

**RESFRIAMENTO E CRIOPRESERVAÇÃO  
DE SÊMEN DE CURIMBA  
*Prochilodus lineatus* (VALENCIENNES, 1836)**

**LAURA HELENA ORFÃO**

**2006**

**LAURA HELENA ORFÃO**

**RESFRIAMENTO E CRIOPRESERVAÇÃO  
DE SÊMEN DE CURIMBA  
*Prochilodus lineatus* (VALENCIENNES, 1836)**

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

Profa. PhD. Ana Tereza de Mendonça Viveiros

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2006

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

Orfão, Laura Helena

Resfriamento e criopreservação de sêmen de curimba *Prochilodus lineatus* (VALENCIENNES, 1836) / Laura Helena Orfão. --Lavras: UFLA, 2006.

86 p.: il

Orientadora: Ana Tereza de Mendonça Viveiros.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Sêmen. 2. Peixe. 3. Resfriamento. 4. Criopreservação. 5 Curimba.
6. *Prochilodus*. I. Universidade Federal de Lavras. II Título.

CDD-639.3752

**LAURA HELENA ORFÃO**

**RESFRIAMENTO E CRIOPRESERVAÇÃO  
DE SÊMEN DE CURIMBA  
*Prochilodus lineatus* (VALENCIENNES, 1836)**

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 5 de dezembro de 2006

Prof. Dr. José Camisão de Souza	DZO/UFLA
Prof. Dr. José Cleto da Silva Filho	DZO/UFLA
Prof. Dr. Paulo dos Santos Pompeu	DBI/UFLA

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

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL

***Dedico este trabalho:***

*A DEUS, pelo dom da vida e do conhecimento;  
Aos meus pais, Bosco e Cecília, primeiros e eternos mestres;  
Aos meus irmãos, José Rodolfo, Lucas e Guilherme;  
Aos meus avós, exemplos de vida;  
Ao Jullian, pelo amor e companheirismo.*

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Zootecnia, pela oportunidade concedida para a realização deste curso.

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

Aos professores Dra Priscila Vieira Rosa Logato e Dr Rilke Tadeu Fonseca de Freitas, pelos conhecimentos transmitidos durante todo o curso.

Ao colega, em especial, Alexandre N. Maria, pelo auxílio em todas as horas e valiosa colaboração.

Aos colegas Ziara A. Isáú, Thiciana B. do Amaral, Alexmiliano V. Oliveira, Marco Aurélio S. Leite, João Fernando Koch e Rafael V. Araújo, pela ajuda.

À empresa Minitub do Brasil<sup>®</sup>, pela doação das palhetas e dos diluidores BTS<sup>®</sup> e MIII<sup>®</sup> 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 colaboração.

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

Às amigas Fabíola, Priscila, Lívia, Natascha, Ana Paula e Renata pelo companheirismo sempre.

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

## SUMÁRIO

Lista de Tabelas .....	i
Lista de Figuras.....	iii
RESUMO GERAL.....	iv
ABSTRACT .....	vi
CAPITULO I - Introdução geral.....	01
1 INTRODUÇÃO .....	02
2 OBJETIVOS .....	05
2.1 Objetivo geral .....	05
2.2 Objetivos específicos .....	05
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	06
3.1 A espécie em estudo .....	06
3.2 Volume seminal e concentração espermática.....	08
3.3 Motilidade espermática e ativadores do sêmen.....	10
3.4 pH e osmolaridade do sêmen .....	15
3.5 Resfriamento do sêmen .....	17
3.6 Criopreservação do sêmen .....	20
3.6.1 Volume das palhetas.....	23
3.6.2 Taxa de descongelamento de sêmen de peixes .....	24
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	26
CAPITULO II- Resfriamento de sêmen de curimba <i>Prochilodus lineatus</i> : efeito das soluções diluidoras .....	36
1 RESUMO.....	37
2 ABSTRACT.....	38

3 INTRODUÇÃO .....	39
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	41
5 RESULTADOS .....	43
6 DISCUSSÃO .....	45
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

CAPITULO III- Criopreservação de sêmen de curimba: definição de um protocolo .....	57
1 RESUMO.....	58
2 ABSTRACT.....	59
3 INTRODUÇÃO .....	60
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	63
5 RESULTADOS .....	65
6 DISCUSSÃO .....	68
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75

CAPITULO IV- Considerações finais.....	78
--	----

ANEXOS .....	82
--------------	----



## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1

<b>TABELA 1</b>	Volume e concentração do sêmen de algumas espécies brasileiras de água doce.....	10
-----------------	--	----

### Capítulo 2

<b>TABELA 1</b>	Características dos diluidores utilizados no resfriamento de sêmen de curimba <i>Prochilodus lineatus</i> .....	42
-----------------	---	----

<b>TABELA 2</b>	Peso corporal, volume do sêmen e concentração espermática ( $\times 10^9$ spz/mL de sêmen) de curimba <i>Prochilodus lineatus</i> .....	44
-----------------	---	----

<b>TABELA 3</b>	Motilidade espermática (expressa em %; média $\pm$ desvio padrão; n= 5 peixes) do sêmen de curimba <i>Prochilodus lineatus</i> diluído em diferente diluidores e resfriado a 4-6°C por até 5 dias.....	45
-----------------	--	----

### Capítulo 3

<b>TABELA 1</b>	Peso corporal, volume do sêmen e concentração espermática do sêmen de curimba <i>Prochilodus lineatus</i> , após hipofiseção (5 mg/ kg peso corporal).....	66
-----------------	--	----

<b>TABELA 2</b>	Motilidade espermática (expressa em %; média $\pm$ desvio padrão; n = 3 palhetas 4 peixes) do sêmen de curimba <i>Prochilodus lineatus</i> criopreservado em diferentes meios e ativado com 4 soluções ativadoras.....	67
<b>TABELA 3</b>	Motilidade espermática (expressa em %; média $\pm$ desvio padrão, n = 4 machos) do sêmen de curimba <i>Prochilodus lineatus</i> criopreservado em glicose 5% e metilglicol, em palhetas de 0,5 ou 4,0 mL e descongeladas em banho-maria a 30 ou 60°C.....	68

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1

<b>FIGURA 1</b>	Exemplar adulto de curimba <i>Prochilodus lineatus</i> .....	06
<b>FIGURA 2</b>	Sucessão de eventos desencadeadores da motilidade espermática em espécies de água doce.....	13

## RESUMO GERAL

Orfão, Laura Helena. **Resfriamento e criopreservação de sêmen de curimba *Prochilodus lineatus* (VALENCIENNES, 1836)**. 2006. 86 p. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) –Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

O curimba (*Prochilodus lineatus*) é uma espécie de peixe nativa da bacia do rio Paraná. Esta espécie é comercialmente importante por ser fornecida como alimento para outras espécies, de interesses ecológico ou comercial, durante a larvicultura. Além disso, é fonte de proteína de alta qualidade para populações ribeirinhas e carentes. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo de preservação de sêmen do curimba por meio dos processos de resfriamento a 4°C -6°C e criopreservação. Os trabalhos foram realizados na Estação de Piscicultura da Companhia Energética de Minas Gerais (CEMIG), Itutinga, MG. Para o resfriamento, o sêmen foi diluído 1:10 (v/v sêmen: volume total) para avaliação dos dois grupos de soluções diluidoras. O grupo com soluções à base de cloreto de sódio foi composto por NaCl 0,9%, NaCl 1,2% e NaCl-tris. O outro grupo com soluções à base de glicose foi composto por glicose 5%, BTS<sup>®</sup> 5% (glicose, citrato de sódio, EDTA, sulfato de gentamicina, NaHCO<sub>3</sub>, KCl) e M III<sup>®</sup> 6% (glicose, citrato de sódio, EDTA, sulfato de gentamicina, NaHCO<sub>3</sub>). Uma alíquota do sêmen foi mantida sem diluição para servir de controle. A motilidade espermática foi subjetivamente avaliada após 0, 1, 2, 3, 4 e 5 dias de resfriamento a 4°C-6°C e a ativação do sêmen foi feita com solução de NaCl 0,29%. Para a criopreservação do sêmen foram realizados dois experimentos. No experimento 1, foram avaliados quatro diluidores (NaCl 0,9%, glicose 5%, BTS<sup>®</sup> 5% e M III<sup>®</sup> 6%), dois crioprotetores (dimetilsulfóxido-DMSO e metilglicol) e quatro ativadores (água destilada, NaCl 0,15%, NaCl 0,29% e NaHCO<sub>3</sub>). Para a criopreservação do sêmen, 3 palhetas de 0,5 mL foram congeladas em cada meio crioprotetor (1:10, v/v, sêmen: volume) em um botijão de vapor de nitrogênio líquido (Taylor-Warton, modelo CP 300, “dry shipper”) a -170°C e depois armazenadas em nitrogênio líquido. A motilidade espermática foi avaliada depois do descongelamento em banho-maria a 60°C por 8 segundos e foi subjetivamente estimada após ativação com cada um dos ativadores testados (1:5, v/v, sêmen:ativador). No experimento 2, o sêmen foi diluído em glicose 5% e metilglicol, sendo testado, agora, o efeito dos volumes de palhetas (0,5 e 4 mL) e da temperatura de descongelamento (30°C e 60°C) no sêmen criopreservado. A motilidade espermática do sêmen resfriado e não diluído foi 4% depois de 2 dias de resfriamento. Após cinco dias de resfriamento a 4°C-6°C o sêmen de curimba diluído em BTS<sup>®</sup> 5% e M III<sup>®</sup> 6% apresentaram motilidades espermáticas de 50%. Estes resultados mostram que é necessário um diluidor para aumentar o tempo de armazenamento. Na criopreservação do

sêmen, no experimento 1, houve uma interação entre diluidores, crioprotetores e ativadores. Todas as amostras de sêmen, criopreservadas no meio contendo NaCl 0,9% como diluidor, produziram baixa motilidade espermática, após o descongelamento, quando comparadas aos outros diluidores. Amostras criopreservadas em glicose 5%, combinadas com metilglicol, produziram altas taxas de motilidades espermáticas, em comparação com as amostras criopreservadas em glicose combinada com DMSO. Os quatro ativadores testados produziram motilidades semelhantes em todas as combinações diluidor-crioprotetor, exceto quando o BTS<sup>®</sup> 5% foi usado como diluidor e a água destilada foi usada como ativador. Não houve diferença no sêmen criopreservado em palhetas de 0,5 e 4,0 mL ou no descongelamento a 30°C ou 60°C

---

\* Comitê Orientador: Ana Tereza de Mendonça Viveiros - UFLA (Orientadora), José Camisão de Souza- UFLA e José Cleto da Silva Filho- UFLA (co-orientadores)

## ABSTRACT

Orfão, Laura Helena. **Semen cool storage and cryopreservation of curimba *Prochilodus lineatus* (VALENCIENNES, 1836)**. 2006. 86 p. MSc Thesis (Animal Production) –Federal University of Lavras, Lavras, MG.\*

Curimba (*Prochilodus lineatus*) is a species of native fish of the Grande river. This species is commercially important for being supplied as food to other ecological or commercial species, of interests, during the fingerling production. Moreover, it is protein source of high quality for marginal and devoid populations. The objective of this work was to develop a protocol of semen preservation of curimba through cooling 4-6°C and cryopreservation storage. This works was carried out at the Fish Culture Unit of Energy Company of Minas Gerais (CEMIG), Itutinga-MG. For chilling storage, semen was diluted (1:10, v/v, semen: total volume) in saline solutions (NaCl 0.9%, NaCl 1.2% or NaCl-tris) or in glucose-based solutions (glucose 5%, BTS<sup>®</sup> 5% or M III<sup>®</sup> 6%). BTS<sup>®</sup> contains glucose, sodium citrate, EDTA, gentamycin sulfate, NaHCO<sub>3</sub> and KCl, and M III<sup>®</sup> contains the same chemical composition of BTS<sup>®</sup> except KCl. One semen aliquot was kept undiluted and was used as control. All samples were stored in open 5-mL test tubes at 4–6°C and motility was evaluated after 0, 1, 2, 3, 4, 5 and 6 days of storage. Sperm motility was subjectively estimated after addition of activation medium (NaCl 0.29%). For semen cryopreservation, two experiments were carried. In experiment 1, eight freezing medium were prepared using a combination of four extenders (NaCl 0.9%, glucose 5%, BTS<sup>®</sup> 5% and M III<sup>®</sup> 6%) and two cryoprotectants (dimethyl sulphoxide - DMSO and methylglycol). Semen was diluted (1:10, v/v, semen: total volume) in each freezing medium, aspirated into 0.5-mL straws (n=3 per medium), transferred to a nitrogen vapor container (Taylor-Warton, CP 300) at -170°C and then stored in liquid nitrogen. Sperm motility was subjectively evaluated after thawing at 60°C-water bath for 8 s. To activate sperm motility, four activating medium (distilled water, NaCl 0.15%, NaCl 0.29% and NaHCO<sub>3</sub>) were tested. Then, to evaluate the effect of straw size (0.5 and 4.0 mL) and thawing temperature (30 and 60°C), semen was frozen in glucose-methylglycol medium using the same method as described on experiment 1. Post-thaw sperm motility was subjectively estimated after activation with NaCl 0.29%. On chilling storage, motility of only 4% was observed on undiluted semen after 2 days at 4-6 °C. Curimba semen diluted in BTS<sup>®</sup> 5% or in M III<sup>®</sup> 6% maintained motility above 50 % for as long as 5 days at 4-6°C. This results show that an extender is necessary to increase semen time storage. For cryopreservation, in experiment 1, there was an interaction among extenders, cryoprotectants and activation media. All samples cryopreserved in a medium containing NaCl 0.9% as extender, produced low

post-thaw sperm motility, compared to the other extenders. Samples cryopreserved in glucose combined with methylglycol produced higher post-thaw sperm motility, compared to samples cryopreserved in glucose combined with DMSO. The four activating medium tested produced similar post-thaw motility in all extender-cryoprotectant combinations, except when BTS<sup>®</sup> was used as extender and distilled water was used as activating medium. There was no difference on semen cryopreserved in 0.5- or 4.0-mL straw or thawed in 30° or in 60°C.

---

\* Guidance Committee: Ana Tereza de Mendonça Viveiros - UFLA (Supervisor), José Camisão de Souza- UFLA e José Cleto da Silva Filho- UFLA (Co-supervisor)

# **CAPÍTULO I**

## **INTRODUÇÃO GERAL**



## 1 INTRODUÇÃO

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

O desenvolvimento de técnicas que levam ao aumento da produção animal ou à conservação de espécies passíveis de extinção vão ao encontro de questões econômicas e ecológicas atualmente levantadas, uma vez que o objetivo de ambas é aumentar o número de alevinos de espécies comerciais ou em extinção. As estratégias para evitar a redução de recursos pesqueiros incluem o desenvolvimento de técnicas de reprodução artificial, de larvicultura e alevinagem, de coleta e preservação de sêmen. Essas estratégias podem também ser utilizadas na produção comercial de peixes. Além disso, as técnicas de preservação do sêmen podem auxiliar em programas de melhoramento genético e para a formação de um banco para conservação dos recursos genéticos.

Outras vantagens da preservação de sêmen são: permitir a troca de material genético entre os laboratórios de reprodução e reduzir o número de

reprodutores, diminuindo assim os custos de produção e eliminando problemas de assincronia da maturidade gonadal, quando machos e fêmeas não estão preparados simultaneamente, além do estabelecimento de programas de hibridização utilizando espécies com períodos reprodutivos diferentes (Viveiros, 2005).

Diante dessas circunstâncias existe uma demanda crescente por técnicas práticas e apuradas de preservação de gametas que facilitem a fertilização artificial desses animais para repovoamento dos rios e sua criação em cativeiro. O armazenamento de espermatozóides pode ser realizado em curto prazo (horas ou dias), por meio do resfriamento, a temperaturas entre 4°C-6°C ou em longo prazo, pela criopreservação em nitrogênio líquido a -196°C, mantendo sua viabilidade por tempo indefinido (meses/anos), que pode variar de acordo com a espécie e o protocolo utilizados.

O resfriamento de sêmen é um método prático e simples para uso na rotina de pisciculturas e programas de preservação de espécies em risco de extinção, além de facilitar as trocas de materiais genéticos entre as fazendas produtoras de pescados. No entanto, a técnica ainda é pouco utilizada, devido, principalmente, ao curto período de armazenamento, evidenciado por baixas taxas de motilidade espermática. A elaboração de um protocolo de resfriamento de sêmen, principalmente de espécies nativas, tem se mostrado específica para cada espécie, tanto para a duração do período de estocagem quanto para os diluidores usados. Os espermatozóides de peixes são imóveis no plasma seminal e esta característica favorece sua preservação em curto prazo, já que eles não requerem energia para locomoção. Uma solução diluidora deve ser utilizada no processo de resfriamento, pois a diluição diminui a competição dos espermatozóides por oxigênio e espaço (Carolsfeld & Harvey, 1999).

Para ser criopreservado, o sêmen precisa ser diluído em meio contendo diluidor e crioprotetor intracelular. Os diluidores são soluções de sais ou de

carboidratos, que ajudam a manter a viabilidade das células durante o congelamento e que permitem que os crioprotetores intracelulares ou extracelulares atinjam o interior e a superfície dos espermatozóides, protegendo-os das crioinjúrias.

Os experimentos de criopreservação de sêmen, geralmente, utilizam escala de laboratório para desenvolver os protocolos de criopreservação, envasando o sêmen em palhetas de 0,5 mL. A avaliação das palhetas de 4,0 mL é comercialmente interessante, uma vez que é possível fertilizar maior quantidade de ovócitos. Estas palhetas já vêm sendo testadas na criopreservação de sêmen de alguns cyprinídeos, por Lahnsteiner et al. (2003) e de sêmen de matrinxã-da-Colômbia (*Brycon amazonicus*), por Velasco-Santamaría et al. (2006). Outros fatores que também influenciam a qualidade do sêmen criopreservado são a temperatura da água no descongelamento do sêmen e a solução ativadora usada no processo de ativação dos espermatozóides, uma vez que os espermatozóides de peixe são imóveis no plasma seminal.

Dessa forma, este trabalho visa: avaliar a eficiência de algumas soluções à base de glicose ou de cloreto de sódio, durante o processo de resfriamento de sêmen de curimba e também o efeito de diluidores, crioprotetores intracelulares, volume da palheta, temperatura de descongelamento e soluções ativadoras da motilidade espermática do sêmen dessa espécie submetida ao processo de criopreservação.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

O objetivo geral deste trabalho foi testar soluções diluidoras, comumente utilizadas em resfriamento de sêmen de outras espécies de peixes, e também avaliar aspectos importantes para o desenvolvimento de um protocolo de criopreservação de sêmen dessa espécie.

### **2.2 Objetivos específicos**

Especificamente, buscou-se:

- avaliar o efeito de soluções diluidoras à base de glicose ou de cloreto de sódio durante o processo de resfriamento do sêmen a 4°C-6°C;
- avaliar alguns meios crioprotetores de sêmen, contendo um diluidor e um crioprotetor intracelular, capazes de manter a viabilidade dos espermatozóides de curimba após descongelamento;
- verificar a eficiência de diferentes soluções ativadoras do sêmen após o descongelamento;
- verificar a eficiência do uso das palhetas de 4 mL em relação às palhetas de 0,5 mL, durante a criopreservação de sêmen;
- testar o descongelamento lento (30°C) em relação ao descongelamento rápido (60°C).

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Espécie em estudo

Ordem: Characiformes

Família: Prochilodontidae

Gênero: *Prochilodus*

Espécie: *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836)

Nome popular: curimba, curimbatá, corimbatá, curimatã, grumatã, papa-terra.



FIGURA 1. Exemplar adulto de curimba (*Prochilodus lineatus*)

O curimba é um peixe de grande porte, atingindo até 70 cm, com o corpo comprimido e alto, e a cabeça larga. Pode atingir até 6 kg de peso corporal. De cor cinza-esverdeada, o corpo é mais escuro no dorso, aclarando-se no ventre, que é mais prateado. A boca é circular e possui lábios móveis providos de numerosos dentículos diminutos, dispostos em duas séries. As nadadeiras anal, ventrais e caudal são escamadas na base e são cinza-amareladas e sem machas, nos adultos. Possui linha lateral completa e as escamas dos machos são ásperas na borda exposta, sobretudo na época reprodutiva. Machos e fêmeas são idênticos externamente. O macho reproduz aos dois anos de idade, com 24 cm, e a fêmea, aos três anos, com 31 cm de comprimento (CEMIG/CETEC, 2000).

Alimentam-se, preferencialmente, de detritos, sendo, assim, caracterizado como iliófago. Devido a essa característica, o curimba tem importante função na cadeia alimentar do ambiente aquático, uma vez que promove a limpeza do fundo dos rios. Encontra-se, geralmente, em ambiente com águas mais lentas, porém, na época de reprodução, realiza migrações em massa até as áreas de desova (CEMIG/CETEC, 2000).

É uma espécie importante para a pesca comercial, artesanal e de subsistência, principalmente nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, onde sua carne é bastante utilizada na culinária e muito apreciada. Além disso, a carne de curimba é uma fonte de proteína de alta qualidade, consumida por comunidades ribeirinhas e populações mais carentes, já que o preço de mercado é menor, comparados ao de outros peixes. As estações de piscicultura têm grande interesse no sucesso da sua reprodução, uma vez que as larvas de curimba servem de alimento para espécies carnívoras de grande importância comercial, como, por exemplo, o dourado (*Salminus maxillosus* = *Salminus brasiliensis*) ou passíveis de extinção, como a piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) e o jaú (*Paulicea luetkeni* = *Zungaro jahu*). Esta espécie é também muito utilizada por usinas hidrelétricas em programas de repovoamento de reservatórios.

Por ser uma espécie migradora, a produção do curimba em cativeiro pode ser prejudicada por não se reproduzirem naturalmente nos lagos e açudes. Devido a isso, têm-se desenvolvido técnicas para otimizar o período reprodutivo dessa espécie, como indução da espermiacão e da desova por aplicação de hormônios. Para tornar o período reprodutivo ainda mais eficiente, podem-se utilizar tecnologias de preservação de sêmen, como o resfriamento e a criopreservação.

Dessa forma, o estudo das técnicas de preservação de sêmen de curimba atende a interesses econômicos, tornando a reprodução mais eficaz e atendendo

também a interesses ecológicos, obtendo-se, assim, um maior número de larvas que servirão de alimento para outras espécies.

### **3.2 Volume seminal e concentração espermática**

Os volumes de sêmen e as concentrações espermáticas encontrados nas diferentes espécies de peixes são bastante variáveis. É importante o conhecimento desses valores para que se possa avaliar a qualidade do sêmen coletado e, com isso, otimizar sua utilização no processo de fertilização artificial (Viveiros, 2005).

O valor biológico está não no volume de sêmen, mas sim na quantidade de células fecundantes que ele possa conter (Fonseca, 1992), sendo muito variável entre as diversas espécies e dentro de uma mesma espécie, de acordo com a estação do ano, o clima, o período de repouso sexual, o método de coleta e o tamanho de reprodutores. A frequência de coleta tem um grande efeito sobre o volume liberado por peixe.

Para *Scophthalmus maximus* (Suquet et al., 1992), *Oncorhynchus mykiss* (Buyukhatipoglu & Holtz, 1984), *Salmo salar* (Gjerd, 1984) e *Dicentrarchus labrax* (Zohar et al., 1984), coletas quinzenais e semanais resultaram na liberação de decrescentes volumes de sêmen em função do tempo. Estudos têm mostrado que a estimulação hormonal pode induzir aumento no volume de sêmen (Billard, 1987), porém, não foi encontrada diferença significativa no volume de sêmen de *Prochilodus marggravii* hipofisados e não hipofisados, embora o volume obtido tenha sido superior nos primeiros (Shimoda et al., 1997).

Várias características seminais podem ser utilizadas para a avaliação qualitativa do sêmen. Uma das mais práticas é a mensuração da concentração espermática, que pode ser feita imediatamente após a coleta do sêmen. A

concentração, ou densidade, espermática expressa a quantidade de espermatozoides por volume de sêmen, podendo ser determinada por meio de contagem em câmaras volumétricas, mediante diluição do sêmen.

Valores de concentração, assim como suas variações de acordo com o peso e idade do peixe, época do ano, frequência de coleta e porção do ejaculado, foram estudados por diversos autores, inclusive no Brasil. O método mais comum para a determinação da concentração espermática (células espermática/mL de sêmen) é a contagem de espermatozoides, por meio de uma câmara hematimétrica (Buyukhatipoglu & Holtz, 1984). A utilização da câmara hematimétrica de Neubauer, entretanto, apresenta alguns inconvenientes. Existe a necessidade de se esperar a precipitação dos espermatozoides no fundo da câmara e, para sua utilização, é preciso realizar altas diluições, que poderiam incorrer em erros (Tatson & Godinho, 2003). Métodos alternativos têm sido propostos, podendo-se citar a contagem na câmara de Makler (Ravinder et al., 1997; Lahnsteiner et al., 1998; Ribeiro, 2001; Tatson & Godinho, 2003), a espectrofotometria (Silveira et al., 1987; Ciereszko e Dabrowski, 1993) e o espermátocrito (Lim et al., 1997; Ciereszko & Dabrowski, 1993; Kavamoto et al., 1986; Poole & Dillani, 1998; Ribeiro, 2001).

A concentração espermática pode variar dentro do mesmo gênero. Em piapara (*Leporinus obtusidens*), foi encontrada concentração de  $16 \times 10^9$  espermatozoides/mL, quando induzidas (Murgas et al., 1999). Essa concentração é dez vezes maior que a encontrada no estudo com piavuçu (*Leporinus macrocephalus*), por Streit Jr. et al. (2003). Ainda segundo esse autor, as características fisiológicas reprodutivas do piavuçu podem determinar essa diferença de concentração quando comparado com a piapara, apesar do gênero ser o mesmo. Em curimba, diferentes valores de concentração espermática foram encontrados por vários autores, assim como em outros peixes (Tabela 1).



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

Nome comum e espécie	Volume (mL)	Concentração espermática*	Autores
Curimatã-pacu ( <i>Prochilodus marggravii</i> )	ND	19,2 a 26,6	Godinho & Cóser (1995)
Curimbatá ( <i>Prochilodus scrofa</i> )	ND	8,6 a 28,7	Shimoda et al. (1997)
		13,3 a 20,5	Godinho & Cóser (1995)
Curimbatá ( <i>Prochilodus lineatus</i> )	0,5 a 3,0	14,4 a 20,3	Cruz (2001)
		13,3 a 20,5	Godinho & Coser (1995)
		14,1 a 20,3	Ribeiro (2001)
Dourado ( <i>Salminus maxillosus</i> )	ND	31,3 a 37,3	Miliorini (2006)
		4,3 a 10,8	Godinho & Coser (1995);
	13,1±3,2	5,7 ± 1,6	Oliveira (2006)
Matrinxã ( <i>Brycon cephalus</i> )	4,0	9,6	Silveira (2000)
Pacu-aranha ( <i>Piaractus mesopotamicus</i> )	7,2 ±4,6	7,1 a 11,1	Godinho & Cóser (1995)
		36,6 a 48,1	Bedore (1999)
Piapara ( <i>Leporinus elongatus</i> )	ND	31,7 a 43,1	Shimoda (1999)
		7,0 -16,0	Godinho & Cóser (1995)
Piau-açu ( <i>Leporinus macrocephalus</i> )	0,05 a 0,2	3,5 a 7,6	Oliveira et al. (2004)
Pintado ( <i>Pseudoplatystoma coruscans</i> )	ND	11,2 ± 2,8	Ribeiro (2001)
		8,0 a 16,0	Godinho & Cóser (1995)
Piracanjuba ( <i>Brycon orbignyanus</i> )	14,5	10,0 a 14,0	Bedore (1999)
		10 a 20	3,9 a 6,1
Pirapitinga ( <i>Brycon nattereri</i> )	7,6 ± 1,1	> 15	Maria (2005)
		30,0 ± 5,6	Oliveira (2006)

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

### 3.3 Motilidade dos espermatozóides e ativadores do sêmen

Os espermatozóides de peixes teleósteos são imóveis nos testículos e no plasma seminal (Leung & Jamieson, 1991), e adquirem motilidade assim que

entram em contato com a água. A diferença entre a menor pressão osmótica da água em relação àquela do plasma seminal é essencial para a iniciação da motilidade dos espermatozóides em peixes de água doce.

Estudos sobre a motilidade espermática de peixes são restritos a um limitado número de espécies. Aproximadamente 20 delas foram estudadas, muito embora mais de 20.000 sejam conhecidas (Billard e Cosson, 1992). Todas as observações sobre motilidade e estudos bioquímicos relatados foram realizadas mediante diluição do sêmen. Uma vez que a duração da motilidade é curta (1-2 minutos para os espermatozóides da maioria das espécies) e o movimento espermático varie durante a fase de motilidade, a diluição é uma peça chave para a determinação da dinâmica de ativação. Ainda segundo os mesmos autores, a sobreposição dos fatores de inibição (alta concentração de potássio e osmolaridade), que acarretaria a ativação simultânea de todos os espermatozóides viáveis, somente poderia ser obtida mediante uma diluição seminal da ordem de 1.000 vezes. Esta diluição poderia iniciar a motilidade de forma simultânea em 100% dos espermatozóides potencialmente ativáveis.

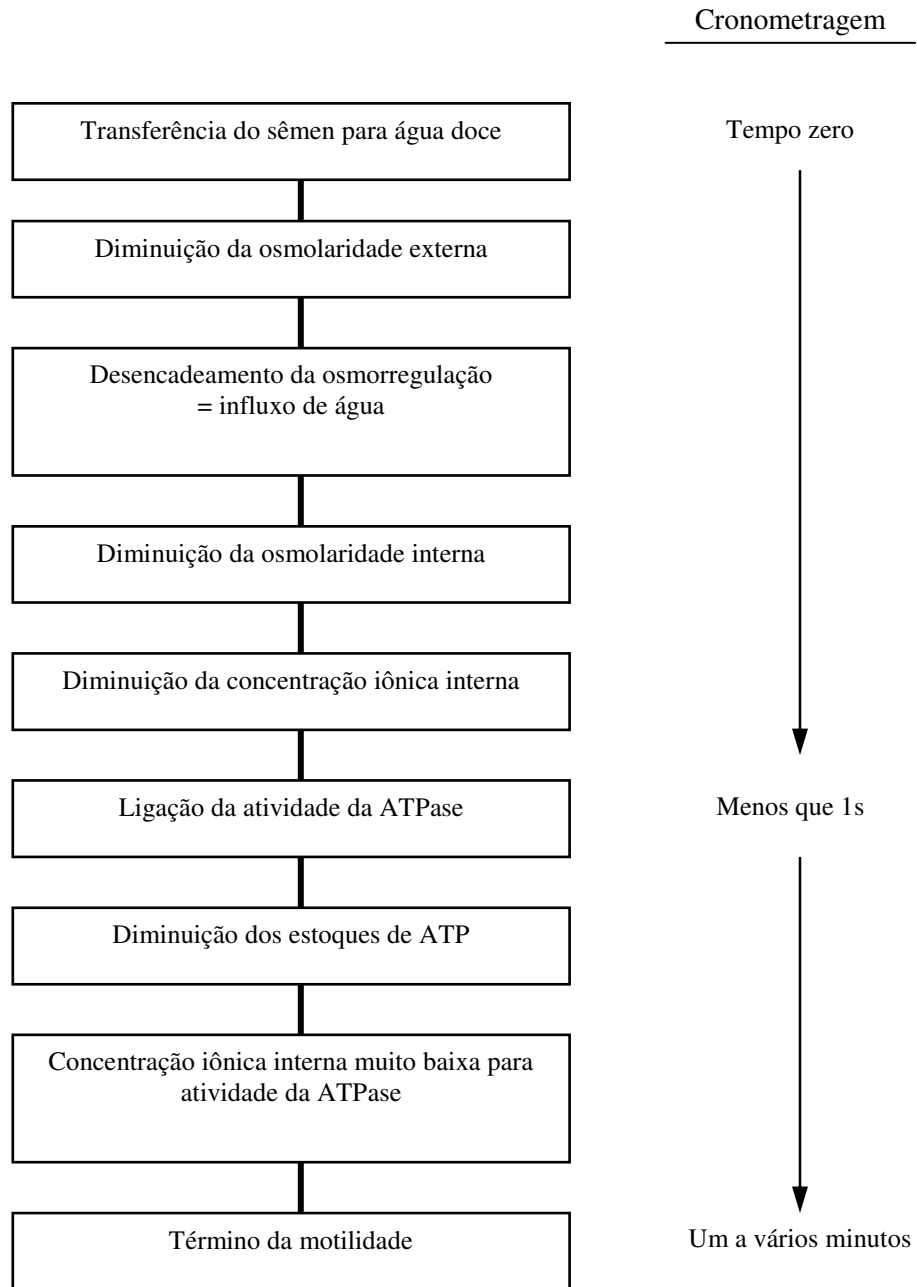
A menores diluições, apenas alguns dos espermatozóides são ativados após mistura com diluente, enquanto outros se tornam progressivamente ativos posteriormente.

A avaliação da motilidade espermática em peixes tem progredido significativamente com a utilização de gravação de vídeos e análise de imagens (Iwamatsu et al., 1993; Trippel & Neilson, 1992) ou iluminação estroboscópica e microscopia de campo escuro (Cosson et al., 1985). Além dessas técnicas, o software CASA (analisador de motilidade espermática assistida por computador), que é amplamente usado para avaliar sêmen de aves e mamíferos, vem sendo usado em peixes e fornecendo parâmetros de motilidade espermática que poderiam estar relacionados a taxas de fertilização (Van Look et al., 2000). Embora estas técnicas estejam sendo desenvolvidas, a avaliação subjetiva da

motilidade espermática é muito prática, necessitando apenas de microscópio óptico e do treinamento do avaliador.

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

O esquema ilustrado na Figura 1 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 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 (Cosson, 2004).



**FIGURA 2.** Sucessão de eventos desencadeadores da motilidade espermática em espécies de água doce. Modificado de Cosson (2004).

A determinação da solução adequada à ativação da motilidade espermática, sem comprometer a qualidade seminal, torna-se uma questão importante em trabalhos de criopreservação em peixes (Bedore, 1999). Além desse aspecto, a concentração da solução ativadora e a proporção ativador:sêmen deve ser considerada conjuntamente durante a ativação da motilidade espermática. Existem substâncias que podem ser ativadoras ou diluidoras, alterando apenas suas concentrações, como, por exemplo, o  $\text{NaHCO}_3$  e o  $\text{NaCl}$ . Entre as soluções ativadoras mais empregadas pelos pesquisadores, podem ser destacadas a água destilada e, em diferentes concentrações, o cloreto de sódio (Cruz, 2001, Maria et al., 2006), o carbonato ácido de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) (Fogli da Silveira et al., 1990; Miliorini et al., 2005), o cloreto de potássio (Lanhsteiner et al., 1995; Ravinder et al., 1997) e até mesmo a uréia (Carolsfeld et al., 2003b).

No sêmen de curimatã-pacu (*Prochilodus marggravii*), as melhores taxas de motilidade em soluções de  $\text{NaCl}$  foram obtidas em baixas concentrações, entre 25 e 75 mM, considerando também que bons resultados foram obtidos em água destilada (Bedore et al., 1997). Soluções de  $\text{NaCl}$  com concentrações de 200 mM e 150 mM não ativam os espermatozoides, enquanto que, em concentrações de 100 mM a 25 mM, as taxas de motilidade crescem gradativamente, mas são inferiores, quando comparadas com água destilada para o sêmen de curimatã (Cruz, 2001). Na avaliação do efeito de soluções de  $\text{NaCl}$  em diferentes concentrações sobre o sêmen de pacu e piracanjuba, observou-se que os espermatozoides, em concentrações de 150 mM ou maiores, permanecem imóveis e, em concentrações entre 25 mM e 75 mM, apresentaram as mais altas taxas de ativação (Bedore, 1999). Em bagre africano (*Clarias gariepinus*), a motilidade espermática caiu parcialmente em solução de  $\text{NaCl}$  entre 50 mM e 100 mM e, em soluções com concentrações acima de 200 mM, a motilidade foi totalmente inibida (Mansour et al., 2002). A solução ativadora de  $\text{NaHCO}_3$  119

mM produziu resultados significativamente superiores a NaCl 25 mM e água destilada, quando testadas em sêmen criopreservado com os crioprotetores DMSO, dimetilacetamida e propilenoglicol, na espécie piau-açu (*L. macrocephalus*) (Ribeiro, 2003).

A solução de NaHCO<sub>3</sub> 119 mM pode ser usada satisfatoriamente como ativadora após o descongelamento. No entanto, durante a fertilização, os ovos se aglutinam no fundo do recipiente, fazendo com que a taxa de eclosão seja zero (Silveira, 2000). A razão sêmen:ativador é outro aspecto que varia significativamente entre espécies e, mesmo, entre estudos (Cruz, 2001) e representa uma dificuldade em relação à estimativa da motilidade espermática. Muitas vezes, alguns espermatozóides encontram-se imóveis e em diluições subseqüentes apresentam movimento. Uma diluição relativamente alta (1:1000) é necessária ao início simultâneo da motilidade em 100% das células espermáticas (30 µL -50µL de solução para ativar cerca de 2 µL de sêmen) (Bedore, 1999). Em baixas diluições, somente alguns espermatozóides são ativados, enquanto outros têm sua ativação tardia. Este fenômeno deve-se à diluição insuficiente ou à mistura inadequada da solução ativadora com o sêmen.

### **3.4 pH e osmolaridade do sêmen**

O pH tem sido descrito como um dos maiores fatores ativadores de sêmen de diversas espécies de peixe (Alavi & Cosson, 2005). Em alguns casos, tem sido relatado o seu efeito sobre capacidade fertilizante do sêmen, como nos resultados de Chao et al. (1992) e de Saad & Billard (1987), que estudaram o efeito do pH sobre a capacidade fertilizante em *Cyprinus carpio* e *Epinephelus malabaricus*, respectivamente. Soluções diluidoras não induziram motilidade em espermatozóides de truta arco-íris quando o pH foi ajustado a valores abaixo de 7,8 (Baynes et al., 1981). Estudos feitos por Baynes et al. (1981) e por Billard & Cosson (1988; 1989; 1992) indicam que íons Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> podem superar o

efeito inibitório do pH. Ao contrário, condições alcalinas, isto é, pH similar ou maior que aqueles do plasma seminal, aparentemente, melhoram a motilidade espermática e a habilidade fertilizante dos espermatozóides salmónídeos (Billard 1981; Billard et al., 1974). O pH do plasma seminal mensurado para salmónídeos ficou entre 7,5 a 8,5. Esses resultados demonstram que existe uma correlação significativa entre pH do plasma seminal e a motilidade espermática ou taxas de fertilização (Alavi & Cosson, 2005).

Billard (1986) e Gatti et al. (1990) relataram que o pH interno dos espermatozóides varia em paralelo com o pH externo e que aquele é cerca de 1 unidade pH abaixo deste. O pH, provavelmente, influencia a concentração protônica intracelular, a qual, subseqüentemente, afeta o potencial de membrana, bem como o comportamento da motilidade (Boitano & Omoto, 1992).

Billard & Cosson (1988) relataram que motilidade espermática ótima da truta arco-íris (*Parasalmo gairdneri* = *Oncorhynchus mykiss*) é em pH 9, quando a temperatura está entre 5°C-21°C. Em cyprinídeos, tem sido demonstrado que os pHs intra e extracelulares, bem como a concentração iônica da solução ativadora, influenciam a ativação e a duração da motilidade espermática (Marian et al., 1993). Lahnsteiner et al. (1998) relataram uma correlação significativa entre o pH do plasma seminal e a percentagem de espermatozóides potencialmente móveis, a percentagem de espermatozóides com motilidade linear e a velocidade de natação. Esses resultados sugerem que o pH pode ser uma característica importante do plasma seminal influenciando o potencial para motilidade em espermatozóides de cyprinídeos (Alavi & Cosson, 2005).

Poucos estudos relatam a osmolaridade do sêmen de peixes nativos, sem diluição. Morisawa et al. (1983) observaram, em espécies de água doce, osmolaridades médias de 317 e 266 mOsmol/kg, respectivamente, no plasma seminal e sanguíneo do goldfish (*Carassius auratus*). Trabalhando com a carpa

(*Cyprinus carpio*), o mesmo autor encontrou 302 mOsmol/kg como osmolaridade do fluído seminal e sanguíneo. A osmolaridade, ou pressão osmótica, tem influência sobre a motilidade espermática, sendo a ativação dos espermatozóides parcial ou totalmente dependente de iso ou hipotonicidade da solução diluente em relação ao plasma seminal (Shimoda, 1999). Em salmonídeos, alta pressão osmótica (400 mOsmol/kg) inibe a motilidade do espermatozóide (Morisawa & Suzuki, 1980; Turdakov, 1970). A pressão osmótica do sêmen (aproximadamente 300 mOsmol/kg) não é suficiente para manter a imobilidade do espermatozóide. Em cyprinídeos, a pressão osmótica é o principal fator que inibe a motilidade (Morisawa & Suzuki, 1980; Morisawa et al., 1983), sendo esta iniciada em meios de pressões osmóticas inferiores a 150-200 mM (Plouidy & Billard, 1982; Morisawa et al., 1983). Variações na pressão osmótica induzem a motilidade espermática em muitas espécies de peixe (Suquet et al., 1994). Meios hipotônicos ativam a motilidade do espermatozóide em cyprinídeos, tais como o *Carassius auratus* e a carpa (Morisawa et al., 1983). A motilidade é ativada no *Scophthalmus maximus* pela diluição em meios isotônicos e hipertônicos. Entretanto, a duração do movimento é menor em diluentes isotônicos (Suquet et al., 1994). Segundo Chamberyron & Zohar (1990), esta observação sugere o envolvimento de outros fatores além da pressão osmótica na ativação. A alta concentração de potássio inibe a motilidade espermática em salmonídeos, mas não em cyprinídeos (Morisawa et al., 1983).

### **3.5 Resfriamento do sêmen**

A preservação de gametas de peixes por meio do resfriamento tem sido estudada em algumas espécies de peixes tropicais com resultados satisfatórios. Os espermatozóides de peixes são imóveis no plasma seminal. Esta característica favorece a sua preservação a curto prazo, já que eles não requerem energia para locomoção. O resfriamento é uma técnica simples, que permite que



o sêmen esteja disponível por intervalo de tempo maior para a fertilização de ovócitos liberados por fêmeas hormônio induzidas, o que assegura maior produtividade no processo reprodutivo. Por facilitar o uso de um grande número de machos por fêmea, pode ajudar no progresso do melhoramento genético da prole resultante (Marques & Godinho, 2004).

Segundo Carolsfeld & Harvey (1999), uma solução diluidora deve ser utilizada no processo de resfriamento, pois a diluição diminui a competição dos espermatozoides por oxigênio e espaço. Além disso, o uso de diluidores pode estabilizar as condições físico-químicas durante a estocagem do sêmen, prolongando a viabilidade dos espermatozoides. Os diluidores são soluções de sais ou de carboidratos que ajudam a manter a viabilidade das células durante o resfriamento e o congelamento. Para que essas soluções funcionem bem como diluidores, algumas condições são exigidas: o diluidor deve ser isotônico ao sêmen para não ativar a motilidade espermática, ser estável ao longo do armazenamento e ser estéril.

A diluição do sêmen em solução com mesma composição do plasma seminal permite melhor aproveitamento da sua capacidade fecundante, principalmente levando-se em conta que a quantidade de sêmen utilizada em procedimentos rotineiros de desova induzida é maior do que o necessário (Tan-Fermin et al., 1999). Soluções de formulações mais simples têm obtido grande sucesso como diluidoras. Soluções salinas que possuem como base o NaCl, com níveis entre 100 e 200 mM, apresentam pequeno risco de danos tanto hipo como hiperosmótico, para os espermatozoides de salmonídeos (Scott & Baynes, 1980). Soluções salinas de NaCl 200 mM e NaCl 200 mM + tris (solução imobilizadora de Saad), acrescidas ou não de antibiótico, preservaram a motilidade espermática em 40%, após 7 dias de resfriamento, em piracanjuba (Maria, 2005). Em um outro trabalho com resfriamento de sêmen de piracanjuba, foi possível resfriar o sêmen diluído em NaCl + tris por 6 dias, com adição de 0,1 mg/mL de gentamicina com menor crescimento bacteriano (Isaú, 2006). Outras soluções

diluidoras desenvolvidas para algumas espécies em particular, muitas vezes, podem ser utilizadas com sucesso em outras espécies. As soluções à base de glicose podem ser mais complexas, como o BTS<sup>®</sup> e MII<sup>®</sup>, ou simples, como a solução de glicose 5% vendida na forma comercial de solução energética injetável, que é viável e prática, e facilmente encontrada em farmácias a um custo baixo, esterilizada e pronta para ser utilizada.

Os diluidores BTS<sup>®</sup> (*Beltsville Thawing Solution* - Minitub<sup>®</sup>) e MIII<sup>®</sup> (Merck III- Minitub<sup>®</sup>) foram originalmente desenvolvidos para o resfriamento do sêmen suíno e têm obtido bons resultados no resfriamento do sêmen de peixes tropicais (Franciscatto et al., 2002; Maria 2005; Maria et al., 2006; Miliorini, 2006; Miliorini et al., 2002; Murgas et al., 2004; Oliveira, 2006). Os diluidores de sêmen também são importantes durante o processo de criopreservação, por carrearem os crioprotetores aos espermatozoides.

No Brasil, ainda são poucas as publicações envolvendo o resfriamento de sêmen de espécies nativas. O sêmen de matrinxã (*Brycon lundii*), pacu (*Piaractus mesopotamicos*), curimatá/piau-três-pintas (*Leporinus frederici*), piapara (*Leporinus elongatus*), curimatã-pacu (*Prochilodus marggravii*), surubim/pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*) e da piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) foi resfriado por 6-29 horas, apresentando motilidade espermática acima de 30% (Marques, 2001). O sêmen de piracanjuba foi resfriado por até sete dias, apresentando motilidade espermática em torno de 40% (Maria, 2005) e por seis dias, com motilidade espermática de 31%, com adição de gentamicina (Isaú, 2006); o de dourado foi resfriado por até 72 horas, com motilidade de 30% e sêmen de pirapitinga foi resfriado com sucesso por sete dias, com motilidade de 70% (Oliveira, 2006).

Na aplicação prática, amostras de sêmen mantidas resfriadas e com motilidade de, pelo menos, 30%, poderiam ser utilizadas em procedimentos de desova induzida em laboratório (Marques, 2001). Em se tratando de carpa

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

Segundo Stoss & Donaldson (1982), os fatores mais determinantes do sucesso do resfriamento são: redução da temperatura, fornecimento e troca de gases, prevenção do desenvolvimento bacteriano e prevenção da dessecação. Os espermatozoides de peixes cultivados, mantidos em baixas temperaturas (ao redor de 4°C), possuem baixo metabolismo e podem ser preservados por muitos dias em diluidores apropriados, sem mudanças significantes na qualidade (Kime et al., 1996).

### **3.6 Criopreservação do sêmen**

Apesar de ser possível a preservação de espermatozoides por períodos curtos, por meio de resfriamento, o congelamento em nitrogênio líquido constitui uma forma viável de manutenção dos gametas masculinos por longos períodos. Este fato torna a criopreservação de sêmen, cada vez mais, uma importante técnica utilizada na aquacultura. Muitos trabalhos relatam metodologias de preservação, a longo prazo, de sêmen de algumas espécies de peixes nativas, tais como a piracanjuba (Bedore, 1999; Carolsfeld et al., 2003; Maria, 2005), o matrinxã (*Brycon cephalus*) (Silveira, 2000), a pirapitinga (Oliveira, 2006), o dourado (Carolsfeld et al., 2003; Coser et al., 1984; Oliveira,

2006; Orfão & Viveiros, 2004;), o piau-açu (Moraes, 2004; Ribeiro & Godinho, 2003), a piapara (Carolsfeld et al., 2003), o pacu (Bedore, 1999) e o curimatã (Carolsfeld et al., 2003; Cruz, 2001; Miliorini et al., 2005).

Durante o processo de congelamento, a suspensão de espermatozoides 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 espermatozoide, 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°C 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. A desidratação severa promove desnaturação das macromoléculas e encolhimento excessivo da célula até ocorrer um colapso da membrana (Medeiros et al., 2002). Quando o sêmen é colocado diretamente no nitrogênio líquido, a membrana plasmática e a peça intermediária podem desaparecer inteiramente. Por outro lado, quando o sêmen é colocado no vapor de nitrogênio líquido, os espermatozoides sofrem congelamento gradual e as estruturas membranosas não são muito alteradas, apesar de o aspecto da cromatina ser consideravelmente modificado (Billard, 1983).

No processo de criopreservação, o sêmen, ao ser congelado, necessita, antes, ser diluído em meio contendo diluidor e crioprotetor. Este composto é formulado para prevenir crioinjúrias aos espermatozoides e também a iniciação da motilidade. Os diluidores, assim como no resfriamento, não devem ativar a

motilidade espermática, ser estáveis ao longo do tempo e estéreis. Além disso, os diluidores devem ser carreadores de crioprotetores.

Os crioprotetores devem ser adicionados ao meio diluidor para que haja proteção do espermatozóide durante o congelamento e o descongelamento (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. Além desses, o metilglicol também tem mostrado eficiência como crioprotetor.

Na criopreservação de sêmen de piracanjuba, o metilglicol foi usado pela primeira e foi o crioprotetor mais eficiente quando comparado com o DMSO e o metanol (Maria et al., 2006). Os crioprotetores extracelulares funcionam de forma diferente; em vez 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 na 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 toxicidade nos sistemas celulares.

Poucos espermatozoides das espécies já estudadas têm sobrevivido a baixas temperaturas de congelamento sem crioprotetores. A adição destas substâncias ao sêmen estende a tolerância dos espermatozoides 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).

### **3.6.1 Volume das palhetas**

A maioria dos trabalhos com criopreservação de sêmen peixes utiliza escala de laboratório para desenvolver os protocolos de criopreservação, envasando o sêmen em palhetas de 0,5 mL. Isto ocorre porque muitas espécies de peixes produzem pequena quantidade de sêmen, impossibilitando a execução de experimentos envolvendo seleção de meios crioprotetores em interação com volume de palheta e com varias repetições.

Em escala comercial, a fertilização de ovos com sêmen em palhetas de volume de 0,5 mL pode ser mais dispendiosa. Assim, o uso de palhetas maiores facilita o processo de fertilização em maiores quantidades de ovócitos. Os poucos trabalhos que foram feitos comparando volumes de palhetas não encontraram diferenças significativa entre os diferentes volumes. Oliveira (2006), criopreservando sêmen de pirapitinga, encontrou motilidades espermáticas semelhantes nas palhetas de 0,25 e 0,5 mL. Silveira (2000), trabalhando com matrinxã, não encontrou diferença entre a taxa de eclosão do sêmen criopreservado em palhetas de 0,5 ou 4,0 mL. Lahnsteiner et al. (2003) não encontraram diferenças significativas nas taxas de eclosão usando sêmen criopreservado em palhetas de 0,5 e 1,2 mL em algumas espécies de

cyprinídeos. E também na criopreservação de sêmen da espécie matrinxã-da-Colômbia, envasado em palhetas de 0,5 e 4,0 mL, não foi encontrada diferença significativa na motilidade espermática entre os dois tamanhos de palhetas (Velasco-Santamaría et al., 2006).

### **3.6.2 Taxa de descongelamento**

Durante o congelamento, as células perdem água e desidratam. Ao serem descongeladas, ocorre o processo inverso com a reidratação das células pelo influxo de água para seu interior (Holt, 2000). Segundo Leung (1991), o descongelamento rápido é necessário para evitar a recristalização, ou seja, o reagrupamento de pequenos cristais de gelo em grandes cristais de gelo, letal para a célula. Normalmente, o descongelamento é feito mergulhando-se as palhetas em banho-maria.

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

Diversos autores utilizam diferentes tempos e temperaturas para descongelar o sêmen estocado em palheta de 0,5 ml. No descongelamento de sêmen de algumas espécies de salmonídeos, foi utilizada a temperatura de 25°C,

por 30 segundos (Lahnsteiner et al., 1997); em sêmen de curimba, utilizaram-se 33°C, por 14 segundos (Cruz, 2001). Murgas et al. (2001) descongelaram o sêmen de piracanjuba, a 60°C, por 5 segundos e Maria (2005), também trabalhando com sêmen de piracanjuba, descongelou, a 60°C, por 8 segundos. Temperaturas mais altas também já foram utilizadas para descongelar sêmen de peixe, por exemplo, na espécie matrinxã-da-Colômbia, Velasco-Santamaría et al. (2006) utilizaram a temperatura de 80°C, por 10 segundos.



#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BAYNES, S. M.; SCOTT, A. P.; DAWSON, A. P. Rainbow trout, *Salmo gairdneri*, spermatozoa: Effects of cations and pH on motility. **Journal of Fish Biology**, London, v. 19, n. 3, p. 259-267, 1981.

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

BEDORE, A. G.; CARDOSO, E. L.; GODINHO, H. P. **Biologia do sêmen do Curimatã-pacu (*Prochilodus marggravii*)**. Belo Horizonte: ICB/UFMG. Departamento de Morfologia, 1997.

BELOVA, N. V. The ecological and physiological peculiarities of sperm in pond cyprinids. Communication I – Production and ecological and physiological peculiarities of the sperm of some cyprinids. **Journal of Ichthyology**, Silver Spring, v. 21, n. 1, p. 90-102, 1981.

BILLARD, R. Artificial insemination in fish. In: LAMMING, G. E. (Org.). **Marshall's physiology of reproduction**. 4. ed. Endinburgh: Churchill Livingstone, 1990. Chap. 9, p. 870-887.

BILLARD, R. The reproductive cycle of male and female brown trout (*Salmo trutta fario*): a quantitative study. **Reproduction Nutrition Development**, Paris, v. 27, n. 1, p. 29-44, 1987.

BILLARD, R. Short- term preservation of sperm under oxygen atmosphere in Rainbow trout, *Salmo gairdneri*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 23, n. 1/4, p. 287- 293, 1981.

BILLARD, R. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. **Reproduction Nutrition Development**, Paris, v. 26, n. 4, p. 877-920, 1986.

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

BILLARD, R.; COSSON, M. P. Measurement of sperm motility in trout and carp. In: De PAUW, N.; JASPER, E.; ACKEFORS, H.; WILKINS, N. (Ed.). **Aquaculture, a biotechnology in progress**. Bredene, Belgium: European Aquaculture Society, 1989. p. 499-503

BILLARD, R.; COSSON, M. P. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. **The Journal of Experimental Zoology**, New York, v. 261, n. 2, p. 122-13, Feb. 1992.

BILLARD, R.; COSSON, M. P. Sperm motility in Rainbow trout, *Parasalmo gairdneri*; Effects of pH and temperature. In: BRETON, B.; ZOHAR, Y. (Ed.). **Reproduction in fish basic and applied aspects in endocrinology and genetics**. Paris: INRA, 1988. p. 161-167

BILLARD, R.; PETIT, J.; JALABERT, B.; SZOLLOSI, D. Artificial insemination in trout using a sperm diluent. In: BLAXTER, O. H. S. (Ed.). **Symposium on the early life history of fish**. Berlin: Springer-Verlag, 1974. p. 715-723.

BOITANO, S.; OMOTO, C. K. **Trout sperm swimming patterns: role of intracellular Ca<sup>2+</sup>. Cell Motil Cytoskeleton**, St. Paul, v. 21, n. 1, p. 74-82, 1992.

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

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

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

CHAMBEYRON, F.; ZOHAR, Y. A diluent for sperm cryopreservation of gilthead seabream, *Sparus aurata*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 90, n. 3/4, p. 345-352, Nov. 1990.

CHAO, N. H. Fish sperm cryopreservation. In: \_\_\_\_\_. **Technology advancement and extension efforts**. Taiwan: Department of Aquaculture,

Taiwan Fishery Research Institute, 1991. p. 31. (Paper on International Symposium on Reproductive Biology in Aquaculture).

CHAO, N. H.; TSAI, H. P.; LIAO, I. C. Short-term and long-term cryopreservation of sperm and sperm suspension of the grouper, *Epinephelus malabracius* (Bloch & Schneider). **Asian Fish Science**, Taiwan, n. 5, p. 3-16, 1992.

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

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.

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

COSSON, J. The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa. **Aquaculture International**, London, 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**. Vienna: Cache River Press, 1999. Chap. 16, p. 162-186.

COSSON, M. P.; BILLARD, R.; GATTI, J. L.; CHRISTEN, R. Rapid and quantitative assesment of trout sperm motility using stroboscopy. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 46, n. 1, p. 71-75, 1985.

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

FOGLI DA SILVEIRA, W. F.; KAVAMOTO, E. T.; CESTAROLLI, M. A.; GODINHO, H. P.; RAMOS, S. M.; SILVEIRA, A. N. Avaliação espermiática, preservação criogênica e fertilidade do sêmen do pacu, *Piaractus mesopotamicus* (HOLMBERG, 1887), proveniente de reprodução induzida. **Boletim Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 17, p. 1-13, 1990. Único.

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

FRANCISCATTO R. T.; MURGAS, L. D. S.; MILIORINI, A. B.; SILVA, M. O. B.; LOGATO, P. V. R. Qualidade do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) e taxa de fertilidade após o resfriamento à 4°C. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 26, n. 3, p. 213-215, jul./set. 2002.

GATTI, J. L.; BILLARD, R.; CHRISTEN, R. Ionic regulation of the plasma membrane potential of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm: role in the initiation of motility. **Journal of Cell Physiology**, New York, v. 143, n. 3, p. 546-544, June 1990.

GJERDE, B. Variation in semen production of farmed atlantic salmon and rainbown trout. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 40, n. 2, p. 109-114, 1984.

GODINHO, H. P.; CÓSER, A. M. L. Bases morfofuncionais da espermatogênese e criopreservação de sêmen de peixes. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 11., 1995. **Anais. . .** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1995. p. 16-25.

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.

HULATA, G.; ROTHBART, S. Cold storage of carpa semen for short periods. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 16, n. 3, p. 267-269, 1979.

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

IWAMATSU, T.; ISHIMA, S.; NAKASHIMA, S. Movement of spermatozoa and changes in micropyles durind fertilization in medaka eggs. **Journal of Experimental Zoology**, New York, v. 266, p. 57-64, 1993.

KAVAMOTO, E. T.; SILVEIRA, W. F.; GODINHO, H. M. . Características seminais do curimbatá, *Prochilodus scrofa*, Steindachner 1881. **Boletim Instituto da Pesca**, São Paulo, v. 13, n. 2, p. 45-50, 1986.

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

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

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

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

LIM, F.; CIERESZKO, A.; DABROWSKI, K. (1996) Sperm production and cryopreservation in muskellung after carp pituitary extract and human chorionic gonadotropin injection. *Progr. Fish-Cult.*, 58:32-37

MANSOUR, N.; LAHNSTEINER, F.; PATZNER, R. A. The spermatozoon of the African catfish: fine structure, motility, viability and its behaviour in seminal vesicle secretion. **Journal of Fish Biology**, London, v. 60, n. 3, p. 545-560, Mar. 2002

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

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

MARIAN, T.; KRASZNAI, Z.; BALKAY, L.; BALAZS, M.; EMRI, M.; BENE, L.; TRON, L. Hypo-osmotic shock inducing osmolality dependent permeabilization and structural changes in the membrane of carp sperm. **Journal Histochemistry Cytochemistry**, New York, v. 41, n. 2, p. 291-298, Feb. 1993.

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

MARQUES, S.; GODINHO, H. P. Short-term cold storage of sperm from six neotropical characiformes fishes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 47, n. 5, p. 799-804, Sept. 2004.

MEDEIROS, C. M. O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A. T. D.; RODRIGUES, J. L. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, Woburn, v. 57, n. 1, p. 327-344, Jan. 2002.

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

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

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

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

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

MORISAWA, M.; SUZUKI, K.; SHIMIZU, H.; MORISAWA, S.; YASUDA, K. Effects of osmolarity and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes. **Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 107, n. 11, p. 95-103, Nov. 1983.

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

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

MURGAS, L. D. S.; SILVA, M. O. B.; MELLO, C. B.; KABEYA, D. M.; SANTANA, G. M. Avaliação quantitativa e qualitativa do sêmen de piaparas (*Leporinus obtusidens*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 23, n. 3, p. 246- 248, jul./set. 1999.

OLIVEIRA, A. V. **Resfriamento e criopreservação do sêmen de dourado *Salminus maxillosus* e de pirapitinga *Brycon nattereri***. 2006. 96 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

OLIVEIRA, A. V.; VIVERIOS, A. T. M.; MORAES, G. F.; MARIA, A. N.; ORFÃO L. H.; SOUZA, G. A. Estudo comparativo das características seminais e de soluções diluidoras de sêmen durante o resfriamento, de piau-açu (*Leporinus macrocephalus*) e piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). In: CONGRESSO DOS PÓS-GRADUANDOS DA UFLA, 13., 2004, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2004.

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

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

POUDY, M. G.; BILLARD, R. The chemical composition of the companion fluids of the gametes in the common carp *Cyprinus carpio*. In: RICHTER, C. J. J.; GOOS, H. J. T. (Ed.). **Reproductive Physiology of Fish**. Amsterdam: PIDOC, 1982.

POOLE, W. R.; DILLANE, M. G. Estimation of sperm concentration of wild and reconditioned brown trout, *Salmo trutta* L. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 29, n. 6, p. 439- 445, June 1998.

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

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

RIBEIRO, R. I. M. A.; GODINHO, H. P. Criopreservação do sêmen testicular do teleósteo “piau-açu” *Leporinus macrocephalus*. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 55, n. 1, p. 75-79, fev. 2003.

SAAD, A.; BILLARD, R. Spermatozoa production and volum of semen collected after hormonal stimulation in the carp, *Cyprinus carpio*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 65, n . 1, p. 67-77, 1987.

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

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

SHIMODA, E. **Caracterização física, química e microscópica do sêmen do pacu *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887**. 1999. 54 p. Dissertação



(Mestrado) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, R.J.

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

SILVEIRA, A. N. **Caracterização espermática, preservação criogênica do sêmen e fertilidade do matrinxã, *Brycon cephalus* (Günter, 1860) (Teleostei; Characidae)**. 2000. 45 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências. Botucatu-SP.

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

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

STREIT JR., D. P.; MORAES, G. V.; RIBEIRO R. P.; CAÇADOR W. C.; SAKAGUTI, E. S.; POVH, J. A.; SOUZA, E. D. Estudo comparativo da indução hormonal da espermiacão em piavuçu (*Leporinus macrocephalus*) com extrato de hipófise de frango, coelho e carpa. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, Maringá, v. 25, no. 2, p. 261-266, July/Dec. 2003.

SUQUET, M.; BILLARD, R.; COSSON, J.; DORANGE, G.; CHAUVAUD, L.; MUGNIER, C.; FAUVEL, C. Sperm features in turbot (*Scophthalmus maximus*): a comparison with other freshwater and marine fish species. **Aquatic Living Resources**, Montrouge, v. 7, n. 4, p. 283-294, 1994.

SUQUET, M.; OMNES, H.; NORMAND, Y.; FAUVEL, C. Influence of photoperiod, frequency of stripping and presence of female on sperm output in

turbot, *Scophthalmus maximus* L. **Aquaculture Fisheries Management**, Amsterdam, v. 23, p. 217-225, 1992.

TAITSON, P. F.; GODINHO, H. P. Evaluation of fish sperm concentration using two counting chambers. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 55, n. 2, p. 238-239, 2003. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-9352003000200020&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-9352003000200020&lng=es&nrm=iso). Acesso em: 31 out. 2006.

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

TRIPPEL, E.A. & NEILSON, J.D. (1992). Fertility and sperm quality of virgin and repeat-spawning Atlantic cod (*Gadus morhua*) and associated hatching success. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.** 49: 2118-2127.

TURDAKOV, A.F. (1970). Effect of various concentrations of Ringer Solution on trout sperm behaviour. **Biol. Nauki**, 74: 20-24.

VAN LOOK, K.J.W, MCALLISTER, B.G., HUYSKENS, G., RURANGWA, E., OLLEVIER, F. e KIME, D.E. (2000) Computer assisted Sperm Analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part A 126:163.

VELASCO-SANTAMARÍA, Y. M.; MEDINA-ROBLES V. M.; CRUZ-CASALLAS, E. P. Cryopreservation of yamú (*Brycon amazonicus*) sperm for large scale fertilization. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 256, n. 1/4, p. 267-271, June 2006.

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

ZOHAR, Y.; BILLARD, R.; WEILL, C, La reproduction de la daurade (*Spartus aurata*) et du bar (*Dicentrarchus labrax*): connaissance du cycle sexuel et contrôle de la gaméto genèses et la ponte. In: \_\_\_\_\_. **L'Aquaculture du bar et des Sparidés**. Paris, 1984. p. 3-24.

## CAPÍTULO II

Orfão, L. H. Resfriamento de sêmen de curimba *Prochilodus lineatus*:  
efeito das soluções diluidoras

In \_\_\_\_\_ **Resfriamento e criopreservação de sêmen de curimba**  
*Prochilodus lineatus* (VALENCIENNES, 1836) . 2006. 86 p. Dissertação  
(Mestrado em Produção Animal) –Universidade Federal de Lavras, Lavras,  
MG.\*

**Resfriamento de sêmen de curimba *Prochilodus lineatus*:  
efeito das soluções diluidoras**

**1 RESUMO**

O resfriamento de sêmen é um método simples de preservação de gametas. O objetivo deste trabalho foi avaliar soluções salinas ou à base de glicose, na diluição do sêmen de curimba *Prochilodus lineatus*, para preservação por meio de resfriamento a 4°C-6°C. Os trabalhos foram realizados na Estação de Piscicultura da Companhia Energética de Minas Gerais (CEMIG), em Itutinga, MG. Para o resfriamento, o sêmen foi diluído 1:10 (v/v sêmen: volume total) para a avaliação dos dois grupos de soluções diluidoras. O grupo com soluções à base de cloreto de sódio foi composto por NaCl 0,9%, NaCl 1,2% e NaCl-tris. O outro grupo, com soluções à base de glicose, foi composto por glicose 5%, BTS<sup>®</sup> 5% (glicose, citrato de sódio, EDTA, sulfato de gentamicina, NaHCO<sub>3</sub>, KCl) e M III<sup>®</sup> 6% (glicose, citrato de sódio, EDTA, sulfato de gentamicina, NaHCO<sub>3</sub>). Uma alíquota do sêmen foi mantida sem diluição, para servir de controle. A motilidade espermática foi subjetivamente avaliada após 0, 1, 2, 3, 4 e 5 dias de resfriamento, a 4°C-6°C e a ativação do sêmen foi feita com solução de NaCl 0,29%. A motilidade espermática do sêmen não diluído foi de 4% após 2 dias de resfriamento. Após cinco dias de resfriamento a 4°C-6°C, o sêmen de curimba diluído em BTS<sup>®</sup> 5% e M III<sup>®</sup> 6% apresentou motilidades espermáticas de 50%. Estes resultados mostram que é necessário um diluidor para aumentar o tempo de armazenamento

---

\* Comitê Orientador: Ana Tereza de Mendonça Viveiros - UFLA (Orientadora), José Camisão de Souza - UFLA e José Cleto da Silva Filho - UFLA (co-orientadores)

**Semen storage of curimba *Prochilodus lineatus* by cooling:  
effects of extender**

**2 ABSTRACT**

Chilled storage of semen is an easy and simple method of semen preservation. The aim of this study was to evaluate saline or glucose solutions as semen extenders of curimba *Prochilodus lineatus* after chilled storage at 4-6°C. The experiments were carried at the Fish Culture Unit of the Energy Company of Minas Gerais (CEMIG), Itutinga-MG. Semen was diluted (1:10, v/v, semen: total volume) in saline solutions (NaCl 0.9%, NaCl 1.2% or NaCl-tris) or in glucose-based solutions (glucose 5%, BTS<sup>®</sup> 5% or M III<sup>®</sup> 6%). BTS<sup>®</sup> contain glucose, sodium citrate, EDTA, gentamycin sulfate, NaHCO<sub>3</sub> and KCl, and M III<sup>®</sup> contain the same chemical composition except KCl. One semen aliquot was kept undiluted and was used as control. All samples were stored in open 5-mL test tubes at 4–6°C and motility was evaluated after 0, 1, 2, 3, 4, 5 and 6 days of storage. Sperm motility was subjectively estimated by adding of activation medium (NaCl 0.29%). Motility of only 4% was observed on control undiluted semen after 2 days at 4-6°C. Curimba semen diluted in BTS<sup>®</sup> 5% or in M III<sup>®</sup> 6% maintained motility above 50% for as long as 5 days at 4-6°C. This results show that semen of curimba must be diluted before chilling storage to maintain high sperm motility.

---

\* Guidance Committee: Ana Tereza de Mendonça Viveiros - UFLA (Orientadora), José Camisão de Souza– UFLA e José Cleto da Silva Filho– UFLA (co-orientadores)

### 3 INTRODUÇÃO

Novas biotecnologias visando à maior eficiência na reprodução animal vêm sendo desenvolvidas. Em peixes, muitas dessas técnicas se aplicam à reprodução artificial e à preservação de sêmen. As técnicas de preservação de sêmen facilitam a reprodução artificial, contribuem em programas de melhoramento e conservação genética e na redução no número de reprodutores. O resfriamento de sêmen é um método prático e simples para uso na rotina de pisciculturas e programas de preservação de espécies em risco de extinção, além de facilitar as trocas de materiais genéticos entre as fazendas produtoras de pescados. No entanto, é uma técnica ainda pouco utilizada, devido, principalmente, ao curto período de armazenamento do sêmen resfriado, evidenciado por baixas taxas de motilidade espermática.

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

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

No Brasil, ainda são poucas as publicações envolvendo o resfriamento de sêmen de espécies nativas, mas, algumas das espécies nativas do alto rio Grande já tiveram o sêmen resfriado. O sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) foi resfriado por até 7 dias, apresentando motilidade espermática em torno de 40% quando diluído em solução de NaCl-tris ou NaCl 1,2% (Maria, 2005); o de dourado (*Salminus maxillosus*= *Salminus brasiliensis*) foi resfriado por até 2 dias, diluído em glicose 5% com motilidade de 30% e o de pirapitinga (*Brycon nattereri*) foi resfriado, com sucesso, por 7 dias, quando diluído em BTS<sup>®</sup>, com motilidade de 70% (Oliveira, 2006). Sêmen de peixes de outras bacias, como matrinxã (*Brycon lundii*), pacu (*Piaractus mesopotamicos*), curimatá/piau-três-pintas (*Leporinus frederici*), piapara (*Leporinus elongatus*), curimatã-pacu (*Prochilodus marggravi*), surubim/pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*) e piracanjuba também já foi resfriado por 6-29 horas, apresentando motilidade espermática acima de 30% (Marques, 2001).

Entre as várias espécies de peixes migradores do rio Grande, encontra-se o curimba (*Prochilodus lineatus*) (Valenciennes, 1836). As estações de piscicultura têm grande interesse no sucesso da sua reprodução, uma vez que as larvas de curimba servem de alimento para espécies carnívoras de grande importância comercial, como, por exemplo, o dourado e espécies passíveis de extinção, como a piracanjuba e o jaú (*Paulicea luetkeni*= *Zungaro jahu*). Além disso, a carne de curimba é uma fonte de proteína de alta qualidade, consumida por comunidades ribeirinhas e populações mais carentes, já que o preço de mercado é menor quando comparado ao de outras espécie de peixes.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de soluções diluidoras à base de glicose e de cloreto de sódio, durante o processo de resfriamento de sêmen de curimba.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido durante o período reprodutivo de 2005/2006. Foram utilizados machos de curimba *Prochilodus lineatus* provenientes da Estação de Piscicultura da Companhia Energética de Minas Gerais (CEMIG), Itutinga, MG. Os animais que possuíam a papila urogenital hiperêmica e que liberavam sêmen sob leve massagem abdominal foram selecionados. Após a seleção, os machos receberam uma única dose de extrato bruto de hipófise de carpa (5 mg/kg do peso corporal) para induzir a espermiacção. Depois de 8 horas, o sêmen de cada animal foi coletado individualmente, de acordo com o manejo da estação. A coleta foi realizada em tubos de ensaio, evitando-se a contaminação do sêmen com água, sangue ou urina por meio da observação em microscópio óptico, como explicado a seguir.

### 4.1 Avaliação seminal

Imediatamente após a coleta, foram verificadas as seguintes características seminais: volume de sêmen, concentração espermática estimada por meio de uma câmara hematimétrica Neubauer “Improved” e pH do sêmen medido com o medidor de pH portátil digital (LT Lutron PH – 206). A motilidade espermática foi avaliada em 5 µL de sêmen colocados em lâminas e levadas ao microscópio óptico previamente focalizado em 400 x. As amostras que apresentavam motilidade (auto-ativação) foram consideradas contaminadas e descartadas. Nas amostras com espermatozóides imóveis, a motilidade espermática foi induzida com NaCl 0,29% (Maria, 2005) na diluição 1:5 e subjetivamente determinada. Somente as amostras com motilidade espermática superior a 80% foram utilizadas no experimento.



#### 4.2 Diluidores de sêmen

Sêmen de 5 machos foram individualmente adicionados, 1:10 (v/v; volume total), em cada um dos diluidores descritos na Tabela 1.

TABELA 1- Características dos diluidores utilizados no resfriamento de sêmen de curimba *Prochilodus lineatus*. UFLA, Lavras, MG, 2006.

<b>Soluções diluidoras</b>	<b>Fórmula (%)</b>	<b>mOsm kg<sup>-1</sup></b>	<b>pH inicial</b>	<b>Referência</b>
NaCl 0,9%	NaCl 0,9	285	7,1	Maria, 2005
NaCl 1,2%	NaCl 1,2	326	7,1	Maria, 2005
NaCl –tris <sup>1</sup>	NaCl 1,2; tris 0,4	428	10,2	Linhart et al., 1993
Glicose	Glicose 5% - C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	404	7,0	Carolsfeld et al, 2003
BTS <sup>®</sup> 5% Minitub <sup>®</sup>	Glicose monohidratada 80; Citrato de sódio 12,7; EDTA 2,6; Sulfato de gentamicina 0,5; NaHCO <sub>3</sub> 2,6; KCl 1,6.	332	7,2	Maria, 2005
M III <sup>®</sup> 6% Minitub <sup>®</sup>	Glicose monohidratada 89; Citrato de sódio 3,0; EDTA 3,0; Sulfato de gentamicina 0,5; NaHCO <sub>3</sub> 4,2;	367	7,0	Maria, 2005

<sup>1</sup> Solução estabilizadora de Saad

Todos os diluidores tiveram o pH ajustado para 7,6, um dia antes do experimento ser realizado. Uma alíquota de sêmen de cada macho foi mantida sem diluição (controle). O sêmen diluído e o controle foram levados ao refrigerador (4°C-6°C) em tubos de ensaio de 5 mL (1 cm diâmetro x 7,5 cm altura). As taxas de motilidade espermática foram avaliadas nos dias 0, 1, 2, 3, 4 e 5 de incubação a 4°C, conforme descrito para o sêmen fresco. Este experimento foi conduzido em delineamento em blocos casualizados (1 bloco = 1 macho), com parcelas subdivididas no tempo.

#### **4.3 Análise estatística**

Para a variável observada (taxa de motilidade espermática), o resíduo de cada modelo foi testado para distribuição normal. Os valores que não apresentaram distribuição normal foram transformados em arc seno  $\sqrt{X}$ , para sua normalização. Então, os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade, utilizando-se o pacote computacional Sistema de Análise de Variância – Sisvar (Ferreira, 2004).

## **5 RESULTADOS**

### **5.1 Avaliação seminal**

O peso corporal dos peixes e as características seminais estão descritos na Tabela 2. Não houve correlação entre o peso corporal dos peixes e o volume de sêmen coletado.

TABELA 2- Peso corporal, volume do sêmen e concentração espermática ( $\times 10^9$  sptz/mL de sêmen) de curimba *Prochilodus lineatus*. UFLA, Lavras, MG 2006

<b>Peixe</b>	<b>Peso corporal (kg)</b>	<b>Volume do sêmen (mL)</b>	<b>Sptzs <math>\times 10^9</math>/mL de sêmen</b>	<b>pH do sêmen</b>	<b>Motilidade inicial</b>
1	1,5	2,5	13,5	7,8	100
2	1,7	1,7	19,6	7,7	100
3	1,5	1,9	19,0	7,6	100
4	1,2	3,1	23,5	8,3	100
5	1,3	2,7	15,5	8,2	100
<b>Média</b>	<b>1,4</b>	<b>2,4</b>	<b>18,3</b>	<b>7,9</b>	<b>100</b>
<b>DP</b>	<b>0,19</b>	<b>0,5</b>	<b>3,8</b>	<b>0,3</b>	<b>0</b>

## 5.2 Diluidores do sêmen

As motilidades espermáticas do sêmen diluído e resfriado a 4°C-6°C estão apresentadas na Tabela 3. Todos os diluidores testados foram capazes de manter alta a motilidade espermática imediatamente após diluição (dia 0) e após o dia 1 de resfriamento. No dia 2, o sêmen controle e aquele diluído em solução de NaCl-tris tiveram motilidade espermática inferior ao do sêmen diluído nos outros diluidores ( $P < 0,05$ ). Nos dias 3, 4 e 5 do resfriamento, o sêmen diluído em BTS<sup>®</sup> e MIII<sup>®</sup> apresentou as maiores taxas de motilidade espermática.

TABELA 3- Motilidade espermática (expressa em %; média  $\pm$  desvio padrão; n= 5 peixes) do sêmen de curimba *Prochilodus lineatus* diluído em diferentes diluidores e resfriado a 4-6°C por até 5 dias. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Diluidores	Armazenamento a 4-6°C (dias)						
	0	1	2	3	4	5	
NaCl 0,9%	97 $\pm$ 4 <sup>a</sup>	66 $\pm$ 5 <sup>a</sup>	56 $\pm$ 5 <sup>a</sup>	18 $\pm$ 18 <sup>b</sup>	5 $\pm$ 5 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	
NaCl 1,2 %	94 $\pm$ 8 <sup>a</sup>	60 $\pm$ 10 <sup>a</sup>	44 $\pm$ 19 <sup>a</sup>	24 $\pm$ 26 <sup>b</sup>	4 $\pm$ 4 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	
NaCl-tris	93 $\pm$ 4 <sup>a</sup>	58 $\pm$ 24 <sup>a</sup>	1 $\pm$ 13 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	
Glicose 5%	98 $\pm$ 3 <sup>a</sup>	82 $\pm$ 19 <sup>a</sup>	57 $\pm$ 24 <sup>a</sup>	36 $\pm$ 26 <sup>b</sup>	26 $\pm$ 15 <sup>b</sup>	7 $\pm$ 13 <sup>b</sup>	
BTS® 5%	100 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	93 $\pm$ 2 <sup>a</sup>	90 $\pm$ 7 <sup>a</sup>	86 $\pm$ 8 <sup>a</sup>	81 $\pm$ 15 <sup>a</sup>	52 $\pm$ 16 <sup>a</sup>	
M III® 6%	97 $\pm$ 5 <sup>a</sup>	90 $\pm$ 19 <sup>a</sup>	88 $\pm$ 8 <sup>a</sup>	82 $\pm$ 13 <sup>a</sup>	71 $\pm$ 26 <sup>a</sup>	48 $\pm$ 19 <sup>a</sup>	
Controle	100 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	74 $\pm$ 13 <sup>a</sup>	4 $\pm$ 34 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	

Médias com a mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Scott Knott (P<0,05)

-BTS® 5% (*Beltsville Thawing Solution* – Minitub®), Fórmula: glicose monohidratada 80%; citrato de sódio 12,7%; EDTA 2,6%; sulfato de gentamicina 0,5%; NaHCO<sub>3</sub> 2,6; KCl 1,6%;

-M III® 6% (Merck III- Minitub®), Fórmula: glicose monohidratada 89,2%; citrato de sódio 3,0%; EDTA 3,6%; sulfato de gentamicina 0,5%; NaHCO<sub>3</sub> 4,2%

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 Características seminais do curimba

No presente trabalho foi observada a concentração espermática de 18,3 x 10<sup>9</sup>  $\pm$  3,8 x 10<sup>9</sup> espermatozoides/mL de sêmen após hipofisação. Dados semelhantes foram observados na mesma espécie por Cruz (2001), com uma dose de 3 mg/kg de peso corporal. Porém, concentrações maiores foram

observadas no sêmen de curimba, por Miliorini (2006), que encontrou um valor de  $37,3 \pm 17,8 \times 10^9$  espermatozoides/mL, com animais também hipofisados. Em outras espécies nativas, as médias de concentração espermática encontradas foram um pouco menores:  $5,88 \times 10^9$  espermatozoides/mL, em piracanjuba (Maria, 2005) e  $5,73 \times 10^9$  espermatozoides/mL, em dourado (Oliveira, 2006). Já em uma outra espécie de Brycon, a piapara, a média de concentração foi de  $30 \times 10^9$  espermatozoides/mL.

O curimba é uma espécie que produz reduzido volume de sêmen, mesmo sendo hipofisado e este volume não sofre maiores variações ao longo do período reprodutivo (Godinho & Cóser, 1995). Neste trabalho, foi coletado um volume médio de  $2,4 \pm 0,5$  mL. Em outro trabalho, com a mesma espécie, foi encontrada uma variação no volume de 0,5 a 3,0 mL (Cruz, 2001). O volume médio de sêmen coletado de curimba foi inferior ao volume de sêmen de outras espécies nativas do rio Grande. Em piracanjuba, foi encontrado um volume médio superior a 15 mL (Maria, 2005), enquanto que, em dourado, encontrou-se um volume de 13 mL (Oliveira, 2006). Também em uma outra espécie de Brycon, a piapara, o volume médio foi de 7,6 mL (Oliveira, 2006).

Pode-se observar, de maneira geral, que as espécies de peixes que produzem sêmen de maior volume também produzem sêmen de menor concentração espermática. O volume do sêmen e a concentração espermática encontrados nas diferentes espécies de peixes são bastante variáveis. É importante o conhecimento desses valores para que se possa avaliar a qualidade do sêmen coletado e, com isso, otimizar sua utilização no processo de fertilização artificial (Viveiros, 2005). Além disso, os dados de concentração espermática permitem que seja determinado o número mínimo de espermatozoide por óvulo durante o processo de fertilização. Dessa forma, pode-se melhorar a eficiência reprodutiva dos machos, maximizando a sua utilização.

Os estudos relacionados com o pH de sêmen de peixes ainda são poucos, principalmente com peixes nativos. Neste trabalho, foi encontrado um valor médio de  $7,9 \pm 0,3$ . Em piracanjuba, o pH médio encontrado foi de  $8,2 \pm 0,2$  (Isaú, 2006). Em dourado, foi encontrada uma variação de 7,8 a 8,2 (Oliveira, 2006). Existe uma correlação significativa entre o pH do plasma seminal e a percentagem de espermatozóides potencialmente móveis, a percentagem de espermatozóides com motilidade linear e a velocidade de natação, segundo relatos de Lahnsteiner et al. (1998).

## **6.2 Resfriamento de sêmen**

Muitas vezes, ao submeter fêmeas e machos à hipofiseção para estimular a liberação dos gametas, pode ocorrer ausência de fêmeas que respondem ao tratamento. Nos casos em que os machos respondem ao tratamento, faz-se a coleta e o armazenamento do sêmen, que poderá ser utilizado para fertilizar os ovócitos das fêmeas novamente submetidas à hipofiseção ou, ainda, de outras fêmeas. Assim, o resfriamento do sêmen permite economizar e evitar o desperdício de doses do hormônio, que tem grande importância para o aumento do custo de produção em pisciculturas.

Para a avaliação da eficiência do sêmen, considera-se que amostras seminais mantidas resfriadas e com motilidade de, pelo menos, 30% podem ser utilizadas para fertilização de ovócitos, de acordo com Marques (2001).

Neste experimento, o sêmen não diluído e aquele diluído em NaCl-tris, após o dia 2 de resfriamento, apresentaram taxa de motilidade espermática inferior ao sêmen diluído nas outras soluções avaliadas. Dessa forma, fica evidente a necessidade do uso de diluidores eficientes no sêmen de curimba, quando armazenado por períodos iguais ou superiores a dois dias. Pelos resultados obtidos, observa-se que a diluição, em uma solução que preserve a

motilidade espermática, permite o resfriamento do sêmen por até cinco dias, o que pode auxiliar na rotina de pisciculturas.

A taxa de diluição do sêmen utilizada neste trabalho foi de 1:10 (volume total). Maria (2005) encontrou motilidades espermáticas maiores quando o sêmen de piracanjuba (*B. orbignyanus*) foi diluído 1:10 em NaCl 1,2% e NaCl-tris, do que quando o sêmen foi diluído 1:5 (volume total) nas mesmas soluções. Em tilápias, acredita-se que a taxa de fertilização não seja afetada quando as proporções sêmen:dilúente variarem de 1:1 a 1:24 (Rana & McAndrew, 1989). Entretanto, em peixes marinhos, uma diluição de sêmen maior que 1:10 poderia levar a uma redução da proteção realizada pelas proteínas do plasma seminal sobre a viabilidade do sêmen (Suquet et al., 2000).

Em um outro trabalho, o sêmen não diluído de curimba foi resfriado em caixa térmica de isopor, para avaliar a viabilidade do sêmen armazenado em saco plástico com ar ou oxigênio, em relação ao sêmen armazenado em tubos sem adição de ar ou oxigênio. Constatou-se haver superioridade na motilidade espermática do sêmen armazenado em saco plástico com ar ou oxigênio (Marques, 2001). Porém, a motilidade, em ambos os recipientes, foi inferior a 40%, com 20 horas de resfriamento. Dessa forma, a diluição permite que o espermatozóide tenha contato com mais oxigênio e, possivelmente, diminui o efeito da contaminação bacteriana, já que a quantidade inicial de bactérias é menor no sêmen diluído.

O pH tem sido descrito como um dos maiores fatores ativadores de sêmen de diversas espécies de peixe (Alavi & Cosson, 2005). O valor de pH mensurado do sêmen de curimba *in natura* foi, em média,  $7,9 \pm 0,3$ . Existem poucos relatos, na literatura, sobre o valor ideal de pH dos diluidores de sêmen. O nosso grupo de pesquisa tem ajustado o pH dos diluidores para 7,6, com o objetivo de uniformizar as soluções em um parâmetro. O estudo do melhor valor de pH para a solução diluidora de sêmen no resfriamento é importante porque o

pH, provavelmente, influencia a concentração protônica intracelular, a qual, subseqüentemente, afeta o potencial de membrana, bem como o comportamento da motilidade espermática em peixes (Boitano & Omoto, 1992).

Alguns estudos têm mostrado que a motilidade do espermatozóide de algumas espécies de truta é inibida em pH menor que 7,5 (Baynes et al., 1981; Billard & Cosson, 1988, 1989, Robitaille et al., 1987). Essa inibição ocorre quando o pH é inferior ao pH do plasma seminal de 7,9 (Morisawa & Morisawa, 1988). Neste experimento, o pH médio encontrado no sêmen fresco de curimba foi de  $7,9 \pm 0,3$  e as soluções diluidoras foram ajustadas para 7,6, inferior ao pH do plasma. Não houve inibição da motilidade espermática nestes diluidores com pH inferior ao do sêmen. Provavelmente, o pH ajustado (7,6) não foi ácido o suficiente para inativar o espermatozóide. Porém, esta informação deve ser considerada durante a seleção das soluções diluidoras e ativadoras do sêmen. Além disso, as taxas de fertilização podem ser influenciadas pelo pH do meio.

No resfriamento de sêmen de piracanjuba, o uso da solução de NaCl-tris ajustada para o pH 7,6 demonstrou ser mais eficiente na manutenção da motilidade espermática em comparação com o sêmen diluído nas mesmas soluções com pH 7,0; 8,2 e 8,8 ou, ainda, com o sêmen não diluído (Isaú, 2006). O pH 7,6 foi o que sofreu as menores oscilações, entre 7,5 e 7,8, durante sete dias de resfriamento, provavelmente devido ao tris, que tem ação tamponante.

No presente trabalho, foram avaliados dois grupos de soluções diluidoras: as soluções à base de glicose (glicose 5%, BTS<sup>®</sup> 5% e MIII<sup>®</sup> 6%) e as soluções à base de cloreto de sódio (NaCl 0,9%, NaCl 1,2% e NaCl-tris).

No grupo de soluções diluidoras à base de cloreto de sódio, o sêmen diluído nas soluções NaCl 0,9% e NaCl 1,2% teve comportamento semelhante e ambas foram eficazes durante dois dias de resfriamento, com motilidade em torno de 50%. No resfriamento de sêmen de piau-açu (*Leporinus macrocephalus*), o sêmen diluído em solução de NaCl 1,2% teve motilidade de



59% até dois dias de resfriamento (Moraes, 2004). Em piracanjuba, o sêmen também diluído na solução de NaCl 1,2% foi viável por até sete dias de resfriamento, com motilidade de 37% (Maria et al., 2006). Neste experimento, a solução de NaCl-tris manteve a motilidade espermática por apenas um dia de resfriamento.

Em outras espécies, como a piracanjuba, essa solução demonstrou ser um eficiente diluidor do sêmen, mantendo sua viabilidade por até sete dias de resfriamento (Isaú, 2006; Maria, 2005). As diferenças entre as soluções de NaCl-tris e NaCl 1,2% vão além da adição do tris. Com a adição deste tampão, a solução de NaCl-tris passa a ter um pH de 10,2 e a osmolaridade de 428 mosm, enquanto que a solução de NaCl 1,2 % tem pH de 7,1 e osmolaridade de 326 mosm. Em relação ao efeito do pH, este foi minimizado pelo ajuste de todas as soluções em pH 7,6. A osmolaridade, ou pressão osmótica, tem influência sobre a motilidade espermática, sendo a ativação dos espermatozoides parcial ou totalmente dependente de iso ou hipotonicidade da solução diluente em relação ao plasma seminal (Shimoda, 1999). Em salmonídeos, a alta pressão osmótica (400 mOsmol/kg) inibe a motilidade do espermatozóide (Turdakov, 1970; Morisawa & Suzuki, 1980).

Como foi visto neste trabalho, a osmolaridade da solução de NaCl-tris foi superior, comparada com a osmolaridade das outras soluções diluidoras. Sugere-se que essa alta osmolaridade da solução de NaCl-tris possa ter afetado a viabilidade espermática do sêmen de curimba resfriado. Pode-se inferir que o espermatozóide de curimba é mais susceptível a uma solução com osmolaridade maior, visto que, em outras espécies, a solução de NaCl-tris foi eficiente no resfriamento do sêmen, como na piracanjuba. A osmolaridade ideal da solução diluidora pode ser diretamente dependente da osmolaridade do sêmen. Não há relatos, na literatura, da osmolaridade do plasma seminal em peixes nativos. A solução de NaCl-tris é comumente utilizada como solução imobilizadora da

motilidade espermática do bagre Europeu (*Silurus glanis*), superando as propriedades ativadoras proporcionadas pela contaminação com água ou urina, durante a coleta de sêmen (Linhart et al., 1993).

Os diluidores que são compostos, principalmente, por glicose, se destacaram na manutenção da motilidade espermática, após três dias de resfriamento, com exceção da solução de glicose 5%. Embora o BTS<sup>®</sup> e o MIII<sup>®</sup> tenham em suas composições 80% e 89,2% de glicose, respectivamente, essa superioridade em manter alta a motilidade espermática pode ser devido à presença de sulfato de gentamicina na sua composição, que diminui o crescimento bacteriano durante o armazenamento.

Esses diluidores foram comercialmente desenvolvidos para diluição de sêmen de suíno. A solução de BTS<sup>®</sup> vem sendo estudada como diluidor de sêmen de peixe, inclusive de curimba. No resfriamento de sêmen desta espécie, o sêmen foi diluído em uma solução composta por BTS<sup>®</sup> acrescido do crioprotetor dimetilsulfóxido (DMSO), na concentração de 5% ou 10% e essa solução foi capaz de manter o sêmen com motilidade espermática de 69%, por três dias de resfriamento (Murgas et al., 2003). No presente trabalho, o sêmen diluído na solução de BTS<sup>®</sup> foi viável por até cinco dias, apresentando motilidade espermática de 52%, sem a necessidade de adição de qualquer crioprotetor. O MIII<sup>®</sup> foi testado pela primeira vez durante o resfriamento de sêmen de curimba neste experimento e mostrou ser tão eficiente quanto o BTS<sup>®</sup> na manutenção da motilidade espermática, após cinco dias de resfriamento.

A presença de bactérias pode diminuir a qualidade do sêmen por produção de enzimas extracelulares e por consumo de oxigênio (Jenkins & Tiersch, 1997). Assim, o uso de antibióticos poderia aumentar o tempo de armazenamento do sêmen, por prevenir o crescimento bacteriano.

A adição de antibióticos nos diluidores de sêmen durante o resfriamento tem sido pouco estudada em peixes. No resfriamento de sêmen de piracanjuba

diluído na solução de NaCl- tris e de NaCl 1,2% não houve diferença entre o sêmen com ou sem gentamicina, porém, os autores sugerem que doses maiores de gentamicina possam ser efetivas (Maria et al., 2006). Ainda no resfriamento de sêmen de piracanjuba, avaliando-se a solução diluidora de NaCl-tris associada a diferentes concentrações de gentamicina (0,01; 0,1; 0,5 e 1,0 mg/mL) observou-se que amostras de sêmen acrescidas de gentamicina apresentaram maior motilidade espermática em relação ao controle no dia 4. No sêmen diluído em meios que continham as concentrações de gentamicina de 0,1, 0,5 e 1,0 mg/mL, foram observadas motilidades superiores a 24% até o dia 6 de resfriamento e não houve crescimento bacteriano (Isaú, 2006).

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

Assim, nas condições apresentadas neste estudo, o sêmen de curimba pode manter-se viável, com motilidade em torno de 50%, por até 5 dias, diluído em soluções glicosadas de BTS<sup>®</sup> ou MIII<sup>®</sup>, facilitando o manejo das pisciculturas e possibilitando a troca de material genético.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BAYNES, S. M.; SCOTT, A. P.; DAWSON, A. P. Rainbow trout, *Salmo gairdneri*, spermatozoa: Effects of cations and pH on motility. **Journal of Fish Biology**, London, v. 19, n. 3, p. 259-267, 1981.

BILLARD, R.; COSSON, M. P. Sperm motility in Rainbow trout, *Parasalmo gairdneri*; Effects of pH and temperature. In: BRETON, B.; ZOHAR, Y. (Ed.). **Reproduction in fish basic and applied aspects in endocrinology and genetics**. Paris: INRA, 1988. p. 161-167

BILLARD, R.; COSSON, M. P. Measurement of sperm motility in trout and carp. In: De PAUW, N.; JASPER, E.; ACKEFORS, H.; WILKINS, N. (Ed.). **Aquaculture, a biotechnology in progress**. Bredene, Belgium: European Aquaculture Society, 1989. p. 499-503

BOITANO, S.; OMOTO, C. K. **Trout sperm swimming patterns: role of intracellular Ca<sup>2+</sup>**. **Cell Motil Cytoskeleton**, St. Paul, v. 21, n. 1, p. 74-82, 1992.

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

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

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

FERREIRA, D. F. **Sistema de Análise de Variância (Sisvar)**. ver 4. 6 (Build 61). Lavras: UFLA. Departamento de Ciências Exatas da UFLA, 2004.

GODINHO, H. P.; CÓSER, A. M. L. Bases morfofuncionais da espermatogênese e criopreservação de sêmen de peixes. In: CONGRESSO

BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 11., 1995. **Anais...** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1995. p. 16-25.

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

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

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.

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.

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.

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

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

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

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

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

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, S. & MORISAWA, M. (1988). Induction of potential for sperm motility by bicarbonate and pH in rainbow trout and chum salmon. **J. Exp. Biol.** 136: 13-22.

MURGAS, D. S.; VIVEIROS, A. T. M.; FRANCISCATTO, R. T.; MILIORINI, A. B.; SILVA, M. O. B.; Sêmen quality of curimba (*Prochilodus lineatus*) using different concentrations of dimethylsulphoxide and cooled at 4°C In: **World Aquaculture**, Salvador, BA, 2003.

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

OLIVEIRA, A. V. **Resfriamento e criopreservação do sêmen de dourado *Salminus maxillosus* e de pirapitinga *Brycon nattereri***. 2006. 96 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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

ROBITAILLE, M.G. ; MUNFORD, K.G. & BROWN, G. (1987). 31P nuclear magnetic resonance study of trout spermatozoa at rest., after motility and during short-term storage. **Biochem. Cell. Biol.** 65: 474-485.

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

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

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

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

TURDAKOV, A.F. (1970). Effect of various concentrations of Ringer Solution on trout sperm behaviour. *Biol. Nauki*, 74: 20-24.

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

### Capítulo III

Orfão, L. H. Criopreservação de sêmen de curimba *Prochilodus lineatus*:  
definição de um protocolo

In \_\_\_\_\_ **Resfriamento e criopreservação de sêmen de curimba**  
*Prochilodus lineatus* (VALENCIENNES, 1836). 2006. 86 p. Dissertação  
(Mestrado em Produção Animal) –Universidade Federal de Lavras, Lavras,  
MG.\*



**Criopreservação de sêmen de curimba *Prochilodus lineatus*:  
definição de um protocolo**

**1 RESUMO**

A criopreservação de sêmen é uma técnica que permite preservar o sêmen por tempo indeterminado. O objetivo deste trabalho foi avaliar, durante o processo de criopreservação de sêmen de curimba *Prochilodus lineatus*, meios crioprotetores, ativadores, volume de palheta e temperatura de descongelamento. Os trabalhos foram realizados na Estação de Piscicultura da Companhia Energética de Minas Gerais (CEMIG), em Itutinga, MG. Foram realizados dois experimentos. No experimento 1 foram avaliados quatro diluidores (NaCl 0,9%, glicose 5%, BTS<sup>®</sup> 5% e M III<sup>®</sup> 6%), dois crioprotetores (dimetilsulfóxido-DMSO e metilglicol) e quatro ativadores (água destilada, NaCl 0,15%, NaCl 0,29% e NaHCO<sub>3</sub>). Para a criopreservação do sêmen, 3 palhetas de 0,5 mL foram congeladas em cada meio crioprotetor (1:10, v/v, sêmen: volume) em um botijão de vapor de nitrogênio líquido (Taylor-Warton, modelo CP 300, “dry shipper”) a -170°C e depois armazenadas em nitrogênio líquido. A motilidade espermática foi avaliada depois do descongelamento em banho-maria a 60°C, por 8 segundos e foi subjetivamente estimada após ativação com cada um dos ativadores testados (1:5, v/v, sêmen: ativador). No experimento 2, o sêmen foi diluído em glicose 5% e metilglicol, sendo testado, agora, o efeito dos volumes de palhetas (0,5 e 4 mL) e da temperatura de descongelamento (30°C e 60°C) no sêmen criopreservado. No experimento 1, houve uma interação entre diluidores, crioprotetores e ativadores. Todas as amostras de sêmen, criopreservadas no meio contendo NaCl 0,9% como diluidor, produziram baixa motilidade espermática, após o descongelamento, quando comparadas às amostras criopreservadas nos outros diluidores. Amostras criopreservadas em glicose 5% combinada com metilglicol, produziram altas taxas de motilidades espermáticas, em comparação com as amostras criopreservadas em glicose combinada com DMSO. Os quatro ativadores testados produziram motilidades semelhantes em todas as combinações diluidor-crioprotetor, exceto quando o BTS<sup>®</sup> 5% foi usado como diluidor e a água destilada foi usada como ativador. Não houve diferença no sêmen criopreservado em palhetas de 0,5 e 4,0 mL ou no descongelamento a 30°C ou 60°C

---

\* Comitê Orientador: Ana Tereza de Mendonça Viveiros - UFLA (Orientadora), José Camisão de Souza- UFLA e José Cleto da Silva Filho- UFLA (co-orientadores)

**Semen cryopreservation of curimba *Prochilodus lineatus*:  
developing a protocol**

**2 ABSTRACT**

Semen cryopreservation allows semen storage for an indeterminate period of time. The aim of this study was to evaluate extenders, cryoprotectants, activation media, straw size and thawing temperature on semen cryopreservation of curimba *Prochilodus lineatus*. Two experiments were carried at the Fish Culture Unit of the Energy Company of Minas Gerais (CEMIG), Itutinga-MG. In experiment 1, eight freezing medium were prepared using a combination of four extenders (NaCl 0.9%, glucose 5%, BTS<sup>®</sup> 5% and M III<sup>®</sup> 6%) and two cryoprotectants (dimethyl sulphoxide - DMSO and methylglycol). Semen was diluted (1:10, v/v, semen: total volume) in each freezing medium, aspirated into 0.5-mL straws (n=3 per medium), transferred to a nitrogen vapor container (Taylor-Warton, CP 300) at -170°C and then stored in liquid nitrogen. Sperm motility was subjectively evaluated after thawing at 60°C-water bath for 8 s. To activate sperm motility, four activating medium (distilled water, NaCl 0.15%, NaCl 0.29% and NaHCO<sub>3</sub>) were tested. Then, to evaluate the effect of straw size (0.5 and 4.0 mL) and thawing temperature (30 and 60°C), semen was frozen in glucose-methylglycol medium using the same method as described for experiment 1. Post-thaw sperm motility was subjectively estimated after activation with NaCl 0.29%. In experiment 1 there was an interaction among extenders, cryoprotectants and activation media. All samples cryopreserved in a medium containing NaCl 0.9% as extender, produced low post-thaw sperm motility, compared to the other extenders. Samples cryopreserved in glucose combined with methylglycol produced higher post-thaw sperm motility, compared to samples cryopreserved in glucose combined with DMSO. The four activating medium tested produced similar post-thaw motility in all extender-cryoprotectant combinations, except when BTS was used as extender and distilled water was used as activating medium. There is not difference on semen cryopreserved in 0.5- or 4.0-mL straw or thawed in 30° or in 60°C.

---

\* Guidance Committee: Ana Tereza de Mendonça Viveiros - UFLA (Orientadora), José Camisão de Souza- UFLA e José Cleto da Silva Filho- UFLA (co-orientadores)

### 3 INTRODUÇÃO

Muitas espécies de peixes tropicais realizam migrações no período reprodutivo. Estas espécies migram para os locais de desova e este processo caracteriza a piracema, que acontece quando, pelas condições climáticas e estímulos hormonais, os peixes se encontram aptos para a reprodução (Godinho & Godinho, 1994). A construção de barragens interrompe este ciclo reprodutivo e, juntamente com o assoreamento de rios e a pesca predatória, prejudica a sobrevivência dessas espécies.

Entre as várias espécies de peixes migradores do rio Grande, está o curimba (*Prochilodus lineatus*) (Valenciennes, 1836). As estações de piscicultura têm grande interesse no sucesso da sua reprodução, uma vez que as larvas de curimba servem de alimento para espécies carnívoras de grande importância comercial, como, por exemplo, o dourado (*Salminus maxillosus*=*Salminus brasiliensis*) ou outras, passíveis de extinção, como a piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) e o jaú (*Paulicea luetkeni*=*Zungaro jahu*). Além disso, a carne de curimba é fonte de proteína de alta qualidade, sendo consumida por comunidades ribeirinhas e populações mais carentes, já que o preço de mercado é menor comparado ao de outros peixes.

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

Atualmente, alguns trabalhos envolvendo a criopreservação de sêmen de espécies de peixes nativos do alto do rio Grande, MG, têm sido descritos, inclusive com o sêmen de curimba (Cruz, 2001; Carolsfeld et al., 2003;

Miliorini, 2006). Em outras espécies, como os bryconídeos, já foram descritos protocolos efetivos para o congelamento do sêmen de piracanjuba (Bedore, 1999; Carolsfeld et al., 2003; Maria, 2005) e de pirapitinga (*B. nattereri*) (Oliveira, 2006).

Para ser criopreservado, o sêmen precisa ser diluído em meio contendo diluidor e crioprotetor intracelular. Os diluidores são soluções de sais ou de carboidratos que ajudam a manter a viabilidade das células durante o congelamento e que permitem que os crioprotetores intracelulares ou extracelulares atinjam o interior e a superfície dos espermatozóides. Os diluidores devem manter os espermatozóides imóveis e ser estéreis. Diluidores como BTS<sup>®</sup> e MIII<sup>®</sup> são comumente utilizados no resfriamento de sêmen de suíno e têm sido testados em sêmen de algumas espécies de peixes tropicais (Maria et al., 2006; Oliveira, 2006; Miliorini, 2006). Outras soluções mais simples, como as de glicose ou as de cloreto de sódio (NaCl), também já foram testadas com sucesso como diluidores de sêmen de peixes (Cruz, 2001; Shimoda, 2004; Maria et al., 2006).

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

Na maioria dos trabalhos com criopreservação de sêmen de peixes, a escala de laboratório é utilizada para desenvolver os protocolos e o sêmen é envasado em palhetas de 0,5 mL. Alguns estudos têm sido conduzidos em escala

comercial, utilizando palhetas de 4,0 mL para criopreservar o sêmen de matrinxã-da-Colômbia (*Brycon amazonicus*) (Velasco-Santamaría et al., 2006) e de alguns cyprinídeos (Lahnsteiner et al., 2003).

Durante o congelamento, as células perdem água e desidratam. Ao serem descongeladas, ocorre o processo inverso com a reidratação das células pelo influxo de água (Holt, 2000). Segundo Leung (1991), o descongelamento rápido é necessário para evitar a recristalização, ou seja, o reagrupamento de pequenos cristais de gelo em grandes cristais de gelo, que são letais para a célula. Diversos autores utilizam diferentes tempos e temperaturas do banho-maria para descongelar o sêmen em palheta de 0,5 mL, desde temperaturas mais baixas, como 33°C por 14 segundos, em sêmen de curimba (Cruz, 2001), até temperaturas mais altas, como 80°C, por 10 segundos, em sêmen de yamú (Velasco-Santamaría et al., 2006).

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

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de diluidores, de crioprotetores intracelulares, de volume da palheta, da temperatura de descongelamento e de soluções ativadoras da motilidade espermática do sêmen de curimba criopreservado.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Procedência dos reprodutores e coleta do sêmen

Os trabalhos foram desenvolvidos durante o período reprodutivo de 2005/2006. Foram utilizados machos de curimba (*Prochilodus lineatus*), da Estação de Piscicultura da Companhia Energética de Minas Gerais (CEMIG), em Itutinga, MG. Foram selecionados aqueles animais que possuíam a papila urogenital hiperêmica e que liberavam sêmen sob leve massagem abdominal. Após a seleção, os machos receberam uma única dose (5 mg/kg do peso corporal) de extrato bruto de hipófise de carpa para induzir a espermiacção. Depois de 8 horas, o sêmen de cada animal foi coletado individualmente, de acordo com o manejo da estação, em tubos de ensaio, evitando-se a contaminação do sêmen com água, sangue ou urina.

### 4.2 Avaliação seminal

Imediatamente após a coleta, a motilidade espermática foi avaliada da seguinte forma: 5 µL de sêmen foram colocados em uma lâmina histológica e levada ao microscópio óptico, previamente focalizado em 400x. As amostras que apresentavam motilidade (auto-ativação) foram consideradas contaminadas e descartadas. Nas amostras que não apresentavam auto-ativação, a motilidade espermática foi induzida com NaCl 0,29% (Maria et al., 2006), na diluição de 1:5 (sêmen:ativador) e subjetivamente determinada. Somente amostras com motilidades espermáticas superiores a 80% foram utilizadas nos experimentos. Durante todo o procedimento, o sêmen foi mantido em tubos de ensaio em banho de gelo ( $15 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Em todos os experimentos, o sêmen foi diluído 1:10 (sêmen: volume total) em meio contendo diluidor e crioprotetor intracelular.

### 4.3 Experimentos

#### 4.3.1 Experimento I – Diluidores, crioprotetores e ativadores

O sêmen de 4 machos foi diluído em um dos oito meios, compostos pelas combinações de 4 diluidores x 2 crioprotetores intracelulares. Os diluidores testados foram:

- NaCl 0,9%; 154 mM (Maria et al., 2006);
- glicose 5%; 277 mM (Carolsfeld et al., 2003);
- BTS<sup>®</sup> 5%; (*Beltsville Thawing Solution* – Minitub<sup>®</sup>) glicose monohidratada 80%; citrato de sódio 12,7%; EDTA 2,6%; sulfato de gentamicina 0,5%; NaHCO<sub>3</sub> 2,6%; KCl 1,6% (Maria et al., 2006);
- M III<sup>®</sup> 6%; (Merck III- Minitub<sup>®</sup>) glicose monohidratada 89,2%; citrato de sódio 3,0%; EDTA 3,6%; sulfato de gentamicina 0,5%; NaHCO<sub>3</sub> 4,2% (Maria et al., 2006).

Os crioprotetores intracelulares dimetil sulfóxido (DMSO - (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) e metilglicol (CH<sub>3</sub>O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OH) foram adicionados a cada diluidor separadamente.

Após o preparo dos meios, o sêmen foi adicionado e a proporção final foi 1 sêmen:8 diluidores:1 crioprotetor intracelular. O sêmen diluído foi envasado em palhetas de 0,5 mL (n=3 palhetas/meio/macho), vedadas com esferas e acondicionadas em raques, que foram colocadas em botijão de vapor de nitrogênio (Cryoporter<sup>®</sup> LN<sub>2</sub> *dry vapor shipper*), à temperatura de -170°C. Após 24 horas, as raques foram armazenadas em nitrogênio líquido (M.V.E., modelo Volta 34). As palhetas foram descongeladas em banho-maria, a 60°C, por 8 segundos (Maria et al., 2006) e a motilidade espermática foi imediatamente ativada com 4 diferentes soluções ativadoras: água destilada, NaCl 0,15% (25 mM), NaCl 0,29% (50 mM) e NaHCO<sub>3</sub> 1% (119mM) (Cruz, 2001). A avaliação da motilidade espermática foi feita como descrita para o sêmen fresco.

#### **4.3.2 Experimento II - Volume da palheta e temperatura de descongelamento**

Sêmen de 4 machos foram coletados separadamente e diluídos em meio contendo glicose 5% e metilglicol. O sêmen diluído foi, então, envasado em palhetas de 0,5 e 4,0 mL, vedadas com esferas e congeladas, conforme descrito anteriormente. As palhetas de 0,5 mL (n=6 palhetas/macho) foram descongeladas em banho-maria, a 60°C, por 8 segundos ou a 30°C, por 16 segundos. As palhetas de 4,0 mL (n=4 palhetas do *pool* de sêmen dos mesmos 4 machos) foram descongeladas em banho-maria, a 60°C, por 24 segundos. Não foi testado o descongelamento das palhetas de 4,0 mL na temperatura de 30°C porque a quantidade de sêmen coletada dos machos de curimba foi muito pequena, impossibilitando a realização do experimento. A taxa de motilidade espermática foi avaliada após ativação com NaCl 0,29%.

#### **4.4 Análise estatística**

Para a variável observada (taxa de motilidade espermática), o resíduo de cada modelo foi testado para distribuição normal. Os valores que não apresentaram essa distribuição foram transformados em arc seno  $\sqrt{X}$ , para sua normalização. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade, utilizando-se o pacote computacional Sistema de Análise de Variância – Sisvar (Ferreira, 2004).

### **5 RESULTADOS**

O valor médio de concentração espermática nos 8 machos, o volume seminal médio e o peso corporal estão apresentados na Tabela 1 .



TABELA 1. Peso corporal, volume do sêmen e concentração espermática do sêmen de curimba *Prochilodus lineatus*, após hipofiseação (5 mg/ kg peso corporal). UFLA, Lavras, MG, 2006.

<b>Peixe</b>	<b>Peso corporal (kg)</b>	<b>Volume do sêmen (mL)</b>	<b>Sptz x 10<sup>9</sup>/mL de sêmen</b>
1	1,4	2,3	14,3
2	1,8	1,8	20,2
3	1,6	2,1	18,2
4	1,1	2,2	22,4
5	1,3	2,8	17,6
6	1,9	3,5	20,3
7	1,8	1,1	17,3
8	1,0	1,8	14,2
<b>Média</b>	<b>1,4</b>	<b>2,2</b>	<b>18,1</b>
<b>DP</b>	<b>0,3</b>	<b>0,7</b>	<b>2,9</b>

#### **Experimento I – Diluidores, crioprotetores e ativadores**

Os dados referentes às motilidades espermáticas do sêmen criopreservado nos 8 meios testados e ativados com os 4 ativadores, estão apresentados na Tabela 2. Houve interação significativa entre os diluidores, crioprotetores intracelulares e ativadores usados. Assim, o efeito do ativador foi dependente do crioprotetor intracelular e diluidor ( $P < 0,05$ ). O sêmen diluído em BTS<sup>®</sup> apresentou baixa motilidade espermática, em relação aos outros tratamentos com o diluidor BTS<sup>®</sup>, apenas na associação com o crioprotetor intracelular DMSO e a água destilada como diluidor ( $P < 0,05$ ). As outras combinações do BTS<sup>®</sup> e todas as do MIII<sup>®</sup> produziram altas taxas de motilidade espermática ( $P < 0,05$ ). A motilidade espermática foi menor para o sêmen diluído

em glicose e DMSO, havendo também o efeito dos ativadores. Quando a glicose foi associada ao crioprotetor intracelular metilglicol, as motilidades foram altas, sem haver diferenças entre os ativadores. No sêmen diluído em NaCl 0,9%, associado aos dois crioprotetores intracelulares testados, foram observadas as menores motilidades espermáticas, independentemente da solução ativadora.

TABELA 2 - Motilidade espermática (expressa em %; média  $\pm$  desvio padrão; n=3 palhetas x 4 peixes) do sêmen de curimba *Prochilodus lineatus* criopreservado em diferentes meios e ativado com 4 soluções ativadoras. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Diluidores	Meios		Ativadores		
	Crio- protetores	Água destilada	NaCl 0,15%	NaCl 0,29%	NaHCO <sub>3</sub> 1%
BTS <sup>®</sup> 5%	Metil- glicol	94 $\pm$ 4 <sup>A a</sup>	93 $\pm$ 3 <sup>A a</sup>	95 $\pm$ 4 <sup>A a</sup>	92 $\pm$ 4 <sup>A a</sup>
M III <sup>®</sup> 6%		88 $\pm$ 7 <sup>A a</sup>	91 $\pm$ 5 <sup>A a</sup>	91 $\pm$ 5 <sup>A a</sup>	91 $\pm$ 5 <sup>A a</sup>
Glicose 5%		95 $\pm$ 4 <sup>A a</sup>	93 $\pm$ 6 <sup>A a</sup>	95 $\pm$ 5 <sup>A a</sup>	94 $\pm$ 4 <sup>A a</sup>
NaCl 0,9%		18 $\pm$ 12 <sup>C a</sup>	16 $\pm$ 13 <sup>B a</sup>	18 $\pm$ 12 <sup>C a</sup>	24 $\pm$ 9 <sup>C a</sup>
BTS <sup>®</sup> 5%	DMSO	38 $\pm$ 22 <sup>B b</sup>	80 $\pm$ 10 <sup>A a</sup>	87 $\pm$ 10 <sup>A a</sup>	88 $\pm$ 6 <sup>A a</sup>
M III <sup>®</sup> 6%		84 $\pm$ 10 <sup>A a</sup>	86 $\pm$ 8 <sup>A a</sup>	88 $\pm$ 8 <sup>A a</sup>	89 $\pm$ 6 <sup>A a</sup>
Glicose 5%		10 $\pm$ 11 <sup>C c</sup>	25 $\pm$ 16 <sup>B b</sup>	36 $\pm$ 18 <sup>B a</sup>	50 $\pm$ 17 <sup>B a</sup>
NaCl 0,9%		1 $\pm$ 3 <sup>C b</sup>	5 $\pm$ 7 <sup>C b</sup>	3 $\pm$ 4 <sup>D b</sup>	26 $\pm$ 7 <sup>C a</sup>

Médias com a mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Scott Knott (P<0,05)

-BTS<sup>®</sup> 5% (*Beltsville Thawing Solution* – Minitub<sup>®</sup>), Fórmula: glicose monohidratada 80%; citrato de sódio 12,7%; EDTA 2,6%; sulfato de gentamicina 0,5%; NaHCO<sub>3</sub> 2,6; KCl 1,6%;

-M III<sup>®</sup> 6% (Merck III- Minitub<sup>®</sup>), Fórmula: glicose monohidratada 89,2%; citrato de sódio 3,0%; EDTA 3,6%; sulfato de gentamicina 0,5%; NaHCO<sub>3</sub> 4,2%

## Experimento II - Volume da palheta e temperatura de descongelamento

Não houve efeito do volume da palheta sobre a motilidade espermática do sêmen criopreservado em glicose e metilglicol, quando foram utilizadas palhetas de 0,5 ou 4 mL. Da mesma forma, também não foram encontradas diferenças entre as temperaturas de descongelamento sobre a motilidade espermática, quando o sêmen foi envasado em palhetas de 0,5 mL e foi descongelado a 30°C ou 60°C (Tabela 3).

TABELA 3 - Motilidade espermática (expressa em %; média  $\pm$  desvio padrão; n=4 machos) do sêmen de curimba *Prochilodus lineatus* criopreservado em glicose 5% e metilglicol, em palhetas de 0,5 ou 4,0 mL e descongeladas em banho-maria, a 30°C ou 60°C. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Temperatura de descongelamento (°C)	Volume da palheta (mL)	
	0,5 <sup>1</sup>	4,0 <sup>2</sup>
30	87 $\pm$ 8	---
60	86 $\pm$ 8	95 $\pm$ 0

1-cada valor representa a média de 12 palhetas (3 palhetas x 4 machos)

2-cada valor representa a média de 4 palhetas de um *pool* de sêmen de 4 machos

## 6 DISCUSSÃO

A elaboração de um meio para o congelamento de sêmen tem como um dos pontos importantes, a associação de um diluidor (solução aquosa) e de um crioprotetor intracelular. Atualmente, varias soluções são usadas como diluidores. Para que não haja a ativação da motilidade dos espermatozoides, a solução aquosa deverá conter sais (KCl, NaCl, NaHCO<sub>3</sub>) e ou açúcares para manter alta a osmolaridade no meio diluidor, evitando, assim, a ativação da motilidade (Viveiros, 2005). O sêmen criopreservado em NaCl 0,9%, associado

aos dois crioprotetores intracelulares testados, resultou em baixas taxas de motilidade espermática. Alguns pesquisadores encontraram bons resultados na criopreservação quando utilizaram NaCl 0,9% como diluidor. Duas espécies do gênero *Brycon*, piracanjuba *B. orbignyanus* (Maria et al., 2006) e pirapitinga *B. nattereri* (Oliveira, 2006) tiveram o sêmen criopreservado em NaCl 0,9% e metilglicol, para as quais registraram-se taxas de motilidade espermática de 68% e 66%, respectivamente.

Os compostos identificados como protetores das células podem ser classificados como crioprotetores extracelulares ou intracelulares. Os crioprotetores extracelulares, que incluem os açúcares (sacarose, glicose), os polímeros (dextran) e as proteínas (gema de ovo e leite desnatado), atuam recobrando a superfície da célula, estabilizando a membrana, protegendo-a e reparando os possíveis danos causados pela criopreservação. A gema de ovo e o leite desnatado são os crioprotetores extracelulares mais comuns (Carolsfeld & Harvey, 1999).

O sêmen diluído em glicose associada ao crioprotetor intracelular DMSO apresentou baixas motilidades espermáticas, enquanto que o sêmen diluído em glicose associada ao metilglicol resultou em altas motilidades. Quando o sêmen da mesma espécie foi criopreservado em solução de glicose e DMSO acrescido de gema de ovo, taxas de motilidade espermáticas superiores a 80% foram encontradas (Cruz, 2001). Provavelmente, houve efeito positivo da gema de ovo como crioprotetor extracelular, que protegeu os espermatozóides dos danos causados pelo congelamento.

O sêmen de curimba diluído nas soluções glicosadas (glicose 5%, BTS<sup>®</sup> e MIII<sup>®</sup>) apresentou altas taxas de motilidade, com exceção da glicose associada ao DMSO e do BTS associado ao DMSO, quando ativado com água destilada.

Embora, neste estudo, essas soluções tenham sido usadas como diluidores de sêmen, é possível que tenha havido maior proteção dos

espermatozoides por estes diluidores, sugerindo maior ação crioprotetora extracelular. Os diluidores BTS<sup>®</sup> e MIII<sup>®</sup> são rotineiramente usados como diluidores em sêmen de suíno e possuem 80% e 89% de glicose, respectivamente. O efeito crioprotetor da glicose está relacionado com a atividade de estabilização da camada lipídica da membrana plasmática durante o congelamento (Gwo, 1994).

O diluidor BTS<sup>®</sup> foi utilizado pela primeira vez em ensaios com espermatozoides de peixes nos trabalhos de Franciscatto et al. (2002), no resfriamento de sêmen de curimba. Neste estudo, o diluidor MIII<sup>®</sup> foi testado pela primeira vez na criopreservação de sêmen de curimba, apresentando altas taxas de motilidade espermática com ambos os crioprotetores intracelulares testados. O sêmen de curimba diluído em meio contendo glicose apresentou motilidade espermática de 95%, tão eficiente quanto o BTS<sup>®</sup> e MIII<sup>®</sup>. O uso da solução de glicose 5% na forma comercial de solução energética injetável é viável e prático, já que esta é facilmente encontrada em farmácias a um custo baixo, esterilizada e pronta para ser utilizada.

Os crioprotetores intracelulares têm muita importância no desenvolvimento de um protocolo de criopreservação do sêmen, por protegerem os espermatozoides dos efeitos do congelamento. Os crioprotetores intracelulares agem reduzindo os danos causados pelos solutos durante o congelamento, enquanto os crioprotetores extracelulares atuam como estabilizadores de membrana. A escolha de um meio de congelamento de sêmen capaz de proteger os espermatozoides tem se mostrado espécie-específica. Entre os crioprotetores intracelulares usados na criopreservação de sêmen de peixes tropicais, o mais utilizado é o DMSO, já testado, inclusive, no sêmen de curimba (Cruz, 2001; Miliorini, 2006), mostrando resultados eficientes.

O crioprotetor intracelular metilglicol, na concentração 10%, quando adicionado aos diluidores testados, mostrou-se tão eficaz quanto o DMSO na

manutenção da taxa de motilidade espermática do sêmen de curimba, durante o processo de criopreservação. O uso de metilglicol como crioprotetor intracelular de sêmen de peixe ainda é pouco comum e foi testado pela primeira vez em sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyianus*). Quando comparado com metanol e DMSO, o metilglicol promoveu as maiores taxas de motilidade espermática, sendo indicado para a criopreservação do sêmen de piracanjuba (Maria et al., 2006). Esse é o primeiro relato do uso do metilglicol como crioprotetor intracelular em sêmen de curimba, apresentando excelentes resultados nas taxas de motilidade espermática. As motilidades espermáticas foram mais altas quando o metilglicol foi usado como crioprotetor intracelular, comparado ao DMSO, ambos em associação com a glicose.

Em espécies de peixes de água doce, a motilidade dos espermatozoides é iniciada quando o sêmen entra em contato com a água, pela diminuição da osmolaridade (Carolsfeld & Harvey, 1999). A diferença existente entre a baixa pressão osmótica da água em relação ao plasma seminal é essencial para iniciar a motilidade espermática nessas espécies (Godinho, 2000). Várias soluções são usadas para ativar a motilidade espermática do sêmen de peixes após descongelamento e pode-se inferir que há uma interação entre a solução crioprotetora usada e o ativador. Neste trabalho, quando a água destilada foi usada para ativar sêmen criopreservado em BTS<sup>®</sup> e DMSO, obteve-se motilidade espermática inferior àquela obtida com o sêmen criopreservado em BTS<sup>®</sup> e metilglicol.

Entre as várias soluções ativadoras de sêmen de peixes, uma das mais utilizadas é o NaHCO<sub>3</sub> 1%. Na ativação de sêmen de curimba criopreservado em glicose, DMSO e gema de ovo, foi observada motilidade espermática superior a 80% com os ativadores NaHCO<sub>3</sub> 1% e NaCl 0,29%, enquanto que, com NaCl 0,15% e água destilada, os resultados foram inferiores (Cruz, 2001).

Em outro estudo, também com o objetivo de criopreservar sêmen de curimba, utilizando um meio composto de BTS<sup>®</sup> e DMSO, foram observadas motilidades espermáticas superiores quando a ativação ocorreu com NaHCO<sub>3</sub> 1%, comparado com a ativação com água destilada (Miliorini, 2006). Na criopreservação de sêmen de tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*), em meio contendo DMSO e glicose e comparando os ativadores NaHCO<sub>3</sub> 1%, NaCl 0,15% e água destilada, não foram encontradas diferenças significativas entre os três ativadores (Godinho et al., 2003).

Como não foram observadas diferenças significativas entre os ativadores testados e com o objetivo de uniformizar os estudos realizados, a solução ativadora de NaCl 0,29% foi escolhida como padrão nestas pesquisas, por apresentar resultados eficientes também em outras espécies: piracanjuba (Maria, 2005), dourado e pirapitinga (Oliveira, 2006). Entretanto, ao definir um ativador da motilidade espermática ideal para uma determinada espécie, é necessário observar se esses ativadores não interferem nos ovócitos, prejudicando as taxas de fertilização. Por exemplo, o NaHCO<sub>3</sub> 1% foi eficiente na ativação do sêmen criopreservado de matrinxã (*Brycon cephalus*), porém, ao ser usado na fertilização, o NaHCO<sub>3</sub> promoveu aglutinação dos ovócitos, impedindo a hidratação e resultando em taxa de eclosão nula (Silveira, 2000).

Palhetas de 0,5 mL para criopreservação do sêmen têm sido muito usadas em experimentos para definir protocolos, por serem de menor custo e por possibilitarem maior número de repetições com volume menor de sêmen. Entretanto, em escala comercial, a fertilização de ovos com este volume de sêmen pode ser mais dispendiosa. Assim, o uso de palhetas maiores facilita o processo de fertilização em maiores quantidades de ovócitos. Neste experimento, não foi observada diferença ( $P > 0,05$ ) na motilidade do sêmen de curimba criopreservado em palhetas de 0,5 ou 4,0 mL ou entre o uso de *pool* de

sêmen e o uso de sêmen de cada indivíduo separadamente. Outros pesquisadores também não encontraram diferenças entre os volumes de palhetas testados.

No processo de criopreservação de sêmen de pirapitinga (*Brycon nattereri*) as motilidades espermáticas foram semelhantes nas palhetas de 0,25 e 0,5 mL (Oliveira, 2006). Na criopreservação de sêmen de matrinxã (*Brycon cephalus*), não houve diferença entre a taxa de eclosão do sêmen criopreservado em palhetas de 0,5 ou de 4,0 mL (Silveira, 2000). Em algumas espécies de cyprinídeos também não foram encontradas diferenças significativas nas taxas de eclosão usando sêmen criopreservado em palhetas de 0,5 e de 1,2 mL (Lahnsteiner et al., 2003). Também foi verificada semelhança na motilidade espermática do sêmen da espécie matrinxã-da-Colômbia envasado em palhetas de 0,5 e de 4,0 mL, (Velasco-Santamaría et al., 2006).

Não houve diferença significativa na motilidade espermática, quando o sêmen foi descongelado nas duas temperaturas testadas. Alguns estudos sugerem que possa ocorrer desnaturação das enzimas na área periférica das palhetas antes que o sêmen no interior da palheta esteja descongelado, causada por elevada temperatura (80°C) do banho-maria (Cabrita et al., 2001; Lahnsteiner et al., 1997). A temperatura de descongelamento de 33°C, durante 14 segundos, foi usada para descongelar sêmen de curimba criopreservado em palhetas de 0,5 mL e foram obtida motilidades superiores a 80% (Cruz, 2001) Na criopreservação de sêmen de matrinxã-da-Colômbia, foram testadas as temperaturas de 35°C e 80°C, em palhetas de diferentes volumes, 0,5, 1,8, 2,5 ou 4,0 mL. Apenas as palhetas de 0,5 mL foram sensíveis à temperatura do banho-maria; as amostras de sêmen descongeladas a 80°C apresentaram motilidade espermática menor do que as amostras descongeladas a 35°C (Velasco-Santamaría, 2006).

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que, pela facilidade de ser encontrada no mercado já esterilizada e na forma de uso, a solução de glicose 5%, combinada ao crioprotetor intracelular metilglicol pode ser eficientemente



usada na criopreservação do sêmen de curimba, sem a necessidade de se acrescentar gema de ovo, a qual dificulta a visualização dos espermatozoides quando a motilidade é avaliada ao microscópio. O sêmen pode ser criopreservado em larga escala, nas palhetas de 4,0 mL e ser descongelado na temperatura de 60°C, por 16 segundos, de forma eficiente. Para ativar a motilidade espermática do sêmen criopreservado, qualquer um dos ativadores testados pode ser utilizado.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

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

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

FERREIRA, D. F. **Sistema de análise de variância (Sisvar)**. ver 4.6 (Build 61). Lavras: UFLA. Departamento de Ciências Exatas da UFLA, 2004.

FRANCISCATTO R. T.; MURGAS, L. D. S.; MILIORINI, A. B.; SILVA, M. O. B.; LOGATO, P. V. R. Qualidade do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) e taxa de fertilidade após o resfriamento à 4°C. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 26, n. 3, p. 213-215, jul./set. 2002.

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

GODINHO, H. P.; AMORIM, V. M. C.; PEIXOTO, M. T. D. Criopreservação do sêmen de tilápia-nilótica *Oreochromis niloticus*, var. chitralada: crioprotetores, soluções ativadoras e refrigerador criogênico. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.32, n. 6, p. 1537-1543, nov./dez. 2003. Suplemento, 1.

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

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

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.

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.; WEISMANN, T.; PATZNER, R. A.; LAHNSTEINER, F.; WEISMANN, T.; PATZNER, R. A. Methanol as cryoprotectant and the suitability of 1.2 ml and 5 ml straws for cryopreservation of semen from salmonid fishes. **Aquaculture Research**, Amsterdam, v. 28, n. 1/4, p. 471-479, Sept. 1997.

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

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

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

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

OLIVEIRA, A. V. **Resfriamento e criopreservação do sêmen de dourado *Salminus maxillosus* e de pirapitinga *Brycon nattereri***. 2006. 96 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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

SILVEIRA, A. N. **Caracterização espermática, preservação criogênica do sêmen e fertilidade do matrinxã, *Brycon cephalus* (Günter, 1860) (Teleostei; Characidae)**. 2000. 45 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências. Botucatu-SP.

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

VELASCO- SANTAMARÍA, Y. M.; MEDINA-ROBLES V.M.; CRUZ-CASALLAS, E.P. Cryopreservation of yamú ( *Brycon amazonicus*) sperm for large scale fertilization. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 256, n, 1/4, p. 267-271, June 2006.

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

## **CAPÍTULO IV**

### **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

## **RESFRIAMENTO E CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE CURIMBA**

O curimba é uma espécie importante para a piscicultura, por ser fornecida como alimentos para outras espécies de grande interesse. Além disso, sua carne é fonte de proteína de alta qualidade para a população carente e é um alimento importante para a população ribeirinha.

Esta espécie tem sido, cada vez mais, criada em cativeiro, onde, muitas vezes, não encontram condições adequadas para a reprodução. Isso acontece porque o curimba tem a característica de migrar rio acima em determinados meses do ano, quando passam por estímulos hormonais e ambientais, até chegar às cabeceiras dos rios, onde ocorre a desova. Diante dessas circunstâncias existe uma demanda crescente por técnicas práticas e apuradas de preservação de gametas que facilitem a fertilização artificial desses animais para repovoamento dos rios e sua criação em cativeiro. Neste breve capítulo, serão discutidos alguns aspectos abordados nessa dissertação, relativos à preservação de sêmen de curimba.

Foi testado o resfriamento do sêmen de curimba em soluções glicosadas e salinas, na diluição 1:10 (v/v sêmen:diluidor). O armazenamento foi feito em refrigerador, com temperatura de 4°C-6°C. Por meio deste experimento, observou-se que a diluição do sêmen permitiu um aumento nos dias de armazenamento, visto que o sêmen não diluído apresentou motilidade espermática próxima de zero, já no segundo dia de resfriamento. O sêmen diluído nas soluções salinas, de maneira geral, não apresentou motilidade espermática eficiente após o segundo dia de resfriamento. Entretanto, as soluções à base de glicose permitiram o armazenamento por mais dias, destacando-se os diluidores BTS<sup>®</sup> 5% ou MIII<sup>®</sup> 6%, que prolongaram o armazenamento do sêmen por até cinco dias.

Na criopreservação, vários meios crioprotetores foram capazes de manter a viabilidade do sêmen durante o congelamento. O meio crioprotetor

formado por glicose 5% e metilglicol foi tão eficiente quanto aqueles formados pelos diluidores BTS<sup>®</sup> 5% ou MIII<sup>®</sup> 6% e o crioprotetor metilglicol. Além da eficiência, o meio composto por solução de glicose 5% e metilglicol tem grande praticidade, uma vez que a solução de glicose pode ser comprada em farmácias, na forma comercial de solução energética injetável, a custo baixo e já esterilizada.

Os ativadores tiveram um efeito dependente do meio crioprotetor. É importante considerar que o ativador pode ter efeito sobre os ovócitos no momento da fertilização. O uso das palhetas de maior volume permite o congelamento do sêmen em larga escala, facilitando a reprodução artificial e permitindo a maior produção de alevinos. Como foi visto, não há efeito do volume da palheta no sêmen criopreservado. Outro aspecto importante na criopreservação é a temperatura de descongelamento do sêmen. Embora a temperatura de 60°C possa ser relativamente alta para o descongelamento do sêmen, resultado de motilidade espermática semelhante foi encontrado quando o sêmen foi descongelado na temperatura de 30°C.

Conclui-se, a partir desses dados, que o sêmen de curimba pode ser:

- preservado em refrigerador, sob temperatura de 4°C-6°C, quando diluído nas soluções glicosadas BTS<sup>®</sup> 5% ou MIII<sup>®</sup> 6% ;
- criopreservado com eficiência e praticidade em meio composto por glicose 5% e metilglicol;
- quando esse meio crioprotetor é utilizado para diluição do sêmen, a ativação da motilidade espermática pode ser feita com qualquer um dos ativadores testados;
- criopreservado em palhetas de 4,0 e 0,5 mL;
- descongelado na temperatura de 30°C ou 60°C.

Como perspectivas futuras, pretende-se testar os protocolos desenvolvidos neste trabalho, na rotina de pisciculturas. Os aspectos envolvidos, tanto no protocolo de resfriamento como de criopreservação, devem ser testados quanto à capacidade de fertilização dos ovócitos e também quanto à influência desse processo na formação e na mortalidade das larvas.



## ANEXOS

ANEXO A. Análise de variância do efeito das soluções diluidoras do sêmen no processo de resfriamento.....	83
ANEXO B. Análise de variância do efeito das soluções diluidoras acrescidas de 10 % de crioprotetores e ativadas com diferentes soluções ativadoras .....	84
ANEXO C. Análise de variância do efeito dos diferentes volumes de palhetas.....	85
ANEXO D. Análise de variância do efeito de temperaturas de descongelamento diferente.....	86

## Anexo A

Análise de variância do efeito das soluções diluidoras do sêmen no processo de resfriamento

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
ANIMAL	4	839,600000	209,900000	2,869	0,0238
DILUIDOR	6	59249,638095	9874,939683	134,972	0,0000
TEMPO	8	251673,892063	31459,236508	429,989	0,0000
DIL*TEMPO	48	33354,419048	694,883730	9,498	0,0000
erro	248	18144,400000	73,162903		
Total corrigido	314	363261,949206			
CV (%) =	21,54				
Média geral:	39,7015873		Número de observações:	315	

## Anexo B

Análise de variância do efeito das soluções diluidoras acrescidas de 10 % de crioprotetores e ativadas com diferentes soluções ativadoras.

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
DILUIDOR	3	57036,023438	19012,007813	347,202	0,0000
CRIOPROTET	1	11838,757813	11838,757813	216,202	0,0000
ATIVADOR	3	2496,648438	832,216146	15,198	0,0000
DILUID*CRIO	3	8596,898438	2865,632813	52,333	0,0000
DILUID*ATI	9	1166,945313	129,660590	2,368	0,0184
CRIOP*ATIV	3	2137,148438	712,382813	13,010	0,0000
DIL*CRIO*AT	9	1157,320313	128,591146	2,348	0,0193
erro	96	5256,750000	54,757813		
Total corrigido	127	89686,492188			
CV (%) =	13,89				
Média geral:	53,2578125	Número de observações:	128		

### Anexo C

Análise de variância do efeito dos diferentes volumes de palhetas

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
BLOCO	5	602,604167	120,520833	7,060	0,0061
VOL	1	229,687500	229,687500	13,454	0,0052
erro	9	153,645833	17,071759		
Total corrigido		15	985,937500		
CV (%) =		4,67			
Média geral:		88,4375000	Número de observações:		16

### Anexo D

Análise de variância do efeito de temperaturas de descongelamento diferentes

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
PEIXE	3	469,791667	156,597222	3,122	0,0503
DESCONGELA	1	1,041667	1,041667	0,021	0,8869
erro	19	953,125000	50,164474		
Total corrigido	23	1423,958333			
CV (%) =	8,19				
Média geral:	86,4583333	Número de observações:	24		