

**RESFRIAMENTO E CRIOPRESERVAÇÃO DE
SÊMEN DO PEIXE TELEÓSTEO PIABANHA**
Brycon insignis

THICIANA BARBOSA DO AMARAL

2009

THICIANA BARBOSA DO AMARAL

**RESFRIAMENTO E CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DO PEIXE
TELEÓSTEO PIABANHA *Brycon insignis***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Reprodução de Peixes, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora

Profª. Dra. Ana Tereza de M. Viveiros-Leal

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2009

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

Amaral, Thiciana Barbosa do.

Resfriamento e criopreservação de sêmen de peixe teleósteo
Piabanha (*Brycon insignis*) / Thiciana Barbosa do Amaral. – Lavras
: UFLA, 2009.

51 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.

Orientador: Ana Tereza Mendonça Viveiros-Leal.

Bibliografia.

1. Preservação. 2. Protocolo de congelamento. 3. Motilidade
espermática. 4. Soluções imobilizadoras. 5. Soluções ativadoras. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 639.3748

THICIANA BARBOSA DO AMARAL

**RESFRIAMENTO E CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DO PEIXE
TELEÓSTEO PIABANHA *Brycon insignis***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós- Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Reprodução de Peixes, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 28 de setembro de 2009

Prof. Dr. João Bosco Barreto Filho UFLA

Prof. Dr. Rilke Tadeu Fonseca de Freitas UFLA

Dr. Marcelo de Castro Leal Utrecht University

Prof^ª. Dra Ana Tereza de Mendonça Viveiros-Leal
UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Ana Viveiros, pela orientação, sabedoria e ensinamentos que estarão presentes sempre em minha vida.

Aos meus pais, Carlos e Neuza, e minha irmã Patrícia, obrigada pelo apoio e compreensão.

Agradeço à Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Medicina Veterinária, pela oportunidade; ao CNPq, pela bolsa de estudos e à Fapemig e a ANEEL, pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

À equipe de trabalho, Ariane F. Nascimento, Alexandre N. Maria, Athalita E. Piva e Nathália Nonato, por tornarem possível a conclusão deste trabalho. Em especial, às amigas Laura Helena Órfão e Ziara A. Isaú, pelo valioso auxílio nos momentos mais importantes. À minha querida Gilvaine C. Lucas, pela ajuda e acolhimento nessa fase de minha vida. Ao amigo Renato N. Pereira, pela colaboração nas análises estatísticas.

À Companhia Energética do Estado de São Paulo (CESP), Estação de Piscicultura de Paraibuna, pela disponibilização dos reprodutores e instalações e à equipe: Danilo Caneppele, Lúcia Cancio, Benedito P. Barros, Ielzo Luis da Silva, Milton Miranda Rosa, Júlio Cesar, Vicente de Paula Martins e Willian Trindade, pelo auxílio e colaboração valiosos.

Aos amigos distantes, mas sempre presentes no coração, Ana Paula Fulan, Natascha Almeida e João Fernando Carvalho, pela enorme amizade e carinho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT	iii
CAPÍTULO 1.....	01
1 Introdução Geral	02
2 Referências Bibliográficas.....	08
CAPÍTULO 2: Resfriamento de sêmen do peixe teleósteo piabanha (<i>Brycon insignis</i>): efeito de diluidores, gentamicina, osmolaridades e ativadores.....	09
1 Resumo.....	10
2 Abstract.....	11
3 Introdução	112
4 Material e Métodos.....	13
5 Análise estatística	17
6 Resultados.....	17
7 Discussão.....	25
8 Referências Bibliográficas.....	29
CAPÍTULO 3: Criopreservação de sêmen do peixe teleósteo piabanha (<i>Brycon insigis</i>): efeito de diluidores, crioprotetores, temperatura de descongelamento e soluções ativadoras.....	33
1 Resumo.....	34
2 Abstract.....	35
3 Introdução.....	36
4 Material e Métodos.....	38
5 Análise Estatística.....	41
6 Resultados.....	42
7 Discussão.....	46
8 Referências Bibliográficas.....	48
CAPÍTULO 4: Considerações Finais.....	50

RESUMO

AMARAL, Thiciana Barbosa do. **Resfriamento e criopreservação de sêmen do peixe teleósteo piabanha *Brycon insignis***. 2009. 51 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

A piabanha (*Brycon insignis*) é uma espécie de peixe nativa da bacia do rio Paraíba do Sul, hoje considerada espécie vulnerável. A sobrevivência dessa espécie encontra-se bastante ameaçada pela poluição do rio Paraíba, decorrente do lançamento de esgoto doméstico, industrial e agropecuário, como também pela introdução do dourado (*Salminus maxillosus*), um voraz predador. No que se refere à sua utilização, é considerada espécie de alto valor comercial e muito apreciada pela resistência à captura com anzol, na pesca esportiva. Este trabalho foi realizado com o objetivo de desenvolver um protocolo de preservação de sêmen de piabanha por meio dos processos de resfriamento a 4°C-6°C e criopreservação. Para o desenvolvimento do protocolo de resfriamento de sêmen, foram utilizados diluidores simples (NaCl e glicose) combinados ou não com gentamicina e diluidores complexos (BTS[®] e Androstar[®]), em diferentes osmolaridades. A motilidade, vigor e duração espermática foram avaliados nos dias 0, 2 e 4 do resfriamento e a ativação feita com NaCl 0,29% e NaHCO₃ 1%. Para o desenvolvimento do protocolo de congelamento de sêmen, oito meios de congelamento, compostos de quatro diluidores (NaCl, glicose, BTS[®] e M III[®]), dois crioprotetores (DMSO e metilglicol), duas temperaturas de descongelamento (30° e 60°C) e dois ativadores (NaCl 0,29% e NaHCO₃ 1%) foram testados. O sêmen foi congelado em palhetas de 0,5 mL em vapor de nitrogênio a -170°C e armazenado em nitrogênio líquido. A motilidade, o vigor e a duração espermática foram avaliados após o descongelamento. Durante os experimentos de resfriamento, todas as amostras diluídas e o controle possuíam alta qualidade no dia zero de armazenamento. No dia 2, a gentamicina foi benéfica quando acrescida à solução de NaCl e não à solução de glicose. Apenas as amostras diluídas em BTS[®] e Androstar[®] atingiram motilidade acima de 50%, vigor espermático acima de 1,9 e duração espermática acima de 50 segundos. Quando esta etapa do experimento foi repetida, as maiores motilidades (60-63%) e duração (111-117 s) foram observadas nas amostras diluídas em Androstar[®] 322 e 362 mOsm e no sêmen controle. A qualidade espermática em todas as

¹ Orientadora: Profa. Ana Tereza de Mendonça Viveiros-Leal – UFLA (Orientadora).

amostras foi maior quando o ativador NaHCO_3 1% foi utilizado. No dia 4, todas as amostras diluídas apresentaram baixa motilidade (0%-10%). Durante os experimentos de congelamento, as maiores taxas de motilidade pós-descongelamento foram observadas quando o sêmen foi criopreservado em metilglicol (76-88%), comparado ao DMSO (23%-59%) e o NaHCO_3 1% foi melhor ativador que o NaCl 0,29% apenas quando o DMSO foi utilizado como crioprotetor. Os diluidores e as temperaturas de descongelamento não tiveram efeito na motilidade espermática após o descongelamento. Nenhum dos diluidores testados prolongou a qualidade espermática do sêmen de piabanha por mais de 2 dias de armazenamento. No entanto, o sêmen pode ser congelado, com sucesso, em qualquer um dos diluidores testados, combinado com o metilglicol. Utilizando essa metodologia, o sêmen descongelado possui ótima qualidade, porém, experimentos de fertilização ainda são necessários.

ABSTRACT

AMARAL, Thiciana Barbosa do. **Cooling storage and cryopreservation of teleost fish piabanha *Brycon insignis* sperm.** 2009. 51 p. Dissertation (Master in Veterinary Science) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.¹

Piabanha (*Brycon insignis*) is a native species of Paraíba do Sul River Basin, and is presently set as vulnerable. The survival of this specie is threatened by pollution of the river, caused by domestic, industrial and agricultural discharge, and by the introduction of the feral jaw characin (*Salminus maxillosus*). Piabanha is high-priced market and very appreciated for sport fishing. The aim of this study was to develop a protocol for sperm preservation of piabanha, both by cooling at 4°C -6°C and by freezing. To develop a cooling protocol for sperm, simple extenders (NaCl and glucose) combined or not with gentamycin, and complex extenders (BTS™ and Androstar™) in different osmolalities were tested. Motility, quality score and motility duration was evaluated after 0, 2 and 4 days after cooling and sperm motility was activated with NaCl 0.29% and NaHCO₃ 1%. To develop a freezing protocol for sperm, eight freezing media composed of four extenders (NaCl, glucose, BTS™ and M III™) and two cryoprotectants (dimethylsulphoxide-DMSO and methylglycol), two thawing temperatures (30 and 60°C) and two activation media (NaCl 0.29% and NaHCO₃ 1%) were tested. Sperm was frozen in 0.5-mL straws in nitrogen vapor at -170°C and stored in liquid nitrogen. Motility, quality score and motility duration was evaluated after thawing. During the cooling experiments, all diluted and control samples possessed high quality on day 0 of storage. On day 2, the addition of gentamycin was beneficial when added to NaCl solution but not glucose solution. Only samples diluted in BTS™ and in Androstar™ yielded motility above 50%, quality score above 1.9 and motility duration above 50 s. When this part of experiment was repeated, highest motility (60-63%) and duration (111-117 s) were observed on samples diluted in Androstar™ at 322 and 362 mOsm, and in control samples. Sperm quality in all samples was higher when NaHCO₃ 1% was used as activation medium. On day 4, all diluted samples yielded low quality (0-10% motility). During the freezing experiments, the highest post-thaw motility rates were observed when sperm was cryopreserved in methylglycol (76-88%), compared to DMSO (23-59%), and NaHCO₃ 1% was a better activation medium than NaCl 0.29% only when DMSO was used as cryoprotectant. Extenders and thawing temperatures had no effect on post-thaw sperm motility. None of the extenders tested prolonged sperm quality of piabanha beyond two days of storage. On the other hand, sperm can be

¹ Advisor: Profa. Ana Tereza de Mendonça Viveiros-Leal – UFLA.

successfully frozen in any of the extenders tested combined with methylglycol. Using this methodology, thawed sperm possess great quality, but fertilization trial is still needed.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

INTRODUÇÃO GERAL

A necessidade de estabelecer técnicas mais refinadas de preservação de sêmen de peixes confronta-se com questões ecológicas e econômicas da atualidade. 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 e a extinção de populações de espécies de importância econômica (Oliveira, 2007).

Com o crescimento da piscicultura comercial, muitas espécies de peixes facilmente encontradas em rios são criadas em cativeiros, nos quais, muitas vezes, não encontram condições adequadas para a reprodução. Isso acontece, principalmente, com aquelas espécies que têm a característica de migrar em determinados meses do ano, quando passam por estímulos hormonais e ambientais, até chegarem às calhas dos rios ou nos grandes afluentes, onde ocorre a desova. Muitas dessas espécies, conhecidas como peixes de piracema, têm grande importância comercial e são produzidas em grande quantidade, enquanto outras, devido à sobrepesca ou outras ações antropogênicas têm seu número cada vez mais diminuído (Sale, 1985).

Piabanha é a denominação regional de espécie de peixe de água doce, caracterizada por suas escamas prateadas, pertencente à família Characidae, subfamília Bryconinae, gênero Brycon, classificada como *Brycon insignis* por Steindachner, em 1877 (Fowler, 1950). É considerada uma espécie de grande porte, atingindo de 8 a 10 kg de peso, aproximadamente (Nomura, 1984; Santos,

1987; Pereira, 1986). Considerado atualmente um peixe raro, é encontrado somente nas cabeceiras dos rios e na foz do rio Paraíba do Sul (Figura 1).



FIGURA 1 Bacia do rio Paraíba do Sul

Possui o abdômen róseo e o dorso prateado. A mandíbula é projetada para a frente e a cabeça é achatada, duas características gerais de peixes predadores. Quanto ao hábitat, aparece em corredeiras, principalmente no tobo das cachoeiras (Figura 2).

O período reprodutivo da espécie estende-se de dezembro a fevereiro. O macho está apto a se reproduzir no segundo ano de vida, quando alcança cerca de 20 cm de comprimento, e a fêmea, a partir do terceiro ano de vida, após atingir 25 cm de comprimento total (Salgado et al., 1997). A fecundação dos óvulos é externa e a desova ocorre quando o nível das águas está em ascensão em virtude das chuvas de verão. A incubação dos ovos é realizada em lagoas marginais ou em áreas de remanso, onde os alevinos encontram alimento e refúgio para seu desenvolvimento. A sobrevivência dessa espécie encontra-se bastante ameaçada pela poluição do rio Paraíba, decorrente do lançamento de esgoto doméstico, industrial e agropecuário, como também pela introdução do

dourado (*Salminus maxillosus*), um voraz predador. Esses fatores comprometeram seriamente a perpetuação dessas espécies (Shimoda, 2004).



FIGURA 2 Exemplar adulto de piabanha (*Brycon insignis*)

Quanto ao hábito alimentar, a piabanha é ictiófaga e insetívora quando jovem, e herbívora e frugívora quando adulta. Durante a larvicultura da piabanha é comum verificar-se canibalismo entre indivíduos, o que pode reduzir substancialmente o número de alevinos produzidos. Para minimizar as perdas, normalmente são utilizadas larvas de outras espécies de peixe, como o curimatá (*Prochilodus lineatus*), que servem como alimento para as piabanhas.

No que se refere a sua utilização, é considerada espécie de alto valor comercial e muito apreciada pela resistência à captura com anzol na pesca esportiva. A exploração para fins comerciais é ainda praticamente inexistente, tendo as estações de piscicultura com criação de piabanhas apenas fins conservacionistas.

Dentre as estações, tem-se a da CESP, localizada em Paraibuna, SP, e a do Projeto Piabanha, em Itaocara, RJ. Esta última tem desenvolvido projetos para aperfeiçoamento da produção de alevinos, que são utilizados para repovoamento no rio Paraíba do Sul.

As estratégias para evitar a redução de recursos pesqueiros incluem o desenvolvimento de técnicas de reprodução artificial, de larvicultura e alevinagem, de coleta e preservação de sêmen. Essas estratégias podem também ser utilizadas na produção comercial de peixes. Além disso, as técnicas de preservação do sêmen podem auxiliar em programas de melhoramento genético e para a formação de um banco para conservação dos recursos genéticos (Viveiros et al., 2008).

Outras vantagens da preservação de sêmen são permitir a troca de material genético entre os laboratórios de reprodução e reduzir o número de reprodutores, diminuindo assim os custos de produção e eliminando problemas de assincronia da maturidade gonadal, quando machos e fêmeas não estão preparados simultaneamente, além do estabelecimento de programas de hibridização utilizando espécies com períodos reprodutivos diferentes (Viveiros, 2005).

A estocagem dos espermatozoides pode ser realizada a curto prazo, por horas ou dias em temperatura de refrigeração (4°C), ou a longo prazo, por meio do congelamento em nitrogênio líquido, a -196°C, mantendo, assim, a viabilidade dos gametas por tempo indefinido (Carolsfeld & Harvey, 1999).

O resfriamento de sêmen é um método prático e simples para uso na rotina de pisciculturas e programas de preservação de espécies em risco de extinção, além de facilitar as trocas de materiais genéticos entre as fazendas produtoras de pescados. No entanto, a técnica ainda é pouco utilizada, devido, principalmente, ao curto período de armazenamento, evidenciado por baixas taxas de motilidade espermática. A elaboração de um protocolo de resfriamento de sêmen, principalmente de espécies nativas, tem se mostrado específica para cada espécie, tanto para a duração do período de estocagem quanto para os diluidores utilizados. Os espermatozoides de peixes são imóveis no plasma seminal. Esta característica favorece sua preservação em curto prazo, já que

eles não requerem energia para locomoção. Uma solução diluidora deve ser utilizada no processo de resfriamento, pois a diluição diminui a competição dos espermatozoides por oxigênio e espaço (Carolsfeld & Harvey, 1999).

Para ser criopreservado, o sêmen precisa ser diluído em meio contendo diluidor e crioprotetor intracelular. Os diluidores são soluções de sais ou de carboidratos que ajudam a manter a viabilidade das células durante o congelamento e que permitem que os crioprotetores intracelulares ou extracelulares atinjam o interior e a superfície dos espermatozoides, protegendo-os das crioinjúrias.

Os estudos realizados no Brasil com peixes tropicais são pouco numerosos e apontam para a necessidade de maior aprofundamento nas pesquisas para se estabelecerem técnicas de preservação de sêmen que melhor se adaptem a cada espécie.

Assim, este trabalho foi realizado com o objetivo de desenvolver um protocolo de preservação de sêmen de piabanha (*Brycon insignis*) a curto e a longo prazo, estabelecendo uma metodologia adequada à espécie. O trabalho está estruturado em dois capítulos: o primeiro, sobre resfriamento de sêmen, no qual o objetivo foi avaliar a eficiência de soluções imobilizadoras (diluidores) de sêmen, acrescidas ou não de gentamicina (experimento 1) e em diferentes osmolaridades (experimento 2), em prolongar a qualidade dos espermatozoides durante o processo de resfriamento de sêmen em piabanha (*Brycon insignis*); no segundo, de criopreservação, o objetivo foi avaliar o efeito de diluidores, agentes crioprotetores, temperatura de descongelamento e soluções ativadoras da motilidade espermática no processo de criopreservação do sêmen de piabanha *Brycon insignis*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAROLSFELD, J.; HARVEY, B. **Conservação de recursos energéticos de peixes: teoria e prática**. Victoria: World Fisheries Trust, 1999.
- FOWLER, H. W. Os peixes de água doce do Brasil. **Arquivos de Zoologia**, São Paulo, v. 6, p.333-340, 1950.
- NOMURA, H. **Dicionário dos peixes do Brasil**. Brasília: Editerra, 1984. 482 p.
- OLIVEIRA, A. V.; VIVEIROS, A. T. M.; MARIA, A. N., FREITAS, R. T. F.; ISAÚ, Z. A. Sucesso do resfriamento e congelamento de sêmen de pirapitinga *Brycon nattereri*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 59, n. 6, p. 1509-1515, dez. 2007.
- PEREIRA, R. **Peixes de nossa terra**. 2. ed. São Paulo: Nobel, 1986. 129p.
- SALE, M. J. Aquatic ecosystem response to flow modification: an overview of the issues. In: OLSON, E. W. (Ed.). **Proceeding of the symposium on small hydropower and fisheries**. Bethesda: American Fisheries Society, 1985. p. 25-31.
- SALGADO, A. F. G.; CHAIN, M. G.; GIRARDI, L.; FARIA, C. A. **A conservação da piabanha (*Brycon insignis*) na Bacia do Rio Paraíba do Sul**. São Paulo: CESP, 1997. p. 1-28. (Relatório Técnico- CESP).
- SANTOS, E. **Peixes de água doce (vida e costumes dos peixes do Brasil)**. 4. ed. Belo Horizonte: Itatiaia, 1987.
- SHIMODA, E. **Análise e criopreservação do sêmen da piabanha *Brycon insignis* Steindachner, 1877 (Pisces, Characidae)**. 2004. 121 p. Tese (Doutorado em Produção Animal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Goytacazes.
- VIVEIROS, A. T. M. Criopreservação de sêmen de peixes. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16., 2005, Goiânia, GO. **Palestras...** Goiânia: CBRA, 2005. CD-ROM.

VIVEIROS, A. T. M.; ÓRFÃO, L. H.; MARIA, A. N.; ALLAMAN, I. B. A simple, inexpensive and successful freezing method for curimba *Prochilodus lineatus* (Characiformes) semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 112, n. 3/4, p. 293-300, June 2009.

CAPÍTULO 2

RESFRIAMENTO DE SÊMEN DO PEIXE TELEÓSTEO PIABANHA (*Brycon insignis*): EFEITO DE DILUIDORES, GENTAMICINA, OSMOLARIDADES E ATIVADORES

1 RESUMO

Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a eficiência de soluções imobilizadoras (diluidores) de sêmen, acrescidas ou não de gentamicina (experimento 1) e em diferentes osmolaridades (experimento 2), em prolongar a qualidade dos espermatozoides durante o processo de resfriamento em piabanha (*Brycon insignis*). No experimento 1, foram testados quatro diluidores simples (NaCl, NaCl-gentamicina, glicose e glicose-gentamicina) e dois mais complexos, à base de glicose, sais e gentamicina (BTS[®] e Androstar[®]). Uma alíquota do sêmen foi mantida sem diluição (controle). As taxas de motilidade, vigor (0 a 5) e duração espermática foram avaliados nos dias 0, 2 e 4 de resfriamento, após ativação com as soluções de NaCl 0,29% e de NaHCO₃ 1%. No experimento 2, os diluidores BTS[®] e Androstar[®] foram avaliados em diferentes osmolaridades. O BTS[®] foi avaliado em 316, 356 (padrão) e 396 mOsm; o Androstar[®] foi avaliado em 282, 322 (padrão) e 362 mOsm. A qualidade dos espermatozoides foi avaliada como no experimento 1 e apenas a solução de NaHCO₃ 1% foi utilizada como ativador. Em ambos os experimentos, todas as amostras de sêmen diluído e controle apresentavam excelente qualidade no dia 0 do resfriamento. No dia 2 do experimento 1, apenas as amostras diluídas em BTS[®] e Androstar[®] apresentavam motilidade espermática acima de 50%, vigor acima de 1,9 e duração acima de 50 segundos. A qualidade espermática em todas as amostras foi superior quando o NaHCO₃ 1% foi utilizado como ativador. A gentamicina foi benéfica apenas quando adicionada à solução de NaCl e a amostra ativada com NaHCO₃ 1%. No dia 4, todas as amostras de sêmen apresentavam baixa qualidade (0%-9% motilidade). No dia 2 do experimento 2, as melhores taxas de motilidade (60%-63%) e duração da motilidade (111-117 segundos) foram observadas nas amostras diluídas em Androstar[®] a 322 e 362 mOsm e no sêmen controle. No dia 4, todas as amostras de sêmen diluído apresentavam baixa qualidade (0%-10% motilidade); o sêmen controle, entretanto, apresentava motilidade de 43%. Nenhum dos diluidores testados prolongou a qualidade dos espermatozoides de piabanha, além de dois dias sob refrigeração. O diluidor Androstar[®] na osmolaridade padrão parece manter as condições de armazenamento mais estáveis, entretanto, é recomendado testar outros diluidores de sêmen e avaliá-los quanto à fertilidade do sêmen diluído e refrigerado.

2 ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the efficiency of immobilizing solutions (extenders) enriched or not with gentamycin (experiment 1) and in different osmolalities (experiment 2), on prolonging sperm quality during the refrigerated storage of piabanha (*Brycon insignis*). In experiment 1, four simple extenders (NaCl, NaCl-gentamycin, Glucose and Glucose-gentamycin) and two more complex extenders composed of glucose, salts and gentamycin (BTS™ and Androstar™) were tested. An aliquot of sperm was kept undiluted and served as control. Motility rate, quality score (0 to 5) and motility duration were evaluated on days 0, 2 and 4 of refrigerated storage after activation with NaCl 0.29% and NaHCO₃ 1%. In experiment 2, BTS™ and Androstar™ were further evaluated under different osmolalities. BTS™ was evaluated at 316, 356 (standard) and 396 mOsm; Androstar™ was evaluated at 282, 322 (standard) and 362 mOsm. Sperm quality was evaluated as described on experiment 1, and NaHCO₃ 1% was used as activation medium only. In both experiments, all diluted and control samples possessed high quality on day 0 of storage. On day 2 of experiment 1, only samples diluted in BTS™ or Androstar™ yielded motility above 50%, quality score above 1.9 and motility duration above 50 s. Sperm quality in all samples was higher when NaHCO₃ 1% was used as activation medium. Gentamycin was beneficial only when added to NaCl solution and activated with NaHCO₃ 1%. On day 4, all samples possessed low quality (0-9% motility). On day 2 of experiment 2, the highest motility rates (60-63%) and duration (111-117 s) were observed on samples diluted in Androstar™ at 322 and 362 mOsm, and in control samples. On day 4, all diluted samples yielded low quality (0-10% motility); control samples, however, yielded 43% motility. None of the extenders tested prolonged sperm quality of piabanha beyond two days of storage. The extender Androstar™ at its standard osmolality seems to keep more stable the environmental storage conditions. It is recommended, however, to test other sperm extenders and test the fertilizing capacity of diluted and stored sperm.

3 INTRODUÇÃO

Novas biotecnologias, visando à maior eficiência na reprodução animal, vêm sendo desenvolvidas. Em peixes, muitas dessas técnicas se aplicam à reprodução artificial e à preservação de sêmen. As técnicas de preservação de sêmen facilitam a reprodução artificial, contribuem em programas de melhoramento e conservação genética e na redução do número de reprodutores.

O resfriamento de sêmen é um método prático e simples para uso na rotina de pisciculturas e programas de preservação de espécies em risco de extinção, além de facilitar as trocas de materiais genéticos entre as fazendas produtoras de pescados. No entanto, é uma técnica ainda pouco utilizada, devido, principalmente, ao curto período de armazenamento do sêmen resfriado, evidenciado por baixas taxas de motilidade espermática.

A elaboração de um protocolo de resfriamento de sêmen, principalmente de espécies nativas, tem se mostrado específica para cada espécie, tanto para a duração do período de estocagem quanto para os diluidores usados. Os espermatozoides de peixes são imóveis no plasma seminal e esta característica favorece a sua preservação a curto prazo, já que eles não estarão utilizando energia para locomoção.

No processo de resfriamento de sêmen, uma solução diluidora deve ser utilizada, pois a diluição diminui a competição dos espermatozoides por oxigênio e espaço (Carolsfeld & Harvey, 1999). Os fatores determinantes do sucesso do resfriamento são a redução da temperatura, o fornecimento e a troca de gases, a prevenção do desenvolvimento bacteriano e a prevenção da dessecação (Stoss & Donaldson, 1982). O armazenamento prolongado, em condições de resfriamento, pode afetar profundamente a qualidade dos espermatozoides, uma vez que condições anaeróbicas associadas à contaminação microbiana reduzem a motilidade e a viabilidade espermáticas (Rurangwa et al., 2004).

Em outro estudo, o sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) foi resfriado por até 7 dias, apresentando motilidade espermática em torno de 40%, quando diluído em solução de NaCl-tris ou NaCl 1,2% (Maria et al., 2006) e o de pirapitinga (*Brycon nattereri*) foi resfriado, com sucesso, por 7 dias, quando diluído em BTS[®], com motilidade de 70% (Oliveira et al., 2007).

Entre as várias espécies de peixes migradores do rio Paraíba do Sul, encontra-se a piabanha (*Brycon insignis*), hoje considerada um peixe raro. A sobrevivência dessa espécie encontra-se bastante ameaçada pela poluição do rio Paraíba decorrente do lançamento de esgoto doméstico, industrial e agropecuário, como também pela introdução do dourado (*Salminus maxillosus*), um voraz predador. Estes fatores comprometeram seriamente a perpetuação dessas espécies. Durante a larvicultura da piabanha, é comum verificar-se canibalismo entre indivíduos, o que pode reduzir substancialmente o número de alevinos produzidos. Para minimizar as perdas, normalmente, são utilizadas larvas de outras espécies de peixe, como o curimatá, que servem como alimento para as piabanhas.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a eficiência de soluções imobilizadoras (diluidores) de sêmen, acrescidas ou não de gentamicina (Experimento 1) e dessas soluções em diferentes osmolaridades (Experimento 2), durante o processo de resfriamento, em piabanha *Brycon insignis*. A qualidade do sêmen foi avaliada quanto à motilidade subjetiva, vigor espermático e duração da motilidade espermática, durante 72 horas de resfriamento.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido durante o período reprodutivo (janeiro e fevereiro) da espécie. Foram utilizados machos de piabanha *Brycon insignis*,

provenientes da Estação de Piscicultura da Companhia Energética de São Paulo (CESP), Paraibuna, SP. Os animais que possuíam a papila urogenital hiperêmica e que liberavam sêmen sob leve massagem abdominal foram selecionados. Após a seleção, os machos receberam uma única dose de extrato bruto de hipófise de carpa (3 mg/kg do peso corporal) para induzir a espermição. Depois de 8 horas, o sêmen de cada animal foi coletado individualmente, de acordo com o manejo da estação. A coleta foi realizada em tubos de ensaio, evitando-se a contaminação do sêmen com água, sangue ou urina. Imediatamente após a coleta, o sêmen foi avaliado em microscopia de luz, como explicado a seguir.

4.1 Avaliação seminal

Imediatamente após a coleta, foram verificadas as seguintes características seminais: volume, concentração (câmara hematimétrica Neubauer “Improved”), pH do sêmen (medidor de pH portátil digital LT Lutron PH – 206) e osmolaridade (semimicro osmômetro K 7400 Knauer, Alemanha). A motilidade espermática foi avaliada em 5 µL de sêmen colocados em lâminas e levadas ao microscópio óptico (modelo L1000, Bioval, Jiangbei, China) previamente focalizado em 400 x. Todas as amostras apresentavam espermatozoides imóveis, demonstrando que o sêmen não havia sido contaminado por água ou urina. Nas quatorze amostras sem contaminação, a motilidade espermática foi, então, induzida com NaCl 0,29% (Maria et al., 2006) na diluição 1:5 e subjetivamente determinada. Para vigor espermático, foram atribuídos escores variando de 1 (intensidade de movimento muito lento dos espermatozoides) a 5 (intensidade de movimento muito rápido dos espermatozoides), segundo Mounib et al. (1968).

Durante todo o procedimento, o sêmen foi mantido em tubos de ensaio em banho de gelo ($15\pm 2^{\circ}\text{C}$).

4.2 Experimentos

4.2.1 Experimento 1: Diluidores de sêmen com diferentes formulações

Sêmen de 7 machos foi individualmente adicionado, 1:10 (v/v; em um volume total de 4,0 mL/amostra), em cada um dos diluidores descritos na Tabela 1. Os diluidores testados foram selecionados, baseando-se em estudos anteriores realizados com peixes da mesma família Characidae (Viveiros et al., 2009; Maria et al., 2006). Além dos diluidores BTS[®] e Androstar[®], os diluidores NaCl e glicose foram testados também após a adição de sulfato de gentamicina (Neo Gentamicin[®], Neo Química, Brasil) em uma concentração de 0,25 mg/mL do diluidor.

TABELA 1 Composição química dos diluidores testados durante o resfriamento de sêmen de piabanha *Brycon insignis*.

Componentes (g) ^a	Diluidores					
	NaCl	NaCl- gentamicina	Glicose	Glicose- gentamicina	BTS [®] ^b	Androstar [®] ^b
Glicose	--	--	5,00	5,00	4,00	2,65
Citrato de sódio	--	--	--	--	0,63	0,44
EDTA	--	--	--	--	0,13	0,26
Sulfato gentamicina	--	0,025	--	0,025	0,02	0,03
KCl	--	--	--	--	0,08	--
NaHCO ₃	--	--	--	--	0,13	0,54
NaCl	1,2	1,2	--	--	--	--
Tris	--	--	--	--	--	0,08
mOsm	373	369	308	300	356	322

^a Componentes foram diluídos em água deionizada, em um volume final de 100 mL

^b Doação da empresa Minitüb[®] (Tiefenbach/Landshut, Alemanha)

BTS[®]: Beltsville Thawing Solution[®]

Todos os diluidores tiveram o pH ajustado para 7,6, um dia antes do experimento ser realizado. Uma alíquota de sêmen de cada macho foi mantida sem diluição (controle). O sêmen diluído e o controle foram levados ao refrigerador (4-6°C) em tubos de ensaio de 10 mL. As taxas de motilidade e o vigor espermático foram avaliados nos dias 0, 2 e 4 após a refrigeração, conforme descrito para o sêmen fresco. A duração da motilidade espermática foi avaliada utilizando-se um cronômetro, o qual era acionado quando o meio ativador era misturado à amostra de sêmen e terminava aos 120 segundos ou quando apenas 10% dos espermatozoides ainda estavam se movendo, nos dias 0, 2 e 4 após a refrigeração.

Foram testadas duas soluções ativadoras da motilidade do sêmen: NaCl 0,29% e NaHCO₃ 1%.

4.2.2 Experimento 2: Diluidores de sêmen com diferentes osmolaridades

As diferentes osmolaridades foram obtidas adicionando-se mais ou menos água deionizada às soluções de BTS[®] e Androstar[®]. O pH dos diluidores foi ajustado como descrito no experimento 1. O sêmen de outros sete machos foi individualmente adicionado, nos diluidores Androstar[®] e BTS[®], da mesma forma descrita para o experimento 1. Para o diluidor BTS[®], as osmolaridades testadas foram 356 (osmolaridade inicial, medida assim que a solução foi preparada), 316 (40 mOsm abaixo da sua osmolaridade inicial) e 396 (40 mOsm acima da sua osmolaridade inicial). O mesmo foi feito para o diluidor Androstar[®], porém, sua osmolaridade inicial era 322 mOsm e as outras osmolaridades estudadas, 282 e 362 mOsm, respectivamente.

Uma alíquota de sêmen de cada macho foi mantida sem diluição (controle). O sêmen diluído e o controle foram levados ao refrigerador (4°-6°C), em tubos de ensaio de 10 mL. As taxas de motilidade, vigor e duração espermática foram avaliadas nos dias 0, 2 e 4 após a refrigeração. A solução de

NaHCO₃ 1% foi utilizada como ativadora. Este experimento foi conduzido em delineamento em blocos casualizados (1 bloco = 1 macho), com parcelas subdivididas no tempo.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as variáveis observadas (taxa de motilidade, duração espermática e vigor), o resíduo de cada modelo foi testado para distribuição normal. Os valores de motilidade que não apresentaram distribuição normal foram transformados em $\arcsin \sqrt{y/100}$; os valores da duração da motilidade espermática transformados pelo procedimento Box & Cox (1964) e, para os valores de vigor espermático, a transformação foi $\sqrt{\text{vigor} + 1,0}$, para a 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 software R, versão, 2.7.1 (R Core Development Team, 2008).

6 RESULTADOS

6.1 Avaliação seminal

O peso corporal dos peixes e as características seminais estão descritos na Tabela 2.

TABELA 2 Peso dos machos e características do sêmen fresco de piabanha
Brycon insignis.

Características	n° machos	Média±DP	Mín-Máx
Peso corporal (g)	14	300±35	245-370
Volume (mL)	14	5,5±2	3-8,5
Espermatozoides x 10 ⁹ mL	14	28±7,5	12-39
pH	7	8,4±0,2	8,1-8,6
Osmolaridade (mOsm/kg)	14	366±15	348-395
Motilidade (%)	14	98±4	90-100
Vigor (1-5)	14	4±0,6	3-5

Vigor: escala 1-5 (1: intensidade de movimento muito lento dos espermatozoides; 5: intensidade de movimento muito rápido dos espermatozoides)

6.1.1 Experimento 1: Diluidores de sêmen com diferentes formulações

Na análise da motilidade espermática, o sêmen diluído em todos os diluidores e testados imediatamente (dia 0) produziu taxas em torno de 90% (Tabela 3). Após o segundo dia de resfriamento, a motilidade em torno de 50% foi observada apenas nas amostras diluídas em BTS[®] e Androstar[®]. Baixas motilidades foram observadas nas amostras diluídas ou sem diluição (controle), após 4 dias de resfriamento. A taxa de motilidade do sêmen resfriado sem diluição diminuiu significativamente a 2%, no dia 4.

TABELA 3 Motilidade espermática (expressa em %; média±DP; n = 7 peixes) do sêmen de piabanha *Brycon insignis* diluído em diferentes diluidores e resfriado a 4°-6°C, por até 4 dias.

Diluidor	Ativador	Resfriamento (dias)		
		0	2	4
NaCl		84±5 ^{A a}	3±5 ^{D b}	0 ^{A b}
NaCl-gentamicina		91±7 ^{A a}	4±5 ^{D b}	0 ^{A b}
Glicose	NaCl 0,29%	93±5 ^{A a}	0 ^{D b}	0 ^{A b}
Glicose-gentamicina		94±8 ^{A a}	0 ^{D b}	0 ^{A b}
BTS [®]		90±11 ^{A a}	53±21 ^{A b}	3±5 ^{A c}
Androstar [®]		86±10 ^{A a}	50±27 ^{A b}	9±19 ^{A c}
Controle		93±11 ^{A a}	24±26 ^{C b}	1±4 ^{A b}
NaCl		96±5 ^{A a}	14±13 ^{C b}	1±4 ^{A b}
NaCl-gentamicina		96±8 ^{A a}	33±30 ^{B b}	0 ^{A c}
Glicose	NaHCO ₃ 1%	90±15 ^{A a}	0 ^{D b}	0 ^{A b}
Glicose-gentamicina		91±15 ^{A a}	0 ^{D b}	0 ^{A b}
BTS [®]		91±9 ^{A a}	53±18 ^{A b}	3±5 ^{A c}
Androstar [®]		94±5 ^{A a}	67±11 ^{A b}	4±5 ^{A c}
Controle		96±5 ^{A a}	44±26 ^{B b}	3±5 ^{A c}

Médias com a mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade.

BTS[®] e Androstar[®]: para formulação, consultar Tabela 1

Para o vigor espermático, o sêmen diluído em todos os diluidores e testados imediatamente (dia 0) obteve vigor em torno de 4 (Tabela 4). Após o segundo dia de resfriamento, vigor em torno de 1,1-2,6 foi observado nas amostras diluídas em BTS[®], Androstar[®], NaCl-gentamicina e no sêmen sem diluição (controle).

TABELA 4 Vigor espermático (expresso na escala 1-5; média±DP; n = 7 peixes) do sêmen de piabanha *Brycon insignis* diluído em diferentes diluidores e resfriado a 4°-6°C, por até 4 dias.

Diluidor	Ativador	Resfriamento (dias)		
		0	2	4
NaCl		3,7±0,5 ^{A a}	0,3±0,5 ^{D b}	0 ^{A b}
NaCl-gentamicina		3,6±1,0 ^{A a}	0,3±0,5 ^{D b}	0 ^{A b}
Glicose	NaCl 0,29%	3,7±0,8 ^{A a}	0 ^{D b}	0 ^{A b}
Glicose-gentamicina		4,3±1,0 ^{A a}	0 ^{D b}	0 ^{A b}
BTS [®]		2,7±1,0 ^{B a}	2,0 ^{B a}	0 ^{A b}
Androstar [®]		2,4±0,8 ^{B a}	1,9±1,1 ^{B a}	0,3±0,8 ^{A b}
Controle		3,7±1,0 ^{A a}	1,0±1,0 ^{C b}	1,0±1,3 ^{A b}
NaCl		4,0±1,0 ^{A a}	1,4±1,8 ^{C b}	0,3±0,8 ^{A b}
NaCl-gentamicina		4,9±0,4 ^{A a}	2,0±1,5 ^{B b}	0 ^{A c}
Glicose	NaHCO ₃ 1%	4,7±0,5 ^{A a}	0 ^{D b}	0 ^{A b}
Glicose-gentamicina		4,7±0,5 ^{A a}	0 ^{D b}	0 ^{A b}
BTS [®]		4,3±1,1 ^{A a}	2,9±0,7 ^{A b}	0,3±0,8 ^{A c}
Androstar [®]		4,4±0,5 ^{A a}	3,3±0,8 ^{A b}	0,3±0,8 ^{A c}
Controle		4,4±0,8 ^{A a}	2,3±1,1 ^{B b}	0,9±1,5 ^{A c}

Médias com a mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade.

BTS[®] e Androsta[®]: para formulação, consultar Tabela 1

Vigor: escala 1-5 (1: intensidade de movimento muito lento dos espermatozoides; 5: intensidade de movimento muito rápido dos espermatozoides)

Na duração da motilidade espermática, os maiores valores (120 segundos) foram observados no dia 0, quando o sêmen estava diluído em qualquer um dos diluidores estudados e ativado com NaHCO₃ 1%, ou diluído em glicose (104 segundos), glicose-gentamicina (109 segundos), NaCl (97 segundos), NaCl-gentamicina (99 segundos) e no sêmen sem diluição (controle),

quando ativado com NaCl 0,29% (Tabela 5). Após o segundo dia de resfriamento, o sêmen sem diluição obteve a duração de 120 segundos, quando ativado com NaHCO₃ 1%. O sêmen diluído em BTS[®], Androstar[®] e NaCl-gentamicina também produziu duração espermiática alta (97-108 segundos), quando ativado com NaHCO₃ 1%. Após 2 e 4 dias de resfriamento, a duração da motilidade espermiática do sêmen resfriado em glicose e glicose-gentamicina e ativado com NaHCO₃ 1% ou NaCl 0,29% diminuiu significativamente a 0.

TABELA 5 Duração da motilidade espermiática (expressa em segundos; média±DP; n = 7 peixes) do sêmen de piabanha *Brycon insignis* diluído em diferentes diluidores e resfriado a 4°-6°C, por até 4 dias.

Diluidor	Ativador	Resfriamento (dias)		
		0	2	4
NaCl		97±24 ^{A a}	3±5 ^{D b}	2±4 ^{B b}
NaCl- gentamicina		99±23 ^{A a}	4±5 ^{D b}	0 ^{B b}
Glicose	NaCl 0,29%	104±23 ^{A a}	0 ^{D b}	0 ^{B b}
Glicose -gentamicina		109±14 ^{A a}	0 ^{D b}	0 ^{B b}
BTS [®]		87±20 ^{B a}	57±15 ^{B b}	3±5 ^{B c}
Androstar [®]		81±20 ^{B a}	50±19 ^{C b}	10±22 ^{B c}
Controle		120 ^{A a}	40±44 ^{B b}	0 ^{B c}
NaCl		120 ^{A a}	86±58 ^{B b}	17±45 ^{B c}
NaCl-gentamicina		120 ^{A a}	103±45 ^{A a}	0 ^{B b}
Glicose	NaHCO ₃ 1%	120 ^{A a}	0 ^{D b}	0 ^{B b}
Glicose-gentamicina		117±7,5 ^{A a}	0 ^{D b}	0 ^{B b}
BTS [®]		120 ^{A a}	108±30 ^{A a}	34±58 ^{A b}
Androstar [®]		120 ^{A a}	97±27 ^{A a}	51±64 ^{A b}
Controle		120 ^{A a}	120 ^{A a}	34±58 ^{A b}

Médias com a mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade.

BTS[®] e Androstar[®]: para formulação, consultar Tabela 1

6.1.2 Experimento 2: Diluidores de sêmen com diferentes osmolaridades

A motilidade do sêmen diluído e resfriado a 4°-6°C está apresentada na Tabela 6. O sêmen diluído em todas as soluções apresentou motilidade espermática alta (92%-97%), semelhante ao sêmen não diluído (controle), no dia 0. Após dois dias do resfriamento, foi observada uma redução na motilidade espermática após ativação, em todas as amostras diluídas e não diluídas. As maiores motilidades (60%-63%) foram observadas no sêmen não diluído e nas amostras diluídas em Androstar[®] 322 e 362 mOsm. Todas as amostras diluídas em BTS[®] apresentaram baixa motilidade (4%-10%). No 4° dia do resfriamento, o sêmen não diluído apresentou a maior motilidade (43%). A motilidade de todas as amostras diluídas variou entre 0% e 10%.

Os diluidores testados foram capazes de manter alto o vigor espermático imediatamente após a diluição, no dia 0 (Tabela 7). No segundo dia, o sêmen diluído em Androstar[®] 322 e 362 mOsm teve vigor espermático superior (3,4-3,6) ao do sêmen não diluído (controle) e diluído nas outras soluções (0,9-2,8). No dia 4 do resfriamento, apenas o sêmen não diluído (controle) apresentou vigor espermático acima de 2.

Na duração da motilidade espermática, o sêmen diluído em todos os diluidores e o sêmen controle (não diluído), testados imediatamente (dia 0), produziram duração de, no mínimo, 120 segundos (Tabela 8). No segundo dia, apenas o sêmen diluído em Androstar[®] 322 e 362 mOsm e o sêmen controle mantiveram alta a duração da motilidade espermática (111-117 segundos), enquanto o sêmen diluído em BTS[®] 316 e 396 mOsm, devido à baixa taxa de motilidade espermática (abaixo de 10%), não foi avaliado quanto à duração da motilidade. Após 4 dias de resfriamento, apenas o sêmen diluído em Androstar[®] 322 mOsm e o sêmen controle apresentavam duração de motilidade (21-77 segundos).

TABELA 6 Motilidade espermática (expressa em %; média±DP; n = 7 peixes) do sêmen de piabanha *Brycon insignis* diluído em diferentes diluidores e resfriado a 4°-6°C, por até 4 dias.

Diluidores	Osmolaridades	Resfriamento (dias)		
		0	2	4
BTS [®]	316	94±5 ^{A a}	4±5 ^{C b}	0 ^{B b}
BTS [®]	356	92±11 ^{A a}	10±6 ^{C b}	0 ^{B b}
BTS [®]	396	94±5 ^{A a}	7±5 ^{C b}	0 ^{B b}
Androstar [®]	282	96±5 ^{A a}	34±23 ^{B b}	1±4 ^{B c}
Androstar [®]	322	96±5 ^{A a}	60±15 ^{A b}	10±11 ^{B c}
Androstar [®]	362	97±5 ^{A a}	63±18 ^{A b}	3±5 ^{B c}
Controle		100 ^{A a}	60±26 ^{A b}	43±28 ^{A c}

Médias com a mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade.

BTS[®] e Androstar[®]: para formulação, consultar Tabela 1

TABELA 7 Vigor espermático (média±DP; n = 7 peixes) do sêmen de piabanha *Brycon insignis* diluído em diferentes diluidores e resfriado a 4°-6°C, por até 4 dias.

Diluidores	Osmolaridades	Resfriamento (dias)		
		0	2	4
BTS [®]	316	3,1±0,4 ^{C a}	0,9±1,2 ^{C b}	0 ^{C c}
BTS [®]	356	3,7±0,5 ^{C a}	2,0±1,0 ^{B b}	0 ^{C c}
BTS [®]	396	4,8±0,4 ^{A a}	1,1±0,9 ^{C b}	0 ^{C c}
Androstar [®]	282	4,4±0,5 ^{B a}	2,8±0,9 ^{B b}	0,1±0,3 ^{C c}
Androstar [®]	322	4,4±0,8 ^{B a}	3,6±0,8 ^{A b}	1,1±1,3 ^{B c}
Androstar [®]	362	4,7±0,5 ^{A a}	3,4±0,8 ^{A b}	0,3±0,4 ^{C c}
Controle		4,0 ^{B a}	2,4±0,5 ^{B b}	2,3±0,7 ^{A b}

Médias com a mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade.

BTS[®] e Androstar[®]: para formulação, consultar Tabela 1

TABELA 8 Duração da motilidade espermática (expressa em segundos; média ± DP; n = 7 peixes) do sêmen de piabanha *Brycon insignis* diluído em diferentes diluidores e resfriado a 4°-6°C, por até 4 dias.

Diluidores	Osmolaridades	Resfriamento (dias)		
		0	2	4
BTS [®]	316	120 ^{A a}	-	-
BTS [®]	356	120 ^{A a}	7±19 ^{C b}	0 ^{B b}
BTS [®]	396	120 ^{A a}	-	-
Androstar [®]	282	120 ^{A a}	73±56 ^{B b}	0 ^{B c}
Androstar [®]	322	120 ^{A a}	116±8 ^{A a}	21±38 ^{B b}
Androstar [®]	362	120 ^{A a}	117±7 ^{A a}	0 ^{B b}
Controle		120 ^{A a}	111±23 ^{A a}	77±45 ^{A b}

Médias com a mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade.

BTS[®] e Androstar: para formulação, consultar Tabela 1

7 DISCUSSÃO

7.1 Características seminais da piabanha

No presente trabalho, alguns parâmetros físico-químicos do sêmen fresco da piabanha foram avaliados. A motilidade espermática, observada após ativação com NaCl 0,29%, foi de 98%, estando bem próximo de 100%, como descrito para a pirapitinga (*Brycon nattereri*) (Oliveira et al., 2007).

Foi observada, neste estudo, uma concentração espermática de 28×10^9 espermatozoides/mL de sêmen após hipofiseação de dose única de extrato bruto de hipófise de carpa, próximo à encontrada para a mesma espécie, $24,38 \times 10^9$ espermatozoides/mL (Shimoda, 2004). Em pirapitinga, outra espécie de *Brycon*, a média de concentração foi de 30×10^9 espermatozoides/mL (Oliveira et al., 2007), enquanto na piracanjuba, a concentração obtida foi de $5,88 \times 10^9$ espermatozoides/mL (Maria et al., 2006). Neste trabalho, foi coletado um volume médio de 5,5 mL. Em piracanjuba, foi encontrado volume médio superior a 15 mL (Maria et al., 2006), enquanto que, em pirapitinga, o volume médio foi de 7,6 mL (Oliveira et al., 2007).

Pode-se observar, de maneira geral, que as espécies de peixes que produzem sêmen de maior volume também produzem sêmen de menor concentração espermática. 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). Além disso, os dados de concentração espermática permitem que seja determinado o número mínimo de espermatozoides por óvulo, durante o processo de fertilização. Dessa forma, pode-se melhorar a eficiência reprodutiva dos machos, maximizando a sua utilização.

7.2 Diluidores de sêmen com diferentes formulações

No presente trabalho, foram avaliados dois grupos de soluções diluidoras: as soluções simples (NaCl e glicose, com e sem acréscimo de gentamicina) e as soluções complexas (BTS[®] e Androstar[®], em sua formulação padrão e em diferentes osmolaridades). No grupo de soluções simples, o sêmen diluído nas soluções de glicose (acrescida ou não de gentamicina) e NaCl (acrescida ou não de gentamicina) teve comportamento semelhante logo após a diluição. A motilidade foi reduzida a zero para o sêmen diluído em glicose e glicose-gentamicina no dia 2, e a motilidade do sêmen diluído em NaCl e NaCl-gentamicina reduzida a 9% e 19%, respectivamente, também no dia 2. Especulase que a diminuição da motilidade no sêmen diluído em glicose e glicose-gentamicina seja devido às baixas osmolaridades (308 e 300, respectivamente), quando comparadas ao sêmen diluído nos outros diluidores, com osmolaridades entre 322 e 356 mOsm. No resfriamento de sêmen de pirapitinga (*Brycon nattereri*), o sêmen diluído em solução de BTS[®] produziu a maior motilidade de 48% até sete dias de resfriamento (Oliveira et al., 2007). Em piracanjuba, o sêmen diluído na solução de NaCl 1,2% foi viável por até sete dias de resfriamento, com motilidade de 37% (Maria et al., 2006).

Neste experimento, o sêmen diluído em BTS[®] e Androstar[®], até o dia 2 de resfriamento, apresentou taxa de motilidade e vigor espermático superior ao sêmen não diluído (controle) e diluído nas outras soluções avaliadas. Para a duração espermática, o sêmen diluído em BTS[®] e Androstar[®], até o dia 2 de resfriamento, apresentou altos valores (50-108 segundos) em relação ao sêmen não diluído (controle 40- 120 segundos) estando dentro do valor encontrado para *Brycon orbignyanus* (56 segundos), (Viveiros & Godinho, 2009). Pelos resultados obtidos, observa-se que a diluição, em uma solução que preserve a duração da motilidade espermática, permite o resfriamento do sêmen por até

dois dias, aumentando também o volume de sêmen, o que pode auxiliar na rotina de pisciculturas.

A presença de bactérias pode diminuir a qualidade do sêmen por produção de enzimas extracelulares e por consumo de oxigênio (Jenkins & Tiersch, 1997). Assim, o uso de antibióticos poderia aumentar o tempo de armazenamento do sêmen, por prevenir o crescimento bacteriano. A adição de antibióticos nos diluidores de sêmen durante o resfriamento tem sido pouco estudada em peixes. Neste trabalho, as soluções de NaCl e glicose, acrescidas de gentamicina, não foram capazes de manter alta a taxa de motilidade espermática até o segundo dia de resfriamento. Porém, quando a gentamicina foi adicionada ao diluidor NaCl, as taxas de motilidade, vigor e duração espermática tiveram sensível melhora, quando comparados somente ao diluidor NaCl sem a adição da gentamicina. No resfriamento de sêmen de piracanjuba diluído na solução de NaCl- tris e de NaCl 1,2%, não houve diferença entre o sêmen diluído em solução acrescida ou não de gentamicina, porém, os autores sugerem que doses maiores de gentamicina possam ser efetivas (Maria et al., 2006). Ainda no resfriamento de sêmen de piracanjuba, avaliando-se a solução diluidora de NaCl-tris associada a diferentes concentrações de gentamicina (0,01; 0,1; 0,5 e 1,0 mg/mL), observou-se que amostras de sêmen acrescidas de gentamicina apresentaram maior motilidade espermática em relação ao controle no dia 4. No sêmen diluído em meios que continham as concentrações de gentamicina de 0,1, 0,5 e 1,0 mg/mL, foram observadas motilidades superiores a 24%, até o dia 6 de resfriamento e não houve crescimento bacteriano (Isaú, 2006). No presente estudo, a diluição do sêmen em NaCl e glicose, acrescido ou não de sulfato de gentamicina na concentração de 0,25 mg/mL, não produziu resultados satisfatórios durante o resfriamento de sêmen de piabanha *Brycon insignis*. Porém, uma superioridade do diluidor NaCl-gentamicina foi observada

em relação ao NaCl, quando o sêmen foi ativado com a solução de NaHCO₃ 1%, para os parâmetros estudados (motilidade, vigor e duração espermática).

7.3 Diluidores de sêmen com diferentes osmolaridades

Como foi visto neste trabalho, as osmolaridades de 322 e 362 da solução de Androstar[®] e o sêmen não diluído (controle- 358 mOsm) proporcionaram as maiores taxas de motilidade espermática até o segundo dia de resfriamento. Essas osmolaridades do Androstar[®] estão muito próximas à do sêmen controle (não diluído).

A osmolaridade ideal da solução diluidora pode ser diretamente dependente da osmolaridade do sêmen. Não há relatos, na literatura, da osmolaridade do plasma seminal em peixes nativos. No presente estudo, a osmolaridade encontrada para o sêmen fresco de piabanha foi 366±15 mOsm. A osmolaridade, ou pressão osmótica, tem influência sobre a motilidade espermática, sendo a ativação dos espermatozoides parcial ou totalmente dependente da iso ou da hipotonicidade da solução diluente em relação ao plasma seminal (Shimoda, 1999). Em salmonídeos, a alta pressão osmótica (400 mOsmol/kg) inibe a motilidade do espermatozoide (Turdakov, 1970; Morisawa & Suzuki, 1980).

No presente trabalho, o sêmen diluído na solução de Androstar[®] foi viável por até dois dias, apresentando motilidade espermática de 63%, sem a necessidade de adição de qualquer crioprotetor. Os diluidores BTS[®] e o Androstar[®] foram testados pela primeira vez durante o resfriamento de sêmen de piabanha. O diluidor BTS[®] não demonstrou, neste experimento, ser tão eficiente quanto no experimento 1, no qual, até o dia 2 de resfriamento, apresentou taxas de motilidade em torno de 50%, provavelmente devido aos diferentes animais utilizados nos experimentos. O diluidor Androstar[®] mostrou ser eficiente na manutenção da motilidade espermática, até dois dias de resfriamento. Além das

causas citadas anteriormente, podem existir outras, responsáveis pelo curto período de viabilidade espermática, tais como consumo de oxigênio, déficit de nutrientes, enzimas e toxinas liberadas pela morte celular e fatores genéticos relacionados à sobrevivência dos espermatozoides (requerimentos da espécie), quando comparados a outros *Brycons*.

O diluidor Androstar[®] se destacou em relação ao BTS[®] na manutenção da motilidade espermática, vigor e duração da motilidade até dois dias de resfriamento. Embora o BTS[®] também tenha, em sua composição, 80% de glicose, essa superioridade do Androstar[®] em manter alta a motilidade espermática pode ser devido à presença de uma maior quantidade de sulfato de gentamicina na sua composição e também à presença de tris, que tem, entre outras, a função de potencializar a ação da gentamicina e do EDTA.

Outras osmolaridades devem ser testadas no resfriamento de sêmen de piabanha para que o período de armazenamento possa ser prolongado para além de dois dias.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAVI, S. M. H.; COSSON, J. Sperm motility in fishes: (I) effects of temperature and pH. **Cell Biology International**, London, v. 29, n. 2, p. 101-110, Feb. 2005.

BOITANO, S.; OMOTO, C. K. Trout sperm swimming patterns: role of intracellular Ca²⁺. **Cell Motil and the Cytoskeleton**, Saint Paul, v. 21, n. 1, p. 74-82, 1992.

BOX, G. E. P.; COX, D. R. An analysis of transformations. **Journal of the royal statistical society**, New York, v. 26, p. 42, n. 2, 1964

CAROLSFELD, J.; HARVEY, B. **Conservação de recursos energéticos de peixes: teoria e prática**. Victoria: World Fisheries Trust, 1999.

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

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

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

ISAÚ, Z. A. **População bacteriana, motilidade espermática e fertilidade de sêmen de piracanjuba *Brycon orbignyanus* (VALENCIENNES, 1849) submetido ao resfriamento**. 2006. 94 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

JENKINS, J. A.; TIERSCH, T. R. A preliminary bacteriological study of refrigerated channel catfish sperm. **Journal World Aquaculture Society**, Baton Rouge, v. 28, n. 3, p. 282-288, Sept. 1997.

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.

MARIA, A. N.; VIVEIROS, A. T.; M.; FREITAS, R. T. F.; OLIVEIRA, A. V. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 260, n. 1/4, p. 298-306, Sept. 2006.

MARQUES, S. **Preservação a curto prazo do sêmen de teleósteos neotropicais de água doce**. 2001. 83 p. Dissertação (Mestrado em Zoologia) – 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 em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

MORISAWA, M.; SUZUKI, K. Osmolality and potassium ion: their roles in initiation of sperm motility in teleosts. **Science**, Washington, v. 210, n. 4474, p. 1145-1147, 1980.

MOUNIB, N. S.; HWANG, P. C.; IDLER, D. R. Cryogenic preservation of Atlantic cod (*Gadus morhua*) sperm. **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, Ottawa, v. 25, p. 2623-2632, 1968.

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

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

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna: R foundation for statistical computing, 2008. Disponível em : <<http://www.r-project.org>>. Acesso em: 10 abr. 2009.

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

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

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, Goytacazes.

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

SUQUET, M.; 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.

TURDAKOV, A. F. Effect of various concentrations of Ringer Solution on trout sperm behaviour. **Dopovidi Akademiji Nauk Ukrainkoirsr. Serie B. Geologicni, himicni ta biologicni nauki**, Kiev, v. 74, p.20-24, Jan. 1970.

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

VIVEIROS, A. T. M.; GODINHO, H. P. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. **Fish Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 35, n. 1, p. 137-150, Mar. 2009.

VIVEIROS, A. T. M.; ÓRFÃO, L. H.; MARIA, A. N.; ALLAMAN, I. B. A simple, inexpensive and successful freezing method for curimba *Prochilodus lineatus* (Characiformes) semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 112, n. 3/4, p. 293-300, June 2009.

CAPÍTULO 3

CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DO PEIXE TELEÓSTEO PIABANHA (*Brycon insignis*): EFEITO DE DILUIDORES, CRIOPROTETORES, TEMPERATURA DE DESCONGELAMENTO E SOLUÇÕES ATIVADORAS

1 RESUMO

Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito de diluidores, agentes crioprotetores, temperatura de descongelamento e soluções ativadoras da motilidade espermática no processo de criopreservação do sêmen de piabanha *Brycon insignis*. No experimento 1, foram avaliados oito meios de congelamento compostos pela combinação de quatro diluidores (NaCl, glicose, BTS[®] e M III[®]) e dois crioprotetores (dimetilsulfóxido-DMSO e metilglicol). O sêmen foi congelado em vapor de nitrogênio a -170°C e armazenado em nitrogênio líquido. A motilidade espermática foi avaliada após descongelamento a 60°C e ativação com NaCl 0,29% e NaHCO₃ 1%. No experimento 2, foram avaliados quatro meios de congelamento compostos pelos diluidores do experimento 1 e metilglicol. O sêmen foi descongelado a 30°C e a 60°C, ativado com os mesmos ativadores e a qualidade avaliada quanto à motilidade, ao vigor (escala de 0 a 5) e à duração da motilidade. No experimento 1, as maiores taxas de motilidade espermática foram observadas no sêmen criopreservado em metilglicol (76%-88%), em relação ao DMSO (23%-59%). Não houve efeito dos diluidores na motilidade e o NaHCO₃ 1% foi melhor ativador do que o NaCl 0,29% apenas quando o DMSO foi utilizado como crioprotetor. No experimento 2, não houve efeito dos diluidores, das temperaturas de descongelamento e nem dos ativadores na motilidade espermática (59%-70%). De maneira geral, os maiores escores de vigor espermático foram observados nas amostras descongeladas a 30°C e ativadas com NaHCO₃ 1%. A duração da motilidade espermática foi mais longa (95-120 segundos) quando o ativador NaHCO₃ 1% foi utilizado. O sêmen de piabanha pode ser congelado em meio contendo qualquer um dos quatro diluidores testados, combinados ao metilglicol. O descongelamento deverá ser feito a 30°C e a motilidade deverá ser ativada com NaHCO₃ 1%. Dessa forma, o sêmen descongelado apresentará ótima qualidade, mas ainda deverá ser testado quanto à capacidade de fertilizar ovócitos.

2 ABSTRACT

The aim of this work was to test the effects of extenders, cryoprotectant agents, thawing temperatures and activation media on the cryopreservation process of piabanha *Brycon insignis* sperm. On experiment 1, eight freezing media composed of four extenders (NaCl, glucose, BTS™ and M III™) and two cryoprotectants (dimethylsulphoxide-DMSO and methylglycol) were tested. Sperm was frozen in nitrogen vapor at -170°C and stored in liquid nitrogen. Sperm motility was evaluated after thawing at 60°C and activated with NaCl 0.29% and NaHCO₃ 1%. In experiment 2, four freezing media composed of the same extenders tested on experiment 1 and methylglycol were evaluated. Sperm was thawed at 30°C and 60°C, activated with the same activation media and sperm quality was evaluated in terms of motility rate, quality score (0 to 5) and motility duration. In experiment 1, the highest motility rates were observed when sperm was cryopreserved in methylglycol (76-88%), compared to DMSO (23-59%). There was no effect of extenders on motility, and NaHCO₃ 1% was a better activation medium than NaCl 0.29% only when DMSO was used as cryoprotectant. In experiment 2, there was no effect of extenders, thawing temperatures or activation media on post-thaw sperm motility (59-70%). In general, the highest quality scores were observed when sperm was thawed at 30°C and activated with NaHCO₃ 1%. Motility duration was longer (95-120 s) when NaHCO₃ 1% was used as activation medium. Piabanha sperm can be frozen in a medium composed of any of the four extenders tested, and methylglycol. Thawing should be carried out at 30°C and motility should be activated with NaHCO₃ 1%. Using this methodology, thawed sperm possess great quality, but fertilization trial is still needed.

3 INTRODUÇÃO

Muitas espécies de peixes tropicais realizam migrações no período reprodutivo. Essas espécies migram para os locais de desova e esse processo caracteriza a piracema, que acontece quando, pelas condições climáticas e estímulos hormonais, os peixes se encontram aptos para a reprodução (Godinho & Godinho, 1994). A construção de barragens interrompe este ciclo reprodutivo e, juntamente com o assoreamento de rios e a pesca predatória, prejudica a sobrevivência dessas espécies, como a piabanha (*Brycon insignis*) que se encontra bastante ameaçada pela poluição do rio Paraíba do Sul, decorrente do lançamento de esgoto doméstico, industrial e agropecuário, como também pela introdução do dourado (*Salminus maxillosus*), um voraz predador. Estes fatores comprometeram seriamente a perpetuação dessa espécie. No que se refere à sua utilização, é considerada espécie de alto valor comercial e muito apreciada pela resistência à captura com anzol na pesca esportiva. A exploração para fins comerciais é ainda praticamente inexistente, tendo as estações de piscicultura com criação de piabanhas apenas fins conservacionistas (Shimoda, 2004).

A criopreservação do sêmen é uma alternativa para otimizar a reprodução durante o período da piracema. Dessa maneira, é possível formar um banco de sêmen dessa espécie, aumentando a variabilidade genética dos estoques por meio de permuta de material genético entre as estações de piscicultura. Outro benefício da criopreservação é a eliminação do problema da assincronia da maturidade gonadal entre machos e fêmeas (Viveiros, 2005).

Alguns trabalhos envolvendo a criopreservação de sêmen de peixes da família *Bryconidae*, já foram descritos, lançando protocolos efetivos para o congelamento do sêmen de piracanjuba (Bedore, 1999; Carolsfeld et al., 2003; Maria et al., 2006) e de pirapitinga (*B. nattereri*) (Oliveira et al., 2007).

Para ser criopreservado, o sêmen precisa ser diluído em meio contendo diluidor e crioprotetor intracelular. Os diluidores são soluções de sais ou de carboidratos que ajudam a manter a viabilidade das células durante o congelamento e permitem que os crioprotetores intracelulares ou extracelulares atinjam o interior e a superfície dos espermatozoides. Os diluidores devem manter os espermatozoides imóveis e ser estéreis (Carolsfeld & Harvey, 1999).

Os crioprotetores intracelulares são substâncias que protegem os espermatozoides durante o processo de congelamento. Eles reduzem o ponto de congelamento do meio extracelular, atenuam os efeitos deletérios dos cristais de gelo e regulam a velocidade de desidratação das células, reduzindo os danos causados pela alta concentração de soluto durante o congelamento lento (Viveiros, 2005). O dimetil sulfóxido (DMSO) é um dos mais utilizados no sêmen de peixes. O metilglicol ainda é pouco estudado neste processo e foi utilizado pela primeira vez em *Brycons* por Maria et al. (2006), na criopreservação de sêmen de piracanjuba, e na pirapitinga por Oliveira et al. (2007).

Os espermatozoides de peixe são imóveis no testículo e no líquido seminal (Leung & Jamieson, 1991). Para a ativação dos espermatozoides dos peixes de água doce, é necessário o contato com uma solução de pressão osmótica menor que a do sêmen. Comumente, são utilizadas soluções de cloreto de sódio e bicarbonato de sódio em baixas concentrações, além da água destilada.

Este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito dos diluidores, dos crioprotetores e das temperaturas de descongelamento na eficiência do processo de criopreservação e das soluções ativadoras da motilidade, vigor e duração espermática do sêmen de piabanha *Brycon insignis*. Visando obter um protocolo para utilização na rotina de laboratórios de reprodução e formação de um banco de sêmen nas estações de piscicultura,

facilitando o manejo da piabanha, uma espécie considerada ameaçada de extinção.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido durante o período reprodutivo (janeiro e fevereiro) da espécie. Foram utilizados machos de piabanha *Brycon insignis* provenientes da Estação de Piscicultura da Companhia Energética de São Paulo (CESP), Paraibuna, SP. Os animais que possuíam a papila urogenital hiperêmica e que liberavam sêmen sob leve massagem abdominal foram selecionados. Após a seleção, os machos receberam uma única dose de extrato bruto de hipófise de carpa (3 mg/kg do peso corporal) para induzir a espermição. Depois de 8 horas, o sêmen de cada animal foi coletado individualmente, de acordo com o manejo da estação. A coleta foi realizada em tubos de ensaio, evitando-se a contaminação do sêmen com água, sangue ou urina.

4.1 Avaliação inicial do sêmen

Imediatamente após a coleta, 5 μ L de sêmen de cada macho foram colocados em lâminas e levadas ao microscópio óptico (modelo L1000, Bioval, Jiangbei, China) previamente focalizado em 400 x. Todas as amostras (n= 18) apresentavam espermatozoides imóveis, demonstrando que o sêmen não havia sido contaminado por água ou urina. A motilidade espermática foi, então, induzida com NaCl 0,29%, na proporção 1:5 e subjetivamente determinada utilizando-se uma escala de 0% a 100%. Para vigor espermático, foram atribuídos escores variando de 1 (intensidade de movimento muito lento dos espermatozoides) a 5 (intensidade de movimento muito rápido dos espermatozoides), segundo Mounib et al. (1968). As amostras de sêmen foram

avaliadas ainda quanto ao volume, à concentração espermática (câmara hematimétrica Neubauer “Improved) e osmolaridade (semimicro osmômetro K 7400 Knauer, Alemanha). Durante todo o procedimento, o sêmen foi mantido em tubos de ensaio em banho de gelo ($15\pm 2^{\circ}\text{C}$).

4.2 Experimentos

4.2.1 Experimento 1 – Diluidores, crioprotetores e ativadores

O sêmen de dez machos foi diluído em um dos oito meios de congelamento, compostos pelas combinações de 4 diluidores x 2 crioprotetores. Os diluidores testados foram escolhidos com base nos bons resultados obtidos em estudos anteriores com piracanjuba (Maria et al., 2006), pirapitinga (Oliveira et al., 2007) e curimba (Viveiros et al., 2009):

TABELA 1 Composição química dos diluidores testados durante a criopreservação de sêmen de piabanha *Brycon insignis*.

Componentes (g) ^a	Diluidores			
	NaCl	Glicose	BTS [®] _b	MIII [®] _b
Glicose	--	5,00	4,00	5,34
Citrato de sódio	--	--	0,63	0,18
EDTA	--	--	0,13	0,18
Sulfato gentamicina	--	--	0,02	0,03
KCl	--	--	0,08	--
NaHCO ₃	--	--	0,13	0,25
NaCl	0,9	--	--	--
Tris	--	--	--	--
mOsm	285	308	356	367

^a Componentes foram diluídos em água deionizada, em um volume final de 100 mL

^b Doação da empresa Minitüb[®] (Tiefenbach/ Landshut, Alemanha)

BTS[®]: Beltsville Thawing Solution[®]

M III[®]: Merck III[®]

Os crioprotetores dimetilsulfóxido (DMSO - (CH₃)₂SO) e metilglicol (CH₃O(CH₂)₂OH) foram adicionados separadamente em cada diluidor, 30 minutos antes da adição do sêmen. O sêmen diluído foi envasado em palhetas de 0,5 mL (n=3 palhetas/meio/macho), vedadas com esferas e acondicionadas em raques, que foram colocadas em botijão de vapor de nitrogênio (dry-shipper, Cheng Du YDH-8), à temperatura de -170°C. Após 24 horas, as raques foram armazenadas em nitrogênio líquido (Cheng Du YDS-20). As palhetas foram descongeladas em banho-maria, a 60°C, por 8 segundos (Maria et al., 2006) e a motilidade espermática foi imediatamente ativada com duas diferentes soluções ativadoras: NaCl 0,29% (50 mM) e NaHCO₃ 1% (119mM). A avaliação da motilidade espermática foi feita como descrita para o sêmen fresco.

4.2.2 Experimento 2 – Diluidores, temperaturas de descongelamento e ativadores

Baseando-se nos resultados obtidos no experimento 1, o sêmen de oito machos foi diluído em um dos quatro diluidores testados anteriormente e criopreservado somente em metilglicol.

Os mesmos procedimentos realizados para o congelamento do sêmen foram utilizados neste experimento. As palhetas foram descongeladas em banho-maria, a 60°C, por 8 segundos e a 30° C, por 16 segundos. Além da análise da motilidade, o vigor e a duração espermática também foram analisados, imediatamente após a ativação com as duas diferentes soluções ativadoras do experimento 1. A avaliação da motilidade e do vigor espermático foi feita como descrita para o sêmen fresco. A duração da motilidade espermática foi avaliada utilizando-se um cronômetro, o qual era iniciado quando o meio ativador era misturado à amostra de sêmen e interrompido aos 120 segundos ou quando apenas 10% das células espermáticas ainda estavam se movendo.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as variáveis observadas (taxa de motilidade, duração espermática e vigor), o resíduo de cada modelo foi testado para distribuição normal. Os valores que não apresentaram distribuição normal foram transformados por meio do procedimento Box & Cox (1964) para a 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 software R, versão, 2.7.1 (R Core Development Team, 2008).

6 RESULTADOS

O peso e as características do sêmen fresco dos 18 machos de piabanha estão apresentados na Tabela 2.

TABELA 2 Peso dos machos e características do sêmen fresco de piabanha *Brycon insignis*.

Características	n° machos	Média ± DP	Mín- Máx
Peso corporal (g)	18	296±28	230-305
Motilidade (%)	18	99±5	80-00
Vigor (1-5)	8	5±0,5	4-5
Volume (mL)	8	4±0,7	2-5
Espermatozoides x 10 ⁹ mL	8	17±7	6-34
Osmolaridade (mOsm/kg)	8	350±13	332-375

Vigor: escala 1-5 (1: intensidade de movimento muito lento dos espermatozoides; 5: intensidade de movimento muito rápido dos espermatozoides)

6.1 Experimento 1- Diluidores, crioprotetores e ativadores

Os dados referentes à motilidade espermática do sêmen criopreservado nos oito meios testados, ativados com os dois ativadores e descongelados na temperatura de 60°C, estão apresentados na Tabela 3.

O sêmen criopreservado em metilglicol combinado a qualquer um dos quatro diluidores produziu as maiores taxas de motilidade espermática (76%-88%) em relação às amostras criopreservadas em DMSO (23%-59%), independentemente do ativador utilizado.

TABELA 3 Motilidade espermática (expressa em %; média±DP; n = 3 palhetas x 10 peixes) do sêmen de piabanha *Brycon insignis* criopreservado.

Diluidor	Crioprotetor	Ativador	
		NaCl 0,29%	NaHCO ₃ 1%
NaCl		46±17 ^{B b}	57±17 ^{B a}
Glicose	DMSO	45±23 ^{B b}	59±18 ^{B a}
BTS [®]		23±17 ^{C b}	40±24 ^{C a}
M III [®]		43±21 ^{B b}	53±22 ^{B a}
NaCl		82±15 ^{A a}	88±7 ^{A a}
Glicose	Metilglicol	77±17 ^{A a}	79±14 ^{A a}
BTS [®]		77±9 ^{A a}	80±8 ^{A a}
M III [®]		77±14 ^{A a}	76±15 ^{A a}

Médias com a mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Scott- Knott, a 5% de probabilidade

6.2 Experimento 2 - Diluidores, temperaturas de descongelamento e ativadores

Os dados referentes à motilidade espermática, ao vigor e à duração da motilidade do sêmen criopreservado nos 4 meios testados e ativados com os dois ativadores estão apresentados na Tabela 4.

Com relação à análise de motilidade espermática, observou-se que o sêmen criopreservado em qualquer um dos quatro diluidores testados apresentou taxas de motilidade semelhantes, quando descongelado tanto na temperatura de 30° como na de 60°C e ativado com qualquer um dos dois ativadores.

Os maiores escores de vigor para o sêmen criopreservado em qualquer uma das quatro soluções diluidoras foi observado após o descongelamento a 30°C e ativado com NaHCO₃ 1% (3,5-4,3) e para o sêmen criopreservado em NaCl e glicose (3,2 e 3,3, respectivamente), ativado com NaCl 0,29%. À temperatura de 60°C, os maiores escores foram observados para o sêmen

criopreservado em NaCl (4,0) ativado com NaHCO_3 1% e em glicose (3,3) ativado com NaCl 0,29%.

A duração da motilidade espermática foi prolongada em todos os diluidores testados, independente da temperatura de descongelamento (30° ou 60°C) pela utilização do ativador NaHCO_3 1% em relação ao NaCl 0,29%. As amostras de sêmen que apresentaram maior duração de motilidade foram aquelas criopreservadas em BTS[®], M III[®] e glicose (113-120 segundos) descongeladas à temperatura de 30°C, ativadas com NaHCO_3 1%. As amostras de sêmen que apresentaram menor duração foram aquelas criopreservadas em NaCl (69-86 segundos) ativadas com NaCl 0,29%, nas temperaturas de descongelamento de 60° e 30°C, respectivamente.

TABELA 4 Motilidade espermática, vigor e duração da motilidade espermática do sêmen de piabanha *Brycon insignis* criopreservado.

Diluidores	T °C	Ativador	
		NaCl 0,29%	NaHCO ₃ 1%
		Motilidade (%)	
NaCl	30	70±19,4	74±12,8
Glicose		63±22,6	70±21,2
BTS®		57±27,1	67±20,4
M III®		61±16,8	66±21,4
NaCl	60	61±24,3	59±27,1
Glicose		68±19,3	71±14,2
BTS®		62±24,5	59±24,8
M III®		60±28,0	66±20,4
		Vigor (1-5) *	
NaCl	30	3,2±1,0 ^{A a}	3,8±0,6 ^{A a}
Glicose		3,3±1,3 ^{A a}	4,3±0,9 ^{A a}
BTS®		2,3±1,0 ^{B b}	3,7±0,9 ^{A a}
M III®		2,5±1,1 ^{B b}	3,5±0,8 ^{A a}
NaCl	60	2,6±0,6 ^{B b}	4,0±0,7 ^{A a}
Glicose		3,3±0,8 ^{A a}	2,7±1,1 ^{B b}
BTS®		2,6±0,6 ^{B a}	3,0±1,0 ^{B a}
M III®		2,5±0,7 ^{B b}	3,1±1,1 ^{B a}
		Duração (segundos)	
NaCl	30	86±24 ^{B b}	116±13 ^{A a}
Glicose		107±23 ^{A b}	120 ^{A a}
BTS®		85±37 ^{B b}	113±17 ^{A a}
M III®		84±24 ^{B b}	113±20 ^{A a}
NaCl	60	69±26 ^{C b}	95±36 ^{B a}
Glicose		83±23 ^{B b}	114±15 ^{A a}
BTS®		79±25 ^{B b}	107±26 ^{A a}
M III®		87±31 ^{B b}	109±18 ^{A a}

Médias com a mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade

* Vigor: escala 1-5 (1: intensidade de movimento muito lento dos espermatozoides; 5: intensidade de movimento muito rápido dos espermatozoides)

Os dados estão expressos como médias±DP; n = 3 palhetas x 8 peixes)

7 DISCUSSÃO

7.1 Diluidores, crioprotetores e ativadores

No presente trabalho, os diluidores testados se mostraram eficientes para a criopreservação do sêmen de piabanha *Brycon insignis*. A elaboração de um meio para o congelamento de sêmen tem como um dos pontos importantes a associação de um diluidor (solução aquosa) e de um crioprotetor. Neste estudo, o crioprotetor metilglicol se mostrou mais eficiente na manutenção da motilidade espermática (76-88%), em relação ao crioprotetor DMSO (23-59%). A escolha de um meio de congelamento de sêmen capaz de proteger os espermatozoides tem se mostrado espécie-específica. O uso de metilglicol como crioprotetor intracelular de sêmen de peixe ainda é pouco comum e foi testado pela primeira vez em sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) (Maria et al., 2006). Outros pesquisadores encontraram bons resultados na criopreservação, utilizando metilglicol como crioprotetor, comparado ao DMSO (Maria et al., 2006; Oliveira et al., 2007). O sêmen de pirapitinga, *B. nattereri* (Oliveira et al., 2007) e piracanjuba, *B. orbignyanus* (Maria et al., 2006), criopreservado em BTS[®] e metilglicol, apresentou taxas de motilidade espermática de 72% e 70%, respectivamente. Esse é o primeiro relato do uso do metilglicol como crioprotetor intracelular em sêmen de piabanha, apresentando excelentes resultados nas taxas de motilidade.

7.2 Diluidores, temperaturas de descongelamento e ativadores

No presente estudo, não houve diferença significativa nos parâmetros motilidade, vigor e duração espermática, quando o sêmen foi descongelado nas temperaturas testadas (30° e 60°C), embora os maiores valores de vigor e duração da motilidade tenham sido observados após o descongelamento à temperatura de 30°C. Alguns estudos sugerem que possa ocorrer desnaturação

das enzimas na área periférica das palhetas, antes que o sêmen no interior da palheta esteja descongelado, causada por elevada temperatura (80°C) do banho-maria (Cabrita et al., 2001; Lahnsteiner et al., 1997). Para o sêmen criopreservado de *Brycon nattereri*, foram testadas as temperaturas de 50°C e 60°C, contudo, não foi observada diferença significativa na motilidade espermática. Valores acima de 66% foram observadas no sêmen congelado em BTS® com o crioprotetor metilglicol (Oliveira et al., 2007).

Após o descongelamento, foram observados altos valores de vigor e duração espermática quando o sêmen foi ativado com NaHCO₃ 1%, em relação ao sêmen ativado com NaCl 0,29%. Em espécies de peixes de água doce, a motilidade dos espermatozoides é iniciada quando o sêmen entra em contato com a água, pela diminuição da osmolaridade (Carolsfeld & Harvey, 1999). A diferença existente entre a baixa pressão osmótica da água em relação ao plasma seminal é essencial para iniciar a motilidade espermática nessas espécies (Godinho, 2000).

Várias soluções são utilizadas para ativar a motilidade espermática do sêmen de peixes após descongelamento e pode-se inferir que há uma interação entre a solução crioprotetora usada e o ativador (Carolsfeld & Harvey, 1999).

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que o sêmen de piabanha pode ser criopreservado em qualquer um dos quatro diluidores testados acrescidos de metilglicol de forma satisfatória. A solução de glicose e NaCl, pela facilidade de ser encontrada no mercado na forma comercial, é viável e prática, já que é encontrada em farmácias a um baixo custo, esterilizada e pronta para ser utilizada. O sêmen deve ser descongelado à temperatura de 30° C, por ser mais fácil de ser mantida no banho-maria, comparada à temperatura de 60°C e a ativação feita com NaHCO₃ 1%, por produzir maior escore para vigor espermático e maior tempo de duração da motilidade espermática, em relação ao NaCl 0,29%.

Experimentos de fertilização devem ser realizados com sêmen criopreservado de piabanha, para que a efetividade desse processo possa ser confirmada.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEDORE, A. G. **Características criopreservação do sêmen de pacu-caranha (*Piaractus mesopotamicus*) e de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)**. 1999. 53p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte

BOX, G. E. P.; COX, D. R. An analysis of transformations. **Journal of the Royal Statistical Society**, London, v. 26, n. 2, p. 42, 1964

CABRITA, E.; ROBLES, V.; ALVAREZ, R.; HERRÁEZ, M. P. Cryopreservation of rainbow trout sperm in large volume straws: application to large scale fertilization. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 201, n. 3/4, p. 301-314, Oct. 2001.

CAROLSFELD, J.; HARVEY, B. **Conservação de recursos energéticos de peixes: teoria e prática**. Victoria: World Fisheries Trust, 1999.

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.

GODINHO, H. P. Criopreservação de sêmen de peixes. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 21, n. 203, p. 16-20, mar./ abr. 2000.

GODINHO, H. P.; GODINHO, A. L. Ecology and conservation of fish in southeastern Brazilian river basins submitted to hydroelectric impoundments. **Acta Limnologica Brasiliensia**, Rio de Janeiro, v. 5, n. 1, p. 187-197, jan. 1994.

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.

MARIA A. N.; VIVEIROS A. T. M.; FREITAS R. T. F.; OLIVEIRA, A. V. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 260, n. 1/4, p. 298-306, Sept. 2006.

MOUNIB, N. S.; HWANG, P. C.; IDLER, D. R. Cryogenic preservation of Atlantic cod (*Gadus morhua*) sperm. **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, Ottawa, v. 25, p. 2623-2632, 1968.

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

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. Vienna: R foundation for statistical computing, 2008. Disponível em: <<http://www.r-project.org>>. Acesso em: 10 abr. 2009.

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

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

VIVEIROS, A. T. M.; GODINHO, H. P. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. **Fish Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 35, n. 1, p. 137-150, Mar. 2009

CAPÍTULO 4

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A piabanha é considerada uma espécie de alto valor comercial e muito apreciada pela resistência à captura com anzol na pesca esportiva. A exploração para fins comerciais é ainda praticamente inexistente, tendo as estações de piscicultura com criação de piabanhas apenas fins conservacionistas. Diante dessas circunstâncias, existe uma demanda crescente por técnicas práticas e apuradas de preservação de gametas que facilitem a fertilização artificial desses animais para repovoamento dos rios e sua criação em cativeiro.

Por meio dos estudos de resfriamento, o sêmen de piabanha pode manter-se viável, com motilidade em torno de 63%, por até dois dias, diluído em solução de Androstar[®], encontrada na forma comercial, em sua osmolaridade padrão (322 mOsm) ou na osmolaridade de 362 mOsm. Essas osmolaridades do Androstar[®] estão muito próximas à do sêmen não diluído (controle- 358 mOsm). O uso de sêmen diluído e resfriado facilita o manejo das pisciculturas e permite o uso eficiente pelo aumento do volume de sêmen utilizado, possibilitando a troca de material genético entre as estações reprodutivas de piscicultura.

Durante o processo de criopreservação, o sêmen de piabanha pode ser congelado em qualquer um dos quatro diluidores testados, acrescidos de metilglicol de forma satisfatória. A solução de glicose e NaCl, pela facilidade de ser encontrada no mercado na forma comercial é viável e prática, já que é encontrada em farmácias a um baixo custo, esterilizada e pronta para ser utilizadas. O sêmen deve ser descongelado à temperatura de 30° C, por ser mais fácil de ser mantida no banho-maria, comparada à temperatura de 60°C e a ativação feita com NaHCO₃ 1%, por produzir maior escore para vigor espermático e maior tempo de duração da motilidade espermática, em relação ao NaCl 0,29%. Experimentos de fertilização devem ser realizados com sêmen resfriado e criopreservado de piabanha, para que a efetividade desse processo possa ser confirmada.