

**DILUIDORES E CRIOPROTETORES NO  
RESFRIAMENTO E CONGELAMENTO DO  
SÊMEN DE PIRACANJUBA (*Brycon orbignyanus*)**

**ALEXANDRE NIZIO MARIA**

**LAVRAS-MG  
2005**

**ALEXANDRE NIZIO MARIA**

**DILUIDORES E CRIOPROTETORES NO RESFRIAMENTO  
E CONGELAMENTO DO SÊMEN DE PIRACANJUBA**  
*(Brycon orbignyanus)*

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

Orientadora

Prof.<sup>a</sup>. PhD Ana Tereza de Mendonça Viveiros

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2005

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

Maria, Alexandre Nizio

Diluidores e crioprotetores no resfriamento e congelamento do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)./Alexandre Nizio Maria - Lavras : UFLA, 2005.

71 p. : il.

Orientadora: Ana Tereza de Mendonça Viveiros.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Piscicultura. 2. Reprodução. 3. Sêmen. 4. Preservação. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-639.3752

**ALEXANDRE NIZIO MARIA**

**DILUIDORES E CRIOPROTETORES NO RESFRIAMENTO  
E CONGELAMENTO DO SÊMEN DE PIRACANJUBA  
(*Brycon orbignyana*)**

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

APROVADA em 23 de fevereiro de 2005

Prof. Dr. Luis David Solis Murgas UFLA

Profa. Dra. Priscila Vieira Rosa Logato UFLA

Prof. Dr Henrique César Pereira Figueiredo UFLA

Prof. Dr. Rilke Tadeu Fonseca de Freitas UFLA

Prof<sup>a</sup>. PhD Ana Tereza de Mendonça Viveiros  
UFLA  
(Orientadora)

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL

*Dedico este trabalho a Daniela, minha esposa, pelo companheirismo e compreensão, ao Lucas, meu filho, pelo amor e alegria, e aos meus pais Enéδιο e Maria pela confiança e apoio.*

*“Feliz o homem que encontrou a sabedoria e alcançou o entendimento, porque a sabedoria vale mais do que a prata, e o fruto que se obtém é melhor que o fino ouro.”*

*Prov. 3, 13-15*

## AGRADECIMENTOS

À Prof<sup>ª</sup>. PhD. Ana Tereza de Mendonça Viveiros, pela atenção, orientação e companheirismo durante todo este trabalho.

Ao Prof. Dr. Luis David Solis Murgas, pela disponibilização do Laboratório de Fisiologia e Farmacologia, pela paciência e compreensão durante a execução dos trabalhos.

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

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Priscila Vieira Rosa Logato, pelos conhecimentos transmitidos durante todo o curso.

Aos colegas Gilson F. de Moraes, Alexmiliano V. Oliveira, Laura H. Orfão, Rafael, Ziara Isaú e Aléssio B. Miliorini, pela ajuda recebida.

Ao Instituto de Ciência Animal da Universidade de Wageningen e Centro de Pesquisa (WUR), Wageningen, Holanda, pela disponibilização do osmômetro.

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

À Companhia Energética de Minas Gerais (CEMIG) pela disponibilização dos reprodutores e instalações da Estação de Piscicultura.

À equipe da Estação de Piscicultura da CEMIG, Gilson, Jailson e Darli, em especial aos Drs. Oscar Moura e Newton José Schimit Prado, pelo auxílio e pela valiosa colaboração.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro e pelo portal Periódicos CAPES.

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

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
LISTA DE TABELAS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	ii
RESUMO .....	iii
ABSTRACT.....	v
1 INTRODUÇÃO .....	01
2 OBJETIVOS .....	03
2.1 Objetivo geral.....	03
2.2 Objetivos específicos .....	03
3 REVISÃO DE LITERATURA. ....	04
3.1 A espécie em estudo.....	04
3.2 Aspectos relevantes da biologia do sêmen .....	05
3.2.1 Morfologia dos espermatozóides .....	05
3.2.2 Metabolismo dos espermatozóides.....	06
3.2.3 Motilidade dos espermatozóides .....	07
3.3 Concentração espermática.....	10
3.4 Coloração diferencial dos espermatozóides .....	11
3.5 Diluidores e crioprotetores .....	11
3.6 Preservação dos espermatozóides através do resfriamento .....	13
3.7 Preservação dos espermatozóides através do congelamento.....	14
3.8 Descongelamento de sêmen de peixes .....	17
3.9 Taxa de fertilização após o congelamento .....	18
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	20
4.1 Procedência dos reprodutores e coleta do sêmen .....	20
4.2 Determinação da concentração espermática.....	21
4.3 Experimento 1-Resfriamento do sêmen de piracanjuba.....	21

4.3.1 Experimento 1A-Avaliação de diluidores de sêmen .....	21
4.3.2 Experimento 1B-Avaliação da adição de crioprotetores nos diluidores de sêmen .....	22
4.3.3 Experimento 1C-Avaliação da adição de antibiótico nos diluidores de sêmen .....	23
4.4 Experimento 2-Congelamento do sêmen de piracanjuba .....	24
4.5 Experimento 3-Capacidade de fertilização e taxa de sobrevivência dos espermatozoides após a criopreservação.....	25
4.6 Análise estatística.....	28
5 RESULTADOS.....	33
5.1 Concentração espermática.....	33
5.2 Experimento 1-Resfriamento do sêmen de piracanjuba.....	33
5.2.1 Experimento 1A-Avaliação de diluidores de sêmen .....	33
5.2.2 Experimento 1B-Avaliação da adição de crioprotetores nos diluidores de sêmen .....	34
5.2.3 Experimento 1C-Avaliação da adição de antibiótico nos diluidores de sêmen .....	37
5.3 Experimento 2-Congelamento do sêmen de piracanjuba.....	39
5.4 Experimento 3- Taxa de sobrevivência e capacidade de fertilização dos espermatozoides após o congelamento .....	41
6 DISCUSSÃO.....	43
6.1 Resfriamento do sêmen .....	43
6.2 Congelamento do sêmen .....	46
6.3 Taxa de sobrevivência e capacidade de fertilização dos espermatozoides após o congelamento.....	50
7 CONCLUSÕES.....	54
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
ANEXOS .....	64



## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b>	Porcentagem de motilidade espermática do sêmen de piracanjuba (média $\pm$ d.p.; n=3peixes) após o resfriamento por 48 horas a 4°C em diferentes soluções diluidoras (proporção sêmen diluidor 1:4) .....	34
<b>TABELA 2</b>	Porcentagem de motilidade espermática do sêmen de piracanjuba (média $\pm$ d.p.; n=3peixes) após resfriamento por 48 h a 4°C em diferentes diluidores acrescidos de crioprotetores à 10% .....	35
<b>TABELA 3</b>	Porcentagem de motilidade espermática do sêmen de piracanjuba (média $\pm$ d.p.; n = 3peixes), diluído em soluções acrescidas de sulfato de gentamicina e resfriada a 4°C por 7 dias (proporção sêmen:diluidor 1:9) .....	38
<b>TABELA 4</b>	Porcentagem de motilidade espermática do sêmen de piracanjuba (média $\pm$ d.p.; n=3peixes; 3 palhetas/peixe) após o descongelamento .....	40
<b>TABELA 5</b>	Taxa de eclosão (média $\pm$ d.p.; n=3; 3 repetições/peixe) de ovos fertilizados com sêmen congelado em soluções contendo metil glicol 10% como crioprotetor e descongelado a 60°C por 8 segundos .....	41

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b>	Exemplar adulto de piracanjuba <i>Brycon orbignyanus</i> .....	04
<b>FIGURA 2</b>	Cascata dos eventos desencadeadores da motilidade espermática.....	09
<b>FIGURA 3</b>	A. tipo de raque utilizada no congelamento; B. Aferição da temperatura do botijão de vapor de nitrogênio líquido através de um termômetro digital, para posterior resfriamento das palhetas .....	27
<b>FIGURA 4</b>	A. Visão da parte superior da incubadora de PVC; B. Visão da parte inferior telada; C. Sistema de incubação dos ovos utilizado no teste de fertilização, abastecido com água na temperatura de 26°C .....	28
<b>FIGURA 5</b>	Valores da taxa de motilidade espermática, porcentagem de espermatozóides vivos obtidos pela coloração diferencial e a taxa de eclosão dos ovos fertilizados com espermatozóides descongelados .....	42

## RESUMO

MARIA, Alexandre Nizio. **Diluidores e crioprotetores no resfriamento e congelamento do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)**. 2005. 71 p. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo de preservação de sêmen do piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) através dos processos de resfriamento a 4°C e congelamento. Os trabalhos foram realizados na Estação de Piscicultura da Companhia Energética de Minas Gerais (CEMIG), Itutinga-MG. No experimento 1 foram avaliados diversos diluidores, crioprotetores (DMSO, metanol e metil glicol) e antibiótico (sulfato de gentamicina) no resfriamento do sêmen. No experimento 2, os diluidores que melhor mantiveram a motilidade espermática no experimento 1 foram acrescidos de 10% de crioprotetor (DMSO, metanol ou metil glicol) e 5% de gema de ovo de galinha e usados como meio diluidor para o congelamento de sêmen. O congelamento foi feito utilizando um botijão de vapor de nitrogênio líquido (Taylor-Warton, modelo CP 300, “dry shipper”). As amostras de sêmen foram descongeladas em banho-maria à 60°C por 8 segundos. No experimento 3, avaliou-se a porcentagem de sobrevivência através do método de coloração diferencial e a capacidade de fertilização dos espermatozoides após o descongelamento. No Experimento 1, a solução de Saad (NaCl 200 mM; tris 30 mM) foi o diluidor que melhor manteve a motilidade espermática, proporcionando 80% de motilidade após 24 h de resfriamento, enquanto as amostras controle (não diluídas) apresentaram apenas 33%. A adição de crioprotetores nos diluidores não promoveu melhoria no meio de conservação durante o resfriamento, exceto nas amostras diluídas em NaCl 0,9% acrescidas de DMSO, as quais após 24 h, produziram uma maior taxa de motilidade espermática (77%) em relação às amostras diluídas apenas em NaCl 0,9% (60%). Entretanto, as amostras de sêmen diluídas em Saad e NaCl 200 mM sem crioprotetor, apresentaram taxa de motilidade semelhante as amostras diluídas em NaCl 0,9% acrescidas de DMSO, indicando não ser necessário o acréscimo de crioprotetores no processo de resfriamento quando as soluções de Saad ou NaCl 200 mM são usadas como diluidores. A adição de gentamicina não melhorou a taxa de motilidade espermática durante o resfriamento. As soluções NaCl 200 mM e Saad, acrescidas ou não de gentamicina, preservaram a motilidade espermática por um período de 7 dias de resfriamento, produzindo taxas de motilidade entre 37 e 40% quando diluídas numa proporção 1:9 (sêmen:diluidor). No Experimento 2, as amostras que apresentaram as maiores taxas de motilidade espermática após o descongelamento foram NaCl 0,9% + gema de ovo + metil glicol (66%); M III<sup>®</sup> (glicose; citrato de sódio; EDTA;

sulfato de gentamicina;  $\text{NaHCO}_3$ ); + gema de ovo + metil glicol (60%) e BTS<sup>®</sup> (glicose; citrato de sódio; EDTA; sulfato de gentamicina;  $\text{NaHCO}_3$ ; KCl) + metil glicol (70%). No Experimento 3, a porcentagem de sobrevivência dos espermatozóides após o descongelamento foi semelhante a porcentagem de espermatozóides móveis. Após a fertilização realizada com o sêmen congelado nesses criodiluidores, verificou-se uma boa taxa de eclosão dos ovos (58, 40 e 66%, respectivamente), porém menor ( $P < 0,05$ ) que a taxa observada com o sêmen fresco (86%).

---

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

## ABSTRACT

MARIA, Alexandre Nizio. **Semen cool storage and cryopreservation of piracanjuba *Brycon orbignyanus***. 2005. 71 p. MSc Thesis (Animal Production) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.\*

The aim of this study was to develop a protocol for semen storage of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) by cool storage at 4°C and cryopreservation. The experiments were carried out at the Fish Culture unit of Hydroelectric Company of Minas Gerais, Itutinga-MG. In experiment 1, some extenders, cryoprotectors (DMSO, methanol or methyl glycol) and antibiotic (gentamicin sulfat) were tested on cool storage of semen. In experiment 2, the extenders that maintained the highest motility rate of semen on experiment 1, were combined with 10% cryoprotector (DMSO, methanol and methyl glycol) and 5% egg yolk, and used as cryodiluent for semen cryopreservation. Semen was frozen in liquid nitrogen vapour (vessel Taylor-Warton, model CP 300, “dry shipper”) and thawed at 60°C water-bath for 8 seconds. In experiment 3, the hatching rate of frozen sperm were evaluated. In experiment 1, semen diluted in Saad solution (NaCl 200 mM; tris 30 mM) yielded the highest motility rate (80%) after 24 h of cooling. Control undiluted semen produced only 33% motility after the same period of cooling. There was no difference on motility of semen diluted in extender compared to samples diluted in extender plus cryoprotectors. The only exception was the combination of NaCl 0,9% plus DMSO that produced 77% motility, compared to 60% motility of samples diluted in NaCl 0,9% only. Semen diluted in Saad solution or NaCl 200 mM only produced motility rates similar to those samples diluted in NaCl 0,9% plus DMSO. This indicates that there is no need to add cryoprotectants to the cooling medium when Saad solution or NaCl 200 mM are used as extenders. When semen was stored for 7 days in NaCl 200 mM or Saad solution containing gentamicin, motility rates were similar to those samples stored in the same extender without gentamicin. In experiment 2, semen frozen in NaCl 0,9% + egg yolk + methyl glycol, M III<sup>®</sup> (glucose; sodium citrate; EDTA; gentamicin sulfat; NaHCO<sub>3</sub>) + egg yolk + methyl glycol and; BTS<sup>®</sup> (glucose; sodium citrate; EDTA; gentamicin sulfat; NaHCO<sub>3</sub>; KCl) + methyl glycol produced post-thawed motility rates above 60%. When those samples semen was used to fertilize fresh eggs, the hatching rates were between 40 and 66%, while control fresh semen produced 86% of hatching.

---

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

## 1 INTRODUÇÃO

A busca por técnicas cada vez mais apuradas de preservação de sêmen de peixes vem de encontro às questões econômicas e ecológicas atuais. Fatores como a destruição das matas ciliares, o aumento da demanda alimentar, a pesca predatória, a construção de barragens de hidroelétricas, interferindo no comportamento migratório dos peixes, e a poluição dos ecossistemas aquáticos, ocasionaram o desaparecimento de algumas espécies e a diminuição de populações de espécies de importância econômica e ecológica.

Os peixes migradores, também conhecidos como de piracema, constituem parte significativa das espécies comerciais brasileiras. Entre elas encontra-se a piracanjuba (*Brycon orbignyanus*), que é objeto de estudo na presente dissertação. Alguns aspectos como a excelente qualidade da carne, o hábito alimentar no ambiente natural e o rápido crescimento e ganho de peso demonstrados em criações experimentais constituem, sem dúvida, indicadores para seleção desta espécie como alternativa para o desenvolvimento da piscicultura nas diversas regiões do Brasil. No entanto, esta espécie vem sofrendo com o desequilíbrio ambiental, sendo apontada como uma espécie ameaçada de extinção. Sua inclusão em programas que visam a conservação do material genético *ex situ* é considerada como uma estratégia a ser priorizada.

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

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

adaptem a cada espécie. Assim sendo, este trabalho visa desenvolver um protocolo de preservação de sêmen de piracanjuba a curto e a longo prazo, estabelecendo uma metodologia adequada a esta espécie.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Desenvolver um protocolo de preservação de sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) a curto prazo, através do processo de resfriamento, e a longo prazo, através do processo de congelamento.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Avaliar a eficiência de soluções diluidoras, associadas ou não a crioprotetores ou antibiótico na motilidade espermática após o resfriamento;
- Avaliar a eficiência de soluções diluidoras associadas a crioprotetores na motilidade e viabilidade espermática após o congelamento;
- Avaliar a capacidade de fertilização do sêmen congelado.



### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 A espécie em estudo

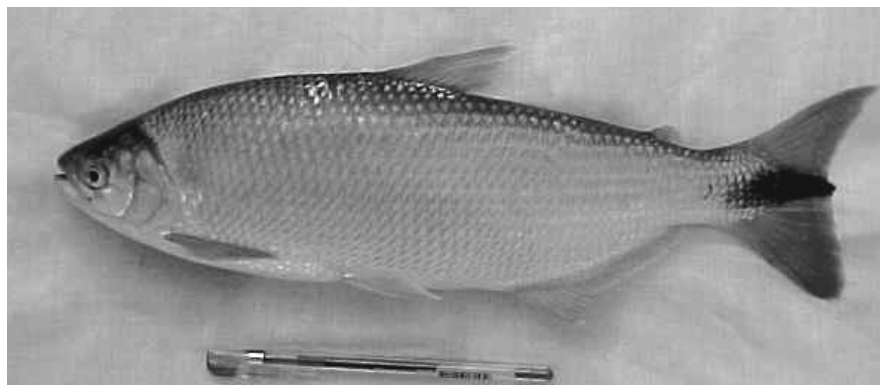
Família: Anostomidae ;

Subfamília: Characiformes;

Gênero: *Brycon*

Espécie: *Brycon orbignyanus*

Nome popular: Piracanjuba



**FIGURA 1.** Exemplar adulto de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)

A piracanjuba é encontrada nas bacias do rio Grande, Paranaíba e Paraguai (Godoy, 1975). Esta espécie apresenta corpo fusiforme e comprido e a boca é ampla e terminal, o dorso é castanho escuro e a nadadeira caudal apresenta cor vermelha com uma faixa mediana bem escura. Ela é onívora, alimentando-se eventualmente de peixes e insetos. O macho reproduz-se a partir de dois anos de idade, com 20 cm de comprimento, apresentando como característica sexual secundária aspereza na nadadeira anal, resultante de pequenas espículas que

aparecem na época da reprodução; já a fêmea se reproduz a partir do terceiro ano de idade, com 25 cm de comprimento. Esta espécie prefere ambientes lóticos de águas claras, sendo encontrada nos locais em que as árvores se deitam sobre o rio, onde obtêm os frutos que lhes servem de alimento. A migração rio acima se dá nos meses de setembro e outubro, culminando com a desova entre novembro e janeiro (Companhia Energética de Minas Gerais & Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais, 2000).

Segundo Conte et al. (1995), a piracanjuba foi muito prejudicada com o barramento dos rios, estando sujeita à extinção. Existe um grande interesse na utilização destes briconídeos tanto para repovoamento de reservatórios hidrelétricos e pisciculturas comerciais, com espécies nativas, quanto para conservação da biodiversidade.

## **3.2 Aspectos relevantes da biologia do sêmen**

### **3.2.1 Morfologia dos espermatozóides**

Os espermatozóides de peixes variam em estrutura (Jamieson, 1991), refletindo sua história evolutiva de mais de 550 milhões de anos (Janvier, 1999).

Segundo Nagahama (1983), os espermatozóides podem ser morfológicamente subdivididos em cabeça, peça intermediária e cauda. Na maioria dos grupos de peixes falta o acrossoma, que ocorre em todos os outros grupos de vertebrados. A morfologia dos espermatozóides parece refletir no seu modo de fertilização. A carência do acrossoma é compensada pela presença da micrópila, um orifício no córion do ovo para a penetração do espermatozóide (Cosson et al., 1999).

Os espermatozóides de matrinxã (*Brycon cephalus*) podem ser classificados como pertencentes a uma estrutura tipicamente primitiva, característica dos peixes teleósteos com fecundação externa, uniflagelados e sem o acrossoma (Silveira, 2000).

A cabeça e a cauda dos espermatozóides de *Brycon orbignyanus* e *Brycon cephalus* apresentam as seguintes características morfológicas: cabeça arredondada destituída de vesícula acrossomal, peça intermediária longa apresentando um colar de mitocôndrias na porção anterior, cauda ou flagelo longo com axonema básico do tipo 9+2 (Aires, 1998; Silveira, 2000).

### **3.2.2 Metabolismo dos espermatozóides**

A energia para a motilidade e o metabolismo básico dos espermatozóides são derivados de uma quebra de nutrientes exógenos e endógenos na presença ou ausência de oxigênio (Stoss, 1983).

Os espermatozóides de peixes com fertilização interna são capazes de realizar glicólise em processos anaeróbios. É provável que o metabolismo espermático seja mantido pelos açúcares ovarianos (Gardiner, 1978, citado por Leung & Jamieson, 1991). Em contraste, o sêmen fertilizando externamente peixes ovíparos mostra uma atividade glicolítica limitada, principalmente no metabolismo oxidativo. Eles não são especificamente adaptados para utilização de fontes de energia exógenas, embora pareçam eficientes, em um grau limitado de ação, quando fornecido alimento externo (Harvey e Kelley, 1984, citado por Leung & Jamieson, 1991).

Estudos realizados por Billard et al. (1995) concluíram que os espermatozóides de carpa (*Cyprinus carpio*) são carregados com ATP, o qual é a maior fonte de energia durante o curto período de motilidade. Este ATP é

hidrolisado rapidamente durante a fase ativa da motilidade. A síntese de ATP fornece uma contribuição muito pequena e pode ser resultado da glicólise e da respiração mitocondrial. A motilidade é interrompida quando 50 a 80% destes ATPs são consumidos pela hidrólise.

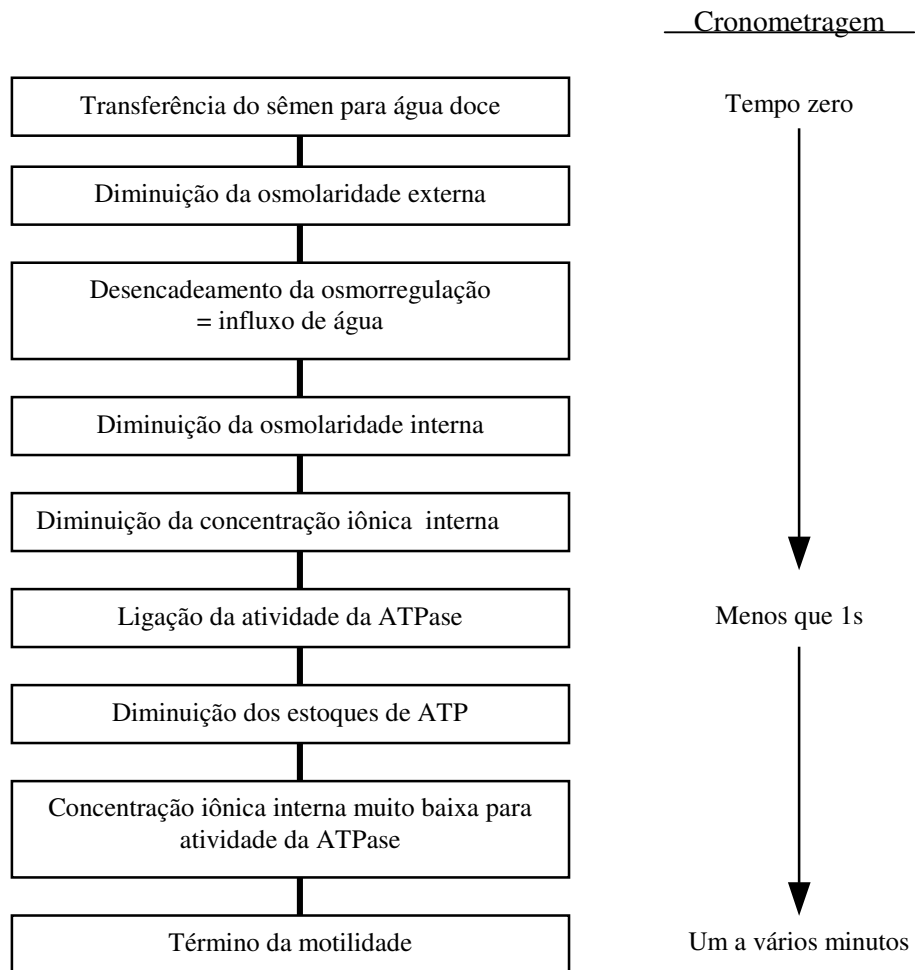
### **3.2.3 Motilidade dos espermatozóides**

Os espermatozóides de peixes são imóveis nos testículos e, em muitas espécies, no plasma seminal. Durante a reprodução natural, a motilidade é induzida depois da liberação dos espermatozóides (e desta forma sua dispersão/diluição) do trato genital do macho dentro do ambiente aquoso em que os espermatozóides encontram os componentes solúveis da água do meio externo, principalmente íons (Cosson, 2004).

Em salmonídeos e ciprinídeos de água doce, a redução da concentração de potássio ou osmolaridade do ambiente ao redor dos espermatozóides liberados em água doce afeta diretamente o flagelo e regula a iniciação da motilidade espermática (Morisawa et al., 1983). O fluido seminal é rico em muitos nutrientes e íons, alguns dos quais importantes na manutenção da qualidade espermática quando estocados no estado imóvel no trato genital. Fatores ambientais externos podem afetar a qualidade e motilidade espermática durante o processo de ativação. Fatores como o pH ou íons presentes podem polarizar a membrana celular e estimular a motilidade espermática dos peixes (Morisawa et al., 1999). A osmolaridade isotônica ao plasma seminal suprime a motilidade espermática em teleósteos marinhos e de água doce; quando o sêmen é exposto a hipertonicidade da água salgada ou hipotonicidade da água doce, respectivamente, induz a iniciação da motilidade espermática (Takai and Morisawa, 1995).

Em resposta ao estresse osmótico, o volume citoplasmático das células espermáticas das espécies de água doce aumenta em até três vezes, como resultado do influxo de água (Perchec-Poupard et al., 1997). O oposto ocorre em espécies de água salgada. Isto, combinado com a medição do ATP, leva a um possível esquema geral (Figura 2) mostrando as mudanças nas concentrações iônicas internas ocorridas em respostas à osmolaridade externa, que podem controlar a motilidade espermática em peixes (Cosson, 2004).

A duração da motilidade espermática em peixes de água doce é muito curta (Billard et al., 1995; Cosson et al., 1999) e muito variada entre as espécies: 30-40 s a 20°C em *Carrpa* (Billard et al., 1995) e 486 s a 26°C em pacu (*Piaractus mesopotamicus*; Maria et al., 2004).



**FIGURA 2.** Modificado de Cosson (2004). Cascata dos eventos desencadeadores da motilidade espermática. Exemplo de espécies de água doce.

O esquema acima descreve os possíveis eventos ocorridos no desencadeamento da motilidade espermática. O exemplo ilustra a ativação dos espermatozoides de alguns peixes de água doce quando transferidos do fluido seminal para água doce, mostrando como a súbita diminuição da osmolaridade externa imediatamente leva ao reajustamento da concentração iônica interna

pelo processo osmorregulativo da membrana. A diminuição da concentração iônica interna atinge valores em que a atividade da ATPase é ótima e, conseqüentemente, a motilidade é em alta velocidade. Posteriormente, o conteúdo de ATP torna-se baixo porque a renovação pela fosforilação mitocondrial é muito lenta, o que é combinado com uma diminuição adicional da concentração iônica a valores em que a atividade da ATPase é bloqueada; por isso, a intensidade flagelar é completamente interrompida alguns minutos mais tarde.

### **3.3 Concentração espermática**

A concentração de espermatozoides no fluido seminal tem sido tradicionalmente usada para avaliar a qualidade espermática em peixes. O método comum para determinação da densidade espermática (células espermática/mL de sêmen) no sêmen de peixe é a contagem de espermatozoides através de uma câmara hematimétrica (Buyukhatipoglu and Holtz, 1984).

O cálculo da concentração espermática é realizado em números de células espermáticas coletadas por quilograma de peso corporal (células/kg), por grama de testículo ou, ainda, por peixe (células/peixe). O número de espermatozoides por mL de sêmen é mais apropriado, podendo ser complementado pelo volume total de sêmen. Sêmen altamente concentrado nem sempre oferece elevada motilidade ou altas taxas de fertilização (Geffen and Evans, 2000; Williot et al., 2000). Este parâmetro não é uma medida específica da capacidade de fertilização do sêmen e pode variar muito dentro de determinadas espécies de peixes, num mesmo indivíduo ao longo da vida, e com o método de indução da espermição (Maria & Viveiros, observações não publicadas). É importante observar que a concentração espermática torna-se uma

característica relativamente importante quando se fertilizam ovos com um volume constante de sêmen, analisando a capacidade de fertilização de diferentes amostras de sêmen (Rurangwa et al., 2004).

### **3.4 Coloração diferencial dos espermatozóides**

A técnica de coloração dos espermatozóides foi introduzida em bovinos, empregando-se a eosina B e a nigrosina solúvel em água (Blom, 1950 citado por Derivaux, 1961). Através da avaliação da porcentagem dos espermatozóides vivos pelo método da coloração diferencial (espermatozóides não corados e corados) pode-se avaliar mais objetivamente a qualidade do material fecundante. Em trabalhos realizados com truta arco-íris, a proporção de espermatozóides vivos e mortos está de acordo com a estimativa percentual subjetiva da motilidade espermática (Kavamoto et al., 1985).

### **3.5 Diluidores e crioprotetores**

Diluidores são soluções de sais ou de carboidratos, que ajudam a manter a viabilidade das células durante a refrigeração. As condições exigidas de um diluidor é que ele seja isotônico (que não ative a motilidade espermática), estável ao longo do armazenamento, estéril e também carreador de crioprotetores.

As soluções diluidoras, desenvolvidas para algumas espécies em particular, têm sido utilizadas com sucesso em outras espécies. O diluidor BTS (Beltsville Thawing Solution - Minitub<sup>®</sup>), normalmente utilizado para o resfriamento do sêmen suíno, tem obtido bons resultados no resfriamento do



sêmen de peixes como o pacu (*Piaractus mesopotamicus*; Miliorini et al., 2002), o curimba (*Prochilodus scrofa*; Franciscatto et al., 2002) e a piracanjuba (*Brycon orbignyanus*; Murgas et al., 2002 b) e no congelamento de sêmen de curimba (Miliorini et al., no prelo).

Os diluidores de sêmen como Kurokura (Kurokura et al., 1984) e Ginsburg fish Ringer (Viveiros et al., 2000) utilizados em espécies comumente criadas na Europa, como a carpa comum (*Cyprinus carpio*) e o bagre africano (*Clarias gariepinus*), foram utilizados com sucesso na preservação do sêmen de espécies nativas como o piau-açú (*Leporinus macrocephalus*; Moraes, 2004).

Os crioprotetores devem ser adicionados ao meio diluidor para que haja uma proteção do espermatozóide durante o congelamento e o descongelamento (Squires et al., 1999).

Estas substâncias devem possuir como propriedades uma baixa toxicidade para as células e alta solubilidade em água. Podem ser classificadas como intracelulares ou permeáveis e extracelulares ou impermeáveis. O crioprotetor intracelular é uma substância química que retira a água da célula e diminui a temperatura na qual o interior da célula é congelado, interferindo também na formação de cristais de gelo por outras formas desconhecidas. Entre os crioprotetores intracelulares mais utilizados podem ser citados dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol, metanol e etilenoglicol. Os crioprotetores extracelulares funcionam de forma diferente; ao invés de entrarem na célula, eles recobrem a superfície celular e estabilizam a membrana, ajudando, portanto, a minimizar e reparar os possíveis danos celulares causados pelo processo de congelamento. A gema de ovo e o leite em pó desnatado são crioprotetores extracelulares mais comuns (Carolsfeld & Harvey, 1999). Os crioprotetores externos combinados com os internos promovem uma proteção mais completa ao espermatozóide, atuando ao nível de membrana celular (Leung & Jamieson, 1991).

A proteção proporcionada pelos crioprotetores internos se dá sobre as enzimas lábeis (ex: catalase) e sobre a estabilidade das proteínas em soluções aquosas não congeladas, mas alternativamente pode também induzir a desnaturação em altas temperaturas e causar uma toxicidade nos sistemas celulares. Poucos espermatozóides nas espécies estudadas têm sobrevivido a baixas temperaturas de congelamento sem crioprotetores. A adição destas substâncias ao sêmen estende a tolerância dos espermatozóides a baixas taxas de congelamento. As taxas ótimas de congelamento dependem da natureza e da concentração dos crioprotetores usados (Chao, 1991). Relata-se também que os crioprotetores são mais efetivos quando penetram rapidamente na célula durante o congelamento, retardando o congelamento intracelular e minimizando os efeitos da solução (Simeone, 1998).

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

Os espermatozóides que são imóveis no plasma seminal são apropriados para a preservação a curto prazo, já que não requerem energia para locomoção.

Existem poucas publicações sobre a estocagem de sêmen dos peixes brasileiros, mas algumas pesquisas têm obtido resultados promissores.

A estocagem de sêmen sob refrigeração é possível, mas avaliações adicionais dos diluidores e condições de estocagem são necessárias antes que este se torne um acessório benéfico ao manejo dos machos para produção de sêmen e fertilização dos ovos. Em alguns casos, crioprotetores (DMSO ou etilenoglicol) são adicionados para preservação em temperaturas levemente abaixo de 0°C em estado líquido (Stoss et al., 1978).

Segundo Stoss & Donaldson (1982), os fatores mais importantes determinantes do sucesso do resfriamento são:

- uma redução da temperatura
- fornecimento e troca de gases
- prevenção do desenvolvimento bacteriano
- prevenção da dessecação

Os espermatozóides de peixes cultivados, mantidos em baixas temperaturas (ao redor de 4°C), têm um baixo metabolismo e podem ser conservados por muitos dias em diluidores apropriados sem mudanças significantes na qualidade (Kime et al., 1996).

Uma solução diluidora deve ser utilizada no processo de resfriamento porque a diluição diminui a competição dos espermatozóides por O<sub>2</sub> e espaço (Carolsfeld & Harvey, 1999).

A adição de antibióticos em concentrações apropriadas pode prolongar o tempo de estocagem dos espermatozóides refrigerados pela prevenção das células espermáticas contra as infecções bacterianas (Segovia et al., 2000).

O oxigênio é outro fator crítico na preservação espermática. Em carpas, a incubação do sêmen com oxigênio não produziu vantagem sobre aqueles estocados em contato com o ar (Saad et al., 1988).

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

A criopreservação espermática é uma importante técnica na aquicultura e tem produzido significativas contribuições na preservação a longo prazo do sêmen para reprodução artificial de muitas espécies de peixes, como, por exemplo, o dourado (*Salminus maxillosus*; Coser et al., 1984); a piracanjuba (Bedore, 1999); o bagre africano (Viveiros et al., 2000); o matrinxã (Silveira, 2000); o curimatá (Cruz, 2001), e a tilápia-nilótica (*Oreochromis niloticus*; Amorim, 2002).

O sêmen de peixe, ao ser congelado, necessita previamente de diluição em soluções contendo diluidor(es) e crioprotetor(es).

Um diluente criopreservativo é projetado não somente para prevenir as crioinjúrias dos espermatozóides, mas também a iniciação da motilidade.

As proporções de diluição do sêmen variam entre espécies e mesmo entre pesquisadores. Assim, Bedore (1999) utilizou uma diluição de 1:4 (sêmen:diluidor) para pacu-caranha e piracanjuba; Silveira (2000) utilizou 1:4 para matrinxã; Ribeiro et al. (2003) utilizaram 1:8 para piau-açú; e Viveiros et al. (2000) utilizaram 1:10 para bagre africano.

O sucesso da criopreservação depende não somente da escolha certa dos crioprotetores e diluidores, mas também do protocolo utilizado. Os crioprotetores e a taxa de congelamento simultaneamente determinam os danos causados aos espermatozóides devido à formação de cristais de gelo intracelular (Mazur, 1977).

Durante o processo de congelamento a suspensão de espermatozóides atinge temperaturas abaixo do ponto de congelamento do meio (super resfriamento), antes que haja a formação de cristais. Quando os cristais de gelo começam a se formar, ocorre um aumento na temperatura que é necessário para a cristalização, o que pode vir a ser deletério para o espermatozóide, sendo minimizado pelo uso de curvas adequadas de congelamento (Squires et al., 1999).

Em temperaturas em torno de 5°C a água intra e extracelular permanece super resfriada e não cristaliza. Entre -5 a -10°C começam a se formar cristais de gelo no meio extracelular, que permanece super resfriado, ocorre troca de água para manter o equilíbrio entre o meio extracelular e o intracelular, ocasionando a desidratação celular. Uma desidratação severa promove desnaturação das macromoléculas e encolhimento excessivo da célula até ocorrer um colapso da membrana (Medeiros et al., 2002).

O contato direto do sêmen com o nitrogênio líquido provoca lesões na membrana plasmática e peça intermediária do espermatozóide. Já no vapor de nitrogênio líquido, os espermatozóides sofrem um congelamento gradativo de forma que as estruturas não são muito danificadas, embora o aspecto da cromatina seja consideravelmente modificado (Billard, 1983). Os maiores prejuízos conhecidos na estrutura dos espermatozóides com relação ao congelamento e descongelamento ocorrem na temperatura crítica entre 0°C e -40°C. De forma geral, a remoção de calor e a adição de crioprotetor são as causas de prejuízos; mais detalhadamente pode-se citar o choque de frio, os efeitos do pH, o gelo intracelular e extracelular, o soluto, o volume e a toxicidade dos crioprotetores (Leung, 1991).

A temperatura do sêmen deve ser levada rapidamente até -50°C, porém entre -50 a -80°C deve ser em uma velocidade um pouco mais lenta. A partir deste momento, o sêmen pode ser transferido para nitrogênio líquido e a temperatura levada a -196°C (Harvey & Carolsfeld, 1993). Em contraste, Viveiros et al. (2000) usaram três etapas no congelamento do sêmen de bagre africano (*C. gariepinus*) e obtiveram taxas de eclosão dos ovos semelhantes às do sêmen fresco. Primeiramente o sêmen foi resfriado a -5°C/min entre 5°C a -40°C. O sêmen permaneceu 5 minutos a -40°C, depois foi mergulhado em nitrogênio líquido (-196°C).

Os métodos de criopreservação consistem de procedimentos para se congelar o sêmen e armazená-lo até sua utilização. A utilização de palhetas envolve seu envazamento com sêmen diluído. Elas são então lacradas e congeladas. Palhetas de diferentes capacidades (0,25 mL; 0,5 mL; 1,0 mL; 1,2 mL; 2,5 mL e 5 mL) têm sido utilizadas. Segundo Lahnsteiner et al. (1997), a taxa de fertilização realizada com palheta de 1,2 mL foi semelhante à palheta de 0,5 mL para salmonídeos usando baixa temperatura de congelamento e alta

temperatura de descongelamento. A palheta de 5 mL resultou no sucesso da fertilização de somente 40% do sêmen controle fresco.

### **3.8 Descongelamento de sêmen de peixes**

O congelamento envolve a perda de água e a desidratação celular (Squires et al., 1999). Por outro lado, o descongelamento envolve uma rehidratação das células, ocorrendo um influxo de água para seu interior (Holt, 2000).

A maioria das células suporta um descongelamento rápido, mesmo que ela não se hidrate totalmente, exceto para embriões de mamíferos. A rapidez no descongelamento é necessária para evitar a recristalização, ou seja, o reagrupamento de pequenos cristais de gelo, formando grandes cristais, letais para a célula (Leung, 1991).

As palhetas normalmente são descongeladas por imersão em banho-maria (Lahnsteiner et al., 1997; Murgas et al., 2001; Amorim, 2002). O sêmen congelado, ao ser retirado do botijão de nitrogênio líquido, deve ser agitado em banho-maria por poucos segundos para que descongele uniformemente (Cruz, 2001). Com palhetas mais calibrosas, este processo se torna mais difícil porque o descongelamento não é uniforme, ou seja, a superfície descongela mais rápido que a porção central. Geralmente, excelentes resultados são obtidos ao se descongelarem palhetas em água quente (cerca de 50 a 60°C). Porém, o descongelamento em água com temperatura elevada pode chegar ao super aquecimento, que é letal aos espermatozoides. Deve-se então aquecer a palheta apenas o tempo suficiente para iniciar o descongelamento do conteúdo de modo que a temperatura da palheta continue a subir mesmo depois de ter sido

removida da água quente, completando, assim, o processo de descongelamento (Carolfeld & Harvey, 1999).

Existe uma variação entre a opinião de diversos autores a respeito do tempo e da temperatura da água para descongelar o sêmen estocado em palheta de 0,5 ml por meio de banho-maria. Lanhsteiner et al. (1997) descongelaram o sêmen de algumas espécies de peixes salmonídeos a 25°C por 30 segundos; Horvarth & Urbányi (2000) descongelaram sêmen de bagre-africano (*C. gariepinus*) a 40°C por 5 segundos; Murgas et al (2001) descongelaram o sêmen de piracanjuba (*B. orbignyanus*) a 60°C por 5 segundos.

### **3.9 Taxa de fertilização após o congelamento**

A qualidade espermática, em muitos casos, tem sido somente avaliada em termos de motilidade após descongelamento. Segundo Rana & MacAndrew (1989), a taxa de fertilização dos ovos é sem dúvida o mais apropriado e prático critério nos protocolos de avaliação para a criopreservação de espermatozóides.

Outros fatores como o número de espermatozóides por ovo, a duração do contato entre os gametas ou o protocolo de fertilização utilizado, podem também influenciar o sucesso da fertilização (Suquet et al., 1995; Chereguini et al., 1999). Na produção comercial, uma relação ótima espermatozóide:ovo tem sido recomendada; ao mesmo tempo, os trabalhos experimentais utilizam o sucesso da fertilização como um ponto final da qualidade espermática, sugerindo uma relação mínima espermatozóide:ovo (Suquet et al., 1995).

O excesso de espermatozóides para fertilização obviamente encobre a qualidade dos espermatozóides criopreservados, dificultando as comparações entre protocolos (Viveiros et al., 2000).

Algumas pesquisas têm sido realizadas com a criopreservação espermática de piracanjuba, tendo sido alcançados bons resultados após descongelamento, variando de 55 a 100% de motilidade após o descongelamento (Bedore, 1999; Murgas et al., 2001; Carolsfeld et al., 2003). Contudo, são necessários mais trabalhos com o objetivo de avaliar a capacidade de fertilização do sêmen pós-descongelamento.



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Procedência dos reprodutores e coleta do sêmen

O trabalho foi desenvolvido durante a piracema, nos meses de dezembro e janeiro de 2003/2004 e 2004/2005, quando foram utilizados machos de piracanjuba *Brycon orbignyianus* (800–1500 g) da Estação de Piscicultura da Companhia Energética de Minas Gerais (CEMIG). A estação está localizada às margens do rio Grande, bacia do Paraná Superior, na cidade de Itutinga, em Minas Gerais.

Os reprodutores foram capturados com rede de arrasto, em tanque de terra, sendo selecionados para doação de sêmen aqueles que possuíam a papila urogenital hiperêmica e que liberaram sêmen sob leve massagem abdominal. Após a captura, cada animal foi pesado, medido e submetido a tratamento com extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC) para induzir a espermiacção. A dose utilizada para os machos foi de 4 mg/kg de peso corporal. Após 5 horas foi coletado o sêmen, de acordo com o manejo da estação. Após limpar e enxugar a papila urogenital com toalha de papel, foram feitas massagens manuais na parede celomática, no sentido crânio-caudal, tomando cuidado para que não ocorresse contaminação do sêmen com fezes, urina, sangue ou água do tanque. O sêmen foi coletado em tubo de ensaio graduado e mantido em banho de gelo durante a execução dos procedimentos de coleta e experimentos.

## **4.2 Determinação da concentração espermática**

A concentração espermática foi estimada com o auxílio de uma câmara hematómica tipo Neubauer “Improved”. Uma alíquota de 1  $\mu$ L de sêmen foi diluída em 1000  $\mu$ L de solução de formol citrato (2,9 g de citrato de sódio, água destilada q.s.p. 100 mL, 4 mL solução comercial de formaldeído 35%; Maria et al., 2004a). Uma alíquota do sêmen diluído foi colocada na câmara hematómica e o valor obtido foi multiplicado pelo fator de correção 50.000, encontrando-se, assim, a quantidade de células por  $\text{mm}^3$ . A transformação em espermatozoides/mL foi realizada multiplicando-se os valores encontrados por  $10^3$ .

## **4.3 Experimento 1 – Resfriamento do sêmen de piracanjuba**

### **4.3.1 Experimento 1A – Avaliação de diluidores de sêmen**

O sêmen de três machos foi coletado individualmente em tubos de ensaio, cada amostra foi dividida em outros 6 tubos e diluído 1:4 (v:v); uma amostra foi mantida sem diluição (controle). Foram utilizados os seguintes diluidores:

- a) NaCl 200 mM (404 mOsm);
- b) Solução imobilizadora de Saad (NaCl 200 mM; Tris 30 mM; 429 mOsm; Linhart et al., 1993);
- c) Ginsburg fish Ringer (NaCl 123,2 mM; KCl 3,75 mM;  $\text{CaCl}_2$  3,0 mM;  $\text{NaHCO}_3$  2,65 mM; 214 mOsm; Viveiros et al., 2000);
- d) Solução fisiológica de NaCl 0,9% (154 mM; 285 mOsm);

- e) Água de coco Kero-coco<sup>®</sup> (cálcio 0,02%; sódio 0,02%; magnésio 0,01%; potássio 0,32%; fósforo 0,01%; carboidratos 5%; 321 mOsm);
- f) Kurokura (NaCl 128,4 mM; KCl 2,7 mM; CaCl<sub>2</sub> 1,4 mM; NaHCO<sub>3</sub> 2,4 mM; 240 mOsm; Kurokura et al., 1984).

A taxa de motilidade espermática foi subjetivamente avaliada após 0, 1, 10, 24 e 48 horas de resfriamento a 4°C.

A taxa de motilidade dos espermatozoides foi expressa em porcentagem de espermatozoides móveis em relação ao total observado em duas alíquotas por amostra por tempo de resfriamento.

A solução ativadora da motilidade espermática utilizada foi NaCl 50 mM (Bedore, 1999; Marques, 2001) na proporção de 1:5 (semê diluído: ativador).

A osmolaridade das soluções utilizadas no resfriamento foi medida através de um micro-osmomêtro avançado (modelo 3MO, Needham Hieghts, Massachussets) no Instituto de Ciência Animal da Universidade de Wageningen e Centro de Pesquisa (WUR), Wageningen, Holanda.

#### **4.3.2 Experimento 1B – Avaliação da adição de crioprotetores nos diluidores de sêmen.**

Os objetivos desse experimento foram: (a) avaliar o efeito de alguns crioprotetores na motilidade espermática durante o tempo de resfriamento a 4°C e (b) avaliar a toxicidade dessas substâncias para serem utilizadas no congelamento de sêmen. Os diluidores que proporcionaram, no experimento 1<sup>A</sup>, as maiores taxas de motilidade espermática, após 1 hora de resfriamento, foram

selecionados. Os crioprotetores internos dimetilsulfóxido (DMSO), metanol e metil glicol (éter metílico do etilenoglicol) foram adicionados aos diluidores na concentração de 10%. A diluição usada foi 1:4 (sêmen : diluidor + crioprotetor). A taxa de motilidade foi subjetivamente avaliada após 0, 1, 10, 24 e 48 horas de resfriamento a 4°C, seguindo-se a mesma metodologia descrita no experimento 1A.

#### **4.3.3 Experimento 1C – Avaliação da adição de antibiótico nos diluidores de sêmen**

O objetivo desse experimento foi testar as melhores soluções diluidoras encontradas no experimento 1A, em 24 horas de resfriamento, em combinação com o antibiótico sulfato de gentamicina (250 µg/ml). Testaram-se também dois diluidores usualmente utilizados no resfriamento do sêmen suíno (BTS<sup>®</sup> e M III<sup>®</sup>).

O sêmen de três machos de piracanjuba foi coletado separadamente em tubos de ensaio. O sêmen de cada macho foi dividido em outros 9 tubos, os quais receberam diluição de 1:9 (v:v); uma amostra foi mantida sem diluição (controle). Foram utilizados os seguintes diluidores:

- a) NaCl 200 mM;
- b) NaCl 200 mM-gentamicina;
- c) Saad;
- d) Saad-gentamicina;
- e) NaCl 0,9%;
- f) NaCl 0,9%-gentamicina;

- g) M III<sup>®</sup> 6% - Merck III (Em cada 100g do produto: glicose 89,2g; citrato de sódio 3,05g; EDTA 3,05g; sulfato de gentamicina 0,5g; NaHCO<sub>3</sub> 4,2g; 348 mOsm);
- h) BTS<sup>®</sup> 5% - Beltsville Thawing Solution (Em cada 100g do produto: glicose monohidratada 80g; citrato de sódio 12,70g; EDTA 2,65g; sulfato de gentamicina 0,50g; NaHCO<sub>3</sub> 2,65g; KCl 1,59g; 318 mOsm);
- i) BTS<sup>®</sup> 5% + KCl 0,16% (BTS-KCl; Murgas et al., 2002b).

A taxa de motilidade foi subjetivamente avaliada 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 dias após resfriamento a 4°C, seguindo a mesma metodologia do experimento 1A.

#### **4.4 Experimento 2 - Congelamento do sêmen de piracanjuba**

As soluções criodiluidoras (diluidor + crioprotetor) para o congelamento foram selecionadas a partir do experimento 1B, sendo utilizadas aquelas que obtiveram maiores taxas de motilidade (acima de 75%) após 1 hora de resfriamento a 4°C. Foram testados também dois diluidores usualmente utilizados para o resfriamento de sêmen suíno (BTS<sup>®</sup> e M III<sup>®</sup>). As soluções criodiluidoras foram acrescidas de 5% gema de ovo de galinha, de acordo com experimentos anteriores (Maria et al., 2004 b). A diluição final do sêmen foi 1:9 (sêmen: diluidor + crioprotetor interno 10% + gema de ovo 5%).

O sêmen (n=3 peixes; 3 palhetas/peixe) foi envasado em palhetas de 0,5 mL (Minitub do Brasil<sup>®</sup>), vedadas com esfera plástica, acondicionadas em raque (Figura 3A) e colocadas no botijão de vapor de nitrogênio líquido (Figura 3B) (Taylor-Warton, modelo CP 300, “dry shipper”) por um período de 24 horas.

Em seguida, as palhetas foram transferidas para o botijão de armazenamento. Após 3 horas no botijão de armazenamento, o sêmen foi descongelado em banho maria a 60°C por 8 segundos. A ativação espermática pós-descongelamento foi realizada com a solução NaCl 50 mM.

A temperatura interna do botijão de vapor de nitrogênio líquido foi medida através de um termômetro digital dentro de uma palheta de 0,5 mL vazia, a qual foi colocada dentro do botijão na mesma posição em que foram colocadas as palhetas preenchidas com sêmen diluído. Foi medido o tempo que a palheta levou para se estabilizar em -170°C, a partir da temperatura ambiente de aproximadamente 21°C.

#### **4.5 Experimento 3 – Capacidade de fertilização e taxa de sobrevivência dos espermatozoides após o congelamento**

Os ovócitos de uma fêmea de piracanjuba (1600 g de peso corporal) foram extraídos após aplicação de duas dosagens de extrato bruto de hipófise de carpa (0,5 e 5 mg/kg de peso corporal) com intervalo de 12 horas entre aplicações. Após 5 horas da última aplicação, os ovócitos foram coletados de acordo com o manejo da estação.

O sêmen de três machos de piracanjuba foi coletado separadamente em tubos de ensaio. O sêmen de cada macho foi dividido em outros 3 tubos, os quais receberam diluição de 1:9 (v:v) nas melhores soluções testadas no experimento 2 (NaCl 0,9% + gema de ovo; M III + gema de ovo e BTS, todos acrescidos de 10% de metil glicol). Foram envazadas 3 palhetas por macho em cada um dos tratamentos testados. Os procedimentos para o congelamento e descongelamento seguiram a metodologia descrita no experimento 2.

**Capacidade de fertilização:** após o descongelamento, o sêmen de cada palheta foi imediatamente rediluído em NaCl 0,9% numa concentração final de 1:19 (v/v). Como controle utilizou-se sêmen fresco diluído em NaCl 0,9% na proporção de 1:199. Uma alíquota de 100 µL de sêmen diluído foi misturada em 0,1 g de ovócito (aproximadamente 100 ovócitos). A fertilização foi iniciada pela adição de 10 mL de água dos aquários em que os peixes se encontravam, sendo misturados por um período de 2 min. Os ovos foram transferidos para incubadoras de cano de PVC teladas no fundo (Figura 4). A temperatura da água para incubação dos ovos foi de 26°C e a taxa de eclosão foi verificada após 16 h da fertilização, contando-se o número de larvas eclodidas e de ovos não-fertilizados.

A taxa de eclosão foi expressa por:

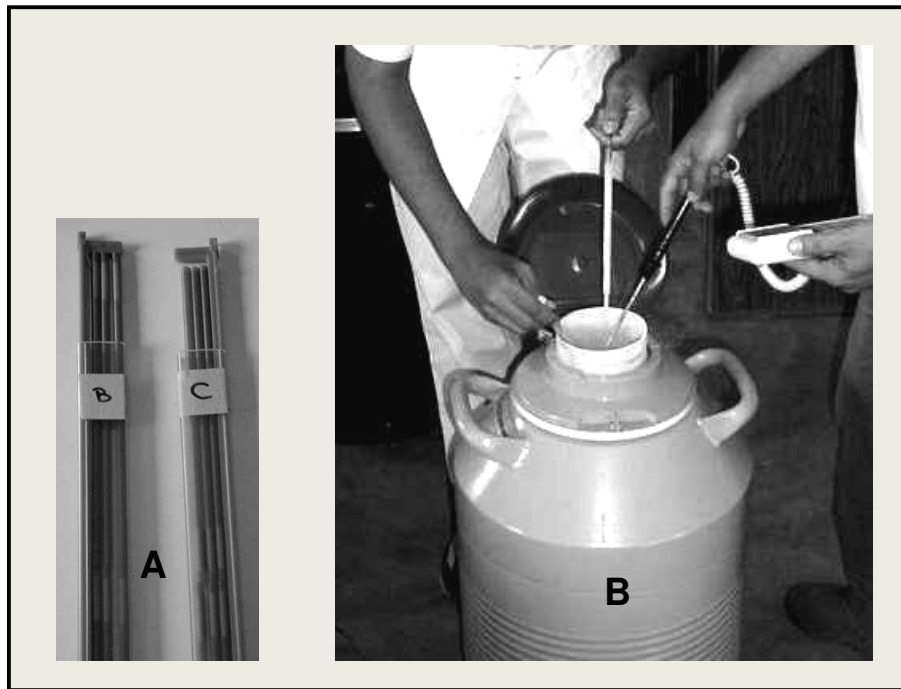
$$\frac{\text{número de larvas} \times 100}{\text{número de larvas} + \text{ovos}}$$

**Taxa de motilidade espermática:** A avaliação da motilidade espermática do sêmen fresco e do descongelado foi realizada segundo a metodologia descrita no experimento 1A.

**Taxa de sobrevivência dos espermatozoides:** A coloração diferencial dos espermatozoides foi realizada no pós-descongelamento do sêmen, durante a execução do experimento 3, objetivando avaliar a sobrevivência do material fecundante. A porcentagem de espermatozoides vivos obtidos pela coloração diferencial foi comparada com a estimativa percentual subjetiva da motilidade espermática. O teste estatístico utilizado foi o qui-quadrado ( $\chi^2$ ) ao nível de 5% de significância.

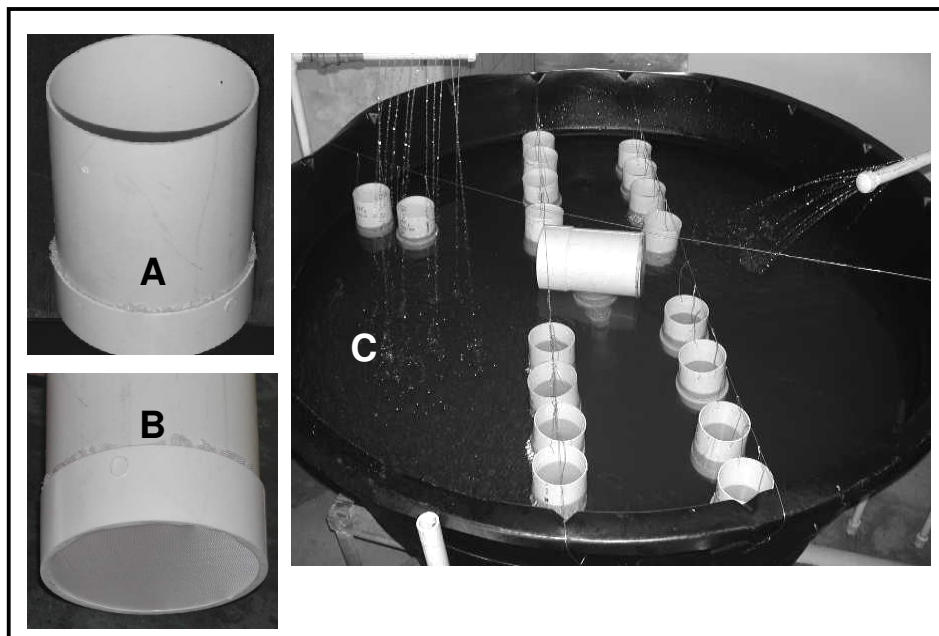
Em uma lâmina histológica foram colocadas, separadamente, uma gota de sêmen e duas gotas de uma solução eosina-nigrosina (eosina B a 5% e nigrosina à 10%).

O sêmen foi misturado aos corantes e, posteriormente, foi feito um esfregaço em lâmina de vidro, completando toda a operação no máximo em um minuto, como recomendado pelo método de Blom (Derivaux, 1961). O esfregaço foi seco sobre uma chama e a leitura realizada em microscópio óptico, em objetiva de imersão. Os espermatozoides mortos coravam-se de vermelho, enquanto os vivos permaneciam não corados. Em cada amostra foram contadas cerca de trezentas células entre vivas e mortas.



**FIGURA 3.** A. Tipo de raque utilizada; B. Aferição da temperatura do botijão de vapor de nitrogênio através de um termômetro digital para posterior resfriamento das palhetas.





**FIGURA 4.** A. Visão da parte superior da incubadora de PVC; B. Visão da parte inferior telada; C. Sistema de incubação dos ovos utilizado no teste de fertilização, abastecido com água na temperatura de 26°C.

#### 4.6 Análise estatística

Para os valores das taxas de motilidade espermática e eclosão dos ovos, o resíduo de cada modelo foi testado para distribuição normal. Os valores que não possuíram essa distribuição foram transformados em arc seno • % para sua normalização.

## **Experimento 1A e 1C – Análise dos diluidores espermáticos no processo de resfriamento.**

Estes experimentos foram conduzidos em um delineamento em blocos casualizados com parcelas subdivididas. Os tratamentos foram arranjados em um esquema fatorial 7 x 4 (sete diluidores e quatro períodos de estocagem), com diluidores na parcela e os períodos de resfriamento nas subparcelas. O bloco controla a variação entre o sêmen dos diferentes peixes. As médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

O modelo estatístico utilizado foi o seguinte:

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

em que:

(Exp. 1A  $i = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7; j = 1, 2, 3, 4; k = 1, 2, 3$ )

(Exp. 1B  $i = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10; j = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8; k = 1, 2, 3$ )

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

$\mu$  = média geral;

$D_i$  = efeito do diluidor  $i$ ;

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

$P_k$  = efeito do período de estocagem  $k$ ;

$B_j$  = efeito do bloco  $j$ ;

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

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

**Experimento 1B – Avaliação da toxicidade dos crioprotetores e seu uso no processo de resfriamento.**

Este experimento foi realizado em parcelas subdivididas. O delineamento utilizado foi o DBC. A parcela foi composta por um fatorial (5 X 4) e a suparcela, pelo período de estocagem (5) + tratamento adicional (sêmen não diluído). O uso do bloco serviu para controlar a variação entre sêmen dos diferentes peixes. As médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de significância.

O seguinte modelo estatístico foi utilizado:

$$y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \gamma_l + \beta_k + (\alpha\gamma)_{il} + \mu_a + \tau + D_{(il)k} + \lambda_j + (\lambda\alpha)_{ji} + (\lambda\gamma)_{jl} + (\lambda\alpha\gamma)_{jil} + (\lambda\tau)_j + E_{ijk}$$

em que:

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

$\mu$  = média geral;

$\alpha_i$  = efeito do diluidor  $i$ , com  $i = 1, 2, 3, 4, 5$ ;

$\gamma_l$  = efeito do crioprotetor  $l$ , com  $l = 1, 2, 3, 4$ ;

$\beta_k$  = efeito do bloco  $k$ , com  $k = 1, 2, 3$ ;

$(\alpha\gamma)_{il}$  = efeito da interação entre o diluidor  $i$  e o crioprotetor  $l$ , na parcela;

$\mu_a$  = média do tratamento adicional;

$\tau$  = efeito do tratamento adicional;

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

$\lambda_j$  = efeito do período de estocagem  $j$ , com  $j = 1, 2, 3, 4, 5$ ;

$(\lambda\alpha)_{ji}$  = efeito da interação entre o período de estocagem  $j$  e o diluidor  $i$ ;

$(\lambda\gamma)_{ji}$  = efeito da interação entre o período de estocagem j e o crioprotetor l;

$(\lambda\alpha\gamma)_{jil}$  = efeito da interação entre o período de estocagem j e o diluidor i associado ao crioprotetor l;

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

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

## Experimento 2 - Congelamento do sêmen

Para o teste de congelamento, o delineamento utilizado foi em blocos casualizado com tratamentos repetidos (DBCRD), com três blocos e três repetições por bloco. O uso do bloco serviu para controlar a variação entre sêmen de diferentes peixes. As médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

O modelo estatístico utilizado foi:

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

em que:

$y_{ij}$  = taxa de motilidade espermática do sêmen que recebeu a solução crioprotetora i repetido k vezes no bloco j, k = 1, 2, 3;

$\mu$  = média geral do experimento;

$T_i$  = efeito da solução crioprotetora i, com i = 1, 2, 3, ..., 22;

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

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

$e_{ij}$  = erro associado à taxa de motilidade espermática do sêmen do peixe que recebeu a solução crioprotetora i repetido k vezes no bloco j.

### **Experimento 3 – Capacidade de fertilização do sêmen congelado**

Utilizou-se um delineamento em blocos casualizado com tratamentos repetidos (DBCRD), com três blocos e três repetições por bloco. O uso do bloco serviu para controlar a variação entre sêmen de diferentes peixes. As médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

O modelo estatístico utilizado foi:

$$y_{ijk} = \mu + T_i + B_j + e_{(ijk)}$$

em que:

$y_{ijk}$  = taxa de eclosão dos ovos que receberam o sêmen congelado na solução crioprotetora  $i$  repetido  $k$  vezes no bloco  $j$ ,  $k = 1, 2, 3$ ;

$\mu$  = média geral do experimento;

$T_i$  = efeito da solução crioprotetora  $i$ , com  $i = 1, 2, 3, \dots, 22$ ;

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

$e_{ijk}$  = erro associado à taxa de eclosão dos ovos que receberam o sêmen congelado na solução crioprotetora  $i$  repetido  $k$  vezes no bloco  $j$ .

## **5 RESULTADOS**

### **5.1 Concentração espermática**

A concentração espermática nos 18 machos utilizados nos experimentos encontra-se mais detalhada no Anexo 1. Foi observado o valor médio de  $5,31 \times 10^9$  (d.p.  $2,44 \times 10^9$ ; extendendo-se de 2,8 a  $10,7 \times 10^9$ ) espermatozóides por mL.

### **5.2 Experimento 1 – Resfriamento do sêmen de piracanjuba**

#### **5.2.1 Experimento 1A – Avaliação de diluidores de sêmen**

No experimento 1A, todos os diluidores testados foram capazes de manter a viabilidade das células espermáticas imediatamente após diluição, produzindo altas taxas de motilidade após ativação (Tabela 1). Após 1 h de resfriamento, o sêmen diluído em todos diluidores com exceção do Fish Ringer, mantiveram uma boa taxa de motilidade, acima de 80%. O sêmen diluído nas soluções NaCl 0,9%, NaCl 200 mM e Saad mantiveram taxas de motilidade espermática significativamente semelhantes no período compreendido entre o início (0 h) e 10 h de resfriamento. Até 24 h, o sêmen diluído em solução de NaCl 0,9%, NaCl 200mM e Saad produziram taxas de motilidade maiores ( $P < 0,05$ ) que o sêmen não diluído. Entre 24 e 48 h ocorreu uma redução marcante na motilidade espermática. Após 48 h o sêmen diluído em NaCl 200

mM e Saad (13 e 17%, respectivamente) apresentaram baixas taxas de motilidade espermática, sendo semelhantes ao sêmen não diluído (12%).

TABELA 1. Porcentagem de motilidade espermática do sêmen de piracanjuba (média  $\pm$  d.p.; n= 3 peixes) após resfriamento do sêmen por 48 horas à 4°C em diferentes soluções diluidoras (proporção sêmen:diluidor 1:4).

Diluidor	Período de resfriamento à 4°C (h)				
	0 h	1 h	10 h	24 h	48h
NaCl 0,9%	100 $\pm$ 0 <sup>aA</sup>	100 $\pm$ 0 <sup>aA</sup>	97 $\pm$ 3 <sup>aA</sup>	57 $\pm$ 15 <sup>bB</sup>	0 <sup>bC</sup>
Kurokura	100 $\pm$ 0 <sup>aA</sup>	88 $\pm$ 13 <sup>aA</sup>	73 $\pm$ 15 <sup>bB</sup>	23 $\pm$ 15 <sup>cC</sup>	0 <sup>bD</sup>
Água de Coco	90 $\pm$ 10 <sup>aA</sup>	83 $\pm$ 15 <sup>aA</sup>	17 $\pm$ 11 <sup>dB</sup>	8 $\pm$ 6 <sup>dC</sup>	0 <sup>bC</sup>
NaCl 200 mM	97 $\pm$ 3 <sup>aA</sup>	92 $\pm$ 6 <sup>aA</sup>	92 $\pm$ 3 <sup>aA</sup>	53 $\pm$ 15 <sup>bB</sup>	13 $\pm$ 6 <sup>aC</sup>
Fish Ringer	87 $\pm$ 6 <sup>aA</sup>	63 $\pm$ 11 <sup>bB</sup>	63 $\pm$ 11 <sup>bB</sup>	20 $\pm$ 10 <sup>cC</sup>	0 <sup>bD</sup>
Saad	100 $\pm$ 0 <sup>aA</sup>	92 $\pm$ 6 <sup>aA</sup>	90 $\pm$ 9 <sup>aA</sup>	80 $\pm$ 10 <sup>aB</sup>	17 $\pm$ 6 <sup>aC</sup>
Sêmen não diluído	100 $\pm$ 0 <sup>aA</sup>	83 $\pm$ 6 <sup>aB</sup>	53 $\pm$ 11 <sup>cC</sup>	33 $\pm$ 21 <sup>dD</sup>	12 $\pm$ 8 <sup>aE</sup>

<sup>aA</sup> Médias com a mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott (P<0,05).

### 5.2.2 Experimento 1B – Avaliação da adição de crioprotetores nos diluidores de sêmen.

A interação entre diluidores e crioprotetores em cada tempo avaliado foi significativa (P<0,05). Os crioprotetores apresentaram um efeito diferenciado em cada diluidor testado (Tabela 2).

TABELA 2. Porcentagem de motilidade espermática do sêmen de piracanjuba (média  $\pm$  d.p.; n= 3 peixes) após resfriamento por 48 horas à 4°C em diferentes diluidores acrescidos de crioprotetores à 10%.

Diluidor	Crioprotetor	Período de resfriamento à 4°C				
		0 h	1 h	10 h	24 h	48h
NaCl 0,9 %	DMSO	97 $\pm$ 3 <sup>aA</sup>	97 $\pm$ 3 <sup>aA</sup>	85 $\pm$ 13 <sup>aB</sup>	77 $\pm$ 6 <sup>aB</sup>	30 $\pm$ 20 <sup>aC</sup>
	Metanol	98 $\pm$ 2 <sup>aA</sup>	97 $\pm$ 3 <sup>aA</sup>	87 $\pm$ 8 <sup>aA</sup>	37 $\pm$ 11 <sup>cB</sup>	0 <sup>bC</sup>
	Metil glicol	98 $\pm$ 2 <sup>aA</sup>	98 $\pm$ 2 <sup>aA</sup>	92 $\pm$ 6 <sup>aA</sup>	43 $\pm$ 11 <sup>cB</sup>	23 $\pm$ 15 <sup>aC</sup>
	Ausente	100 $\pm$ 0 <sup>aA</sup>	100 $\pm$ 0 <sup>aA</sup>	93 $\pm$ 3 <sup>aA</sup>	60 $\pm$ 10 <sup>bB</sup>	0 <sup>bC</sup>
NaCl 200 mM	DMSO	88 $\pm$ 3 <sup>aA</sup>	85 $\pm$ 5 <sup>aA</sup>	77 $\pm$ 6 <sup>bA</sup>	27 $\pm$ 15 <sup>dB</sup>	0 <sup>bC</sup>
	Metanol	57 $\pm$ 15 <sup>dA</sup>	55 $\pm$ 23 <sup>cA</sup>	33 $\pm$ 25 <sup>dB</sup>	0 <sup>eC</sup>	0 <sup>bC</sup>
	Metil glicol	90 $\pm$ 5 <sup>aA</sup>	85 $\pm$ 10 <sup>aA</sup>	73 $\pm$ 15 <sup>bB</sup>	20 $\pm$ 10 <sup>dC</sup>	0 <sup>bD</sup>
	Ausente	100 $\pm$ 0 <sup>aA</sup>	100 $\pm$ 0 <sup>aA</sup>	92 $\pm$ 3 <sup>aA</sup>	67 $\pm$ 6 <sup>aB</sup>	17 $\pm$ 15 <sup>aC</sup>
Saad	DMSO	83 $\pm$ 6 <sup>bA</sup>	78 $\pm$ 8 <sup>bA</sup>	75 $\pm$ 13 <sup>bA</sup>	17 $\pm$ 15 <sup>dB</sup>	0 <sup>bC</sup>
	Metanol	85 $\pm$ 13 <sup>bA</sup>	80 $\pm$ 20 <sup>bA</sup>	67 $\pm$ 21 <sup>cB</sup>	27 $\pm$ 15 <sup>dC</sup>	13 $\pm$ 6 <sup>aD</sup>
	Metil glicol	95 $\pm$ 5 <sup>aA</sup>	97 $\pm$ 3 <sup>aA</sup>	87 $\pm$ 6 <sup>aA</sup>	13 $\pm$ 13 <sup>dB</sup>	10 $\pm$ 10 <sup>aB</sup>
	Ausente	100 $\pm$ 0 <sup>aA</sup>	100 $\pm$ 0 <sup>aA</sup>	93 $\pm$ 3 <sup>aA</sup>	82 $\pm$ 3 <sup>aB</sup>	17 $\pm$ 11 <sup>aC</sup>
Água de coco	DMSO	82 $\pm$ 10 <sup>bA</sup>	82 $\pm$ 10 <sup>bA</sup>	4 $\pm$ 5 <sup>eB</sup>	0 <sup>eB</sup>	0 <sup>bB</sup>
	Metanol	0 <sup>fA</sup>	0 <sup>dA</sup>	0 <sup>eA</sup>	0 <sup>eA</sup>	0 <sup>bA</sup>
	Metil glicol	40 $\pm$ 10 <sup>eA</sup>	13 $\pm$ 6 <sup>dB</sup>	10 $\pm$ 10 <sup>eB</sup>	7 $\pm$ 6 <sup>eB</sup>	0 <sup>bB</sup>
	Ausente	95 $\pm$ 0 <sup>aA</sup>	88 $\pm$ 3 <sup>aA</sup>	43 $\pm$ 21 <sup>dB</sup>	0 <sup>eC</sup>	0 <sup>bC</sup>
Kurokura	DMSO	73 $\pm$ 6 <sup>cA</sup>	77 $\pm$ 6 <sup>bA</sup>	72 $\pm$ 19 <sup>bA</sup>	57 $\pm$ 6 <sup>bB</sup>	10 $\pm$ 10 <sup>aC</sup>
	Metanol	65 $\pm$ 9 <sup>cA</sup>	63 $\pm$ 6 <sup>cA</sup>	63 $\pm$ 15 <sup>cA</sup>	50 $\pm$ 10 <sup>bB</sup>	0 <sup>bC</sup>
	Metil glicol	68 $\pm$ 3 <sup>cA</sup>	62 $\pm$ 3 <sup>cA</sup>	57 $\pm$ 15 <sup>cA</sup>	27 $\pm$ 21 <sup>dB</sup>	0 <sup>bC</sup>
	Ausente	100 $\pm$ 0 <sup>aA</sup>	100 $\pm$ 0 <sup>aA</sup>	77 $\pm$ 10 <sup>bB</sup>	45 $\pm$ 9 <sup>cC</sup>	0 <sup>bD</sup>
Sêmen não diluído		100 $\pm$ 0 <sup>aA</sup>	100 $\pm$ 0 <sup>aA</sup>	78 $\pm$ 10 <sup>bB</sup>	53 $\pm$ 6 <sup>bC</sup>	17 $\pm$ 6 <sup>aD</sup>

<sup>aA</sup> Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (P<0,05). Saad (NaCl 200 mM; Tris 30 mM); Kurokura (NaCl 128,4 mM; KCl 2,7 mM; CaCl<sub>2</sub> 1,4 mM; NaHCO<sub>3</sub> 2,4 mM); DMSO = dimetilsulfóxido.

O sêmen diluído em NaCl 0,9% com ou sem crioprotetor no período compreendido entre o início (0 h) e 10 h de resfriamento, não apresentou uma queda significativa na motilidade espermática. Até 24 h de resfriamento, o



DMSO adicionado ao diluidor manteve a motilidade espermática mais alta em relação ao NaCl 0,9% sem crioprotetor e ao sêmen não diluído. O sêmen não diluído, após 48 h de resfriamento, apresentou motilidade espermática baixa (17%), semelhante ao sêmen diluído acrescido de DMSO (30%) e metil glicol (23%).

O diluidor NaCl 200 mM + metanol reduziu significativamente a motilidade espermática em todos os períodos observados, em relação ao sêmen diluído nos outros crioprotetores. Após 10 e 24 h de resfriamento, apenas o sêmen diluído em NaCl 200 mM sem crioprotetor proporcionou uma taxa de motilidade espermática superior ao sêmen não diluído. Esse diluidor, acrescido de qualquer um dos crioprotetores testados, proporcionou uma queda acentuada na motilidade espermática após 24 h. Após 48 h de resfriamento apenas o sêmen diluído em NaCl 200 mM sem crioprotetor apresentou alguma motilidade espermática (17%) semelhante ao sêmen não diluído.

O sêmen diluído na solução de Saad e Saad + metil glicol até 10 h de resfriamento apresentaram alta motilidade espermática, apresentado-se superior ao sêmen não diluído. Até 24 h de resfriamento, somente o sêmen diluído na solução de Saad sem crioprotetor mostrou-se superior ao sêmen não diluído. Todos os crioprotetores adicionados a este diluidor, reduziram a motilidade espermática neste período. Após 48 h de resfriamento, a motilidade espermática do sêmen não diluído foi semelhante à do sêmen diluído em Saad, Saad + metil glicol e Saad + metanol.

A água de coco em combinação com todos os crioprotetores reduziu significativamente ( $P < 0,05$ ) a motilidade espermática imediatamente após a diluição em relação ao sêmen diluído na água de coco. Até 1 h de resfriamento, o sêmen diluído na água de coco sem crioprotetor ou acrescido de DMSO teve uma queda na motilidade espermática em relação ao sêmen não diluído, mas ainda acima de 80%. Após este período a queda na motilidade espermática foi acentuada tanto na ausência quanto na presença de crioprotetor.

A solução Kurokura acrescida com os crioprotetores, reduziu significativamente ( $P < 0,05$ ) a motilidade espermática imediatamente após a diluição (0 h). Até 10 h de resfriamento, o sêmen diluído em Kurokura ou Kurokura + DMSO apresentaram motilidade espermática semelhante ao sêmen não diluído. Até 24 h de resfriamento, o sêmen diluído em Kurokura acrescido de DMSO ou metanol foi semelhante ao sêmen não diluído. Após 48 h de resfriamento, o sêmen diluído em Kurokura acrescido de DMSO apresentou taxa de motilidade espermática estatisticamente semelhante ao sêmen não diluído.

### **5.2.3 Experimento 1C – Adição de antibiótico aos diluidores de sêmen**

Os diluidores que proporcionaram as maiores taxas de motilidade após 24 h de estocagem, testados no experimento 1A (NaCl 0,9%, NaCl 200 mM e Saad), foram selecionados para este experimento, juntamente com as soluções BTS acrescido ou não de KCl e M III. Os diluidores NaCl 200 mM e Saad mostraram-se eficientes na preservação da motilidade espermática até 7 dias de resfriamento a 4°C, adicionados ou não de gentamicina (Tabela 3). As soluções BTS, BTS-KCl e M III preservaram a motilidade espermática por um período menor, de 5 dias. A solução NaCl 0,9% acrescida ou não de gentamicina preservou o sêmen por apenas 2 dias, proporcionando baixas taxas de motilidade nesse período. O sêmen não diluído também apresentou uma queda brusca em sua motilidade, reduzindo de 97 para 33% entre o início do resfriamento (dia 0) e o 1º dia de estocagem.

TABELA 3. Porcentagem de motilidade espermática do sêmen (média  $\pm$  desvio padrão; n=3) de piracanjuba, diluído em soluções acrescidas de sulfato de gentamicina e resfriadas à 4°C por 7 dias (proporção sêmen:diluidor 1:9).

Diluidor	Gentamicina $\mu$ g/mL	Período de Resfriamento à 4°C (dias)							
		0	1	2	3	4	5	6	7
NaCl 0,9%	0	93 $\pm$ 6 <sup>a</sup>	77 $\pm$ 11 <sup>b</sup>	5 $\pm$ 0 <sup>e</sup>	0 <sup>e</sup>	0 <sup>e</sup>	0 <sup>e</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
NaCl 0,9%	250	93 $\pm$ 6 <sup>a</sup>	77 $\pm$ 11 <sup>b</sup>	12 $\pm$ 8 <sup>e</sup>	0 <sup>e</sup>	0 <sup>e</sup>	0 <sup>e</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
NaCl 200 mM	0	95 $\pm$ 5 <sup>a</sup>	73 $\pm$ 6 <sup>b</sup>	70 $\pm$ 10 <sup>b</sup>	63 $\pm$ 6 <sup>b</sup>	43 $\pm$ 6 <sup>c</sup>	40 $\pm$ 10 <sup>c</sup>	37 $\pm$ 6 <sup>a</sup>	37 $\pm$ 6 <sup>a</sup>
NaCl 200 mM	250	95 $\pm$ 5 <sup>a</sup>	73 $\pm$ 11 <sup>b</sup>	70 $\pm$ 10 <sup>b</sup>	67 $\pm$ 6 <sup>b</sup>	57 $\pm$ 6 <sup>b</sup>	50 $\pm$ 10 <sup>b</sup>	40 $\pm$ 10 <sup>a</sup>	37 $\pm$ 11 <sup>a</sup>
Saad	0	97 $\pm$ 3 <sup>a</sup>	90 $\pm$ 5 <sup>a</sup>	87 $\pm$ 3 <sup>a</sup>	80 $\pm$ 10 <sup>a</sup>	63 $\pm$ 6 <sup>b</sup>	63 $\pm$ 6 <sup>a</sup>	50 $\pm$ 10 <sup>a</sup>	40 $\pm$ 10 <sup>a</sup>
Saad	250	97 $\pm$ 3 <sup>a</sup>	88 $\pm$ 8 <sup>a</sup>	85 $\pm$ 9 <sup>a</sup>	80 $\pm$ 10 <sup>a</sup>	77 $\pm$ 6 <sup>a</sup>	67 $\pm$ 6 <sup>a</sup>	40 $\pm$ 10 <sup>a</sup>	37 $\pm$ 11 <sup>a</sup>
BTS®	250	97 $\pm$ 3 <sup>a</sup>	83 $\pm$ 6 <sup>a</sup>	63 $\pm$ 6 <sup>b</sup>	43 $\pm$ 6 <sup>c</sup>	37 $\pm$ 11 <sup>c</sup>	27 $\pm$ 6 <sup>c</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
BTS® + KCl	250	97 $\pm$ 3 <sup>a</sup>	70 $\pm$ 10 <sup>b</sup>	50 $\pm$ 0 <sup>c</sup>	47 $\pm$ 6 <sup>c</sup>	47 $\pm$ 6 <sup>c</sup>	10 $\pm$ 0 <sup>d</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
M III®	300	90 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	80 $\pm$ 0 <sup>b</sup>	60 $\pm$ 0 <sup>b</sup>	47 $\pm$ 11 <sup>c</sup>	17 $\pm$ 11 <sup>d</sup>	5 $\pm$ 5 <sup>d</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
Sêmen não diluído	0	97 $\pm$ 3 <sup>a</sup>	33 $\pm$ 6 <sup>c</sup>	20 $\pm$ 10 <sup>d</sup>	7 $\pm$ 6 <sup>d</sup>	0 <sup>e</sup>	0 <sup>e</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>

<sup>a A</sup> Médias seguidas da mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste scott-Knott p<0,05. As fórmulas do BTS e M III encontram-se descritas no item material e métodos.

### **5.3 Experimento 2-Congelamento do sêmen de piracanjuba**

O botijão de vapor de nitrogênio líquido usado para o congelamento das amostras de sêmen nesse experimento estabilizou-se a uma temperatura de  $-170^{\circ}\text{C}$  em um período de 329 segundos, gerando uma velocidade de congelamento de  $-35,6^{\circ}\text{C min}^{-1}$  entre  $21$  e  $-170^{\circ}\text{C}$  (Anexo 2).

As amostras de sêmen diluídas em NaCl 0,9%, M III e BTS combinado com o crioprotetor metil glicol apresentaram as maiores taxas de motilidade espermática pós-descongelamento (Tabela 4), em comparação com o sêmen diluído nesses mesmos diluidores, acrescidos de DMSO ou metanol.

A adição de gema de ovo ao diluidor M III acrescido de DMSO, metanol ou metil glicol proporcionou uma melhoria na motilidade espermática pós-descongelamento em relação à não adição da gema de ovo, nos mesmos criodiluidores testados. Já no diluidor BTS a adição de gema de ovo proporcionou uma melhoria na motilidade espermática pós-descongelamento quando combinado com DMSO ou metanol, mas não com metil glicol.

TABELA 4. Porcentagem de motilidade espermática do sêmen de piracanjuba (média  $\pm$  desvio padrão; n=3 peixes; 3 palhetas/peixe) após o descongelamento.

Diluidor	Crioprotetor 10%	Gema de ovo (%)	Motilidade (%)
Água de coco	DMSO	5	10 $\pm$ 8 <sup>f</sup>
	DMSO	5	8 $\pm$ 2 <sup>f</sup>
NaCl 0,9%	Metanol	5	7 $\pm$ 4 <sup>f</sup>
	Metil glicol	5	66 $\pm$ 9 <sup>a</sup>
Kurokura	DMSO	5	5 $\pm$ 4 <sup>g</sup>
Saad	DMSO	5	33 $\pm$ 7 <sup>c</sup>
	Metanol	5	4 $\pm$ 4 <sup>g</sup>
	Metil glicol	5	26 $\pm$ 5 <sup>d</sup>
NaCl 200mM	DMSO	5	16 $\pm$ 5 <sup>e</sup>
	Metil glicol	5	44 $\pm$ 5 <sup>b</sup>
M III <sup>®</sup>	DMSO	0	0 $\pm$ 0 <sup>h</sup>
	Metanol	0	4 $\pm$ 4 <sup>g</sup>
	Metil glicol	0	10 $\pm$ 8 <sup>f</sup>
	DMSO	5	23 $\pm$ 5 <sup>d</sup>
	Metanol	5	34 $\pm$ 12 <sup>c</sup>
	Metil glicol	5	60 $\pm$ 10 <sup>a</sup>
BTS <sup>®</sup>	DMSO	0	0 $\pm$ 0 <sup>h</sup>
	Metanol	0	21 $\pm$ 8 <sup>e</sup>
	Metil glicol	0	70 $\pm$ 12 <sup>a</sup>
	DMSO	5	11 $\pm$ 3 <sup>f</sup>
	Metanol	5	48 $\pm$ 8 <sup>b</sup>
	Metil glicol	5	47 $\pm$ 9 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott (P<0,05).

#### 5.4 Experimento 3 - Taxa de sobrevivência e capacidade de fertilização dos espermatozóides após o congelamento

A taxa de sobrevivência dos espermatozóides (% de espermatozóides vivos) obtida pelo método da coloração diferencial foi originada do sêmen utilizado na fertilização (Experimento 3). O teste de qui-quadrado revelou que não há diferenças significativas entre o método subjetivo de avaliação da motilidade espermática e o método objetivo obtido pela coloração diferencial dos espermatozóides (porcentagem de espermatozóides vivos - Anexo 3). O sêmen foi preservado eficientemente em todos os criodiluidores testados, apresentando uma elevada taxa de sobrevivência dos espermatozóides (Figura 5) após o descongelamento (70, 66 e 62% nos diluidores M III, BTS e NaCl 0,9%, respectivamente). O sêmen fresco apresentou 84% de espermatozóides vivos.

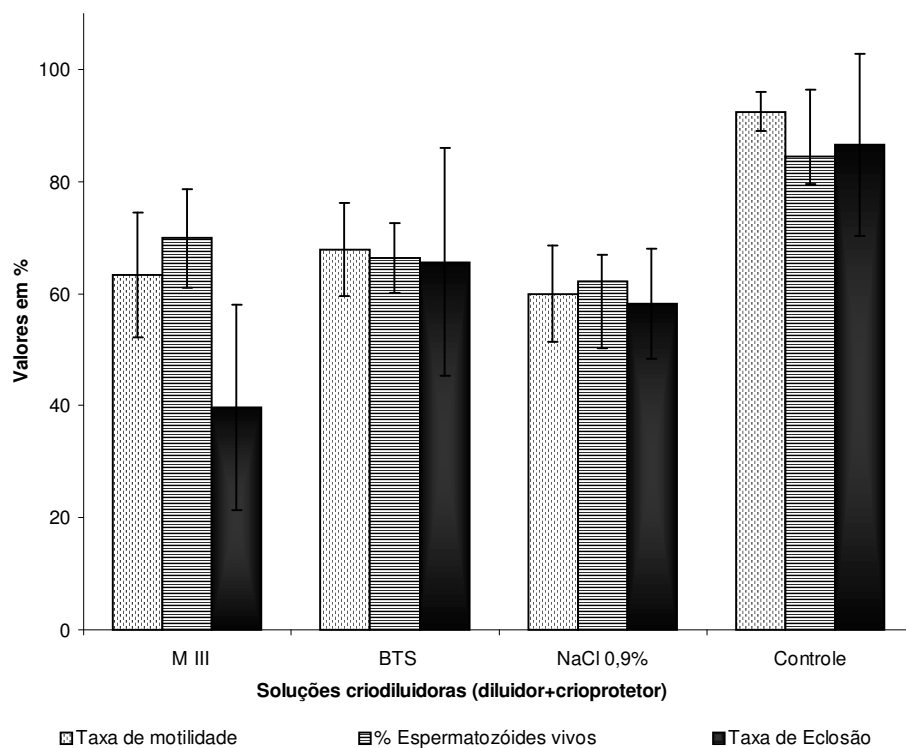
TABELA 5. Taxa de eclosão (média  $\pm$  desvio; n=3; 3 repetições/peixe) de ovos fertilizados com sêmen congelado em soluções contendo metil glicol 10% como crioprotetor e descongelado a 60°C por 8 segundos.

Diluidor	Gema de ovo (%)	Taxa de eclosão (%)
Sêmen fresco	-	86 $\pm$ 16 <sup>a</sup>
NaCl 0,9%	5	58 $\pm$ 10 <sup>b</sup>
BTS	0	66 $\pm$ 20 <sup>b</sup>
M III	5	40 $\pm$ 18 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott (P<0,05).

A partir do valor médio da concentração espermática encontrado no sêmen dos peixes utilizados no experimento 3, estimou-se o número de espermatozóides utilizados na fertilização dos ovócitos, que foi de 46 x 10<sup>5</sup>

espermatozoides por ovócito com o sêmen congelado e  $4,6 \times 10^5$  com o sêmen fresco. A capacidade de fertilização dos espermatozoides após o descongelamento foi mantida. O sêmen congelado em NaCl 0,9% + metil glicol + gema de ovo ou em BTS e metil glicol proporcionaram taxas de eclosão dos ovos de 58 e 66 %, respectivamente (Tabela 5). A taxa de eclosão dos ovos fertilizados com sêmen fresco foi superior ao sêmen congelado ( $P < 0,05$ ).



**FIGURA 5.** Taxa de motilidade espermática, porcentagem de espermatozoides vivos obtidos pela coloração diferencial e a taxa de eclosão dos ovos fertilizados com espermatozoides descongelados.

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 Resfriamento do sêmen

Os espermatozoides de peixes teleósteos podem ser armazenados com sucesso no estado líquido sob refrigeração por curtos períodos de tempo. No presente estudo, a motilidade dos espermatozoides variou com o diluidor e a taxa de diluição utilizada (experimentos 1A e 1C). O sêmen diluído na relação 1:4 manteve uma boa motilidade espermática até 24 h de resfriamento quando a taxa de diluição aumentou para 1:9; o período de sobrevivência dos espermatozoides aumentou para 7 dias de resfriamento a 4°C.

As soluções salinas (Experimento 1A) que se destacaram na preservação do sêmen de piracanjuba foram as soluções de Saad, seguidas de NaCl 200 mM e NaCl 0,9%. O sêmen não diluído, após 24 h, apresentou uma taxa de motilidade inferior ao sêmen diluído, evidenciando a necessidade do uso de diluidores no sêmen de piracanjuba, quando armazenado por períodos iguais ou superiores a 24 h. A solução de Saad é comumente utilizada como solução imobilizadora da motilidade espermática do bagre Europeu (*Clarias gariepinus*), superando as propriedades ativadoras proporcionada pela contaminação com água ou urina durante a coleta de sêmen (Linhart et al., 1993). Na piracanjuba, a solução de Saad demonstrou ser um eficiente diluidor, mantendo uma elevada taxa de motilidade após 24 h de resfriamento a 4°C. Assim, alguns diluidores utilizados para espécies comumente cultivadas na Europa podem ser utilizados com sucesso em espécies brasileiras. Algumas soluções como Kurokura, usado como diluidor de sêmen de carpa (Kurokura et al., 1984), e Ginsburg fish Ringer, usado como diluidor de sêmen de bagre africano (Viveiros et al., 2000), foram testadas como diluidores de sêmen em uma espécie brasileira. O sêmen de



piáu-açu, *Leporinus macrocephalus*, foi resfriado nessas soluções e produziu taxas de motilidade espermática de 33 e 44%, respectivamente após 48 h de resfriamento, valores superiores ao sêmen não diluído (2%; Moraes, 2004).

A queda acentuada na motilidade espermática observada entre 24 e 48 h de resfriamento (experimento 1A) pode ter ocorrido devido a diversos fatores, como contaminação bacteriana do sêmen devido ao método de coleta, deficiência na oxigenação do meio ou alta taxa de diluição espermática. O método de coleta do sêmen através da massagem abdominal produz uma alta taxa de contaminação bacteriana devido ao contato do sêmen com o muco externo do peixe. O prolongamento das condições de estocagem no resfriamento pode afetar principalmente a qualidade do sêmen, devido às condições anaeróbicas e associadas a contaminações microbianas (Rurangwa et al., 2004).

Os diluidores BTS e M III, rotineiramente utilizados no resfriamento de sêmen suíno, mostraram-se eficientes na preservação do sêmen de piracanjuba até 5 dias a 4°C, quando diluído numa relação 1:9 (Experimento 1C). A concentração de gentamicina adicionada nas soluções salinas (Saad, NaCl 200 mM e NaCl 0,9%) foi semelhante à existente nos diluidores BTS e M III. A adição de gentamicina nas soluções salinas não melhorou a taxa de motilidade espermática até 7 dias de resfriamento possivelmente devido à baixa dosagem (250 µg/mL), ao tipo de antibiótico utilizado, ou ainda à falta de associação com outros antibióticos ou antimicóticos. Talvez, doses mais altas de gentamicina possam diminuir o crescimento bacteriano e manter alta a motilidade espermática do sêmen de piracanjuba durante o resfriamento por mais tempo. A adição de antibióticos aos diluidores utilizados no armazenamento do sêmen sob refrigeração deve ter uma concentração apropriada, prevenindo o crescimento bacteriano. Em tilápia (*Oreochromis niloticus*), altas concentrações de gentamicina (750 µg/ml) e de ampicilina (>250 µg/ml) reduziram

significativamente a viabilidade espermática e a função mitocondrial (Segovia et al., 2000).

O sêmen de piracanjuba foi anteriormente preservado no BTS na diluição 1:3, apresentando uma boa viabilidade até 6 dias de resfriamento a 4°C. Entretanto, foi observado um efeito pré-ativador do BTS sobre a motilidade espermática, tornando-se necessária a adição de solutos como o KCl para aumentar a osmolaridade do meio e manter o estado de imotilidade espermática, característica do sêmen de peixes (Murgas et al., 2002 b). Já nesse trabalho, não foi observado o efeito pré-ativador do BTS sobre a motilidade espermática. Quando o sêmen diluído em BTS foi posteriormente ativado, as taxas de motilidade espermática foram superiores em relação às amostras diluídas em BTS-KCl (10%), após 5 dias de resfriamento (27%).

O sêmen diluído tanto em BTS quanto em M III, a partir do primeiro dia de armazenamento, precipitava e aglutinava no fundo do tubo de ensaio, formando uma massa de espermatozoides coagulada. Moraes (2004) observou que as amostras de sêmen de piau-açú diluídas em NaHCO<sub>3</sub> 150 mM e 200 mM também apresentaram este aspecto coagulado após 12 h de resfriamento entre 5 e 8°C. O BTS e o M III possuem uma concentração de NaHCO<sub>3</sub> de 15,8 e 30 mM, respectivamente, podendo ser responsáveis por essa coagulação. Por outro lado, o sêmen diluído em Ginsburg fish Ringer e Kurokura que também possuem NaHCO<sub>3</sub> em suas fórmulas mas em menor concentração (2,65 e 2,4 mM, respectivamente) não apresentaram esse aspecto coagulado.

A adição de crioprotetores nos diluidores de sêmen durante o resfriamento (Experimento 1B) não promoveu uma melhoria na motilidade espermática em relação às amostras diluídas não acrescidas de crioprotetores. As únicas exceções foram as amostras diluídas em NaCl 0,9% + DMSO, que apresentaram maior taxa de motilidade até 24 h de resfriamento em relação às amostras diluídas apenas em NaCl 0,9%. Entretanto, as amostras de sêmen diluídas em Saad e NaCl 200 mM sem crioprotetor, apresentaram taxa de

motilidade semelhante às amostras diluídas em NaCl 0,9% acrescidas de DMSO, indicando não ser necessário o acréscimo de crioprotetores no processo de resfriamento quando as soluções de Saad ou NaCl 200 mM são usadas como diluidores. Resultados semelhantes foram observados no sêmen de piau-açu diluído em Kurokura e NaCl 200 mM. A adição dos crioprotetores metanol ou metil glicol não melhorou as taxas de motilidade espermática após 48 h de resfriamento em relação às amostras diluídas nos mesmos diluidores, porém sem acréscimo dos crioprotetores (Moraes, 2004).

A toxicidade proveniente da combinação entre os diluidores e os crioprotetores e a consequente escolha do crioprotetor para uso no congelamento do sêmen foram verificadas após uma hora de armazenamento a 4°C, período suficiente para manipulação. O tempo necessário para que o crioprotetor penetre nas células espermáticas, chamado de tempo de equilíbrio, é muito variado. Em bagre africano foi observado que longo tempo de equilíbrio (maiores que 60 minutos) ou altas concentrações de DMSO (20%) ou glicerol (10%) afetaram a viabilidade espermática e diminuíram significativamente a taxa de eclosão dos ovos. Por outro lado, o metanol pode ser usado por um período de incubação longo (60 minutos), mesmo em altas concentrações como 20%.

## **6.2 Congelamento do sêmen**

A taxa de congelamento ótima para células espermáticas varia de  $-1-10^{\circ}\text{C min}^{-1}$  para sêmen humano (Henry et al., 1993) a  $-100^{\circ}\text{C min}^{-1}$  para sêmen de touro (Woelders, 1997). Para células espermáticas de peixes, a taxa de congelamento não pode ser nem muito rápida nem muito lenta (Viveiros, 2005). O botijão de vapor de nitrogênio líquido utilizado neste trabalho apresentou uma taxa de congelamento de  $-35,6^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , entre 21 e  $-170^{\circ}\text{C}$ , estando dentro dos limites recomendados por Harvey & Carolsfeld (1993) que são de -10 a

-50°C min<sup>-1</sup>. No mesmo tipo de botijão já foi registrada taxa de congelamento de -45°C min<sup>-1</sup> entre 8 e -150°C (Carolsfeld et al., 2003). Alguns fatores, como estado de conservação do botijão, tempo para sua estabilização e frequência de uso dentre outros, podem afetar a taxa de congelamento (Bedore, 1999). A temperatura de estabilização do botijão encontrada no presente estudo foi de -170°C, semelhante à de -176°C encontrada por Moraes (2004). O uso do botijão de vapor de nitrogênio líquido proporcionou bons resultados no processo de congelamento do sêmen de piracanjuba. Vários autores têm obtido sucesso na utilização desse botijão durante o processo de congelamento de sêmen de peixes (Bedore, 1999; Carolsfeld & Harvey, 1999; Cruz, 2001; Murgas et al., 2002 a; Ribeiro, 2003; Carolsfeld et al., 2003).

O efeito da velocidade de descongelamento na sobrevivência das células espermáticas depende do histórico de congelamento. Em geral, células congeladas rapidamente, como em palhetas de 0,5 mL, devem ser mais rapidamente descongeladas em água quente, quando comparadas com aquelas células congeladas em taxas mais lentas, como em criotubos ou macropalhetas contendo um maior volume de sêmen (Viveiros, 2005). Nesse estudo foi utilizado no descongelamento das palhetas de 0,5 mL uma temperatura da água do banho-maria de 60°C a fim de que a taxa de descongelamento fosse rápida, uma vez que o seu congelamento também foi rápido. O descongelamento rápido é muito utilizado como medida importante na prevenção de recristalização do gelo intracelular (Carolsfeld & Harvey, 1999). A temperatura da água utilizada no descongelamento do sêmen de algumas espécies de piracema tem variado entre 26 e 60°C, com um tempo de imersão entre 5 e 14 segundos (Bedore, 1999; Silva, 2000; Murgas et al., 2001; Cruz, 2001; Moraes, 2004). Em revisão realizada por Viveiros (2005), com diversas espécies de bagre, o descongelamento do sêmen tem ocorrido principalmente em banho-maria entre 25 e 40°C.

O crioprotetor metil glicol na concentração 10%, quando adicionado aos diluidores testados, mostrou-se eficaz na proteção dos espermatozoides de piracanjuba durante os processos de congelamento e descongelamento, quando comparado com o metanol e DMSO. O metil glicol nunca foi testado como crioprotetor no congelamento de sêmen de peixes.

O acréscimo de gema de ovo como crioprotetor externo é crucial para a manutenção da motilidade espermática de piracanjuba após o descongelamento, tornando mandatória sua adição no meio diluidor (Maria et al., 2004 b). A gema de ovo é rotineiramente utilizada nos diluidores para criopreservação de sêmen de mamíferos com o intuito de proteger as células espermáticas contra o choque térmico. Acredita-se que sua ação seja devida à presença de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), as quais aderem à membrana celular durante o processo de criopreservação, preservando, com isso, a membrana do espermatozoide (Moussa et al., 2002). Sua atuação se dá na superfície da membrana plasmática, restaurando a perda de fosfolípidos e aparentemente induzindo uma alteração transitória de sua composição, e conseqüentemente prevenindo a ruptura da membrana (Farstard, 1996). Em peixes, como em mamíferos, a gema de ovo está relacionada com a resistência da membrana plasmática aos danos causados pela baixa temperatura (Leung, 1991). Em Salmonídeos, esse agente estabilizador de membrana é essencial para manter a viabilidade dos espermatozoides após o processo de congelamento e descongelamento (Baynes & Scott, 1987; Lahnsteiner et al., 1996); já nos ciprinídeos, a adição de gema de ovo provoca um efeito negativo na qualidade do sêmen, reduzindo a motilidade espermática (Babiak & Glogowski, 1998; Lahnsteiner et al., 2000).

A solução fisiológica de NaCl 0,9% (154 mM) utilizada como diluidor no congelamento do sêmen de piracanjuba, acrescida de metil glicol 10% e gema de ovo 5%, mostrou-se eficiente, apresentando uma boa taxa de motilidade após o descongelamento. As formulações simples têm geralmente obtido grande

sucesso como diluidor. Segundo Scott & Baynes (1980), soluções que têm como base NaCl, com níveis entre 100 e 200 mM, possuem um pequeno risco de danos hipo ou hiperosmótico para os espermatozóides de salmonídeos. Uma solução 0,8% de NaCl associada ao DMSO 10% preservou os espermatozóides de dourado *Salminus maxillosus*, apresentando de 10 a 40% de motilidade pós-descongelamento (Cóser et al., 1984).

A solução de Saad utilizada como diluidor de sêmen de piracanjuba, acrescido de DMSO, metanol ou metil glicol, proporcionou uma menor taxa de motilidade (33, 4 e 26%, respectivamente) após o descongelamento em relação aos outros criodiluidores testados, mostrando não ser um bom diluidor. Já o sêmen de dourado congelado em Saad + DMSO ou Saad + metil glicol apresentou motilidade espermática após o descongelamento acima de 60% (Orfão & Viveiros, 2004).

A água de coco utilizada como diluidor de sêmen de piracanjuba, acrescido de gema de ovo e DMSO, proporcionou baixa taxa de motilidade espermática (10%) após descongelamento. Entretanto, quando o sêmen dessa mesma espécie foi congelado no mesmo criodiluidor e ativado com NaHCO<sub>3</sub> 0,5 e 1%, uma taxa de motilidade espermática de 60% foi observada (Murgas et al., 2001). A taxa de diluição utilizada neste estudo (1:9 v:v) foi diferente da taxa utilizada por esses autores (1:3 v:v). Alguns fatores como a diluição e o ativador utilizado, diferenças no ano e na idade reprodutiva e a variabilidade individual dos animais estudados podem ser os responsáveis pela diferença observada na taxa de motilidade.

Os diluidores BTS e M III utilizados rotineiramente no resfriamento do sêmen suíno obtiveram sucesso na preservação do sêmen de piracanjuba. O BTS e o M III possuem 80 e 89% de glicose, respectivamente, em 100 g do produto. O efeito crioprotetor da glicose está relacionado com a atividade de estabilização de membranas. A glicose, como a sacarose, promove a estabilização da camada

lipídica da membrana plasmática durante o congelamento (Gwo, 1994). O uso de açúcares são menos tóxicos do que muitos crioprotetores (Watson et al., 1987). O sêmen diluído em M III + metil glicol + gema de ovo apresentou uma maior taxa de motilidade espermática (60%) pós-descongelamento do que M III + metil glicol (10%). No entanto, o sêmen diluído em BTS + metil glicol, produziu uma maior taxa de motilidade espermática (70%) do que BTS + metil glicol + gema de ovo (47%). A gema de ovo tem sido utilizada com sucesso em combinação com a glicose e DMSO no congelamento do sêmen de piracanjuba, apresentando motilidade espermática pós-descongelamento acima de 80% (Carolsfeld et al., 2003).

### **6.3 Taxa de sobrevivência e capacidade de fertilização dos espermatozóides após o congelamento**

A taxa de sobrevivência dos espermatozóides (% de espermatozóides vivos) de piracanjuba obtida através do método de coloração diferencial, após o processo de congelamento e descongelamento, foi elevada e semelhante aos resultados subjetivos obtidos pela análise da taxa de motilidade espermática. Esses resultados confirmam as observações de Kavamoto et al. (1985), os quais, após avaliação do sêmen de 54 machos de truta arco-íris (*Salmo irideus* Gibbons), verificaram que a proporção de espermatozóides vivos e mortos está de acordo com a estimativa porcentual subjetiva da motilidade espermática. A avaliação da qualidade do sêmen efetuada pela coloração diferencial, na espécie estudada, foi um método auxiliar eficiente dentre os testes qualitativos rotineiramente utilizados.

Informações sobre o número mínimo de espermatozóides frescos (não congelado) necessários à fertilização de ovócitos de piracanjuba não estão

disponível na literatura. Geralmente a relação utilizada é relativamente alta e varia com a espécie. Para o sêmen descongelado essa relação precisa ser ajustada, pois os processos de congelamento e descongelamento provocam uma grande mortalidade dos espermatozóides, além de danificarem as estruturas celulares (membrana celular, peça intermediária e flagelo), incapacitando-os para a fertilização (Martinez & Ekwall, 1998). Neste estudo o sêmen congelado foi diluído 20 vezes e o sêmen fresco, 200 vezes, obtendo-se relações de espermatozóides:ovócito de  $4,6 \times 10^5:1$  para o sêmen fresco e de  $46 \times 10^5:1$  para o sêmen congelado. Em bagre africano, o sêmen congelado pode ser diluído 200 vezes e o sêmen fresco, até 2000 vezes, sem perder a habilidade de fertilização. As relações espermatozóides:ovócito nessas situações foram de  $11,3 \times 10^3$  para o sêmen congelado e de  $1,13 \times 10^3:1$  para o sêmen fresco (Viveiros et al., 2000). Para a fertilização dos ovócitos de matrinxã, Silveira (2000) utilizou  $2,36 \times 10^5$  espermatozóides descongelados por ovócito.

A solução NaCl 50 mM é melhor ativador da motilidade espermática do sêmen descongelado de pacu e piracanjuba do que o  $\text{NaHCO}_3$  1% (Bedore, 1999). Neste estudo, testes preliminares indicaram a solução NaCl 50 mM como ativador para o sêmen descongelado, embora as taxas de eclosão fossem próximas de zero. Decidiu-se então utilizar como ativador espermático a água do próprio tanque em que os reprodutores se encontravam, apresentando, assim, altas taxas de eclosão. Em ciprinídeos, também foi observado a influência da solução ativadora da motilidade espermática sobre a taxa de motilidade. A utilização da água como solução ativadora proporcionou taxas e duração da motilidade muito mais baixas que as soluções NaCl (12,5 e 50 mM) e KCl/MgSO<sub>4</sub>. No entanto, as taxas de fertilização foram mais baixas nas soluções NaCl e KCl/MgSO<sub>4</sub> em comparação com a água (Lahnsteiner et al., 2003). Isto indica que a motilidade espermática e a fertilidade não estão correlacionadas nessas condições.



Poucos trabalhos de criopreservação de sêmen de peixes nativos têm utilizado a fertilização como um parâmetro para avaliar a qualidade do sêmen após o descongelamento. Rana (1995) sugere que se faça o teste de fertilização para comprovar a eficiência do método de congelamento, pois os espermatozóides que exibem motilidade podem não ser viáveis.

No presente estudo, observou-se uma boa taxa de eclosão de ovos quando se utilizou o sêmen congelado em BTS acrescido de metil glicol (66%) e em NaCl 0,9%, metil glicol e gema de ovo (58%). Embora apresente semelhanças na taxa de sobrevivência dos espermatozóides, o sêmen diluído em M III + metil glicol + gema de ovo apresentou uma menor taxa de eclosão. Alguns grumos de espermatozóides foram observados no sêmen diluído nesse criodiluidor após o descongelamento. Uma interação entre os componentes do diluidor e a gema de ovo pode ter sido responsável pelo efeito negativo na fertilização. Em matrinxã (*Brycon cephalus*) a taxa de eclosão dos ovos fertilizados foi de 30,93% para o sêmen congelado em glicose, DMSO e gema de ovo e de 45,11% para o sêmen fresco (Silveira, 2000).

Foi observada uma grande variação individual entre os machos utilizados na fertilização. Algumas interações complexas entre fatores genéticos, fisiológicos e ambientais afetam a qualidade espermática (Rurangwa et al., 2004). Segundo Lahnsteiner et al. (1998), a variação na taxa de fertilização do sêmen de truta arco-íris pode ser explicado por alguns modelos de regressão. Nesses modelos os componentes do plasma seminal (pH, atividade  $\beta$ -D-glucuronidase, níveis de lipídeos totais) são responsáveis por 80% da variação total na taxa de fertilização. Os parâmetros de metabolismo espermático (atividade da malato desidrogenase, atividade respiratória, atividade do aspartato aminotransferase, níveis de lipídeos totais) são responsáveis por 75% da variação total na taxa de fertilização. Finalmente, os parâmetros de motilidade

espermática (taxa de motilidade, velocidade de natação total) são responsáveis por 65% da variação total da fertilização.

Os protocolos de resfriamento e congelamento desenvolvidos nesta dissertação podem ser utilizados em situações de produção envolvendo essa espécie. No entanto, mais experimentos devem ser realizados para maximizar o uso dos sêmen descongelado.

## 7 CONCLUSÕES

Nas condições apresentadas na presente dissertação, pode-se concluir que:

- O sêmen de piracanjuba pode ser resfriado (4°C) por 7 dias quando diluído em Saad ou NaCl 200 mM em uma taxa de diluição 1:9;
- Não há vantagens em se acrescentar um crioprotetor interno para a preservação do sêmen a 4°C quando as soluções Saad e NaCl 200 mM são utilizadas como diluidores;
- O sêmen pode ser eficientemente congelado em um dos seguintes criodiluidores: NaCl 0,9% + metil glicol + gema de ovo; M III + metil glicol + gema de ovo e em BTS + metil glicol.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIRES, E. D. **Características morfológicas e histofisiológicas da via espermática da piracanjuba, *Brycon orbignyanus* (Pisces: Teleostei)**. 1998. 69 p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

AMORIM, V. M. C. **Criopreservação de sêmen de tilápia-nilótica (*Oreochromis niloticus*), variedade chitralada**. 2002. 64 p. Dissertação (Mestrado em Zoologia) - Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Belo Horizonte.

BABIÁK, I.; GLOGOWSKI, J. Cryopreservation of sperm from asp *Aspius asuius*. **Progressive Fish-Culturist**, Bethesda, v. 60, n. 2, p. 146-148, Apr. 1998.

BAYNES, S. M.; SCOTT, A. P. Cryopreservation of rainbow trout spermatozoa: The influence of sperm quality, egg quality and extender composition on postthaw fertility. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 66, n. 1, p. 53-67, Oct. 1987.

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

BILLARD, R. Ultrastructure of trout spermatozoa: changes after dilution and deepfreezing. **Cell Tissue Research**, New York, v. 228, n. 2, p. 205-218, 1983.

BILLARD, R.; COSSON, J.; PERCHEC, J.; LINHART, O. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 129, n. 1/4, p. 95-112, Jan. 1995.

BUYUKHATIPOGLU, S.; HOLTZ, W. Sperm output in rainbow trout (*Salmo gairdneri*): effect of age, timing and frequency of stripping and presence of females. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 37, n. 1, p. 63-71, 1984.

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

CAROLSFELD, J.; HARVEY, B. J. **Conservação de recursos genéticos em peixes: teoria e prática**. Curso de treinamento brasileiro. Tradução H. P. Godinho. Victória, Canadá: World fisheries Trust, 1999. p. 47. Datilografado.

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

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

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

CONTE, L.; BOZANO, G. L. N.; FERRAZ DE LIMA, J. A. Influência do sistema de alimentação no crescimento da piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) em gaiolas. **Boletim Técnico CEPTA**, Pirasununga, v. 8, p. 49-59, 1995.

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

COSSON, J. The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa. **Aquaculture International**, Dordrecht, v. 12, n. 1, p. 69-85, 2004.

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

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

DERIVAUX, J. Valoración de la Fertilidad Masculina. In: **Fisiopatología de la reproducción e inseminación artificial de los animales domésticos**. Zaragoza, España: E. Acribia, 1961. p. 108-111.

FARSTAD, W. Semen cryopreservation in dogs and foxes. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 251-260, 1996.

GEFFEN, A. J.; EVANS, J. P. Sperm traits and fertilisation success of male and Sex reversed female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 182, n. 1/2, p. 61-72, Feb. 2000.

GODOY, M. P. **Peixes do Brasil**. Piracicaba: Editora Franciscana, 1975. 309 p.

GWO, J. C. Cryopreservation of yellowfin seabream (*Acanthopagrus latus*) spermatozoa (Teleost, Perciformes, Sparidae). **Theriogenology**, Woburn, v. 41, n. 5, p. 989-1004, Apr. 1994.

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

HENRY, M. A.; NOILES, E. E.; GAO, D. Y.; MAZUR, P.; CRITSER, J. K. Cryopreservation of human spermatozoa. The effects of cooling rate and warming rate on the maintenance of motility, plasma membrane integrity, and mitochondrial function. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v. 60, n. 5, p. 911-918, Nov. 1993.

HOLT, W. V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, Woburn, v. 53, n. 1, p. 47-58, Jan. 2000.

JAMIESON, B. G. M. **Fish evolution and systematics: evidence from spermatozoa**. Cambridge: Cambridge University Press, 1991. 319 p.

JANVIER, P. Catching the first fish. **Nature**, London, v. 402, n. 6758, p. 21-22, Nov. 1999.

KAVAMOTO, E. T.; FOGLI DA SILVEIRA, W.; RIGOLINO, M. G.; CARVALHO FILHO, A. C. de. Avaliação macro e microscópica do sêmen de truta arco-iris *Salmo irideus* Gibbons. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 12, n. 3, p. 73-81, 1985.

KIME, D. E.; EBRAHIMI, M.; NYSTEN, K.; ROELANTS, I.; RURANGWA, E.; MOORE, H. D. M.; OLLEVIER, F. Use of computer assisted sperm analysis (CASA) for monitoring the effects of pollution on sperm quality of fish: application to effects of heavy metals. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 36, n. 3/4, p. 223-237, Dec. 1996.

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

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

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

LAHNSTEINER, F.; BERGER, B.; WEISMANN, T.; PATZNER, R. A. Determination of semen quality of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by sperm motility, seminal plasma parameters, and spermatozoal metabolism. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 163, n. 1/2, p. 163-181, Apr. 1998.

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

LAHNSTEINER, F.; WEISMANN, T.; PATZNER, R. A. Methanol as cryoprotectant and the suitability of 1,2 and 5 ml straws for cryopreservation of semen from salmonid fishes. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 28, n. 6, p. 471-479, June 1997.

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

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

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

MARQUES, S. **Preservação a curto prazo do sêmen de teleosteos neotropicais de agua doce**. 2001. 83 p. Dissertação (Mestrado) - Pontífica Universidade Católica de Minas gerais, Belo Horizonte.

MARIA, A. N.; MURGAS, L. D. S.; SILVA, M. O. B.; MILIORINI, A. B.; FRANCISCATTO, R. T.; LOGATO, P. V. R. Influência da adição de iodeto de potássio e citrato de sódio na qualidade do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus* - Holmberg, 1887). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 1, p. 191-195, jan./fev. 2004 a.

MARIA, A. N.; VIVEIROS, A. T. M.; MORAIS, G. F.; MURGAS, L. D. S.; OLIVEIRA, A. V.; MILIORINI, A. B. Effects of extenders on sperm motility of a brazilian teleost fish piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) after 24 h of cooling In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 15., 2004, Porto Seguro, Bahia, Brazil. **Abstracts...** Porto Seguro, Bahia, Brazil: Brazilian College of Animal Reproduction/ ICAR, 2004b. abst. 526

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

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

MEDEIROS, C. M. O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A. T. D.; RODRIGUES, J. L. Current status of sperm criopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, Woburn, v. 57, p. 327-344, Jan. 2002.

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

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



MORISAWA, M.; ODA, S.; YOSHIDA, M.; TAKAI, H. Transmembrane signal transduction for the regulation of sperm motility in fishes and ascidians. In: Gagnon, C. (Ed.), **The male gamete: from basic knowledge to clinical applications**. Vienna, USA: Cache River Press, 1999. p. 149-160.

MORISAWA, M.; OKUNO, M.; SUZUKI, K.; MORISAWA, S.; ISHIDA, K. Initiation of sperm motility in teleosts. **Journal Submicroscope Cytology**, Tokyo, v. 15, n. 1, p. 61-65, Jan. 1983.

MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A.; TAINTURIER, D.; ANTON, M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by a easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, Woburn, v. 57, n. 6, p. 1695-1706, Apr. 2002.

MURGAS, L. D. S.; FRASCISCATTO, R. T.; MILIORINI, A. B.; SILVA, M. O. B.; MARIA, A. N. Viabilidade seminal de Piapara (*Leporinus obtusidens*), empregando diferentes diluentes, no resfriamento do sêmen à 4°C. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 26, n. 3, p. 211-213, jul./set. 2002a.

MURGAS, L. D. S.; GUALHANONE, A.; SILVA, M. O. B.; MELLO, C. B. FREITAS, R. T. F.; ZANGERONIMO, M. G. Calidad seminal del pez piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) post-descongelación. **Revista Anales de Veterinária**, Murcia, v. 17, n. 1, p. 3-10, 2001.

MURGAS, L. D. S.; SILVA, M. O. B.; FRANCISCATTO, R. T.; MILIORINI, A. B.; MARIA, A. N.; OLIVEIRA, S. L.; LOGATO, P. V. R.; FIALHO, E. T. Viabilidade espermática do sêmem de Piracanjuba (*Brycon orbignianus*) resfriado à 4°C. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 39., 2002, Recife. **Anais...** Recife: SBZ, 2002b. 1 CD-ROM.

NAGAHAMA, Y.; The functional morphology of teleost gonads. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J.; DONALDSON, E. M. (Ed.). **Fish physiology**. New York: Academic Press, 1983. v. 9, p. 233-275.

ORFÃO, L. H.; VIVEIROS, A. T. M. Criopreservação do sêmen do osteíctio dourado, *Salminus maxillosus*. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFLA – CICESAL, 17., 2004, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2004.

PERCHEC-POUPARD, G.; GATTI, J. L.; COSSON, J.; JEULIN, C.; FIERVILLE, F.; BILLARD, R. Effects of extracellular environment on the osmotic signal transduction involved in activation of motility of carp spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 110, n. 2, p. 315-327, July 1997.

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

RANA, K. J.; McANDREW, B. J. The viability of cryopreserved tilapia spermatozoa. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 76, n. 3/4, p. 335-345, Feb. 1989.

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

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

SAAD, A.; BILLARD, R.; THERON, M. C.; HOLLEBECQ, M. G. Short-term preservation of carp (*Cyprinus carpio*) semen. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 71, n. 1/2, p. 133-150, Aug. 1988.

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

SEGOVIA, M.; JENKINS, J. A.; PANIAGUA-CHAVEZ, C.; TIERSCH, T. R. Flow cytometric evaluation of antibiotic effects on viability and mitochondrial function of refrigerated spermatozoa of Nile tilapia. **Theriogenology**, Woburn, v. 53, n. 7, p. 1489-1499, Apr. 2000.

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

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

SIMIONE, F. P. **Cryopreservation manual**. New York: Nalge Nunc International Corporation; 1998. p. 8.

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

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

STOSS, J.; BUYUKHATIPOGLU, S.; HOLTZ, W. Short term and cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) sperm. **Annales de Biologie Animal Biochimie Biophysique**, Paris, v. 18, n. 4, p. 1077-1082, 1978.

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

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

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

VIVEIROS, A. T. M. Semen cryopreservation in catfish species, with particular emphasis on the African catfish. **Animal Breeding Abstracts**, Fort Collins, v. 73, n. 1, p. 1N-9N, Jan. 2005.

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

WATSON, P. F.; MORRIS, G. J. Cold shock injury in animal cells. **Proceedings Society of Experimental Biology**, New York, v. 41, p. 311-340, 1987.

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

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

## ANEXOS

- ANEXO 1. Peso corporal e concentração espermática dos exemplares piracanjuba utilizados nos experimentos ..... 65
- ANEXO 2. Tempo de estabilização do botijão de vapor de nitrogênio líquido, antes da introdução das palhetas ..... 66
- ANEXO 3. Tabela contendo as taxas de motilidade espermática e a porcentagem de espermatozoides vivos obtidos pela coloração diferencial após o descongelamento do sêmen (Experimento 3) ..... 67
- ANEXO 4. Análise de variância do efeito das soluções diluidoras sobre a taxa de motilidade espermática durante o resfriamento (Experimento 1A) ..... 68
- ANEXO 5. Análise de variância do efeito das soluções diluidoras de sêmen acrescidas de 10% de crioprotetores sobre a taxa de motilidade espermática, durante o resfriamento (Experimento 1B) ..... 69
- ANEXO 6. Análise de variância do efeito das soluções diluidoras acrescidas de antibiótico sobre a taxa de motilidade espermática, durante o resfriamento (Experimento 1C) ..... 70
- ANEXO 7. Análise de variância do efeito dos criodiluidores no processo de congelamento do sêmen (Experimento 2) ..... 71
- ANEXO 8. Análise de variância do efeito do sêmen congelado sobre a taxa de eclosão dos ovos (Experimento 3) ..... 71

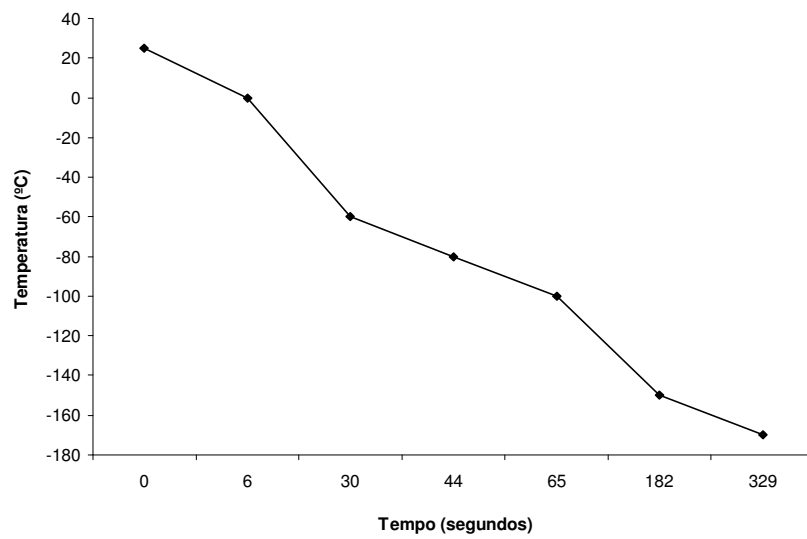
## ANEXO 1

Concentração espermática obtida no sêmen de 18 exemplares de piracanjuba.

<b>Experimento</b>	<b>Peso corporal (g)</b>	<b>Espematozóides x 10<sup>9</sup>/mL</b>
1A	1000	5,30
	900	5,90
	1000	3,80
1B	1200	4,15
	800	9,20
	900	6,90
1C	1500	2,80
	1000	3,15
	1300	3,75
2A	1000	2,80
	1100	4,60
	900	3,35
2B	1200	2,80
	1200	4,15
	900	5,50
3	1200	8,10
	1200	10,75
	1200	8,55
<b>Média</b>	1083	5,31
<b>Desvio padrão</b>	179	2,44

## ANEXO 2

Tempo de estabilização do botijão de vapor de nitrogênio líquido, antes da introdução das palhetas.



### ANEXO 3

Porcentagem da motilidade espermática e de espermatozoides vivos obtidos pela coloração diferencial (média±desvio; n=3; 3 repetições/peixe) após descongelamento do sêmen.

<b>Soluções criodiluidoras</b>	<b>Motilidade espermática*</b>	<b>Taxa de sobrevivência *</b>
NaCl 0,9%	60	65
	60	66
	70	75
	70	74
	60	69
	70	69
	50	49
	50	42
	50	51
Média ± desvio padrão	60 ± 9	62 ± 12
BTS	70	68
	60	59
	70	69
	80	74
	70	71
	70	63
	50	55
	70	66
70	72	
Média ± desvio padrão	68 ± 8	66 ± 6
M III	50	59
	70	78
	50	58
	80	80
	70	71
	70	80
	70	73
	50	61
60	69	
Média ± desvio padrão	63 ± 11	70 ± 9
Média do sêmen fresco	92 ± 4	84 ± 5

\* Estatisticamente iguais pelo teste de qui quadrado (P>0,05)



#### ANEXO 4

Análise de variância do efeito das soluções diluidoras do sêmen no processo de resfriamento (Experimento 1A)

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
ANIMAL	2	2093.3333	1046.6666	12.116	0.0013
DILUIDOR	6	15853.3333	2642.2222	30.585	0.0000
erro 1	12	1036.6666	86.3888		
TEMPO	4	113767.6190	28441.9047	561.485	0.0000
DILUIDOR*TEMPO	24	13715.7142	571.4880	11.282	0.0000
erro 2	56	2836.6666	50.6547		
Total corrigido	104	149303.3333			
CV 1 (%) =	15.66				
CV 2 (%) =	12.00				
Média geral:	59.3333	Número de observações:	105		

## ANEXO 5

Análise de variância do efeito das soluções diluidoras acrescidas de 10% de crioprotetores no processo de resfriamento (Experimento 1B).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
ANIMAL	2	1045.6066	522.8033	2.895	0.0676
DILUIDOR	4	75485.5466	18871.3866	104.497	0.0000
CRIOPROTETOR	3	30410.8100	10136.9366	56.131	0.0000
DILUIDOR*CRIOP	12	16122.9066	1343.5755	21.600	0.0000
FATORIAL x ADICIONAL	1	4340.0701	4340.0701	24.990	0.0000
erro 1	40	6946.6666	173.6666		
TEMPO	4	247549.5466	1887.3866	994.921	0.0000
TEMPO*DILUIDOR	16	18430.0200	1151.8762	18.518	0.0000
TEMPO*CRIOP	12	8260.2400	688.3533	11.066	0.0000
TEMPO*DILUI*CRIOP	48	29280.4600	610.0095	9.807	0.0000
erro 2	168	10259.2000	61.0666		
Total corrigido		299	443400.1966		
CV 1 (%) =	25.73				
CV 2 (%) =	15.10				
Média geral:	52.2366	Número de observações:	300		

## ANEXO 6

Análise de variância do efeito das soluções diluidoras acrescidas de antibiótico na preservação do sêmen durante o resfriamento (Experimento 1C).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
BLOCO	2	223.6000	111.8000	2.048	0.1580
DILUIDOR	9	55997.5166	6221.9462	113.963	0.0000
erro 1	18	982.7333	54.5962		
TEMPO	7	105756.9166	15108.1309	650.612	0.0000
DILUIDOR*TEMPO	63	23608.0833	374.7314	16.137	0.0000
erro 2	140	3251.0000	23.2214		
Total corrigido	239	189819.8500			
CV 1 (%) =	19.08				
CV 2 (%) =	12.44				
Média geral:	38.7250		Número de observações:	240	

## ANEXO 7

Análise de variância do efeito dos criodiluidores no congelamento do sêmen (Experimento 2).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
BLOCO	2	240.0990	120.0495	3.277	0.0401
CRIODILUIDORES	21	54803.5948	2609.6949	71.243	0.0000
erro	174	6373.7894	36.6309		
Total corrigido	197	61417.4833			
CV (%) =	22.89				
Média geral:	26.4397		Número de observações:	198	

## ANEXO 8

Análise de variância do efeito do sêmen congelado na taxa de eclosão dos ovos (Experimento 3).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
BLOCO	2	3328.7424	1664.3712	10.656	0.0004
CRIODILUIDORES	3	8219.9040	2739.9680	17.542	0.0000
erro	27	4217.2286	156.1936		
Total corrigido	32	15765.8751			
CV (%) =	20.70				
Média geral:	60.3787		Número de observações:	33	