



ALINE FERREIRA SOUZA DE CARVALHO

**CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE PACU
(*Piaractus mesopotamichus*) E CURIMBA
(*Prochilodus lineatus*): PREDIÇÃO DO
POTENCIAL DE CONGELABILIDADE E USO DA
CAFEÍNA NA SOLUÇÃO ATIVADORA**

LAVRAS-MG

2012

ALINE FERREIRA SOUZA DE CARVALHO

**CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE PACU *Piaractus*
mesopotamichus) E CURIMBA (*Prochilodus lineatus*):
PREDIÇÃO DO POTENCIAL DE CONGELABILIDADE E USO DA
CAFEÍNA NA SOLUÇÃO ATIVADORA**

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

Orientador

Dr: Luís David Solis Murgas

LAVRAS-MG

2012

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Carvalho, Aline Ferreira Souza de.

Criopreservação do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e curimba (*Prochilodus lineatus*) : predição de potencial de congelabilidade e uso da cafeína na solução ativadora / Aline Ferreira Souza de Carvalho. – Lavras : UFLA, 2012.

97 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Luis David Solis Murgas.

Bibliografia.

1. Congelamento. 2. Qualidade seminal. 3. Metilxantinas. 4. Atividade antioxidante total. 5. Ativadores espermáticos. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 639.37520416

ALINE FERREIRA SOUZA DE CARVALHO

**CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE PACU (*Piaractus
mesopotamichus*) E CURIMBA (*Prochilodus lineatus*):
PREDIÇÃO DO POTENCIAL DE CONGELABILIDADE E USO DA
CAFEÍNA NA SOLUÇÃO ATIVADORA**

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

APROVADA em 16 de Julho de 2012.

Dr. Galileu Crovatto Veras	UFPA
Dr. Márcio Gilberio Zangeronimo	UFLA
Dr. Monica Ferreira Rodrigues	UFLA

Dr. Luis David Solis Murgas
Orientador

**LAVRAS-MG
2012**

A Deus, por me guiar e me dar forças, especialmente, nos momentos de angústia. Essa etapa só foi vencida devido a Sua presença em minha vida.

Aos meus pais, João Batista de Carvalho e Helena Ferreira Souza de Carvalho, por eles simplesmente serem quem são. Obrigada pela criação espetacular, pelo exemplo de vida, pelo amor incondicional e por toda a felicidade proporcionada a cada dia. Amo vocês!

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, pelo apoio financeiro concedido durante o Mestrado.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Medicina Veterinária por fornecer todo o suporte necessário.

À Universidade Federal de Goiânia, em especial ao Setor de Piscicultura, pela parceria concedida.

Ao Professor e orientador Luis David Solis Murgas, especial agradecimento, pela confiança, exemplo e, sobretudo, pelo carinho durante todos esses anos de convívio. Serei sempre grata.

Ao Professor Márcio Gilberto Zangeronimo, à Dra. Mônica Ferreira Rodrigues e ao Dr. Galileu Crovato Veras pelo tempo dispensado a fazer parte da banca de defesa.

Aos Professores Ivan Bezerra Alaman e Márcio Gilberto Zangeronimo e a Daniella Aparecida de Jesus Paula, pela colaboração nas análises estatísticas.

À Monica Ferreira Rodrigues e Estefânia de Souza Andrade por terem tornado possível e acima de tudo, prazerosa, a execução do experimento em Goiânia.

À Joyce Ferreira Carvalho e Ana Carina Vasconcelos, pelo auxílio nas análises laboratoriais.

A todos os colegas de trabalho do Setor de Piscicultura da UFG, o meu muito obrigada.

A todos os amigos do biotério, pela companhia e conversas que tornam ainda mais agradáveis os dias de trabalho.

A Willan César Cortez por sempre ajudar e pela amizade.

As amigas queridas; Yasmin e Letícia que mesmo quando distantes, me transmitiram palavras e gestos de carinho. Amizade verdadeira para sempre.

A Tássia, pela amizade conquistada, risos e diversão proporcionada a cada dia de convívio. O meu muito obrigada pelo carinho e zelo.

Aos meus tios queridos Maria e Marco, por terem me acolhido no momento em que mais precisei. O lar de vocês trouxe-me aconchego e tranquilidade.

Ao meu amor Victor, por me dar força e transmitir a Fé em Deus em cada momento de dificuldade durante esses anos, tornando tudo tão simples. Obrigada pelo amor e por estar sempre ao meu lado.

Aos meus pequenos Henrique e João Pedro, pelos sorrisos e pelo amor mais puro de todos. Obrigada por tornar os meus dias mais leves e encher o meu coração de esperança.

A minha irmã Carol, por fazer desses dois anos ainda mais especiais, por fazer da nossa casa um lar cheio de alegria e por cuidar de mim com um jeitinho único. Agradeço a cada momento que passamos juntas.

A minha irmã Marina, que mesmo de tão longe, confortou-me com o seu amor e otimismo irradiante, além de ser um exemplo constante em minha vida.

Ao meu pai querido, que com o coração mais puro de todos, esteve sempre ao meu lado, me dando carinho e aconchego. Obrigada por ser tão presente em minha vida e por me ensinar a amar acima de tudo!

A minha mãezinha que, com imenso amor e garra, me ensinou a ser forte, a ter persistência sempre. Obrigada por ser tão presente em minha vida, por transmitir em seu olhar confiança e em suas palavras alento.

Agradeço a todos!

RESUMO GERAL

Com o primeiro experimento objetivou-se determinar quais características espermáticas são capazes de predizer com mais precisão o potencial de congelabilidade do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*). Aliquotas de 200 µL de sêmen, de onze reprodutores, foram diluídas na solução crioprotetora (DMSO 10% e BTS 5%), envasadas em palhetes de 0,5 ml e criopreservadas em nitrogênio líquido por dez dias. A criopreservação afetou ($P < 0,05$) todas as variáveis de qualidade. Apenas a motilidade espermática e duração da motilidade mensuradas no sêmen descongelado tiveram uma alta correlação (-0,6377 e -0,7306 respectivamente) com a variável canônica representada pelas características espermáticas do sêmen fresco. Pode-se concluir que motilidade e duração da motilidade podem ser utilizadas para predizer o potencial de congelabilidade. Com o segundo experimento objetivou-se avaliar o efeito de diferentes concentrações de cafeína, adicionada a solução ativadora, nos parâmetros de motilidade espermática do sêmen *in natura* e descongelado de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e curimba (*Prochilodus lineatus*). As soluções ativadoras foram preparadas a base de NaHCO_3 adicionadas de cafeína nas concentrações de 0,0, 2,5, 5,0, 10,0 e 20,0 mM. Para a coleta do sêmen foram utilizados um total de oito reprodutores de pacu e 20 de curimba. Para criopreservação, utilizou o mesmo protocolo do primeiro experimento. Houve um aumento linear na motilidade espermática para o sêmen *in natura* pacu, para o sêmen *in natura* de curimba e para o sêmen descongelado de curimba ($P < 0,05$), em função do aumento na concentração de cafeína. Observou-se uma resposta quadrática na duração da motilidade para o sêmen descongelado de pacu e para o sêmen *in natura* de curimba. Portanto, esses resultados indicam que a adição da cafeína na solução ativadora pode melhorar os parâmetros de motilidade espermática, no entanto, é dependente da espécie e da concentração utilizada.

Palavras-chaves: Congelamento. Qualidade seminal. Atividade antioxidante total. Metilxatinas. Ativadores espermáticos.

GENERAL ABSTRACT

The first experiment aimed at determining which sperm characteristics are capable of predicting with better precision the freezing potential of curimba (*Prochilodus lineatus*) semen. Aliquots of 200 μ L of semen, taken from eleven breeders, were diluted in a cryoprotectant solution (DMSO 10% and BTS 5%), placed in 0.5 mL sterile straws and cryopreserved in liquid nitrogen for ten days. Cryopreservation affected ($P < 0.05$) all quality variables. Only spermatid motility and motility duration, measured in thawed semen, presented high correlation (-0.6377 and -0.7306, respectively) with the canonic variable represented by the spermatid characteristics of fresh semen. It may be concluded that motility and motility duration may be used to predict freezing potential. The second experiment aimed at evaluating the effect of different caffeine concentrations added to the activating solution in the parameters of sperm motility in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) and curimba (*Prochilodus lineatus*) *in natura* and thawed semen. The activating solutions were prepared based on NaHCO_3 added of caffeine in the concentrations of 0.0, 2.5, 5.0, 10.0 and 20.0 mM. For the collection of the semen, a total of 8 pacu and 20 curimba breeders were used. For the cryopreservation, the same protocol of the first experiment was used. A linear increase occurred in sperm motility for pacu and curimba *in natura* semen and for curimba thawed semen ($P < 0.05$), due to the increase in caffeine concentration. A quadratic response was observed in motility duration for pacu thawed semen and for curimba *in natura* semen. Therefore, these results indicate that the addition of caffeine in the activation solution may improve sperm motility parameters, however, it is dependent of the species and the used concentration.

Key-words: Freezing. Semen quality. Total antioxidant activity. Methylxatines. Sperm activators.

LISTA DE GRÁFICOS

CAPÍTULO 3

Gráfico 1 Motilidade espermática do sêmen <i>in natura</i> de pacu, de acordo com as concentrações de cafeína	88
Gráfico 2 Duração da motilidade do sêmen descongelado de pacu, de acordo com as concentrações de cafeína	89
Gráfico 3 Motilidade espermática do sêmen <i>in natura</i> de curimba, de acordo com as concentrações de cafeína	90
Gráfico 4 Duração da motilidade do sêmen <i>in natura</i> de curimba, de acordo com as concentrações de cafeína	90
Gráfico 5 Motilidade espermática do sêmen descongelado de curimba, de acordo com as concentrações de cafeína	91

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1 Efeito da criopreservação nas características espermáticas do sêmen de curimba	54
Tabela 2 Correlações entre as características espermáticas mensuradas no sêmen fresco de curimba	59
Tabela 3 Correlações entre as características espermáticas mensuradas no sêmen descongelado de curimba	61
Tabela 4 Correlação canônica relacionando as características espermáticas do sêmen de curimba antes e após a criopreservação.....	64
Tabela 5 Cargas cruadas dos pares canônicos entre as características espermáticas do sêmen fresco e descongelado de curimba.....	65

CAPÍTULO 3

Tabela 1 Osmolaridade das soluções ativadoras da motilidade espermática do sêmen de curimba.....	83
Tabela 2 Características espermáticas do sêmen <i>in natura</i> de pacu e curimba....	84
Tabela 3 Motilidade espermática e duração da motilidade do sêmen <i>in natura</i> e descongelado de pacu e curimba, ativados com diferentes soluções de cafeína.....	86

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 Introdução geral	13
1 INTRODUÇÃO	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1 Características gerais e morfologia espermática	15
2.2 Motilidade espermática	17
2.3 Ativação da motilidade espermática	20
2.4 Metabolismo energético do espermatozoide	22
2.5 Atividade antioxidante do plasma seminal	23
2.6 Peroxidação lipídica no sêmen	26
2.7 Efeito da criopreservação na qualidade do sêmen	28
2.8 Soluções ativadoras da motilidade espermática	31
2.9 Cafeína adicionada a solução ativadora	33
REFERÊNCIAS	37
CAPÍTULO 2 Características espermáticas para prever o potencial de congelabilidade do sêmen de curimba (<i>Prochilodus lineatus</i>).....	42
1 INTRODUÇÃO	44
2 MATERIAL E MÉTODOS	47
2.1 Local do experimento e animais	47
2.2 Indução hormonal, coleta e avaliação do sêmen <i>in natura</i>	47
2.3 Criopreservação e descongelamento do sêmen	48
2.4 Obtenção do plasma seminal	49
2.5 Determinação das variáveis de qualidade seminal	50
2.5.1 Motilidade espermática	50
2.5.2 Morfologia espermática	50
2.5.3 Atividade antioxidante total	51
2.5.4 Peroxidação lipídica.....	51
2.6 Análises estatísticas.....	52
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	53

3.1	Efeito da criopreservação nas variáveis de qualidade seminal	54
3.1.1	Motilidade espermática e duração da motilidade.....	54
3.1.2	Morfologia espermática	55
3.1.3	Atividade antioxidante total	56
3.1.4	Peroxidação lipídica.....	57
3.2	Análise de correlação simples entre as variáveis de qualida de seminal.....	59
3.3	Análise de correlação canônica	64
4	CONCLUSÃO	68
	REFERÊNCIAS	70
	CAPÍTULO 3 Efeito da cafeína, adicionada a solução ativadora, nas características de motilidade espermática do sêmen de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>) e curimba (<i>Prochilodus lineatus</i>)	73
1	INTRODUÇÃO.....	74
2	MATERIAL E MÉTODOS	78
2.1	Local e seleção dos animais	78
2.2.	Delineamento experimental	78
2.3	Hipofísação, coleta e avaliação do sêmen <i>in natura</i>	78
2.4	Criopreservação e descongelamento do sêmen	80
2.5	Ativação da motilidade espermática com soluções de cafeína	80
2.6	Análises estatísticas.....	81
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	82
3.1	Osmolaridade das soluções ativadoras.....	83
3.2	Avaliação do sêmen <i>in natura</i>	86
3.3.	Efeito da cafeína na motilidade espermática.....	86
4	CONCLUSÃO	93
	REFERÊNCIAS	95

CAPÍTULO I Introdução geral

1 INTRODUÇÃO

A criopreservação é uma ferramenta de grande utilidade para a aquicultura, sendo fundamental na rotina de reprodução artificial. O crescente desenvolvimento do setor aquícola, associado com a necessidade de preservação das espécies ameaçadas de extinção, têm impulsionado cada vez mais o desenvolvimento de técnicas apuradas de criopreservação.

Embora seja amplamente empregada, a criopreservação ainda apresenta limitações importantes. Além da falta de protocolos bem padronizados para aplicação em escala comercial, a redução dos parâmetros de motilidade e taxa de fertilização são fatores considerados limitantes para o sucesso da criopreservação. Portanto, é importante encontrar meios para minimizar os efeitos deletérios da criopreservação, como por exemplo, seleção de amostras de sêmen com maior potencial de congelabilidade e adição de potenciadores da motilidade espermática na solução ativadora.

Visto que o sucesso da criopreservação depende diretamente da qualidade do sêmen utilizado, torna-se necessário estabelecer um grupo de variáveis para predizer o potencial de congelabilidade do sêmen fresco. Entre essas variáveis, pode-se destacar motilidade e morfologia espermática, atividade antioxidante total do plasma seminal e o nível de peroxidação lipídica no sêmen.

Além disso, para obter êxito na criopreservação, soluções ativadoras adequadas devem ser utilizadas para a ativação da motilidade espermática pós-descongelamento. Por exemplo, a adição de cafeína na solução ativadora pode aumentar o nível de AMPc e de cálcio intracelular resultando em uma melhora nos parâmetros de motilidade espermática e, conseqüentemente, do sucesso da criopreservação.

O pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e a curimba (*Prochilodus lineatus*) são espécies nativas da bacia do rio grande com importância econômica relevante, caracterizada pela facilidade de cultivo e alta produtividade. Além disso, devido ao declínio de suas populações selvagens, o interesse pela preservação das espécies tem aumentado consideravelmente. Sendo assim, a criopreservação do sêmen e a fertilização artificial podem contribuir para a maior produtividade e preservação dessas espécies.

Portanto, torna-se imprescindível a realização de estudos que visem contribuir para obtenção de amostras de sêmen com melhor qualidade e de soluções ativadoras com efeitos adicionais à motilidade espermática, permitindo assim o incremento da qualidade espermática após a criopreservação.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Características gerais e morfologia espermática

Em peixes teleósteos, a fisiologia espermática e composição do sêmen apresentam grande variabilidade individual e depende de uma interação complexa entre fatores genéticos, fisiológicos e ambientais, associado às adaptações necessárias para cada espécie. O sêmen é composto pelo plasma seminal e pelo espermatozoide e, apesar das variações, características gerais são observadas para todas as espécies (BILLARD, 1986; RURANGWA et al., 2004).

O plasma seminal, produto de secreção dos testículos e ducto espermático, é composto por substâncias que dão suporte ao espermatozoide. Sua principal função é fornecer mecanismos de proteção e viabilidade da célula espermática na qual incluem: manutenção do estado quiescente; fornecimento de níveis adequados de nutrientes para o metabolismo espermático; controle do processo de maturação final e proteção do espermatozoide contra danos oxidativos e proteolíticos (CIERESZKO, 2008).

Em relação a sua composição, em contraste com vertebrados superiores, o plasma seminal de peixes é caracterizado por baixa concentração de proteína e outros compostos orgânicos, sendo constituído principalmente por compostos minerais (sódio, potássio, cálcio e magnésio). Em relação às substâncias orgânicas, apesar de presente em pequenas quantidades, as proteínas têm importante função de proteção contra ataques proteolíticos. Além disso, têm sido identificadas proteínas que atuam como fator de inibição ou que aumentam a viabilidade espermática. Substratos energéticos, como a glicose e frutose, também são encontrados no plasma seminal, no entanto também em pequenas quantidades. O ácido ascórbico e o ácido úrico são componentes antioxidantes

encontrados em abundância e são responsáveis por exercer proteção a membrana plasmática e ao DNA do espermatozoide contra danos oxidativos (CIERESZKO, 2008). Entre os compostos minerais, o K^+ e o Na^+ são os íons predominantes e estão diretamente relacionadas com a imobilidade dos espermatozoides no plasma seminal (BILLARD et al., 1995).

O espermatozoide da maioria das espécies de peixes teleósteos é caracterizado pela ausência do acrossoma e consiste de três compartimentos principais, cabeça, peça intermediária e cauda ou flagelo. A cabeça contém o núcleo e, portanto, o DNA paternal. O núcleo, na maioria das espécies de peixes teleósteos, apresenta uma invaginação onde o axonema será ancorado. A peça intermediária também é pequena e o seu conteúdo é composto basicamente pela mitocôndria, na qual fornece a energia necessária para o batimento flagelar. O flagelo é responsável pelo movimento do espermatozoide e liga-se a cabeça, especificamente na invaginação do núcleo, pelo complexo centriolar que é composto por um centríolo proximal e outro distal (LAHNSTEINER; PATZNER, 2008).

O axonema e a membrana plasmática também são importantes componentes da célula espermática. O axonema, presente no flagelo, é composto por um arranjo típico de nove pares de microtúbulos periféricos e um par de microtúbulos centrais. Cada microtúbulo é organizado em um cilindro composto por 13 protofilamentos aderentes sendo o último filamento composto por dímeros de tubulina. O deslizamento entre dímeros adjacentes atua como força para o deslizamento do axonema na qual resulta na curvatura do flagelo e, conseqüentemente, do batimento flagelar. A membrana citoplasmática envolve o espermatozoide e desempenha importante papel na ativação da motilidade espermática através da detecção de alterações iônicas, sendo composta basicamente por fosfolípidos e proteínas que são responsáveis por conferir fluidez e permeabilidade (BOBE; LABBÉ, 2010).

A morfologia do espermatozoide de peixes apresenta pouca variação estrutural entre as espécies, sendo pequenas modificações observadas em função de cada família. Os espermatozoides podem ser divididos em dois grupos morfológicos, de acordo com a estratégia reprodutiva. Em espécies de fertilização interna, os espermatozoides apresentam organização mais complexa, com núcleo alongado e peça intermediária maior com grande quantidade de mitocôndrias. Em relação ao tamanho, a cabeça apresenta em torno de 10 μm , peça intermediária 5 μm e a cauda entre 30-40 μm . Com organização mais simples, os espermatozoides de espécies com fertilização externa são denominados *aquasperm*. O formato da cabeça é ovoide ou esférica com tamanho menor que 5 μm , a peça intermediária também é pequena (2-4 μm) com poucas mitocôndrias presentes, podendo ser monoflagelado ou biflagelados (LAHNSTEINER; PATZNER, 2008).

2.2 Motilidade espermática

Os espermatozoides de peixes teleósteos permanecem quiescentes no trato genital sendo a motilidade espermática uma propriedade transitória que tem início após a liberação do espermatozoide no ambiente aquático. Esta inativação é resultado de um efeito combinado entre a osmolaridade e a composição do plasma seminal, principalmente, associado ao íon K^+ . Vários são os fatores que podem desencadear o início da motilidade, com destaque principal para a osmolaridade e composição iônica do meio de ativação (BILLARD, 1986; BILLARD et al., 1995).

Em relação a osmolaridade, a célula espermática tem suas funções controladas a partir da mudança na osmolaridade extracelular, que atua como um sinal fisiológico para desencadear um mecanismo celular em resposta a esta variação. Portanto, a pressão osmótica como fator isolado já é capaz de iniciar a

motilidade espermática indicando a importância deste fator externo na regulação da motilidade (MORISAWA et al., 1983).

De uma maneira geral, a motilidade espermática é suprimida pela osmolaridade isotônica do plasma seminal e quando ocorre um aumento na osmolaridade externa a motilidade espermática é iniciada em peixes marinhos. Em peixes de água doce ocorre o contrário, sendo a diminuição da osmolaridade responsável pela ativação da motilidade (TAKAI; MORISAWA, 1995). Em espécies anádrômas, como a perca listrada (*Morone saxatilis*) e eurialinas, como o medaka (*Oryzias latipes*) e o (*Fundulus grandis*), a motilidade espermática pode ser ativa em uma ampla faixa de osmolaridade, em meios isotônicos, hipertônicos e hipotônicos. Provavelmente, os espermatozoides desta espécie desenvolveram-se mecanismos de adaptação que permitem a ativação tanto em água salobra quanto doce (HE; KEERAN-JENKINS; WOODS, 2004; TIERSCH; YANG, 2009).

Alteração na concentração intracelular de K^+ na célula espermática é um evento celular marcante que ocorre em função de uma pressão osmótica pré-estabelecida. Em *Takifuso niphobes* (peixe marinho), a exposição ao meio hipertônico resulta em um subsequente aumento da concentração intracelular de K^+ que é responsável pelo início da motilidade espermática. Este aumento ocorre em função de dois eventos principais: (1) absorção de K^+ através da membrana plasmática pelas bombas dependentes de ATP e (2) diminuição do volume celular por desidratação. Em *Danio rerio* (peixe de água doce) ocorre o mecanismo contrário, com diminuição na concentração intracelular de K^+ em função da exposição ao meio hipotônico (TAKAI; MORISAWA, 1995).

A alteração no volume celular é outro evento marcante que ocorre durante o início da motilidade e já foi observado em espermatozoides de carpa (*Cyprinus carpio*), barbo rosado (*Puntius conchonius*) e barbo tigre (*Barbus barbatus* L). A tensão osmótica na célula induz um gradiente de concentração

entre o meio intracelular e extracelular, em resposta, a célula espermática altera o seu volume na tentativa de equilibrar a osmolaridade entre os meios. A perda de água e o encolhimento celular são observados em espécies marinhas, enquanto que influxo de água e tumefação celular são observados em espécies de água doce, eventos estes, que ocorrem pela difusão passiva da água. Entretanto, é importante salientar que estas alterações são fenômenos progressivos, que ocorrem após o início da motilidade em função da variação na osmolaridade externa (HU et al., 2009).

Os íons predominantes do plasma seminal são K^+ , Na^+ e Cl^- sendo suas concentrações maiores em função do aumento da osmolaridade. Estes íons estão envolvidos na regulação da motilidade espermática, seja pela contribuição iônica intracelular ou pela regulação da osmolaridade (HE; KEERAN-JENKINS; WOODS, 2004). Embora não apresente efeito primário na ativação da motilidade espermática a concentração e o tipo iônico predominante no meio de ativação poderão afetar os parâmetros de motilidade e a transdução do sinal osmótico para a célula espermática (HE et al., 2012; MORITA et al., 2006; YANG; TIERSCH, 2009).

Dentre os íons que regulam a motilidade espermática, o K^+ merece destaque. Na maioria das espécies de peixes teleósteos, como a truta (*Oncorhynchus mykiss*) e o esturjão (*Acipenser ruthenus*), a alta concentração de K^+ no plasma seminal é um dos fatores que inibe a ativação da motilidade. Para ocorrer a ativação, é necessário que ocorra uma redução na concentração de K^+ que varia de espécie para espécie (ALAVI; RODINA; LINHART, 2011).

Cátions bivalentes, principalmente o Na^+ e o Ca^{2+} , são antagonistas ao efeito inibitório do K^+ sendo capazes de ativar a motilidade espermática mesmo na presença de K^+ intracelular na concentração inibitória mínima. Esta habilidade no processo de ativação está associada ao influxo de Ca^{2+} e efluxo de

K^+ através de canais iônicos, na qual promove uma redução nos níveis de K^+ , permitindo assim, o início da motilidade (ALAVI; COSSON, 2006).

Além de atuar de forma direta na ativação da motilidade espermática, o Ca^{2+} tem importante papel como segundos mensageiros para a transdução do sinal interno, que é necessário para a ativação da motilidade espermática. Sendo assim, a concentração extracelular deste íon é necessária para a manutenção do nível intracelular adequado (HE; KEERAN-JENKINS; WOODS, 2004). Entretanto, a ação do Ca^{2+} na ativação da motilidade espermática é diretamente dependente da espécie e da osmolaridade externa. A resposta do espermatozoide ao Ca^{2+} extracelular evoluiu para adaptar-se a água doce, onde a concentração de Ca^{2+} é baixa, ou a água salobra, onde a concentração é alta. Portanto, a medida que a osmolaridade do meio aumenta a necessidade de Ca^{2+} extracelular necessária para a motilidade espermática também aumenta (MORITA et al., 2006).

2.3 Ativação da motilidade espermática

Para ocorrer a ativação da motilidade é necessário que o espermatozoide perceba o sinal externo de ativação e o transforme em um sinal bioquímico interno. Vários são os mecanismos envolvidos neste controle. Dentre eles, o papel da membrana plasmática é essencial, associada com a permeabilidade e alterações no potencial de membrana.

No plasma seminal, a membrana plasmática do espermatozoide encontra-se em um estado de despolarização e quando exposta a meios hipotônicos ou hipertônicos ocorre uma hiperpolarização, que é necessária para a ativação espermática. Este estado de hiperpolarização é resultado da troca de íons entre os meios interno e externo do espermatozoide que leva a alteração do potencial de membrana. Por exemplo, em carpa (*Cyprinus carpio*), carpa java

(*Puntius javanicus*) e goby (*Oxyeleotris marmorata*) o livre transporte de K^+ e Cl^- pela membrana plasmática do espermatozoide, associado a canais iônicos, permite a percepção do sinal osmótico, que é necessário para alterar o potencial de membrana e iniciar a motilidade espermática (MORITA et al., 2006).

A presença de canais de água na superfície da célula espermática também está envolvida na ativação da motilidade espermática. Estes canais são responsáveis por controlar a entrada e saída de água em função da osmolaridade. Em barbo (*Barbus barbus L.*) o uso de um bloqueador de canais mecanossensíveis resultou em menor motilidade indicando a possível participação destes canais no processo de transdução do sinal (HU et al., 2009).

A passagem de água e íons pela membrana plasmática induzem a ativação da via de segundos mensageiros, principalmente a via do AMPc, que são essenciais para a transdução do sinal interno. A ativação da via do AMPc determina a ativação de proteínas flagelares por fosforilação/desfosforilação (ZILLI et al., 2009, 2011).

Em resumo, o modelo proposto por Zilli et al. (2009) exemplifica, de maneira clara e sucinta, o mecanismo molecular de ativação da motilidade espermática em espécies marinhas. O choque hiperosmótico ocasionado no espermatozoide desencadeia o efluxo de água com subsequente redução do volume celular. A saída de água, associada com o aumento da concentração intracelular de íons, conduzem a ativação da adenilciclase e a sinalização da via AMPc e posterior fosforilação de proteínas flagelares, especificamente a proteína kinase A. Em peixes de água doce mecanismo semelhante ocorre, no entanto, em função de um choque hiposmótico, influxo de água, aumento do volume celular e diminuição na concentração de íons.

2.4 Metabolismo energético do espermatozoide

Os espermatozoides de peixe permanecem quiescentes por períodos relativamente longos no testículo e no trato reprodutivo. Nessas condições, o metabolismo energético é basal, caracterizado por baixo consumo de oxigênio, necessário apenas para a manutenção de trocas iônicas na membrana plasmática, e armazenamento de grandes estoques de ATP nas mitocôndrias (BILLARD, 1986; INGERMANN, 2008). Em contraste, são altamente ativos e apresentam curta duração da motilidade após liberação e diluição no ambiente aquático ou quando expostos a um meio de ativação adequado (BOBE; LABBÉ, 2010).

As fontes centrais de energia para o espermatozoide são provenientes da fosforilação oxidativa, ciclo do ácido tricarboxílico e da glicólise aeróbica, sendo o ATP a principal molécula energética. Após ativação da motilidade, a demanda por energia pelo espermatozoide é muito alta e a atividade da adenilato quinase torna-se intensa para gerar o ATP necessário para o batimento flagelar. No entanto, o consumo energético é muito maior do que a produção de energia, com rápida depleção dos níveis de ATP, o que resulta em curta duração da motilidade, em torno de 60 segundos para a maioria (BURNES; MOYES; MONTGOMERIE, 2005; INGERMANN, 2008).

A capacidade da célula espermática em metabolizar substratos energéticos exógenos depende diretamente da estratégia reprodutiva da espécie. Espécies de fertilização interna são capazes de metabolizar substratos exógenos devido a presença de substâncias metabólicas nos fluidos biológicos da fêmea. Por outro lado, em espécies de fertilização externa, a célula espermática tem dificuldade em metabolizar o substrato extracelular, devido ao metabolismo oxidativo limitado (BOBE; LABBÉ, 2010). Por exemplo, em medaka a presença ou ausência de glicose no meio ativador não teve efeito significativo sobre a motilidade indicando que a célula foi incapaz de utilizar a glicose. Esta

incapacidade em metabolizar a glicose é devido à permeabilidade reduzida da célula espermática a este substrato e não a deficiência de enzimas glicolíticas (YANG; TIERSCH, 2009).

2.5 Atividade antioxidante do plasma seminal

Em peixes teleósteos, o plasma seminal é constituído por moléculas específicas que conferem proteção a célula espermática contra os danos oxidativos (INGERMANN, 2008). Estas moléculas compõem o sistema antioxidante, que tem a função, basicamente, de inibir a oxidação de outras moléculas, sendo fundamental para a manutenção da viabilidade celular (AITKEN; CLARKSON; FISHEL, 1989). Entretanto, poucos estudos que caracterizem o sistema antioxidante no sêmen de peixes foram desenvolvidos (LAHNSTEINER; MANSOUR, 2010; LAHNSTEINER; MANSOUR; PLAETZER, 2010).

A caracterização do sistema antioxidante do sêmen de truta marrom (*Salmo trutta*), lota (*Lota lota*), perca (*Perch fluviatus*) e alburno (*Alburnus alburnos*), revelou a presença de enzimas de defesa antioxidante (catalase, glutatona redutase, sulfóxido de metionina redutase, peroxidase e superóxido dismutase) e de metabólitos antioxidantes (ácido ascórbico, glutatona, metionina, tocoferol e ácido úrico). O padrão de atividade destas substâncias, tanto quantitativo como qualitativo, é bastante uniforme entre estas espécies, com pequenas diferenças interespecíficas. A superóxido dismutase e o ácido úrico foram os que apresentaram maior concentração e atividade, enquanto que a atividade das outras enzimas e metabólitos foi relativamente baixa, com padrão semelhante de comportamento (LAHNSTEINER; MANSOUR, 2010; LAHNSTEINER; MANSOUR; PLAETZER, 2010).

A enzima superóxido dismutase fornece importante proteção antioxidante ao espermatozoide através da neutralização dos radicais peróxidos intracelulares e extracelulares, impedindo assim o processo de peroxidação lipídica da membrana celular do espermatozoide (LAHNSTEINER; MANSOUR; PLAETZER, 2010). Quando presente em níveis elevados no sêmen de robalo (*Dicentrarchus labrax*), a superóxido dismutase foi associada à ausência de peroxidação lipídica, ratificando a importância desta enzima na proteção contra as espécies reativas de oxigênio (EROs) (MARTÍNEZ-PARÁMO et al., 2012a).

O ácido úrico presente no plasma seminal é originado, em parte, pelo espermatozoide por meio do metabolismo da purina (INGERMANN, 2008). Este metabólito é um forte agente redutor e tem efeito positivo sobre os parâmetros de motilidade e integridade de membrana, além de diminuir a peroxidação lipídica. Ciereszco et al. (1999) reportaram altos níveis de ácido úrico em truta (*O. mykiss*), perca (*P. flavenses*), *Esox masquinongy*, *Esox lucius*, carpa (*C. carpio*), (*Abramis brama*) e tenca (*Tinca tinca*), sendo que a faixa de concentração variou entre 2.1 a 12.4 mg/100 ml. Estes resultados indicam que a presença do ácido úrico no plasma seminal é espécie-específico e, provavelmente, apresenta efeito antioxidante diferente de acordo com a espécie.

Vitaminas e aminoácidos também são conhecidos por sua ação antioxidante, ambos com a função de neutralizar os radicais livres e impedir a propagação dos danos oxidativos na célula. O ácido ascórbico (vitamina C) e o tocoferol (vitamina E) são exemplos de vitaminas antioxidantes naturais particularmente importantes. A taurina e a hipotaurina são exemplos de aminoácidos sulfurados com ação antioxidante (CABRITA et al., 2011).

A participação do ácido ascórbico como antioxidante no sêmen de peixes é controversa. Em truta (*O. mykiss*), esta vitamina está presente no plasma seminal em níveis relativamente elevados, o que é um forte indício da

sua importância como antioxidante (CIRESKO; DABROWSKI, 1994). De maneira semelhante, a adição do ácido ascórbico ao meio crioprotetor no sêmen de robalo (*Dicentrachus labrax*) foi suficiente para neutralizar o dano oxidativo promovido pela criopreservação, sendo mais um indício da sua importância (MARTINEZ-PÁRAMO et al., 2012a). Contraditoriamente, no sêmen de dourada (*Sparus auratus*) a adição de vitaminas (ácido ascórbico e tocoferol), ao meio extensor de congelamento não foi capaz de proteger contra os danos oxidativos e sim aumentar a fragmentação do DNA pós-descongelamento, provavelmente devido às doses utilizadas (CABRITA et al., 2011).

Em relação aos aminoácidos, o efeito antioxidante da taurina e hipotaurina podem ser evidenciados por meio da suplementação desses compostos ao meio crioprotetor do sêmen de dourada (*Sparus auratus*). A adição de ambos os aminoácidos foi capaz de fornecer certo nível de proteção aos espermatozoides, caracterizado pela redução da fragmentação do DNA e neutralização das EROs (CABRITA et al., 2011).

Além da taurina e hipotaurina, é provável que em sêmen de peixes exista um sistema antioxidante dependente do aminoácido metionina, que representa um importante mecanismo de defesa em diferentes células. A metionina está presente no plasma seminal de lota (*Lota lota*), perca (*Perca fluviatilis*), alburno (*Alburnus alburnus*) e truta marrom (*Salmo trutta*). A ação da metionina redutase está relacionada a ligação com as EROs e subsequente oxidação desta molécula. Já a metionina oxidase estimula a atividade da metionina redutase, no entanto, este mecanismo é pouco conhecido (LAHNSTEINER; MANSOUR, 2010; LAHNSTEINER; MANSOUR; PLAETZER, 2010).

2.6 Peroxidação lipídica no sêmen

Radicais livres são intermediários de reações químicas, que contém um ou mais elétrons desemparelhados, capazes de ocasionar danos celulares pela transferência destes elétrons para outras moléculas químicas. Os EROs são exemplos de radicais livres. Eles são formados como subprodutos de reações enzimáticas de sinalizações intercelulares e intracelulares, na qual incluem todos os radicais de oxigênio, como o ânion radical superóxido (O_2^-), radical hidroxila ($HO\cdot$), radical alquila ($L\cdot$), alcóxila ($LO\cdot$) e peróxila ($LOO\cdot$). Essas moléculas são altamente reativas podendo combinar facilmente com outras moléculas e induzir o processo de oxidação com consequente dano celular (KAUR; BILASPURI, 2011).

Os espermatozoides são células capazes de gerar EROs por um processo fisiológico normal e, apesar de ocasionar danos oxidativos a célula espermática, quando presentes em concentrações adequadas, desempenham importante papel na fisiologia do espermatozoide. Em mamíferos, o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio são capazes de induzir a hiperativação do espermatozoide, além de promover a capacitação do espermatozoide e ligação da célula espermática ao ovócito, possibilitando assim o processo de fertilização (LAMIRANDE et al., 1997).

Quando há um desequilíbrio entre a produção de EROs e a atividade antioxidante, a célula espermática fica vulnerável ao estresse oxidativo, que é uma condição associada ao acúmulo de EROs na célula e, conseqüentemente, de dano celular. Todos os componentes celulares, na qual incluem os lipídeos, proteínas, ácidos nucleicos e carboidratos são alvos potenciais deste evento (AITKEN; CLARKSON; FISHEL, 1989). Este acúmulo de radicais livres na célula espermática pode ocorrer em função de dois eventos principais. Primeiro associado à ausência de um mecanismo de defesa endógeno funcional e, em

segundo lugar, devido à exposição da célula a técnicas de manipulação, como por exemplo, as técnicas de criopreservação (DU-PLESSIS et al., 2008).

Quando os danos ocasionados pelo estresse oxidativo são direcionados aos lipídeos da membrana do espermatozoide, ocorre um evento chamado de peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica é uma cascata de eventos bioquímicos resultantes da ação dos EROs sobre os lipídeos insaturados das membranas celulares. Este evento gera, principalmente, os radicais L, LO, e LOO[·], na qual leva à destruição de sua estrutura, falência dos mecanismos de troca de metabólitos e, em condição extrema, à morte celular. A composição lipídica da membrana do espermatozoide torna esta célula particularmente susceptível ao dano oxidativo devido à grande quantidade de ácidos graxos insaturados (BENZIE, 1996).

Resumidamente, o processo de peroxidação lipídica ocorre em três fases principais conhecidas como iniciação, propagação e terminação. Na primeira etapa, basicamente o que ocorre é o início da peroxidação a partir do ataque dos ácidos graxos poli-insaturados por uma espécie altamente reativa, capaz de abstrair um átomo de hidrogênio destas moléculas e formar os radicais alquilas. A propagação da reação se dá por meio da combinação dos radicais alquilas com o oxigênio, formando assim, o radical peroxila. O radical peroxila, por sua vez, promove a remoção de átomos de hidrogênio de outras moléculas de ácidos graxos na qual gera outro radical alquila. A reação entre o peroxila e átomo de hidrogênio removido gera um hidroperóxido lipídico (LOOH). Além da formação de radicais peroxilas, os hidroperóxidos produzidos podem dar origem a radicais alcoxilícos e hidroxílicos a partir da reação com Feⁿ⁺ e Cuⁿ⁺. Por conseguinte, a fase de terminação consiste na aniquilação dos radicais formados originando produtos não radicalares (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

Os danos ocasionados pela peroxidação lipídica ao espermatozoide são altamente variáveis e depende de diversos fatores como duração da exposição

aos EROs, tipo e concentração de EROs e níveis de antioxidantes. Em um revisão feita por Kothari et al. (2010) os autores destacam que entre os danos observados pela peroxidação lipídica os danos ao DNA são os mais importantes, na qual podem diminuir a viabilidade celular e, conseqüentemente, a capacidade de fertilização. Adicionalmente, os autores citam trabalhos onde a peroxidação lipídica pode ocasionar uma diminuição da fluidez da membrana e, conseqüentemente, resultar em uma diminuição da motilidade espermática e fusão do espermatozoide ao ovócito.

2.7 Efeito da criopreservação na qualidade do sêmen

A criopreservação é uma técnica bastante empregada para a conservação do sêmen de diferentes espécies de peixes, incluindo as espécies nativas do Brasil (FELIZARDO et al., 2010; ORFÃO et al., 2011). A técnica baseia-se no armazenamento de espermatozoides em nitrogênio líquido (-196 °C) na qual permite a manutenção da viabilidade celular por tempo indeterminado

A criopreservação é um método seguro a ser utilizado para a preservação dos recursos genéticos, uma vez que, após o processo de congelamento e descongelamento a motilidade espermática e capacidade de fertilização são recuperadas. No entanto, para a manutenção do espermatozoide a baixa temperatura é necessária a utilização de um protocolo de criopreservação adequado que depende da quantidade e qualidade do meio diluidor, tipo e concentração dos crioprotetores, o volume da amostra e características da célula espermática (KOPEIKA; KOPEIXA, 2008).

O sucesso da criopreservação pode ser afetado pela alta variabilidade na qualidade do sêmen a ser utilizado. Esta variabilidade está associada, principalmente, a fatores intrínsecos que determinam a crioresistência da célula espermática, que nada mais é que a habilidade do espermatozoide em preservar

suas características morfofuncionais após a criopreservação. A crioeresistência se dá em função da resistência da membrana e a capacidade da célula em manter suas estruturas intracelulares e funções básicas (KOPEIKA; KOPEIXA, 2008).

Durante o processo de criopreservação, a célula espermática é exposta a condições externas que não são fisiologicamente adequadas e isto acaba por afetar diversos parâmetros da atividade do espermatozoide, tais como motilidade, morfologia, composição do plasma seminal e atividade antioxidante (BUTSS et al., 2011; MARTINEZ-PÁRAMO et al., 2012a).

Dentre as causas deste efeito deletério, pode-se destacar a exposição do espermatozoide ao meio crioprotetor que ocasiona estresse osmótico a célula e, conseqüentemente danos à função espermática. A formação de microcristais de gelo durante o congelamento também é deletéria ao espermatozoide o que pode ocasionar osmoconcentração e desidratação da célula (MEDEIROS et al., 2002). Alterações metabólicas e danos oxidativos ocasionados por EROs também são eventos altamente prejudiciais ao espermatozoide (LI; LIU; ZHANG, 2006).

Entre os parâmetros afetados pela criopreservação, a motilidade espermática, é reduzida significativamente quando a célula é exposta a baixas temperaturas. Como exemplo, a criopreservação do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) diminuiu progressivamente a motilidade espermática (FELIZARDO et al., 2010). De maneira semelhante, os parâmetros de motilidade de dourada (*Sparus auratus*), robalo (*Dicentrarchus labrax*) e de salmonídeos (*Salvelinus fontinalis* e *Oncorhynchus mykiss*) foram significativamente reduzidos em função do congelamento, com menor percentual de células móveis e menor velocidade progressiva, quando comparado ao sêmen fresco (LAHNSTEINER; MANSOUR; KUNZ, 2011; MARTÍNEZ-PÁRAMO et al., 2012b; ZILLI et al., 2008). Segundo Zilli et al. (2008), esta redução dos parâmetros de motilidade pode estar associada aos danos ao flagelo, redução da função mitocondrial e degradação de proteínas.

A morfologia espermática também pode ser afetada pelo processo de criopreservação. Alterações ultraestruturais no espermatozoide podem ocorrer em função da alteração na osmolaridade do meio que os circundam. Estas alterações podem ser caracterizadas por rompimento da membrana, redução da função mitocondrial, espiralização, ruptura ou aderência do axonema, e são responsáveis por deficiências funcionais e causas de redução da motilidade e capacidade de fertilização (MARQUES, 2001).

As anomalias espermáticas podem ser divididas em dois grupos, sendo estas, anomalias menores e anomalias maiores. As anomalias menores ocorrem durante a espermatogênese em decorrência de fatores que acometem os reprodutores. Já as anomalias maiores estão relacionadas aos procedimentos de manejo durante a coleta (MILIORINI, 2006). Em mamíferos, amostras de sêmen com anomalias espermáticas acima de 30% para bovinos e 20% para ovinos e suínos não devem ser utilizadas (COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL - CBRA, 1998). Para peixes, estes limites ainda não foram estabelecidos, no entanto, durante a criopreservação do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) observou-se anomalias na faixa de 20 a 30% a qual foi associada com a diminuição da taxa de motilidade pós-descongelamento (FELIZARDO et al., 2010).

A exposição da célula espermática ao meio crioprotetor é responsável por ocasionar danos ao espermatozoide. Além do choque osmótico, a diluição no meio extensor acaba por alterar a constituição do plasma seminal com diluição de componentes importantes, como proteínas e enzimas antioxidantes. Portanto, constituintes do plasma seminal quando presentes em condições subótimas, podem prejudicar a função de proteção do espermatozoide e, conseqüentemente, o potencial de congelabilidade (BUTSS et al., 2011).

A redução da capacidade antioxidante total do sêmen em função do processo de criopreservação foi observada durante a criopreservação do sêmen

de pargo (*Pagrus major*), caracterizado pela diminuição na atividade da enzima superóxido dismutase e catalase (CHEN et al., 2010). Em amostras de sêmen descongelado de robalo (*Dicentrarchus labrax*) a atividade antioxidante total apresentou uma redução significativa, indicando que os antioxidantes naturalmente presentes no plasma seminal desta espécie também foram reduzidos em função, provavelmente, da diluição ao meio extensor (MARTÍNEZ-PARÁMO et al., 2009).

O aumento da peroxidação lipídica ocorre concomitante com a diminuição da atividade antioxidante, uma vez que, a célula se torna mais vulnerável a ação das espécies reativas de oxigênio, como mencionado acima. Em consequência, o EROs produzidos degradam os fosfolipídios de membrana ocasionando assim o processo de peroxidação lipídica (CHEN et al., 2010).

Entretanto, o processo de criopreservação nem sempre induzirá a um aumento do processo de peroxidação. Durante a criopreservação do sêmen de truta (*Salvelinus fontinalis*) e truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) a peroxidação lipídica não apresentou diferenças significativas entre amostras de sêmen *in natura* e descongelado, provavelmente associado com o curto período de preservação da amostra, o que impediu a manifestação das EROs (LAHNSTEINER; MANSOUR; KUNZ, 2011; MARTÍNEZ-PARÁMO et al., 2012a). Estes autores afirmam que a menor viabilidade do sêmen após a criopreservação está relacionada apenas ao estresse osmótico, uma vez que, o nível de peroxidação lipídica pós-descongelamento não aumentou.

2.8 Soluções ativadoras da motilidade espermática

O ambiente natural onde ocorre a fertilização nem sempre é o melhor meio para a sobrevivência dos espermatozoides e ovócitos. Isto se dá em função dos efeitos deletérios da água sobre os gametas. A exposição ao ambiente

aquático acaba por induzir deterioração morfológica rápida na célula espermática, com ruptura da membrana plasmática. Já para os ovócitos, após liberação na água ocorre reação cortical com fechamento da micrópula. Sendo assim, o uso da fertilização artificial torna-se de grande importância para a melhora do processo reprodutivo em peixes (BILLARD, 1986).

A utilização de soluções ativadoras adequadas, que mimetizem o plasma seminal e não comprometam a qualidade do sêmen, pode contribuir para aumentar a duração e intensidade da motilidade espermática, ambas contribuindo para maior sobrevivência e capacidade fertilizante do espermatozoide, contrapondo assim os efeitos deletérios da exposição ao ambiente aquático ou ao ativador espermático (BILLARD, 1992; VALDEBENITO et al., 2009). Além disso, pode contribuir para melhorar a criopreservação do sêmen.

A composição iônica do meio ativador, apesar de importante, exerce menor influência sobre o espermatozoide quando comparada a osmolaridade, uma vez que soluções não iônicas também são capazes de ativar a motilidade espermática. Entretanto, a adição de íons traz efeitos aditivos nos parâmetros de motilidade (HE; KEERAN-JENKINS; WOODS, 2012; MORITA et al., 2006, 2008; YANG; TIERSCH, 2009).

A adição de potenciadores da motilidade espermática na solução ativadora é uma alternativa a ser utilizada tanto em sêmen fresco como em sêmen descongelado. Dentre estes, o uso de metilxantinas, como a cafeína e a teofilina, em sêmen tem sido proposta em diferentes espécies animais, como em bubalinos (FATTOUH; ABDU, 1991), coelhos (LÓPEZ; ALVARINÓ, 2000), bovinos (COSCIANI et al., 2001), suínos (GLOGOWSKI; DANFORTH; CIRESZKO, 2002) cães (MILANI et al., 2010), equinos (CARRINGTON et al., 2011) e primatas (OLIVEIRA et al., 2011).

Em peixes, poucos estudos foram realizados, entretanto, não se pode destacar a importância destas substâncias na motilidade espermática, uma vez que, podem contribuir para minimizar o efeito deletério ao espermatozoide, ocasionado, por exemplo, pelo processo de criopreservação (BABIACK et al., 1999; VALDEBENITO, 2007).

2.9 Cafeína adicionada à solução ativadora

A cafeína faz parte de um grupo de substâncias com efeito farmacológico semelhante conhecido como metilxantinas. Além da cafeína, inclui-se neste grupo a teofilina e a pentoxifilina, que são os principais representantes desta classe. Estas substâncias são metilados derivados da purina, podendo ser classificadas também com alcaloides (STAVRIC, 1988).

O efeito da cafeína no sêmen está relacionado com a sua ação como inibidor da fosfodiesterase. Esta enzima é responsável pela hidrólise do AMPc e, quando inibida, induz um aumento do AMPc, molécula essencial no processo de ativação da motilidade espermática e no metabolismo energético da célula. Sendo assim, a cafeína tem sido utilizada com frequência como aditivo no sêmen de mamíferos a fim de melhorar as características de motilidade espermáticas, principalmente relacionadas aos danos ocasionados pelo processo de criopreservação (COLÁS; CEBRIÁN PÉREZ; MIÑO-BLANCO, 2010).

As metilxantinas também atuam em outro sistema enzimático importante, a fosfatase alcalina (FA), tanto no plasma seminal como no espermatozoide, com efeito distinguível para cada tipo de metilxantina. A teofilina e a cafeína apresentam efeito inibitório sobre a FA do plasma seminal e do espermatozoide. A teofilina é a que apresenta efeito mais acentuado, com efeito inibitório dose-dependente e influenciado pelo pH, tendo maior eficácia em baixo pH. Já a pentoxifilina apresenta efeito paradoxal sobre a FA, sendo

capaz de estimular esta enzima no espermatozoide e não exercer nenhum efeito sobre a FA do plasma seminal. Apesar destes efeitos, a inibição ou estimulação da FA pode não estar relacionada ao efeito benéfico destas substâncias na motilidade espermática (GLOGOWSKI; DANFORTH; CIERESZKO, 2002). Além disso, a cafeína também é capaz de induzir um aumento significativo no teor de cálcio intracelular em espermatozoides viáveis que contribui para a ativação da adenilciclase com consequente aumento do AMPc (COLÁS; CEBRIÁN PÉREZ; MIÑO-BLANCO, 2010).

A adição da cafeína ao sêmen é capaz de afetar diferentes parâmetros da motilidade espermática em diferentes espécies animais, dentre eles, a porcentagem de células móveis, intensidade e duração. Em coelhos, após a adição de soluções de cafeína na concentração de 5 mM, ao sêmen diluído, fresco e refrigerado, observou-se um aumento na porcentagem de células móveis o que indica que esta metilxantina é capaz de induzir uma reativação de espermatozoides imóveis (LÓPEZ; ALVARIÑO, 2000). Em suínos, a intensidade da motilidade espermática foi maior na presença dessa metilxantina (GLOGOWSKI; DANFORTH; CIERESZKO, 2002). Em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), a cafeína adicionada na solução ativadora na concentração de 10 mM, foi capaz de prolongar a duração da motilidade espermática (VALDEBENITO, 2007) Em equinos, concentração de 2 mM de cafeína foi capaz de induzir um aumento no número de células móveis, além de aumentar a duração da motilidade pós-descongelamento (CARRINGTON et al., 2011).

Variáveis individuais dos espermatozoides, tais como velocidade curvilínea (VCL), amplitude lateral de cabeça (ALH), velocidade linear (VSL) e motilidade progressiva (PM), são afetadas de maneira diferente pela adição da cafeína. Em sêmen de cães, a adição de cafeína no momento do descongelamento, na concentração de 7,5 mM, foi capaz de aumentar os valores

de VCL e ALH, entretanto apresentou efeito negativo no VSL e PM. Apesar dos efeitos diferentes em cada variável, de uma maneira geral, a cafeína foi capaz de aumentar a qualidade do sêmen pela melhoria da motilidade total (MILANI et al., 2010). A adição de cafeína na concentração de 2 mM no sêmen refrigerado de equino foi capaz de induzir um aumento na PM quando comparado ao grupo controle (sem adição de cafeína), resultando em maior duração da motilidade espermática (CARRINGTON et al., 2011).

Apesar do efeito benéfico da cafeína, a inclusão em altas concentrações no sêmen pode ocasionar efeitos adversos sobre os espermatozoides e, conseqüentemente, sobre a capacidade fertilizante. A adição de soluções de cafeína na concentração de 100 mM no sêmen diluído de coelho, apesar de aumentar a motilidade, reduziu a taxa de fertilização (LÓPEZ; ALVARIÑO, 2000). Concentrações de 4 mM e 6mM, adicionadas ao sêmen diluído de bubalinos antes do congelamento, também mostraram-se prejudicial, uma vez que, a motilidade pós-descongelamento manteve-se por curto período (FATTOUH; ABDU, 1991). Em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) concentração elevada de cafeína (20 mM), adicionada a solução ativadora, mostrou-se prejudicial à motilidade espermática, com redução da duração (VALDEBENITO, 2007).

O efeito da cafeína sobre a motilidade espermática pode ser afetada pelo tempo de incubação e armazenamento do sêmen. Para que a cafeína possa exercer efeito sobre o espermatozoide é necessário um tempo mínimo de incubação que permita a restauração da motilidade, sendo o aumento da motilidade proporcional ao tempo de incubação. Em bubalinos a adição da cafeína no sêmen diluído resultou em maiores valores de motilidade quando o período de incubação foi de 2 horas (FATTOUH; ABDU, 1991). Contraditoriamente, o tempo de incubação não exerceu influência sobre a motilidade espermática em sêmen de cães, sendo que a cafeína já foi capaz de

melhorar os parâmetros de motilidade logo após a sua adição (MILANI et al., 2010). Já em relação ao armazenamento, longos períodos fazem com que a célula entre em exaustão e perde a capacidade de reagir com a cafeína (LÓPEZ; ALVARIÑO, 2000).

O efeito da cafeína é bastante variável e depende de diferentes fatores, tais como, a espécie animal, concentração, tempo de incubação e armazenamento. Além disso, estas variações podem estar associadas a presença de substratos exógenos presentes no meio diluidor ou ativador (FATTOUH; ABDOU, 1991). Por exemplo, o uso da água de coco, como meio diluidor, adicionado de cafeína foi capaz de aumentar a motilidade e o vigor do sêmen de macaco-prego quando comparado a outros diluidores (TES-TRIS). Provavelmente, estas substâncias atuam de forma sinérgica no processo de ativação espermática, combinando os efeitos benéficos destas substâncias. A cafeína estimula o aumento do AMPc e a água de coco, que é rica em ácido acético, é capaz de restaurar vias específicas do AMPc, ambas contribuindo para a capacidade energética da célula espermática (OLIVEIRA et al., 2011).

REFERÊNCIAS

- AITKEN, R. J.; CLARKSON, J. S.; FISHEL, S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. **Biology of Reproduction**, New York, v. 40, n. 6, p. 183-197, June 1989.
- ALAVI, S. M. H.; COSSON, J. Sperm motility in fishes: II., effects of ions and osmolality: a review. **Cell Biology International**, London, v. 30, n. 1, p. 1-14, Jan. 2006.
- ALAVI, S. M. H.; RODINA, D. G.; LINHART, T. Roles of osmolality, calcium: potassium antagonist and calcium in activation and flagellar beating pattern of sturgeon sperm. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, New York, v. 160, n. 1, p. 166-174, Oct. 2011.
- BABIACK, I. et al. The effect of egg yolk, low density lipoproteins, methyloxanthines and fertilization diluent on cryopreservation efficiency of northern pike (*Esox Lucius*) spermatozoa. **Theriogenology**, Stoneham, v. 52, n. 3, p. 473-479, Aug. 1999.
- BENZIE, I. F. F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. **International Journal of Food Science and Nutrition**, Parma, v. 47, n. 3, p. 233-261, May 1996.
- BILLARD, R. Reproduction in rainbow trout: sex differentiation, dynamics of gametogenesis, biology and preservation of gametes. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 100, n. 1/3, p. 263-298, Jan. 1992.
- _____. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. **Reproduction Nutrition Development**, Paris, v. 26, n. 4, p. 877-920, 1986.
- BILLARD, R. et al. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 129, n. 1/4, p. 95-112, Jan. 1995.
- BOBE, J.; LABBÉ, C. Egg and sperm quality in fish. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 165, n. 3, p. 535-548, Feb. 2010.
- BURNES, G.; MOYES, C. D.; MONTGOMERIE, R. Motility, ATP levels and metabolic enzyme activity of sperm from bluegill (*Lepomis macrochirus*). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, London, v. 140, n. 1, p. 11-17, Jan. 2005.

BUTTS, I. A. E. et al. Semen characteristics and their ability to predict sperm cryopreservation potential of Atlantic cod, *Gadus morhua* L. **Theriogenology**, Stoneham, v. 75, n. 7, p. 1290-1300, Apr. 2011.

CABRITA, E. et al. The influence of certain aminoacids and vitamins on post-thaw fish sperm motility, viability and DNA fragmentation. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 125, n. 1/4, p. 189-195, May 2011.

CARRINGTON, J. L. et al. Effect of caffeine, pentoxifylline, and taurine on post-thaw parameters of equine frozen semen. **Journal of Equine Veterinary Science**, Champaign, v. 31, n. 5, p. 230-356, May 2011.

CHEN, Y. K. et al. Effect of long-term cryopreservation on physiological characteristics, antioxidant activities and lipid peroxidation of red seabream (*Pagrus major*) sperm. **Cryobiology**, San Diego, v. 61, n. 2, p. 189-193, July 2010.

CIERESZKO, A. Chemical composition of seminal plasma and its physiological relationship with sperm motility, fertilizing capacity and cryopreservation success in fish. In: ALAVI, S. N. H. et al. (Ed.). **Fish spermatology**. Oxford: Alpha Science International, 2008. p. 215-241.

CIERESZKO, A.; DABROWSKI, K. Relationship between biochemical constituents of fish semen and fertility: the effect of short-term storage. **Fish Physiology Biochemistry**, Amsterdam, v. 12, n. 5, p. 357-369, Jan. 1994.

CIERESZKO, A. et al. The presence of uric acid, an antioxidative substance, in fish seminal plasma. **Fish Physiology Biochemistry**, Amsterdam, v. 21, n. 5, p. 313-315, Jan. 1999.

COLÁS, C.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A.; MIÑO-BLANCO, T. Caffeine induces ram sperm hyperactivation independent of cAMP-dependent protein kinase. **International Journal Andrology**, Copenhagen, v. 33, n. 1, p. 187-197, Feb. 2010.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal**. 2. ed. Belo Horizonte, 1998. 49 p.

COSCIONI, A. C. et al. Sperm function and production of bovine embryos in vitro after swim-up with different calcium and caffeine concentration. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 67, n. 1/2, p. 59-67, July 2001.

DU-PLESSIS, S. S. et al. Impact of oxidative stress on IVF. **Expert Review of Obstetrics and Gynecology**, London, v. 3, n. 4, p. 539-554, 2008.

FATTOUH, E. S. M.; ABDU, M. S. S. Effect of caffeine on the post-thaw motility of buffalo spermatozoa. **Theriogenology**, Stoneham, v. 36, n. 1, p. 149-154, July 1991.

FELIZARDO, V. O. et al. Effect of cryopreservant combinations on the motility and morphology of curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 122, n. 3, p. 259-263, Dec. 2010.

GLOGOWISKI, J.; DANFORTH, D. R.; CIERESZKO, A. Inhibition of alkaline phosphatase activity of boar semen by pentoxifylline, caffeine, and theophylline. **Journal of Andrology**, Philadelphia, v. 23, n. 6, p. 783-792, Nov. 2002.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 3rd ed. New York: Oxford University, 1999. 936 p.

HE, Q. et al. Evaluation of activation and storage conditions for sperm of yellow drum *Nibea albiflora*. **Aquaculture**, Amsterdam, n. 324/325, p. 319-322, Jan. 2012.

HE, S.; KEERAN-JENKINS, K.; WOODS, C. Activation of sperm motility in striped bass via a cAMP-independent pathway. **Theriogenology**, Stoneham, v. 61, n. 1/8, p. 1487-1498, May 2004.

HU, J. et al. Changes in extracellular osmolality initiate sperm motility in freshwater teleost rosy barb *Puntius conchoniis*. **Theriogenology**, Stoneham, v. 72, n. 5, p. 704-710, Sept. 2009.

INGERMANN, R. Energy metabolism and respiration in fish spermatozoa. In: ALAVI, S. N. H. et al. (Ed.). **Fish spermatology**. Oxford: Alpha Science International, 2008. p. 241-267.

KAUR, A. B.; BILASPURI, G. S. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. **Veterinary Medicine International**, New York, v. 2011, p. 1-7, 2011.

KOPEIKA, E.; KOPEIKA, J. Variability of sperm quality after cryopreservation in fish. In: ALAVI, S. N. H. et al. (Ed.). **Fish spermatology**. Oxford: Alpha Science International, 2008. p. 347-397.

KOTHARI, S. et al. Free radicals: their beneficial and detrimental effects on sperm function. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v. 48, n. 5, p. 425-435, May 2010.

LAHNSTEINER, F.; MANSOUR, N. A comparative study on antioxidant systems in semen of species of the Percidae, Salmonidae, Cyprinidae, and Lotidae for improving semen storage techniques. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 307, n. 1/2, p. 130-140, Sept. 2010.

LAHNSTEINER, F.; MANSOUR, N.; KUNZ, F. A. The effect of antioxidants on the quality of cryopreserved semen in two salmonid fish, the brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Theriogenology**, Stoneham, v. 76, n. 5, p. 882-890, June 2011.

LAHNSTEINER, F.; MANSOUR, N.; PLAETZER, K. Antioxidant systems of brown trout (*Salmo trutta f. fario*) semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 119, n. 3/4, p. 314-321, June 2010.

LAHNSTEINER, F.; PATZNER, R. A. Sperm morphology and ultrastructure in fish. In: ALAVI, S. N. H. et al. (Ed.). **Fish spermatology**. Oxford: Alpha Science International, 2008. p. 1-63.

LAMIRANDE, E. et al. Reactive oxygen species and sperm physiology. **Reviews of Reproduction**, Colchester, v. 2, n. 2, p. 48-54, 1997.

LI, J.; LIU, Q. H.; ZHANG, S. C. Evaluation of the damage in fish spermatozoa cryopreservation. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, Qingdao, v. 4, n. 4, p. 370-377, Apr. 2012.

LÓPEZ, F. J.; ALVARINO, J. M. R. Effects of added caffeine on results following artificial insemination with fresh and refrigerated rabbit semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 58, n. 1/2, p. 147-154, Feb. 2000.

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, 2001.

MARTINEZ-PARAMO, S. et al. Cryobanking as tool for conservation of biodiversity: effect of brown trout sperm cryopreservation on the male genetic potential. **Theriogenology**, Stoneham, v. 71, n. 4, p. 594-604, Mar. 2009.

_____. Incorporation of ascorbic acid and α -tocopherol to the extender media to enhance antioxidant system of cryopreserved sea bass sperm.

Theriogenology, Stoneham, v. 77, n. 6, p. 1129-1136, Apr. 2012a.

_____. Sea bass sperm freezability is influenced by motility variables and membrane lipid composition but not by membrane integrity and lipid peroxidation. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 131, n. 3/4, p. 211-218, Apr. 2012b.

MEDEIROS, C. M. O. et al. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, Stoneham, v. 57, n. 1, p. 327-344, Jan. 2002.

MILANI, C. et al. Effect of post-thaw dilution with caffeine, pentoxifylline, 2'-deoxyadenosine and prostatic fluid on motility of frozen-thawed dog semen.

Theriogenology, Stoneham, v. 74, n. 1, p. 153-164, Mar. 2010.

MILIORINI, A. B. **Ativadores e concentrações de metanol e dimetilsulfóxido na qualidade do sêmen criopreservado de curimba (*Prochilodus lineatus*)**.

2006. 99 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

MORISAWA, M. et al. Effects of osmolality and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes. **Journal of Experimental Biology**, London, v. 107, p. 95-103, Nov. 1983.

MORITA, M. et al. Changes in sperm motility in response to osmolality/ Ca^{2+} in three Indonesian fresh water teleosts: Goby (*Oxyeleotris marmorata*), Java carp (*Puntius javanicus*), and catfish (*Clarias batrachus*). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, New York, v. 143, n. 3, p. 361-367, Mar. 2006.

OLIVEIRA, K. G. et al. Semen coagulum liquefaction, sperm activation and cryopreservation of capuchin monkey (*Cebus apella*) semen in coconut water solution (CWS) and TES-TRIS. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 123, n. 1, p. 75-80, Jan. 2011.

ORFÃO, L. H. et al. Extender composition, osmolality and cryoprotectant effects on the motility of sperm in the Brazilian endangered species Brycon opalinus (*Characiformes*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 311, n. 1/4, p. 241-247, Feb. 2011.

RURANGWA, E. et al. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 234, n. 1/4, p. 1-28, May 2004.

STAVRIC, B. Methylxanthines: toxicity to humans: 2., caffeine. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 26, n. 7, p. 645-662, July 1988.

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

TIERSCH, T. R.; YANG, H. Environmental salinity-induced shifts in sperm motility activation in *Fundulus grandis*. **Aquaculture**, Amsterdam, n. 324/325, p. 145-150, Jan. 2012.

VALDEBENITO, N. I. Efecto de la cafeína em la motilidade y fertilidade espermática de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*). **Información Tecnológica**, La Serena, v. 18, n. 2, p. 61-65, 2007.

VALDEBENITO, N. I. et al. Factores fisicoquímicos que regulan la motilidade espermática em peces: aspectos básicos y aplicados: uma revisó. **Archivos Medicina Veterinaria**, Valdivia, v. 41, p. 97-106, 2009.

YANG, H.; TIERSCH, T. R. Sperm motility initiation and duration in a euryhaline fish, medaka (*Oryzias latipes*). **Theriogenology**, Stoneham, v. 72, n. 3, p. 386-392, Aug. 2009.

ZILLI, L. et al. Aquaporin inhibition changes protein phosphorylation pattern following sperm motility activation in fish. **Theriogenology**, Stoneham, v. 76, n. 4, p. 737-744, Sept. 2011.

_____. Evidence for the involvement of *Aquaporins* in sperm motility activation of the teleost gilthead sea bream (*Sparus aurata*). **Biology of Reproduction**, New York, v. 81, n. 5, p. 880-888, July 2009.

_____. Molecular mechanisms determining sperm motility initiation in two sparids (*Sparus aurata* and *Lithognathus mormyrus*). **Biology of Reproduction**, New York, v. 79, n. 2, p. 356-366, Apr. 2008.

CAPÍTULO 2 Características espermáticas para prever o potencial de congelabilidade do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*)

RESUMO

Este experimento foi conduzido com o objetivo de determinar quais características espermáticas são capazes de prever com mais precisão o potencial de congelabilidade do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*), através da análise de correlação canônica. Foram utilizados onze reprodutores com peso inicial de $705,21 \pm 111$ g. Para a criopreservação, alíquota de 200 μ L de sêmen, de cada animal, foi diluída na solução crioprotetora (DMSO 10% e BTS 5%), na proporção de 1:4 e envasada em palhetes de 0,5 ml. A criopreservação afetou ($P < 0,05$) todas as variáveis de qualidade, com redução na motilidade espermática, duração da motilidade e atividade antioxidante e aumento nas anomalias totais, anomalias maiores, anomalias menores e peroxidação lipídica. No sêmen fresco, observou-se correlação positiva entre duração da motilidade e patologias maiores ($r=0,4688$; $P=0,0278$) e correlação negativa entre motilidade e duração da motilidade ($r=-0,4893$; $P=0,0208$), atividade antioxidante e patologias menores ($r=-0,5149$; $P=0,0142$). No sêmen descongelado observou-se correlação positiva entre motilidade e duração da motilidade ($r=0,7159$; $p=0,0002$), motilidade e atividade antioxidante ($r=0,4288$; $p=0,0465$) e correlação negativa entre motilidade e patologias menores ($r=-0,4166$; $p=0,0538$), atividade antioxidante e peroxidação lipídica ($r=-0,3683$; $p=0,0917$). Apenas a motilidade espermática e duração da motilidade mensuradas no sêmen descongelado tiveram uma alta correlação ($-0,6377$ e $-0,7306$ respectivamente) com a variável canônica representada pelas características espermáticas do sêmen fresco. De acordo com os resultados obtidos pode-se concluir que motilidade e duração da motilidade podem ser utilizadas para prever o potencial de congelabilidade.

Palavras chaves: Atividade antioxidante. Congelamento. Morfologia espermática. Motilidade espermática. Peroxidação lipídica.

ABSTRACT

The study was conducted with the objective of determining which sperm characteristics were able to predict more accurately the freezability potential of curimba (*Prochilodus lineatus*) semen by means of canonical correlation analysis. Eleven breeders with the initial weight of 705.21 ± 111 g were used. For the cryopreservation, an aliquot of 200 μ L of semen taken from each animal was diluted in the cryoprotectant solution (DMSO 10% and BTS 5%) in a ratio of 1:4 and placed into 0.5 ml sterile straws. Cryopreservation affected ($P < 0.05$) all quality variables, with reduction in sperm motility, motility duration and antioxidant activity and increase in total anomalies, major anomalies, minor anomalies and lipid peroxidation. In fresh semen there was a positive correlation between motility duration and major pathologies ($r = 0.4688$, $P = 0.0278$) and negative correlation between motility and motility duration ($r = -0.4893$, $P = 0.0208$), total antioxidant activity and anomalies minor ($r = -0.5149$, $P = 0.0142$). In the thawed semen was observed a positive correlation between motility and motility duration ($r = 0.7159$, $p = 0.0002$), motility and antioxidant activity ($r = 0.4288$, $p = 0.0465$) and negative correlation between motility and minor pathologies ($r = -0.4166$, $p = 0.0538$), and lipid peroxidation and antioxidant activity ($r = -0.3683$, $p = 0.0917$). Only sperm motility and motility duration, measured in thawed semen, presented high correlation (-0.6377 and -0.7306 respectively) with the canonical variable represented by the sperm characteristics of fresh semen. According to the obtained results it can be concluded that motility and motility duration may be used to predict freezability potential.

Keywords: Antioxidant activity. Freezing. Sperm morphology. Sperm motility. Lipid peroxidation.

1 INTRODUÇÃO

Dentre as espécies nativas do Brasil, a curimba (*Prochilodus lineatus*) é uma espécie de piracema de médio porte que se destaca pela sua importância para o ecossistema, além de apresentar alta produtividade quando criadas comercialmente, sendo importante a utilização de técnicas que permitam a sua preservação e o aumento da produtividade, como por exemplo, através da preservação dos espermatozoides.

A criopreservação de sêmen é uma técnica que se baseia no armazenamento de espermatozoides em nitrogênio líquido (-196 °C), na qual permite a manutenção da viabilidade celular por tempo indeterminado. Em geral, esta técnica tem sido amplamente utilizada para práticas reprodutivas, conservação do germoplasma e melhoramento genético em várias espécies de mamíferos (MARTÍNEZ-PÁRAMO et al., 2012). Em peixes teleósteos, a expansão da produção aquícola e o declínio das populações selvagens têm impulsionado o interesse pela criopreservação do sêmen (BUTTS et al., 2011).

Apesar de ser um método seguro, a criopreservação do sêmen ainda não é uma prática de rotina nos programas de fertilização. Isso se dá em função de diversos fatores que limitam a utilização do sêmen criopreservado, como por exemplo, protocolos de criopreservação não padronizados, perda de qualidade seminal e a variabilidade na qualidade inicial do sêmen (BUTTS et al., 2011).

A perda de qualidade seminal durante a criopreservação está associada a exposição da célula espermática a condições externas que não são fisiologicamente adequadas. Essa exposição desencadeia uma série de eventos prejudiciais ao espermatozoide, tais como, estresse osmótico, alterações na bioquímica do plasma seminal, desidratação e cristalização celular e danos oxidativos (KOPEIKA; KOPEIKA, 2008).

Como consequências desses eventos, diversos parâmetros da atividade do espermatozoide são afetados negativamente, com destaque para a motilidade e morfologia espermática e atividade antioxidante (BUTSS et al., 2011; MARTÍNEZ-PARÁMO et al., 2012). Além disso, a variabilidade na qualidade inicial do sêmen influencia diretamente a capacidade do espermatozoide em preservar suas características morfofuncionais após a criopreservação e, conseqüentemente, no sucesso do congelamento (KOPEIKA; KOPEIKA, 2008).

Em função da perda de qualidade e da variabilidade na capacidade dos espermatozoides em sustentar a criopreservação, é de extrema importância desenvolver modelos que prevêm a capacidade da célula espermática em suportar ou não o congelamento criogênico. Tradicionalmente, os parâmetros de qualidade mais avaliados são motilidade, concentração espermática e morfologia espermática, taxa de fertilização e sobrevivência do embrião (KOPEIKA; KOPEIKA, 2008). No entanto, esses parâmetros dão uma visão geral da qualidade do sêmen, sendo necessárias análises mais específicas como a atividade antioxidante total e nível de peroxidação lipídica.

Portanto, o principal objetivo proposto com a execução desse trabalho foi o de determinar quais características espermáticas são capazes de prever com mais precisão o potencial de congelabilidade do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*), por meio das correlações canônicas entre as variáveis do sêmen antes e após a criopreservação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local do experimento e animais

O experimento foi conduzido no Setor de Piscicultura do Departamento de Produção Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás (DPA/EV/UFG), em Goiânia, GO, no mês de janeiro de 2012. As análises de morfologia espermática e análises bioquímicas do sêmen foram realizadas no Setor de Fisiologia e Farmacologia do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG.

Onze reprodutores de curimba (*Prochilodus lineatus*), com peso de $705,21 \pm 111$ g, foram mantidos em viveiros de terra sendo capturados com auxílio de rede de arrasto. Os peixes foram selecionados de acordo com as características reprodutivas, tais como papila urogenital hiperêmica e liberação de sêmen após leve massagem abdominal. Após captura e seleção, os animais foram transportados para o Laboratório do Setor de Piscicultura em caixas de transporte com oxigenação e qualidade de água adequada, onde foram mantidos em caixas d'água de polietileno (500 L) até a realização da coleta do sêmen. As condições de temperatura, oxigenação e pH da água foram mantidas ideais dentro do laboratório.

2.2 Indução hormonal, coleta e avaliação do sêmen *in natura*

Os animais foram submetidos a tratamento hormonal com extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC) para indução à espermição, sendo os reprodutores de curimba, primeiramente, pesados e marcados para estabelecer as doses do hormônio. A indução procedeu-se pela aplicação de duas doses do hormônio,

prévia e definitiva, de 0,5 e 5,0 mg de EBHC kg⁻¹ próxima à base da nadadeira dorsal. O intervalo entre as aplicações foi de 12 horas e o tempo entre a última dose e a coleta do sêmen foi de, aproximadamente, oito horas.

Para coleta do sêmen, os animais foram retirados da caixa d'água, envoltos em toalha e apoiados em uma superfície plana para facilitar o manuseio. As papilas urogenitais e região circunjacente foram limpas e secas como papel toalha para evitar qualquer tipo de contaminação com fezes, urina e sangue. Após leve massagem na parede celomática, no sentido crânio-caudal (FELIZARDO et al., 2010), o sêmen foi coletado em tubos de ensaio graduados estéreis.

Para certificar-se que o sêmen coletado não havia sido previamente ativado por contaminação, uma alíquota de 10 µL de sêmen por animal foi depositada em lâmina histológica de vidro e homogeneizada com 40 µL de solução de NaHCO₃, certificando-se da ausência de motilidade. Em seguida, uma alíquota de 10 µL de cada animal foi coletada e diluída em formol citrato (990 µL), para determinação da morfologia espermática. O restante do sêmen foi utilizado para criopreservação (200 µL) e obtenção do plasma seminal.

2.3 Criopreservação e descongelamento do sêmen

Após a análise inicial, 200 µL do sêmen in natura de cada reprodutor foi depositado em tubo de ensaio estéril para diluição, lenta e gradativa, pela solução crioprotetora, na proporção de uma parte de sêmen para quatro partes da solução (800 µL). A solução foi composta pelo crioprotetor interno dimetilsulfóxido (DMSO) adicionado na concentração de 10% e pelo diluidor *Beltsville Thawing Solution* (BTS Minitüb[®]) na concentração final de 5%.

A criopreservação foi conduzida imediatamente após a diluição, sendo as amostras envasadas em palhetes de 0,5 mL (duas palhetes por animal) que,

por sua vez, foram vedadas com massa cirúrgica estéril. Em seguida as palhetes foram então acondicionadas em raques de polietileno e transferidas para botijão de vapor de nitrogênio líquido (Taylor-Wharton, modelo CP 300, tipo *dry shipper*) para resfriamento. Após 24 horas, todas as amostras foram transferidas para o botijão de nitrogênio líquido para congelamento.

Oito dias após a criopreservação as palhetes foram retiradas do botijão para descongelamento. Utilizou-se banho-maria a temperatura de 60 °C para o descongelamento, sendo as palhetes imersas e levemente agitadas por oito segundos. Em seguida, foram retiradas do banho-maria, enxugadas com papel toalha sendo a extremidade correspondente a massa cirúrgica descartada. O sêmen foi então depositado em tubos tipo Eppendorf, sendo uma alíquota de 10 µL coletada e diluída em formol citrato (990 µL), para determinação da morfologia espermática após o descongelamento. O restante do sêmen foi utilizado para obtenção do plasma seminal.

2.4 Obtenção do plasma seminal

O restante do sêmen *in natura* e descongelado de cada amostra foi centrifugado durante 10 minutos a 7000 rpm. O sobrenadante foi então colocado em tubos criogênicos e armazenados a -80 °C até realização das análises de atividade antioxidante total e peroxidação lipídica (BUTSS et al., 2011). Duas mensurações de cada componente do plasma seminal (atividade antioxidante e peroxidação lipídica) foram realizadas.

2.5 Avaliação das características espermáticas

2.5.1 Motilidade espermática

Para ativação da motilidade uma alíquota de 10 µL de sêmen de cada animal foi depositada em lamina histológica de vidro e homogeneizada com 40 µL de solução de NaHCO₃ (0,76%). A motilidade espermática, das amostras de sêmen fresco e descongelado, foi observada em microscópio óptico de luz sob aumento de 100 dioptrias sendo estimada em porcentagem média de células moveis em três campos, em uma escala de 0-100%. A duração foi determinada desde a homogeneização com a solução ativadora até que restassem apenas 10% de espermatozoides móveis. Esse procedimento foi realizado em duplicata para cada amostra

2.5.2 Morfologia espermática

A análise morfológica foi realizada a partir de amostras de sêmen *in natura* e descongelada previamente fixada em formol citrato. Uma alíquota de 10 µL da solução foi depositada em lâminas de vidro e cobertas por lamínula. Em seguida, a morfopatologia de 100 espermatozoides, focalizados em diversos campos da lâmina, foi observada em microscópio óptico de contraste de fase com iluminação episcópica em um aumento de 1000 dioptrias. Foram investigadas as patologias de cabeça, peça intermediária e da cauda, conforme descrito a seguir (MILIORINI, 2006):

Patologias de cabeça: patologias maiores (macrocefalia, microcefalia e cabeça degenerada) e patologias menores (isolada normal);

Patologias de peça intermediária: patologia maior (peça intermediária degenerada);

Patologias de cauda: patologias maiores (fraturada, fortemente enrolada e degenerada) e patologias menores (dobrada).

Assim como para os componentes do plasma seminal e motilidade, esse procedimento foi repetido para obter duas mensurações para análise estatística.

2.5.3 Atividade antioxidante total

A atividade antioxidante do sêmen, antes e após a criopreservação, foi determinada utilizando kit comercial colorimétrico (QuantiChrom™ Antioxidant Assay Kit - DTAC-100). O princípio do teste baseia-se na mensuração da capacidade antioxidante total (TAC), onde o Cu^{2+} é reduzido por um antioxidante (trolox) para Cu^+ . Quando incubado com o reagente, o Cu^+ forma um complexo corado, sendo a intensidade da cor em 570 nm proporcional ao TAC da amostra. Trolox foi utilizado como padrão e as amostras foram expressas em μM equivalentes das concentrações padrão de trolox.

2.5.4 Peroxidação lipídica

Para determinar o nível de peroxidação lipídica, antes e após a criopreservação, foi utilizado um kit colorimétrico comercial (QuantiChrom™ TBARS Assay Kit - DTBA-100). O kit baseia-se na reação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), como o malonaldeído (MDA), com o ácido tiobarbitúrico (TBA) para formar um produto de cor rosa. A intensidade da cor a 535 nm é proporcional à concentração de TBARS na amostra.

2.6 Análises estatísticas

Para avaliar o efeito da criopreservação sobre as características espermáticas foi feito uma análise de variância. Em caso de significância, os dados foram submetidos ao teste T, a 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico Sisvar versão 5.3.

Associações simples no sentido bivariado, entre as características espermáticas mensuradas no sêmen fresco e no sêmen descongelado, foram determinadas por meio do coeficiente linear de Pearson, considerando um nível de significância de 5%.

Para avaliar a associação entre as características espermáticas do sêmen fresco com as características espermáticas do sêmen descongelado foi feito uma análise de correlação no sentido multivariado, por meio da análise de correlação canônica. Tal técnica é um método estatístico multivariado cujo principal objetivo é a exploração das correlações de amostras entre dois conjuntos de variáveis quantitativas observadas nas mesmas unidades experimentais.

Basicamente, considerou-se X (sêmen fresco) o grupo de variáveis independentes com p colunas e Y (sêmen descongelado) o grupo de variáveis dependentes com q colunas, obtendo-se assim as variáveis canônicas U, que é um fator formado pelas combinações lineares das variáveis do grupo X, e variáveis canônicas V, que é um fator formado pelas combinações lineares das variáveis do grupo Y. Logo, as variáveis canônicas constituem a primeira função canônica associada à correlação canônica, expressa por:

$$r = \frac{\text{cov}(U, V)}{\sqrt{V(U) \cdot V(V)}}$$

Para cada par de variáveis tem-se um coeficiente de correlação. O número de variáveis é igual à $\min(p, q)$, que neste caso será igual a 6, ou seja, tem-se 6 pares de variáveis canônicas e 6 coeficientes de correlação canônico correspondentes a cada par canônico. Essas análises foram realizadas por meio do pacote computacional R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2012), com o auxílio da função “cc” do pacote “CCA” versão 1.2 (GONZÁLEZ; DÉJEAN, 2012). Utilizou-se o teste lambda de Wilks para avaliar a significância dos coeficientes de correlação com o auxílio da função “p.asym” do pacote “CCP” versão 1.1 (MENZEL, 2012), considerando-se um nível de significância de 10%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito da criopreservação nas características espermáticas

A criopreservação do sêmen de curimba reduziu ($P < 0,05$) a motilidade espermática, duração da motilidade e atividade antioxidante total e propiciou o aumento nas anomalias maiores, anomalias totais e peroxidação lipídica (Tabela 1).

Tabela 1 Efeito da criopreservação nas características espermáticas do sêmen de curimba

Características espermáticas	Sêmen fresco	Sêmen descongelado	CV (%)	P
Motilidade espermática (%)	47,27±13,11 ^a	97,27±4,58 ^b	12,12	<0,0001
Duração da motilidade (s)	52,22±8,47 ^a	60,9±11,5 ^b	15,28	0,0018
Anomalias menores (%)	6,45±4,11	7,50±2,70	49,89	0,3249
Anomalias maiores (%)	4,81±1,94 ^a	15,90±3,58 ^b	27,82	<0,0001
Anomalias totais (%)	11,27±4,77 ^a	23,40±4,72 ^b	27,39	<0,0001
Atividade antioxidante total (μM trolox)	157±116 ^a	598±200 ^b	43,15	<0,0001
Peroxidação lipídica (μM MDA)	0,64±0,47 ^a	2,07±0,44 ^b	34,54	<0,0001

^{a,b} Médias seguidas de letras distintas, nas colunas, diferem entre si pelo teste T ($P < 0,05$)

3.1.1 Motilidade espermática e duração da motilidade

Observou-se uma redução ($p < 0,05$) na motilidade espermática após a criopreservação do sêmen (Tabela 1). Esse resultado foi consistente com os

achados anteriores para esta espécie. Felizardo et al. (2010) constataram uma redução de 44% na motilidade espermática após o descongelamento, semelhante a média encontrada neste trabalho de 49,39%. A criopreservação também comprometeu a motilidade espermática de outras espécies de peixes, como o bacalhau do atlântico (*Gadhus morhua* L.) e o robalo (*Dicentrarchus labrax*) (BUTTS et al., 2011; MARTINEZ-PARÁMO et al., 2012). O congelamento e descongelamento podem ocasionar danos à célula espermática e, conseqüentemente, reduzir a atividade do espermatozoide. Prováveis causas de redução na motilidade incluem danos diretos ao axonema do flagelo, redução da função mitocondrial e destruição de proteínas associadas à ativação da motilidade (ZILLI et al., 2008). Chen et al. (2010) destacam ainda que perdas do estoque de ATP, pelos danos as mitocôndrias, também diminui a motilidade espermática.

De maneira semelhante, a duração da motilidade também sofreu uma redução significativa. Porém, Felizardo et al. (2010) não encontraram influência da criopreservação sobre a duração da motilidade do sêmen descongelado de curimba, que foi de 70 ± 51 s, superior ao valor obtido nesse trabalho. Essa diferença pode ser atribuída ao protocolo de criopreservação utilizado, uma vez que neste trabalho foi utilizado apenas o DMSO (10%) como crioprotetor interno e no trabalho citado utilizou-se, em combinação ao DMSO (8%), a lactose (5%) como crioprotetor externo. Esses autores citam ainda que a combinação entre agentes crioprotetores externos e internos pode fornecer maior duração da motilidade.

3.1.2 Morfologia espermática

As anomalias totais aumentaram significativamente em função do processo de criopreservação (Tabela 1). Em um trabalho realizado por Felizardo

et al. (2010) as anomalias espermáticas ocorreram em uma faixa de 20% a 30% no sêmen descongelado de curimba, corroborando os resultados encontrados nesse trabalho onde observou-se uma porcentagem média de anomalias totais de 23% no sêmen descongelado. Em mamíferos, amostras de sêmen com patologias espermáticas acima de 30% para bovinos e 20% para ovinos e suínos não devem ser utilizadas (COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL - CBRA, 1998). Para peixes, estes limites ainda não foram estabelecidos, no entanto, patologias acima de 30% podem estar relacionadas com a diminuição da taxa de motilidade e da capacidade de fertilização. Miliorini (2006) destaca ainda que o ponto crítico de anormalidades espermáticas de peixes oscila em torno de 50%.

Neste trabalho, apenas as patologias maiores sofreram um aumento ($P < 0,05$) em função da criopreservação (Tabela 1). De uma maneira geral, as anomalias menores ocorrem durante a espermatogênese, decorrentes de causas que acometem os reprodutores. Em contrapartida, as patologias maiores ocorrem em função do manejo durante a coleta do sêmen a ser criopreservado (MILIORINI, 2006). Esse aumento pode estar associado a alterações ultra-estruturais nos espermatozoides após a alteração da osmolaridade do meio que os circunda, por exemplo, pela exposição ao crioprotetor, sendo estas alterações limitantes a duração da motilidade (MARQUES, 2001).

3.1.3 Atividade antioxidante total

A atividade antioxidante total foi menor ($P < 0,05$) no sêmen descongelado quando comparada ao sêmen fresco (Tabela 1). A criopreservação também teve efeito negativo sobre a atividade antioxidante total no sêmen de bacalhau do atlântico (*Gadhus morhua* L) (BUTTS et al., 2011). De maneira semelhante, a criopreservação do sêmen de pargo (*Pagrus major*), também

reduziu significativamente a atividade de duas enzimas antioxidantes, a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT) (CHEN et al., 2010), o que indica uma possível redução na atividade antioxidante total. Esta redução pode estar associada ao consumo dos antioxidantes na tentativa de eliminar o excesso de EROs produzidos e, possivelmente, em função da exposição ao ambiente e diluição ao meio crioprotetor.

Outro aspecto importante a ser ressaltado é a identificação da presença de um sistema antioxidante com atividade elevada no sêmen de curimba, caracterizado por atividade antioxidante total de 598 ± 200 μM trolox no plasma do sêmen fresco, fato este ainda não caracterizado anteriormente para esta espécie. Lahnesteiner e Mansour (2010) e Lahnteiner, Mansour e Plaetzer (2010) também identificaram a presença de um sistema antioxidante eficiente no plasma seminal e no espermatozoide de truta marrom (*Salmo trutta*), lota (*Lota lota*), perca (*Perch fluvilatus*) e alburno (*Alburnus alburnos*), composto por enzimas e metabólitos antioxidantes. A superóxido dismutase e o ácido úrico apresentaram alta concentração e atividade, enquanto que a atividade das outras enzimas e metabólitos foi relativamente baixa, com padrão semelhante de comportamento.

A caracterização das principais substâncias antioxidantes no sêmen de curimba torna-se necessário para investigações futuras, o que pode fornecer evidências para definição de melhores protocolos de criopreservação.

3.1.4 Peroxidação lipídica

No sêmen fresco, o baixo nível de peroxidação lipídica indica que a alta atividade endógena do sistema antioxidante (Tabela 1) foi capaz de fornecer uma proteção aos espermatozoides contra os danos oxidativos. Esses resultados estão de acordo com os demais trabalhos da literatura, caracterizados pela

presença de sistema antioxidante endógeno eficiente (LAHNTEINER; MANSOUR, 2010; LAHNTEINER; MANSOUR; PLAETZER, 2010).

A peroxidação lipídica aumentou significativamente em função do processo de criopreservação, com aumento superior a três vezes (Tabela 1). Resultado semelhante foi observado para o sêmen de pargo (*Pagrus major*) e de robalo (*Dicentrarchus labrax*), caracterizado pelo aumento significativo na peroxidação lipídica em função da criopreservação (CHEN et al., 2010; MARTINEZ-PARÁMO et al., 2012). Esse processo pode ocorrer em função de duas situações principais: devido a ausência de um mecanismo de defesa antioxidante endógeno funcional e/ou devido a exposição da célula a técnicas de manipulação, que induz um aumento excessivo na produção de EROs (KAUR; BILASPURI, 2011).

É importante ressaltar que o metabolismo do espermatozoide, em condições de armazenamento em nitrogênio líquido, é totalmente suprimido. Portanto, a alteração observada nesse trabalho na peroxidação lipídica é, possivelmente, decorrente dos danos ocasionados ao sistema de proteção antioxidante pelo congelamento ou pela exposição do sêmen ao ambiente. Contraditoriamente, Chen et al. (2010) observaram que a peroxidação lipídica aumenta a medida em que o tempo de armazenamento também aumenta. Segundo os autores, esses resultados indicam que o processo metabólico do espermatozoide não é interrompido durante o armazenamento em nitrogênio líquido o que, contradiz a ideia inicial. Sendo assim, são necessárias investigações futuras a cerca das possíveis causa do aumento desse processo decorrente da criopreservação.

3.2 Análise de correlação entre as variáveis de qualidade seminal

A análise de correlação, no geral, revelou uma baixa correlação entre as variáveis de qualidade mensuradas no sêmen fresco e no sêmen descongelado, no entanto, com algumas exceções.

Dentre as variáveis avaliadas no sêmen fresco observou-se uma correlação negativa entre motilidade e duração da motilidade ($r=-0,4893$; $P=0,0208$), e entre atividade antioxidante e patologias menores ($r=-0,5149$; $P=0,0142$) e uma correlação positiva entre duração da motilidade e anomalias menores ($r=0,4688$; $P=0,0278$) (Tabela 2).

Tabela 2 Correlações entre as características espermáticas mensuradas no sêmen fresco de curimba

	M	DM	PM	PMR	PL	AAT
M	1	0,0208	0,1638	0,4067	0,4777	0,2983
DM	-0,4893	1	0,7743	0,0278	0,9533	0,4604
PM	0,3075	-0,0648	1	0,6324	0,6728	0,0142
PMR	-0,1862	0,4688	0,108	1	0,2208	0,5456
PL	-0,1597	0,0133	0,0954	0,272	1	0,7447
AAT	-0,2323	0,166	-0,5149	0,1362	-0,0736	1

Na diagonal acima do valor 1, encontram-se os p-valores dos coeficientes de correlação e na diagonal abaixo do valor 1, encontram-se os valores dos coeficientes de correlação. M: motilidade espermática; DM: duração da motilidade; AME: anomalias menores; AMA: anomalias maiores; PL: peroxidação lipídica; AAT: atividade antioxidante total.

A correlação negativa entre motilidade e duração da motilidade pode ser explicada pelo metabolismo energético do espermatozoide. Após ativação da motilidade espermática, a demanda por energia é muito alta e a atividade da

adenilato quinase torna-se intensa para gerar o ATP necessário para o batimento flagelar. No entanto, o consumo energético é muito maior do que a produção de energia, com rápida depleção dos níveis de ATP. Assim, motilidade espermática elevada induziria um maior consumo de ATP na tentativa de manter o batimento do flagelo mais intenso, o que pode explicar a redução da duração da motilidade em função do aumento da motilidade espermática no sêmen fresco (BURNES; MOYES; MONTGOMERIE, 2005).

Essa correlação moderada entre motilidade espermática e duração da motilidade leva a crer que basta a análise de uma delas para prever a respeito da outra. A motilidade espermática (porcentagem de células móveis) é uma das variáveis mais utilizadas para avaliar a qualidade do sêmen, principalmente, devido a sua praticidade de análise. Ela é um parâmetro de qualidade integrativo que permite a análise de vários compartimentos celulares, tais como, membrana plasmática, mitocôndrias e axonema (BOBE; LABBÉ, 2010). Por outro lado, devido a baixa duração da motilidade em função do rápido metabolismo energético (BURNES; MOYES; MONTGOMERIE, 2005) a análise da duração da motilidade pode ser mais difícil de mensurar, embora seja extremamente importante. Portanto, essas variáveis devem ser analisadas em conjunto, uma vez que, ambas são importantes e se complementam.

A correlação negativa entre atividade antioxidante e anomalias menores indica que uma redução na atividade antioxidante total pode ser responsável, em parte, pelo o aumento das anomalias e vice-versa. Segundo Butts et al. (2011), o aumento da atividade antioxidante total é capaz de combater o ataque dos radicais livres, fornecendo assim, proteção da integridade da membrana e do genoma, o que pode refletir diretamente na ocorrência de anomalias espermáticas explicando a correlação entre essas variáveis.

A correlação positiva entre duração da motilidade e anomalias menores foi um achado inesperado uma vez que, não há uma explicação fisiológica para

tal fato. As anomalias de cabeça isolada e cauda dobrada refletem diretamente na ocorrência de movimentos flagelares oscilatórios e circulatorios o que compromete a fertilização do ovócito (KAVAMOTO et al., 1999). Sendo assim, o se aumento refletiria negativamente na duração da motilidade.

A correlação entre essas variáveis também é considerada moderada. Tradicionalmente, a análise morfológica dos espermatozoides é utilizada como parte integral na rotina de avaliação do sêmen, pois permite fazer inferências a respeito do potencial de fertilização e auxilia na caracterização de amostras de sêmen para criopreservação. No entanto, a análise por meio de microscópio óptico pode ser dispendiosa e necessita de treinamento específico. Por outro lado, a análise da atividade antioxidante, por ser um método colorimétrico, pode trazer resultados mais precisos, além de permitir uma análise prontamente automatizada com rendimento de várias amostras por dia.

Dentre as variáveis avaliadas no sêmen descongelado observou-se correlação positiva entre motilidade e duração da motilidade ($r=0,7159$; $P=0,0002$), motilidade e atividade antioxidante ($r=0,4288$; $P=0,0465$) e correlação negativa entre motilidade e anomalias menores ($r=-0,4166$; $P=0,0538$). Na tabela 3 encontram-se os coeficientes de correlação entre as variáveis de qualidade mensuradas no sêmen fresco.

Tabela 3 Correlações entre as características espermáticas mensuradas no sêmen descongelado de curimba

	M	DM	AME	AMA	PL	AAT
M	1	0,0002	0,0538	0,2765	0,9044	0,0464
DM	0,7159	1	0,1427	0,2630	0,6488	0,1752
AME	-0,4166	-0,3229	1	0,2587	0,4668	0,1397

“Tabela 3, conclusão”

	M	DM	AME	AMA	PL	AAT
AMA	-0,2427	-0,2494	0,2516	1	0,5869	0,7991
PL	-0,2772	-0,1029	0,1637	0,1226	1	0,0917
AAT	0,4288	0,2998	-0,3252	-0,0576	-0,3683	1

Na diagonal acima do valor 1, encontram-se os p-valores dos coeficientes de correlação e na diagonal abaixo do valor 1, encontram-se os valores dos coeficientes de correlação. M: motilidade espermática; DM: duração da motilidade; AME: anomalias menores; AMA: anomalias maiores; PL: peroxidação lipídica; AAT: atividade antioxidante total.

A correlação positiva entre motilidade e duração da motilidade pode ser explicada pela exposição do espermatozoide ao meio diluidor. Os diluidores são soluções de sais ou de carboidratos adicionados ao sêmen com o intuito de manter a viabilidade das células espermáticas durante a criopreservação. Portanto, o BTS utilizado como diluidor nesse trabalho pode ter contribuído para o metabolismo energético do espermatozoide, após o descongelamento, resultando na manutenção da duração da motilidade espermática em função do aumento da motilidade.

Correlações positivas entre diferentes parâmetros da motilidade espermática também foi observado por Martinez-Páramo et al. (2012) no sêmen de robalo (*Dicentrarchus labrax*). Estes autores avaliaram a motilidade progressiva, motilidade total, velocidade curvilínea, velocidade em linha reta e linearidade, sendo que todas as variáveis foram correlacionadas entre si. Correlacionando os parâmetros de qualidade espermática com a capacidade de fertilização do sêmen, Butts et al. (2011) observaram que existe uma correlação

positiva entre a motilidade espermática e a capacidade de fertilização do sêmen de bacalhau do atlântico (*Gadus morhua*).

A correlação positiva entre atividade antioxidante total e motilidade espermática indica a importância do sistema antioxidante endógeno para a proteção do espermatozoide contra os danos oxidativos.

Durante a criopreservação, o espermatozoide é exposto ao estresse oxidativo pela diluição ao meio extensor, exposição ao crioprotetor e pela manutenção a baixas temperaturas. O acúmulo de EROs na célula espermática pode ocasionar danos a estrutura do espermatozoide, caracterizado por redução na motilidade espermática, viabilidade e capacidade de fertilização (BALL, 2008). Isso se dá em função do plasma seminal ser capaz de fornecer apenas uma proteção antioxidante parcial, devido principalmente a diluição dos componentes plasmáticos, além de induzir o consumo de antioxidantes na tentativa de eliminar esses radicais (LAHNSTEINER; MANSOUR, 2010; LAHNTEINER; MANSOUR; PLAETZER, 2010).

A correlação negativa entre motilidade e anomalias menores indica que quanto maior for o nível de comprometimento morfológico ao espermatozoide menor será a motilidade espermática e vice-versa. Em sêmen de caninos, também foi observado uma correlação negativa entre a porcentagem de espermatozoides morfológicamente anormais e o percentual de motilidade espermática, em função de defeitos funcionais no sistema energético do espermatozoide, corroborando com os resultados obtidos nesse trabalho (CASSANI; BECONI; O'FLAHERTY, 2005).

Embora a análise da motilidade espermática seja amplamente utilizada para avaliar a qualidade do sêmen, ela fornece apenas uma visão geral da qualidade do sêmen, mas não descrevem a capacidade individual dos espermatozoides. Portanto, a análise da morfologia espermática, que é capaz de determinar a viabilidade dos espermatozoides individuais pode ser utilizada a

fim de complementar a análise de motilidade, uma vez que ambas se correlacionaram. Além disso, a análise da atividade antioxidante total também pode contribuir para uma análise da qualidade mais abrangente.

3.3 Análise de correlação canônica

Considerando a primeira função canônica, que é a que retém a maior variação dos dados, pode-se inferir que houve associação significativa ($P=0,1016$) entre as variáveis mensuradas no sêmen fresco com as variáveis mensuradas no sêmen descongelado e que 78,62% da variação dos dados do sêmen descongelado podem ser explicados pelas variáveis mensuradas no sêmen fresco (Tabela 4).

Tabela 4 Correlação canônica relacionando as características espermáticas do sêmen e curimba antes e após a criopreservação

Função canônica	Correlação canônica	R2 canônico	Probabilidade*
1	0,8867	0,7862	0,1016
2	0,7885	0,6217	0,4202
3	0,6866	0,4715	0,7423
4	0,3735	0,1395	0,9689
5	0,1707	0,0292	0,9504
6	0,1381	0,0191	0,5972

*Valores de probabilidade de acordo com o teste lambda de Wilk's

A correlação de cada variável original com a função canônica do grupo oposto está apresentada na Tabela 5, por meio das cargas canônicas cruzadas.

Tabela 5 Cargas cruzadas dos pares canônicos entre as características espermáticas do sêmen fresco e descongelado de curimba

	1 °	2 °	3°	4°	5°	6°
MD	-0,6377	0,0263	-0,0257	0,2242	-0,048	0,0279
DMD	-0,7306	-0,0371	-0,2719	0,0218	0,033	0,0549
PMED	0,1947	-0,6381	0,2439	-0,0595	0,0631	-0,0129
PMAD	0,3964	-0,342	0,0516	-0,0979	-0,1059	0,054
PLD	0,3972	-0,0282	0,0558	0,1703	0,0656	0,0912
AATD	-0,1694	-0,1348	-0,5703	0,1447	-0,0704	-0,0526
MF	0,0452	-0,1085	0,3943	0,2761	-0,0272	0,0383
DMF	-0,4155	-0,3676	-0,4943	-0,059	0,0214	0,0102
PMEF	0,5968	-0,2782	-0,1953	0,1981	-0,0353	-0,0184
PMAF	0,1902	-0,2633	-0,2833	-0,0979	0,0254	0,1053
PLF	0,116	0,2187	-0,2339	-0,0777	-0,1356	0,047
AATF	-0,2506	-0,3679	0,2778	-0,272	-0,0142	0,0053

MD: motilidade espermática sêmen descongelado; DMD: duração da motilidade sêmen descongelado; AMED: anomalias menores sêmen descongelado; AMAD: anomalias maiores sêmen descongelado; PLD: peroxidação lipídica sêmen descongelado; AATD: atividade antioxidante total sêmen descongelado. MF: motilidade espermática; sêmen fresco; DMF: duração da motilidade sêmen fresco; AMEF: anomalias menores sêmen fresco; AMAF: anomalias maiores sêmen fresco; PL: peroxidação lipídica sêmen fresco; AATF: atividade antioxidante total sêmen fresco

Considerando o primeiro par canônico, que apresentou maior coeficiente de correlação canônica, as variáveis motilidade, duração e atividade antioxidante, mensuradas no sêmen descongelado, apresentaram uma relação inversa com o sêmen fresco, ou seja, em função da criopreservação esses parâmetros tendem a diminuir. Já as anomalias menores, anomalias maiores e peroxidação lipídica apresentam uma relação direta, ou seja, em função da criopreservação tendem a aumentar.

Apenas as variáveis de motilidade e duração da motilidade mensuradas no sêmen descongelado tiveram uma alta correlação (-0,6377 e -0,7306 respectivamente) com as características espermáticas do sêmen fresco. Elevando as cargas canônicas ao quadrado, a variável canônica independente explicou 40,67% da variância da motilidade e 53,38% da variância da duração. Portanto, grande parte das variações observadas no sêmen descongelado, para estas variáveis, ocorre em função da qualidade inicial do sêmen utilizado para a criopreservação. A partir dessa informação pode-se inferir então que, amostras de sêmen com melhor qualidade serão capazes de manter a motilidade e duração da motilidade após o descongelamento, com menor redução desses parâmetros após a criopreservação.

Flores et al. (2009) também destacam que variações na motilidade espermática do sêmen é responsável por determinar diferenças na resistência ao congelamento. Em caprinos, variáveis de motilidade mensuradas no sêmen descongelado também foram consideradas bons indicadores da crioresistência do espermatozoide (DORADO; MUNÓZ-SERRANO; HIDALGO, 2010). Martínez-Parámo et al. (2012) também encontraram uma forte correlação nos parâmetros de motilidade progressiva, motilidade total e velocidade em linha reta entre amostras de sêmen fresco e descongelado de robalo (*Dicentrarchus labrax*), que está diretamente correlacionada a viabilidade celular. De acordo com os resultados da presente pesquisa e os demais achados da literatura, a motilidade espermática e duração da motilidade são bons indicadores de qualidade para prever o potencial de congelabilidade do sêmen.

As anomalias menores, anomalias maiores, peroxidação lipídica e atividade antioxidante total, mensuradas no sêmen descongelado, apresentaram baixa correlação (0,1947; 0,3964; 0,3972 e -0,1694, respectivamente) com a variável canônica representada pelas características seminais do sêmen fresco, como evidenciado na Tabela 4. Elevando as cargas canônicas ao quadrado a

porcentagem de predição é baixa (3,79%; 15,74%; 15,77% e 0,028%). Isso indica que a variável canônica independente não é capaz de explicar a variância dessas características no sêmen descongelado. Portanto, variações nesses parâmetros estariam associadas a outros fatores que não sejam a qualidade inicial do sêmen. Adicionalmente, devido à baixa correlação entre as amostras de sêmen antes e após a criopreservação esses parâmetros não seriam bons indicadores para prever o potencial de congelabilidade.

A ocorrência de anomalias maiores está associada a procedimento de manejo durante a coleta do sêmen, que pode refletir em alterações morfológicas após a criopreservação e descongelamento, sendo independente da qualidade inicial do sêmen. Sendo assim, mesmo que o sêmen fresco apresente baixo nível de anomalias maiores não necessariamente esta característica será mantida após o descongelamento. Por outro lado, as anomalias menores ocorrem durante a espermatogênese. No entanto, nesse trabalho a baixa correlação evidenciada indica que, mesmo sendo uma característica atribuída ao reprodutor, a ocorrência de patologias menores não pode ser explicada pela qualidade inicial do sêmen.

Variações na peroxidação lipídica após o descongelamento do sêmen podem estar associadas à estrutura da membrana alterada e inativação de enzimas antioxidantes, que ocorrem de maneira independente da qualidade inicial do sêmen, como evidenciado por Li et al. (2010). Assim como observado na presente pesquisa, a peroxidação lipídica também não se correlacionou antes e após a criopreservação do sêmen de robalo (*Dicentrarchus labrax*) (MARTÍNEZ-PARÁMO et al., 2012), o que reforça a possibilidade desse evento ser independente da qualidade inicial do sêmen.

A diminuição da atividade antioxidante após descongelamento também não foi correlacionada com a qualidade inicial do sêmen. Essa redução pode estar associada com a exposição do sêmen ao meio crioprotetor, resultando na

diluição de componentes importantes, como por exemplo, de enzimas antioxidantes (LAHNSTEINER et al., 1996).

Contraditoriamente, Butts et al. (2011), evidenciaram que o potencial de congelabilidade aumenta significativamente com o aumento da atividade antioxidante total do sêmen de bacalhau do atlântico (*Gadus morhua L.*), caracterizado pela maior proteção da integridade da membrana e do genoma contra o ataque de radicais livres. Reforçando essa ideia a adição de taurinas e hipotaurinas também foram capazes de fornecer certo nível de proteção aos espermatozoides, caracterizado pela redução da fragmentação do DNA e neutralização das EROs (CABRITA et al., 2011).

As diferenças observadas em relação a este trabalho e a literatura podem estar associadas à metodologia empregada para as análises de cada variável, método estatístico utilizado para determinar as correlações e, principalmente, a grande variabilidade observada entre as espécies.

4 CONCLUSÃO

Sob as condições em que este experimento foi realizado pode-se concluir que as várias de motilidade e duração da motilidade podem ser utilizadas para predizer o potencial de congelabilidade do sêmen de curimba.

REFERÊNCIAS

- BALL, B. A. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: impacts on sperm function and preservation in the horse. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 107, n. 3/4, p. 257-267, Sept. 2008.
- BOBE, J.; LABBÉ, C. Egg and sperm quality in fish. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 165, n. 3, p. 535-548, Feb. 2010.
- BURNES, G.; MOYES, C. D.; MONTGOMERIE, R. Motility, ATP levels and metabolic enzyme activity of sperm from bluegill (*Lepomis macrochirus*). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, London, v. 140, n. 1, p. 11-17, Jan. 2005.
- BUTTS, I. A. E. et al. Semen characteristics and their ability to predict sperm cryopreservation potential of Atlantic cod, *Gadus morhua* L. **Theriogenology**, Stoneham, v. 75, n. 7, p. 1290-1300, Apr. 2011.
- CABRITA, E. et al. The influence of certain aminoacids and vitamins on post-thaw fish sperm motility, viability and DNA fragmentation. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 125, n. 1/4, p. 189-195, May 2011.
- CASSANI, P.; BECONI, M. T.; O'FLAHERTY, C. Relationship between total superoxide dismutase activity with lipid peroxidation, dynamics and morphological parameters in canine semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 86, n. 1/2, p. 163-173, Mar. 2005.
- CHEN, Y. K. et al. Effect of long-term cryopreservation on physiological characteristics, antioxidant activities and lipid peroxidation of red seabream (*Pagrus major*) sperm. **Cryobiology**, San Diego, v. 61, n. 2, p. 189-193, July 2010.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal**. 2. ed. Belo Horizonte, 1998. 49 p.
- DORADO, J.; MUNÓZ-SERRANO, A.; HIDALGO, M. The effect of cryopreservation on goat semen characteristics related to sperm freezability. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 121, n. 1/2, p. 115-123, Aug. 2010.

FELIZARDO, V. O. et al. Effect of cryopreservant combinations on the motility and morphology of curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 122, n. 3, p. 259-263, Dec. 2010.

FLORES, E. et al. The degree of resistance to freezing-thawing is related to specific changes in the structures of motile sperm subpopulations and mitochondrial activity in boar spermatozoa. **Theriogenology**, Stoneham, v. 72, n. 6, p. 784-797, Oct. 2009.

GONZÁLEZ, I.; DÉJEAN, S. **Canonical Correlation Analysis: R package** version 1.2. Disponível em: <<http://CRAN.R-project.org/package=CCA>>. Acesso em: 13 maio 2012.

KAUR, A. B.; BILASPURI, G. S. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. **Veterinary Medicine International**, New York, v. 2011, p. 1-7, 2011.

KAVAMOTO, E. T. et al. Anormalidades morfológicas nos espermatozóides do curimatá, *Prochilodus lineatus* (Steindachner, 1881) (Osteichthyes, Characiformes, Prochilodontidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 25, p. 61-66, 1999.

KOPEIKA, E.; KOPEIKA, J. Variability of sperm quality after cryopreservation in fish. In: ALAVI, S. N. H. et al. (Ed.). **Fish spermatology**. Oxford: Alpha Science International, 2008. p. 347-397.

LAHNSTEINER, F. et al. Motility of spermatozoa of *Alburnus alburnus* (Cyprinidae) and its relationship to seminal plasma composition and sperm metabolism. **Fish Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 15, n. 2, p. 167-179, Apr. 1996.

LAHNSTEINER, F.; MANSOUR, N. A comparative study on antioxidant systems in semen of species of the Percidae, Salmonidae, Cyprinidae, and Lotidae for improving semen storage techniques. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 307, n. 1/2, p. 130-140, Sept. 2010.

LAHNSTEINER, F.; MANSOUR, N.; PLAETZER, K. Antioxidant systems of brown trout (*Salmo trutta f. fario*) semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 119, n. 3/4, p. 314-321, June 2010.

LI, P. et al. Evaluating the impacts of osmotic and oxidative stress on common carp (*Cyprinus carpio*, L.) sperm caused by cryopreservation techniques. **Biology of Reproduction**, New York, v. 83, n. 5, p. 852-858, Nov. 2010.

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, 2001.

MARTÍNEZ-PÁRAMO, S. et al. Sea bass sperm freezability is influenced by motility variables and membrane lipid composition but not by membrane integrity and lipid peroxidation. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 131, n. 3/4, p. 211-218, Apr. 2012.

MENZEL, U. **CCP**: significance tests for Canonical Correlation Analysis. Disponível em: <<http://CRAN.R-project.org/package=CCP>>. Acesso em: 13 maio 2012.

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

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2012. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>. Acesso em: 13 maio 2012.

ZILLI, L. et al. Molecular mechanisms determining sperm motility initiation in two sparids (*Sparus aurata* and *Lithognathus mormyrus*). **Biology of Reproduction**, New York, v. 79, n. 2, p. 356-366, Apr. 2008.

CAPÍTULO 3 Efeito da cafeína, adicionada à solução ativadora, sobre as características de motilidade espermática do sêmen fresco e descongelado de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e curimba (*Prochilodus lineatus*)

RESUMO

Objetivou-se com esta pesquisa avaliar o efeito de diferentes concentrações de cafeína, adicionada a solução ativadora, nos parâmetros de motilidade espermática do sêmen *in natura* e descongelado de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e curimba (*Prochilodus lineatus*). Utilizou-se um delineamento em blocos casualizados com cinco tratamentos (diferentes concentrações de cafeína) sendo a parcela experimental constituída por duas amostras para o sêmen descongelado e uma amostra para o sêmen *in natura*. As soluções ativadoras foram preparadas a base de NaHCO₃ adicionadas de cafeína nas concentrações de 2,5, 5,0, 10,0 e 20,0 mM. Como controle, utilizou-se a mesma solução não adicionada de cafeína. Para a coleta do sêmen foram utilizados um total de oito reprodutores de pacu e 20 de curimba, com peso inicial de 2,5 ± 0,4 kg e 0,61 ± 0,2 kg, respectivamente. Após avaliação inicial do sêmen, procedeu-se a criopreservação, sendo alíquotas de sêmen de 200 µL diluídas na solução crioprotetora, composta por DMSO 10% e BTS 5% na proporção de 1:4, e envasados em palhetes de 0,5 ml. Houve um aumento linear na motilidade espermática para o sêmen *in natura* pacu, para o sêmen *in natura* de curimba e para o sêmen descongelado de curimba (P<0,05), em função do aumento na concentração de cafeína. Observou-se uma resposta quadrática na duração da motilidade para o sêmen descongelado de pacu e para o sêmen *in natura* de curimba, sendo que as concentrações estimadas de 8,38 mM e 5,71 mM de cafeína proporcionaram as maiores taxas de duração da motilidade (P<0,05), respectivamente. A cafeína adicionada acima dessas concentrações promove uma redução da duração da motilidade. Portanto, esses resultados indicam que a adição da cafeína na solução ativadora pode melhorar os parâmetros de motilidade espermática, no entanto, é dependente da espécie e da concentração utilizada.

Palavras-chaves: Ativadores espermáticos. Criopreservação. Metilxantinas.

ABSTRACT

This work aimed at evaluating the effect of different concentrations of caffeine added to the activating solution, over sperm motility parameters of fresh and thawed pacu (*Piaractus mesopotamicus*) and curimba (*Prochilodus lineatus*) semen. A randomized block design with five treatments (different caffeine concentrations) with the experimental parcel consisting of two thawed semen samples and one fresh semen sample were used. The activating solutions were prepared based on NaHCO_3 and added caffeine at the concentrations of 2.5, 5.0, 10.0 and 20.0 mM. As control, the solution without the addition of caffeine was used. For the collection of the semen were used a total of 8 pacu breeding males and 21 curimba breeding males, with the initial weight of 2.5 ± 0.4 kg and 0.61 ± 0.2 kg, respectively. After an initial evaluation of the semen, cryopreservation was proceeded, with aliquots of 200 μl semen diluted in a cryoprotectant solution, consisting of 10% DMSO and 5% BTS in the ratio of 1:4, and placed into 0.5 ml sterile straws. A linear increase ($P < 0.05$) in sperm motility occurred for pacu fresh semen, curimba fresh semen and for curimba thawed semen, due to the increase in caffeine concentration. There was a quadratic response in motility duration for pacu thawed semen and for curimba fresh semen, with estimated caffeine concentrations of 8.38 mM and 5.71 mM showing the highest motility duration ($P < 0.05$), respectively. Caffeine added superior to these concentrations promote a reduction in motility duration. Therefore, these results indicate that the addition of caffeine in the activator solution may improve sperm motility parameters. However, it depends on the species and the used concentration.

Keywords: Sperm activators. AMPc. Cryopreservation. Methylxantines

1 INTRODUÇÃO

O pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e a curimba (*Prochilodus lineatus*) são espécies nativas da bacia do rio grande com importância econômica relevante, caracterizada pela facilidade de cultivo e alta produtividade. Além disso, devido ao declínio de suas populações selvagens, o interesse pela preservação das espécies tem aumentado consideravelmente. Sendo assim, a criopreservação do sêmen e a fertilização artificial podem contribuir para a maior produtividade e preservação dessas espécies.

A criopreservação é uma técnica que permite a manutenção da viabilidade celular por tempo indeterminado, preservando assim, os recursos genéticos de espécies de interesse econômico ou ameaçadas de extinção. A fertilização artificial, por sua vez, tem por objetivo fertilizar com sucesso todos os ovos férteis utilizando um número reduzido de machos. Estas duas técnicas, em conjunto, aumentam o sucesso da reprodução artificial, porém, a qualidade espermática é prejudicada seja pela manutenção em baixa temperatura ou pela manipulação do sêmen (BILLARD, 1992).

Durante a criopreservação a célula espermática é exposta a condições externas que não são fisiologicamente adequadas, desencadeando uma série de eventos prejudiciais a sobrevivência do espermatozoide. Dentre esses eventos, o desgaste energético no interior da célula resulta em diminuição da motilidade e, conseqüentemente, da capacidade de fertilização (KOPEIKA; KOPEIKA, 2008). De maneira semelhante, durante a fertilização artificial, a adição de água para hidratação do ovócito induz deterioração rápida na célula espermática, com ruptura da membrana plasmática e, conseqüentemente, redução da motilidade espermática (BILLARD, 1992).

Quando o espermatozoide é exposto ao meio ativador, seja o sêmen *in natura* ou descongelado, a demanda por energia é muito alta e a atividade da

adenilato quinase torna-se intensa para gerar o ATP necessário para o batimento flagelar. No entanto, o consumo energético é muito maior do que a produção de energia, com rápida depleção dos níveis de ATP, o que resulta em curta duração da motilidade (BURNES; MOYES; MONTGOMERIE, 2005).

Para minimizar os efeitos deletérios mencionados acima, o uso de soluções ativadoras adequadas que mimetizem o plasma seminal e não comprometam a qualidade do sêmen é de extrema importância em programas de reprodução assistida. Estas soluções podem contribuir para aumentar a duração e intensidade da motilidade espermática, ambas contribuindo para maior sobrevivência e capacidade fertilizante do espermatozoide (VALDEBENITO et al., 2009). Como exemplo, pode-se citar a adição de solutos específicos a solução ativadora, como o NaHCO_3 . Esta substância preserva a integridade espermática e tem capacidade de aumentar o AMPc, resultando em uma melhor motilidade espermática (CARLSON; HILLE; BABCOCK, 2007; MURGAS et al., 2007).

Alternativamente, o uso da cafeína, com a finalidade de melhorar os parâmetros de motilidade espermática, tem sido proposto em diferentes espécies de mamíferos, tais como, ovinos (KUBOVICOVA et al., 2010), caninos (MILANI et al., 2010), equinos (CARRINGTON et al., 2011) e primatas (OLIVEIRA et al., 2011), com efeito positivo sobre os parâmetros de motilidade espermática. Esta melhora é resultado do efeito da cafeína sobre a inibição da enzima fosfodiesterase na qual promove o aumento dos níveis intracelulares de AMPc, inibição da fosfatase alcalina (GLOGOWISK; DANFORTH; CIERESZKO, 2002) e pelo aumento no teor de cálcio intracelular que contribui para ativação da adenilciclase (COLÁS; CEBRÍAN PÉREZ; MIÑO-BLANCO, 2010). No entanto, para peixes a adição da cafeína na solução ativadora ainda apresenta resultados controversos com efeitos benéficos (VALDEBENITO, 2007) ou não (BABIACK et al., 1999), sendo o principal ponto de discussão

associado com a concentração a ser utilizada e as variações interespecíficas encontradas.

Portanto, objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito de diferentes concentrações de cafeína, adicionada a solução ativadora, nos parâmetros de motilidade espermática do sêmen *in natura* e descongelado de curimba (*Prochilodus lineatus*) e pacu (*Piaractus mesopotamicus*)

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local e seleção dos animais

A presente pesquisa foi realizada no Setor de Piscicultura, do Departamento de Produção Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás (DPA/EV/UFG), em Goiânia, GO, no mês de janeiro de 2012. Para realização do experimento, foram selecionados oito machos de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e 20 machos de curimba (*Prochilodus lineatus*).

Para seleção de ambas as espécies os animais foram capturados com auxílio de rede de arrasto de acordo com suas características reprodutivas. Foram selecionados apenas aqueles que apresentavam papila urogenital hiperêmica e que liberaram sêmen sob delicada massagem abdominal. Após seleção, os animais foram transferidos para o laboratório da piscicultura da UFG e mantidos em caixas d'água de polietileno (500 L de capacidade volumétrica) até a coleta do sêmen.

2.2 Delineamento experimental

Utilizou-se um delineamento em blocos casualizados, com cinco tratamentos, ou seja, diferentes concentrações de cafeína (0,0, 2,5, 5,0, 10,0 e 20 mM). Foram utilizados oito blocos para o sêmen de pacu e 20 blocos para o sêmen de curimba. A parcela experimental foi constituída por uma amostra para o sêmen *in natura* e duas amostras para o sêmen descongelado.

2.3 Hipofisação, coleta e avaliação do sêmen *in natura*

Os animais selecionados, após pesagem e marcação, foram submetidos ao tratamento hormonal com extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC), através de injeções intramusculares próximas à base da nadadeira dorsal. Para os exemplares de pacu, foi aplicado apenas uma dose definitiva de $5,0 \text{ mg kg}^{-1}$. Já para curimba, a indução foi feita com duas doses, sendo uma preparatória de $0,5 \text{ g kg}^{-1}$ e uma definitiva de $5,0 \text{ g kg}^{-1}$, respectivamente. O intervalo entre as aplicações foi de 12 horas e a coleta do sêmen procedeu-se após oito horas, contadas a partir da dose definitiva. O peso dos animais foi de $2,5 \pm 0,44 \text{ kg}$ para pacu e $0,61 \pm 0,22 \text{ kg}$ para curimba.

A coleta do sêmen foi conduzida por meio de leve massagem na parede celomática, no sentido craniocaudal, sendo o sêmen coletado em tubos de ensaio graduados estéreis para determinação do volume seminal. Previamente a coleta, as papilas urogenitais e região circunjacentes foram limpas e secas com papel toalha para evitar qualquer tipo de contaminação com fezes, urina e sangue.

Para certificar-se que o sêmen coletado não havia sido previamente ativado por contaminação, uma alíquota de $10 \text{ }\mu\text{L}$ de sêmen por animal foi depositada em lâmina histológica de vidro e homogeneizada com $40 \text{ }\mu\text{L}$ de solução de NaHCO_3 , certificando-se da ausência ou não de motilidade. Em seguida, uma alíquota de $10 \text{ }\mu\text{L}$ de cada amostra de sêmen foi coletada e diluída em formol citrato ($990 \text{ }\mu\text{L}$), para determinação da concentração espermática, que foi estimada por meio de uma câmara de Neubauer. A fórmula abaixo foi utilizada para estimar a concentração:

$CE = N \times FC$; em que:

CE é a concentração espermática (espermatozoides or mm^3);

N é o número de células contadas na câmara de Neubauer.

O fator de correção (FC) é dado por:

$FC = (q \times fd) / d$; em que:

$q = 5$, e representa a razão entre o número total de quadrículos da câmara de Neubauer (25) e o número de quadrículos contados (5);

fd é o fator de diluição da alíquota de sêmen ($= 10^4$);

d é a profundidade entre a lamínula e a câmara de Neubauer ($= 0,1$ mm).

2.4 Criopreservação e descongelamento do sêmen

Amostras de sêmen de cada animal foram depositadas em tubos de ensaio estéril para diluição na solução crioprotetora, composta por DMSO 10% e BTS 5%, sendo a proporção de diluição de uma parte de sêmen (200 μ L) para quatro partes da solução (800 μ L). Em seguida, as amostras diluídas foram envasadas em palhetes de 0,5 ml (duas por animal) sendo estas vedadas com massa cirúrgica estéril. Posteriormente, foram acondicionadas em raques de polietileno e transferidas para botijão de vapor de nitrogênio líquido (Taylor-Wharton, modelo CP 300, tipo *dry shipper*) para resfriamento. Após 24 horas, todas as amostras foram transferidas para o botijão de nitrogênio líquido para congelamento, onde foram mantidas por sete dias até o descongelamento.

Para o descongelamento, as palhetes foram imersas, individualmente, em banho-maria a temperatura de 60 °C por oito segundos, sendo levemente agitadas durante todo o processo. Em seguida, foram enxugadas com papel toalha sendo a extremidade correspondente a massa cirúrgica descartada e o sêmen depositado em tubos de ensaio estéril.

2.5 Ativação da motilidade espermática com diferentes soluções de cafeína

Para avaliar o efeito da cafeína sobre a motilidade espermática, em amostras de sêmen *in natura* e descongelado, foram preparadas quatro soluções ativadoras a base de NaHCO₃ (0,76%) adicionadas de cafeína em diferentes concentrações, sendo estas, 2,5, 5,0, 10 e 20 mM. Como controle, utilizou-se a mesma solução não adicionada de cafeína. A cafeína utilizada no experimento foi obtida da empresa Sigma-Aldrich.

Cada uma das soluções foi preparada após pesagem da quantidade necessária de cafeína para obter a molaridade desejada, tendo em conta que 194,19 g é equivalente a 1 mol de cafeína. Em seguida, adicionou-se a cafeína na solução de NaHCO₃ e homogeneizou-se em banho-maria para melhor dissolução do produto. Após preparo, a osmolaridade das soluções foi determinada por meio de osmômetro.

A motilidade espermática foi avaliada pelo método subjetivo, através de microscópio óptico de luz em aumento de 100 dioptrias, sendo estimada em porcentagem média de células moveis em três campos, em uma escala de 0-100%. A duração da motilidade foi determinada desde a homogeneização com a solução ativadora até que restassem apenas 10% de espermatozoides móveis. Para este procedimento, cinco alíquotas de 10 µL de sêmen foram depositadas em laminais histológicas de vidro, individualmente, e homogeneizadas com cada uma das soluções ativadoras.

2.6 Análises estatísticas

Os dados de motilidade e duração da motilidade para o sêmen *in natura* e descongelado de pacu e curimba foram submetidos a análise de variância a 5%

de probabilidade. Em caso de significância, as médias foram submetidas à análise de regressão. Todas as análises estatísticas foram conduzidas no programa estatístico Sisvar versão 5.3.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Osmolaridade das soluções ativadoras

Houve um aumento da osmolaridade das soluções ativadoras em função do aumento da concentração de cafeína (Tabela 1). Em peixes de água doce, para que ocorra a ativação da motilidade espermática é necessário que o meio de ativação seja hiposmótico em relação ao plasma seminal (TAKAI; MORISAWA, 1995). Por exemplo, o meio de ativação deve ser inferior 286 mOsm para a piabanha (SHIMODA; ANDRADE; VIDAL JÚNIOR, 2004) e inferior a 350 mOsm em tilápia (SHIMODA et al., 2007). Portanto, todas as soluções ativadoras utilizadas nesse experimento foram hiposmóticas ao plasma seminal de espécies de peixes de água doce.

Tabela 1 Osmolaridade das soluções ativadoras da motilidade espermática do sêmen de curimba

Soluções ativadoras	Osmolaridade (mOsmol/kg-1)
0,0 mM de cafeína	68
2,5 mM de cafeína	92
5,0 mM de cafeína	96
10,0 mM de cafeína	107
20,0 mM de cafeína	132

3.2 Avaliação do sêmen *in natura*

Na Tabela 2, encontram-se os valores médios das características espermáticas do sêmen *in natura* de pacu e curimba. Todos os parâmetros de qualidade avaliados apresentaram índices satisfatórios e estão dentro da faixa esperada para as espécies (VIVEIROS; GODINHO, 2008), indicando que as amostras utilizadas no experimento apresentaram boa qualidade. A qualidade do sêmen é uma das características mais importante que afetam o resultado final da fertilização e criopreservação, sendo fundamental a avaliação do sêmen *in natura* a ser congelado (KOPEIKA; KOPEIKA, 2008).

Tabela 2 Características espermáticas do sêmen *in natura* de pacu e curimba

Características Espermáticas	Pacu	Curimba
Volume (ml)	2,96±0,43	2,26±4,35
Motilidade (%)	86,3±15,1	97±7,3
Duração da motilidade (s)	45,5±10,3	62,3±8,7
Concentração*	61,4±11,86	41,38±10,7

*(espermatozoides X 10⁷/ml)

O volume seminal encontrado para as duas espécies está de acordo com os demais trabalhos disponíveis na literatura. Felizardo et al. (2011) e Viveiros et al. (2009) obtiveram volume seminal médio para o sêmen de curimba de 2,1 e 2,43 ml, respectivamente. Esta semelhança pode estar associada ao tipo de indução hormonal. Ambos os trabalhos, assim como esta pesquisa, utilizaram o

EBHC para indução e, segundo Donaldson e Hunter (1983) a indução hormonal têm influência direta no volume seminal.

O valor médio da motilidade espermática para o sêmen de pacu foi superior ao 79,5% obtido por Streit Júnior et al. (2006), cujo trabalho avaliou-se as características qualitativas do sêmen de pacu também induzidos com EBHC. No entanto, para duração da motilidade este valor foi inferior aos 50,3 s obtido por estes mesmos autores. Diferença na dose do hormônio pode ser uma possível explicação para variações nos resultados, uma vez que, neste trabalho a dose utilizada do EBHC foi o dobro da utilizada por Streit Júnior et al. (2006).

Paulino et al. (2011) e Viveiros et al. (2010) obtiveram valores semelhantes para a motilidade espermática do sêmen de *Prochilodus lineatus* também induzidos com EBHC, sendo estes valores correspondentes a 92% e 90%, respectivamente.

É importante ressaltar que a análise da motilidade espermática reflete variações ambientais e genéticas na qual pode justificar as diferenças observadas entre os trabalhos (KOPEIKA; KOPEIKA, 2008). Apesar de não haver um valor mínimo para os parâmetros de motilidade espermática de sêmen de peixe que seja capaz de garantir a sua eficiência, pode-se considerar que os valores obtidos para ambas as espécies não seriam comprometedores da qualidade do sêmen uma vez que estão de acordo com as informações obtidas na literatura.

A concentração espermática observada para ambas as espécies foi inferior ao observado no sêmen de curimba por Felizardo et al. (2010), que foi de $23,4 \times 10^9$ espermatozoides por ml. No entanto, foi superior ao obtido por Kavamoto e Silveira (1997), que encontrou uma concentração de $26,18 \times 10^6$ espermatozoides/ml. Esta variação é esperada, pois a concentração espermática pode ser afetada por diversos fatores, tais como, fase reprodutiva e o tipo de hormônio. Provavelmente, a baixa concentração observada neste trabalho está

associada ao período reprodutivo, uma vez que, o hormônio utilizado foi o mesmo para todos os trabalhos citados.

Segundo Silva et al. (2009), a concentração espermática tende a aumentar no mês de janeiro, em função do avanço da piracema. Para este trabalho, a coleta do sêmen, foi conduzida exatamente neste mês, no entanto, a reprodução iniciou-se tardiamente neste ano, o que pode explicar, em parte, a menor concentração espermática observada.

3.3 Efeito da cafeína na motilidade espermática

Os valores médios da motilidade espermática e duração da motilidade, do sêmen *in natura* e descongelado de pacu e curimba, ativados com diferentes soluções de cafeína, estão representadas na Tabela 2.

Tabela 3 Motilidade espermática e duração da motilidade do sêmen *in natura* e descongelado e pacu e curimba, ativados com diferentes soluções de cafeína

Espécie	Sêmen	Variável	Cafeína (mM)					CV (%)	P
			0	2,5	5,0	10,0	20,0		
Pacu	<i>in natura</i>	Mot. (%) ¹	86,3	86,3	90,0	93,8	93,8	5,44	0,001
			±15,1	±15,1	±9,2	±9,2	±9,2		
		Dur. (s)	45,5	46,8	45,9	47,8	47,8	7,52	0,60
	Desc.	Mot. (%)	35,6	35,6	35,6	36,3	36,9	4,39	0,06
			±7,8	±7,8	±8,3	±7,0	±7,0		

"Tabela 3, conclusão"

Espécie	Sêmen	Variável	Cafeína (mM)					CV (%)	P
Curimba	<i>in natura</i>	Dur. (s) ²	31,9	33,9	36,3	32,9	31,4	9,33	0,035
			±5,8	±6,0	±2,1	±3,1	±3,1		
		Mot. (%) ¹	97,0	97,0	97,0	99,5	99,5	3,07	0,001
			±7,3	±7,3	±7,3	±2,2	±2,2		
		Dur. (s) ²	62,3	62,7	63,2	61,6	57,8	5,34	<0,0001
			±8,7	±9,0	±8,9	±8,2	±8,9		
Desc.	Mot. (%) ¹	51,3	51,3	58,5	60,3±	60,5±	3,27	<0,0001	
		±12,1	±12,1	±13,4	13,2	3,0			
	Dur. (s)	52,8	53,5	53,4	53,4	53,3	3,73	0,79	
		±7,7	±7,4	±7,4	±7,0	±7,2			

Mot.: motilidade espermática; Dur.: duração da motilidade espermática

¹ Regressão linear significativa (P<0,05)

² Regressão quadrática significativa (P<0,05)

Para o sêmen *in natura* de pacu à medida que se elevou a concentração de cafeína houve um aumento linear correspondente (P<0,05) na motilidade espermática, sendo que a máxima concentração avaliada foi capaz de proporcionar a motilidade de 93,8% (Gráfico 1). Além disso, para cada incremento de 1% na concentração de cafeína houve um aumento correspondente na motilidade de 0,413%. Já para a duração da motilidade espermática a não houve efeito em função do aumento da concentração de cafeína (P>0,05).

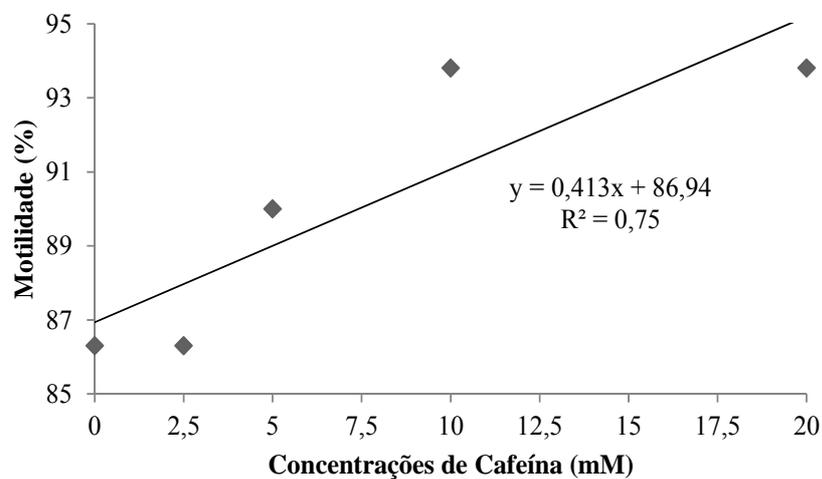


Gráfico 1 Motilidade espermática do sêmen *in natura* de pacu, de acordo com as concentrações de cafeína

Para o sêmen descongelado de pacu, foi observada uma resposta quadrática significativa para a duração da motilidade, em que uma concentração de 8,38 mM de cafeína foi capaz de proporcionar uma máxima duração da motilidade de 34,57 s (Gráfico 2). Para a motilidade, não houve efeito ($P > 0,05$) em função das concentrações de cafeína.

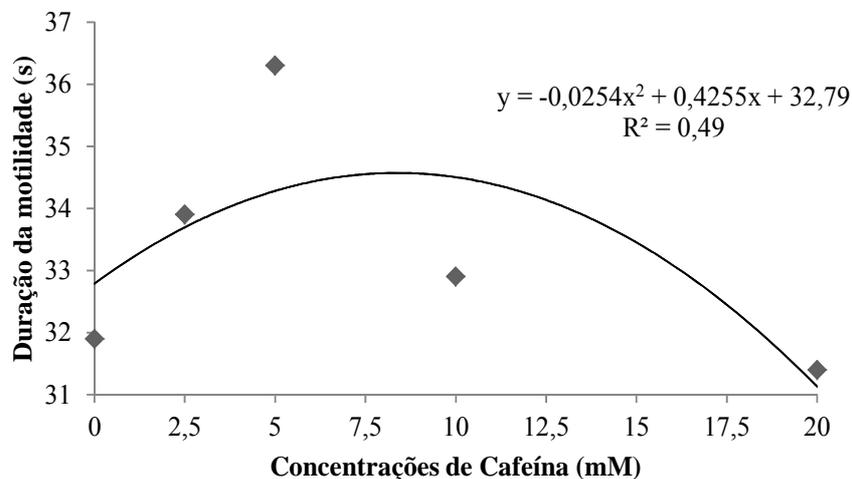


Gráfico 2 Duração da motilidade do sêmen descongelado de pacu, de acordo com as concentrações de cafeína

Já para o sêmen *in natura* de curimba o aumento da concentração de cafeína resultou em aumento ($P < 0,05$) correspondente na motilidade espermática, sendo que a máxima concentração avaliada foi capaz de proporcionar motilidade de 99,5%. Adicionalmente, para cada incremento de 1% na concentração de cafeína, ocorre um aumento na motilidade espermática de 0,15%. Para a duração da motilidade observou-se a um comportamento quadrático em função das concentrações de cafeína ($P < 0,05$), sendo a máxima duração da motilidade (63,10 s) observada na concentração de 5,71 mM (Gráfico 4).

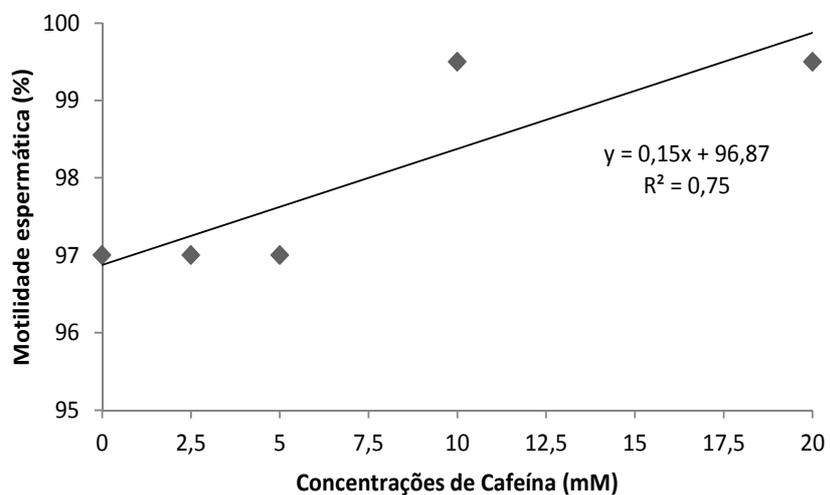


Gráfico 3 Motilidade espermática do sêmen *in natura* de curimba, de acordo com as concentrações de cafeína

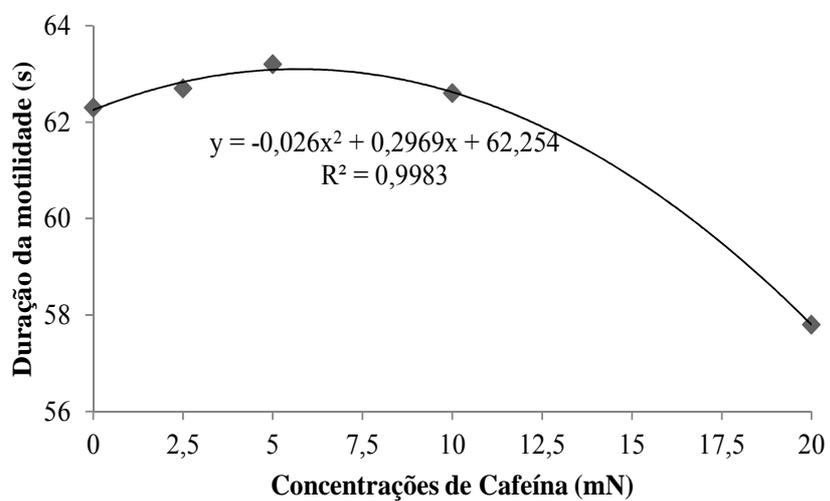


Gráfico 4 Duração da motilidade do sêmen *in natura* de curimba, de acordo com as concentrações de cafeína

Para o sêmen descongelado de curimba o aumento na concentração de cafeína resultou em aumento linear correspondente ($P < 0,05$) na motilidade espermática, dentro dos limites avaliados, sendo que para cada incremento de 1% na concentração de cafeína espera-se um aumento de 0,478% na motilidade (Gráfico 5). Para a variável duração da motilidade, não houve efeito ($P > 0,05$) em função das diferentes concentrações de cafeína.

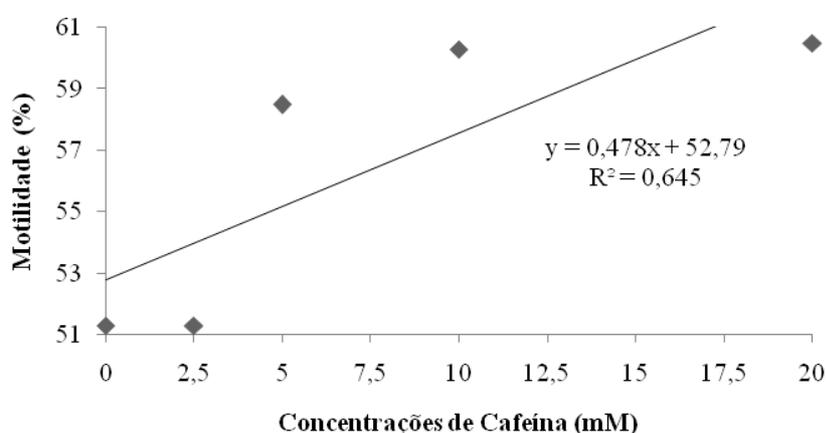


Gráfico 5 Motilidade espermática do sêmen descongelado de curimba, de acordo com as concentrações de cafeína

Os resultados desta pesquisa indicam que, para peixes, o efeito da cafeína é espécie-específico, uma vez que, comportamento diferente foi observado para as espécies avaliadas. Além disso, indica uma variabilidade em relação a variável analisada e o tipo de sêmen. Na literatura, os resultados encontrados também são controversos, com efeitos benéficos ou não. Por exemplo, em cavilha (*Esox lucius*) a cafeína reduziu significativamente a taxa de fertilidade, indicando que esta substância pode ser prejudicial para motilidade espermática (BABIACK et al., 1999). Já em salmonídeos (*Onchorynchus*

mykiss), a adição de metilxantinas na solução ativadora, foi capaz de induzir uma reativação dos espermatozoides por restauração das vias metabólicas, além de prolongar e intensificar a motilidade espermática (BENAU; TERNER, 1980).

Esta especificidade no efeito da cafeína sobre os parâmetros de motilidade espermática pode se dá em função da própria variabilidade na composição do sêmen que reflete diretamente na motilidade espermática (KOPEIKA; KOPEIKA, 2008). Por exemplo, pode estar associada à variação interindividual dos estoques de ATP intracelular. Espermatozoides com altos níveis de ATP intracelular, provavelmente, serão capazes de sustentar a motilidade por mais tempo, o que pode refletir diretamente no efeito da cafeína na duração da motilidade espermática, uma vez que a cafeína também atua sobre o metabolismo energético da célula espermática (BURNES; MOYES; MONTGOMERIE, 2005).

A composição iônica da solução ativadora também pode afetar o efeito da cafeína no sêmen. A solução ativadora utilizada neste trabalho era composta por solução de NaHCO_3 (0,76%) o que pode ter contribuído para o efeito benéfico da cafeína, uma vez que, já foi demonstrado que substratos exógenos podem atuar de maneira sinérgica com esse composto, ambos contribuindo para a motilidade espermática (FATTOUH; ABDU, 1991).

O NaHCO_3 é conhecido por ser um estimulante fisiológico relevante da motilidade espermática e tem efeito direto sobre o batimento flagelar. Além disso, assim como a cafeína, o seu efeito na ativação do espermatozoide é resultado do aumento do AMPc que é capaz de acelerar o batimento flagelar (CARLSON; HILLE; BABCOCK, 2007). Sendo assim, a cafeína e o NaHCO_3 podem ter atuado de forma sinérgica contribuindo para aumentar os parâmetros de motilidade espermática, no entanto até certa concentração da cafeína, uma vez, que concentrações acima de 10 mM mostraram-se prejudiciais, como já mencionado acima.

Apesar do efeito benéfico da cafeína, em altas concentrações pode ocasionar efeitos adversos sobre o espermatozoide. Concentrações acima de 8,38% e 5,71% tiveram efeito negativo sobre a duração da motilidade para o sêmen descongelado de pacu e para o sêmen *in natura* de curimba, respectivamente. De maneira semelhante, em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), a inclusão da cafeína na solução ativadora na concentração de 20 mM resultou em diminuição da duração da motilidade do sêmen *in natura* quando comparada a concentração de 10 mM (VALDEBENITO, 2007).

Em sêmen canino o efeito da cafeína, adicionada ao meio diluidor após o descongelamento, também foi dependente da concentração, assim como o observado nesse trabalho. Avaliando-se três concentrações diferentes (2,5; 5,0 e 7,5 mM) os parâmetros de motilidade, tais como velocidade em linha reta (VSL) e motilidade progressiva (PM), foram negativamente afetados na concentração de 7,5 mM sendo os melhores resultados encontrados para a concentração intermediária (MILANI et al., 2010).

A baixa solubilidade da cafeína, na qual dificulta a obtenção de soluções em altas concentrações, pode estar associada a esse efeito deletério sobre os parâmetros de motilidade, quando adicionada em altas concentrações. Além disso, pode estar associado ao aumento da osmolaridade das soluções ativadoras. A adição de cafeína, nesse trabalho, na concentração de 20 mM resultou em maior osmolaridade ($132 \text{ mOsmol/kg}^{-1}$), quando comparada as demais. Segundo Felizardo et al. (2011), soluções ativadoras contendo alta osmolaridade podem proporcionar menores taxas e duração da motilidade no sêmen criopreservado de curimba. Este fato pode estar associado a menor diferença de osmolaridade do ativador espermático em relação ao plasma seminal, na qual pode não proporcionar meio adequado para a ativação completa dos espermatozoides.

4 CONCLUSÃO

Sob as condições em que este experimento foi realizado pode-se concluir que:

- para o sêmen *in natura de* pacu a cafeína deve ser adicionada a solução ativadora na concentração de 20 mM;
- para o sêmen descongelado de pacu a cafeína deve ser adicionada a solução ativadora na concentração de 8,38 mM;
- para o sêmen *in natura* de curimba a cafeína deve ser adicionada a solução ativadora na concentração de 5,71 mM;
- para o sêmen descongelado de curimba cafeína deve ser adicionada a solução ativadora na concentração de 20 mM

REFERÊNCIAS

BABIACK, I. et al. The effect of egg yolk, low density lipoproteins, methyxanthines and fertilization diluent on cryopreservation efficiency of northern pike (*Esox Lucius*) spermatozoa. **Theriogenology**, Stoneham, v. 52, n. 3, p. 473-479, Aug. 1999.

BENAU, D.; TERNER, C. Initiation, prolongation, and reactivation of the motility of salmonid spermatozoa. **Gamete Research**, New York, v. 3, n. 3, p. 247-257, 1980.

BILLARD, R. Reproduction in rainbow trout: sex differentiation, dynamics of gametogenesis, biology and preservation of gametes. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 100, n. 1/3, p. 263-298, Jan. 1992.

BURNESS, G.; MOYES, C. D.; MONTGOMERIE, R. Motility, ATP levels and metabolic enzyme activity of sperm from bluegill (*Lepomis macrochirus*). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, London, v. 140, n. 1, p. 11-17, Jan. 2005.

CARLSON, A. E.; HILLE, B.; BABCOCK, D. F. External Ca²⁺ acts upstream of adenylyl cyclase SACY in the bicarbonate signaled activation of sperm motility. **Developmental Biology**, Orlando, v. 312, n. 1, p. 183-192, Sept. 2007.

CARRINGTON, J. L. et al. Effect of caffeine, pentoxifylline, and taurine on post-thaw parameters of equine frozen semen. **Journal of Equine Veterinary Science**, Champaign, v. 31, n. 5, p. 230-356, May 2011.

COLÁS, C.; CEBRIÁN PÉREZ, J. A.; MIÑO-BLANCO, T. Caffeine induces ram sperm hyperactivation independent of cAMP-dependent protein kinase. **International Journal Andrology**, Copenhagen, v. 33, n. 1, p. 187-197, Feb. 2010.

DONALDSON, E. M.; HUNTER, G. Induced final maturation ovulation and spermiation in cultured fish. In: HOAR, W. S.; RANDAL, D. J.; DONALDSON, E. M. (Ed.). **Fish physiology**. New York: Academic, 1983. p. 351-403.

FATTOUH, E. S. M.; ABDOU, M. S. S. Effect of caffeine on the post-thaw motility of buffalo spermatozoa. **Theriogenology**, Stoneham, v. 36, n. 1, p. 149-154, July 1991.

FELIZARDO, V. O. et al. Effect of cryopreservant combinations on the motility and morphology of curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 122, n. 3/4, p. 259-263, Dec. 2010.

_____. Osmolaridade e taxa de diluição na ativação do sêmen criopreservado de *Prochilodus lineatus*. **Archivos Zootecnia**, Concordia, v. 60, n. 232, p. 1255-1262, 2011.

GLOGOWISKI, J.; DANFORTH, D. R.; CIERESZKO, A. Inhibition of alkaline phosphatase activity of boar semen by pentoxifylline, caffeine, and theophylline. **Journal of Andrology**, Philadelphia, v. 23, n. 6, p. 783-792, Nov. 2002.

KAVAMOTO, E. R.; SILVEIRA, W. S. da. Produção espermática do curimbatá *Prochilodus scrofa* Steindacher, 1881. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 24, n. 2, p. 73-78, jul. 1997.

KOPEIKA, E.; KOPEIKA, J. Variability of sperm quality after cryopreservation in fish. In: ALAVI, S. N. H. et al. (Ed.). **Fish spermatology**. Oxford: Alpha Science International, 2008. p. 347-397.

KUBOVICOVA, E. et al. Effect of different semen extenders and additives to insemination doses on ewe's pregnancy rate. **Slovak Journal Animal Science**, Bratislava, v. 43, n. 3, p. 118-122, 2010.

MILANI, C. et al. Effect of post-thaw dilution with caffeine, pentoxifylline, 2'-deoxyadenosine and prostatic fluid on motility of frozen-thawed dog semen. **Theriogenology**, Stoneham, v. 74, n. 1, p. 153-164, Mar. 2010.

MURGAS, L. D. S. et al. Criopreservação do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) mediante adição de diferentes diluidores, ativadores e crioprotetores. **Revista Brasileira Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 36, n. 3, p. 526-531, mar./jun. 2007.

OLIVEIRA, K. G. et al. Semen coagulum liquefaction, sperm activation and cryopreservation of capuchin monkey (*Cebus apella*) semen in coconut water solution (CWS) and TES-TRIS. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 123, n. 1, p. 75-80, Jan. 2011.

PAULINO, M. S. et al. Desempenho reprodutivo do pacu, piracanjuba e curimba induzidos com extrato de buserelina. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 37, n. 1, p. 39-45, 2011.

SHIMODA, E.; ANDRADE, D. R.; VIDAL JÚNIOR, M. V. Análise química do plasma seminal da piabanha *Brycon insignis*. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE AQUICULTURA E BIOLOGIA AQUÁTICA, 1., 2004, Vitória. **Anais...** Vitória: UFES, 2004. p. 192.

SHIMODA, E. et al. Efeito da osmolaridade sobre a motilidade espermática na piabanha *Brycon insignis*. **Ceres**, Viçosa, MG, v. 54, n. 1, p. 430-433, jan. 2007.

SILVA, J. M. A. et al. Características seminais e índices reprodutivos de curimba (*Prochilodus lineatus*) em diferentes períodos reprodutivos. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, São Paulo, v. 10, n. 3, p. 668-677, jul./set. 2009.

STREIT JÚNIOR, D. P. et al. Características qualitativas do sêmen de pacu (*piaractus mesopotamicus*) após indução hormonal. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 22, n. 3, p. 119-125, Sept./Dec. 2006.

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

VALDEBENITO, N. I. Efecto de la cafeína em la motilidade y fertilidade espermática de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*). **Información Tecnológica**, La Serena, v. 18, n. 2, p. 61-65, 2007.

VALDEBENITO, N. I. et al. Factores fisicoquímicos que regulan la motilidade espermática em peces: aspectos básicos y aplicados: uma revisó. **Archivos Medicina Veterinaria**, Valdivia, v. 41, p. 97-106, 2009.

VIVEIROS, A. T. M. et al. Motility and fertility of the subtropical freshwater fish streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) sperm cryopreserved in powdered coconut water. **Theriogenology**, Stoneham, v. 74, n. 4, p. 551-556, Sept. 2010.

_____. 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.

VIVEIROS, A. T. M.; GODINO, 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. 2008.