de 2012 (primeira coleta realizada) apresentaram maior concentração média de espermatozoides (14,54 bilhões/mL), seguida pela média das amostras do mês de fevereiro de 2013 (8,36 bilhões/mL) e janeiro de 2013 (3,73 bilhões/mL).

As médias da concentração de espermatozoides foram menores do que as encontradas por VIEIRA et al. (2011) que encontraram uma concentração média de 22,93 bilhões de espermatozoides/mL de ejaculado de reprodutores de tambaqui induzidos com hormônio em latitude equatorial. Além disso, os autores recomendam um intervalo de coleta de dois meses entre as induções hormonais, para que as reservas de espermatozoides sejam reestabelecidas.

A média das amostras coletadas no mês de janeiro apresentou redução significativa da concentração de espermatozoides, isso pode ser devido ao fato de que anteriormente à data de coleta houve um período de estiagem de dias, o que não ocorreu anteriormente às outras coletas e pode ter contribuído para a menor produção de espermatozoides pelos reprodutores nessa data.

Espécies tropicais reofílicas tem sua reprodução influenciada principalmente pelo regime de ventos e chuvas que, em ambiente natural, provocam mudanças no nível das águas. Essas mudanças afetam a quantidade e

qualidade de alimento disponíveis em função da época do ano, já que as planícies de inundação nos períodos de chuva se tornam ambientes ricos em alimento e abrigo, por este motivo, os desovadores totais tropicais, como é o caso do tambaqui, iniciam a estação reprodutiva principalmente nos períodos de cheia, para que as larvas encontrem maior abundância de alimento e apresentem altas taxas de sobrevivência (ZANIBONI FILHO & NUÑER, 2004).

Além disso, para machos o processo de gametogênese é dividido em duas fases: a primeira, denominada de espermatogênese, inclui a proliferação de espermatogonia, multiplicação de espermatócitos I por mitose, produção de espermatócitos II por meiose e diferenciação em espermatides, essa fase é completada quando ocorre a espermiogênese, que é a formação dos espermatozoides flagelados. Na segunda fase, denominada espermição, os espermatozoides são liberados nos ductos espermáticos, que ocorre durante a estação reprodutiva (MYLONAS et al., 2010). A maioria dos métodos de indução utilizados para realizar a reprodução artificial em aquicultura não induz a espermatogênese, que é um longo processo que pode durar dias ou semanas, mas principalmente induz espermição, de maneira que a indução é realizada para estimular a produção de fluido seminal e aumentar a quantidade de espermatozoides liberados pelo reprodutor (MYLONAS et al., 2010). Dessa forma, é possível que ainda que o volume de sêmen seja maior, a concentração de espermatozoides seja menor, pois a formação dos espermatozoides não é estimulada pela indução hormonal e sim por fatores ambientais.

4 CONCLUSÃO

Durante o período reprodutivo do tabaqui, houve mudanças na concentração de espermatozoides, que diminuiu em relação à primeira coleta e o tempo de vida dos espermatozoides, que foi menor no final do experimento em relação à coleta imediatamente anterior.

REFERÊNCIAS

1. BILLARD, R.; COSSON, J. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. **Journal of Experimental Zoology**, v. 261, p. 122-131, 1992.
2. BILLARD, R.; COSSON, G.; PERCHEC, G.; LINHART, O. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. **Aquaculture**, v. 129, p. 95-112, 1995.
3. CHOWDHURY, I.; JOY, E. K. P. Seminal vesicle and its role in the reproduction of teleosts. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 33, p. 383-398, 2007.
4. LAHNSTEINER, F. Morphology, fine structure, biochemistry and function of the spermatid ducts in marine fish. **Tissue and Cell**, v. 35, p. 363-373, 2003.
5. MARIA, A. N.; AZEVEDO, H. C.; SANTOS, J. P.; SILVA, A. C.; CARNEIRO, P. C. F. Semen characterization and sperm structure of the Amazon tambaqui *Colossoma macropomum*. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 26, p. 779-783, 2010.
6. MYLONAS, C. C.; FOSTIER, A.; ZANUY, S. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. **General and Comparative Endocrinology**, n 165, p. 516-534, 2010.
7. R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing** [online], R Foundation for Statistical Computing, 2012. Disponível em <http://www.R-project.org/>, ISBN 3-900051-07-0. Acesso em 30 mar. 2012.
8. ROMAGOSA, E.; SOUZA, B. E.; SANCHES, E. A.; BAGGIO, D. M.; BOMBARDELLI, R. A. Sperm motility of *Prochilodus lineatus* in relation to dilution rate and temperature of the activating medium. **Journal of Applied Ichthyology**, n. 26, p. 678–681, 2010.
9. RURANGWA, E.; KIME, D. E.; OLLEVIER, F.; NASH, J. P. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. **Aquaculture**, v. 234, p. 1-28, 2004.
10. SANCHES, E. A.; BOMBARDELLI, R. A.; MARCOS, R. M.; NEUMANN, G.; TOLEDO, C. P. R.; ROMAGOSA, E. Sperm motility of *Rhamdia quelen* studied using computer-assisted analysis by open-source software. **Aquaculture Research**, n. 42, p. 153-156, 2010.
11. SANCHES, E. A.; BOMBARDELLI, R. A.; BAGGIO, D. M.; SOUZA, B. E. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de dourado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.11, p.2091-2098, 2009.

12. SCHULZ, R. W.; FRANÇA, L. R.; LAREYRE, J. J.; LEGAC, F.; CHIARINI-GARCIA, H.; NOBREGA, R. H.; MIURA, T. Spermatogenesis in fish. **General and Comparative Endocrinology**, v. 165, p. 390-411, 2010.
13. STREIT JÚNIOR, D P.; RIBEIRO, R. P.; MORAES, G. V.; MENDEZ, L. V.; GALLO, J. M.; DIGMAYER, M.; POVH, J. A. Características qualitativas do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) após indução hormonal. **Bioscience Journal**, v. 22, n. 3, p. 119-125, 2006.
14. SUQUET, M.; DREANNO, C.; FAUVEL, C.; COSSON, J.; BILLARD, R. Criopreservation of sperm in marine fish. **Aquaculture Research**, v. 31, p. 231-243, 2000.
15. VIEIRA, M. J. A. F.; CARVALHO, M. A. M.; SALMITO-VANDERLEY, C. S. B.; SALGUEIRO, C. C. M.; VIVEIROS, A. T. M.; MOURA, A. A. A. N.; NUNES, J. F. Características do sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*) em latitude equatorial. **Archivos de Zootecnia**, v. 60, n. 232, p. 1263-1270, 2011.
16. ZANIBONI FILHO, E.; NUÑER, A. P. O. Reprodução de peixes migradores de água doce no Brasil. In: CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALOSSO, D. M.; CASTAGNOLLI, N. **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, p. 45-74, 2004.

CAPÍTULO 3 – CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE TAMBAQUI EM DIFERENTES CRIOPROTETORES

RESUMO

O objetivo com o trabalho foi avaliar a eficiência de quatro crioprotetores adicionados ao meio diluidor na criopreservação do sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*) e melhor protocolo de descongelamento. Foram realizadas quatro coletas com intervalos regulares de amostras de sêmen (*pool*) de dez reprodutores. Os crioprotetores testados foram: glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF) e metanol, na proporção de 10,0%. Para a avaliação da qualidade do sêmen após o descongelamento foi realizado o teste *in vivo* das amostras em três protocolos diferentes para cada crioprotetor, com três tempos de descongelamento (15, 30 e 45s) na temperatura de 30°C, totalizando 12 tratamentos com cinco repetições em esquema fatorial. Os resultados da fertilização foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, com significância de 0,05. O tratamento que resultou em melhor taxa de fertilização foi o que continha metanol como crioprotetor e o descongelamento no tempo de 30 s, com taxa de fertilização média de 77,65%, sendo, entre os tratamentos avaliados, o mais recomendado para a criopreservação do sêmen de tambaqui.

Palavras-chave: congelamento, *Colossoma macropomum*, espermatozoide.

ABSTRACT

The objective of the study was to evaluate the efficiency of four cryoprotectants added to the extender on sperm cryopreservation of tambaqui *Colossoma macropomum* and to define the best thawing protocol. Four samples of semen at regular intervals were collected from ten breeding males (pool). The cryoprotectants tested were: glycerol, dimethylsulfoxide (DMSO), dimethylformamide (DMF) and methanol at a ratio of 10.0%. For the evaluation of semen quality after thawing the *in vivo* test samples in three different protocols for each cryoprotectant was performed with three thawing times (15, 30 and 45s) at 30°C temperature, totaling 12 treatments with five replicates in factorial design. The results of fertilization were subjected to analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test, with significance of 0.05. The treatment that resulted in improved fertilization rate was the one containing methanol as cryoprotectant and thawing time of 30 s, with a mean fertilization rate of 77.65%, being among the treatments the most recommended for cryopreservation of tambaqui semen.

Keywords: cryopreservation, *Colossoma macropomum*, espermatozoa.

1 INTRODUÇÃO

A criopreservação de sêmen é uma técnica que visa a conservação de material genético em nitrogênio líquido a -196°C , temperatura em que a funcionalidade das células espermáticas e suas estruturas são conservadas e sua viabilidade é mantida para usos futuros (CARNEIRO, 2007).

A utilização da técnica de criopreservação de sêmen de peixes apresenta diversas vantagens, principalmente no que tange a resolução de problemas comuns na prática da reprodução artificial de diversas espécies.

A reprodução de espécies reofílicas que, em sua maioria, não se reproduz espontaneamente em cativeiro, deve ser realizada artificialmente. Porém, para que seja aplicado o protocolo de indução hormonal, os reprodutores devem estar em estágio de maturação gonadal avançado, o que pode ocorrer em períodos diferentes entre fêmeas e machos, ou quando se deseja obter indivíduos resultantes de hibridização entre duas espécies que possuem épocas reprodutivas diferentes. Dessa forma, a manutenção de banco de sêmen criopreservado, em quantidade e qualidade, auxilia na redução dos problemas com desovas assíncronas. Facilita também a rotina dentro de laboratórios de reprodução artificial de peixes, de forma que é possível direcionar maior atenção às fêmeas durante a desova.

Bancos de sêmen criopreservado possibilitam a realização de programas de melhoramento genético de espécies de importância econômica, para programas de preservação de recursos genéticos de populações nativas e/ou endêmicas de áreas degradadas por ações antrópicas, geralmente barramentos e modificações na calha dos rios, e programas de repovoamento da ictiofauna de corpos d'água, como estratégia de administração de recursos pesqueiros desses locais.

Além disso, permitem melhor aproveitamento de espaço em pisciculturas, diminuindo a demanda de lâmina d'água para estocagem de reprodutores, ainda há diminuição dos custos com manutenção de matrizes, pela necessidade de estoque de reprodutores menor.

Desta forma, estudos de técnicas e protocolos para criopreservação de sêmen de peixes são importantes para a propagação artificial das espécies de

peixe de interesse econômico, tanto na produção intensiva em piscicultura, quanto na conservação de recursos pesqueiros.

Sendo assim, objetivou-se com o presente trabalho, determinar qual o crioprotetor intracelular e tempo de descongelamento produzem melhor resultado no processo de criopreservação do sêmen de tambaqui.

2 METODOLOGIA

O experimento foi realizado no período de dezembro de 2012 a janeiro de 2014, nos setores de Piscicultura e de Reprodução Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás (EVZ-UFG), *Campus II* – Samambaia, em Goiânia-GO.

2.1 Colheita de sêmen

Foram selecionados dez exemplares machos da espécie tambaqui, sexualmente maduros, com idade mínima de três anos, que liberaram sêmen com leve pressão abdominal sem indução hormonal. Após a seleção, os indivíduos foram identificados por fio de cobre revestido de pvc colorido na nadadeira dorsal, pesados e encaminhados ao laboratório de reprodução de peixes do setor de Piscicultura da EVZ-UFG, onde foram acondicionados em caixas d'água de volume de 1000 L com fluxo de água contínuo e submetidos à indução hormonal com extrato bruto de hipófise de carpa, na quantidade de 2,0 mg/kg de peso vivo, diluído em solução salina de NaCl 0,9%, na quantidade de 0,5 mL/kg de peso vivo e aplicado via intraperitoneal. Decorridas 12 horas da indução hormonal os indivíduos foram envoltos em toalha úmida e submetidos à extrusão dos gametas por pressão abdominal no sentido céfalo-caudal, realizada em meio seco, sem presença de água, urina ou sangue. O sêmen foi coletado em seringas graduadas de 10,0 mL previamente identificadas com o nome da cor de identificação de cada reprodutor e o número da amostra coletada.

Para cada amostra foi realizado o teste de contaminação, que consistiu em avaliar a motilidade espermática com o auxílio de microscópio óptico com aumento de 400X, em que foram rejeitadas as amostras que apresentarem mais de 1,0% de motilidade no campo óptico sem a ativação com água.

Atestada a viabilidade das amostras, o sêmen foi acondicionado em caixa térmica com gelo, na temperatura de aproximadamente 5,0°C e transportado ao setor de Reprodução Animal da EVZ-UFG onde foi submetido ao processo de congelamento.

Após a primeira coleta os reprodutores foram acondicionados em viveiro de 50 m² de área de lâmina d'água, previamente desinfetados e adubados e com renovação de água constante, onde foram mantidos durante o período de coletas, sendo retirados apenas para o manejo reprodutivo. A alimentação dos reprodutores foi realizada uma vez a cada dois dias, no final da tarde, com ração extrusada, de 42% de proteína bruta e *pellets* de 10-12 mm, na taxa de 0,5% do peso vivo.

Foram realizadas três coletas com intervalos regulares de aproximadamente 30 dias entre coletas, em que foram utilizados os mesmos animais.

2.2 Criopreservação

As amostras de sêmen de todos os reprodutores foram misturadas na mesma proporção formando um *pool* de sêmen, que foi objeto de congelamento.

Em cada coleta o *pool* seminal foi dividido em quatro alíquotas de igual volume, adicionadas ao meio diluente à base de gema de ovo (20,0%), glicose (5,0%) e solução salina NaCl 0,9% (65,0%) na diluição 1:4 (sêmen/solução). Os crioprotetores glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF) e metanol foram acrescentados na proporção de 10,0%.

Cada meio diluente foi preparado previamente e armazenado em refrigerador, na temperatura aproximada de 5°C, para que não houvesse choque térmico do sêmen quando misturado à solução crioprotetora. Somente a gema de ovo foi adicionada ao meio diluidor minutos antes da diluição do sêmen no meio, a fim de não perder as suas propriedades.

Após homogeneizadas, as alíquotas de cada crioprotetor foram envasadas em palhetas de 0,5 mL em 15 amostras para cada meio crioprotetor em seguida foram colocadas em *racks* de alumínio, devidamente identificadas e alocadas em canecas de um botijão com vapor de nitrogênio do tipo *dry shipper*, estabilizado a -180,0°C, onde permaneceram por duas horas, e então, foram transferidas para botijão de nitrogênio líquido onde permaneceram armazenadas durante o período do experimento a temperatura de -196,0°C.

2.3 Descongelamento

O descongelamento foi realizado com auxílio de banho-maria pré-ajustado na temperatura de 30°C. As palhetas foram mergulhadas em tempos de 15, 30 e 45 s. Em cada descongelamento foi selecionada uma palheta de cada coleta de cada meio crioprotetor, que posteriormente foram cortadas com auxílio de cortador de palhetas e o sêmen descongelado das palhetas foi misturado para a realização da fertilização dos ovócitos.

2.4 Avaliação do sêmen *in vivo*

Para a avaliação do sêmen *in vivo* foi realizada reprodução artificial, com a seleção de duas fêmeas maduras, escolhidas subjetivamente pela aparência da papila urogenital, do abdômen e canulação intra-ovariana dos ovócitos. Após a seleção, as matrizes foram encaminhadas ao laboratório de reprodução, onde foram acondicionadas em caixas d'água de volume de 1000 L com fluxo de água contínuo e submetidas à indução hormonal com extrato bruto de hipófise de carpa na quantidade de 5,5 mg/kg de peso vivo, diluído em solução salina de NaCl 0,9% aplicado via intraperitoneal, em duas doses de 0,5 mg/kg e 5,0 mg/kg respectivamente com intervalo de 12 horas entre doses. Após a aplicação da segunda dose de hormônio foi realizada a contagem de 260 horas-grau, para a extrusão dos ovócitos por pressão abdominal no sentido céfalo-caudal em meio e recipiente seco, sem presença de água, urina ou sangue.

Para a fertilização, os ovócitos das duas fêmeas foram misturados em igual proporção e divididos em 60 alíquotas de 1 g cada em recipientes secos. Foi utilizado o sêmen pós-descongelamento dos quatro crioprotetores e três tempos de descongelamento, com cinco repetições, sendo que para cada repetição foi misturado o sêmen das coletas que ocorreram no decorrer do experimento. Os gametas foram misturados em meio seco e em seguida ativados com a água das incubadoras e incubados em incubadoras experimentais confeccionadas com garrafas tipo PET e tela de poliamida com malhas de 1 mm entre nós, com

volume útil de 1,0 L e fluxo de água contínuo na densidade aproximada de 1,0 g de ovo/L.

A taxa de fertilização foi estimada após os embriões terem atingido o estágio de gástrula inicial, momento em que a água de cada incubadora foi drenada e os embriões foram fixados em solução de formol salina tamponada (10,0%), em recipiente fechado e identificado. Para a determinação da taxa de fertilização os ovos foram contados e separados em embriões viáveis e ovos gorados, a taxa de fertilização foi considerada a porcentagem de embriões viáveis em relação ao total de ovos incubados em cada incubadora.

2.4 Delineamento experimental

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial entre quatro crioprotetores e três tempos de descongelamento, perfazendo 12 tratamentos com cinco repetições.

Os resultados do teste de fertilização foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey. Foi adotado nível de 0,05 de significância em todos os testes, que foram realizados com o auxílio do *software* R (R DEVELOPEMENT CORE TEAM, 2012).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do teste de fertilização com o sêmen descongelado estão apresentados na tabela 1.

TABELA 1 – Valores médios da taxa de fertilização (%) nos meios de congelamento com quatro crioprotetores e três tempos de descongelamento, seguidos pelas médias globais dos crioprotetores (linhas) e tempos de descongelamento (colunas) e valor de probabilidade com significância de 0,05.

Crioprotetor	Tempo de descongelamento (s)			Média	P*	P**	P***
	15	30	45				
DMF	46,79 ^{bB}	60,35 ^{aB}	41,94 ^{cC}	49,69 ^C			
DMSO	42,24 ^{cC}	62,97 ^{aB}	51,84 ^{bB}	52,35 ^B			
Glicerol	37,05 ^{bD}	43,13 ^{aC}	36,35 ^{bD}	38,84 ^D	<0,001	<0,001	<0,001
Metanol	64,92 ^{bA}	77,65 ^{aA}	64,20 ^{bA}	68,92 ^A			
Média	47,75 ^b	61,02 ^a	48,58 ^b				

Médias seguidas de letras diferentes minúsculas são diferentes nas linhas e médias seguidas de letras diferentes maiúsculas são diferentes nas colunas pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

*Valor de probabilidade referente ao teste F da análise de variância do crioprotetor.

**Valor de probabilidade referente ao teste F da análise de variância do tempo de descongelamento

***Valor de probabilidade referente ao teste F da análise de variância da interação entre o crioprotetor e o tempo de descongelamento

Houve diferença nos resultados de fertilização entre os meios com diferentes crioprotetores ($P^* < 0,001$) e os tempos de descongelamento das amostras ($P^{**} < 0,001$).

Entre os crioprotetores, todos apresentaram diferença entre si, mostrando-se como o melhor crioprotetor testado o metanol, com taxa de fertilização média de 68,92%, seguido do DMSO, com taxa de fertilização média

de 52,35%, DMF com taxa de fertilização média de 49,69% e glicerol, com taxa de fertilização média de 38,84%.

Entre os tempos de descongelamento, 30 s apresentou melhores taxas de fertilização com 61,02%. Já 15 e 45 s, apresentaram resultados inferiores de 47,75% e 48,58% respectivamente, mas não diferiram significativamente entre si.

Houve interação entre os crioprotetores e o tempo de descongelamento ($P^{***}<0,001$). A interação pode ser percebida nos tratamentos com os crioprotetores DMF e DMSO, em ambos os tratamentos o tempo de descongelamento de 30 s apresentou resultados superiores (DMF=60,35% e DMSO=62,97%). Porém, no tratamento com DMF a segunda melhor taxa de fertilização foi observada no descongelamento em 15 s (46,79%), seguido pelo tempo de 45 s com taxa de fertilização média de 41,94%. Já para o tratamento com DMSO a segunda melhor taxa de fertilização foi observada no descongelamento em 45 s (51,84%) seguido pela taxa de fertilização média do tempo de 15 s (45,24%).

Desdobrando a interação entre os tratamentos, pode-se observar que os tratamentos que continham metanol como crioprotetor foram superior para todos os tempos de descongelamento, sendo as taxas de fertilização médias de 64,92% para 15 s, 77,65% para 30 s e 64,20% para 45 s.

Os resultados obtidos no experimento divergiram dos encontrados por VARELA JÚNIOR et al. (2012) que avaliaram o uso de amidas em comparação ao DMSO (10%) e glicerol (5%) como crioprotetores intracelulares para sêmen de tambaqui e observaram que melhores resultados de taxas de fertilização, eclosão e integridade dos espermatozoides ocorreram nas amostras criopreservadas com o uso de amidas, incluindo a DMF, em que os autores observaram taxas de fertilização média de 91,6%, superiores às observadas no presente trabalho.

LE et al. (2011) avaliaram o uso de DMSO, etilenoglicol, metanol e glicerol, ambos nas concentrações de 5%, 10%, 15% e 20%, como crioprotetores intracelulares na criopreservação de sêmen de corvina (*Larimichthys polyactis*) e observaram que o etilenoglicol na concentração de 10% apresentou melhor resultado de motilidade espermática com média de 73,7%, não diferindo significativamente da motilidade observada no sêmen fresco, de 88,7%.

VIVEIROS et al. (2011) avaliaram o uso de DMSO e metilglicol como crioprotetores, na concentração de 10%, para sêmen de *Brycon insignis* e encontraram melhores resultados de motilidade espermática com o uso de metilglicol (77% a 82%) em relação ao DMSO (23% a 46%).

A eficiência do agente crioprotetor no processo de congelamento de uma célula pode variar em função do tipo de célula a ser criopreservada, levando-se em consideração o tipo de animal e a espécie. Além disso, a concentração e o tempo de exposição ao crioprotetor antes do congelamento podem produzir diferenças na viabilidade das células criopreservadas (CASTRO et al., 2011).

O crioprotetor intracelular deve ser um composto que consiga penetrar na célula por difusão passiva, causando desidratação nas célula e protegendo-a contra as injúrias do congelamento. A permeabilidade do crioprotetor na célula está relacionada ao baixo peso molecular do mesmo (PURDY, 2006). Dentre os crioprotetores testados, metanol é o que apresenta o menor peso molecular, o que aumentaria a velocidade de penetração na célula e, possivelmente, a proteção durante o processo de criopreservação, evitando a formação de cristais de gelo que possam romper as estruturas celulares.

CHEW et al. (2010) avaliaram o tempo de descongelamento do sêmen de *Probarbus jullieni* a 40°C por seis, sete, oito, dez, 20 e 30 segundos e observaram que maior taxa de motilidade ocorreram quando o descongelamento por sete segundos, com média de 55%, sendo que a partir de dez segundos imersas em água para descongelamento, as amostras apresentaram redução drástica da motilidade percentual, com valores de motilidade abaixo de 10%.

VIVEIROS et al. (2012a) avaliaram tempo e temperatura de descongelamento do sêmen criopreservado de pirapitinga do Sul (*Brycon opalinus*) e observaram que o descongelamento a temperatura de 60°C por oito segundos proporcionou melhores resultados de motilidade espermática e duração do tempo de motilidade do que a 30°C, tanto para recipientes de envase de 0,5 e 4,0 mL.

Para a matrinxã (*Brycon natterii*) os resultados de motilidade espermática percentual e vigor espermático não diferiram para descongelamento a 30°C por 16 segundos ou 50°C e 60°C por oito segundos (OLIVEIRA et al., 2007; VIVEIROS et al., 2012b).

O estado e a viabilidade das células espermáticas após a criopreservação depende da capacidade da célula de resistir a uma série de mudanças físicas, químicas e fisiológicas que ocorrem durante o processo de descongelamento (ANDREEV et al., 2009).

Os piores resultados observados foram nos tratamentos com glicerol para todos os tempos de descongelamento, sendo que para esse crioprotetor o tempo de descongelamento de 30 s produziu melhor taxa média de fertilização (43,13%) em relação aos tempos de descongelamento de 15 s (37,05%) e 45 s (36,35%), que não diferiram entre si.

Piores resultados observados com o uso de glicerol podem ser devido ao fato de que o glicerol pode causar efeito tóxico à célula espermática, havendo desnaturação proteica e modificações nas interações de actina da cauda do espermatozoide, o que podem interferir na movimentação dos espermatozoides e, conseqüentemente, no processo de fertilização (ALVARENGA et al., 2000).

4 CONCLUSÃO

Entre os crioprotetores testados no experimento, metanol resultou em melhores taxas de fertilização. Para a temperatura de 30°C o melhor tempo de descongelamento é de 30s.

Entre os tratamentos testados o uso do metanol como crioprotetor e o tempo de descongelamento de 30 s na temperatura de 30°C resultou na melhor taxa de fertilização, sendo o tratamento recomendado para a criopreservação do sêmen de tambaqui.

REFERÊNCIAS

- 1 ALVARENGA, M. A.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.; MOREIRA, R. M.; CESARINO, M. M. Acrosomal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two packaging systems. **Equine Veterinary Journal**, v. 32, p. 541-545, 2000.
- 2 ANDREEV, A. A.; SADIKOVA, D. G.; GAKHOVA, E. N.; PASHOVKIN, T. N.; TIKHOMIROV, A. M. Congelation of cryoprotective solutions and cryopreservation of fish sperm. **Biophysics**, v. 54, n. 5, p. 612-616, 2009.
- 3 CARNEIRO, P. C. F. Tecnologias de produção e armazenamento de sêmen de peixes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 3, p. 361-366, 2007.
- 4 CASTRO, S. V.; CARVALHO, A. A.; SILVA, C. M. G.; FAUSTINO, L. R.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oocitos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, n. 2, p. 1-17, 2011.
- 5 CHEW, P. C.; HASSAN, R.; RASHID, Z. A.; CHUAH, H. P. The current status of sperm cryopreservation of the endangered *Probarbus jullieni* (Sauvage) in Malasya. **Journal of Applied Ichthyology**, v.26, p. 797-805, 2010.
- 6 LE, M. H.; LIM, H. K.; MIN, B. H.; PARK, M. W.; CHANG, Y. J. Semen cryopreservation of yellow croaker *Larimichthys polyactis*. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 21, p. 789-797, 2011.
- 7 OLIVEIRA, A. V.; VIVEIROS, A. T. M.; MARIA, A. N.; FREITAS, R. T. F.; IZAU, Z. A. Sucesso do resfriamento e congelamento de sêmen de pirapitinga *Brycon nattereri*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 6, p. 1509-1515, 2007.
- 8 PURDY, P. H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v. 63, p. 215-225, 2006.
- 9 R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: A language and environment for statistical computing [online], R Foundation for Statistical Computing, 2012. Disponível em <http://www.R-project.org/>, ISBN 3-900051-07-0. Acesso em 30 mar. 2012.
- 10 VARELA JÚNIOR, A. S.; CORCINI, C. D.; GHELLER, S. M. M.; JARDIM, R. D.; LUCIA JÚNIOR, T.; STREIT JÚNIOR, D. P.; FIGUEIREDO, M. R. C. Use of amides as cryoprotectants in extenders for frozen sperm of tambaqui, *Colossoma macropomum*. **Theriogenology**, v. 78, p. 244-251, 2012.
- 11 VIVEIROS, A. T. M.; ORFÃO, L. H.; NASCIMENTO, A. F.; CORRÊA, F. M.; CANEPPELE, D. Effects of extenders, cryoprotectants and freezing methods

on sperm quality of the threatened Brazilian freshwater fish pirapitinga-do-sul *Brycon opalinus* (Characiformes). **Theriogenology**, v. 78, p. 361-368, 2012a.

- 12 VIVEIROS, A. T. M.; MARIA, A. N.; AMARAL, T. B.; ORFÃO, L. H.; ISAU, Z. A.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R. Spermatozoon ultrastructure and sperm cryopreservation of the Brazilian dry season spawner fish pirapitinga, *Brycon nattereri*. **Aquaculture Research**, v. 43, p. 546-555, 2012b.
- 13 VIVEIROS, A. T. M.; AMARAL, T. B.; ORFÃO, L. H.; ISAU, Z. A.; CANEPPELE, D.; LEAL, M. C. Sperm cryopreservation of tiete tetra *Brycon insignis* (Characiformes) effects of cryoprotectants, extenders, thawing temperatures and activating agents on motility features. **Aquaculture Research**, v. 42, p. 858-865, 2011.