

**MOTILIDADE ESPERMÁTICA DE SÊMEN DE
PEIXES CRIOPRESERVADO EM DIFERENTES
MEIOS AVALIADA POR MÉTODOS
SUBJETIVO E COMPUTADORIZADO**

ARIANE FLÁVIA DO NASCIMENTO

2008

ARIANE FLÁVIA DO NASCIMENTO

**MOTILIDADE ESPERMÁTICA DE SÊMEN DE PEIXES
CRIOPRESERVADO EM DIFERENTES MEIOS AVALIADA POR
MÉTODOS SUBJETIVO E COMPUTADORIZADO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Ciências Veterinárias, área de concentração em Reprodução de Peixes, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora

Prof^ª. Dra Ana Tereza de Mendonça Viveiros

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Nascimento, Ariane Flávia.

Motilidade espermática de sêmen de peixes criopreservado em diferentes meios avaliada por métodos subjetivo e computadorizado

/ Ariane Flávia Nascimento. – Lavras : UFLA, 2008.

54 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2008.

Orientador: Ana Tereza de Mendonça Viveiros.

Bibliografia.

1. Peixe. 2. Sêmen. 3. Criopreservação. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 639.375

ARIANE FLÁVIA DO NASCIMENTO

**MOTILIDADE ESPERMÁTICA DE SÊMEN DE PEIXES
CRIOPRESERVADO EM DIFERENTES MEIOS AVALIADA POR
MÉTODOS SUBJETIVO E COMPUTADORIZADO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Ciências Veterinárias, área de concentração em Reprodução de Peixes, para obtenção do título de “Mestre”.

Defesa em 29 de agosto de 2008

Prof. Dr. Paulo dos Santos Pompeu – UFLA

Prof. Dr. Rilke Tadeu Fonseca de Freitas – UFLA

Dr. Marcelo de Castro Leal – Utrecht University, Holanda

Profª. Dra Ana Tereza de Mendonça Viveiros

UFLA

(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2008

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Aquiles e Lúcia, aos meus irmãos, Amanda, Álvaro e Alberty, muito obrigada pelo apoio, compreensão e amor incondicional.

Agradeço à Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Medicina Veterinária, pela oportunidade e ao CNPq, pelo apoio financeiro.

À profª. Ana Tereza de Mendonça Viveiros, pela valiosa orientação, ensinamentos e paciência.

Aos colegas, Laura Helena Órfão, Ziara A. Isaú, Alexandre Nizio Maria, Thiciana Amaral, Ivan Allaman, por tornarem possível a conclusão deste trabalho.

À Companhia Energética de Minas Gerais (CEMIG), Estação de Piscicultura de Itutinga, pela disponibilização dos reprodutores e instalações e à equipe, Gilson, Jailson e Darli, pelo auxílio e colaboração.

Ao Centro de Pesquisas Rodolpho von Ihering do Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS), em Pentecoste (CE), em especial ao Dr. Pedro Eymard Mesquita, aos funcionários e estagiários.

Ao Laboratório de Tecnologia do Sêmen da Universidade Estadual do Ceará, em especial ao Dr. José Ferreira Nunes, Audália M. Carvalho, Marcelo J. A. F. Vieira, Cristiane C. M. Salgueiro e Nathalie Ommundsen.

Aos queridos amigos Cibele Vidal Bastos, Nathalie Ommundsen, Íris Cristina Santos, Clarisse Amélia Bosco, Taísa Amarente, Marco Aurélio S. Leite, pelo amor, apoio e companheirismo, alguns bem de perto, outros mais distantes.

A Friedrich Nietzsche, pela inspiração.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
INTRODUÇÃO	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	4
MOTILIDADE DO SÊMEN CRIOPRESERVADO DE PIRAPITINGA (<i>Piaractus brachypomus</i>), PELO MÉTODO SUBJETIVO E COMPUTADORIZADO SCA [®]	5
FERTILIDADE E MOTILIDADE DO SEMEN DE CURIMBA (<i>Prochilodus lineatus</i>) CRIOPRESERVADO EM ÁGUA DE COCO EM PÓ (ACP [®]) OU EM GLICOSE	24
CONCLUSÕES	45

RESUMO

NASCIMENTO, Ariane Flávia. **Motilidade espermática de sêmen de peixes criopreservado em diferentes meios avaliada por métodos subjetivo e computadorizado.** 2008. 54 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

A pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) e a curimba (*Prochilodus lineatus*) são espécies de peixe da ordem Characiforme, de importância econômica e ecológica. Os objetivos do presente estudo foram (a) avaliar diferentes meios de congelamento para o sêmen de ambas as espécies; (b) comparar a motilidade espermática após o descongelamento avaliada pelo método subjetivo ao microscópio de luz, bem como pelo método computadorizado SCA[®], em ambas as espécies; (c) determinar as velocidades espermáticas após o descongelamento pelo método computadorizado SCA[®], em ambas as espécies e; (d) estabelecer uma correlação entre as velocidades espermáticas e a taxa de fertilização para a curimba. O sêmen de pirapitinga foi diluído em quatro meios de congelamento preparados com dois diluidores (glicose e BTS[®]) combinados a dois crioprotetores (metilglicol e DMSO) e congelado em vapor de nitrogênio. O sêmen foi descongelado, a motilidade espermática foi avaliada tanto subjetivamente no microscópio de luz quanto objetivamente pelo sistema computadorizado SCA[®] e as velocidades curvilínea (VCL), média na trajetória (VAP) e linear (VSL) foram calculadas. O sêmen de curimba foi diluído em dois meios de congelamento preparados com dois diluidores (glicose e ACP[®]) combinados ao crioprotetor metilglicol e congelado em vapor de nitrogênio.

¹ **Comitê Orientador:** Prof^a. Ana Tereza de Mendonça Viveiros – UFLA (Orientadora), Prof. José Ferreira Nunes – UECE, Prof. Rilke Tadeu Fonseca de Freitas – UFLA.

Metade das palhetas foi avaliada quanto à motilidade e velocidades espermáticas, como descrito para a pirapitinga. A outra metade das palhetas foi avaliada quanto à capacidade de fertilizar ovócitos frescos de três fêmeas. Tanto na pirapitinga quanto na curimba, não houve diferença significativa entre a motilidade espermática avaliada subjetivamente ou pelo sistema computadorizado. Em pirapitinga, o sêmen congelado em glicose-metilglicol apresentou as maiores taxas de motilidade (81%) e as maiores velocidades, quando comparadas às amostras congeladas nos outros meios. Em curimba, as amostras criopreservadas em ACP[®] apresentaram maior motilidade espermática (84%), em relação às amostras criopreservadas em glicose (75%); entretanto, a taxa de fertilização e as velocidades espermáticas foram semelhantes para o sêmen criopreservado nos dois diluidores. Foram encontradas correlações positivas entre a taxa de fertilização e as velocidades espermáticas. O crioprotetor metilglicol foi mais eficiente do que o DMSO para o sêmen de pirapitinga, conforme observado em outros Characiformes. A glicose é um diluidor bastante simples, de fácil acesso em farmácias e drogarias, e, combinado ao metilglicol, é um excelente meio de congelamento para ambas as espécies estudadas.

ABSTRACT

NASCIMENTO, Ariane Flávia. **Motility of fish sperm cryopreserved in different freezing media evaluated subjectively and by computerized system.** 2008. 54 p. Dissertation (Master in Veterinary Science) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.¹

Pirapitinga (*Piaractus brachipomus*) and curimba (*Prochilodus lineatus*) are Characiforme fish species, of economic and ecological importance. The aims of this study were to (a) evaluate different freezing media for semen of both species; (b) compare post-thaw sperm motility subjectively evaluated under light microscope and computerized system SCA[®] for both species and (c) determine post-thaw sperm velocities by SCA[®] for both species and; (d) establish a correlation between the sperm velocities and the fertilization rates for curimba. Pirapitinga semen was diluted in four freezing media prepared with two extenders (glucose and BTS[®]) combined with two cryoprotectants (methylglycol and DMSO) and frozen nitrogen vapor. Semen was thawed, sperm motility was evaluated both subjectively under light microscope and objectively by computer system SCA[®] and the curvilinear velocity (VCL), average path (VAP) and straight line (VSL) were calculated. Curimba semen was diluted in two semen extenders (ACP[®] and glucose) combined with methylglycol as cryoprotectant and frozen in nitrogen vapor. Half of the samples were evaluated for motility and sperm velocity, as described for pirapitinga. The other half was evaluated for the capacity to fertilize fresh oocytes from three females. In both pirapitinga and curimba, there was no difference in post-thaw sperm motility evaluated either subjectively or by computer system. In pirapitinga, semen cryopreserved in glucose-methylglycol yielded higher motility (81%) and velocities compared

¹ **Guidance Committee:** Prof^ª. Ana Tereza de Mendonça Viveiros – UFLA (Advisor), Prof. José Ferreira Nunes – UECE, Prof. Rilke Tadeu Fonseca de Freitas – UFLA.

to semen cryopreserved in the other media. In curimba, semen cryopreserved in ACP[®] yielded higher motility (84%) than semen cryopreserved in glucose (75%), however fertilization rates and sperm velocities were similar among samples cryopreserved in both extenders. A positive correlation was observed between fertilization rate and sperm velocity. The cryoprotectant methylglycol was more efficient than DMSO for pirapitinga semen, as observed in other Characiformes. Glucose is a simple extender, available in drugstores and, combined with methylglycol, is an excellent freezing medium for semen of both fish species studied here.

INTRODUÇÃO

Com a grande expansão da piscicultura comercial, muitas espécies de peixes, comumente encontradas em rios, são criadas em cativeiros, nos quais, muitas vezes, não encontram condições adequadas para a reprodução. Isso ocorre, principalmente, com aquelas espécies que têm a característica de migrar em determinados meses do ano, quando passam por estímulos hormonais e ambientais, até chegarem às calhas dos rios ou nos grandes afluentes, onde ocorre a desova. Muitas dessas espécies, conhecidas como peixes de piracema, têm grande importância comercial e são produzidas em grande quantidade, enquanto outras, devido à sobrepesca ou outras ações antropogênicas (assoreamento de rios, construções de barragens, diminuição de matas ciliares, aumento da poluição e introdução de espécies exóticas), têm seu número cada vez mais diminuído. Entre essas ações, a construção de barragens nos rios causa profundas modificações no ambiente aquático (Sale, 1985).

O desenvolvimento de técnicas que levam ao aumento da produção animal ou à conservação de espécies passíveis de extinção vão ao encontro de questões econômicas e ecológicas atualmente levantadas, uma vez que o objetivo de ambas é aumentar o número de alevinos de espécies comerciais ou em extinção. As estratégias para evitar a redução de recursos pesqueiros incluem o desenvolvimento de técnicas de reprodução artificial, de larvicultura e alevinagem, de coleta e preservação de sêmen. Essas estratégias podem também ser utilizadas na produção comercial de peixes. Além disso, as técnicas de preservação do sêmen podem auxiliar em programas de melhoramento genético e para a formação de um banco para conservação dos recursos genéticos (Órfão, 2006). Outras vantagens da preservação de sêmen são: permitir a troca de material genético entre os laboratórios de reprodução e reduzir o número de reprodutores, diminuindo, assim, os custos de produção e eliminando problemas

de assincronia da maturidade gonadal, quando machos e fêmeas não estão preparados simultaneamente, além do estabelecimento de programas de hibridização utilizando espécies com períodos reprodutivos diferentes (Viveiros, 2005). Diante dessas circunstâncias há uma demanda crescente por técnicas práticas e acuradas de preservação de gametas que facilitem a fertilização artificial desses animais para repovoamento dos rios e sua criação em cativeiro.

O armazenamento de espermatozóides pode ser realizado em curto prazo (horas ou dias), por meio do resfriamento, a temperaturas entre 4°C-6°C ou em longo prazo, pela criopreservação em nitrogênio líquido a -196°C, mantendo sua viabilidade por tempo indefinido. No processo de criopreservação, o sêmen, ao ser congelado, necessita, antes, ser diluído em meio contendo diluidor e crioprotetor. Esse composto é formulado para prevenir crioinjúrias aos espermatozóides e também a iniciação da motilidade. Os diluidores, assim como no resfriamento, não devem ativar a motilidade espermática, ser estáveis ao longo do tempo e estéreis. Além disso, os diluidores devem ser carreadores de crioprotetores. Os crioprotetores devem ser adicionados ao meio diluidor para que haja proteção do espermatozóide durante o congelamento e o descongelamento (Viveiros, 2005). Essas substâncias devem possuir como propriedades uma baixa toxicidade para as células e alta solubilidade em água. Podem ser classificadas como intracelulares ou permeáveis e extracelulares ou impermeáveis. O crioprotetor intracelular é uma substância química que retira a água da célula e diminui a temperatura na qual o interior da célula é congelado, diminuindo também na formação de cristais de gelo por outras formas desconhecidas. Entre os crioprotetores intracelulares mais utilizados, podem ser citados dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol, metanol e etilenoglicol. Além desses, o metilglicol também tem mostrado eficiência como crioprotetor (Viveiros & Godinho, 2008).

Usualmente a qualidade do sêmen é avaliada apenas pela estimativa da porcentagem de espermatozóides móveis. Há alguns trabalhos nos quais se avalia de forma mais detalhada a atividade espermática, apresentando a velocidade dos espermatozóides e a frequência de batimento flagelar, medido mediante análise de vídeomicrografia. O analisador de motilidade espermática assistida por computador tem sido amplamente utilizado para examinar a qualidade do sêmen de aves e mamíferos, sendo a sua aplicação recente em estudos nos peixes (Rurangwa et al., 2001). Parâmetros de motilidade espermática apresentados pelo programa, como porcentagem de espermatozóides móveis, velocidade curvilínea, frequência de batimento flagelar, entre outros, estão diretamente relacionados à taxa de fertilização e poderia prever o potencial reprodutivo de um indivíduo. Na aquicultura, seria possível observar o efeito da manipulação da temperatura, fotoperíodo e condições de cultivo, além de possibilitar a verificação da viabilidade de meios diluentes e crioprotetores para o congelamento de sêmen. O analisador de motilidade captura imagens sucessivas, identificando os pontos onde o espermatozóide se encontra a cada imagem. São traçadas retas entre esses pontos, sendo calculado o percurso total (Look et al., 2001).

Dessa forma, com o presente trabalho objetivou-se: (a) avaliar a eficiência de meios de congelamento para o sêmen de pirapitinga e curimba, (b) avaliar a motilidade espermática tanto subjetivamente por microscópio de luz como objetivamente, calculada por método computadorizado, (c) quantificar as velocidades espermáticas para ambas as espécies e (d) estabelecer uma correlação entre as velocidades espermáticas e a taxa de fertilização para a curimba.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ORFÃO, L. H. **Resfriamento e criopreservação de sêmen de curimba *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836)**. 2006. 82 p. Dissertação (Mestrado em Produção Animal), Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brazil.

RURANGWA, E.; VOLCKAERT, F. A. M.; HUYSKENS, G.; KIME, D.E.; OLLEVIER, F. Quality control of refrigerated and cryopreserved semen using computer-assisted sperm analysis (CASA), viable staining and standardized fertilisation in African catfish (*Clarias gariepinus*). **Theriogenology**, Woburn, v. 55, n.3, p. 751-769, 2001.

SALE, M. J. Aquatic ecosystem response to flow modification: an overview of the issues. In: OLSON, E. W. (Ed.). **Proceeding of the symposium on small hydropower and fisheries**. Bethesda: American Fisheries Society, 1985. p. 25-31.

VAN LOOK, K. J. W.; MCALLISTER, B. G.; HUYSKENS, G.; RURANGWA, E.; OLLEVIER, F.; KIME, D. E. Computer assisted Sperm Analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. **Comparative Biochemistry and Physiology**, New York, v.130, n.4, p. 425-433. 2001.

VIVEIROS, A. T. M. Criopreservação de sêmen de peixes. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16., 2005, Goiânia. **Palestras...** Goiânia: [s. n.], 2005.

VIVEIROS, A. T. M.; GODINHO, H. P. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. **Fish Physiology Biochemistry**, 2008, doi: 10.1007/s10695-008-92403.

MOTILIDADE DO SÊMEN CRIOPRESERVADO DE PIRAPITINGA
(*Piaractus brachypomus*), PELO MÉTODO SUBJETIVO E
COMPUTADORIZADO SCA®

(Preparado de acordo com as normas da revista “Theriogenology”)

A.F. Nascimento¹, A.N. Maria², N.O. Pessoa³, M.A.M. Carvalho³ e A.T.M.
Viveiros^{4*}

1- Mestranda do programa de pós-graduação em Ciências Veterinárias-UFLA

2- Doutorando do programa de pós-graduação em Zootecnia-UFLA

3- Laboratório de Tecnologia do Sêmen-UECE

4- Professora associada do Departamento de Zootecnia-UFLA

* Autor correspondente. E-mail: ana.viveiros@ufla.br

Resumo

A pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) pertence à família Characidae e é originário das Bacias do rio Amazonas e Orinoco. A pirapitinga possui um rápido crescimento, carne de grande aceitação no mercado e excelentes condições para a piscicultura. O uso de sêmen criopreservado facilita a reprodução artificial realizada em pisciculturas comerciais. Conduziu-se este estudo, objetivando: (a) comparar a eficiência do metilglicol com o dimetilsulfóxido (DMSO), o crioprotetor mais comumente utilizado em characiformes; (b) testar a eficiência da glicose e BTS® (Beltsville Thawing Solution) como diluidores de sêmen; e (c) comparar a motilidade espermática pós-descongelamento subjetivamente, avaliada ao microscópio de luz e pelo método computadorizado. O sêmen de 19 machos foi coletado e então diluído

em quatro meios de congelamento preparados a partir da combinação de dois diluidores (glicose e BTS[®]) e dois crioprotetores (metilglicol e DMSO). Em seguida, o sêmen diluído foi envasado em palhetas de 0,5 mL e congelado em vapor de nitrogênio a -170°C, e armazenado em nitrogênio líquido. Após o transporte por 100 km de carro, as palhetas foram descongeladas (banho-maria 60°C por 8 segundos), a motilidade espermática foi avaliada tanto subjetivamente no microscópio de luz quanto objetivamente pelo sistema computadorizado SCA[®] e as velocidades curvilínea, média na trajetória, linear e a área da cabeça dos espermatozoides foram calculadas. Não houve diferença significativa quando a motilidade espermática foi avaliada subjetivamente ou pelo sistema computadorizado. O sêmen congelado em glicose-metilglicol apresentou as maiores taxas de motilidade (81%), as maiores velocidades espermáticas e as menores áreas de cabeça do espermatozoide (14,4 μm^2), quando comparadas às amostras congeladas nos outros meios. O metilglicol foi eficiente como crioprotetor do sêmen de pirapitinga, como já havia sido observado em outras espécies de peixe.

Abstract

Pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) belongs to the Characidae family and is native to the Amazon and Orinoco River basins. Pirapitinga has a fast growth, meat of high acceptance and excellent conditions for aquaculture. The use of cryopreserved sperm would facilitate the artificial reproduction carried out in the commercial hatcheries. The aims of this study were to (a) compare the efficiency of methylglycol with dimethyl sulfoxide (DMSO), the cryoprotectant mostly used in characiforms; (b) test the efficiency of glucose and BTS[®] (Beltsville Thawing Solution) as semen extender; and (c) compare post-thaw sperm motility subjectively evaluated under light microscope and by computerized system. Semen was collected from 19 males and then diluted in four freezing media prepared by the combination of two extenders (glucose and BTS[®]) with two cryoprotectants (methylglycol and DMSO). The then diluted semen was loaded into 0.5 mL straws and frozen in nitrogen vapor at -170°C, and stored in liquid nitrogen. After a 100-km trip by car, straws were thawed (60 °C water bath for 8s), post-thaw sperm motility was evaluated both subjectively under light microscope and objectively under a computerized system SCA[®] and the curvilinear velocity, average path, straight line velocity and the spermatozoa head area were determined. There was no significant difference when sperm motility was evaluated subjectively or by computer system. Samples cryopreserved in glucose-methylglycol yielded higher post-thaw sperm motility (81%), faster sperm velocities and smaller spermatozoa head areas (14.4 μm²) compared to samples frozen in the other media. Methylglycol was efficient as cryoprotectants for pirapitinga spermatozoa, as previously observed for other species of fish.

Introdução

A pirapitinga, *Piaractus brachypomus* (Cuvier, 1818), é um peixe da família Characidae, migratório, de hábitos onívoros, originário das Bacias do rio Amazonas e Orinoco. Essa espécie pode alcançar até 20 kg de peso e comprimento de aproximadamente 55 centímetros (Alcântara et al., 1990). É uma espécie rústica de rápido crescimento, carne de grande aceitação no mercado, excelentes condições para a piscicultura (Fresneda et al., 2004) e de grande importância econômica para cultivo em escala comercial na Colômbia, Brasil, Peru, Venezuela e América Central (Vásquez-Torres et al., 2002). Os machos de pirapitinga atingem a maturidade sexual com dois anos, e não se reproduzem em cativeiro, sendo necessária a aplicação de hormônios para induzir a espermição.

A criopreservação de sêmen é uma importante técnica na aqüicultura e tem facilitado os procedimentos de reprodução artificial. Com o sêmen criopreservado, é necessário apenas trabalhar com as fêmeas na indução da desova e coleta dos ovócitos. O sêmen congelado pode ser mantido em bancos de sêmen por prazo indeterminado, o que possibilita o estabelecimento de programas de melhoramento genético com a utilização de machos selecionados, elimina o problema de assincronia da atividade reprodutiva entre machos e fêmeas, e permite reduzir o número de reprodutores machos mantidos na estação de piscicultura, com conseqüente redução dos custos (Godinho, 2007). Vários pesquisadores conseguiram produzir altas taxas de fertilidade com sêmen criopreservado e, portanto, sugerem o uso dessa metodologia, em escala comercial, na carpa *Cyprinus carpio* (Linhart et al., 2000), no bagre Africano *Clarias gariepinus* (Viveiros et al., 2000) e em truta *Oncorhynchus mykiss* (Glogowski et al., 2000). Em peixes nativos, estudos em criopreservação de

sêmen ainda estão em fase de testes quanto à sua capacidade de fertilização em larga escala (Maria et al., 2006a; Viveiros et al., 2008). Para ser criopreservado, o sêmen precisa ser diluído em meio contendo um diluidor e um crioprotetor interno. A glicose é um diluidor de fácil acesso, e, em combinação com o DMSO e gema de ovo, ou apenas em combinação com o metilglicol, tem sido o diluidor de sêmen mais utilizado em espécies de peixes da ordem Characiformes, no Brasil (Viveiros & Godinho, 2008). Diluidores desenvolvidos para sêmen de suínos, como o BTS[®] (Beltsville Thawing Solution; Minitüb[®]), têm sido empregados com êxito, tanto quando combinado com o DMSO, quanto com o metilglicol (Viveiros & Godinho, 2008).

Para se avaliar a qualidade do sêmen após a criopreservação, vários parâmetros têm sido analisados, e o mais utilizado é a motilidade espermática. O método computadorizado de análise espermática tem sido amplamente utilizado para examinar a qualidade do sêmen de aves e mamíferos. Em peixes, a aplicação do sistema computadorizado é mais recente (Lahnsteiner et al., 2000; Rurangwa et al., 2001) e, em espécies nativas, apenas um estudo está disponível na literatura (Shimoda, 2004). Parâmetros de motilidade espermática apresentados pelo método computadorizado, como porcentagem de espermatozóides móveis, velocidade curvilinear, frequência de batimento flagelar, entre outros, estão diretamente relacionados à taxa de fertilização e permitem prever o potencial reprodutivo de um indivíduo, além de ser rápida e precisa. Porém, a utilização desse sistema exige equipamentos de alto custo, inacessíveis à maioria dos laboratórios e pisciculturas (Rurangwa et al., 2004). Poucos laboratórios no Brasil possuem tais equipamentos e nenhum deles avaliou a qualidade do sêmen da pirapitinga após a criopreservação.

Conduziu-se o presente estudo com o objetivo de comparar a motilidade espermática avaliada tanto pelo método subjetivo ao microscópio de luz tradicionalmente usado em laboratórios e pisciculturas, quanto pelo método

computadorizado SCA[®] (Sperm Class Analyser[®], 2005, Microptics, S.L. versão 3.2.0), do sêmen criopreservado de pirapitinga *Piaractus brachypomus*. Foi, ainda, comparada a eficiência do metilglicol como crioprotetor e o BTS[®] como diluidor, testado em pirapitinga aqui pela primeira vez, com os meios mais comumente utilizados em characiformes (DMSO e glicose).

Material e Métodos

O trabalho foi desenvolvido durante os meses de agosto e setembro de 2007, no Centro de Pesquisas Rodolpho von Ihering do Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS), em Pentecoste (CE). Foram capturados 28 machos de pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) com rede de arrasto, em tanque de terra, dos quais 20 liberavam sêmen sob leve massagem da cavidade celomática no sentido crânio-caudal. Esses machos foram selecionados, identificados com microchip, pesados e injetados com dose única de extrato bruto de hipófise de carpa (5 mg/kg de peso corporal) para facilitar a coleta de sêmen, de acordo com o protocolo da estação. Após aproximadamente 12 horas a 26°C, o sêmen de cada macho foi coletado individualmente em tubos de ensaio, evitando-se a contaminação com água, sangue, fezes ou urina. Imediatamente após a coleta, o sêmen foi avaliado em microscópio de luz previamente focalizado em aumento de 400x, para verificar se apresentavam motilidade espontânea causada por contaminação. Nas 19 amostras sem motilidade espontânea, a motilidade espermática foi induzida com NaCl 0,29% (Viveiros et al., 2008) na diluição de 1:10 (sêmen:ativador) e subjetivamente determinada utilizando-se uma escala de 0 a 100%. Em seguida, amostras de sêmen foram avaliadas quanto ao volume, concentração (câmara hematimétrica tipo Neubauer “Improved”), pH (YSY Meter 660) e osmolaridade

(microosmômetro digital Roembling). Durante esses procedimentos, o sêmen foi mantido em tubos de ensaio em banho de gelo ($15 \pm 2^\circ\text{C}$).

Para ser criopreservado, o sêmen foi diluído em quatro meios de congelamento, num fatorial 2 diluidores x 2 crioprotetores, na proporção final de 1 sêmen: 8 diluidor: 1 crioprotetor. Os diluidores testados foram :

- glicose: Solução de glicose 5% (Fresenius-Kabi[®]); pH 4,5; 326 mOsmol;

- BTS[®] (Beltsville Thawing Solution – Minitub[®]) (%): glicose monohidratada 4,0g; citrato de sódio 0,63g; EDTA 0,13g; sulfato de gentamicina 0,02g; NaHCO₃ 0,13g; KCl 0,08g; pH 7,6; 332 mOsmol.

Os crioprotetores testados foram metilglicol e DMSO. O sêmen diluído foi, então, envasado em palhetas de 0,5 mL (n=3 palhetas/meio/macho) e congelado no botijão de vapor de nitrogênio (Cryoporter[®] LN₂ dry vapor shipper), a -170°C . Após 24 horas, as palhetas foram transferidas para o botijão de nitrogênio líquido (M.V.E., modelo Volta 20). Após 30 dias, as amostras foram transportadas de carro por aproximadamente 100 Km em botijão de nitrogênio líquido do DNOCS, para o Laboratório de Tecnologia do Sêmen da Universidade Estadual do Ceará (UECE) em Fortaleza – CE. Nesse laboratório, as palhetas foram descongeladas em banho-maria a 60°C , por 8 segundos (Maria et al., 2006a) para a avaliação da motilidade espermática. A motilidade foi avaliada tanto subjetivamente, conforme descrito para o sêmen fresco, quanto objetivamente, pelo método computadorizado Sperm Class Analyser[®] (SCA[®] 2005, Microptics, S.L. versão 3.2.0), que calculou os seguintes parâmetros: motilidade espermática (%), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), velocidade média na trajetória (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade linear (VSL, $\mu\text{m/s}$) e área da cabeça dos espermatozoides (μm^2 ; n=600-750 espermatozoides/meio/10 machos). Cinco μL do sêmen descongelado de cada palheta foram adicionados na câmara de Makler e ativado com 50 μL de NaCl 0,29% e imediatamente observado no

microscópio de contraste de fase (Nikon H550S), focalizado na objetiva de 400x, com filtro verde e ótica na posição pH1. O microscópio encontrava-se acoplado a uma câmera de vídeo que gera 25 imagens por segundo por meio das quais os parâmetros de motilidade foram calculados pelo SCA[®].

Todos os dados estão expressos em média \pm erro-padrão da média. O resíduo de cada modelo foi testado para distribuição normal. Os valores que não possuíram essa distribuição foram transformados em arc seno \sqrt{x} para sua normalização. Os dados foram submetidos à análise de variância utilizando-se o pacote computacional Sistema de Análise de Variância (SAEG para Windows, UFV) sendo as médias, comparadas pelo teste de SNK a 5% de probabilidade.

Resultados

O peso e as características do sêmen fresco dos 19 machos de pirapitinga estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1- Peso dos machos e características do sêmen fresco de pirapitinga (média \pm erro padrão da média; n= 19 machos)

Características	Média \pm erro padrão
Peso corporal (kg)	3,5 \pm 0,1
Motilidade espermática subjetiva (%)	91,0 \pm 1,6
Volume de sêmen (mL)	1,8 \pm 0,2
pH do sêmen	9,0 \pm 0,0
Osmolaridade do sêmen (mOsmol/ kg)	313,3 \pm 9,6
Espermatozóides x 10 ⁹ /mL	55,5 \pm 1,4

As motilidades espermáticas avaliadas pelo método subjetivo e SCA[®] do sêmen criopreservado nos quatro meios de congelamento estão apresentadas na Tabela 2. Não houve diferença significativa quando a motilidade espermática foi

avaliada pelo método subjetivo em comparação com o SCA[®]. Dessa forma, para descrever e discutir os resultados obtidos, serão usadas as motilidades espermáticas obtidas pelo método SCA[®].

Houve interação significativa entre os diluidores e crioprotetores testados. Quando o metilglicol foi testado como crioprotetor, a maior taxa de motilidade espermática foi observada nas amostras criopreservadas em glicose (81%) em comparação com as amostras criopreservadas em BTS[®]. No entanto, quando o DMSO foi testado como crioprotetor, motilidades semelhantes foram encontradas entre o sêmen criopreservado em glicose (52%) ou em BTS[®] (51%).

Tabela 2- Motilidades espermáticas (%; média ± EP; n = 19 machos) avaliadas pelo método computacional SCA[®] e, subjetivamente, ao microscópio de luz, do sêmen de pirapitinga criopreservado em quatro meios de congelamento.

Diluidor	Motilidade SCA%*		Motilidade Subjetiva %*	
	Metilglicol	DMSO	Metilglicol	DMSO
Glicose	81 ± 4 ^{aA}	52 ± 5 ^{aB}	77 ± 4 ^{aA}	49 ± 5 ^{aB}
BTS [®]	57 ± 6 ^{bA}	51 ± 5 ^{aA}	53 ± 6 ^{bA}	47 ± 5 ^{aA}

^{a-d; A-B} Médias seguidas por diferentes sobrescritos (minúsculo na coluna e maiúsculo na linha para cada método de avaliação da motilidade) diferem entre si (SNK; P<0,05); BTS[®] (%): glicose monohidratada 4,0g; citrato de sódio 0,63g; EDTA 0,13g; sulfato de gentamicina 0,02g; NaHCO₃ 0,13g; KCl 0,08g.

*As motilidades subjetiva e SCA não diferiram entre si (P>0,05).

A VCL, VSL e VAP foram significativamente maiores (P<0,05) nas amostras criopreservadas em meio contendo glicose-metilglicol, comparado às amostras criopreservadas nos outros meios de congelamento (Fig. 1).

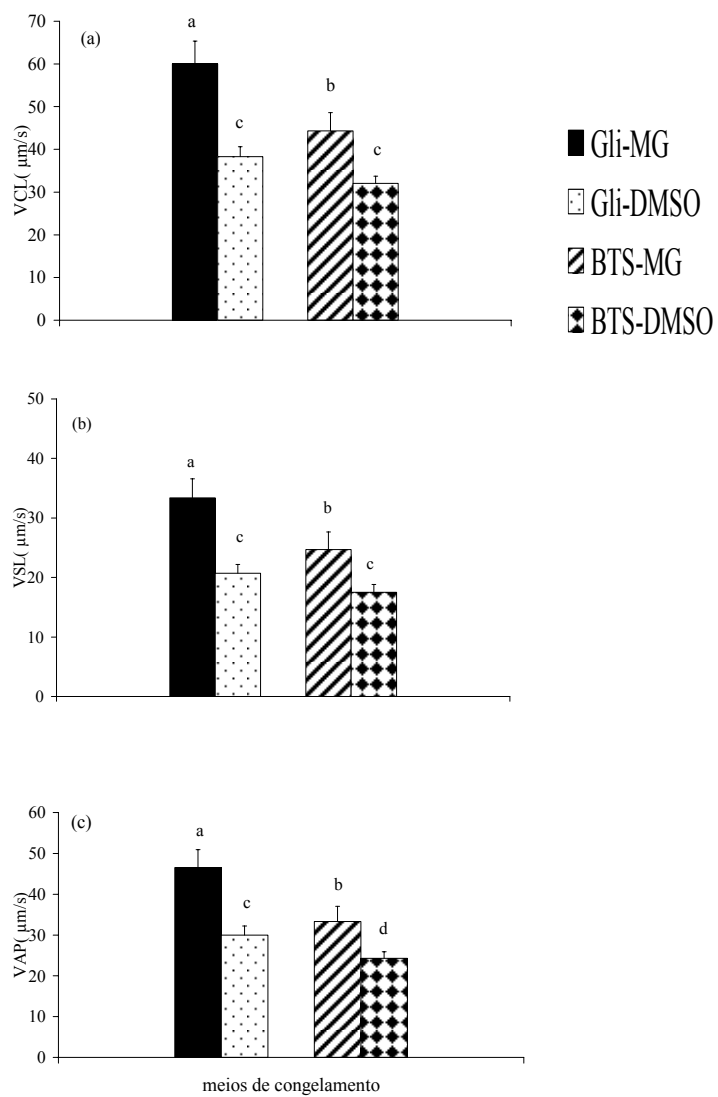


Figura 1. (a) Velocidade curvilinear (VCL, $\mu\text{m/s}$), (b) velocidade linear (VSL, $\mu\text{m/s}$) e (c) velocidade média na trajetória (VAP, $\mu\text{m/s}$) de sêmen de pirapitinga criopreservado em quatro meios de congelamento ($n= (19 \text{ machos} \times 3$

palhetas)/meio) Diferentes letras (a-d) indicam uma diferença significativa entre os meios de congelamento (SNK, $P < 0,05$).

Gli: Glicose 5%; BTS[®]: glicose monohidratada 4,0g; citrato de sódio 0,63g; EDTA 0,13g; sulfato de gentamicina 0,02g; NaHCO₃ 0,13g; KCl 0,08g; MG: Metilglicol; DMSO: Dimetilsulfóxido

A área da cabeça dos espermatozoides foi significativamente menor quando os espermatozoides foram congelados em glicose-metilglicol ($14,4\mu\text{m}^2$) em relação aos outros meios de congelamento (Fig. 2).

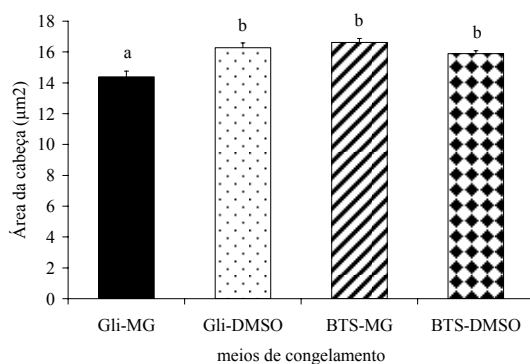


Figura 2. Área da cabeça dos espermatozoides (μm^2) do sêmen de pirapitinga criopreservado em quatro meios de congelamento ($n=600-750$ espermatozoides/meio/10 machos). Diferentes letras(a, b) indicam uma diferença significativa entre os tratamentos (SNK, $P < 0,05$)

Gli: Glicose 5%; BTS[®]: glicose monohidratada 4,0g; citrato de sódio 0,63g; EDTA 0,13g; sulfato de gentamicina 0,02g; NaHCO₃ 0,13g; KCl 0,08g; MG: Metilglicol; DMSO: Dimetilsulfóxido

Discussão

No presente estudo, alguns parâmetros físico-químicos do sêmen fresco, bem como diferentes meios de congelamento para o sêmen de pirapitinga *Piaractus brachymomus*, foram avaliados. A motilidade espermática foi determinada pelo método subjetivo que utiliza microscópio de luz, tradicionalmente usado na maioria dos estudos como parâmetro de avaliação da qualidade do sêmen (Viveiros & Godinho, 2008), e comparada ao método objetivo computadorizado SCA (Sperm Class Analyser[®]), que além da motilidade, fornece as velocidades curvilínea (VCL), linear (VSL) e média na trajetória (VAP) e a área da cabeça dos espermatozoides.

A motilidade do sêmen fresco de pirapitinga observada após ativação com NaCl 0,29% foi de 91%, estando dentro da variação 61 a 92% descrita em outros estudos na mesma espécie (González et al., 1998; González & Fresneda, 2000; Fresneda et al., 2004; Navarro et al., 2004). O volume médio do sêmen observado no presente estudo foi de 1,8 mL e a concentração espermática encontrada foi de 55,5 espermatozoides x 10⁹/mL. Em outros estudos, com a mesma espécie, o menor volume seminal observado foi 0,83 mL e concentração de 30,6 espermatozoides x 10⁹/mL (Fresneda et al., 2004) ao passo que o maior volume foi 13,4 mL e concentração de 17,7 espermatozoides x 10⁹/mL (Navarro et al., 2004). O pH médio do sêmen de pirapitinga observado no presente estudo foi 9,0. Relatos anteriores mostram uma variação entre 7,1 e 8,8 para o sêmen fresco de pirapitinga (González et al., 1998; González & Fresneda, 2000; Fresneda et al., 2004; Navarro et al., 2004). A variação observada em relação ao volume, concentração e pH, deve-se provavelmente às particularidades da metodologia de cada estudo. Além disso, o presente estudo foi realizado nos meses de agosto e setembro, correspondentes à época seca do ano, no sertão do nordeste brasileiro, já o estudo de Fresneda et al. (2004) foi realizado na Colômbia nos meses de julho a agosto, correspondendo à época chuvosa nessa região. Os estudos de Gonzalez et al. (1998); Gonzalez & Fresneda (2000);

Navarro et al. (2004), foram também realizados na Colômbia, mas não foi mencionada a época do ano.

A osmolaridade do sêmen de pirapitinga foi 313 mOsmol/Kg. Não foi encontrado nenhum relato sobre a osmolaridade do sêmen dessa espécie, mas está dentro do observado para a maioria do peixes teleósteos (Alavi & Cosson, 2006).

No presente estudo, não houve diferença significativa entre a motilidade espermática avaliada subjetivamente ao microscópio de luz ou objetivamente pelo sistema computadorizado. O SCA[®] é um método computadorizado que permite uma avaliação objetiva e precisa não somente sobre a proporção de células móveis em uma amostra de sêmen, mas também sobre a qualidade do movimento das mesmas. As trajetórias do espermatozóide são individualmente determinadas pela função flagelar, nos quais características como velocidade, frequência de batimento flagelar e amplitude irão, corretamente, refletir a condição fisiológica de cada célula (Peña & Linde-Forsberg, 2000). A avaliação da motilidade assistida por computador vem sendo utilizada em peixes e fornece parâmetros de velocidade espermática que estão relacionados a taxas de fertilização (Rurangwa et al., 2001). Embora a avaliação espermática por meio computadorizado forneça dados precisos, o custo dos equipamentos envolvidos é alto. Dessa forma, a avaliação subjetiva da motilidade é muito útil e pode ser utilizada em pisciculturas comerciais como um bom parâmetro da qualidade do sêmen e um baixo custo.

Neste estudo, foram testados dois crioprotetores: metilglicol e DMSO. O crioprotetor metilglicol, também conhecido como 2-metoxietanol ou éter metílico do etilenoglicol, é derivado do metanol (CH₃OH) e óxido de eteno (CH₂OCH₂). O metilglicol já foi testado por nossa equipe, com sucesso, em diversas espécies de peixes nativos, não apenas combinado à glicose e ao BTS[®] (veja a seguir), mas também ao NaCl (Amaral et al., 2008), NaCl-gema de ovo

(Maria et al., 2006b) e à água de coco em pó (Viveiros et al., 2007). O DMSO é o crioprotetor mais utilizado na criopreservação do sêmen de peixes Characiformes brasileiros e tem sido efetivo na maioria das espécies quando utilizado numa concentração de 5-15%, quando combinado à glicose e gema de ovo (Viveiros & Godinho, 2008), inclusive em pirapitinga (Fresneda et al., 2004). Esses crioprotetores foram testados no presente estudo, em combinação com os diluidores glicose e BTS[®]. As maiores motilidades espermáticas e maiores velocidades foram observadas nas amostras criopreservadas em meio contendo glicose-metilglicol, quando comparada às amostras congeladas nos outros meios. O meio glicose-metilglicol também foi eficiente para o sêmen de curimba, *Prochilodus lineatus* (Viveiros et al., 2008) e piapara *Leporinus obtusidens* (Koch et al., 2007). A glicose é um diluidor simples, facilmente acessível, podendo ser usada em condições de campo, sem a necessidade de equipamento de laboratório, uma vez que é comercializada como solução estéril, pronta para o uso. Quando o sêmen de pirapitinga foi diluído em meio contendo glicose e DMSO, a motilidade encontrada foi de 52%, inferior a motilidade observada quando a glicose foi testada com metilglicol.

O diluidor BTS[®] foi desenvolvido para o resfriamento de sêmen de suíno e tem apresentado bons resultados na criopreservação de sêmen de várias espécies de peixe. No presente estudo, quando o sêmen de pirapitinga foi criopreservado em BTS[®], motilidades de 51 a 57% foram encontradas, independente do crioprotetor testado. O diluidor BTS[®] proporcionou excelentes taxas de motilidade quando utilizado na criopreservação de sêmen pacu *Piaractus mesopotamicus* (Orfão et al., 2008), *B. orbignyanus* (Maria et al., 2006a e 2006b), *P. lineatus* (Viveiros et al., 2008), pirapitinga *Brycon nattereri* (Oliveira et al., 2007) quando associado ao metilglicol e de *S. brasilienses* (Viveiros et al., 2008), *P. lineatus* (Miliorini, 2006) e *L. obtusidens* (Koch et al., [2007]) quando associado ao DMSO.

Conclusão

O meio de congelamento contendo glicose e metilglicol pode ser utilizado de forma satisfatória na criopreservação do sêmen de pirapitinga. A solução de glicose 5% na forma comercial de solução injetável é viável e prática, já que é facilmente encontrada em farmácias a um baixo custo, esterilizada e pronta para ser utilizada. O metilglicol foi eficiente como crioprotetor do sêmen pirapitinga, como já se havia observado em outras espécies de peixe. Embora o sistema computadorizado forneça dados precisos sobre a motilidade e velocidade dos espermatozoides, a avaliação subjetiva da motilidade espermática é muito prática e pode ser realizada por pessoal treinado em pisciculturas comerciais como um bom parâmetro da qualidade do sêmen. Experimentos de fertilização devem ser realizados com a pirapitinga, para que a efetividade tanto do processo de criopreservação quanto da avaliação subjetiva e objetiva da motilidade espermática possam ser confirmadas.

Agradecimentos

Ao Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS), pelos peixes. À Minitub, por fornecer o diluidor BTS. À Universidade Estadual do Ceará (UECE), em especial ao Laboratório de Tecnologia do Sêmen, pela disponibilização do sistema computadorizado.

Referências bibliográficas

ALAVI, S. M. B.; COSSON, J. Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: a review. **Cell Biology International**, London, v. 30, n. 2, p. 1-14, 2006.

ALCÂNTARA, P. F.; OLIVEIRA, A. A.; NOBRE, M. I. S. N. Considerações sobre a amostragem da pirapitnga, *Colossoma brachypomum*, Cuvier, no estado do Ceará (Brasil). **Ciências Agronômicas**, Fortaleza, v. 21, n. 1/2, p. 43-49, jun./dez. 1990.

AMARAL, T. B.; VIVEIROS, A. T. M; ISAÚ, Z. A.; CANEPPELE, D. Efeito de diferentes meios de congelamento na criopreservação do sêmen de piabanha *Brycon insignis*. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 45., 2008. Lavras. **Abstract...** Lavras: UFLA, 2008.1 CD-ROM.

FRESNEDA, A.; LENIS, G.; AGUDELO, E.; ANGEL, M. O. Espermiación inducida y crioconservación de semen de Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*). **Revista Colombiana Ciencias Pecuarias**, Medellín, v. 17, p. 46-52, 2004. Suplemento.

GLOGOWSKI, J.; KWASNILK, M.; PIROS, B.; DABROWSKI, K.; GORYECZKO, K.; DOBOSZ, S.; KUZMINSKI, H.; CIERESZKO, A. Characterization of rainbow trout milt collected with a catheter: sêmen parameters and cryopreservation success. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 31, n. 3, p. 289-296, 2000.

GODINHO, H. P. Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo horizonte, v. 31, n. 3, p. 351-360, jul./set. 2007.

GONZÁLEZ, O. E.; DÍAZ, J.; LARA, R. Criopreservación de semen en algunas especies de peces tropicales de importancia económica y comercial de la orinoquia colombiana (*Piaractus brachypomus*, *Pseudoplatystoma fasciatum*), Fase 1, **Proyecto del CIC UJTL INPA**. Bogotá: [s. n.], 1998.

GONZÁLEZ, O. E.; FRESNEDA, A. Criopreservación de semen en algunas especies de peces tropicales de importancia económica y comercial de la orinoquia colombiana (*Piaractus brachypomus*, *Pseudoplatystoma fasciatum*) Fase 2, **Proyecto del CIC UJTL INPA**. Bogotá: [s. n.], 2000.

KOCH, J. F. A.; VIVEIROS, A. T. M.; MARIA, A. N.; ÓRFÃO, L. H.
Diluidores e crioprotetores na criopreservação do sêmen de piapara *Leporinus obtusidens*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 44., 2007, Jaboticabal. **Anais...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Zootecnia/Gmosis, [2007]. 1 CD-ROM.

LAHNSTEINER, F.; BERGER, B.; HORVÁTH, A.; URBÁNYI, B.; WEISMANN, T. Criopreservation of spermatozoa in cyprinid fishes. **Theriogenology**, Woburn, v. 54, n. 9, p. 1477-1496, Dec. 2000.

LINHART, O.; RODINA, M.; COSSON, J. Cryopreservation of sperm in common carp *Cyprinus carpio*: sperm motility and hatching success of embryos. **Cryobiology**, San Diego, v. 41, n. 3, p. 241-250, 2000.

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*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 260, n. 1/4, p. 298-306, Sept. 2006a.

MARIA, A. N.; VIVEIROS, A. T. M.; ÓRFÃO, L. H.; OLIVEIRA, A. V.; MORAES, G. F. Effects of cooling and freezing on sperm motility of the endangered fish piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Characiformes, Characidae). **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 3, n. 1/4, p. 55-60, 2006b.

MILIORINI, A. B. **Ativadores e concentrações de metanol e dimetilsulfóxido na qualidade do sêmen criopreservado de curimba (*Prochilodus lineatus*)** 2006. 99 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

NAVARRO, O. J.; SANTAMARÍA, Y. M. V.; CASALLAS, P. E. C. Evaluación de cinco protectores para la crioconservación de semen de Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*). **Revista Colombiana Ciencias Pecuarias**, Medellín, v. 17, p. 53-59, 2004, Suplemento.

OLIVEIRA, A. V.; VIVEIROS, A. T. M.; MARIA, A. N.; FREITAS, R. T. F.; ISAÚ, Z. A. Sucesso do resfriamento e congelamento de sêmen de pirapitinga *Brycon nattereri*. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 59, n. 6, p. 1509-1515, 2007.

ORFÃO, L. H.; VIVEIROS, A. T. M.; SILVA, F. P. C.; MARIA, A. N. Diluidores e crioprotetores na motilidade espermática do sêmen de pacu *Piaractus mesopotamicus*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 45., 2008, Lavras. **Abstract...** Lavras: UFLA, 2008.1 CD-ROM.

PEÑA, A.; LINDE-FORSBERG, C. Effects of spermatozoal concentration and post-thaw dilution on survival after thawing of dog spermatozoa. **Theriogenology**, Woburn, v. 54, n. 5, p. 703-708, 2000.

RURANGWA, E.; KIME, D. E.; OLLEVIER, F.; NASH, J. P. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 234, n. 1/4, p. 1-28, May 2004.

RURANGWA, E.; VOLCKAERT, F. A. M.; HUYSKENS, G.; KIME, D.E.; OLLEVIER, F. Quality control of refrigerated and cryopreserved semen using computer-assisted sperm analysis (CASA), viable staining and standardized fertilisation in African catfish (*Clarias gariepinus*). **Theriogenology**, Woburn, v. 55, n.3, p. 751-769, 2001.

SHIMODA, E. **Análise e criopreservação do sêmen da piabanha *Brycon insignis* Steindachner, 1877 (Pisces, Characidae)**. 2004. 121 p. Tese (Doutorado em Produção Animal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ.

VÁSQUEZ-TORRES, W.; PEREIRA M. F.; ARIAS-CASTELLANOS, J. A. Estudos para composição de uma dieta referência semipurificada para avaliação de exigências nutricionais em juvenis de pirapitinga, *Piaractus brachypomus* (Cuvier, 1818). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 31, n. 1, p. 283-292, 2002, Suplemento.

VIVEIROS, A. T. M. Criopreservação de sêmen de peixes. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16., 2005, Goiânia. **Palestras...** Goiânia: [s.n.], 2005.

VIVEIROS, A. T. M.; GODINHO, H. P. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. **Fish Physiology Biochemistry**, 2008, doi: 10.1007/s10695-008-92403

VIVEIROS, A. T. M.; MARIA, A. N.; ORFÃO, L. H.; CARVALHO, M. A. M.; NUNES, J. F. Powder coconut water (ACP[®]) as extender for semen cryopreservation of Brazilian migratory fish species. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON REPRODUCTIVE PHYSIOLOGY OF FISH, 8., 2007, Saint Malo, France. **Abstracts...** Saint Malo: [s.n.], p. 232, 2007.

VIVEIROS, A.T. M.; ORFÃO, L. H.; MARIA, A. N.; ALAMMAN, I. B. A simple, inexpensive and successful freezing method for curimba *Prochilodus lineatus* (Characiformes) semen. **Animal Reproduction Science**, 2008. doi: 10.1016/j.anireprosci.2008.04.025

VIVEIROS, A. T. M.; SO, N.; KOMEN, J. Sperm cryopreservation of African catfish (*Clarias gariepinus*): cryoprotectants, freezing rates and sperm: egg dilution ratio. **Theriogenology**, Woburn, v. 54, n. 9, p. 1305-1308, 2000.

FERTILIDADE E MOTILIDADE DO SEMEN DE CURIMBA (*Prochilodus lineatus*) CRIOPRESERVADO EM ÁGUA DE COCO EM PÓ (ACP®) OU EM GLICOSE

(Preparado de acordo com as normas da revista “Theriogenology”)

A.T.M. Viveiros^{1*}, A.F. Nascimento², L.H. Órfão³, Z.A. Isáú³, C.C.M. Salgueiro⁴, J.F. Nunes⁴

1- Professora associada do Departamento de Zootecnia-UFLA

2- Mestranda do programa de Ciências Veterinárias-UFLA

3- Doutoranda do programa de pós-graduação em Zootecnia-UFLA

4- Laboratório de Tecnologia do Sêmen-UECE

* autor correspondente

Resumo

A curimba (*Prochilodus lineatus*) é uma espécie de peixe nativa da bacia do rio Paraná e é comercialmente importante por ser fornecida como alimento vivo para espécies de peixes carnívoros, além de ser fonte de proteína de alta qualidade para populações ribeirinhas e carentes. O uso de sêmen criopreservado facilita a reprodução artificial realizada em pisciculturas comerciais. Nesse estudo objetivou-se: (a) comparar o uso da água de coco em pó (ACP®) com a glicose, o diluidor de sêmen utilizado para a criopreservação de sêmen dessa espécie; (b) comparar a motilidade espermática pós-descongelamento subjetivamente avaliada ao microscópio de luz e pelo método computadorizado; (c) estabelecer uma correlação entre as velocidades espermáticas e a taxa de fertilização. O sêmen de oito machos foi coletado e diluído em dois meios de congelamento preparados com dois diluidores (glicose e ACP®) combinados ao

crioprotetor metilglicol. Em seguida, o sêmen diluído foi envasado em palhetas de 0,5 mL e congelado em vapor de nitrogênio a -170°C , e armazenado em nitrogênio líquido. Metade das palhetas foi transportada em vapor de nitrogênio por avião de Lavras a Fortaleza, CE, onde o sêmen foi descongelado (banho-maria 60°C por 8 segundos), a motilidade espermática foi avaliada tanto subjetivamente no microscópio de luz quanto objetivamente pelo sistema computadorizado SCA[®] e as velocidades curvilínea, média na trajetória e linear foram calculadas. A outra metade das palhetas foi avaliada quanto à capacidade de fertilização. Para isso 100 μL de sêmen criopreservado em cada diluidor e de cada macho foram utilizados para fertilizar 0,2 g de ovócitos de três fêmeas. A taxa de fertilização (n° ovos fertilizados/ n° ovos totais) foi verificada após 10 horas. Não houve diferença significativa entre a motilidade espermática avaliada subjetivamente ou pelo sistema computadorizado. As amostras criopreservadas em ACP[®] apresentaram maior motilidade espermática (84%), em comparação com as amostras criopreservadas em glicose (75%); entretanto, a taxa de fertilização e as velocidades espermáticas foram semelhantes entre o sêmen criopreservado nos dois diluidores. Foram encontradas correlações positivas entre a taxa de fertilização e as velocidades espermáticas. Assim, o sêmen de curimba pode ser criopreservado com sucesso em meio contendo glicose ou ACP[®] como diluidores e metilglicol como crioprotetor. A taxa de fertilização em curimba pode ser estimada mediante a avaliação das velocidades espermáticas do sêmen criopreservado.

Abstract

Curimba (*Prochilodus lineatus*) is a native fish species of the Paraná river basin, commercially important as live-food for carnivorous species and a high quality protein source for riverside and needy populations. The use of cryopreserved semen facilitates the artificial reproduction carried out in commercial hatcheries. The aims of this study were to (a) compare the use of powdered coconut water (ACP[®]) with glucose, the extender utilized to cryopreserve semen of this species; (b) compare the post-thaw sperm motility evaluated both subjectively under light microscope and by a computer system SCA[®] and; (c) establish a correlation between the sperm velocities and the fertilization rates. Semen of eight males was collected and diluted in two extenders (ACP[®] and glucose) combined with methylglycol as cryoprotectant. Then, diluted semen was loaded in 0.5-mL straws and frozen in nitrogen vapor at -170°C and stored in liquid nitrogen. Half of the samples were transported by air in nitrogen vapor from Lavras to Fortaleza, CE, where semen was thawed (60°C water bath for 8 seconds), sperm motility was evaluated both subjectively under light microscope and objectively by SCA[®] and the curvilinear velocity, average path velocity and straight line velocity were calculated. The other half of the samples was evaluated on the capacity of fertilizing fresh oocytes. For this, 100 µL of semen cryopreserved in each extender and of each male was used to fertilize 0.2 g of oocytes from three females. Fertilization rate (number of fertilized eggs /number of total eggs) was verified 10 hours later. There was no difference on post-thaw sperm motility evaluated either subjectively or by computer system. Semen cryopreserved in ACP[®] yielded higher post-thaw sperm motility (84%), compared to semen cryopreserved in glucose (75%), however fertilization rates and sperm velocities between semen cryopreserved in both extenders were similar. Positive correlations between the sperm velocities and fertilization rates were observed. Thus, curimba semen can be successfully

cryopreserved in a medium containing glucose or ACP[®] as extenders and methylglycol as cryoprotectant. The curimba fertilization rate can be estimated by evaluating sperm velocities under SCA[®].

Introdução

A curimba, *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836), é um peixe da ordem Characiformes e apresenta larga distribuição geográfica em toda a América do Sul, representando cerca de 50-90% de toda a ictiomassa existente na Bacia do rio Paraná (Bonetto, 1994). O macho reproduz-se aos dois anos de idade, com 24 cm, e a fêmea, aos três anos, com 31 cm de comprimento. Quando adulta, a curimba pode atingir até 6 kg de peso corporal e 70 cm de comprimento (Companhia Energética de Minas Gerais & Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais – CEMIG/CETEC, 2000). Como consequência do seu hábito alimentar, a curimba exerce importante função no fluxo de energia dentro dos sistemas aquáticos que habita via processamento de sedimentos (Flecker, 1996). Essa espécie encontra-se, geralmente, em ambiente com águas mais lentas; porém, na época de reprodução, realiza migrações em massa até as áreas de desova (CEMIG/CETEC, 2000). A curimba é uma das espécies de peixes de água doce com maior significado na piscicultura comercial, sendo muito apreciada na culinária dos estados da Região Nordeste do Brasil. As estações de piscicultura têm grande interesse no sucesso da sua reprodução, uma vez que as larvas de curimba servem de alimento para espécies carnívoras de grande importância comercial, como, por exemplo, o dourado (*Salminus maxillosus*) ou passíveis de extinção, como a piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) e o jaú (*Zungaro jahu*) (Viveiros et al., 2008). Essa espécie é também muito utilizada por usinas hidrelétricas em programas de repovoamento de reservatórios, além de servir como espécie-modelo no desenvolvimento de

pesquisas em biotecnologia reprodutiva, dadas sua elevada prolificidade e facilidade de manejo. Para tornar o período reprodutivo mais eficiente, podem-se utilizar tecnologias de preservação de sêmen, como o resfriamento e a criopreservação. Dessa forma, o estudo das técnicas de preservação de sêmen de curimba atende a interesses econômicos, tornando a reprodução mais eficaz e atendendo também a interesses ecológicos, obtendo-se, assim, um maior número de larvas que servirão de alimento para outras espécies. Além disso, a preservação de sêmen permite a troca de material genético entre os laboratórios de reprodução e reduz o número de reprodutores, diminuindo, assim, os custos de produção e eliminando problemas de assincronia da maturidade gonadal, quando machos e fêmeas não estão preparados simultaneamente, além de estabelecer programas de hibridização utilizando espécies com períodos reprodutivos diferentes (Viveiros, 2005).

Para ser criopreservado, o sêmen precisa ser diluído em meio contendo um diluidor e um crioprotetor interno. A glicose é um diluidor de fácil acesso, e, em combinação com a gema de ovo e o dimetilsulfóxido (DMSO), tem sido o meio de congelamento mais utilizado em espécies de peixes Characiformes, no Brasil (Viveiros & Godinho, 2008). Mais recentemente, esse grupo de pesquisa avaliou vários meios de congelamento para sêmen de curimba e observou que glicose associada ao metilglicol, como crioprotetor, foi o meio mais eficaz produzindo 86-86% de motilidade e 95% de fertilidade após o descongelamento (Viveiros et al., 2008).

A água de coco é uma solução natural e estéril, composta de sais, proteínas, açúcares, vitaminas, gorduras neutras, além de indutores da divisão celular e eletrólitos diversos, fornecendo os nutrientes necessários para a conservação de células espermáticas (Blume & Marques Jr., 1994). Pesquisadores da Universidade Estadual do Ceará desenvolveram a água de coco sob a forma de pó (ACP[®] - ACP Tecnologia, Brasil), apresentando os mesmos

constituintes bioquímicos da forma *in natura*, com formulação padronizada e maior capacidade de armazenamento, o que facilita sua comercialização para regiões onde o fruto não existe (Silva et al., 2006). O ACP[®] foi testado inicialmente como diluidor de sêmen de caprino (Salgueiro et al., 2002), e mais recentemente, na criopreservação de sêmen de peixes, como piracanjuba, curimba, piapara *Leporinus elongatus* (Viveiros et al., 2007).

Objetivou-se com o presente estudo avaliar a motilidade espermática tanto pelo método subjetivo ao microscópio de luz tradicionalmente usado em laboratórios e pisciculturas, com o método computadorizado, do sêmen criopreservado de curimba, *Prochilodus lineatus*, além de estabelecer uma correlação entre as velocidades espermáticas e a taxa de fertilização. Para isso, o sêmen foi criopreservado em meio padronizado para a curimba (glicose-metilglicol) e comparado com a água de coco em pó (ACP[®]) e metilglicol.

Material e Métodos

Animais e coleta de sêmen

A coleta de sêmen foi realizada durante os meses de outubro a dezembro de 2006, obedecendo ao período reprodutivo da curimba *Prochilodus lineatus*. Os peixes (n= 8 machos) foram provenientes da estação de piscicultura da CEMIG, unidade de Itutinga, MG. Cada macho recebeu dose única de extrato bruto de hipófise de carpa (5 mg/kg de peso corporal), para facilitar a coleta de sêmen, conforme rotina realizada na estação. Após aproximadamente 8 horas a 26°C, o sêmen de cada macho foi coletado individualmente em tubos de ensaio, evitando-se a contaminação com água, sangue, fezes ou urina. Imediatamente após a coleta, o sêmen foi avaliado em microscópio de luz previamente

focalizado em 400x para verificar se apresentavam motilidade espontânea causada por contaminação. Todas as amostras de sêmen (n= 8 machos) apresentavam-se imóveis (sem motilidade espontânea) e a motilidade espermática foi induzida com NaCl 0,29% (Maria et al., 2006) na diluição de 1:10 (sêmen:ativador) e subjetivamente determinada por meio de uma escala de 0 a 100%. Todas as amostras que apresentavam pelo menos 80% de espermatozoides móveis foram utilizadas nesse experimento. As amostras de sêmen foram também avaliadas quanto ao volume e concentração (câmara hematómica tipo Neubauer “Improved”). Durante esses procedimentos, o sêmen foi mantido em tubos de ensaio em banho de gelo ($15 \pm 2^\circ\text{C}$).

Criopreservação do sêmen

Para ser criopreservado, o sêmen dos oito machos foi diluído em meio de congelamento contendo água de coco em pó (ACP[®]) e metilglicol e comparado com a glicose e metilglicol (Viveiros et al., 2008), na proporção final de 1 sêmen: 8 diluidor: 1 metilglicol. Os diluidores testados foram:

- Glicose: Solução de glicose 5% (Fresenius - Kabi[®]); pH ajustado para 7,6; 326 mOsmol;
- ACP[®]104 (Água de Coco em pó[®]) (%): glicose 4,4 g; proteínas: 0,37mg; fósforo 6,2 mg; potássio 175 mg; cálcio: 17,5 mg; magnésio: 8,5 mg; sódio 10,5 mg; ferro 0,06 mg; entre outros componentes (Carvalho et al., 2006); pH 7.8; 300 mOsmol.

O sêmen diluído foi, então, envasado em palhetas de 0,5 mL (n=6 palhetas x 2 meios x 8 macho) e congelado no botijão de vapor de nitrogênio (Cryoporter[®] LN₂ *dry vapor shipper*), a -170°C . Após 24 horas, as palhetas foram transferidas para o botijão de nitrogênio líquido (M.V.E., modelo Volta 40). De um total de

96 palhetas congeladas, 48 palhetas foram avaliadas quanto à capacidade de fertilizar ovócitos e as outras 48, quanto à motilidade espermática.

Avaliação da motilidade espermática

As 48 palhetas destinadas à avaliação da motilidade espermática permaneceram no botijão de nitrogênio líquido até agosto de 2007, quando foram transferidas novamente para o “dry shipper”, transportado de avião por aproximadamente 3000 km para o Laboratório de Tecnologia do Sêmen da Universidade Estadual do Ceará (UECE) em Fortaleza – CE. Chegando ao laboratório, as palhetas foram descongeladas em banho-maria a 60°C, por oito segundos (Viveiros et al., 2008) para a avaliação da motilidade espermática. A motilidade foi avaliada tanto subjetivamente, conforme descrito para o sêmen fresco, quanto objetivamente pelo sistema computadorizado Sperm Class Analyser[®] (SCA[®] 2005, Microptics, S.L. versão 3.2.0), que calculou os seguintes parâmetros: motilidade espermática, velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), velocidade média na trajetória (VAP, $\mu\text{m/s}$) e velocidade linear (VSL, $\mu\text{m/s}$). Cinco μL do sêmen descongelado de cada palheta foi adicionado à câmara de Makler e ativado com 50 μL de NaCl 0.29% e imediatamente observado no microscópio de contraste de fase (Nikon H550S), focalizado na objetiva de 400X, filtro verde e ótica na posição pH1. O microscópio encontrava-se acoplado a uma câmera de vídeo que gera 25 imagens por segundo por meio das quais os parâmetros de motilidade foram calculados pelo SCA[®].

Avaliação da capacidade de fertilização

As 48 palhetas destinadas à avaliação da fertilidade foram transportadas no “dry shipper” por aproximadamente 60 Km, da Universidade Federal de

Lavras à Estação de Piscicultura da CEMIG, unidade de Itutinga, MG. O sêmen foi descongelado a 60°C por oito segundos e usado para fertilizar ovócitos frescos. Ovócitos de três fêmeas de curimba foram extrusados após aplicação de duas dosagens de extrato bruto de hipófise de carpa (0,5 e 5 mg/kg de peso corporal), com intervalo de 12 horas entre aplicações. Após 5 horas da última aplicação, os ovócitos foram coletados de acordo com o manejo da estação. Cem µL de sêmen de cada palheta foram utilizados para fertilizar 0,2 g de ovócitos (aproximadamente 240 ovócitos) de cada fêmea (48 palhetas x 3 fêmeas). A fertilização foi iniciada pela adição de 10 mL de água dos aquários onde os peixes se encontravam, sendo misturados por um período de 2 min. Os ovos foram transferidos para incubadoras de cano de PVC teladas no fundo. A temperatura da água para incubação dos ovos foi de 26°C e a taxa de fertilização (nº ovos fertilizados/ nº ovos totais) foi verificada após 10 horas.

Todos os dados estão expressos em média ± erro-padrão da média. O delineamento usado foi em blocos casualizados, com 8 blocos, sendo 1 peixe/bloco. O resíduo de cada modelo foi testado para distribuição normal. Os valores que não possuíram essa distribuição foram transformados em arc seno \sqrt{x} para sua normalização. Os dados foram submetidos à análise de variância utilizando-se o pacote computacional Sistema de Análise de Variância (SAEG para Windows, UFV), sendo as médias comparadas pelo teste SNK a 5% de probabilidade.. As correlações entre a taxa de fertilização e as velocidades espermáticas obtidas pelo método computadorizado SCA[®] foram feitas pelo teste de Spearman .

Resultados

O volume seminal encontrado foi $1,9 \pm 0,2$ mL e a concentração espermática, $19,2 \pm 1,1 \times 10^9$ espermatozóides /mL. As motilidades espermáticas avaliadas pelo método subjetivo e SCA[®], assim como a taxa de fertilização do sêmen criopreservado nos dois meios de congelamento, estão apresentadas na Tabela 1.

Não houve diferença quando a motilidade espermática foi avaliada pelo método subjetivo em comparação com o SCA[®]. As maiores taxas de motilidade espermáticas foram observadas quando o sêmen foi criopreservado em ACP[®]-metilglicol (84%). As velocidades espermáticas foram semelhantes entre as amostras congeladas em glicose ou em ACP[®]: velocidade curvilinear (VCL): 49,1-53,7 $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, 23,6-24,3 $\mu\text{m/s}$) e velocidade na trajetória média (VAP, 36,0-36,8 $\mu\text{m/s}$) (Fig. 1).

A taxa de fertilização para ovos fertilizados com o sêmen-controle e fresco foi de 62%. De acordo com a concentração do sêmen e o número de ovócitos por grama, foi estimada uma proporção de 8×10^5 espermatozóides por ovócito. Não houve diferença na taxa de fertilização entre as amostras congeladas em glicose ou em ACP[®].

Tabela 1. Motilidade espermática (%; média \pm SE) avaliada pelo método computacional SCA[®] e subjetivamente ao microscópio de luz, e taxa de fertilização do sêmen de curimba criopreservado em metilglicol combinado a dois diluidores.

Diluidores	Motilidade espermática (%)		Fertilização (%)
	Subjetiva*	SCA [®] *	
ACP [®]	79 \pm 3,5 ^b	84 \pm 3,5 ^a	48 \pm 4,2 ^b
Glicose 5%	71 \pm 5,3 ^c	75 \pm 6,3 ^b	45 \pm 3,7 ^b
Controle (sêmen fresco)	93 \pm 1,5 ^a	NT	62 \pm 5,7 ^a

*As motilidades subjetiva e SCA[®] não diferiram entre si (P>0.05). SCA[®] : Sperm Class Analyser[®] (2005, Microptics, S.L. versão 3.2.0).

^{a-b}: Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem entre si (SNK; P<0.05); n=(24 palhetas/meio) x 3 fêmeas.

NT: Não testado

ACP[®] 104 (Água de Coco em pó[®]) (%): glicose 4,4 g; proteínas: 0,37 mg; fósforo 6,2 mg; potássio 175 mg; cálcio: 17,5 mg; magnésio: 8,5 mg; sódio 10,5 mg; ferro 0,06 mg; dentre outros componentes (Carvalho et al., 2006).

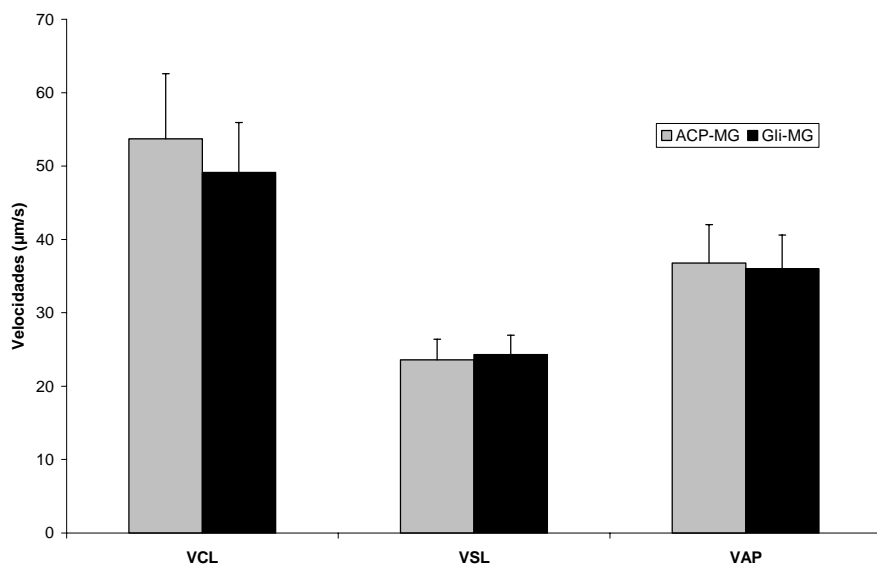


Figura 1. Velocidade curvilinear (VCL, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$) e velocidade na trajetória média (VAP, $\mu\text{m/s}$) de sêmen de curimba criopreservado em dois meios de congelamento (n=24 palhetas/meio).

Gli: Glicose 5%; ACP[®] 104 (Água de Coco em pó[®]) (%): glicose 4,4 g; proteínas: 0,37 mg; fósforo 6,2 mg; potássio 175 mg; cálcio: 17,5 mg; magnésio: 8,5 mg; sódio 10,5 mg; ferro 0,06 mg; dentre outros componentes (Carvalho et al., 2006). MG: Metilglicol
 Não foi observada diferença nas velocidades espermáticas entre os dois meios de congelamento (teste F; $P > 0.05$).

As correlações entre os parâmetros de velocidade espermática e as taxas de fertilização estão apresentadas na figura 2. A maior correlação entre a fertilização e a velocidade espermática foi observada para a VCL ($r = 0,8$).

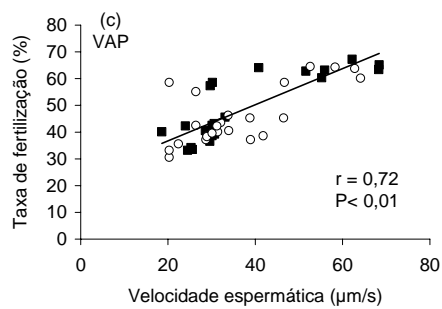
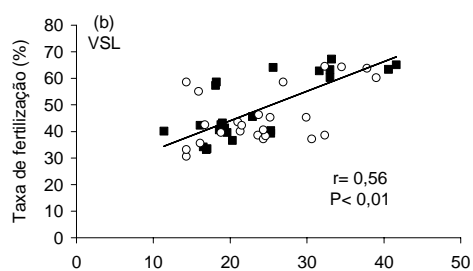
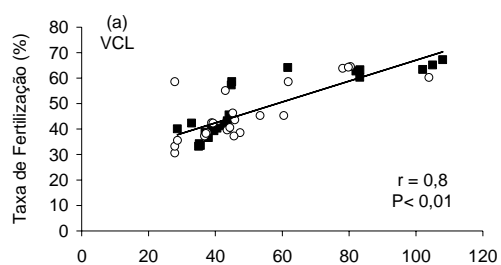


Figura 2. Correlação de Spearman entre a taxa de fertilização de ovos de curimba fertilizados com sêmen congelado em (■) ACP-metilglicol e (○) glicose-metilglicol e as velocidades (a) curvilínea (VCL), (b) progressiva (VSL) e (c) trajetória média (VAP).

Gli: Glicose 5%

ACP[®] 104 (Água de Coco em pó[®]) (%): glicose 4,4 g; proteínas: 0,37 mg; fósforo 6,2 mg; potássio 175 mg; cálcio: 17,5 mg; magnésio: 8,5 mg; sódio 10,5 mg; ferro 0,06 mg; dentre outros componentes (Carvalho et al., 2006); pH 7.8; 300 mOsmol;

Discussão

No presente estudo, foram testados dois meios de congelamento para o sêmen de curimba *Prochilodus lineatus*. A motilidade espermática foi determinada pelo método subjetivo que utiliza microscópio de luz, tradicionalmente usado na maioria dos estudos como parâmetro de avaliação da qualidade do sêmen (Viveiros & Godinho, 2008), e comparada ao método objetivo computadorizado SCA (Sperm Class Analyser[®]) que além da motilidade, fornece a velocidade curvilinear (VCL), a velocidade média na trajetória (VAP) e a velocidade linear (VSL) dos espermatozóides. A efetividade da criopreservação foi testada pela fertilização, assim como a correlação entre a taxa de fertilização e as velocidades espermáticas fornecidas pelo SCA[®].

No presente estudo, não houve diferença significativa entre a motilidade espermática avaliada subjetivamente ao microscópio de luz ou objetivamente pelo sistema computadorizado. A análise espermática computadorizada tem se desenvolvido e está continuamente sendo aperfeiçoada desde que foi introduzida no início dos anos 80 (Amann & Hammerstedt, 1980). O sistema computadorizado fornece dados precisos sobre as características do movimento espermático e correlações positivas têm sido encontradas entre a capacidade de fertilização e as características da motilidade definidas em espécies de peixes nas quais o sistema foi testado. Entre esses parâmetros, a motilidade progressiva e os padrões de movimentação celular têm sido correlacionados com a fertilização *in vitro* (Rurangwa et al., 2004). A análise computadorizada fornece

os meios para uma classificação objetiva de uma dada população de espermatozoides. Usando imagens digitais da trilha de cada célula espermática, o sistema computadorizado pode analisar, processando algoritmos, as propriedades do movimento dos espermatozoides. Os parâmetros geralmente relatados incluem a velocidade curvilínea (VCL), que é a velocidade média sobre o trajeto real seguida pela célula em micrômetros por segundo; a velocidade média do trajeto (VAP), que corresponde à velocidade média da trajetória da célula alisada em micrômetros por o segundo; a velocidade em linha reta (VSL), que representa a velocidade média em uma linha reta do começo à extremidade do trajeto em micrômetros por segundo (Verstegen et al., 2002). O sistema computadorizado de avaliação espermática quantifica diferentes parâmetros da motilidade espermática de interesse, incluindo aqueles que não são observados manualmente, é rápido e faz uma análise elaborada dos componentes da motilidade. O sistema computadorizado tem alta repetibilidade e fornece uma estimativa da motilidade espermática mais característica que a visual pelo microscópio de luz (Rurangwa et al., 2004).

O sistema fornece dados precisos sobre as características do movimento espermático e correlações positivas têm sido encontradas entre a capacidade de fertilização e as características da motilidade definidas em espécies de peixes nas quais o sistema foi testado. A avaliação automatizada da motilidade dos espermatozoides é de grande interesse pelo fato de a cinética espermática ter relevância na determinação do potencial de fertilidade dos espermatozoides. Entre esses parâmetros, a velocidade progressiva e os padrões de movimentação celular têm sido correlacionados com a fertilização *in vitro*.

O sêmen congelado em meio contendo ACP[®] apresentou maiores taxas de motilidade espermática em relação ao sêmen congelado em glicose, embora não tenha sido observada diferença entre a velocidade espermática entre os dois tratamentos. Bons resultados foram observados quando se utilizou o ACP[®] na

criopreservação de sêmen de outras três espécies nativas, incluindo a curimba: *Prochilodus lineatus*, *Brycon orbignyanus* e *Leporinus obtusidens* (Viveiros et al., 2007). Esse diluidor foi desenvolvido inicialmente para diluir sêmen de caprino, e atualmente é muito utilizado para sêmen de caprino (Salgueiro et al., 2002), cães (Cardoso et al., 2005) e equinos (Sampaio Neto et al., 2002). Já há alguns anos, têm sido conduzidos trabalhos na criopreservação do sêmen de peixe utilizando-se diluidores à base de água de coco *in natura* (Mello et al., 1998). No entanto, esses diluidores apresentam desvantagens, como a baixa disponibilidade dos frutos com características ideais para a sua fabricação e a impossibilidade de conservação por longo período da água de coco *in natura*. Ademais, a constituição bioquímica de um fruto pode apresentar pequenas variações em relação aos demais, o que pode diretamente influenciar a ação conservativa do diluidor. A água de coco, sob a forma de pó (ACP[®] - ACP Tecnologia, Brasil), apresenta os mesmos constituintes bioquímicos da forma *in natura*; porém, é padronizada e mais eficazmente conservada, o que facilita sua comercialização para regiões onde o fruto não existe.

Em outro estudo, o sêmen congelado em meio contendo glicose associada ao metilglicol produziu taxas de motilidade (86%) e fertilização (74%) superiores às encontradas no presente estudo (Viveiros et al., 2008). A glicose associada ao metilglicol foi excelente para curimba, em relação a outras soluções a base de glicose (MIII[®] e BTS[®]). O uso da solução de glicose 5% na forma comercial de solução energética injetável é viável e prático, já que essa é facilmente encontrada em farmácias a um custo baixo, esterilizada e pronta para ser utilizada. A glicose associada ao DMSO e gema de ovo é o meio mais comumente utilizado para Characiformes (Cruz, 2001; Carolsfeld et al., 2003). A gema de ovo dificulta a visualização dos espermatozoides para avaliar a motilidade tanto subjetivamente ao microscópio de luz quanto pelo método computadorizado.

Não houve diferença entre a taxa de fertilização do sêmen congelado nos dois meios de congelamento testados nesse estudo. Foram encontradas correlações positivas entre a taxa de fertilização e as velocidades espermáticas. A maior correlação com taxa de fertilização foi observada para a velocidade curvilínea. Correlações positivas também foram encontradas para o bagre africano, *Clarias gariepinus* (Rurangwa et al., 2001), turbot, *Psetta maxima* (Dreanno et al., 1999), carpa, *Cyprinus carpio* (Linhart et al., 2000) e truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss* (Lahnsteiner, 2000).

A mensuração indireta da qualidade do sêmen pela capacidade de fertilização pode não ser segura, desde que a qualidade dos ovos POSSA ser variável e afetar o sucesso da fertilização. Na produção comercial de peixes, é necessário avaliar a qualidade do sêmen para aumentar a eficiência da fertilização artificial. A fertilização pode ser dependente do número de espermatozoides móveis e sua velocidade. Se a qualidade espermática pode ser relacionada com a habilidade de fertilizar, então é possível usar o método computadorizado rotineiramente numa grande amplitude de protocolos de congelamento de sêmen sem o requerimento de fêmeas e sem a variabilidade inerente ao uso de ovos de diferentes fêmeas (Rurangwa et al., 2004).

Conclusão

Os meios de congelamento contendo glicose ou ACP[®] associado ao metilglicol mostraram-se eficientes na criopreservação do sêmen de curimba. O ACP[®] é um produto tipicamente brasileiro e possui grande potencial biotecnológico. Por outro lado, o uso da glicose é extremamente prático, já que a solução é comercializada em farmácias em forma de solução estéril pronta para uso. Embora não tenha sido observada diferença entre a taxa de motilidade espermática avaliada pelo método subjetivo ao microscópio de luz e o método

computadorizado, com a utilização deste método foi possível estabelecer uma correlação positiva entre as velocidades espermáticas e a taxa de fertilização. Pela avaliação da motilidade espermática por método computadorizado, posteriormente será possível padronizar a habilidade de fertilização do sêmen de uma determinada espécie de peixe.

Agradecimentos

Ao CNPq, pelo financiamento do projeto 471975/2004-4; à Companhia Energética de Minas Gerais (CEMIG) e a toda equipe da Estação Ambiental de Itutinga, pela disponibilização dos reprodutores e; ao Laboratório de Tecnologia do Sêmen da Universidade Estadual do Ceará (UECE), pela disponibilização do sistema computadorizado de análise do sêmen.

Referências Bibliográficas

AMANN, R. P.; HAMMERSTEDT, R. H. Validation of a system for computerized measurement of spermatozoal velocity and percentage of motile sperm. **Biology of Reproduction**, Stanford, v. 23, n.3, p. 647-656, 1980.

BLUME, H.; MARQUES JÚNIOR, A. P. Avaliação da água de coco no cultivo e criopreservação de embriões murídeos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 18, n. 3/4, p. 97-104, 1994.

BONETTO, A. A. Austral rivers of South America. In: MARGALEF, R. (Ed.). **Limnology now: a paradigm of planetary problems**. New York: Elsevier Science, 1994. p. 425-472.

CARDOSO, R. C. S.; SILVA, A. R.; SILVA, L. D. M. Use of the powdered coconut water (ACP-106[®]) for cryopreservation of canine spermatozoa. **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 2, n. 4, p. 257-262, Oct./Dec. 2005.

CAROLSFELD, J.; GODINHO, H. P.; ZANIBONI FILHO, E.; HARVEY, B. J. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. **Journal of Fish Biology**, Oxford, v. 63, n. 2, p. 472-489, Aug. 2003.

CARVALHO, J. M.; MAIA G. A.; SOUSA, P. H. M.; MAIA Jr., G. A.. Água-de-coco: Propriedades nutricionais, funcionais e processamento. **Semina: Ciências agrárias**, Londrina, v.27, n.3, p. 437-452, jul./set.,2006.

COMPANHIA ENERGÉTICA DE MINAS GERAIS; FUNDAÇÃO CENTRO TECNOLÓGICO DE MINAS GERAIS. **Guia ilustrado de peixes da bacia do rio Grande**. Belo Horizonte: CEMIG/CETEC, 2000. 144 p.

CRUZ, V. L. B. **Criopreservação do sêmen de curimatá (*Prochilodus lineatus*)**. 2001. 59 p. Dissertação (Mestrado em Zoologia de Vertebrados) – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte.

DREANNO, C.; COSSON, J.; SUQUET, M.; SEGUIN, F.; DORANGE, G.; BILLARD, R. Nucleotides content, oxidative phosphorylation, morphology and fertilizing capacity of turbot (*Psetta maxima*) spermatozoa during the motility period. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 53, n. 2, p. 230-243, 1999.

FLECKER, A. S. Ecosystem engineering by a dominant detritivore in a diverse tropical stream. **Ecology**, Washington, v. 77, n. 6, p. 1845-1854, 1996.

LAHNSTEINER, F. Semen cryopreservation in the Salmonidae and in the Northern pike. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 31, n. 3, p. 245-258, 2000.

LINHART, O.; RODINA, M.; COSSON, J. Cryopreservation of sperm in common carp *Cyprinus carpio*: sperm motility and hatching success of embryos. **Cryobiology**, San Diego, v. 41, n. 3, p. 241-250, 2000.

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*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 260, n. 1/4, p. 298-306, Sept. 2006.

MELLO, C. B. M.; MURGAS, L. D. S.; SILVA, M. O. B. Teste de fertilização de sêmen do pacu (*Piaractus mesopotamicus*), criopreservação com vários tipos

de diluentes. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUACULTURA, 10., 1998, Recife. **Resumos...** Recife: [s. n.], 1998, p. 270.

RURANGWA, E.; KIME, D. E.; OLLEVIER, F.; NASH, J. P. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 234, n. 1/4, p. 1-28, May 2004.

RURANGWA, E.; VOLCKAERT, F. A. M.; HUYSKENS, G.; KIME, D.E.; OLLEVIER, F. Quality control of refrigerated and cryopreserved semen using computer-assisted sperm analysis (CASA), viable staining and standardized fertilisation in African catfish (*Clarias gariepinus*). **Theriogenology**, Woburn, v. 55, n.3, p. 751-769, 2001.

SALGUEIRO, C. C. M.; NUNES, J. F.; OLIVEIRA, K. P. L.; VIEIRA, V. L.; GONDIM, J. M.; MATEOS-REX, E. Utilização de diluentes à base de água de coco “in natura” e em pó na inseminação artificial programada de cabras. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 5, n. 5, p. 96-98, 2002.

SAMPAIO NETO, J.C.; SALGUEIRO, C. C. M.; MATEOS-REX, E.; NUNES, J. F. Utilization of ACP 105[®] extender in the refrigeration of stallion semen. **Brazilian Journal of Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 5, n.1, p. 137-139, 2002.

SILVA, A. R.; CARDOSO, R. C. S.; SILVA, L. D. M. Comparação entre a água de coco em pó (ACP[®]) e o Tris como diluidores na criopreservação do sêmen de cães. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 43, n. 6, p. 767-774, 2006.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, Woburn, v. 57, n.1, p. 149-179, 2002.

VIVEIROS, A. T. M. Criopreservação de sêmen de peixes. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16., 2005, Goiânia. **Palestras...** Goiânia: [s. n.], 2005.

VIVEIROS, A. T. M.; GODINHO, H. P. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. **Fish Physiology Biochemistry**, 2008, doi: 10.1007/s10695-008-92403

VIVEIROS, A. T. M.; MARIA, A. N.; ORFÃO, L. H.; CARVALHO, M. A. M.; NUNES, J. F. Powder coconut water (ACP[®]) as extender for semen cryopreservation of Brazilian migratory fish species. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON REPRODUCTIVE PHYSIOLOGY OF FISH, 8., 2007, Saint Malo, France. **Abstracts...** Saint Malo: [s.n.], p. 232, 2007.

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**, 2008. doi: 10.1016/j.anireprosci.2008.04.025

CONCLUSÕES

O método subjetivo é simples e prático e foi confirmada a sua eficácia quando comparado ao método computadorizado, tanto em curimba quanto em pirapitinga.

Como nas outras espécies de characiformes testadas, o metilglicol foi o crioprotetor mais eficiente, quando comparado ao DMSO.

Na pirapitinga, o sêmen apresentou as maiores velocidades e as maiores taxas de motilidade, quando congelado em glicose. Na curimba, as velocidades espermáticas foram semelhantes no sêmen criopreservado em glicose ou em ACP, embora aquelas amostras congeladas em ACP tenham apresentado maiores taxas de motilidade.

Na curimba, foi possível estabelecer uma correlação entre as velocidades espermáticas e a taxa de fertilização.