

**RESFRIAMENTO E CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN DE  
DOURADO *Salminus maxillosus* E DE PIRAPITINGA *Brycon  
nattereri***

**ALEXMILIANO VOGEL DE OLIVEIRA**

**2006**

**ALEXMILIANO VOGEL DE OLIVEIRA**

**RESFRIAMENTO E CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN DE  
DOURADO *Salminus maxillosus* E DE PIRAPITINGA *Brycon  
nattereri***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Curso de Mestrado em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora

Profª. PhD Ana Tereza de Mendonça Viveiros

**LAVRAS**

MINAS GERAIS – BRASIL  
2006

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

Oliveira, Alexmiliano Vogel de

Resfriamento e criopreservação do sêmen de dourado *Salminus maxillosus* e de pirapitinga *Brycon nattereri* / Alexmiliano Vogel de Oliveira. – Lavras: UFLA, 2006.

94 p. : il.

Orientadora: Ana Tereza de Mendonça Viveiros.

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Diluidores. 2. Crioprotetores. 3. Motilidade. 4. Sêmen. 5. Dourado. 6. Pirapitinga. I Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-639.37

**ALEXMILIANO VOGEL DE OLIVEIRA**

**RESFRIAMENTO E CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN DE DOURADO**  
*Salminus maxillosus* E DE PIRAPITINGA *Brycon nattereri*.

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Curso de Mestrado em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 11 de abril de 2006

Prof. Dr. Luis David Solis Murgas UFLA

Prof. Dr. Rilke Tadeu Fonseca de Freitas UFLA

Prof. Dr. José Camisão de Souza UFLA

Profª. Dra. Léa Rosa Mourgues Schurter UFLA

Profª. PhD Ana Tereza de Mendonça Viveiros  
UFLA  
(Orientadora)

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL

**Dedico este trabalho a Genaina,  
pelo companheirismo e  
compreensão; a Joana, pelo apoio e  
dedicação e aos meus pais, Carlos  
Alberto e Rosalice, pela confiança,  
apoio e carinho.**

## **AGRADECIMENTOS**

À Profa. PhD. Ana Tereza de Mendonça Viveiros, pela atenção, orientação e companheirismo durante todo este trabalho.

Ao Prof. Dr. Rilke Tadeu Fonseca Freitas, pelo direcionamento estatístico durante a elaboração e execução do projeto.

À Profa. Dr<sup>a</sup>. Priscila V. R. Logato, pelos conhecimentos transmitidos durante todo o curso.

Aos colegas, Alexandre N. Maria, Laura H. Orfão, Ziara Isau, João Fernando Koch, Marcus Vinicius e Rafael V. Araújo, pela ajuda recebida.

Genaina A. Souza, pelo carinho, companheirismo e ajuda recebida.

Ao pessoal da secretaria do Departamento de Zootecnia, Keila, Keikey, Sandra, Pedro e Carlos, pela ajuda.

À empresa Minitub do Brasil<sup>®</sup>, pela doação das palhetas e diluidores utilizados nos experimentos.

À equipe da Estação de Hidrobiologia de Furnas Centrais Elétricas, em especial ao Sr. Dirceu e Sra. Marcília, pela valiosa colaboração e auxílio.

À equipe da Estação de Piscicultura da CEMIG, Gilson, Jailson e Darli, em especial ao Sr. Oscar, pela valiosa colaboração.

A todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

**MUITO OBRIGADO!!!**

## CONTEÚDO

	<b>Página</b>
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
CAPÍTULO 1.....	01
1 INTRODUÇÃO.....	02
2 OBJETIVOS.....	03
2.1 Objetivo geral.....	03
2.2 Objetivos específicos.....	03
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	04
3.1 Relevância do estudo do sêmen de peixes.....	04
3.2 Localização da bacia do rio Grande.....	06
3.3 As espécies em estudo.....	06
3.3.1 O dourado.....	06
3.3.2 A pirapitinga.....	08
3.4 Os espermatozóides e os parâmetros físicos do sêmen.....	09
3.5 Diluidores.....	12
3.6 Crioprotetores.....	13
3.7 Preservação dos espermatozóides através do resfriamento.....	14
3.8 Preservação dos espermatozóides através do congelamento.....	16
3.9 Processo de descongelamento.....	18
3.10 Taxa de fertilização do sêmen congelado.....	19
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	21
CAPÍTULO 2 – Resfriamento e criopreservação do sêmen de dourado (Pisces: <i>Salminus maxillosus</i> ).....	
RESUMO.....	29
1 INTRODUÇÃO.....	32

2	MATERIAL E MÉTODOS .....	34
3	RESULTADOS.....	43
4	DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....	48
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	55

CAPÍTULO 3 – Resfriamento e criopreservação do sêmen de pirapitinga (Pisces: <i>Brycon nattereri</i> ).....		59
--	--	----

RESUMO.....		60
1	INTRODUÇÃO .....	62
2	MATERIAL E MÉTODOS .....	64
3	RESULTADOS.....	67
4	DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....	71
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	75

CAPÍTULO 4 – DISCUSSÃO GERAL .....		79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....		84

ANEXOS .....		86
--------------	--	----



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Exemplar adulto de dourado <i>Salminus maxillosus</i> .....	07
FIGURA 2	Exemplar adulto de pirapitinga <i>Brycon nattereri</i> .....	08

## RESUMO GERAL

OLIVEIRA, Alexmiliano Vogel de. **Resfriamento e criopreservação do sêmen de dourado *Salminus maxillosus* e de pirapitinga *Brycon nattereri***. 2006. 94 p. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

O dourado (*Salminus maxillosus*) e a pirapitinga (*Brycon nattereri*) são espécies de peixe da bacia do rio Grande. O dourado é muito apreciado devido a excelência da sua carne e por ser um peixe esportivo, enquanto que a pirapitinga é uma espécie em extinção, devido as mudanças no seu hábitat, sobrepesca, urbanização e poluição. Os objetivos do presente estudo foram, desenvolver protocolos satisfatórios de preservação de sêmen de dourado e de pirapitinga, por meio do resfriamento a 4°C-6°C e da criopreservação. Em dourado, o sêmen foi diluído 1:10, 1:5 ou 1:2 (v/v sêmen: volume total) em nove soluções (soluções salinas simples, salinas complexas, glicose ou salina-glicose) utilizadas como diluidoras de sêmen de peixe. A motilidade espermática foi subjetivamente avaliada após 0,1, 2 e 3 dias resfriado a 4°C. Para selecionar a melhor criosolução a ser utilizada no congelamento, o sêmen foi diluído em uma combinação de crioprotetores a 10% (dimetilsulfóxido-DMSO, glicerol ou metil glicol) e diluidores, NaCl 154 mM, NaCl 200 mM, Saad (solução salina) ou BTS<sup>®</sup> (solução salina-glicose). A motilidade espermática foi avaliada após 1 hora a 4°C. Para a criopreservação, o sêmen foi misturado aos diluidores NaCl 154 mM, NaCl 200 mM, Saad, glicose 5% ou BTS<sup>®</sup>, combinados com o crioprotetor DMSO. Então, o sêmen diluído foi envasado em palhetas de 0,5 mL, congelado em vapor de nitrogênio, a -170°C por 24 h, e transferido para o nitrogênio líquido. A motilidade espermática foi avaliada após o descongelamento em banho-maria, 60°C, por 8 segundos. A maior motilidade espermática (30%), após 48h de resfriamento, foi observada no sêmen diluído em glicose 5%, 1:2. O sêmen não diluído, não teve nenhuma motilidade no mesmo período de resfriamento. O DMSO provou ser o crioprotetor mais eficiente, quando comparado ao glicerol ou metil glicol. As mais altas motilidades espermáticas (acima de 60%), pós-descongelamento, foram observadas no sêmen criopreservado em glicose-DMSO ou em BTS<sup>®</sup>-DMSO, na taxa de diluição 1: 5. Em pirapitinga, o sêmen foi diluído 1:10 em um dos seguintes diluidores: NaCl 154 mM, NaCl 200 mM, Saad e BTS<sup>®</sup>. A motilidade espermática foi avaliada diariamente até 7 dias, depois de resfriado a 4°C. Dez criosoluções foram preparadas, oito com os mesmos quatro diluidores e dois crioprotetores (DMSO ou metil glicol), e duas, com glicose 5% e os mesmos dois crioprotetores. O sêmen foi diluído e criopreservado usando o mesmo protocolo descrito para dourado, e a motilidade espermática foi avaliada após o descongelamento, 60°C, por 8 segundos. Então o sêmen foi criopreservado em

NaCl 200 mM-DMSO, Saad-DMSO, NaCl 154 mM-metil glicol ou BTS<sup>®</sup>-metil glicol, e congelado em palhetas de 0,5 ou 0,25 mL. A motilidade espermática foi avaliada após o descongelamento em duas temperaturas diferentes: 50°C e 60°C, por 8 segundos. Na pirapitinga, motilidade de 48% foi observada no sêmen diluído em BTS<sup>®</sup>, após 7 dias a 4°C. O sêmen pôde ser criopreservado com sucesso em NaCl 200 mM ou Saad, combinado com DMSO ou em NaCl 154 mM ou BTS<sup>®</sup>, combinado com metil glicol. Não houve diferença sobre a motilidade espermática, quando o sêmen foi congelado em palhetas de 0,5 ou 0,25 mL e descongelado, a 50°C ou 60°C. Então, concluí-se que o sêmen de dourado pode ser preservado por 2 dias em glicose 5%, 1:2, e criopreservado em glicose 5%-DMSO ou BTS<sup>®</sup>-DMSO. O sêmen de pirapitinga pode ser resfriado por 7 dias em BTS<sup>®</sup>, e criopreservado em BTS<sup>®</sup>-metil glicol.

Palavras chaves: Diluidores, crioprotetores, motilidade, sêmen, dourado, pirapitinga

---

Comitê Orientador: Ana Tereza de Mendonça Viveiros – UFLA (Orientadora), Priscila Vieira Rosa Logato – UFLA e Luis David Solis Murgas – UFLA (co-orientadores)

## ABSTRACT

OLIVEIRA, Alexmiliano Vogel de. **Cooling and Freezing of dourado *Salminus maxillosus* and pirapitinga *Brycon nattereri* semen.** 2006. 94 p. Dissertation (MSc Animal Production) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.\*

Dourado (*Salminus maxillosus*) and pirapitinga (*Brycon nattereri*) are fish species of the river Grande bay. Dourado is very appreciated for its high quality meat and for recreational fishing, while pirapitinga is an endangered species due to changes in the river course, over-fishing, urbanization and pollution. The aim of this research was: develop cooling and freezing suitable protocols of dourado and pirapitinga semen. In dourado, semen was diluted 1:10, 1:5 or 1:2 (v/v semen:total volume) in nine solutions (simple saline, complex saline, glucose or saline-glucose solutions) used as fish semen extenders. Sperm motility was subjectively evaluated after 0, 1, 2 and 3 days of cooling at 4°C. To select the most suitable cryosolutions for freezing, semen was diluted in a combination of dimethyl sulphoxide (DMSO), glycerol or methyl glycol as cryoprotectant (10%), and NaCl 154 mM, NaCl 200 mM, Saad (saline solution) or BTS™ (saline-glucose solution) as extender. Sperm motility was evaluated after 1 h at 4°C. For the cryopreservation trial, semen was mixed in DMSO as cryoprotectant and in NaCl 154 mM, NaCl 200 mM, Saad, glucose 5% or BTS™ as extenders. Then diluted semen was aspirated into 0.5-mL straws, placed in a nitrogen vapor vessel at -170°C for 24 h and transferred to liquid nitrogen. Post-thaw motility was evaluated after thawing in a 60°C water bath for 8 sec. The highest motility (30%) of 24-h cooled semen was obtained in samples diluted 1:2 in glucose. Undiluted semen had no motility during the same period of cooling. DMSO proved to be the most suitable cryoprotectant, when compared to glycerol or methyl glycol. The highest post-thaw motility (above 60%) was produced when semen was cryopreserved in glucose-DMSO or in BTS™-DMSO, 1:5 dilution ratio. In pirapitinga, semen was diluted 1:10 in one of the following extenders: NaCl 154 mM, NaCl 200 mM, Saad or BTS™. Sperm motility was evaluated every day up to 7 days, after cooling at 4°C. Eight cryosolutions were prepared with the same four extenders and two cryoprotectants (DMSO or methyl glycol), semen was added and cryopreserved using the same protocol described for dourado. Sperm motility was evaluated after thawing at 60°C for 8 sec. Then semen was cryopreserved in NaCl 200 mM-DMSO, Saad-DMSO, NaCl 154 mM- methyl glycol or BTS™-methyl glycol, and frozen in 0.5 or 0.25 mL straws. Post-thaw motility was evaluated after thawing under two different temperatures: 50 and 60°C. Pirapitinga semen produced 48% motility after as long as 7 days at 4°C when diluted in BTS™. Pirapitinga semen can be successfully cryopreserved in NaCl 154 or BTS™

combined with methyl glycol or in NaCl 200 mM or Saad combined with DMSO. There was no significant difference on sperm motility when semen was frozen in 0.5- or 0.25 mL-straw or thawed at 50 or 60°C. Thus, it can be concluded that dourado semen can be cooled for only 2 days in glucose, and cryopreserved in BTS™ or glucose and DMSO as cryoprotectant. Pirapitinga semen can be cooled for 7 days in BTS™, and cryopreserved in BTS™ and methyl glycol.

Keywords: extenders, cryoprotectants, motility, semen, dourado, pirapitinga

---

Comitê Orientador: Ana Tereza de Mendonça Viveiros – UFLA (Orientadora), Priscila Vieira Rosa Logato – UFLA e Luis David Solis Murgas – UFLA (co-orientadores).

## **CAPÍTULO 1**

### **INTRODUÇÃO GERAL**

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta grande diversidade de espécies nativas e de recursos genéticos que não são encontrados, naturalmente, fora da América do Sul. A destruição das matas ciliares, o aumento da demanda alimentar, a introdução de espécies exóticas, a pesca predatória, a construção de barragens de hidrelétricas interferindo no comportamento migratório dos peixes e a poluição dos ecossistemas aquáticos têm ocasionado a diminuição de populações de espécies de importância econômica e o desaparecimento de outras, como o dourado, muito apreciado pelos pescadores devido à excelência de sua carne e ao fato de ser um peixe esportivo e a pirapitinga, espécie ameaçada de extinção.

Em cativeiro, nem sempre a reprodução de peixes é uma tarefa fácil, principalmente se tratando de espécies nativas que ainda não têm a sua biologia estudada. As espécies nativas, em sua maioria, não se reproduzem naturalmente em cativeiro, sendo necessária a indução da desova pelo uso de hormônios. Outro problema comum encontrado para a utilização das técnicas de reprodução induzida nestas espécies é a assincronia na maturação das gônadas de machos e de fêmeas, o que promove uma diminuição acentuada na produção. Contudo, estudos sobre o resfriamento e a criopreservação do sêmen de peixes têm contribuído sensivelmente para o desenvolvimento e aplicação de metodologias visando o controle da reprodução, favorecendo a manipulação genética, a seleção de plantéis e a redução do estoque de machos, por tornar disponíveis os gametas a qualquer tempo. Some-se a isso a possibilidade da utilização dessa metodologia em programas de hibridação, programas de preservação de material genético de espécies em risco de extinção e a facilidade de trocas de materiais genéticos entre as fazendas produtoras de pescados. Assim sendo, este trabalho visa desenvolver protocolos de preservação do sêmen de dourado e de pirapitinga, a curto e a longo prazos.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Desenvolver protocolos de preservação de sêmen de dourado *Salminus maxillosus* e de pirapitinga *Brycon nattereri* a curto prazo, por meio do resfriamento e, a longo prazo, por meio da criopreservação.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Avaliar a eficiência de soluções diluidoras de sêmen na motilidade espermática após o resfriamento.
- Avaliar a eficiência de soluções diluidoras associadas a crioprotetores, sobre a motilidade espermática após a criopreservação.



### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Relevância do estudo do sêmen de peixes

Pouca relevância tem sido dada aos estudos de sêmen de peixes, pois a atenção maior se volta ao processo de desova induzida (hipofização) para a produção de alevinos. Conhecimentos básicos, nesta área, são cada vez mais solicitados, principalmente em função da necessidade de se ter cada vez mais sêmen criopreservado de boa qualidade (Shimoda, 2004).

A pesca em período de reprodução e a construções de barragens, são fatores que estão levando ao declínio os estoques de peixes, especialmente as espécies de piracema. Passagens para peixes que permitem a migração rio acima e telas que mantêm os alevinos longe das turbinas, quando estes migram rio abaixo, funcionam bem para apenas algumas espécies. Na verdade, o que tem sido observado é uma significativa redução de algumas espécies de peixes, tornando-se urgente o desenvolvimento de tecnologias que permitam sua sobrevivência (Carolsfeld & Harvey, 1999).

Implantações de programas de repovoamento têm sido uma das estratégias utilizadas e muitas companhias hidroelétricas instalam estações de piscicultura para produção e soltura de alevinos nos rios. Contudo, alguns problemas podem estar relacionados ao procedimento adotado nessas estações, dentre estes, a utilização de poucos reprodutores para a produção dos alevinos.

A percentagem de sobrevivência da prole na natureza é mínima, quando comparada à daquelas encontradas nas estações de piscicultura. Embora o número de alevinos utilizados no repovoamento seja considerável, a sua diversidade genética é muito pequena. Isso implica em perdas na diversidade e de heterozigidade, ou seja, a progênie produzida do estoque reprodutor

utilizado no repovoamento apresenta, potencialmente, efeitos de consanguinidade e deriva genética (Shimoda, 2004).

A utilização e a implantação de bancos genéticos, incluindo o congelamento de sêmen, constituem soluções potenciais para minimizar perdas decorrentes da ação do homem sobre os peixes nativos, garantindo a diversidade genética nos programas de repovoamento. Amostras de sêmen de peixes obtidos na natureza seriam criopreservadas e parte delas utilizada nos procedimentos de desova artificial para repovoamento. O restante seria mantido em bancos genéticos para a conservação desses materiais (Shimoda, 2004).

Segundo Viveiros (2005), pode ser citada uma série de benefícios relacionados ao desenvolvimento das técnicas de criopreservação de gametas, tais como:

- a recuperação de estoques silvestres ameaçados de extinção;
- a redução do número de reprodutores (machos) utilizados em programas de propagação artificial com conseqüente redução dos custos;
- a eliminação do problema da assincronia na maturidade gonadal entre reprodutores, principalmente das espécies migratórias (ou de piracema) quando machos e fêmeas não estão preparados simultaneamente para a reprodução;
- o estabelecimento de programas de melhoramento genético com a utilização de machos selecionados ou manipulados geneticamente (triplóides, transgênicos);
- a facilidade de transporte, difusão e troca de material genético entre organizações atuantes na área com risco reduzido de transmissão de patógenos;
- o fornecimento de materiais genéticos para a identificação de populações ou estoques por meio de técnicas de biologia molecular;

- o estabelecimento de programa de hibridização utilizando espécies com períodos reprodutivos diferentes.

### **3.2 Localização da bacia do rio Grande**

A bacia do rio Grande faz parte da bacia do rio Paraná, do qual é o principal formador. Ocupa uma área de aproximadamente de 143.000 km<sup>2</sup>, dos quais 86.500 km<sup>2</sup> (60,7%) pertencem ao estado de Minas Gerais. O rio Grande, durante certo trecho, separa parcialmente os estados de Minas Gerais e de São Paulo e é formado por pequenos afluentes que nascem na serra de Mantiqueira. Correndo inicialmente entre a serra da Canastra, ao norte e as serras de Itapexé e Franca, ao sul, flui na direção nordeste. Poucos quilômetros após a corredeira de Jaguará, muda seu curso geral para o oeste e, então, junta-se pela margem direita ao rio Paranaíba, formando assim o rio Paraná. No seu trecho exclusivamente mineiro, o rio Grande apresenta frequentes corredeiras e saltos. Depois, na divisa com São Paulo, passa a percorrer um planalto com trechos de margens alagadiças e com várias lagoas marginais (CEMIG/CETEC, 2000).

### **3.3 As espécies em estudo**

#### **3.3.1 O dourado**

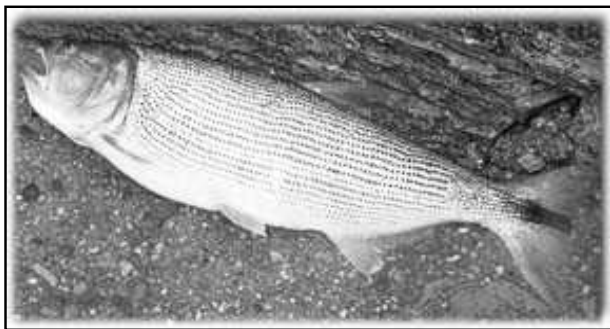
Família: Charidae;

Subfamília: Salmininae;

Gênero: *Salminus*;

Espécie: *Salminus maxillosus* Valenciennes, 1849;

Nome popular: Dourado



**FIGURA 1.** Exemplar adulto de dourado (*Salminus maxillosus*)

O dourado é o maior peixe de escamas da bacia do rio Paraná, podendo atingir mais de um metro de comprimento. O corpo é alto e as escamas são relativamente pequenas. A boca possui duas séries de dentes, tanto no pré-maxilar, quanto no dentário. O dorso é castanho escuro, sendo o abdome e a região inferior do corpo de cor amarelo-vivo, com uma lista negra sobre os raios caudais medianos. É um peixe de piracema, reproduzindo-se normalmente de novembro a janeiro. Ao iniciar sua primeira alimentação, a pós-larva ingere formas menores de plânctons; com seis dias de vida, passa a ingerir microcrustáceos; com quinze dias, faz uso também de larvas de Odonata e de Chironomidae. O hábito alimentar piscívoro já está estabelecido em alevinos de 8 cm de comprimento, sendo o adulto um piscívoro exclusivo, engolindo a presa inteira. É o peixe de água doce mais apreciado pelos pescadores, pela excelência da sua carne e por ser de difícil captura. Pode ser pescado em áreas de corredeiras. Não se reproduz em ambientes lênticos e nem em cativeiro, devendo-se, para tanto, recorrer à hipofização (CEMIG/CETEC, 2000). Segundo Barbieri et al. (2001), o dourado é largamente distribuído nas maiores bacias hidrográficas da América do Sul, rios Amazonas e Paraná, incluindo Pantanal/Mato Grosso e a bacia do rio Mogi Guaçu.

### 3.3.2 A pirapitinga

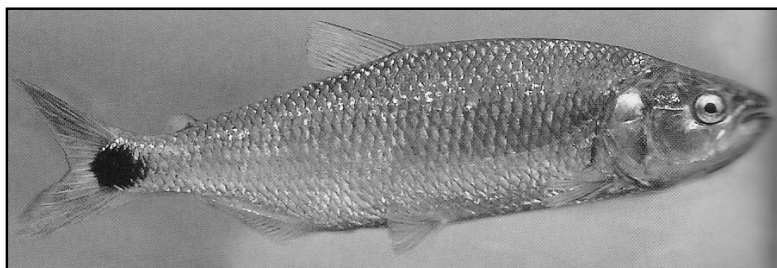
Família: Charidae;

Subfamília: Bryconinae;

Gênero: *Brycon*;

Espécie: *Brycon nattereri* Günther, 1864;

Nome popular: Pirapitinga ou parpitinga



**FIGURA 2.** Exemplar adulto de pirapitinga (*Brycon nattereri*)

A pirapitinga é um peixe de porte médio, podendo atingir de 40 a 50 cm de comprimento. Seu dorso é escuro, sendo as nadadeiras amareladas. Apresenta três séries de dentes multicúspides no pré-maxilar. É uma espécie carnívora, que alimenta-se de pequenos peixes e insetos bentônicos. Em geral, o macho é sensivelmente menor e mais esguio que a fêmea. Um dimorfismo sexual do macho é a aspereza da nadadeira anal, resultante de pequenas espículas que aparecem na época da reprodução. A utilização desta espécie na piscicultura está sendo estudada na Estação de Pesquisa e Desenvolvimento Ambiental de Volta Grande, da CEMIG. A espécie não é mais encontrada em várias seções do rio Grande devido às alterações ocorridas em seu hábitat (CEMIG/CETEC, 2000).

Estudando a reprodução e o comportamento da pirapitinga *Brycon nattereri*, constatou-se que a principal característica do local de sua ocorrência é a de um ambiente com águas frias e correntosas, com pedras, cachoeiras e

muitas árvores nas margens; um ambiente ainda selvagem e livre da ação do homem. A maturação de suas gônadas (testículos e ovários) ocorre nos meses de temperaturas baixas e sua reprodução nos meses de agosto e setembro. Os reprodutores desovam em locais com pouca luminosidade, embaixo de pedras e nas margens, abandonando-os em seguida. Os ovos apresentam coloração escura, ficam aderidos em substratos, como raízes e cobertos com folhas mortas (Silva & Mello, 1997).

#### **3.4 Os espermatozoides e os parâmetros físicos do sêmen**

Morfologicamente os espermatozoides podem ser subdivididos em cabeça, peça intermediária e cauda. Na maioria dos grupos de peixes, falta o acrossoma, que está presente em todos os outros grupos de vertebrados (Nagahama, 1983). Todavia, a carência do acrossoma na maioria dos teleósteos é compensada pela presença da micrúpila, um orifício no córion do ovo para a penetração do espermatozoide (Cosson et al., 1999).

Um aspecto importante na rotina de reprodução artificial em qualquer espécie animal é a avaliação das características seminais (Silveira et al., 1988). Para descrição de um perfil espermático são analisadas características físicas do sêmen (volume, motilidade, vigor e concentração) e, ainda, as características morfológicas dos espermatozoides (Fonseca et al., 1992).

O volume do sêmen e a concentração espermática encontrados nas diferentes espécies de peixes são bastante variáveis. É importante o conhecimento desses valores para que se possa avaliar a qualidade do sêmen coletado e, com isso, otimizar sua utilização no processo de fertilização artificial (Viveiros, 2005). Valores de volume e concentração espermática estabelecidos para algumas espécies de peixes nativas são apresentados na Tabela 1.

TABELA 1 – Volume e concentração espermática do sêmen de algumas espécies brasileiras de água doce.

Nome comum e Espécie	Volume (mL)	Concentração espermática*	Autores
Curimatã-pacu ( <i>Prochilodus marggravii</i> )	ND	19,2 a 26,6 8,6 a 28,7	Godinho & Cóser (1995) Shimoda et al. (1997)
Curimbatá ( <i>Prochilodus scrofa</i> )	ND	13,3 a 20,5	Godinho & Cóser (1995)
Curimbatá ( <i>Prochilodus lineatus</i> )	0,5 a 3,0	14,4 a 20,3 13,3 a 20,5 14,1 a 20,3	Cruz (2001) Godinho & Cóser (1995) Ribeiro (2001)
Dourado ( <i>Salminus maxillosus</i> )	ND	4,3 a 10,8	Godinho & Cóser (1995)
Matrinxã ( <i>Brycon cephalus</i> )	4,0	9,6	Silveira (2000)
Pacu-caranha ( <i>Piaractus mesopotamicus</i> )	7,2 ± 4,6	7,1 a 11,1 36,6 a 48,1 31,7 a 43,1	Godinho & Cóser (1995) Bedore (1999) Shimoda (1999)
Piapara ( <i>Leporinus elongatus</i> )	ND	7,0 a 16,0	Godinho & Cóser (1995)
Piau-açu ( <i>Leporinus macrocephalus</i> )	0,05 a 0,2	3,5 a 7,6 11,2 ± 2,8	Oliveira et al. (2004) Ribeiro (2001)
Pintado ( <i>Pseudoplatystoma coruscans</i> )	ND	8,0 a 16,0	Godinho & Cóser (1995)
Piracanjuba ( <i>Brycon orbignyanus</i> )	14,5 10 a 20 > 15	10,0 a 14,0 3,9 a 6,1 2,8 a 10,7	Bedore (1999) Oliveira et al. (2004) Maria (2005)

\* espermatozoides x 10<sup>9</sup> / mL; ND – não descrito.  
Adaptado de Viveiros (2005).

O método mais comum para a determinação da concentração espermática (células espermática/mL de sêmen) é a contagem de espermatozoides por meio de uma câmara hematimétrica (Buyukhatipoglu & Holtz, 1984). A utilização da câmara hematimétrica de Neubauer, entretanto,

apresenta alguns inconvenientes. Taitson & Godinho (2003) afirmam que há necessidade de se esperar a precipitação dos espermatozoides no fundo da câmara e que, para a sua utilização, é preciso realizar altas diluições, que poderiam incorrer erros. Métodos alternativos têm sido propostos, podendo-se citar a contagem na câmara de Makler (Taitson & Godinho, 2003; Ribeiro, 2001; Ravinder et al., 1997; Lahnsteiner et al., 1998), a espectrofotometria (Silveira et al., 1987; Ciereszko & Dabrowski, 1993) e o espermatócrito (Poole & Dillani, 1998; Ribeiro, 2001). A concentração espermática pode ser estimada em número de espermatozoide/mL de sêmen, número de espermatozoide/kg de peso corporal e número de espermatozoide/peixe. O número de espermatozoides por mL de sêmen é mais apropriado, podendo ser complementado pelo volume total de sêmen (Maria, 2005). Sêmen altamente concentrado nem sempre oferece elevada motilidade ou altas taxas de fertilização (Geffen & Evans, 2000; Williot et al., 2000).

Estudos sobre a motilidade espermática de peixes são restritos a um limitado número de espécies. Segundo Billard & Cosson (1992), aproximadamente 20 espécies são estudadas, muito embora mais de 20.000 sejam conhecidas. A motilidade é iniciada quando os espermatozoides (que são imóveis no fluido seminal) são liberados no exterior e entram em contato com a água. A diferença existente entre a baixa osmolaridade da água em relação àquela do plasma seminal é essencial para a iniciação da motilidade dos espermatozoides em peixes de água doce.

Nos peixes marinhos, a situação é inversa: a motilidade é iniciada quando o espermatozoide entra em contato com a água do mar, cuja osmolaridade é muito mais elevada que a do plasma seminal (Takai & Morisawa, 1995). A energia para a motilidade e o metabolismo básico do espermatozoide são derivados de uma quebra de nutrientes exógenos e endógenos na presença ou ausência de oxigênio (Stoss, 1983). A diminuição da



capacidade de natação dos espermatozóides é originada, em parte, pela diminuição do estoque de energia ocorrida durante o período de motilidade (Billard, 1990; Cosson et al., 1999). Em espermatozóide de peixes, a fosforilização oxidativa mitocondrial, que é altamente requerida para produzir energia durante a locomoção, permanece insuficiente para sustentar o armazenamento de ATP endógeno (Cosson et al., 1999).

A diluição pode ser a chave da imotilidade e motilidade dos espermatozóides, porque o volume da solução ativadora adicionado determina a dinâmica de ativação. Uma diluição relativamente alta (1:1000) é necessária para iniciar a motilidade simultânea de 100% dos espermatozóides. Em baixas diluições, somente alguns espermatozóides são ativados e outros vêm a ser ativados progressivamente mais tarde (Billard & Cosson, 1992).

### **3.5 Diluidores**

Os diluidores são soluções de sais ou de carboidratos, que ajudam a manter a viabilidade das células durante o resfriamento e o congelamento. Para que essas soluções funcionem bem como diluidores, algumas condições são exigidas: o diluidor deve ser isotônico ao sêmen para não ativar a motilidade espermática, ser estável ao longo do armazenamento e ser estéril (Maria, 2005).

Segundo Tan-Fermin et al. (1999), a diluição do sêmen em solução com mesma composição do plasma seminal permite melhor aproveitamento da sua capacidade fecundante, principalmente levando-se em conta que a quantidade de sêmen utilizada em procedimentos rotineiros de desova induzida é maior do que o necessário. O uso de diluidores pode estabilizar as condições físico-químicas durante a estocagem do sêmen, prolongando a viabilidade dos espermatozóides.

Soluções de formulações mais simples têm obtido grande sucesso como diluidoras. Segundo Scott & Baynes (1980) soluções salinas que possuem como base o NaCl, com níveis entre 100 e 200 mM, apresentam pequeno risco de

danos tanto hipo como hiperosmótico para os espermatozoides de salmonídeos. Soluções salinas de NaCl 200 mM e NaCl 200 mM + Tris (solução imobilizadora de Saad) acrescidas ou não de antibiótico, preservaram a motilidade espermática em 40%, após 7 dias de resfriamento, em piracanjuba (Maria, 2005).

Outras soluções diluidoras desenvolvidas para algumas espécies em particular, muitas vezes, podem ser utilizadas com sucesso em outras espécies. O diluidor BTS<sup>®</sup> (Beltsville Thawing Solution - Minitub<sup>®</sup>) foi originalmente desenvolvido para o resfriamento do sêmen suíno e tem obtido bons resultados no resfriamento do sêmen de peixes como o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (Miliorini et al., 2002), o curimba (*Prochilodus scrofa*) (Franciscatto et al., 2002), e a piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) (Murgas et al., 2004; Maria, 2005).

### **3.6 Crioprotetores**

Os crioprotetores são substâncias que devem ser adicionadas ao meio diluidor para que haja proteção do espermatozoide durante o congelamento (Squires et al., 1999). Estas substâncias devem possuir como propriedades uma baixa toxicidade para as células e alta solubilidade em água, podendo 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 a mesma é congelada, interferindo na formação de cristais de gelo. Poucos espermatozoides nas espécies estudadas têm sobrevivido às temperaturas de congelamento sem crioprotetores. A adição destas substâncias ao sêmen aumenta a tolerância dos espermatozoides às baixas temperaturas de congelamento (Chao, 1991). Entre os crioprotetores intracelulares mais utilizados estão dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol, metanol,

etilenoglicol e dimetil-acetamida (DMA). Estes crioprotetores já foram testados em sêmen de teleósteos (Stoss, 1983; Leung & Jamieson, 1991; Suquet et al., 2000), sendo avaliados nas proporções de 1 parte de sêmen:1 parte de criosolução (diluidor + crioprotetor) até 1:20 (Chao & Liao, 2001). Recentemente foi descrita a excelente ação do metil glicol como crioprotetor de sêmen de piracanjuba (Maria, 2005). O DMSO é o crioprotetor mais usado em criopreservação de sêmen de espécies de piracema e tem produzido bons resultados. Carolsfeld et al. (2003), trabalhando com criopreservação de sêmen de peixes migratórios brasileiros, utilizaram o crioprotetor DMSO com sucesso no congelamento do sêmen das seguintes espécies: curimatá (*Prochilodus lineatus*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*), piapara (*Leporinus elongatus*), piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) e dourado (*Salminus maxillosus*).

Os crioprotetores extracelulares, por outro lado, recobrem a superfície celular e estabilizam a membrana, ajudando, portanto, a minimizar e reparar os possíveis danos celulares causados pelo processo de congelamento. A gema de ovo e o leite em pó desnatado são os crioprotetores extracelulares mais comuns (Carolsfeld & Harvey, 1999). Os crioprotetores externos, combinados com os internos, promovem proteção mais completa ao espermatozóide, atuando na membrana celular (Leung & Jamieson, 1991).

### **3.7 Preservação dos espermatozóides através do resfriamento**

Os espermatozóides de peixes são imóveis no plasma seminal. Esta característica favorece sua preservação a curto prazo, já que eles não requerem energia para locomoção.

Segundo Rana (1995), a estocagem de gametas e embriões de teleósteos por quatro horas ou até alguns dias tem sido reportada em salmonídeos, carpa e em espécies de tilápia.

Em se tratando de carpa *Cyprinus carpio*, é possível a conservação de sêmen, com boa motilidade, a 2°C-5°C, por até 2 dias (Belova, 1981; Hulata & Rothbart, 1979). Entretanto, verifica-se redução da motilidade e do conteúdo intracelular de ATP após 8 horas de resfriamento. Também estudando a *C. carpio*, Ravinder et al. (1997) testaram várias soluções diluidoras e três temperaturas de resfriamento, sendo avaliados parâmetros como velocidade espermática e frequência de batimento flagelar. A temperatura de 5°C, quando comparada a de 2°C e 22°C, foi a que apresentou melhores resultados e as soluções diluidoras avaliadas, após 24 horas de manutenção a 5°C, não demonstraram diferença significativa na motilidade em relação ao sêmen a fresco.

No Brasil, ainda são poucas as publicações envolvendo o resfriamento de sêmen de espécies nativas. O sêmen de matrinxã *Brycon lundii*, pacu *Piaractus mesopotamicus*, curimatá, piau-três-pintas *Leporinus frederici*, piapara, curimatã-pacu *Prochilodus marggravii*, surubim/pintado *Pseudoplatystoma coruscans* e piracanjuba, foram resfriados com sucesso por até 29 horas, apresentando motilidade espermática acima de 30% (Marques, 2001). Em outro trabalho, o sêmen de piracanjuba foi resfriado por até 7 dias, apresentando motilidade espermática em torno de 40% (Maria, 2005). O sêmen de pacu também foi resfriado com sucesso por 6 horas, apresentando motilidade espermática acima de 60% (Murgas et al., 2005). Em termos de aplicação prática, amostras de sêmen mantidas resfriadas e com motilidade de, pelo menos, 30%, poderiam ser utilizadas em procedimentos de desova induzida em laboratório (Marques, 2001).

Segundo Stoss & Donaldson (1982), os fatores mais determinantes do sucesso do resfriamento são: redução da temperatura, fornecimento e troca de gases, prevenção do desenvolvimento bacteriano e prevenção da dessecação.

Os espermatozóides de peixes cultivados, mantidos em baixas temperaturas (ao redor de 4°C), possuem baixo metabolismo e podem ser preservados por muitos dias em diluidores apropriados sem mudanças significantes na qualidade (Kime et al., 1996). Segundo Carolsfeld & Harvey (1999), uma solução diluidora deve ser utilizada no processo de resfriamento, pois a diluição diminui a competição dos espermatozóides por oxigênio e espaço.

### **3.8 Preservação dos espermatozóides através congelamento**

No que se refere à criopreservação de sêmen de peixes, diversas metodologias foram testadas em algumas espécies, embora os graus de sucesso ainda sejam muito variáveis. Segundo Lubzens et al. (1997), muitos métodos de congelamento de espermatozóides têm sido desenvolvidos nos últimos 20 anos. Apesar de ser possível a preservação de espermatozóides por períodos curtos por meio de resfriamento, o congelamento em nitrogênio líquido constitui uma forma viável de manutenção dos gametas masculinos por longos períodos. Este fato torna a criopreservação espermática, cada vez mais, uma importante técnica utilizada na aquicultura. Esta técnica vem produzindo significantes contribuições na preservação, a longo prazo, do sêmen de algumas espécies de peixes nativos, tais como a piracanjuba (Bedore, 1999; Carolsfeld et al., 2003; Maria, 2005), o matrinxã (Silveira, 2000), o dourado (Coser et al., 1984; Carolsfeld et al., 2003; Órfão & Viveiros, 2004), o piau-açu (*Leporinus macrocephalus*) (Moraes, 2004; Ribeiro & Godinho, 2003), a piapara (Carolsfeld et al., 2003), o curimatá (*Prochilodus lineatus*) (Carolsfeld et al., 2003; Cruz, 2001; Miliorini et al., 2005) e o pacu *Piaractus mesopotamicus* (Bedore, 1999).

Lahnsteiner et al. (2000), em revisão sobre criopreservação de sêmen de ciprinídeos, afirmam que, embora existam muitos estudos na área, os

conhecimentos desenvolvidos são ainda muito fragmentados. Investigações detalhadas de parâmetros criobiológicos ainda são ausentes e os protocolos de criopreservação derivam, principalmente, de dados empíricos.

Para melhor entendimento do processo de criopreservação deve-se ter em mente que o sêmen, ao ser congelado, necessita, antes, ser diluído em soluções contendo diluidor(es) e crioprotetor(es). Este composto é formulado para prevenir crioinjúrias aos espermatozóides e também a iniciação da motilidade.

Diversos autores utilizam diluições diferentes para espécies diferentes e, muitas vezes, diluições diferentes para uma mesma espécie. Assim, Bedore (1999) utilizou uma diluição de 1:5 (sêmen:solução total) para pacu-caranha e piracanjuba, Silveira (2000) utilizou 1:4 para matrinxã, Ribeiro & Godinho (2003) utilizaram 1:9 para piau-açú, e Maria (2005) utilizou 1:10 para piracanjuba.

Segundo Mazur (1977), o sucesso da criopreservação não depende somente da escolha certa dos crioprotetores e diluidores, mas também dos protocolos utilizados. Os crioprotetores e a taxa de congelamento, simultaneamente, determinam o grau dos danos causados aos espermatozóides devido à formação de cristais de gelo intracelulares.

Ao longo do processo de congelamento, a suspensão de espermatozóides atinge temperaturas abaixo do ponto de congelamento do meio (super resfriamento), antes que haja a formação de cristais. Quando os cristais de gelo começam a se formar, ocorre um aumento na temperatura. Este fato pode ocasionar danos aos espermatozóides, sendo minimizado pelo uso de curvas adequadas de congelamento (Squires et al., 1999).

Quando o sêmen é colocado diretamente no nitrogênio líquido, a membrana plasmática e a peça intermediária sofrem graves lesões e podem desaparecer inteiramente. Por outro lado, quando o sêmen é colocado no vapor

de nitrogênio, os espermatozoides sofrem um congelamento gradual, de forma que essas estruturas não são muito danificadas, embora o aspecto da cromatina seja consideravelmente modificado (Billard, 1983).

O sucesso da criopreservação de sêmen com nitrogênio líquido exige que as taxas de congelamento estejam entre  $-10^{\circ}$  e  $-50^{\circ}\text{C}/\text{min}$  (Harvey & Carolsfeld, 1993). Essa taxa de congelamento é normalmente obtida no vapor de nitrogênio, mas, para isso, havia a necessidade de se encontrar, após o equilíbrio, a distância correta entre a superfície do nitrogênio líquido e onde o sêmen deveria ser colocado para que tais taxas de congelamento fossem obtidas. Entretanto, variações bruscas na temperatura do ambiente onde se realizava a criopreservação dificultavam bastante esta operação. A utilização de botijões contendo exclusivamente vapor de nitrogênio líquido, que consiste de um recipiente hermeticamente fechado no qual o nitrogênio é absorvido em material poroso que recobre as paredes mantendo a temperatura do interior constante (em torno de  $-180^{\circ}\text{C}$ ; Bedore, 1999), facilitou a realização dos procedimentos de criopreservação. Então, as amostras são congeladas no vapor de nitrogênio, procedimento que tem se mostrado eficaz na criopreservação de sêmen de várias espécies, tais como a piracanjuba (Bedore, 1999; Carolsfeld et al., 2003; Maria, 2005), a curimatá (Carolsfeld et al., 2003; Miliorini et al., 2005), o piau-açu (Moraes, 2004), o pacu, a piapara e o dourado (Carolsfeld et al., 2003).

### **3.9 Processo de descongelamento**

Durante o congelamento, há um processo de perda de água e a desidratação celular (Squires, 1999), conforme explicado no item anterior. Já no descongelamento, o que ocorre é o processo inverso, de reidratação das células, ocorrendo um influxo de água para seu interior (Holt, 2000).

A maioria das células suporta o descongelamento rápido, mesmo que ela não se hidrate totalmente. Segundo Leung (1991), o descongelamento rápido é

necessário para tentar evitar a recristalização, ou seja, o reagrupamento de pequenos cristais de gelo em grandes cristais de gelo, letal para a célula.

Normalmente, o descongelamento é feito mergulhando-se as palhetas em banho-maria. Segundo Cruz (2001), o sêmen congelado, ao ser retirado do botijão de nitrogênio líquido e mergulhado em banho-maria, deve ser agitado por poucos segundos, para que o sêmen descongele uniformemente. Com palhetas mais calibrosas, este processo se torna mais difícil porque o descongelamento não é uniforme e a superfície descongela mais rapidamente que a porção central. Geralmente, excelentes resultados são obtidos ao descongelarem-se palhetas em água quente (cerca de 50°C a 60°C). Porém, o descongelamento em água quente pode chegar ao superaquecimento que é letal aos espermatozóides. Deve-se, então, aquecer a palheta apenas o tempo suficiente para iniciar o descongelamento do conteúdo, de modo que a temperatura da palheta continue a subir, mesmo depois de ter sido removida da água quente, completando, assim, o processo de descongelamento (Carolfeld & Harvey, 1999).

Diversos autores utilizam diferentes tempos e temperaturas para descongelar o sêmen estocado em palheta de 0,5 ml. Lahnsteiner et al. (1997) descongelaram o sêmen de algumas espécies de salmonídeos a 25°C por 30 segundos; Murgas et al. (2001), descongelaram o sêmen de piracanjuba (*B. orbignyanus*), a 60°C por 5 segundos; Maria (2005), também trabalhando com sêmen de piracanjuba, descongelou, a 60°C, por 8 segundos e Órfão & Viveiros (2004) descongelaram sêmen de dourado (*S. maxillosus*), a 60°C, por 8 segundos.

### **3.10 Taxa de fertilização do sêmen congelado**

Embora, a motilidade tenha sido freqüentemente usada como critério de qualidade espermática, ela nem sempre representa um bom indicativo da



capacidade de fertilização. Espermatozóides imóveis (Friborough, 1966) não estão necessariamente mortos ou incapazes de fertilização. Segundo Rana & McAndrew (1989), a taxa de fertilização dos ovos é, sem dúvida, o mais apropriado e prático critério nos protocolos de avaliação para a criopreservação de espermatozóides.

Outros fatores, como o número de espermatozóides por ovócito, a duração do contato entre os gametas ou o protocolo de fertilização utilizado, podem também influenciar o sucesso da fertilização (Suquet et al., 1995; Chereguini et al., 1999). Em produção comercial de peixes, uma relação ótima espermatozóide:ovócito tem sido recomendada; ao mesmo tempo, os trabalhos experimentais utilizam o sucesso da fertilização como um ponto final da qualidade espermática, sugerindo uma relação mínima espermatozóide:ovo (Suquet et al., 1995; Rurangwa et al., 1998). Uma razão de  $3,14 \times 10^5$  espermatozóides por ovócito foi utilizada, na fertilização de piabanha *Brycon insignis*, por Shimoda (2004), quando utilizou-se sêmen criopreservado. Em piracanjuba, Maria (2005) utilizou uma relação 46 e  $4,6 \times 10^5$  espermatozóides/ovócito, para sêmen criopreservado e sêmen fresco, respectivamente. Em matrinxã, Silveira (2000) utilizou uma relação média de  $3,1$  e  $2,8 \times 10^5$  espermatozóides/ovócito para o sêmen criopreservado e sêmen fresco, respectivamente.

Segundo Viveiros et al. (2000), o excesso de espermatozóides na fertilização, obviamente, mascara a qualidade dos espermatozóides criopreservados, dificultando as comparações entre protocolos.

Algumas pesquisas têm sido realizadas envolvendo a criopreservação do sêmen de peixe de espécies nativas, contudo, são necessários mais trabalhos com o objetivo de aumentar as informações sobre a biologia, a reprodução e o crescimento das espécies pesqueiras.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARBIERI, G.; SALLES, F. A.; CESTAROLLI, M. A. Reproductive and nutritional dynamics of *Salminus maxillosus* Valenciennes, 1849 (Pisces, Characidae) at Mogi Guaçu river, state of São Paulo, Brazil. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 23, n. 2, p. 441-444, Apr. 2001.
- BEDORE, A. G. **Característica e conservação do sêmen de Pacu-Caranha (*Piaractus mesopotamicus*) e de Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)**. 1999. 53 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- BELOVA, N. V. The ecological and physiological peculiarities of sperm in pond cyprinids. Communication I – Production and ecological and physiological peculiarities of the sperm of some cyprinids. **Journal of Ichthyology**, Silver Spring, v. 21, n. 1, p. 90-102, 1981.
- BILLARD, R. Artificial insemination in fish. In: LAMMING, G. E (Org.). **Marshall's physiology of reproduction**. 4. ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1990. Chap. 9, p. 870-887.
- BILLARD, R. Ultrastructure of trout spermatozoa: changes after dilution and deepfreezing. **Cell Tissue Research**, New York, v. 228, n. 2, p. 205-218, 1983.
- BILLARD, R.; COSSON, M. P. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. **The Journal of Experimental Zoology**, New York, v. 261, n. 2, p. 122-131, Feb. 1992.
- BUYUKHATIPOGLU, S.; HOLTZ, W. Sperm output in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) Effect of age, timing and frequency of stripping and presence of females. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 37, n. 1, p. 63-71, 1984.
- 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.
- CAROLSFELD, J.; HARVEY, B. Conservação de recursos genéticos de peixes: teoria e prática. **Curso de Treinamento Brasileiro**. Tradução de H. P. Godinho. Victoria, Canadá: World Fisheries Trust, 1999. 47 p.

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. 141 p.

CHAO, N. H. Fish sperm cryopreservation. In: **Technology advancement and extension efforts**. Taiwan: Department of Aquaculture, Taiwan Fishery Research Institute, 1991. p. 31. (Paper on International Symposium on Reproductive Biology in Aquaculture).

CHAO, N. H.; LIAU, I. C. Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos. **Aquacultura**, Amsterdam, v. 197, n. 1/4, p. 161-189, June 2001.

CHEREGUINI, O.; GARCIA, de la BANDA, I.; RASINES, I.; FERNANDEZ, A. Artificial fertilisation in turbot, *Scophthalmus maximus*: different methods and determination of the optimal sperm – egg ratio. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 30, n. 5, p. 319-324, May 1999.

CIERESZKO, A.; DABROWSKI, K. Estimation of sperm concentration of rainbow trout, whitefish and yellow perch using a spectrophotometric technique. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 109, n. 3/4, p. 367-373, Feb. 1993.

CÓSER, A. M.; GODINHO, H.; RIBERIO, D. M. Cryogenic preservation of spermatozoa from *Prochilodus scrofa* and *Salminus maxillosus*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 37, n. 4, p. 387-390, 1984.

COSSON, J.; BILLARD, R.; CIBERT, C.; DRÉANNO, C.; SUQUET, M. Ionic factors regulating the motility of fish sperm. In: GAGNON, C. (Ed.). **The male gamete: from basic science to clinical applications**. Viena: Cache River Press, 1999. Chap. 16, p. 162-186.

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

FONSECA, V. O.; VALLE FILHO, F. R.; ABREU, J. J.; MIES FILHO, A. Procedimentos para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. **Colégio Brasileiro de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, 1992. 69 p.

FRANCISCATTO, R. T.; MURGAS, L. D. S.; MILIORINI, A. B. Qualidade do sêmen de curimbatá (*Prochilodus lineatus*) e taxa de fertilidade após resfriamento a 4°C. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 26, n. 3, 213-215, jul./set. 2002.

- FRIBOURGH, J. H. The application of a differential staining method to low-temperature studies on goldfish spermatozoa. **Progressive Fish Culturis**, Bethesda, v. 28, n. 4, p. 227-237, 1966.
- GEFFEN, A. J.; EVANS, J. P. Sperm traits and fertilisation success of male and Sex reversed female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 182, n. 1/2, p. 61-72, Feb. 2000.
- GODINHO, H. P.; CÓSER, A. M. L. Bases morfofuncionais da espermatogênese e criopreservação de sêmen de peixes. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 11., 1995. **Anais...** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1995. p. 16-25.
- HARVEY, B.; CAROLSFELD, J. **Induced breeding in tropical fish culture**. Ottawa: International Development Research Centre, 1993.
- HOLTZ, W. V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, Woburn, v. 53, n. 1, p. 47-58, Jan. 2000.
- HULATA, G.; ROTHBART, S. Cold storage of carpa semen for short periods. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 16, n. 3, p. 267-269, 1979.
- KIME, D. E.; EBRAHIMI, M.; NYSTEN, K.; ROELANTS, I.; RURANGWA, E.; MOORE, H. D. M.; OLLIVIER, F. Use of computer assisted sperm analysis (CASA) for monitoring the effects of pollution on sperm quality of fish: application to effects of heavy metals. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 36, n. 3/4, p. 223-237, Dec. 1996.
- LAHNSTEINER, F.; BERGER, B.; HORVÁTH, A.; URBÁNYI, B., WEISMANN, T. Cryopreservation of spermatozoa in cyprinid fishes. **Theriogenology**, Woburn, v. 54, n. 9, p. 1477-1496, Dec. 2000.
- LAHNSTEINER, F.; BERGER, B.; WEISMANN, T.; PATZNER, R. A. Determination of semen quality of the rainbow trout, *oncorhynchus mykiss*, by sperm motility, seminal plasma parameters, and spermatozoal metabolism. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 163, n. 1/2, p. 163-181, Apr. 1998.
- LAHNSTEINER, F.; WEISMANN, T.; PATZNER, R. A. Methanol as cryoprotectant and the suitability of 1, 2 and 5 mL straws for cryopreservation of

semen from salmonid fishes. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 28, n. 6, p. 471-479, June 1997.

LEUNG, L. K. P. Principles of biological cryopreservation. In: JAMIESON, B. G. M. (Ed). **Fish evolution and systematics: evidence from Spermatozoa**. Cambridge: Cambridge University Press, 1991. Cap. 19, p. 230-244.

LEUNG, L. K. P.; JAMIESON, B. G. M. Live preservation of fish gametes. In: JAMIESON, B. G. M. (Ed). **Fish evolution and systematics: evidence from Spermatozoa**. Cambridge: Cambridge University Press, 1991. Cap. 20, p. 245-295.

LUBZENS, E.; DAUBE, N.; PEKARSKY, I.; MAGNUS, Y.; COHEN, A.; YUSEFOVICH, F.; FEIGIN, P. Carp (*Cyprinus carpio* L.) spermatozoa cryobanks – Strategies in research and application. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 155, n. 1/4, p. 13-30, Sept. 1997.

MARIA, A. N. **Diluidores e crioprotetores no resfriamento e congelamento do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)**. 2005. 71 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MARQUES, S. **Preservação a curto prazo do sêmen de teleosteos neotropicais de água doce**. 2001. 83 p. Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte.

MAZUR, P. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. **Cryobiology**, San Diego, v. 14, n. 3, p. 251-272, 1977.

MILIORINI, A. B.; MURGAS, L. D. S.; PEREIRA, G. J. M. Taxas de fertilização do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) após o congelamento. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16., 2005, Goiânia, GO. **Anais...** Goiânia, GO, 2005.

MILIORINI, A. B.; MURGAS, L. D. S.; VIVEIROS, A. T. M.; FRANCISCATO, R. T.; SILVA, M. O. B.; MARIA, A. N. Resfriamento do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) a 4°C, usando diferentes concentrações de dimetilsulfoxido. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 26, n. 3, p. 209-211, jul./set. 2002.

MORAES, G. F. **Resfriamento e congelamento do sêmen de piau-açu (*Leporinus macrocephalus*)**. 2004. 68 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG .

- MURGAS, L. D. S.; GUALHANONE, A.; SILVA, M. O. B.; MELLO, C. B.; FREITAS, R. T. F.; ZANGERONIMO, M. G. Calidad seminal del pez piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) post-descongelación. **Revista Anales de Veterinária**, Murcia, v. 17, n. 1, p. 3-10, 2001.
- MURGAS, L. D. S.; MILIORINI, A. B.; FRANCISCATO, R. T.; MARIA, A. N. Viabilidade espermática do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) resfriado a 4°C. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 33, n. 6, p. 1361-1365, nov./des. 2004.
- MURGAS, L. D. S.; MILIORINI, A. B.; PEREIRA, G. J. M. Qualidade do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) transportado e resfriado à 4°C durante 6 horas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16., 205, Goiânia, GO. **Anais...** Goiânia, GO, 2005.
- NAGAHAMA, Y. The functional morphology of teleost gonads. In Hoar, W. S.; RANDALL, D. J.; DONALDSON, E. M. (Ed.). **Fish Physiology**. New York: Academic Press, 1983. v. 9, p. 233-275.
- OLIVEIRA, A. V.; VIVERIOS, A. T. M.; MORAES, G. F.; MARIA, A. N.; ÓRFÃO, L. H.; SOUZA, G. A. Estudo comparativo das características seminais e de soluções diluidoras de sêmen durante o resfriamento, de piau-açu (*Leporinus macrocephalus*) e piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). In: CONGRESSO DOS PÓS-GRADUANDOS DA UFLA, 13., 2004, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2004.
- ÓRFÃO, L. H.; VIVEIROS, A. T. M. Criopreservação do sêmen do osteíctio dourado, *Salminus maxillosus*. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFLA – CICESAL, 17., 2004, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2004.
- POOLE, W. R.; DILLANE, M. G. Estimation of sperm concentration of wild and reconditioned brown trout, *Salmo trout* L. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 29, n. 6, p. 439-445, June 1998.
- RANA, K. Preservation of gametes. In: BROMAGE, N. R.; ROBERTS, R. J. (Ed.). **Broodstock management and egg and larval quality**. London: Blackwell Science, 1995. p. 53-75.
- RANA, K. J.; McANDREW, B. J. The viability of cryopreserved tilapia spermatozoa. **Aquacultura**, Amsterdam, v. 76, n. 3/4, p. 335-345, Feb. 1989.

RAVINDER, K.; NASARUNDDIN, K.; MAJUMDAR, K. C.; SHIVAJI, S. Computerized analysis of motility, motility patterns and motility parameters of spermatozoa of carp following short-term storage of semen. **Journal of Fish Biology**, London, v. 50, n. 6, p. 1309-1328, June 1997.

RIBEIRO, R. I. M. A. **Criopreservação do sêmen do piau-açu *Leporinus macrocephalus* (Garavello e Britski, 1998)**. (2001) Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

RIBEIRO, R. I. M. A.; GODINHO, H. P. Criopreservação do sêmen testicular do teleosteo piau-açu *Leporinus macrocephalus*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 55, n. 1, p. 75-79, jan./fev. 2003

RURANGWA, E.; ROELANTS, I.; HUYSKENS, G.; EBRAHIMI, M.; KIME, D. E.; OLLIVIER, F. The minimum effective spermatozoa:egg ratio for artificial insemination and effects of mercury on sperm motility and fertilization ability in *Clarias gariepinus*. **Journal of Fish Biology**, London, v. 53, n. 2, p. 402-413, Aug. 1998.

SCOTT, A. Z. P.; BAYNES, S. M. A review of the biology, handling and storage of salmonid spermatozoa. **Journal of Fish Biology**, London, v. 17, n. 6, p. 707-739, 1980.

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

SHIMODA, E. **Caracterização física, química e microscópica do sêmen do pacu *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887**. 1999. 54 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ.

SHIMODA, E.; ANDRADE, D. R.; VIDAL JÚNIOR, M. V.; SLIVA, J. F. S.; CARBALLO, O. W. F.; CRUZ, G. M. Influência da presença da fêmea sobre as características seminais do curimatá (*Prochilodus marggravii* Walbaum, 1972). **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Niterói, v. 4, n. 1, p. 39-42, 1997.

SILVA, M. O. B.; MELLO, C. B. M. Observações “in loco” da desova da Parpitinga (*Brycon nattereri*) no Rio Itaúna, Município de Baependi – MG. In:

ENCONTRO ANUAL DA ASSOCIAÇÃO MINEIRA DE AQUICULTURA, 13., 1997, Passos. **Resumos...** Passos, 1997. p. 44.

SILVEIRA, A. N. **Caracterização espermática, preservação criogênica do sêmen e fertilidade do matrinxã, (*Brycon cephalus*)**. 2000. 45 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

SILVEIRA, W. F.; KAVAMOTO, E. T.; RIGOLINO, M. G.; TABATA, Y. A. Fertilidade do sêmen da truta arco-íris, *Salmo irideus* Gibbons, em diferentes concentrações de espermatozoides por óvulo. **Boletim da Indústria da Pesca**, São Paulo, v. 15, n. 1, p. 51-57, 1988.

SILVEIRA, W. F.; KAVAMOTO, E. T.; RIGOLINO, M. G.; TABATA, Y. A. O método espectrofotométrico na avaliação da concentração de espermatozoides na truta arco-íris, *Salmo irideus* Gibbons. **Boletim da Indústria da Pesca**, São Paulo, v. 14, p. 69-73, 1987.

SQUIRES, E. L.; PICKETT, B. W.; GRAHAM, J. K.; VANDERWALL, D. K.; McCUE, P. M.; BRUEMMER, J. E. Principles of cryopreservation. In: **Cooled and Frozen Stallion Semen**. 1999. Cap. 9.

STOSS, J. Fish gamete preservation and spermatozoa physiology. In: Hoar W. S.; RANDALL, D. J.; DONALDSON, E. M. (Ed.). **Fish physiology**, London: B. Academic Press, 1983. v. 9, cap. 6, p. 305-350.

STOSS, J.; DONALDSON, E. M. Preservation of fish gametes. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM REPRODUCTION PHYSIOLOGY FISH, 1982, Wageningen. **Proceedings...** Wageningen, 1982. p. 114-122.

SUQUET, T.; BILLARD, R.; COSSON, J.; NORMANT, Y.; FAUVEL, C. Artificial insemination in turbot (*Scophthalmus maximus*): determination of the optimal sperm to egg ratio and time of gamete contact. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 133, n. 1, n. 83-90, May 1995.

SUQUET, T.; DREANNO, C.; FAUVEL, C.; COSSON, J.; BILLARD, R. Cryopreservation of sperm in marine fish. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 31, n. 3, p. 231-243, Mar. 2000

TAKAI, H.; MORISAWA, M. Change in intracellular K<sup>+</sup> concentration caused by external osmolality change regulates sperm motility of marine and freshwater teleosts. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 108, n. 3, p. 1175-1181, Mar. 1995.



TANFERMIN, J. D.; MIURA, T.; ADACHI, S.; YAMAUCHI, K. Seminal plasma compositions, sperm motility and milt dilution in the Asian catfish *Clarias macrocephalus* (Gunther). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 171, n. 3/4, p. 323-338, Feb. 1999.

TAITSON, P. F.; GODINHO, H. P. Evaluation of fish sperm concentration using two counting chambers. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 55, n. 2, p. 238-239, mar./abr. 2003.

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

VIVEIROS, A. T. M.; SO, N.; KOMEN, J. Sperm Cryopreservation of African Catfish (*Clarias gariepinus*) Cryoprecipitants, Freezing Rates and sperm: Egg Dilution Ratio. **Theriogenology**, New York, v. 54, n. 9, p. 1305-1308, Dec. 2000.

WILLIOT, P.; KOPEIKA, E. F.; GONCHARO, B. F. Influence of testis state, temperature and delay in semen collection on spermatozoa motility in the cultured Siberian sturgeon (*Acipenser baere* Brandt). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 189, n. 1/2, p. 53-61, Sept. 2000.

## **CAPÍTULO 2**

### **RESFRIAMENTO E CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN DE DOURADO (PISCES: *Salminus maxillosus*)**

## RESFRIAMENTO E CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN DE DOURADO (PISCES: *Salminus maxillosus*)

### RESUMO

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo de preservação de sêmen de dourado (*Salminus maxillosus*) a curto prazo, por meio do resfriamento a 4°C-6°C e a longo prazo, pela criopreservação. Os trabalhos foram realizados durante as piracemas 2004/2005 e 2005/2006. O sêmen foi coletado, resfriado e congelado, utilizando reprodutores da estação de Hidrobiologia e Piscicultura de FURNAS Centrais Elétricas e avaliado no Departamento de Zootecnia da UFLA. O teste de fertilização foi realizado na Estação de Piscicultura da CEMIG, unidade de Itutinga. No experimento 1 (resfriamento do sêmen), foram avaliadas os diluidores de sêmen, NaCl 154 mM, NaCl 200 mM, Saad, Ginsburg fish Ringer, Goldfish Ringer, Kurokura, BTS<sup>®</sup>, glicose 5% e água de coco, e três taxas de diluição, 1:10 (sêmen: volume total), 1:5 e 1:2. No experimento 2 (seleção de crioprotetores e criosoluções), foram testados 3 crioprotetores (metil glicol, glicerol, DMSO) na concentração de 10%, combinados aos diluidores que apresentaram maiores taxas de motilidade durante o experimento 1. No experimento 3, as criosoluções que melhor mantiveram a motilidade espermática, após 1 hora a 4°C, foram testadas quanto à criopreservação. O sêmen foi criopreservado em palhetas de 0,5 mL no vapor de nitrogênio (Taylor-Warton, modelo CP 300 "dry shipper"). Após 24 h, as amostras foram armazenadas em botijão de nitrogênio líquido. O descongelamento foi realizado em banho-maria (60°C por 8 segundos) e a motilidade espermática avaliada. No experimento 3, também foi avaliada a capacidade de fertilização do sêmen criopreservado nas melhores criosoluções testadas. No experimento 1, foi observado que o sêmen diluído em glicose 5%, na diluição 1:2, pode ser armazenado a 4°C por até 2 dias, apresentando motilidade de 30%, enquanto que o sêmen *in natura* já não apresentava motilidade nesse mesmo período. No experimento 2, foi observado que o sêmen diluído em meio contendo DMSO apresentou as taxas de motilidade mais altas, após 1 hora de resfriamento, em relação ao sêmen diluído em meios contendo glicerol e metil glicol. No experimento 3, observou-se que o sêmen criopreservado na proporção 1:5 apresentou taxas de motilidade espermática acima de 45%, enquanto que o sêmen criopreservado na proporção 1:10 apresentou motilidade máxima de 20%, após o descongelamento. As criosoluções de glicose 5%-DMSO e BTS<sup>®</sup>-DMSO, na proporção 1:5, mostraram-se eficientes quanto ao congelamento do sêmen de dourado e não apresentaram diferença significativas entre si ( $P>0,05$ ), apresentando motilidade espermática acima de 61% após o descongelamento. Após a fertilização, foram

observadas taxas de eclosão de 23,0% e 17,4% para o sêmen criopreservado em glicose 5% + DMSO e BTS<sup>®</sup> + DMSO, respectivamente, enquanto que o sêmen fresco apresentou taxa de eclosão de 60%. Com base no presente estudo, pode-se concluir que o sêmen de dourado pode ser resfriado por até 2 dias, a 4°C, quando diluído em glicose 5%, na proporção 1:2 (sêmen: volume total) e criopreservado em BTS<sup>®</sup>-DMSO ou glicose 5%-DMSO, a 1:5.

Palavras chaves: diluidores, crioprotetores, motilidade, sêmen

## 1 INTRODUÇÃO

O dourado *Salminus maxillosus* é um peixe de grande porte, pertencente à bacia do rio Grande e podendo atingir mais de um metro de comprimento. Seu corpo é alto, as escamas são relativamente pequenas e o dorso é castanho-escuro. O abdome e a região inferior do corpo são de cor amarelo-vivo, com uma listra negra sobre os raios caudais medianos. É uma espécie que se reproduz, normalmente, de novembro a janeiro (CEMIG/CETEC, 2000). Devido às modificações ambientais causadas pelo homem, a população de dourado na bacia do rio Grande vem diminuindo gradativamente. A pesca, a captura em época de desova, a poluição da água, o desmatamento, bem como a construção de barragens, têm sido apontados como razões para a redução populacional não só do dourado, como também de várias outras espécies de peixes no Brasil (Carosfeld & Harvey, 1999).

A preservação do sêmen de peixes a curto prazo, por meio da refrigeração a 4°C, e a longo prazo, pela criopreservação em nitrogênio líquido (-196°C), vem sendo estudada. Marques (2001) resfriou (a 4°C) sêmen de pacu-caranha (*Piaractus mesopotamicus*), matrinxã (*Brycon lundii*), piracanjuba (*Brycon orbignyanus*), piau-verdadeiro (*Leporinus elongatus*), piau-três-pintas (*leporinus friderici*), curimbatá (*Prochilodus lineatus*) e curimbatá-pacu (*Prochilodus marggravii*), por até 29 horas, dependendo da espécie. Maria (2005) resfriou (a 4°C) sêmen de piracanjuba por até sete dias, quando diluído em Saad ou NaCl 200 mM, na proporção 1:10. Órfão & Viveiros (2004) resfriaram (a 4°C) sêmen de dourado por 1 dia, quando utilizaram sêmen *in natura* e não diluído ou diluído em glicose 5%, a 1:10.

Uma estratégia eficaz para a conservação do patrimônio genético de peixes brasileiros seria a implantação de bancos genéticos, incluindo os de

sêmen criopreservado (Carolsfeld et al., 2003). O sêmen de várias espécies de peixes tem sido criopreservado, alcançando taxas de fertilização cada vez mais semelhantes às obtidas com sêmen fresco (salmonídeos por Billard, 1992; bagre Africano *Clarias gariepinus*, por Viveiros et al., 2000 e bagre Europeu, *Silurus glanis*, por Linhardt et al., 1993), e utilizados rotineiramente em programas de produção e hibridação.

No Brasil, a biodiversidade de espécies de peixes é enorme e poucos são os grupos de pesquisa que se dedicam ao assunto. Entretanto, já foram descritos alguns trabalhos experimentais envolvendo criopreservação de sêmen em peixes nativos do rio Grande, tais como o dourado (*Salminus maxillosus*) (Cóser et al., 1984; Órfão & Viveiros, 2004), o piau (Cóser et al., 1987), o curimatá (Kavamoto et al., 1989; Cóser et al., 1992; Cruz, 2001), o pacu (Carolsfeld et al., 1990; Silveira et al., 1990; Bedore, 1999) e a piracanjuba (Bedore, 1999; Murgas et al., 2003; Maria, 2005), entre outros.

Visando melhorar as técnicas reprodutivas do dourado *S. maxillosus*, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver protocolos de preservação do sêmen, a curto prazo, por meio do resfriamento e a longo prazo, pela criopreservação, nesta espécie.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Procedência dos reprodutores e coleta do sêmen

Os estudos foram desenvolvidos durante as piracemas 2004-05 e 2005-06, ambos nos meses de janeiro e fevereiro. Foram utilizados sêmen de 14 machos de dourado *Salminus maxillosus*, oriundos da Estação de Hidrobiologia e Piscicultura de FURNAS Centrais Elétricas para os experimentos de resfriamento e criopreservação de sêmen, e uma fêmea e um macho provenientes da Estação de Piscicultura da Companhia Energética de Minas Gerais (CEMIG) unidade Itutinga, utilizados para o teste de fertilidade do sêmen criopreservado (Exp. 3D). Os reprodutores foram capturados com rede de arrasto, em tanque de terra, selecionados e levados para aquários. Após identificados e pesados, os machos foram submetidos ao tratamento hormonal de extrato bruto de hipófise de carpa, utilizando dosagem única de 1 mg/kg de peso vivo. O sêmen de cada macho foi coletado em tubos de ensaios graduados e armazenados a 4°-6°C.

### 2.2 Avaliação seminal

Após a coleta do sêmen, foram verificadas as seguintes características seminais: volume de sêmen; concentração espermática estimada por meio de uma câmara hematimétrica Neubauer “Improved”; motilidade espermática avaliada subjetivamente por somente uma pessoa, em microscópio óptico e estimada em porcentagem de espermatozóides móveis (0–100) em relação ao total observado, após ativação de uma parte de sêmen para 5 partes de NaCl 50 mM (Maria, 2005) e o pH seminal, medido por medidor de pH portátil digital, LT lutron PH - 206.

### 2.3. Experimento 1 – Resfriamento do sêmen

Várias soluções diluidoras de sêmen (etapa A) e três taxas de diluição sêmen:diluidor (etapa B) foram avaliadas.

A etapa A foi conduzida em DBC com parcela subdividida. O sêmen de cada um dos três machos foi diluído, 1:10 (sêmen:volume total), em um dos seguintes diluidores:

1. NaCl 154 mM (solução fisiológica de NaCl 0,9%) (Maria, 2005);
2. NaCl 200 mM (Maria, 2005);
3. Solução imobilizadora de Saad (NaCl 200,0 mM + Tris)(Linhart et al., 1993);
4. Goldfish Ringer (mM: NaCl 125,0; KCl 2,4; MgCl<sub>2</sub> 1,9; MgSO<sub>4</sub> 0,6; CaCl<sub>2</sub> 3,2; glicose 5,6 e HEPES 1,0g)(comunicação pessoal Dr. J. Komen);
5. Ginsburg fish Ringer (mM: NaCl 123,2; KCl 3,8; CaCl<sub>2</sub> 3,0; NaHCO<sub>3</sub> 2,7) (Viveiros et al., 2000);
6. Kurokura (mM: NaCl 128,4; KCl 2,7; CaCl<sub>2</sub> 1,4; NaHCO<sub>3</sub> 2,4)(Kurokura et al., 1984);
7. glicose 5% (glicose 27,8 mM)(Carolsfeld et al., 2003);
8. água de coco Kero-coco<sup>®</sup> (%: cálcio 0,02; sódio 0,02; magnésio 0,01; potássio 0,32; fósforo 0,01; carboidratos 5,00);
9. Controle: sêmen *in natura*, sem diluição.

Cada tratamento foi mantido em um tubo de ensaio de 5 mL, devidamente identificado e armazenado na geladeira a 4°C-6°C. A motilidade espermática foi avaliada 0, 1, 2 e 3 dias após a diluição, conforme metodologia descrita para o sêmen fresco.

O modelo estatístico utilizado foi:

$$Y_{ijk} = \mu + D_i + B_j + e_{ij} + P_k + (PD)_{ik} + e_{(ijk)}$$

em que:



$Y_{ijk}$  = taxa de motilidade espermática do sêmen que recebeu o diluidor i no período de estocagem j no bloco k;

$\mu$  = média geral;

$D_i$  = efeito do diluidor i; com i = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9;

$B_j$  = efeito do bloco j; com j = 1, 2 e 3;

$e_{ij}$  = erro associado à parcela que recebeu o diluidor i no bloco j;

$P_k$  = efeito do período de estocagem k; com k = 1, 2 e 3

$(PD)_{ik}$  = efeito da interação entre o diluidor i e o período de estocagem k;

$e_{(ijk)}$  = erro associado à subparcela que recebeu o diluidor i no período de estocagem k no bloco j.

A etapa B foi conduzida em um delineamento em blocos casualizados com parcela subdividida. O sêmen de cada um dos cinco machos foi diluído em uma das seguintes combinações de 4 diluidores (NaCl 154 mM, NaCl 200 mM, glicose 5% e BTS<sup>®</sup>, Beltsville Thawing Solution, Minitub (%): glicose 80,0, citrato de sódio 12,7, EDTA 2,7, sulfato de gentamicina 0,5, NaHCO<sub>3</sub> 2,7, KCl 1,5) e três taxas de diluição (1:2, 1:5 e 1:10, sêmen:volume total). Além disso, uma amostra de sêmen de cada macho foi mantida sem diluição (controle - sêmen *in natura*), totalizando 13 tratamentos (4 diluidores x 3 taxas de diluição + 1 controle). Cada tratamento foi mantido em um tubo de ensaio de 5 mL, devidamente identificado e armazenado na geladeira a 4°C-6°C. A motilidade espermática foi avaliada 0, 1, 2 e 3 dias após a diluição.

O modelo estatístico usado foi:

$$Y_{ijk} = \mu + D_i + P_l + B_k + (DP)_{il} + \mu_a + F + E_{(il)k} + A_j + (AD)_{ij} + (AP)_{jl} + (ADP)_{ij} + (AF)_j + E_{(ijk)}$$

em que:

$Y_{ijk}$  = taxa de motilidade espermática do sêmen que recebeu o diluidor i na proporção l no período de estocagem j no bloco k;

$\mu$  = média geral;

$D_i$  = efeito do diluidor i; com  $i = 1, 2, 3$  e  $4$ ;  
 $P_l$  = efeito da diluição l; com  $l = 1, 2$  e  $3$ ;  
 $B_k$  = efeito do bloco k; com  $k = 1, 2, 3, 4$  e  $5$ ;  
 $(DP)_{il}$  = efeito da interação entre o diluidor i e a diluição l, na parcela;  
 $\mu_a$  = média do tratamento adicional (controle);  
 $F$  = efeito do tratamento adicional  
 $E_{(il)k}$  = erro experimental associado à parcela composta pelo diluidor i e a diluição l dentro do bloco k;  
 $A_j$  = efeito do período de estocagem j; com  $j = 1, 2, 3$  e  $4$ ;  
 $(AD)_{ij}$  = efeito da interação entre o diluidor i e o período de armazenamento j;  
 $(AP)_{jl}$  = efeito da interação entre o período de armazenamento j e a diluição l;  
 $(ADP)_{ijl}$  = efeito da interação entre o período de armazenamento j e o diluidor i associado a diluição l;  
 $(AF)_j$  = efeito da interação entre o período de armazenamento j e o tratamento adicional;  
 $E_{(il)jk}$  = erro associado à subparcela que recebeu o diluidor i e a diluição l no período de armazenamento j no bloco k.

#### **2.4 Experimento 2 – Seleção de crioprotetores e criosoluções para o sêmen**

O experimento 2 foi desenvolvido para selecionar um crioprotetor mais adequado ao sêmen de dourado (etapa 2A) e, conseqüentemente, algumas criosoluções (diluidor + crioprotetor) para serem posteriormente utilizadas na criopreservação do sêmen de dourado. Este experimento foi realizado em duas etapas.

A etapa A foi conduzida em DBC com parcela subdividida. O sêmen de cada um dos 3 machos foi diluído (1:10) em uma das combinações de 4 diluidores (NaCl 154 mM, NaCl 200 mM, Saad e BTS<sup>®</sup>) e 3 crioprotetores a

10% (dimetilsulfóxido – DMSO, metil glicol e glicerol). Além disso, uma amostra de sêmen de cada macho foi mantida sem diluição (controle - sêmen *in natura*), totalizando 13 tratamentos (4 diluidores x 3 crioprotetores + 1 controle). Cada tratamento foi mantido em um tubo de ensaio de 5 mL, devidamente identificado e armazenado na geladeira a 4°C-6°C. A motilidade espermática foi avaliada a 0 e 1 hora após a diluição.

O modelo estatístico usado foi:

$$Y_{ijkl} = \mu + D_i + P_l + B_k + (DP)_{il} + \mu_a + F + E_{(il)k} + A_j + (AD)_{ij} + (AP)_{jl} + (ADP)_{ilj} + (AF)_j + E_{(il)k}$$

em que:

$Y_{ijkl}$  = taxa de motilidade espermática do sêmen que recebeu o diluidor  $i$  associado ao crioprotetor  $l$  no período de estocagem  $j$  no bloco  $k$ ;

$\mu$  = média geral;

$D_i$  = efeito do diluidor  $i$ ; com  $i = 1, 2, 3$  e  $4$ ;

$P_l$  = efeito do crioprotetor  $l$ ; com  $l = 1, 2$  e  $3$ ;

$B_k$  = efeito do bloco  $k$ ; com  $k = 1, 2$  e  $3$ ;

$(DP)_{il}$  = efeito da interação entre o diluidor  $i$  associado ao crioprotetor  $l$ , na parcela;

$\mu_a$  = média do tratamento adicional;

$F$  = efeito do tratamento adicional

$E_{(il)k}$  = erro experimental associado à parcela composta pelo diluidor  $i$  e o crioprotetor  $l$  dentro do bloco  $k$ ;

$A_j$  = efeito do período de estocagem  $j$ ; com  $j = 1$  e  $2$

$(AD)_{ij}$  = efeito da interação entre o diluidor  $i$  e o período de estocagem  $j$ ;

$(AP)_{jl}$  = efeito da interação entre o período de estocagem  $j$  e o crioprotetor  $l$ ;

$(ADP)_{ilj}$  = efeito da interação entre o período de estocagem  $j$  e o diluidor  $i$  associado ao crioprotetor  $l$ ;

$(AF)_j$  = efeito da interação entre o período de estocagem  $j$  e o tratamento adicional;

$E_{(ijk)}$  = erro associado à subparcela que recebeu o diluidor  $i$  e o crioprotetor  $l$  no período de estocagem  $j$  no bloco  $k$ .

A etapa B foi conduzida em DBC com parcela subdividida. O sêmen de cada um dos 3 machos foi diluído (1:5) em uma das criosoluções selecionadas a partir do experimento 2A: NaCl 154 mM, NaCl 200 mM, Saad e BTS<sup>®</sup>, combinados com DMSO e Saad-metil glicol. Entretanto, mais um tratamento foi incluído (glicose 5%-DMSO). Além disso, uma amostra de sêmen de cada macho foi mantida sem diluição (controle - sêmen *in natura*), totalizando 7 tratamentos (6 criosoluções + 1 controle). Cada tratamento foi mantido em um tubo de ensaio de 5 mL, devidamente identificado, e armazenado na geladeira a 4°C-6°C. A motilidade espermática foi avaliada a 0 e 1 hora após a diluição.

O modelo estatístico usado foi:

$$Y_{ijk} = \mu + D_i + B_j + e_{ij} + P_k + (PD)_{ik} + e_{(ijk)}$$

em que:

$Y_{ijk}$  = taxa de motilidade espermática do sêmen que recebeu a criosolução  $i$  no período de estocagem  $j$  no bloco  $k$ ;

$\mu$  = média geral;

$D_i$  = efeito da criosolução  $i$ ; com  $i = 1, 2, 3, 4, 5, 6$  e  $7$ ;

$B_j$  = efeito do bloco  $j$ ; com  $j = 1, 2$  e  $3$ ;

$e_{ij}$  = erro associado à parcela que recebeu a criosolução  $i$  no bloco  $j$ ;

$P_k$  = efeito do período de estocagem  $k$ ; com  $k = 1$  e  $2$ ;

$(PD)_{ik}$  = efeito da interação entre a criosolução  $i$  e o período de estocagem  $k$ ;

$e_{(ijk)}$  = erro associado à subparcela que recebeu a criosolução  $i$  no período de estocagem  $k$  no bloco  $j$ .

### **2.5 Experimento 3 – Criopreservação do sêmen**

As criosoluções testadas no experimento 2, que proporcionaram motilidade espermática acima de 55% após 1 h de armazenamento a 4°C-6°C, foram selecionadas para prosseguir nas quatro etapas de experimentos sobre a criopreservação de sêmen. O delineamento utilizado em cada uma das quatro etapas foi o DBC.

Na etapa A, o sêmen de cada um dos três machos foi diluído (1:10) nas criosoluções selecionadas a partir do experimento 2A: NaCl 154 mM, NaCl 200 mM, Saad e BTS<sup>®</sup>, combinados com DMSO. O sêmen diluído foi envasado em palhetas (Minitub do Brasil<sup>®</sup>) de 0,5 mL (3 palhetas por criosolução), vedadas com esfera plástica, acondicionadas em raques e congeladas em vapor de nitrogênio (Taylor-Warton, modelo CP 300, “dry shipper”), por um período de 24 h. Em seguida, as palhetas foram transferidas para o nitrogênio líquido e armazenadas. O descongelamento das palhetas foi realizado em banho-maria, a 60°C, por 8 segundos (Maria, 2005). A motilidade espermática foi avaliada imediatamente após o descongelamento.

Na etapa B, o sêmen de cada um dos três machos foi diluído (1:5) nas criosoluções selecionadas a partir do experimento 2B: NaCl 154 mM, NaCl 200 mM, Saad, BTS<sup>®</sup> e glicose 5%, combinados com DMSO. Após a diluição, o sêmen foi envasado e congelado de acordo com a metodologia descrita para a etapa anterior.

Nas etapas C e D, o sêmen (n=5 machos) foi diluído (1:5) e criopreservado (n=6 palhetas/criosolução) nas mesmas criosoluções utilizadas na etapa anterior (B), exceto em Saad-DMSO, por apresentar fórmula bastante semelhante à da criosolução NaCl 200 mM-DMSO. Três palhetas de cada criosolução foram descongeladas e a motilidade espermática avaliada (etapa C). As outras 3 palhetas das criosoluções que proporcionaram motilidade acima de 60% foram descongeladas e testadas quanto à sua capacidade de fertilizar

ovócitos (etapa D). Para tanto, uma fêmea recebeu duas dosagens de extrato bruto de hipófise de carpa (0,5 e 5 mg/kg de peso vivo), com intervalo de 12 horas entre aplicações. Os ovócitos foram, então, coletados de acordo com o manejo da estação de piscicultura da CEMIG, unidade Itutinga. Cada palheta foi descongelada e o sêmen imediatamente rediluído em NaCl 200 mM na proporção final de 1:10. Como controle foi utilizado sêmen fresco diluído em NaCl 200 mM na proporção 1:200. Uma alíquota de 100µL de sêmen diluído foi misturada em 0,15 g de ovócitos (aproximadamente 200 ovócitos). A fertilização foi iniciada após adição de 2 mL de água dos aquários em que os peixes se encontravam. Decorridos 2 minutos de leve agitação, foram acrescentados mais 10 mL de água do tanque para a hidratação dos ovos e deixados em repouso por mais 5 minutos. Os ovos foram, então, transferidos para incubadoras de cano de PVC teladas no fundo, conforme descrito por Maria (2005). A temperatura da água de incubação dos ovos foi mantida em torno de 26°C. A taxa de eclosão, verificada após 20h da fertilização, foi expressa por:

$$(\text{n}^\circ \text{ de larvas} \times 100) / (\text{n}^\circ \text{ de larvas} + \text{ovos})$$

O modelo estatístico utilizado foi:

(Exp. 3A  $i = 1, 2, 3$  e  $4; j = 1, 2$  e  $3$ )

(Exp. 3B  $i = 1, 2, 3, 4$  e  $5; j = 1, 2$  e  $3$ )

(Exp. 3C  $i = 1, 2, 3$  e  $4; j = 1, 2, 3, 4$  e  $5$ )

(Exp. 3D  $i = 1$  e  $2; j = 1, 2, 3, 4$  e  $5$ )

$$Y_{ij} = \mu + T_i + B_j + (TB)_{ij} + e_{(ij)}$$

em que:

$Y_{ij}$  = taxa de motilidade espermática do sêmen que recebeu a criosolução i no bloco j;

$\mu$  = média geral;

$T_i$  = efeito da criosolução i;

$B_j$  = efeito do bloco j;

$(TB)_{ij}$  = efeito da interação entre a criosolução i e o bloco j;

$e_{(ij)}$  = erro associado à parcela que recebeu a criosolução i no bloco j.

Para os dados observados (taxa de motilidade espermática), o resíduo de cada modelo foi testado para distribuição normal. Os valores que não apresentaram essa distribuição foram transformados em arc seno  $\sqrt{X}$  para sua normalização. Então, os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5%, de probabilidade, utilizando-se o pacote computacional Sistema de Análise de Variância – SISVAR (Ferreira, 1999).

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Características seminais

As amostras de sêmen de dourado apresentaram coloração branca leitosa, ligeiramente amarelada e de pouca viscosidade. Os dados sobre o número de animais, peso vivo, pH, piracema (ano), exp/etapa, volume seminal e concentração espermática podem ser observados na Tabela 1.

TABELA 1: Dados referentes ao ano (piracema) em que cada experimento foi realizado, peso vivo, volume e pH do sêmen, concentração e motilidade espermática.

Peixes	Piracema (ano)	Experimento /etapa	Peso vivo (kg)	Volume (mL)	PH	Sptz x 10 <sup>9</sup> /mL	Motilidade (%)
1	2004/05	1A	6,0	10,1	--	3,2	100
2	2004/05	1A	3,0	11,4	--	5,5	100
3	2004/05	1A	3,6	13,0	--	5,4	100
4	2004/05	2A e 3A	3,4	13,0	--	5,75	85
5	2004/05	2A e 3A	5,0	17,0	--	5,25	90
6	2004/05	2A e 3A	3,0	13,2	--	9,15	80
7	2004/05	2B e 3B	3,2	18,0	--	6,8	90
8	2004/05	2B e 3B	2,9	11,0	--	4,4	90
9	2004/05	2B e 3B	3,1	8,0	--	6,2	80
10	2005/06	1B, 3C, 3D	2,6	14,1	7,2	4,3	100
11	2005/06	1B, 3C, 3D	2,7	10,7	7,9	8,05	100
12	2005/06	1B, 3C, 3D	2,5	12,6	7,8	4,8	95
13	2005/06	1B, 3C, 3D	2,1	9,4	8,2	5,85	100
14	2005/06	1B, 3C, 3D	3,0	17,0	8,2	7,55	100
Média ± DP			3,2±1,0	13,1±3,2	--	5,73±1,63	93±7

Sptz – espermatozoides, Mot. Inic – motilidade inicial

#### 3.2 Experimento 1 - Resfriamento do sêmen

Todos os diluidores testados, independentemente da taxa de diluição usada, foram capazes de manter taxas de motilidade espermática acima de 80%, imediatamente após diluição (Tabela 2). O sêmen *in natura* resfriado a 4°C e



não diluído apresentou taxas de motilidade espermática de 62% (etapa A) e 0% (etapa B), após o 1 dia de resfriamento. Das amostras diluídas, a maior taxa de motilidade após 1 dia de resfriamento foi observada quando o sêmen foi diluído em glicose 5%, nas proporções 1:2 e 1:5 (etapa B). Após 2 dias de resfriamento, foi observado que o sêmen diluído em glicose 5% 1:2, apresentou a maior taxa motilidade (etapa B) em relação às demais amostras.

TABELA 2. Motilidade espermática (expressa em %; média  $\pm$  desvio padrão; n=3 machos etapa A e n=5 machos etapa B) do sêmen de dourado armazenado a 4°C-6°C, em diferentes combinações de diluidores e taxas de diluição.

Etapas	Diluidores	Sêmen: volume total	Motilidade (%)			
			Dia 0	Dia 1	dia 2	dia 3
A	NaCl 154 mM	1:10	90 $\pm$ 13 <sup>a</sup>	5 $\pm$ 4 <sup>c</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	---
	NaCl 200 mM	1:10	100 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	22 $\pm$ 17 <sup>c</sup>	1 $\pm$ 1 <sup>a</sup>	---
	Saad <sup>1</sup>	1:10	98 $\pm$ 3 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>c</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	---
	Ginsburg F.R <sup>2</sup>	1:10	90 $\pm$ 17 <sup>a</sup>	1 $\pm$ 0 <sup>c</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	---
	Goldfish R. <sup>3</sup>	1:10	98 $\pm$ 3 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>c</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	---
	Kurokura <sup>4</sup>	1:10	93 $\pm$ 3 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>c</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	---
	Glicose 5%	1:10	83 $\pm$ 16 <sup>a</sup>	38 $\pm$ 29 <sup>b</sup>	2 $\pm$ 3 <sup>a</sup>	---
	Água de coco	1:10	85 $\pm$ 26 <sup>a</sup>	1 $\pm$ 2 <sup>c</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	---
	Sêmen <i>in natura</i>	---	100 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	62 $\pm$ 25 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	---
B	NaCl 154 mM	1:2	98 $\pm$ 4 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>b</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>b</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>
		1:5	97 $\pm$ 4 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>b</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>b</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>
		1:10	81 $\pm$ 37 <sup>b</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>b</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>b</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>
	NaCl 200 mM	1:2	97 $\pm$ 4 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>b</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>b</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>
		1:5	98 $\pm$ 4 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>b</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>b</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>
		1:10	82 $\pm$ 38 <sup>b</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>b</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>b</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>
	Glicose 5%	1:2	97 $\pm$ 4 <sup>a</sup>	60 $\pm$ 20 <sup>a</sup>	30 $\pm$ 20 <sup>a</sup>	14 $\pm$ 15 <sup>a</sup>
		1:5	99 $\pm$ 2 <sup>a</sup>	48 $\pm$ 13 <sup>a</sup>	7 $\pm$ 4 <sup>b</sup>	1 $\pm$ 2 <sup>a</sup>
		1:10	97 $\pm$ 4 <sup>a</sup>	2 $\pm$ 4 <sup>b</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>b</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>
	BTS <sup>®</sup> <sup>5</sup>	1:2	96 $\pm$ 9 <sup>a</sup>	15 $\pm$ 31 <sup>b</sup>	6 $\pm$ 13 <sup>b</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>
		1:5	99 $\pm$ 2 <sup>a</sup>	1 $\pm$ 2 <sup>b</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>b</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>
		1:10	98 $\pm$ 4 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>b</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>b</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>
	Sêmen <i>in natura</i>	---	99 $\pm$ 2 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>b</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>b</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup> Médias seguidas por letras diferentes, na mesma coluna e etapa, diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott (P<0,05).

<sup>1</sup> NaCl 200 mM + Tris

<sup>2</sup> NaCl 123,2 mM; KCl 3,75 mM; CaCl<sub>2</sub> 3,0 mM; NaHCO<sub>3</sub> 2,65 mM

<sup>3</sup> NaCl 125 mM; KCl 2,4 mM; MgCl<sub>2</sub> 1,9 mM; MgSO<sub>4</sub> 0,6 mM; CaCl 3,2 mM; glicose 5,6 mM e Hepes 0,95g

<sup>4</sup> NaCl 128,4 mM; KCl 2,7 mM; CaCl<sub>2</sub> 1,4 mM; NaHCO<sub>3</sub> 2,4 mM

<sup>5</sup> Glicose 80%, citrato de sódio 12,7%, EDTA 2,65%, sulfato de gentamicina 0,50%, NaHCO<sub>3</sub> 2,65%, KCl 1,5%

### **3.3 Experimento 2 – Seleção de crioprotetores e crioluções para o sêmen**

Durante a etapa A, foram testados três crioprotetores, DMSO, metil glicol e glicerol. O crioprotetor glicerol afetou negativamente a motilidade do sêmen imediatamente após diluição (0 h) e proporcionou as menores taxas de motilidade após 1 hora de resfriamento a 4°C (Tabela 3). Após 1 hora, foi observado que todas as amostras diluídas em meio contendo DMSO e a amostra diluída em Saad-metil glicol apresentaram as maiores taxas de motilidades espermáticas, sendo semelhantes àquelas observadas no sêmen *in natura* (controle).

Na etapa B, todas as amostras de sêmen testadas apresentaram motilidades acima de 60%, imediatamente após diluição (0 h). Após 1 hora de resfriamento, foi observado que a amostra diluída em Saad-metil glicol apresentou motilidade espermática inferior ( $P < 0,05$ ) à das amostras diluídas em meio contendo DMSO.

TABELA 3. Motilidade (%; média  $\pm$  desvio padrão; n= 3 machos) do sêmen de dourado diluído 1:10 (etapa A) e 1:5 (etapa B) em diferentes criosoluções (diluidores e crioprotetores), e armazenados a 4°C-6°C por 1 h.

Etapas	Crioprotetores (10%)	Diluidores	Motilidade (%)	
			0 h	1 h
A	DMSO	NaCl 154 mM	80 $\pm$ 13 <sup>a</sup>	58 $\pm$ 13 <sup>a</sup>
		NaCl 200 mM	80 $\pm$ 9 <sup>a</sup>	73 $\pm$ 14 <sup>a</sup>
		Saad <sup>1</sup>	60 $\pm$ 28 <sup>a</sup>	78 $\pm$ 6 <sup>a</sup>
		BTS <sup>®2</sup>	90 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	78 $\pm$ 8 <sup>a</sup>
	Metil glicol	NaCl 154 mM	38 $\pm$ 28 <sup>b</sup>	5 $\pm$ 3 <sup>b</sup>
		NaCl 200 mM	62 $\pm$ 33 <sup>a</sup>	32 $\pm$ 39 <sup>b</sup>
		Saad <sup>1</sup>	80 $\pm$ 9 <sup>a</sup>	73 $\pm$ 8 <sup>a</sup>
		BTS <sup>®2</sup>	60 $\pm$ 23 <sup>a</sup>	21 $\pm$ 14 <sup>b</sup>
	Glicerol	NaCl 154 mM	20 $\pm$ 5 <sup>b</sup>	0 $\pm$ 1 <sup>b</sup>
		NaCl 200 mM	38 $\pm$ 33 <sup>b</sup>	8 $\pm$ 14 <sup>b</sup>
		Saad <sup>1</sup>	25 $\pm$ 13 <sup>b</sup>	7 $\pm$ 1 <sup>b</sup>
		BTS <sup>®2</sup>	48 $\pm$ 35 <sup>b</sup>	0 $\pm$ 1 <sup>b</sup>
--	Sêmen <i>in natura</i>	85 $\pm$ 5 <sup>a</sup>	87 $\pm$ 6 <sup>a</sup>	
B	DMSO	NaCl 154 mM	68 $\pm$ 16 <sup>a</sup>	65 $\pm$ 18 <sup>a</sup>
	DMSO	NaCl 200 mM	72 $\pm$ 8 <sup>a</sup>	72 $\pm$ 10 <sup>a</sup>
	DMSO	Saad <sup>1</sup>	70 $\pm$ 10 <sup>a</sup>	72 $\pm$ 6 <sup>a</sup>
	DMSO	Glicose 5%	78 $\pm$ 8 <sup>a</sup>	77 $\pm$ 6 <sup>a</sup>
	DMSO	BTS <sup>®2</sup>	73 $\pm$ 6 <sup>a</sup>	70 $\pm$ 9 <sup>a</sup>
	Metil glicol	Saad	72 $\pm$ 13 <sup>a</sup>	52 $\pm$ 20 <sup>b</sup>
	--	Sêmen <i>in natura</i>	87 $\pm$ 6 <sup>a</sup>	83 $\pm$ 6 <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup> Médias seguidas por letras diferentes, na mesma coluna e etapa, diferem entre si (P<0,05; Scott-Knott)

<sup>1</sup> NaCl 200 mM + Tris

<sup>2</sup> Glicose 80%, citrato de sódio 12,7%, EDTA 2,65%, sulfato de gentamicina 0,50%, NaHCO<sub>3</sub> 2,65%, KCl 1,5%

### 3.4 Experimento 3 – Criopreservação do sêmen

A estabilização da temperatura no botijão de vapor de nitrogênio ocorreu a -172°C após o período de 270 segundos, gerando a velocidade de congelamento, entre 26°C a -172°C, de - 44,1°C min<sup>-1</sup>.

As motilidades espermáticas mais baixas ocorreram com a diluição de 1:10 nas várias criosoluções testadas, pós-descongelamento (etapa A; Tabela 4).

Na etapa B, não foi observada diferença significativa ( $P>0,05$ ) entre as criosoluções testadas. Na etapa C, foi observado que o sêmen diluído em glicose 5% e BTS<sup>®</sup> apresentaram as maiores motilidades espermáticas, pós-descongelamento. Na etapa D, foi observada taxa de eclosão de 23% e 17%, para as fertilizações realizadas com sêmen criopreservado em glicose 5% ou BTS<sup>®</sup>, respectivamente, não apresentando diferença ( $P>0,05$ ) entre si. A taxa de eclosão do sêmen fresco foi de 60%.

A proporção de espermatozoides/ovócito estimada para a fertilização foi de  $28,7 \times 10^5$  para o sêmen criopreservado e  $1,4 \times 10^5$  para o sêmen fresco.

TABELA 4. Motilidade e taxa de eclosão (%; média  $\pm$  desvio padrão; n=3 machos etapas A e B, n=5 machos etapas C e D) do sêmen de dourado criopreservado em diferentes diluidores contendo DMSO (10%) e em diferentes taxas de diluição (sêmen:volume total).

Diluidores	Motilidade (%)			Eclosão (%)
	A (1:10)	B (1:5)	C (1:5)	D (1:5)
NaCl 154 mM	16 $\pm$ 15 <sup>a</sup>	66 $\pm$ 16 <sup>a</sup>	45 $\pm$ 17 <sup>b</sup>	--
NaCl 200 mM	20 $\pm$ 9 <sup>a</sup>	53 $\pm$ 19 <sup>a</sup>	49 $\pm$ 7 <sup>b</sup>	--
Saad <sup>1</sup>	16 $\pm$ 15 <sup>a</sup>	45 $\pm$ 19 <sup>a</sup>	--	--
BTS <sup>®2</sup>	16 $\pm$ 15 <sup>a</sup>	47 $\pm$ 27 <sup>a</sup>	64 $\pm$ 4 <sup>a</sup>	17 $\pm$ 8 <sup>b</sup>
Glicose 5%	--	50 $\pm$ 29 <sup>a</sup>	61 $\pm$ 7 <sup>a</sup>	23 $\pm$ 8 <sup>b</sup>
Sêmen <i>in natura</i>	100 $\pm$ 0	98 $\pm$ 3	99 $\pm$ 2	60 $\pm$ 13 <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup> Médias seguidas por letras diferentes, na mesma coluna e etapa, diferem entre si ( $P<0,05$ ; Scott-Knott)

<sup>1</sup> NaCl 200 mM + Tris

<sup>2</sup> Glicose 80%, citrato de sódio 12,7%, EDTA 2,65%, sulfato de gentamicina 0,50%, NaHCO<sub>3</sub> 2,65%, KCl 1,5%

## 4 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

### **Resfriamento do sêmen**

O sêmen de peixes teleósteos pode ser armazenado com sucesso sob refrigeração, no estado líquido, por curtos períodos de tempo. A solução diluidora de glicose 5% preservou o sêmen de dourado por um período mais longo. Essa solução vem sendo utilizada com sucesso na criopreservação do sêmen de várias espécies de peixes, tais como curimatá, pacu, piapara, piracanjuba, dourado, surubim (Carolsfeld et al., 2003) e matrinxã (Silveira, 2000), embora não tenha sido testada no resfriamento.

No presente estudo, foi observado que as amostras de sêmen diluídas nas diversas soluções testadas apresentaram motilidade espermática acima de 80%, imediatamente após a diluição. Embora os diluidores Ginsburg Fish Ringer, Goldfish Ringer, Kurokura e água de coco tenham ativado a motilidade espermática (de 5% a 10% de motilidade) logo após a diluição, sendo, portanto, sendo descartados, algumas soluções como Kurokura, usadas inicialmente como diluidor de sêmen de carpa (Kurokura et al., 1984) e Ginsburg Fish Ringer, usada como diluidor de sêmen de bagre africano (Viveiros et al., 2000), foram testadas com sucesso como diluidores de sêmen em duas espécies brasileiras, o piau-açu e a piracanjuba. O sêmen de piau-açu *Leporinus macrocephalus*, foi resfriado por até 48 horas apresentando taxa de motilidade de 33% e 44% respectivamente, quando diluído nessas soluções, enquanto que o sêmen *in natura* apresentava motilidade de 2% (Moraes, 2004). Em piracanjuba, foi observada taxa de motilidade de 73% e 63%, após 10 horas de resfriamento, quando o sêmen foi diluído em Kurokura e em Ginsburg Fish Ringer respectivamente, valores que superaram ao observado no sêmen *in natura* (53%) (Maria, 2005).

Embora a água de coco seja tradicionalmente utilizada para a criopreservação de sêmen de caprino (Nunes, 1988), baixa motilidade foi observada quando utilizou-se esse diluidor em sêmen de dourado (no presente estudo), de piracanjuba (Bedore, 1999; Maria, 2005) e em de piau-açu (Moraes, 2004).

Após 1 dia a 4°C, etapa A, o sêmen *in natura* apresentou a maior taxa de motilidade espermática, entretanto, na etapa B, foi observado que o sêmen *in natura* não apresentava motilidade espermática. Possivelmente, a diferença observada entre a taxa de motilidade do sêmen *in natura*, etapas A e B, está relacionada com a época (início, meio ou fim da piracema) em que ele foi coletado.

Após 2 dias de resfriamento, foi observado que o sêmen diluído em glicose 5%, 1:2 (etapa B), apresentou a maior taxa de motilidade (30%) em relação ao sêmen não diluído (0%; *in natura*) e diluído em outras soluções (próximos de 0%). Segundo Marques (2001), em termos de aplicação prática, amostras de sêmen mantidas resfriadas e com motilidade de, pelo menos, 30% poderiam ser utilizadas com sucesso em procedimentos de desova induzida em laboratório. Após esse período, o sêmen apresentou motilidade ainda menor, não sendo, portanto, recomendável o resfriamento de sêmen de dourado por períodos superiores a 2 dias.

As soluções salinas simples testadas (NaCl 154 mM, NaCl 200 mM e Saad) não foram eficientes na preservação do sêmen armazenado a 4°C. Embora a solução de Saad tenha se mostrado ineficiente na preservação do sêmen de dourado, ela é comumente utilizada como solução imobilizadora de motilidade espermática do bagre Europeu (*Silurus glanis*), superando as propriedades ativadoras proporcionadas pela contaminação com água ou urina durante a coleta de sêmen (Linhardt et al., 1993). Além disso, o sêmen de piracanjuba foi

preservado com sucesso por até 7 dias a 4°C, quando diluído em soluções salinas de NaCl 200 mM e Saad, e na proporção 1:10 (Maria, 2005).

O diluidor BTS<sup>®</sup>, rotineiramente utilizado no resfriamento de sêmen de suíno, tem sido usado eficientemente na preservação (a 4°C) de sêmen de peixes. O sêmen de piracanjuba foi preservado por até 5 dias a 4°C, quando diluído em BTS<sup>®</sup> (Maria, 2005) e por até 6 dias a 4°C, quando diluído em BTS<sup>®</sup> acrescido de KCl ou de citrato de sódio (Murgas et al., 2004). No sêmen de dourado, esse diluidor não apresentou bons resultados quando testado no resfriamento.

Variações individuais de motilidade espermática foram observadas no presente trabalho e podem ter sido causadas por vários fatores, tais como: a) alta variabilidade genética individual nos reprodutores trabalhados; b) escala arbitrária de 0% a 100% (Fogli da Silveira et al., 1990), avaliação subjetiva, portanto, sujeito a erros de leitura por parte do pesquisador; c) mudanças nas condições aeróbias do sêmen preservado (Lahnsteiner et al., 1996); e d) proliferações de bactérias (Izaú et al., 2005) ou fungos (Rana, 1995).

### **Criopreservação do sêmen**

A velocidade de congelamento de células espermáticas pode variar de  $-5^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , no caso de sêmen bagre africano (Viveiros et al., 2000) a  $-100^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , no caso de touro (Woelders, 1997). No presente trabalho foi observada velocidade de congelamento, entre  $26,6^{\circ}\text{C}$  a  $-172^{\circ}\text{C}$ , de  $-44,1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , valores esses dentro dos limites recomendados por Harvey & Carolsfeld (1993) que são de  $-10^{\circ}\text{C}$  a  $-50^{\circ}\text{C min}^{-1}$ . Velocidades de congelamento de  $-45^{\circ}\text{C min}^{-1}$  (Carolsfeld et al., 2003) e  $-35,6^{\circ}\text{C min}^{-1}$  (Maria, 2005) foram observadas em trabalhos envolvendo criopreservação de sêmen de espécies nativas, quando utilizou-se o mesmo tipo de botijão de vapor de nitrogênio. O uso desse botijão proporcionou bons resultados no processo de congelamento do sêmen de

dourado. Vários autores têm obtido sucesso utilizando o botijão de vapor de nitrogênio, uma metodologia simples, barata e padronizada de congelamento de sêmen de peixes (Bedore, 1999; Carolsfeld & Harvey, 1999; Cruz, 2001; Ribeiro & Godinho, 2003; Maria, 2005).

As diluições utilizadas para criopreservação de sêmen de peixes variam de 1:2 a 1:10 (sêmen:volume total)(Harvey & Hoar, 1979). Em dourado, as motilidades espermáticas mais altas, após o descongelamento, ocorreram com a diluição 1:5, quando comparada à diluição 1:10. A diluição 1:5 está próxima às diluições utilizadas em curimba (Cóser et al., 1984), dourado (Cóser et al., 1984; Carolsfeld et al., 2003), piau (*Leporinus silvester*) (Cóser et al., 1987), piracanjuba (Bedore, 1999; Murgas et al., 2003) e matrinxã (Silveira, 2000).

Na criopreservação de sêmen de tilápia (*Sarotherodon mossambicus*), foi observado sinergismo entre crioprotetores (Harvey, 1983). Aparentemente, determinados crioprotetores agem melhor em algumas espécies do que em outras, de sorte que a seleção do melhor crioprotetor a ser testado pela primeira vez numa espécie deve ser feita em testes de tentativa e erro (Bedore, 1999). Assim, no presente estudo, o glicerol afetou negativamente a motilidade do sêmen imediatamente após diluição (0 h) e foi descartado.

Foi observado que as amostras diluídas em meio contendo DMSO, de maneira geral, apresentaram as maiores motilidades espermáticas, sendo semelhante àquela observada no sêmen não diluído. O crioprotetor metil glicol, quando combinado com a solução de Saad, proporcionou ao sêmen taxa de motilidade espermática semelhante àquela observada nas amostras diluídas em NaCl 154 mM, NaCl 200 mM, Saad e BTS<sup>®</sup>, acrescidos de DMSO e à do sêmen não diluído (exp. 2A). Entretanto, quando testaram-se novamente essas criosoluções (exp. 2B) na proporção 1:5, foi observado que somente a amostra diluída em Saad-metil glicol apresentou motilidade espermática inferior a 60%,



sendo descartada do experimento 3. Possivelmente, essa menor diluição tornou o crioprotetor metil glicol tóxico às células espermáticas do dourado, quanto comparado à diluição 1:10 e ter diminuído a motilidade espermática (exp. 2B, após 1h a 4°C). O metil glicol foi testado pela primeira vez como agente crioprotetor em sêmen de piracanjuba e dentre os crioprotetores testados, mostrou ser o mais indicado para a criopreservação do sêmen dessa espécie (Maria, 2005). Entretanto, para o sêmen de dourado, o melhor crioprotetor testado foi o DMSO, que já vem sendo usado na criopreservação do sêmen de várias espécies brasileiras, tais como piracanjuba (Bedore, 1999; Carolsfeld et al., 2003; Murgas et al., 2003), matrinxã (Silveira, 2000), curimatã, piapara, pacu e dourado (Carolsfeld et al., 2003).

Na criopreservação do sêmen de dourado, foi observado que o sêmen diluído em BTS<sup>®</sup> e glicose 5% apresentou as maiores motilidades espermáticas após o descongelamento (exp. 3C). Soluções complexas, como BTS<sup>®</sup>, que possui 80% de glicose na sua composição, têm sido cada vez mais utilizadas (Maria, 2005; Miliorini et al., 2005). No presente estudo, foi observado que amostras de sêmen criopreservadas em meio contendo BTS<sup>®</sup> apresentaram 64% de motilidade espermática, que é superior ( $P < 0,05$ ) à das amostras criopreservadas em soluções salinas (45% e 49% para NaCl 154 e 200 mM, respectivamente; exp. 3C). Entretanto, foi observado que amostras de sêmen de dourado diluídas em solução simples de glicose 5% apresentaram motilidade espermática (61%) semelhante à daquelas amostras diluídas em BTS<sup>®</sup>. Sucessos têm sido obtidos na criopreservação do sêmen de espécies de piracema utilizando-se criosoluções constituídas de glicose 5% e DMSO, como curimatã (Cruz, 2001; Carolsfeld et al., 2003), matrinxã (Silveira, 2000), piracanjuba (Bedore, 1999; Carolsfeld et al., 2003), pacu-caranha (Bedore, 1999; Carolsfeld et al., 2003), dourado e piapara (Carolsfeld et al., 2003).

Esse é o primeiro relato sobre a proporção de espermatozoides/ovócito utilizado em fertilidade com sêmen de dourado. Geralmente, a relação espermatozoides/ovócito utilizada é alta e varia com a espécie. Para o sêmen descongelado, essa relação deve ser ainda maior, pois, os processos de congelamento e descongelamento provocam grande mortalidade dos espermatozoides, além de danificarem as estruturas celulares (membrana celular, peça intermediária e flagelo), incapacitando-os para a fertilização (Martinez & Ekwall, 1998). No presente estudo, o sêmen de dourado criopreservado foi diluído 10 vezes e o sêmen fresco 200 vezes, obtendo-se relações de espermatozoides/ovócito de  $28,7 \times 10^5$  para sêmen criopreservado e  $1,4 \times 10^5$  para sêmen fresco. Em piracanjuba, Maria (2005) utilizou as relações 46 e  $4,6 \times 10^5$  espermatozoides/ovócito, para sêmen criopreservado e sêmen fresco, respectivamente. Entretanto em matrinxã, Silveira (2000) utilizou as relações médias de 3,1 e  $2,8 \times 10^5$  espermatozoides/ovócito para sêmen criopreservado e sêmen fresco, respectivamente.

A fertilização no presente trabalho foi realizada utilizando-se água do próprio tanque dos reprodutores, como solução ativadora. Em piracanjuba, e durante os trabalhos conduzidos com a fertilização de ovócito por sêmen criopreservado, foi observado que a utilização da água do tanque como solução ativadora da motilidade espermática proporcionou as maiores taxas de eclosão, quando comparada à solução de NaCl 50 mM (Maria, 2005). Em ciprinídeos, foram observadas taxas de fertilidades mais elevadas quando utilizou-se a água do tanque dos reprodutores como solução ativadora, do que quando utilizaram-se soluções de NaCl (12,5 e 50 mM) e KCl/MgSO<sub>4</sub> (Lahnsteiner et al., 2003). No dourado, não foi observada diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre as taxas de eclosão, quando foi utilizado sêmen criopreservado. O sêmen fresco proporcionou taxa de eclosão de 60%, enquanto que o sêmen criopreservado em BTS<sup>®</sup>-DMSO ou em glicose 5%-DMSO proporcionou taxas de eclosão de 17%

e 23%, respectivamente. Silveira (2000), trabalhando com matrinxã observou taxa de eclosão de 31% para o sêmen criopreservado em glicose 5%, DMSO e gema de ovo e de 45% para o sêmen fresco. Maria (2005) observou taxas de eclosão de 66% e 58%, quando foi utilizado sêmen de piracanjuba criopreservado em BTS<sup>®</sup> e metil glicol (10%) ou NaCl 154 mM, metil glicol e gema de ovo, respectivamente e 86% quando utilizou sêmen fresco.

Com base nas observações no presente estudo, pode-se concluir que o sêmen de dourado pode ser preservado a 4°C, por até 2 dias, quando diluído em glicose 5%, na proporção 1:2 e criopreservado em BTS<sup>®</sup>-DMSO ou em glicose 5%-DMSO, na proporção 1:5.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEDORE, A. G. **Característica e conservação do sêmen de Pacu-Caranha (*Piaractus mesopotamicus*) e de Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)**. 1999. 53 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

BILLARD, R.; COSSON, M. P. Some problems related to the assesment of sperm motility in freshwater fish. **The Journal of Experimental Zoology**, New York, v. 261, n. 2, p. 122-131, Feb. 1992.

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

CAROLSFELD, J.; HARVEY, B. Conservação de recursos genéticos de peixes: teoria e prática. **Curso de Treinamento Brasileiro**. Tradução de H. P> Godinho. Victoria, Canadá: World Fisheries Trust, 1999. 47 p.

CAROLSFELD, J.; HARVEY, B.; FOGLI DA SILVA, W.; KAVAMOTO, E. T.; RAMOS, S. M.; SILVEIRA, A. N. Criopreservação do sêmen do pacu, *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887. **Boletim Técnico CEPTA**, Pirassununga, v. 3, p. 1-4, 1990.

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. 141 p.

CÓSER, A. M.; GODINHO, H.; RIBERIO, D. M. Cryogenic preservation of spermatozoa form *Prochilodus scrofa* and *Salminus maxillosus*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 37, n. 4, p. 387-390, 1984.

CÓSER, A. M.; GODINHO, H.; TORQUATO, V. C. Criopreservação de sêmen do peixe, piau, *Leporinus silvestrii* (Boulenger, 1902). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 39, n. 1, p. 37-42, jan. /fev. 1987.

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

FERREIRA, D. F. **Sistema de análise de variância (SISVAR)**. Lavras: Universidade federal de Lavras, 1999. ver. 4.3 (Build 43).

FOGLI DA SILVA, W.; KAVAMOTO, E. T.; CESTAROLLI, M. A.; GODINHO, H. M.; SILVEIRA, A. N. Avaliação espermática, preservação criogênica e fertilidade do sêmen do pacu, *Piaractus mesopotâmicus* (Holmberg, 1887), proveniente de reprodução induzida. **Boletim da Indústria da Pesca**, São Paulo, v. 17, p. 1-13, 1990.

HARVEY, B. Cryopreservation of *Sarotherodon mossambicus* spermatozoa. **Aquiculture**, Amsterdam, v. 32, n. 3/4, p. 313-320, 1983.

HARVEY, B.; CAROLSFELD, J. **Induced breeding in tropical fish culture**. Ottawa: International Development Research Centre, 1993.

HARVEY, B. J.; HOAR, W. **The theory and practice of induced breeding in fish**. Ottawa: International Development Research Centre, 1979.

IZAÚ, Z. A.; VIVEIROS, A. T. M.; FIGUEIREDO, H. C. P.; MARIA, A. N.; OLIVEIRA, A. V. Relação entre crescimento bacteriano e motilidade espermática durante o resfriamento em piracanjuba (*Pisces *Bruycon orbignianus**). In: CONGRESSO DOS PÓS-GRADUANDOS DA UFLA, 14., 2005, Lavras, MG. **Anais...** Lavras, MG, 2005.

KAVAMOTO, E. T.; FOGLI DA SILVA, W. F.; GODINHO, H. M.; ROMAGOSA, E. Conservação em nitrogênio líquido do sêmen de *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881. **Boletim Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 16 p. 29-36, 1989.

KUROKURA, H.; HIRANO, R.; TOMITA, M.; IWAHASHI, M. Cryopreservation of carp sperm. **Aquaculture Research**, Amsterdam, v. 31, n. 3, p. 245-258, 1984.

LAHNSTEINER, F.; BERGER, B.; WEISMANN, T. Effects of media, fertilization technique, extender, straw volume, and sperm to egg ratio on hatchability of cyprinid embryos, using cryopreserved semen. **Theriogenology**, Woburn, v. 60, n. 5, p. 829-841, Sept. 2003.

LAHNSTEINER, F.; BERGER, B.; WEISMANN, T.; PATZNER, R. A. The influence of various cryoprotectants on semen quality of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) before and after cryopreservation. **Journal of Applied Ichthyology**, Berlin, v. 12, n. 2, p. 99-106, July 1996.

LINHARDT, O.; BILLART, R.; PROTEAU, J. P. Cryopreservation of European catfish (*Silurus glanis* L.) spermatozoa. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 115, n. 3/4, p. 347-359, Sept. 1993.

MARIA, A. N. **Diluidores e crioprotetores no resfriamento e congelamento do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)**. 2005. 71 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MARQUES, S. **Preservação a curto prazo do sêmen de teleosteos neotropicais de água doce**. 2001. 83 p. Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte.

MARTINEZ, H. R.; EKWALL, H. Electron microscopy in the in the assesment of cryopreserved spermatozoa viability. **The American Microscopy and Analysis**, p. 11-13, May 1998.

MILIORINI, A. B.; MURGAS, L. D. S.; PEREIRA, G. J. M. Taxas de fertilização do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) após o congelamento. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16., Goiânia, GO. **Anais...** Goiânia, GO, 2005.

MORAES, G. F. **Resfriamento e congelamento do sêmen de piau-açu (*Leporinus macrocephalus*)**. 2004. 68 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG .

MURGAS, L. D. S.; FRANCISCATO, R. T.; SANTOS, A. G. O. Avaliação espermática pós-descongelamento em piracanjuba (*Brycon orbignyauns*, Valenciennes, 1849). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 32, n. 6, p. 1810-1814, 2003. Suplemento 2.

MURGAS, L. D. S.; MILIORINI, A. B.; FRANCISCATO, R. T.; MARIA, A. N. Viabilidade espermática do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) resfriado a 4°C. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 33, n. 6, p. 1361-1365, nov. /dez. 2004. Suplemento 2.

NUNES, J. F. Água de coco na inseminação artificial. **Cabra & Bodes**, Belo Horizonte, v. 4, n. 19, p. 17-19, 1988.

ÓRFÃO, L. H.; VIVEIROS, A. T. M. Criopreservação do sêmen do osteíctio dourado, *Salminus maxillosus*. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO

CIENTÍFICA DA UFLA – CICESAL, 17., 2004, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2004

RANA, K. Presevation of gametes. In: BROMAGE, N. R.; ROBERTS, R. J. (Ed.). **Broodstock management and egg and larval quality**. London: Blackwell Science, 1995. p. 53-75.

RIBEIRO, R. I. M. A.; GODINHO, H. P. Criopreservação do sêmen testicular do teleosteo piau-açu *Leporinus macrocephalus*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 55, n. 1, p. 75-79, jan./fev. 2003

SILVA, E. B. **Avaliação comparativa da utilização do sêmen criopreservado e fresco na fertilização dos óvulos de curimatã *Prochilodus lineatus***. 2000. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SILVEIRA, A. N. **Caracterização espermática, preservação criogênica do sêmen e fertilidade do matrinxã, (*Brycon cephalus*)**. 2000. 45 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

SILVEIRA, W. F.; KAVAMOTO, E. T.; CESTAROLLI, M. A.; GODINHO, H. M.; RAMOS, S. M.; SILVEIRA, A. N. Avaliação espermática, preservação criogênica e fertilidade do sêmen do pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), proveniente de reprodução induzida. **Boletim Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 17, p. 1-33, 1990. Único.

VIVEIROS, A. T. M.; SO, N.; KOMEN, J. Sperm Cryopreservation of African Catfish (*Clarias gariepinus*) Cryoprectants, Freezing Rates and sperm: Egg Diluition Ratio. **Theriogenology**, New York, v. 54, n. 9, p. 1305-1308, Dec. 2000.

WOELDERS, H. Fundamentals and recent development in cryopreservation of bull and boar semen. **The Veterinarian Quartely**, Utrecht, v. 19, n. 3, p. 135-138, Sept. 1997.

## **CAPÍTULO 3**

### **RESFRIAMENTO E CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN DE PIRAPITINGA (PISCES: *Brycon nattereri*)**



## RESFRIAMENTO E CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN DE PIRAPITINGA (PISCES: *Brycon nattereri*)

### RESUMO

O objetivo do trabalho foi desenvolver um protocolo eficiente para a preservação do sêmen de Pirapitinga (*Brycon nattereri*) a curto e longo prazos, por meio dos processos de resfriamento (4-6°C) e criopreservação. Os trabalhos foram realizados em junho de 2005. O sêmen foi coletado, resfriado e congelado, utilizando-se reprodutores da estação de Piscicultura da CEMIG (Companhia Energética de Minas Gerais), unidade de Itutinga e avaliados no departamento de Zootecnia da UFLA. Foram utilizados 8 machos e o sêmen de cada um foi coletado separadamente em tubos de ensaio graduados e mantido em banho de gelo até a execução dos experimentos. No experimento 1, foram avaliados os diluidores NaCl 154 mM, NaCl 200 mM, Saad e BTS<sup>®</sup> quanto à sua capacidade de preservar a motilidade espermática durante o resfriamento por até 7 dias. A taxa de diluição usada foi de 1:10 (sêmen:volume total) e a motilidade espermática ativada com solução de NaCl 50 mM. No experimento 2, foi avaliado o efeito das criosoluções (diluidor+crioprotetor) na criopreservação do sêmen de pirapitinga. Foram testados cinco diluidores (NaCl 154 mM, NaCl 200 mM, Saad, glicose e BTS<sup>®</sup>) e dois crioprotetores (DMSO – dimetilsulfóxido e metil glicol), totalizando dez tratamentos. O sêmen foi, então, dividido, diluído, envasado em palhetas de 0,5 mL, congelado em botijão de vapor de nitrogênio (Taylor-Warton, modelo CP 300 "dry shipper") por 24h e armazenado em nitrogênio líquido a -196°C. O descongelamento foi realizado em banho-maria, a 60°C, por 8 segundos e a motilidade espermática imediatamente avaliada em microscópio óptico. No experimento 3, foram avaliados o efeito do volume da palheta (0,25 x 0,5 mL) na criopreservação do sêmen e o efeito da temperatura de descongelamento (60°C ou 50°C) sobre a motilidade espermática. As melhores criosoluções testadas no experimento 2 (NaCl 154 mM ou BTS<sup>®</sup>, acrescidas de metil glicol, e NaCl 200 mM ou Saad, acrescidos de DMSO), foram utilizadas neste experimento. No experimento 1, o sêmen diluído em BTS<sup>®</sup> apresentou motilidade espermática de 48%, após 7 dias de resfriamento, proporcionando o melhor resultado do resfriamento, enquanto que o sêmen *in natura* (não diluído) e o sêmen diluído em NaCl 154 mM, NaCl 200 mM e Saad, apresentaram motilidade espermática acima de 30% somente até o 3º dia de resfriamento. No experimento 2, o sêmen criopreservado em NaCl 154 mM-metil glicol, BTS<sup>®</sup>-metil glicol, NaCl 200 mM-DMSO e Saad-DMSO, apresentaram taxas de motilidade espermática acima de 68%, pós-descongelamento. No experimento 3, não houve diferença entre o volume das palhetas usadas no processo de congelamento do sêmen e nem entre as

temperaturas de descongelamento, mas foi observada diferença entre os meios criodiluidores. O sêmen diluído em BTS<sup>®</sup>-metil glicol apresentou motilidades espermáticas superiores ao sêmen diluído em NaCl 154 mM-metil glicol e NaCl 200 mM-DMSO. Concluiu-se que o sêmen de pirapitinga poder ser resfriado por até 7 dias a 4°C, quando diluído em BTS<sup>®</sup> e criopreservado na criosolução BTS<sup>®</sup>-metil glicol, a uma taxa de diluição 1:10.

Palavras chaves: diluidores, crioprotetores, motilidade, sêmen

## 1 INTRODUÇÃO

A pirapitinga ou parpitinga (*Brycon nattereri*) é um peixe de porte médio, que pode atingir de 40 a 50 cm de comprimento e apresenta dorso escuro e nadadeiras amareladas. Em geral, o macho é sensivelmente menor e possui aspereza da nadadeira anal, resultante de pequenas espículas que aparecem na época da reprodução. Essa espécie se reproduz nos meses frios e em águas rasas. A sua utilização na piscicultura vem sendo estudada na Estação de Pesquisa e Desenvolvimento Ambiental de Volta Grande – CEMIG. A espécie não é mais encontrada em várias seções do rio Grande, devido às alterações ocorridas em seu hábitat (CEMIG/CETEC, 2000), tais como a destruição das matas ciliares, poluição dos rios e construção de barragens e hidrelétricas. Esses fatores aliados à pesca predatória, incluem a pirapitinga na lista nacional das espécies ameaçadas de extinção.

A preservação de sêmen a curto prazo consiste em manter viabilidade espermática por um período de horas ou dias, em temperaturas de refrigeração, para serem utilizados posteriormente na fertilização, podendo facilitar o manejo por dispensar a presença do macho no ato da fecundação e também aumentar a eficiência da reprodução artificial nas estações de pisciculturas. Porém, alguns cuidados são determinantes para o sucesso do resfriamento, tais como redução da temperatura, fornecimento e troca de gases, prevenção do desenvolvimento bacteriano e prevenção da dissecação (Stoss & Donaldson, 1982).

Alguns pesquisadores têm resfriado sêmen de espécies do gênero *Brycon*, com sucesso. O sêmen de piabanha *B. insignis* foi resfriado com sucesso por até 6 h (Shimoda, 2004), o de matrinxã *B. lundii* e piracanjuba *B. orbignyanus* por até 14 h (Marques, 2001). Em outro estudo, o sêmen de piracanjuba foi resfriado por até 7 dias apresentando taxas de motilidade acima de 37% (Maria, 2005).

No que se refere a criopreservação de sêmen de peixes, diversas metodologias têm sido testadas em diferentes espécies de peixe, embora os graus de sucesso sejam muito variáveis. A criopreservação em nitrogênio líquido constitui a forma viável de manutenção dos gametas masculinos por longos períodos. Também é considerada uma estratégia eficaz para a conservação do patrimônio genético de peixes brasileiros, por meio de possíveis bancos genéticos. Alguns trabalhos experimentais envolvendo criopreservação de sêmen de espécies de peixes em extinção e nativos têm sido descritos. Em briconideos, já foram descritos protocolos efetivos para a criopreservação do sêmen de piracanjuba (Bedore, 1999; Carolsfeld et al., 2003; Murgas et al., 2004; Maria, 2005) e piabanha (Shimoda, 2004). Após extensa revisão de literatura, não foi possível encontrar relatos de um protocolo para a criopreservação do sêmen de pirapitinga.

Com a finalidade de melhorar a reprodução e evitar que essa espécie seja extinta, objetivou-se, neste trabalho, desenvolver um protocolo de preservação do sêmen de pirapitinga (*B. nattereri*) a curto prazo, pelo processo de resfriamento, e a longo prazo, por meio do processo de congelamento.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Procedência dos reprodutores e coleta do sêmen

O trabalho foi desenvolvido em julho de 2005, quando foram utilizados 8 machos (200 a 400g) de pirapitinga *Brycon nattereri*, da Estação de Piscicultura da Companhia Energética de Minas Gerais (CEMIG) unidade Itutinga. Os machos que apresentaram sêmen sob leve pressão abdominal receberam dosagem única de extrato de hipófise de carpa (5 mg/kg peso corporal), intramuscular. Após 8 horas da aplicação, o sêmen foi coletado diretamente em tubos estéril. Imediatamente após a coleta, uma amostra de sêmen de cada macho foi observada sob microscópio óptico e aquelas que apresentavam motilidade (auto-ativação) por contaminação por água ou urina foram descartadas. O sêmen de cada macho foi coletado separadamente em tubos de ensaios graduados e armazenados a 4°C, para a execução dos trabalhos. Do sêmen coletado de cada macho, amostras foram retiradas e utilizadas no resfriamento e na criopreservação. As amostras foram transportadas para o Departamento de Zootecnia da UFLA, onde foram analisadas.

### 2.2 Avaliação seminal

Após a coleta do sêmen, foram verificadas as seguintes características seminais: volume de sêmen; concentração espermática estimada por meio de uma câmara hematimétrica Neubauer “Improved”; motilidade espermática avaliada subjetivamente por somente um técnico, por meio de microscópio óptico e estimada em porcentagem de espermatozóides móveis em relação ao total observado, após ativação de uma parte de sêmen para 5 partes de NaCl 50 mM (Maria, 2005).

### **2.3 Experimento 1 – Resfriamento do sêmen**

O experimento foi conduzido em um delineamento em blocos casualizados com parcela subdividida. O sêmen de cada um dos machos (n=4) foi diluído, 1:10 (sêmen:volume total) em um dos seguintes diluidores:

1. NaCl 154 mM (solução fisiológica de NaCl 0,9%; Maria, 2005);
2. NaCl 200 mM (Maria, 2005);
3. Solução imobilizadora de Saad (NaCl 200,0 mM + Tris; Linhart et al., 1993);
4. BTS<sup>®</sup> (Beltsville Thawing Solution, Minitub (%): glicose 80,0; citrato de sódio 12,7; EDTA 2,7; NaHCO<sub>3</sub> 2,7; KCl 1,5; sulfato de gentamicina 0,5; Maria, 2005);
5. Controle: sêmen *in natura*, sem diluição.

Cada tratamento foi mantido em um tubo de ensaio de 5 mL, devidamente identificado e armazenado na geladeira a 4-6°C. A motilidade espermática foi avaliada 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 dias após a diluição, conforme descrito para o sêmen fresco.

### **2.4 Experimento 2 - Criopreservação do sêmen: criosoluções**

Neste experimento foi analisado o efeito de diferentes criosoluções (diluidores + crioprotetores) sobre a motilidade do sêmen descongelado.

O experimento foi conduzido em um delineamento em blocos casualizados. O sêmen de cada um dos machos (n=4) foi diluído em uma das combinações de cinco diluidores (NaCl 154 mM, NaCl 200 mM, Saad, BTS<sup>®</sup> e glicose 5%) e dois crioprotetores a 10%, dimetilsulfóxido (DMSO) e metil glicol, totalizando 10 tratamentos (5 diluidores x 2 crioprotetores). O sêmen diluído foi envasado em palhetas (Minitub do Brasil<sup>®</sup>) de 0,5 mL (n=4 palhetas por criosolução por macho), vedadas com esfera plástica, acondicionada em raques e congeladas em vapor de nitrogênio (Taylor-Warton, modelo CP 300,

“dry shipper”) por um período de 24 h. Em seguida, as palhetas foram transferidas para o nitrogênio líquido e armazenadas. O descongelamento das palhetas foi realizado em banho-maria, a 60°C por 8 segundos (Maria, 2005). A motilidade espermática foi avaliada imediatamente após o descongelamento.

### **2.5 Experimento 3 - Criopreservação do sêmen: volume da palheta e temperatura de descongelamento**

O experimento foi conduzido em um delineamento em blocos casualizados. O sêmen de cada um dos machos (n=4) foi diluído (1:10) nas quatro criosoluções selecionadas a partir do experimento 2: NaCl 200 mM-DMSO, Saad-DMSO, NaCl 154 mM-metil glicol e BTS<sup>®</sup>-metil glicol. Após a diluição, o sêmen foi envasado em palhetas de 0,25 mL (n=6 palhetas) e 0,5 mL (n=6 palhetas) e congelado de acordo com a metodologia descrita no experimento anterior. Três palhetas de cada volume para cada criosolução, foram descongeladas em banho-maria em uma das duas temperaturas testadas (50 ou 60°C) por 8 segundos. O arranjo fatorial utilizado foi 4 x 2 x 2 (4 criosoluções, 2 volumes de palhetas e 2 temperaturas de descongelamento). A motilidade foi avaliada imediatamente após o descongelamento.

Para os dados observados (taxa de motilidade espermática), o resíduo de cada modelo foi testado para distribuição normal. Os valores que não apresentaram essa distribuição foram transformados em arc seno  $\sqrt{X}$  para sua normalização. Então, os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5%, de probabilidade, utilizando-se o pacote computacional Sistema de Análise de Variância – SISVAR (Ferreira, 1999).

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Características seminais

O sêmen de pirapitinga apresentou coloração branca e pouca viscosidade. Os dados sobre o número de animais, peso vivo, volume seminal, motilidade inicial e concentração espermática podem ser observados na Tabela 1.

TABELA 1: Dados referentes ao número e peso vivo dos machos, volume, motilidade inicial e concentração espermática do sêmen de pirapitinga utilizado no presente trabalho.

Peixes (n)	Exp.	Peso vivo (g)	Volume (mL)	Sptz x 10 <sup>9</sup> /mL	Motil. (%)
1	1 e 2	250	8,8	26,8	100
2	1 e 2	330	8,2	43,2	95
3	1 e 2	300	7,7	27,8	95
4	1 e 2	230	7,0	30,9	100
5	3	350	5,5	27,5	100
6	3	320	9,0	29,3	100
7	3	400	8,0	25,1	95
8	3	300	6,9	29,7	95
Média ± DP		310 ± 50	7,6 ± 1,1	30,0 ± 5,6	98 ± 3

#### 3.2 Experimento 1 – Resfriamento do sêmen

Todos os diluidores testados foram capazes de manter a motilidade espermática imediatamente após a diluição (dia 0), como pode ser observado pelos dados da Tabela 1. A motilidade espermática de todas as amostras (diluídas ou não) declinou à medida em que o tempo de armazenamento aumentou. Após o 1º dia de resfriamento, as amostras diluídas em BTS® apresentaram motilidade espermática superior ( $P < 0,05$ ) às amostras diluídas em NaCl 154 mM, NaCl 200 mM e Saad, porém, semelhante ao sêmen *in natura* (não diluído). A partir do 2º dia de resfriamento (dados não apresentados), até o 7º dia, foi observado que amostras de sêmen diluídas em BTS® apresentaram



motilidades espermáticas superiores ( $P < 0,05$ ), também, ao sêmen *in natura*. As amostras diluídas em BTS<sup>®</sup> apresentaram motilidade espermática acima de 80%, por até 3 dias não havendo diferença ( $P > 0,05$ ) entre estes períodos de resfriamento.

TABELA 2. Motilidade (%; média  $\pm$  desvio padrão; n=4 machos) do sêmen de pirapitinga diluído em diferentes soluções e armazenado a 4-6°C por até 7 dias.

Diluidores	Motilidade espermática (%)				
	dia 0	dia 1	dia 3	Dia 5	Dia 7
NaCl 154 mM	98 $\pm$ 5 <sup>aA</sup>	73 $\pm$ 15 <sup>bB</sup>	49 $\pm$ 15 <sup>bC</sup>	2 $\pm$ 2 <sup>bD</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>bD</sup>
NaCl 200 mM	94 $\pm$ 5 <sup>aA</sup>	73 $\pm$ 10 <sup>bB</sup>	48 $\pm$ 17 <sup>bC</sup>	6 $\pm$ 6 <sup>bD</sup>	1 $\pm$ 1 <sup>bD</sup>
Saad <sup>1</sup>	96 $\pm$ 5 <sup>aA</sup>	81 $\pm$ 8 <sup>bA</sup>	39 $\pm$ 19 <sup>bB</sup>	7 $\pm$ 7 <sup>bC</sup>	3 $\pm$ 2 <sup>bC</sup>
BTS <sup>®2</sup>	98 $\pm$ 5 <sup>aA</sup>	98 $\pm$ 3 <sup>aA</sup>	88 $\pm$ 3 <sup>aA</sup>	70 $\pm$ 4 <sup>aB</sup>	48 $\pm$ 6 <sup>aC</sup>
Sêmen <i>in natura</i>	100 $\pm$ 0 <sup>aA</sup>	93 $\pm$ 3 <sup>aA</sup>	39 $\pm$ 20 <sup>bB</sup>	7 $\pm$ 7 <sup>bC</sup>	2 $\pm$ 2 <sup>bC</sup>

<sup>a,A</sup> Médias seguidas por letras superescritas (minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas) diferentes indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ ); pelo teste Scott-Knott.

<sup>1</sup> NaCl 200 mM + Tris

<sup>2</sup> Beltsville Thawing Solution, Minitub<sup>®</sup> contendo glicose 80%; citrato de sódio 12,7%; EDTA 2,7%; sulfato de gentamicina 0,5%; NaHCO<sub>3</sub> 2,7%; KCl 1,5%

### 3.3 Experimento 2 - Criopreservação do sêmen: crioluções

Foi observado efeito interativo entre diluidor e crioprotetor sobre a motilidade espermática (Tabela 2). Dentre as amostras criopreservadas em meio contendo DMSO, o sêmen diluído em NaCl 200 mM e Saad apresentaram taxas de motilidade pós-descongelamento superiores ao sêmen diluído em NaCl 154 mM, BTS<sup>®</sup> e glicose 5%. Por outro lado, dentre as amostras criopreservadas em metil glicol, os diluidores que proporcionaram as maiores taxas de motilidade foram NaCl 154 mM e BTS<sup>®</sup>.

TABELA 3. Motilidade (%; média  $\pm$  desvio padrão; n=4 machos; n=4 palhetas por criosolução) do sêmen de pirapitinga criopreservado em diferentes criosoluções.

Diluidores	Crioprotetores (10%)	
	DMSO	Metil glicol
NaCl 154 mM	51 $\pm$ 8 <sup>bB</sup>	68 $\pm$ 11 <sup>aA</sup>
NaCl 200 mM	68 $\pm$ 2 <sup>aA</sup>	57 $\pm$ 12 <sup>bB</sup>
Saad <sup>1</sup>	72 $\pm$ 7 <sup>aA</sup>	45 $\pm$ 9 <sup>bB</sup>
BTS <sup>®2</sup>	39 $\pm$ 10 <sup>cB</sup>	72 $\pm$ 1 <sup>aA</sup>
Glicose 5%	32 $\pm$ 8 <sup>cB</sup>	49 $\pm$ 16 <sup>bA</sup>

<sup>a-c</sup> Médias seguidas por letras superescritas minúsculas (nas colunas) e maiúsculas (nas linhas) diferentes indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ ), pelo teste Scott-Knott.

<sup>1</sup> NaCl 200 mM+Tris

<sup>2</sup> Beltsville Thawing Solution, Minitub<sup>®</sup> contendo glicose 80%; citrato de sódio 12,7%; EDTA 2,65%; sulfato de gentamicina 0,50%; NaHCO<sub>3</sub> 2,65%; KCl 1,5%.

### 3.4 Experimento 3 - Criopreservação do sêmen: volume da palheta e temperatura de descongelamento

A análise de variância para motilidade espermática mostrou não haver diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre os dois volumes de palhetas utilizados no congelamento (Tabela 3) e nem entre as duas temperaturas de descongelamento testadas (Tabela 4). Entretanto, foi observada diferença ( $P < 0,05$ ) entre as criosoluções testadas. O sêmen criopreservado em BTS<sup>®</sup>-metil glicol, apresentou motilidade espermática de 66%, sendo superior ( $P < 0,05$ ) às motilidades observadas no sêmen criopreservado em NaCl 154 mM-metil glicol (54%) ou NaCl 200 mM-DMSO (51%). O sêmen criopreservado em Saad-DMSO apresentou motilidade espermática (59%) semelhante ( $P > 0,05$ ) ao sêmen criopreservado nas outras criosoluções.

TABELA 4. Motilidade (%; média  $\pm$  desvio padrão; n=4 machos) do sêmen de pirapitinga criopreservado em diferentes criosoluções, envasado em palhetas de 0.25 ou em 0.5 mL (n=3 palhetas de cada volume por criosolução), e descongelado a 60°C por 8 segundos.

Criosoluções		Palhetas (mL)	
Diluidores	Crioprotetores	0,25	0,5
NaCl 154 mM	Metil glicol	57 $\pm$ 11	51 $\pm$ 13
NaCl 200 mM	DMSO	47 $\pm$ 11	56 $\pm$ 8
Saad <sup>1</sup>	DMSO	59 $\pm$ 7	59 $\pm$ 8
BTS <sup>®2</sup>	Metil glicol	67 $\pm$ 11	66 $\pm$ 11

Não houve diferença significativa (P>0,05).

<sup>1</sup> NaCl 200 mM+Tris

<sup>2</sup> Beltsville Thawing Solution, Minitub<sup>®</sup> contendo glicose 80%; citrato de sódio 12,7%; EDTA 2,65%; sulfato de gentamicina 0,50%; NaHCO<sub>3</sub> 2,65%; KCl 1,5%.

TABELA 5. Motilidade (%; média  $\pm$  desvio padrão; n=4 machos) do sêmen de pirapitinga, criopreservado em diferentes criosoluções, envasado em palhetas de 0.5 mL (n=6 palhetas por criosolução), e descongelado a 50° ou 60°C por 8 segundos.

Criosoluções		Temperatura de descongelamento(°C)	
Diluidores	Crioprotetores	50	60
NaCl 154 mM	Metil glicol	51 $\pm$ 15	57 $\pm$ 8
NaCl 200 mM	DMSO	53 $\pm$ 13	50 $\pm$ 8
Saad <sup>1</sup>	DMSO	62 $\pm$ 6	56 $\pm$ 8
BTS <sup>®2</sup>	Metil glicol	66 $\pm$ 11	67 $\pm$ 9

Não foi observada diferença significativa (P>0,05), pelo teste Scott-Knott.

<sup>1</sup> NaCl 200 mM+Tris

<sup>2</sup> Beltsville Thawing Solution, Minitub<sup>®</sup> contendo glicose 80%; citrato de sódio 12,7%; EDTA 2,65%; sulfato de gentamicina 0,50%; NaHCO<sub>3</sub> 2,65%; KCl 1,5%.

## 4 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

### **Diluidores e taxa de diluição no resfriamento do sêmen**

A taxa de diluição 1:10 (sêmen: volume total) proporcionou altas motilidade espermática durante a preservação do sêmen de pirapitinga. Essa mesma taxa de diluição foi utilizada na preservação do sêmen de piracanjuba proporcionando maiores motilidade espermática em relação à taxa de diluição 1:5, tanto no resfriamento quanto na criopreservação do sêmen (Maria, 2005).

Os diluidores testados no presente trabalho (NaCl 154 mM, NaCl 200 mM, Saad, BTS<sup>®</sup> e glicose 5%) foram selecionados a partir de experimentos realizados em preservação do sêmen de piracanjuba (*B. orbignyanus*) por Maria (2005) e de dourado (*S. maxillosus*), capítulo 2 dessa dissertação. Em piracanjuba, os diluidores NaCl 200 mM e Saad foram capazes de preservar a 4-6°C o sêmen por 7 dias, apresentando motilidade acima de 37%. Em piau-açu (*Leporinus macrocephalus*), a maior motilidade espermática, 59%, foi observada no sêmen diluído em NaCl 200 mM, após 2 dias de resfriamento, quando comparada a outros 4 diluidores (0 a 33%; Moraes, 2004). A solução de Saad é comumente utilizada como solução imobilizadora de motilidade espermática do bagre Europeu (*Silurus glanis*), superando as propriedades ativadoras proporcionadas pela contaminação com água ou urina durante a coleta de sêmen (Linhart et al., 1993). Em dourado, a solução de glicose 5% preservou a 4-6°C o sêmen por 2 dias, enquanto que os outros diluidores testados não conseguiram preservá-lo por mais do que um dia (Capítulo 2 dessa dissertação). O diluidor BTS<sup>®</sup>, rotineiramente utilizado no resfriamento de sêmen de suíno, também tem sido usado com sucesso na preservação de sêmen de peixes. Em pirapitinga, motilidade espermática de 48% foi observada no sêmen diluído em BTS<sup>®</sup> e preservado a 4-6°C por 7 dias, enquanto que o sêmen *in natura* apresentou 39%

de motilidade ainda no 3º dia de resfriamento. Em termos de aplicação prática, amostras de sêmen mantidas resfriadas com motilidade de pelo menos 30% poderiam ser utilizadas em procedimentos de desova induzida em laboratório (Marques, 2001). Além da pirapitinga, sêmen de piracanjuba foi anteriormente resfriado em solução de BTS<sup>®</sup>, por até 6 dias, apresentando 63% de motilidade (Murgas et al., 2004).

O sêmen *in natura* (não diluído) de pirapitinga pôde ser preservado a 4-6°C por somente 3 dias e apresentou motilidade espermática de 39%, evidenciando a necessidade do uso de diluidores para o sêmen de pirapitinga, quando resfriado por períodos iguais ou superiores a 3 dias. Em piracanjuba, o sêmen *in natura* diminui drasticamente a motilidade espermática (de 100% para 33%), após 24 h de resfriamento, sendo necessário o uso de diluidores para a sua preservação (Maria, 2005).

#### **Crioprotetores e criosoluções na criopreservação do sêmen**

O metil glicol utilizado no presente trabalho, tem sido usado como crioprotetor de embriões de bovino (Takagi et al, 1993). O efeito do metil glicol foi primeiramente testado na criopreservação de sêmen, num estudo em piracanjuba. Nesse estudo, o sêmen criopreservado em meio contendo metil glicol apresentou as maiores motilidades espermáticas quando comparado com metanol ou DMSO (Maria, 2005). Em pirapitinga, entretanto, foi observada interação entre diluidores e crioprotetores. As amostras de sêmen diluídas em NaCl 154 mM ou BTS<sup>®</sup>, acrescidas de metil glicol ou em NaCl 200 mM ou Saad, acrescidas de DMSO, apresentaram motilidade espermática semelhantes ( $P>0.05$ ) e acima de 65% (experimento 2). Entretanto, quando o sêmen foi novamente criopreservado nessas quatro criosoluções, maiores motilidades espermáticas (66%) foram observadas no sêmen criopreservado em BTS<sup>®</sup>-metil glicol em relação às outras criosoluções (experimento 3). O BTS<sup>®</sup>, que possui

80% de glicose na sua composição, têm sido cada vez mais utilizado em criopreservação de sêmen de peixes nativos. Em piracanjuba, motilidade espermática acima de 60% foi observada no sêmen criopreservado em BTS<sup>®</sup>-metil glicol (Maria, 2005). Foi observada menor eficiência da solução de glicose 5% quanto a capacidade de criopreservar o sêmen de pirapitinga, em relação aos outros diluidores. O sêmen criopreservado nessas criosoluções apresentou motilidade espermática abaixo de 49%, enquanto que o sêmen criopreservado nos outros diluidores, apresentou motilidade acima de 60%. Entretanto, a criosolução de glicose-DMSO tem sido a mais utilizada na criopreservação do sêmen de espécies nativas, tais como piracanjuba (Bedore, 1999; Carolsfeld et al., 2003; Murgas et al., 2004), matrinxã (Silveira, 2000), pacu (Bedore, 1999; Carolsfeld et al., 2003), curimatá, piapara e dourado (Carolsfeld et al., 2003).

#### **Volume de palheta e temperatura de descongelamento**

Não foi observada diferença ( $P>0,05$ ) na motilidade do sêmen de pirapitinga criopreservado em palhetas de 0,25 ou 0,5 mL e nem do sêmen descongelado em banho-maria a 50 ou 60°C (experimento 3). Em *Pleuronectes ferrugineus*, foi observada uma diminuição na taxa de fertilização quando o sêmen foi criopreservado em palhetas de 1,7 mL em relação às palhetas de 0,25 mL (Richardson et al., 1999). Em matrinxã, não foi observada diferença ( $P>0,05$ ) entre a taxa de eclosão do sêmen criopreservado em palhetas de 0,5 ou 4,0 mL (Silveira, 2000).

Em geral, células congeladas rapidamente, como em palhetas de 0,5 mL, devem ser mais rapidamente descongeladas quando comparadas com células congeladas em velocidade mais lenta, como em criotubos ou macropalhetas contendo um volume maior de sêmen (Viveiros, 2005). No presente estudo, foram testadas duas temperaturas de banho-maria (50 e 60°C), que

proporcionam um rápido descongelamento. Entretanto, não foi observada diferença quanto à motilidade espermática após o descongelamento. Sêmen de piracanjuba criopreservado em glicose-DMSO-gema de ovo apresentou maior motilidade espermática quando descongelado a 50°C por 10 segundos, em relação ao semen descongelado a 60°C por 5 segundos (Murgas et al., 2003). Possivelmente, essa diferença pode ter sido causada pelo menor tempo de imersão no banho-maria e não pela temperatura de exposição, uma vez que, em pirapitinga, não foi observada diferença na motilidade do sêmen descongelado a 50 ou 60°C, por 8 segundos (presente estudo). No descongelamento do sêmen de algumas espécies de piracemas, tem-se utilizado temperatura de banho-maria que variam de 26° a 60°C e com um tempo de imersão entre 5 a 14 segundos (Bedore, 1999; Silva; 2000; Cruz, 2001; Murgas et al., 2003; Moraes, 2004; Maria, 2005).

No presente estudo, foi observada a velocidade de congelamento de -37°C/min entre as temperaturas de +20 e -172°C. Esse valor está dentro dos limites recomendados por Harvey & Carolsfeld (1993), que são entre -10 a -50°C/min. No mesmo modelo de botijão, foi registrada velocidade de congelamento de -45°C/min (Carolsfeld et al., 2003) e de -36°C/min (Maria, 2005). Alguns fatores como estado de conservação do botijão, tempo para sua estabilização e frequência de uso, podem afetar a taxa de congelamento (Bedore, 1999). O congelamento do sêmen de pirapitinga através do botijão de vapor de nitrogênio proporcionou bons resultados. Vários autores têm obtido sucesso com a utilização desse botijão no congelamento de sêmen de peixes (Bedore, 1999; Carolsfeld & Harvey, 1999; Cruz, 2001; Ribeiro & Godinho, 2003; Murgas et al., 2003; Maria, 2005; Capítulo 2 dessa dissertação).

Baseado nesses resultados, o sêmen de pirapitinga pode ser resfriado por até 7 dias a 4°C, quando diluído em BTS<sup>®</sup> ou criopreservado em BTS<sup>®</sup>-metil glicol, apresentando altas taxas de motilidade espermática.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEDORE, A. G. **Característica e conservação do sêmen de Pacu-Caranha (*Piaractus mesopotamicus*) e de Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)**. 1999. 53 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

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.

CAROLSFELD, J.; HARVEY, B. Conservação de recursos genéticos de peixes: teoria e prática. **Curso de Treinamento Brasileiro**. Tradução de H.P> Godinho. Victoria, Canadá: World Fisheries Trust. 47 p., 1999.

COMPANHIA ENERGÉTICA DE MINAS GERAIS, FUNDAÇÃO CENTRO TECNOLÓGICO DE MINAS GERAIS. **Guia ilustrado de peixes da bacia do rio Grande**. Belo Horizonte: CEMIG/CETEC, 141 p., 2000.

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

FERREIRA, D.F. **Sistema de análise de variância (SISVAR)**. Lavras: Universidade federal de Lavras, 1999. ver. 4.3 (Build 43).

HARVEY, B.; CAROLSFELD, J. **Induced breeding in tropical fish culture**. Ottawa: International Development Research Centre, 1993.

LINHART, O.; BILLART, R.; PROTEAU, J. P. Cryopreservation of European catfish (*Silurus glanis* L.) spermatozoa. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 115, n. 3/4, p. 347-359, Sept. 1993.

MARIA, A. N. **Diluidores e crioprotetores no resfriamento e congelamento do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)**. 2005. 71 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MARQUES, S. **Preservação a curto prazo do sêmen de teleosteos neotropicais de água doce**. 2001. 83 p. Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte.



MORAES, G. F. **Resfriamento e congelamento do sêmen de piau-açu (*Leporinus macrocephalus*)**. 2004. 68 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG .

MURGAS, L. D. S.; MILIORINI, A. B.; FRANCISCATO, R. T.; MARIA, A. N. Viabilidade espermática do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) resfriado a 4°C. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 6, p. 1361-1365, 2004.

MURGAS, L. D. S.; FRANCISCATO, R. T.; SANTOS, A. G. O. Avaliação espermática pós-descongelamento em piracanjuba (*Brycon orbignyauns*, Valenciennes, 1849). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 6, p. 1810-1814 (Supl. 2), 2003.

RIBEIRO, R. I. M. A.; GODINHO, H.P. Criopreservação do sêmen testicular do teleosteo piau-açu *Leporinus macrocephalus*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 55, n. 1, p. 75-79, jan./fev. 2003

RICHARDSON, G. F.; WILSON, C. E.; CRIM, L.W.; YAO, Z. Cryopreservation of yellowtail flounder (*Pleuronectes platessa*) semen in large straws. **Aquaculture**, v. 174, p. 89-94, 1999.

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

SILVA, E. B. **Avaliação comparativa da utilização do sêmen criopreservado e fresco na fertilização dos óvulos de curimatã *Prochilodus lineatus***. 2000. Dissertação (Mestrado) – Umiversidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SILVEIRA, A. N. **Caracterização espermática, preservação criogênica do sêmen e fertilidade do matrinxã, (*Brycon cephalus*)**. 2000. 45 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

STOSS, J.; DONALDSON, E. M. Preservation of fish gametes. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM REPRODUCTION PHYSIOLOGY FISH, 1982, Wageningen. **Proceedings...** Wageningen, 1982. P. 114-122.

TAKAGI, M., BOEDIONO, A., SAHA, S., AND SUZUKI, T. Survival rate of frozen-thawed bovine IVF embryos in relation to exposure time using various cryoprotectants. **Cryobiology** 30, 306–312, 1993.

VIVEIROS, A. T. M. Criopreservação de sêmen de peixes. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16., 2005. Goiânia, GO. **Palestras ...** Goiânia, GO, 2005. Anais : Palestras.



## **CAPÍTULO 4**

### **DISCUSSÃO GERAL**

## Dourado x Pirapitinga

O dourado (*Salminus maxillosus*) é uma espécie de peixe da bacia do rio Grande, muito apreciado pelos pescadores, devido à excelência da sua carne e ao fato de ser um peixe esportivo. A pirapitinga (*Brycon nattereri*) é igualmente proveniente da bacia do rio Grande e está na lista de peixes brasileiros ameaçados de extinção. Esta espécie não é mais encontrada em várias seções do rio Grande devido às alterações ocorridas em seu hábitat. Nesse capítulo, discutiremos algumas peculiaridades observadas no resfriamento e na criopreservação do sêmen de dourado e de pirapitinga, no presente estudo.

Vários diluidores de formulações simples ou complexas foram testados no sêmen de dourado e de pirapitinga (capítulo 2 e 3, dessa dissertação). Em comum, foram testadas as soluções diluidoras de NaCl 154 mM, NaCl 200 mM, Saad, glicose 5% e BTS<sup>®</sup>. As soluções salinas simples de NaCl 154 mM, NaCl 200 mM e Saad foram utilizadas anteriormente com sucesso na preservação do sêmen de piracanjuba *Brycon orbignyanus*, a curto e a longo prazos (Maria, 2005). A solução de Saad é comumente utilizada como solução imobilizadora de motilidade espermática do bagre europeu *Silurus glanis*, superando as propriedades ativadoras proporcionadas pela contaminação com água ou urina, durante a coleta de sêmen (Linhardt et al., 1993). A solução de glicose 5% tem sido usada na criopreservação do sêmen de algumas espécies nativas, tais como curimatá *Prochilodus scrofa* (Cruz, 2001; Carolsfeld et al., 2003), matrinxã *Brycon cephalus* (Silveira, 2000), piracanjuba (Bedore, 1999; Carolsfeld et al., 2003), pacu-caranha *Piaractus mesopotamicus* (Bedore, 1999; Carolsfeld et al., 2003), dourado *S. maxillosus* e piapara *Leporinus elongatus* (Carolsfeld et al., 2003), embora não seja utilizada no resfriamento. O diluidor BTS<sup>®</sup>, rotineiramente utilizado no resfriamento de sêmen de suíno, tem sido utilizado

com sucesso na preservação do sêmen de piracanjuba (Murgas et al., 2004; Maria, 2005), curimba (Milorini et al., 2005), pacu (Murgas et al., 2005), dourado e pirapitinga (capítulo 2 e 3, da presente dissertação).

No resfriamento a 4°C, foi observado que a melhor solução diluidora para o sêmen de dourado foi glicose 5%, que preservou a motilidade espermática por 2 dias, enquanto que, para o sêmen de pirapitinga, foi observado que a melhor solução diluidora foi BTS<sup>®</sup>, que preservou a motilidade espermática por 7 dias (Tabela 1). Em piracanjuba, espécie do mesmo gênero da pirapitinga, foi observado que as melhores soluções diluidoras foram NaCl 200 mM e Saad, e que também preservaram a motilidade espermática por até 7 dias, quando armazenado a 4°C (Maria, 2005). Apesar de pertencerem ao mesmo gênero, o sêmen de pirapitinga e de piracanjuba apresentou necessidades de diluidores diferentes para ser preservado com sucesso.

TABELA 1. Motilidade (%; média ± desvio padrão) das amostras de sêmen diluídas nas melhores soluções testadas, tanto em dourado quanto em pirapitinga, e armazenadas a 4°C por até 7 dias.

Espécies	Diluidores	Tx diluição	Motilidade (%)		
			Dia 0	Dia 2	Dia 7
Dourado	Glicose 5%	1:2	97±4	30±20	--
Dourado	<i>in natura</i>	--	100±0	0±0	--
Pirapitinga	BTS <sup>®</sup>	1:10	98±5	91±3	48±6
Pirapitinga	<i>in natura</i>	--	100±0	73±3	2±2

Em relação à taxa de diluição do sêmen, em dourado, foram testadas três diluições (1:2, 1:5 e 1:10 – sêmen: volume total) e foi observado que a diluição 1:2 proporcionou os melhores resultados no resfriamento e a diluição 1:5, na criopreservação (capítulo 2). Em pirapitinga, foi utilizada apenas a diluição 1:10 (capítulo 3), que foi a melhor diluição testada para o sêmen de piracanjuba por Maria (2005). Essa diluição foi selecionada para o sêmen de pirapitinga, por dois motivos: por pertencer ao mesmo gênero da piracanjuba,

*Brycon* e por não haver informações na literatura sobre a criopreservação do sêmen de pirapitinga. A taxa de diluição 1:10 proporcionou bons resultados em pirapitinga.

Os crioprotetores dimetil sulfóxido (DMSO) e metil glicol foram testados na criopreservação do sêmen de dourado (capítulo 2) e de pirapitinga (capítulo 3). Em dourado, foi observado que os meios contendo o crioprotetor DMSO proporcionaram as melhores taxas de motilidade espermática. Esse crioprotetor tem sido usado com sucesso na criopreservação de várias espécies nativas, tais como piracanjuba (Bedore, 1999; Carolsfeld et al., 2003; Murgas et al., 2003), matrinxã (Silveira, 2000), curimatá, piapara, pacu e dourado (Carolsfeld et al., 2003). As criosoluções glicose 5%-DMSO ou BTS<sup>®</sup>-DMSO, proporcionaram as maiores taxas de motilidade (61 e 64%, respectivamente), após o descongelamento, para o sêmen de dourado criopreservado. Entretanto, foram observadas, em pirapitinga, interações entre diluidores e crioprotetores, que não foram observadas em dourado. No caso, o sêmen de pirapitinga diluído nas criosoluções NaCl 200 mM-DMSO, Saad-DMSO, NaCl 154 mM-metil glicol e BTS<sup>®</sup>-metil glicol, foi eficientemente criopreservados e após o descongelamento, apresentou motilidade espermática acima de 68%. O que tem sido observado na literatura é que, aparentemente, determinados crioprotetores agem melhor em determinadas espécies do que em outras (Bedore, 1999).

Na criopreservação do sêmen de pirapitinga, não foi observada diferença ( $P < 0,05$ ) entre os volumes das palhetas (0,25 e 0,5 mL) e nem entre as temperaturas de banho-maria utilizadas, sobre a motilidade espermática. Em relação à fertilização utilizando sêmen criopreservado, não foi possível sua realização, pois, as fêmeas de pirapitinga apresentavam ovócitos de baixa qualidade (coloração opaca) e ou não desovaram. Acredita-se que o período de reprodutivo dessa espécie já estava terminando, quando os trabalhos foram realizados e, por isso, a fertilização não foi bem sucedida. Em dourado, não foi

possível testar volumes de palhetas e nem temperaturas de banho-maria, entretanto, foi realizada a fertilização utilizando sêmen criopreservado. Uma taxa de eclosão média de 20% para o sêmen criopreservado e uma taxa de eclosão de 60% para o sêmen fresco foram observadas. Esses resultados são considerados satisfatórios, uma vez que, na reprodução artificial de dourado utilizando sêmen fresco, a taxa de eclosão observada é, em média, de 20% (comunicação pessoal Gilson, estação de piscicultura da CEMIG, unidade Itutinga).

Conclui-se, que o sêmen de dourado pode ser preservado por até 2 dias a 4°C, quando diluído em glicose 5%, na proporção 1:2 (sêmen: volume total), e criopreservado em BTS<sup>®</sup>-DMSO ou glicose 5%-DMSO, a 1:5, enquanto que o sêmen de pirapitinga pode ser preservado por até 7 dias a 4°C, quando diluído em BTS<sup>®</sup>, e criopreservado em BTS<sup>®</sup>-metil glicol.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEDORE, A. G. **Característica e conservação do sêmen de Pacu-Caranha (*Piaractus mesopotamicus*) e de Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)**. 1999. 53 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

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.

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

LINHART, O.; BILLART, R.; PROTEAU, J. P. Cryopreservation of European catfish (*Silurus glanis* L.) spermatozoa. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 115, n. 3/4, p. 347-359, Sept. 1993.

MARIA, A. N. **Diluidores e crioprotetores no resfriamento e congelamento do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)**. 2005. 71 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MILIORINI, A. B.; MURGAS, L. D. S.; PEREIRA, G. J. M. Taxas de fertilização do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) após o congelamento. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16, Goiânia, GO, **Anais...** Goiânia, GO, 2005. Anais: Resumo.

MURGAS, L. D. S.; MILIORINI, A. B.; PEREIRA, G. J. M. Qualidade do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) transportado e resfriado à 4°C durante 6 horas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16, Goiânia, GO, **Anais...** Goiânia, GO, 2005. Anais: Resumo.

MURGAS, L. D. S.; MILIORINI, A. B.; FRANCISCATO, R. T.; MARIA, A. N. Viabilidade espermática do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) resfriado a 4°C. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 6, p. 1361-1365, 2004.

MURGAS, L. D. S.; FRANCISCATO, R. T.; SANTOS, A. G. O. Avaliação espermática pós-descongelamento em piracanjuba (*Brycon orbignyauns*,

Vallenciennes, 1849). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 6, p. 1810-1814 (Supl. 2), 2003.

SILVEIRA, A. N. **Caracterização espermática, preservação criogênica do sêmen e fertilidade do matrinxã, (*Brycon cephalus*)**. 2000. 45 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

## ANEXOS

TABELA 1A. Análise de variância do efeito das soluções diluidoras do sêmen de dourado no processo de resfriamento (experimento 1A).....	88
TABELA 2A. Análise de variância do efeito das soluções diluidoras e das diluições do sêmen de dourado no processo de resfriamento (experimento 1B). ....	89
TABELA 3A. Análise de variância do efeito das soluções diluidoras acrescidas de 10% de crioprotetores no processo de resfriamento do sêmen de dourado (experimento 2A).....	90
TABELA 4A. Análise de variância do efeito das criosoluções no processo de resfriamento do sêmen de dourado (experimento 2B).....	90
TABELA 5A. Análise de variância do efeito das criosoluções na criopreservação do sêmen de dourado (experimento 3A).....	91
TABELA 6A. Análise de variância do efeito das criosoluções na criopreservação do sêmen de dourado (experimento 3B). ....	91
TABELA 7A. Análise de variância do efeito das criosoluções na criopreservação do sêmen de dourado (experimento 3C). ....	92

TABELA 8A. Análise de variância do efeito do sêmen criopreservado sob a taxa de eclosão dos ovos de dourado (experimento 3D).....	92
TABELA 9A. Análise de variância do efeito das soluções diluidoras do sêmen de pirapitinga no processo de resfriamento (experimento 1). .....	93
TABELA 10A. Análise de variância do efeito das criosoluções na criopreservação do sêmen de pirapitinga (experimento 2).....	93
TABELA 11A. Análise de variância do efeito das palhetas e da temperatura de descongelamento do sêmen de pirapitinga (experimento 3).. .....	94

TABELA 1. Análise de variância do efeito das soluções diluidoras do sêmen de dourado no processo de resfriamento (experimento 1A).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	8	9 746.574074	1218.321759	6.194	0.0010
PEIXE	2	1997.462963	998.731481	5.078	0.0196
erro 1	16	3147.037037	196.689815		
TEMPO	3	156179.000000	52059.666667	410.747	0.0000
TEMPO*TRAT	24	12720.833333	530.034722	4.182	0.0000
erro 2	54	6844.166667	126.743827		
Total corrigido:107		190635.074074			
CV 1 (%) =	31.94				
CV 2 (%) =	25.64				
Média geral:	43.9074074	Número de observações:	108		

TABELA 2. Análise de variância do efeito das soluções diluidoras e das diluições do sêmen de dourado no processo de resfriamento (experimento 1B).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
PEIXE	4	3100.308333	775.077083	7.654	0.0000
DILUIÇÃO	2	3696.758333	1848.379167	18.252	0.0000
DILUIDOR	3	9009.366667	3003.122222	29.655	0.0000
DILUIÇÃO*DILUIDOR	6	3529.108333	588.184722	5.808	0.0000
FATORIAL x ADICIONAL	1	146.466667	146.466667	1.263	0.0000
erro 1	48	5566.415385	115.966987		
TEMPO	3	401898.780769	133966.260256	1529.239	0.0000
TEMPO*DILUIÇÃO	6	1682.941667	280.490278	2.770	0.0133
TEMPO*DILUIDOR	9	7283.600000	809.288889	7.992	0.0000
TEMPO*DILUIDOR*DILUI	18	6103.325000	339.073611	3.348	0.0000
erro 2	188	19038.491667	101.268573		
Total corrigido	259	456015.150000			
CV 1 (%) =		39.37			
CV 2 (%) =		34.22			
Média geral:		27.3500000	Número de observações:		260

TABELA 3. Análise de variância do efeito das soluções diluidoras acrescidas de 10% de crioprotetores no processo de resfriamento do sêmen de dourado (experimento 2A).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
PEIXE	2	448.111111	224.055556	0.618	0.5434
CRIOPROTET	2	38194.777778	19097.388889	52.684	0.0000
DILUIDOR	3	4263.375000	1421.125000	3.920	0.0142
CRIOPROTET*DILUIDOR	6	6866.666667	1144.444444	3.157	0.0112
FATORIAL x ADICIONAL	1	8562.565173	8562.565173	17.963	0.0000
erro 1	24	11440.153846	476.673077		
TEMPO	1	6869.538462	6869.538462	33.370	0.0000
TEMPO*CRIOPROTET	2	2046.777778	1023.388889	2.823	0.0697
TEMPO*DILUIDOR	3	2290.597222	763.532407	2.106	0.1124
TEMPO*CRIOPROTET*DIL	6	743.111111	123.851852	0.342	0.9111
erro 2	46	16674.555556	362.490338		
Total corrigido	77	87755.384615			
CV 1 (%) =	44.07				
CV 2 (%) =	28.96				
Média geral:	49.5384615	Número de observações:	78		

TABELA 4. Análise de variância do efeito das criosoluções no processo de resfriamento do sêmen de dourado (experimento 2B).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
PEIXE	2	1653.571429	826.785714	7.021	0.0096
TRATAMENTO	6	2015.476190	335.912698	2.853	0.0578
erro 1	12	1413.095238	117.757937		
TEMPO	1	192.857143	192.857143	7.364	0.0168
TEMPO*TRATAMENTO	6	465.476190	77.579365	2.962	0.0441
erro 2	14	366.666667	26.190476		
Total corrigido	41	6107.142857			
CV 1 (%) =	15.04				
CV 2 (%) =	7.09				
Média geral:	72.1428571	Número de observações:	42		

TABELA 5. Análise de variância do efeito das criosoluções na criopreservação do sêmen de dourado (experimento 3A).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMENTO	4	2017.022222	504.255556	3.955	0.0088
PEIXE	2	450.977778	225.488889	1.768	0.1843
erro	38	4845.244444	127.506433		
Total corrigido	44	7313.244444			
CV (%) =	84.97				
Média geral:	13.2888889	Número de observações:		45	

TABELA 6. Análise de variância do efeito das criosoluções na criopreservação do sêmen de dourado (experimento 3B).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMENTO	4	2538.888889	634.722222	4.972	0.0025
PEIXE	2	13687.777778	6843.888889	53.610	0.0000
erro	38	4851.111111	127.660819		
Total corrigido	44	21077.777778			
CV (%) =	21.64				
Média geral:	52.2222222	Número de observações:		45	



TABELA 7. Análise de variância do efeito das criosoluções na criopreservação do sêmen de dourado (experimento 3C).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
PEIXE	4	2190.000000	547.500000	3.091	0.0234
TRATAMENTO	3	3898.333333	1299.444444	7.337	0.0003
erro	52	9210.000000	177.115385		
Total corrigido	59	15298.333333			
CV (%) =	24.27				
Média geral:	54.8333333	Número de observações:	60		

TABELA 8. Análise de variância do efeito do sêmen criopreservado sob a taxa de eclosão dos ovos de dourado (experimento 3D).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
PEIXE	4	467.040000	116.760000	2.240	0.1170
TRATAMENTO	1	157.360500	157.360500	3.019	0.1042
erro	14	729.757000	52.125500		
Total corrigido	19	1354.157500			
CV (%) =	35.70				
Média geral:	20.2250000	Número de observações:	20		

TABELA 9. Análise de variância do efeito das soluções diluidoras do sêmen de pirapitinga no processo de resfriamento (experimento 1).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
ANIMAL	3	1293.127778	431.042593	3.763	0.0409
DILUIDORES	4	37619.911111	9404.977778	82.116	0.0000
erro 1	12	1374.400000	114.533333		
TEMPO	7	207263.600000	25907.950000	500.659	0.0000
TEMPO*DILUIDORES	32	18907.788889	590.868403	11.418	0.0000
erro 2	120	6209.722222	51.747685		
Total corrigido	178	272668.550000			
CV 1 (%) =	20.47				
CV 2 (%) =	13.76				
Média geral:	52.2833333	Número de observações:	180		

TABELA 10. Análise de variância do efeito das criosoluções na criopreservação do sêmen de pirapitinga (experimento 2).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
ANIMAL	3	99.400000	33.133333	0.321	0.8099
CRIOPROTETORES	1	313.600000	313.600000	3.041	0.0926
DILUIDORES	4	2308.650000	577.162500	5.596	0.0021
CRIOP.*DILUIDORES	4	4858.150000	1214.537500	11.776	0.0000
erro	27	2784.600000	103.133333		
Total corrigido	39	10364.400000			
CV (%) =	18.40				
Média geral:	55.2000000	Número de observações:	40		

TABELA 11. Análise de variância do efeito das palhetas e da temperatura de descongelamento do sêmen de pirapitinga (experimento 3).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
ANIMAL	3	388.875000	129.625000	1.201	0.3203
TEMPERATURA	1	3.062500	3.062500	0.028	0.8670
PALHETAS	1	3.062500	3.062500	0.028	0.8670
CRIOSOLUÇÃO	3	2015.875000	671.958333	6.226	0.0012
TEMPERATUR*PALHETAS	1	100.000000	100.000000	0.926	0.3409
TEMPERATUR*CRIOSOL	3	313.312500	104.437500	0.968	0.4163
PALHETAS*CRIOSOL	3	433.812500	144.604167	1.340	0.2734
TEMP*PALHETAS*CRIOSOL	3	55.875000	18.625000	0.173	0.9146
erro	45	4857.125000	107.936111		
Total corrigido	63	8171.000000			
CV (%) =	18.03				
Média geral:	57.6250000	Número de observações:	64		