



ARIANE FLÁVIA DO NASCIMENTO

**EFEITO DE CRIOPROTETORES, DILUIDORES
E OSMOLALIDADE NA QUALIDADE
ESPERMÁTICA DE *Prochilodus lineatus* E
*Brycon orbignyanus***

LAVRAS – MG

2013

ARIANE FLÁVIA DO NASCIMENTO

**EFEITO DE CRIOPROTETORES, DILUIDORES E OSMOLALIDADE
NA QUALIDADE ESPERMÁTICA DE *Prochilodus lineatus* E *Brycon
orbignyanus***

Tese 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 Doutor.

Orientadora

Dra. Ana Tereza de Mendonça Viveiros

LAVRAS – MG

2013

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Nascimento, Ariane Flávia do.

Efeito de crioprotetores, diluidores e osmolalidade na qualidade espermática de *Prochilodus lineatus* e *Brycon orbignyanus* / Ariane Flávia do Nascimento. – Lavras : UFLA, 2013.

88 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Ana Tereza de Mendonça Viveiros.

Bibliografia.

1. Sêmen. 2. Teleósteos. 3. Neotropical. 4. Characiformes. 5.
CASA. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 639.37520416

ARIANE FLÁVIA DO NASCIMENTO

**EFEITO DE CRIOPROTETORES, DILUIDORES E OSMOLALIDADE
NA QUALIDADE ESPERMÁTICA DE *Prochilodus lineatus* E *Brycon
orbignyanus***

Tese 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 Doutor.

APROVADA em 09 de agosto de 2013.

Dr. Marcelo de Castro Leal	UFLA
Dr. José Camisão de Souza	UFLA
Dr. Paulo dos Santos Pompeu	UFLA
Dra. Laura Helena Orfão	UNIFENAS

Dra. Ana Tereza de Mendonça Viveiros
Orientadora

LAVRAS – MG

2013

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Aquiles e Lúcia, aos meus irmãos, Amanda, Álvaro e Alberty, muito obrigada pelo apoio, compreensão e amor incondicional;

Ao meu amor, Henrique P. Rafaldini, que nunca desistiu de mim, me amou nos momentos mais difíceis, segurou minha mão quando eu não tinha forças para estendê-la. Amo-te, meu príncipe!

À minha orientadora, professora Ana Viveiros, por toda paciência, apoio e valiosa orientação;

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Zootecnia, pela oportunidade oferecida de realização do doutorado;

Aos companheiros de experimento, Mariana Hamaue, Lays Pereira, Marina Lemes, Tais Taffarel, Thales França, Camilla Silveira e Thatijanne Carvalho, por toda amizade, companheirismo e auxílio em campo e no laboratório;

Aos amigos queridos que me ajudaram a desenvolver esse trabalho, Antônio Carlos S. Gonçalves, Marina Leme, Isabela M. Di Chiacchio e Mariana Hamaue, pelas noites em claro e as horas na estrada;

Ao Dr. Marcelo de Castro Leal, pelo auxílio nas análises do CASA e fluorescência;

Às queridas amigas; Laura Helena Órfão, Cibele Vidal Bastos, Nathalie Ommundsen, Vivian Oliveira, Taísa Amarante, Isabela Peixoto, Débora Spila, Maraia Sagradin, Iris Maria, pelo amor, apoio e companheirismo, todas sempre em meu pensamento, mesmo às vezes distantes;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Agência Nacional de Energia Elétrica e Furnas Centrais Elétricas S.A. (ANEEL P&D Furnas), pelo apoio financeiro e suporte à realização dos projetos;

Aos biólogos; Dirceu M. Ribeiro e Marcília B. Goulart (Furnas), pela amizade, prontidão e auxílio na realização dos experimentos na estações de piscicultura;

Aos responsáveis pela estação de piscicultura de Furnas Centrais Elétricas S.A., por permitir e auxiliar na execução dos experimentos.

Ao meu psiquiatra, Dr. Ulisses de M. Vieira, que me ajudou a não desistir e a Friedrich Nietzsche, por me lembrar sempre quem eu sou.

RESUMOGERAL

A piracanjuba *Brycon orbignyianus* e o curimatá *Prochilodus lineatus* são peixes Characiformes, nativos da América do Sul, com grande potencial para a aquicultura. No estudo inicial (artigo 1) foram avaliados os efeitos da osmolalidade, diluidores, crioprotetores (CPAs) e tempo de equilíbrio sobre a motilidade do sêmen fresco de *B. orbignyianus* e *P. lineatus*. Vinte e quatro meios numa combinação de seis diluidores (BTS[®] e glicose a 270, 315 e 360 mOsm/kg), com os CPAs DMSO (Me2SO), metanol, metilglicol (MG) e um controle sem CPA foram preparados. Imediatamente após diluição, as amostras foram observadas em um microscópio de luz para confirmar se a todas as combinações de diluidor-CPA iriam suprimir o início da motilidade espermática. A motilidade foi então ativada e avaliada imediatamente após diluição (amostras não-equilibradas) e após um tempo de equilíbrio de 30 min a 4 °C. Em ambas as espécies, a motilidade foi iniciada em todas as amostras diluídas em BTS-270-controle, Glu-270-MG, Glu-270-MG, Glu-270-controle, e em todas as combinações contendo Me2SO. Em piracanjuba, a taxa de motilidade (77-92%) e vigor (3,3-4,7) das amostras não equilibradas não foram significativamente afetados por qualquer parâmetro. Depois de 30 minutos, no entanto, o vigor foi reduzido na maioria das amostras. Em curimatá, a taxa de motilidade foi significativamente maior nas amostras não-equilibradas (83%) em comparação com amostras equilibradas por 30 min (75%). O vigor das amostras não-equilibradas não foi afetado por nenhum parâmetro (3,3-4,2). No sêmen congelado (artigo 2) foram avaliados os efeitos de CPAs na motilidade espermática, velocidades e integridade de membrana. Foram utilizados seis meios de congelamento compreendendo a combinação de três CPAs (Me2SO, metanol e MG) e dois diluidores (BTS[®] e glicose). A taxa de motilidade, e as velocidades curvilínea (VCL), média na trajetória (VAP) e linear (VSL) foram avaliadas por meio de um sistema computadorizado de análise do sêmen (CASA). A integridade de membrana foi determinada utilizando os corantes fluorescentes SYBR[®] 14 e iodeto de propídio. Em *B. orbignyianus*, foi observada alta qualidade pós-descongelamento apenas em amostras congeladas em BTS-metilglicol; as amostras possuíam VSL de 90 µm/s, VAP de 113 µm/s e 57% de espermatozoides intactos. Em *P. lineatus*, foi observada alta qualidade pós-descongelamento em amostras congeladas em BTS-metilglicol, glicose-metilglicol e glicose-metanol. O sêmen congelado em Me2SO teve a menor qualidade. Com base nestes resultados, conclui-se que o metilglicol é o CPA mais adequado para *B. orbignyianus* e *P. lineatus* fornece boa proteção da membrana durante o processo de criopreservação.

Palavras-chave: Sêmen. Teleósteos. Neotropical. CASA. Characiformes.

GENERAL ABSTRACT

Piracanjuba *Brycon orbignyanus* and streaked prochilod *Prochilodus lineatus* are Characiforme fish, native to South America, with great potential for aquaculture. In the initial study (article 1) we evaluated the effects of osmolality, extenders, cryoprotectants (CPAs) and equilibration time over the motility of *B. orbignyanus* and *P. lineatus* fresh sperm. Twenty four media in a combination of six extenders (BTS™ and glucose solutions at 270, 315 and 360 mOsm/kg), with the CPAs DMSO (Me2SO), methanol, methyl glycol (MG), and a control without CPA were prepared. Immediately after dilution, the samples were observed under a light microscope to confirm whether all extender-CPA combinations would suppress the initiation of sperm motility. Motility was then triggered and evaluated immediately after dilution (non-equilibrated samples) and after an equilibrium period of 30 minutes at 4 °C. In both species, motility was initiated in all samples diluted in BTS-270-control, Glu-270-MG, Glu-270-control, and in all combinations containing DMSO. In *B. orbignyanus*, motility rate (77 to 92%) and vigor (3.3 to 4.7) of the non-equilibrated samples were not significantly affected by any parameter. After 30 min, however, vigor decreased in most samples. In *P. lineatus*, motility rate was significantly higher in the non-equilibrated samples (83%) compared to the samples equilibrated for 30 minutes (75%). Vigor of non-equilibrated samples was not affected by any parameter (3.3 to 4.2). In the frozen sperm (article 2) we evaluated the effects of cryoprotectants on post-thaw sperm motility, speed and membrane integrity of *B. orbignyanus* and *P. lineatus*. Six freezing media comprising a combination of three CPAs (Me2SO, methanol and methyl glycol) and two extenders (BTS™ and glucose) were used. Post-thaw sperm motility rate and curvilinear (VCL), straight-line (VSL) and average path (VAP) speeds were evaluated using a Computer-Assisted Sperm Analyzer (CASA). Membrane integrity was determined using SYBR™ 14 and propidium iodide staining. In *B. orbignyanus*, we observed high post-thaw quality only in samples frozen in BTS-methyl glycol; the samples presented VSL of 90 µm/s, VAP of 113 µm/s and 57% intact sperm. In *P. lineatus*, we observed high post-thaw quality in samples frozen in BTS-methyl glycol, glucose-methyl glycol and glucose-methanol. Semen frozen in Me2SO presented the lowest quality. Based on these results, we conclude that the methyl glycol is the most suitable CPA for *B. orbignyanus* and *P. lineatus* and provides good membrane protection during the cryopreservation process.

Keywords: Semen. Teleost. Neotropical. CASA. Characiforme.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

Figura 1	Exemplar de piracanjuba <i>B. orbignyana</i>	13
Figura 2	Bacias Hidrográficas do Brasil	14
Figura 3	Exemplar de curimatã <i>P. lineatus</i>	15
Figura 4	Sucessão de eventos desencadeadores da motilidade espermática em espécies de água doce	20
Figura 5	Sistema computadorizado de análise do sêmen (CASA)	22
Figura 6	Coloração com SYBR- 14 em amostra de sêmen descongelado de <i>P. lineatus</i>	24
Figura 7	Coloração com iodeto de propídiu em amostra de sêmen descongelado de <i>P. lineatus</i>	25

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	10
1	INTRODUÇÃO	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1	<i>Brycon orbignyanus</i>	12
2.2	<i>Prochilodus lineatus</i>	14
2.3	Características do sêmen de peixes teleósteos	15
2.3.1	Volume, concentração e osmolaridade	16
2.3.2	Motilidade espermática	19
2.3.3	Integridade da membrana espermática	23
2.4	Criopreservação do sêmen	25
2.4.1	Crioprotetores e diluidores	27
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS	30
	REFERÊNCIAS	31
	SEGUNDA PARTE - ARTIGOS	40
	ARTIGO 1 Extender composition, osmolality, cryoprotectant and equilibration time effects on fresh sperm motility of two Characiformes fish: piracanjuba (<i>Brycon orbignyanus</i>) and streaked prochilod (<i>Prochilodus lineatus</i>)	40
	ARTIGO 2 Methyl glycol, methanol and Me₂SO effects on post-thaw sperm motility, velocities and membrane integrity of <i>Brycon orbignyanus</i> and <i>Prochilodus lineatus</i> (Characiformes)	64

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

Como consequência da sobre-exploração, das alterações ambientais promovidas por desmatamento, mineração, poluição industrial e agrícola, dos usos conflitantes das águas (irrigação, produção de energia elétrica), dos represamentos e da introdução de espécies exóticas há uma crescente preocupação com a conservação da diversidade genética tanto de espécies de valor econômico quanto de espécies ameaçadas de extinção. As espécies de peixes de água doce mais ameaçadas geralmente são as de valor econômico, de hábitos reofílicos e que realizam longas migrações ascendentes para reprodução. Muitas dessas espécies, conhecidas como peixes de piracema, têm grande importância comercial, enquanto outras devido às ações antropogênicas têm seu número cada vez mais diminuído. Entre essas ações, a construção de barragens nos rios causa profundas modificações no ambiente aquático (SALE, 1985).

Uma vez que a pesca não atende ao consumo mundial de pescado, há uma crescente demanda pela indústria de aquicultura para suprir a produção pesqueira. Dessa forma, na atualidade, biotecnologias aplicadas à reprodução são importantes não apenas para a conservação da diversidade genética em si, mas também pela necessidade de manutenção da variabilidade genética para os programas de melhoramento genético de espécies para cultivo. 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. Bancos de sêmen congelados de peixes podem disponibilizar o sêmen de muitos machos rapidamente para fertilização. Se adequadamente coletados e congelados, com a devida caracterização genética,

podem ser utilizados para programas de recomposição de populações silvestres ameaçadas de extinção ou para programas específicos de melhoramento genético para atendimento a critérios de aumento nas taxas de crescimento, resistência a doenças ou com propriedades funcionais específicas desejadas (RESENDE; MARQUES, 2009). Embora exista um número grande de estudos avaliando técnicas de preservação de sêmen de peixes, ainda há ambiguidade quanto aos resultados divulgados, primariamente devido à falta de padronização das metodologias utilizadas e da análise dos dados. Além disso, devido ao fato dos peixes terem evoluído para se adaptarem a praticamente todas as superfícies de água da Terra (de água doce à lagos hipersalinos, de águas geladas do Ártico às águas quentes do deserto da Califórnia), existem diferenças substanciais em sua morfofisiologia mesmo entre as espécies presentes no mesmo ambiente e, conseqüentemente, os espermatozoides de cada espécie demonstram reações diferentes aos protocolos de conservação (KOPEIKA et al., 2007). O sêmen de cada espécie apresenta uma resposta durante o processo de criopreservação, tendo os méis crioprotetores capacidades diferentes na proteção das espermatozoides quando avaliada após o congelamento. Essa capacidade de proteção dos meios de congelamento está relacionada principalmente à composição e osmolalidade do meio diluidor além da natureza do crioprotetor. Diante dessas circunstâncias há uma demanda crescente por técnicas práticas e acuradas de preservação de gametas que facilitem a fertilização artificial desses animais para repovoamento dos rios e sua criação em cativeiro.

Assim, com o presente trabalho objetiva-se avaliar o efeito de crioprotetores, diluidores e osmolaridade na qualidade do sêmen fresco e criopreservado de *Prochilodus lineatus* e *Brycon orbignyanus*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Brycon orbignyanus*

A piracanjuba, *Brycon orbignyanus* (Figura 1) pertencente à ordem Characiformes, família Characidae, é um peixe migratório nativo das bacias formadas pelos rios Uruguai e Paraná, muito apreciado pelo valor e sabor de sua carne (GODOY, 1986). A piracanjuba é uma espécie presente nas regiões sul-sudeste brasileiras, que vem desaparecendo devido à destruição das matas ciliares, poluição, represamento de rios e diminuição de lagoas marginais, em decorrência da construção de usinas hidrelétricas e drenagem para a agricultura. Esta espécie tem despertado grande interesse não só por sua carne de excelente qualidade, mas também por ser muito apreciada em pescas esportivas devido ao seu comportamento agressivo quando fisgado, além de apresentar rápido crescimento e facilidade de cultivo (VAZ; TORQUATO; BARBOSA, 2000). O *B. orbignyanus* é uma espécie de hábito alimentar onívoro, alimentando-se de peixes (fases iniciais de vida), insetos e sementes. O macho torna-se apto a reprodução a partir de dois anos de idade, com 20 cm de comprimento, apresentando como característica sexual secundária aspereza na nadadeira anal, resultante de pequenas espículas que aparecem na época da reprodução; já a fêmea se reproduz a partir do terceiro ano de idade, com 25 cm de comprimento. Esta espécie apresenta corpo fusiforme e comprido e a boca é ampla e terminal, o dorso é castanho escuro e a nadadeira caudal apresenta cor vermelha com uma faixa mediana bem escura (COMPANHIA ENERGÉTICA DE MINAS GERAIS - CEMIG; FUNDAÇÃO CENTRO TECNOLÓGICO DE MINAS GERAIS - CETEC, 2000).



Figura 1 Exemplar de piracanjuba *B. orbignyanus*

Fonte: <http://www.terradagente.com.br>

O *B. orbignyanus* prefere ambientes lóticos de águas claras, sendo encontrada nos locais em que as árvores se deitam sobre o rio, onde obtêm os frutos que lhes servem de alimento. A migração rio acima se dá nos meses de setembro e outubro, culminando com a desova entre novembro e janeiro (CEMIG; CETEC, 2000). Entretanto, o *B. orbignyanus* encontra-se ameaçado de extinção por não conseguir realizar migração reprodutiva, devido ao grande número de barragens hidrelétricas encontradas nos rios e à degradação ambiental (VAZ; TORQUATO; BARBOSA, 2000; ROSA; LIMA, 2008). Existe grande interesse na utilização destes briconídeos tanto para produção em pisciculturas comerciais, quanto para conservação da biodiversidade.



Figura 2 Bacias Hidrográficas do Brasil

Fonte <http://www.portalsaofrancisco.com.br>

2.2 *Prochilodus lineatus*

O curimatá, *Prochilodus lineatus* (Figura 2), pertencente à ordem Characiformes, família Prochilodontidae e apresenta larga distribuição geográfica em toda a América do Sul, representando cerca de 50-90% de toda a biomassa de peixe existente no curso baixo do rio e nas lagoas marginais da Bacia do rio Paraná (BONETTO, 1986; YUAN, 1992). O macho reproduz-se aos dois anos de idade, com 24 cm, e a fêmea aos três anos, com 31 cm de comprimento. Quando adulta, a curimba pode atingir até 6 kg de peso corporal e 70 cm de comprimento (CEMIG; CETEC, 2000). Alimenta-se de lodo, algas, perifiton e detritos orgânicos, sendo considerada espécie de regime alimentar especializado, do tipo iliófago. Como consequência do seu hábito alimentar, a curimba exerce importante função no fluxo de energia dentro dos sistemas aquáticos que habita via processamento de sedimentos (FLECKER, 1996). Essa espécie 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). A curimba é uma das espécies de peixes de água doce com maior significado na piscicultura comercial, sendo muito apreciada na culinária dos estados da Região Nordeste do Brasil. 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 brasiliensis*) ou passíveis de extinção, como a piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) e o jaú (*Zungaro jahu*). Essa espécie é também muito utilizada por usinas hidrelétricas em programas de repovoamento de reservatórios, além de servir como espécie-modelo no desenvolvimento de pesquisas em biotecnologia reprodutiva, dadas sua elevada prolificidade e facilidade de manejo (VIVEIROS et al., 2010).



Figura 3 Exemplar de curimatá *P. lineatus*

Fonte: <http://www.peixesdebonito.com.br>

2.3 Características do sêmen de peixes teleósteos

Estudos sobre as características físico-químicas do sêmen de peixes têm demonstrado grandes variações intraespecíficas e interespecíficas,

principalmente na concentração espermática, volume e composição do plasma seminal. Estas variações têm sido atribuídas a fatores como variabilidade genética, envelhecimento dos espermatozoides no testículo, sazonalidade, estado reprodutivo e estratégia reprodutiva. É de extrema importância o conhecimento das características morfológicas e funcionais dos espermatozoides, para o estudo básico da biologia reprodutiva e para a produção em cativeiro de qualquer espécie íctica, assim como, para o desenvolvimento de técnicas dirigidas à conservação de espécies nativas. O parâmetro mais utilizado para a avaliação seminal é a motilidade e, dentro desta variável, os espermatozoides apresentam características espécie-específicas, como por exemplo: o início, duração e padrão da motilidade (LAHNSTEINER, 2000; COSSON et al., 2000).

2.3.1 Volume, concentração e osmolaridade

O volume de sêmen as concentrações espermáticas e osmolaridades encontrados nas diferentes espécies de peixes são bastante variáveis. Antes da manipulação é necessário avaliar a qualidade do sêmen aperfeiçoando sua utilização no processo de fertilização artificial (ORFÃO et al., 2011).

O valor biológico está não no volume de sêmen, mas sim na quantidade de células fecundantes que ele possa conter (FONSECA et al., 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 de sêmen liberado por peixe. Amostras coletadas no início e ao final da época de reprodução, geralmente não são de boa qualidade. A causa da baixa qualidade no início não é conhecida, entretanto, ao final da época de reprodução, esta condição pode ser ocasionada pelo envelhecimento dos espermatozoides nos testículos (BILLARD; COSSON, 1992).

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 (VIEIRA et al., 2011). O método mais comum para a determinação da concentração espermática (espermatozoides/mL de sêmen) é a contagem de espermatozoides, por meio de câmara hematimétrica (BUYUKHATIPOGLU; HOLTZ, 1984). A utilização da câmara hematimétrica de Neubauer, entretanto, apresenta alguns inconvenientes, como a chance de erro na contagem. 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 (TAITSON; GODINHO, 2003). Métodos alternativos têm sido propostos, podendo-se citar a contagem na câmara de Makler (LAHNSTEINER et al., 1998; RAVINDER et al., 1997), a espectrofotometria (CIERESZKO; DABROWSKI, 1993; SILVEIRA et al., 1987) e o espermátocrito (LIN; CIERESZKO; DABROWSKI, 1997; CIERESZKO; DABROWSKI, 1993). Uma ampla variação da concentração espermática é encontrada em peixes de água doce, encontrando-se relatos de concentração mínima de $1,97 \times 10^9$ spz/mL em *Rhamdia quelen* (BOMBARDELLI et al., 2006) e máxima de $41,58 \times 10^9$ spz/mL na *Perca flavescens* (CIERESZKO; DABROWSKI, 1993).

Osmolalidade é definida como a concentração de solutos totais numa solução, com a propriedade de exercer pressão no interior da referida solução. Esta propriedade do soluto é conhecida como pressão osmótica, que está envolvida na regulação do fluxo de água por meio de uma membrana. Assim, quando a concentração de soluto (mOsm/kg de água) é mais baixa no meio onde se encontra imersa uma célula, do que no próprio citosol (hiposmótica), esta

tende a aumentar seu volume, introduzindo água do meio ambiente; mas, quando a célula é imersa numa solução mais concentrada (hiperosmótica), sofre a redução do tamanho e saída de água da membrana (BOLSOVER et al., 2004). A osmolalidade, assim como, a temperatura, pH, íons (incluindo Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) e taxa de diluição influenciam a motilidade espermática, nas soluções de ativação e de imobilização (ALAVI; COSSON, 2005, 2006).

A osmolalidade e composição do plasma seminal normalmente previnem a motilidade espermática nos ductos espermáticos de peixes (BILLARD, 1986). O plasma seminal de peixes é constituído, em grande parte, por compostos minerais (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}). Esses compostos (íons) estão envolvidos na regulação da osmolalidade (HE; KEERAN-JENKINS; WOODS, 2004). O fluido seminal não só imobiliza os espermatozoides, mas também os protege (COSSON et al., 1997). Por conseguinte, a motilidade é induzida após liberação e contato dos espermatozoides com o meio aquoso durante a reprodução natural ou com o meio ativador durante a propagação artificial (COSSON, 2010). De acordo com Morisawa e Susuki (1980) a osmolalidade do sêmen de peixes apresenta-se em torno de 300 mOsm/kg. A variabilidade apresentada neste parâmetro parece ter relação com características individual e espécie-específicas, uma variação de 254 a 346 mOsm/kg foi encontrada em trabalhos com ciprinídeos (ALAVI; COSSON, 2006) e de 232 a 322 mOsm/kg em salmonídeos (ALAVI; COSSON, 2006). Em espécies de characiformes, osmolalidades do sêmen de 260 a 320,5 mOsm/kg tem sido reportada para tambaqui (CARNEIRO et al., 2012; VIEIRA et al., 2011) de para 276 a 346 mOsm/kg para *Prochilodus lineatus* e de 239 a 313 mOsm/kg em *Brycon orbignyanus* (GONÇALVES et al., 2013). O conhecimento da osmolalidade média do sêmen de peixe teleósteos é de extrema importância na reprodução assistida, uma vez que seus espermatozoides permanecem quiescentes na osmolaridade do plasma seminal, fator crítico para espermatozoides que, após a

ativação, tem uma duração média da motilidade de aproximadamente 2 minutos (VIEIRA et al., 2011).

2.3.2 Motilidade espermática

Na maioria das espécies de peixes, os espermatozoides são imóveis nos testículos e no plasma seminal (MORISAWA; MORISAWA, 1990). Em geral, a motilidade espermática é induzida por pressão hiposmótica em peixes de água doce e por pressão hiperosmótica em peixes marinhos (ALAVI et al., 2007). Durante a reprodução natural, a motilidade é induzida depois da liberação dos espermatozoides (e desta forma sua dispersão/diluição) do trato genital do macho dentro do ambiente aquoso em que os espermatozoides encontram os componentes solúveis da água do meio externo, principalmente íons (COSSON, 2004). Em salmonídeos e ciprinídeos de água doce, a redução da concentração de potássio ou a osmolaridade do ambiente ao redor dos espermatozoides liberados em água doce afeta diretamente o flagelo e regula a iniciação da motilidade espermática (MORISAWA et al., 1983). O fluido seminal é rico em muitos nutrientes e íons, alguns dos quais importantes na manutenção da qualidade espermática, quando estocados no estado imóvel no trato genital. Fatores ambientais externos podem afetar a qualidade e a motilidade espermática, durante o processo de ativação. Fatores como o pH ou íons presentes podem polarizar a membrana celular e estimular a motilidade espermática dos peixes (MORISAWA et al., 1999).

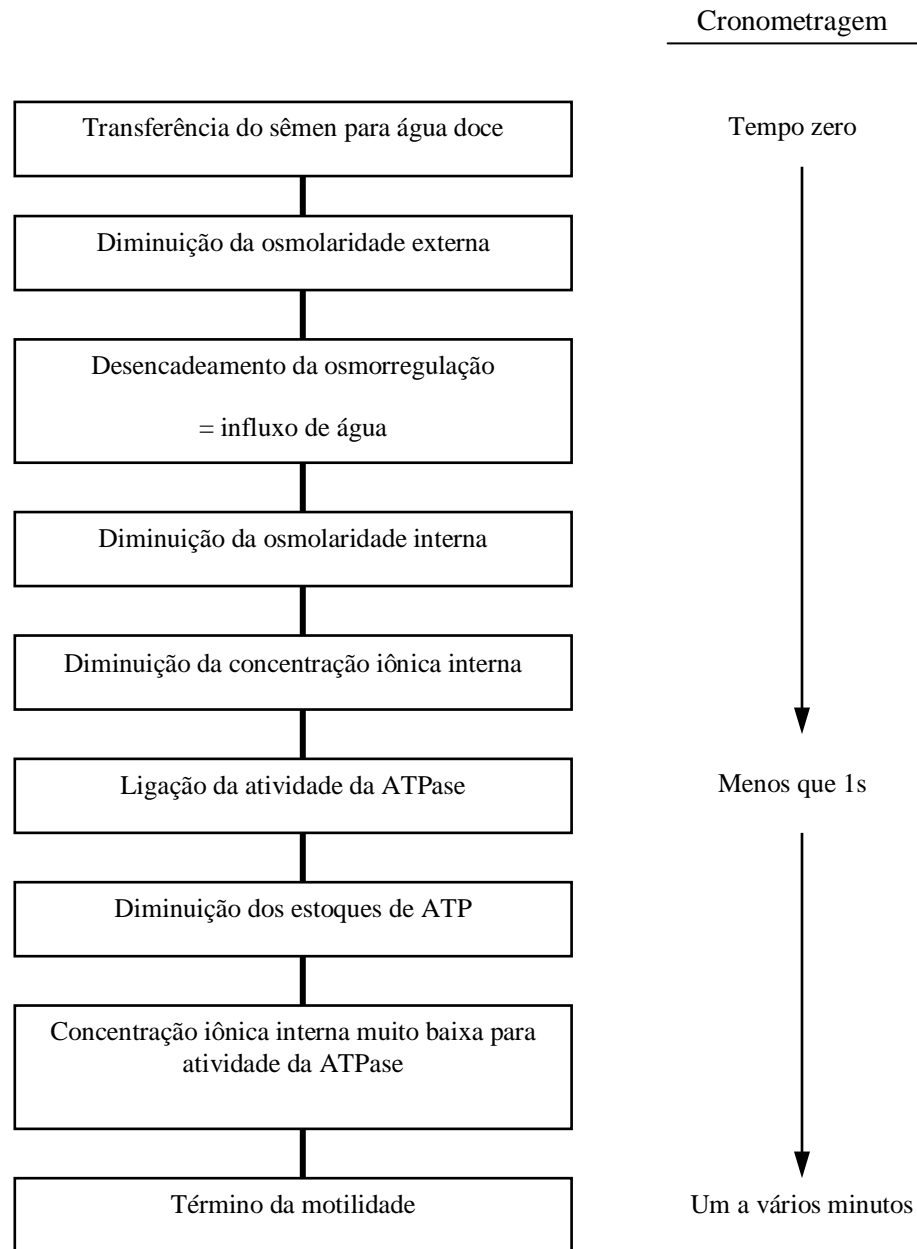


Figura 4 Sucessão de eventos desencadeadores da motilidade espermática em espécies de água doce

Fonte: Modificado de Cosson (2004).

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, é insuficiente para sustentar o armazenamento de ATP endógeno (COSSON et al., 1999).

A motilidade espermática é o parâmetro mais utilizado para a avaliação da qualidade dos espermatozoides (ALAVI et al., 2008; COSSON et al., 2008). Esta é uma importante ferramenta para prever a capacidade do sêmen na fertilização dos ovócitos. A simples estimativa da motilidade do sêmen fresco, por meio de microscopia ótica (200 ou 400 x) é usada rotineiramente para uma avaliação inicial da qualidade espermática (KAVAMOTO; SILVEIRA, 1986). O resultado é expresso em porcentagem de espermatozoides móveis, na escala de 0 a 100%, em relação ao total de espermatozoides analisados (MARIA et al., 2006; VIVEIROS et al., 2009).

Há alguns trabalhos nos quais se avalia de forma mais detalhada a atividade espermática, sendo a velocidade dos espermatozoides e a frequência de batimento flagelar, medidos por meio de videomicrografia. O sistema computadorizado de análise do sêmen (CASA, Figura 3) tem sido amplamente utilizado para examinar a qualidade do sêmen de aves e mamíferos, sendo a sua aplicação recente em estudos nos peixes (RURANGWA et al., 2001). Parâmetros de motilidade espermática analisados por meio do programa, como porcentagem de espermatozoides móveis, velocidade curvilínea, frequência de batimento flagelar, entre outros, estão diretamente relacionados à taxa de fertilização e podem prever o potencial reprodutivo de um indivíduo (VIVEIROS et al., 2010).

Na aquicultura, o uso do CASA possibilita a verificação da viabilidade de meios diluentes e crioprotetores para o congelamento de sêmen a partir de

dados com altos níveis de confiança e repetibilidade permitindo a comparação de estudos realizados em diversas partes do mundo.

O CASA captura imagens sucessivas, identificando os pontos onde o espermatozoide se encontra a cada imagem. São traçadas retas entre esses pontos, sendo calculado o percurso total do espermatozoide. A partir de um software são detectados, identificados e quantificados atributos da motilidade na amostra de sêmen. As definições para aplicação do CASA são baseadas em características, como tamanho, forma e trajetória de natação do espermatozoide em cada espécie avaliada (YANG; TIERSCH, 2011).

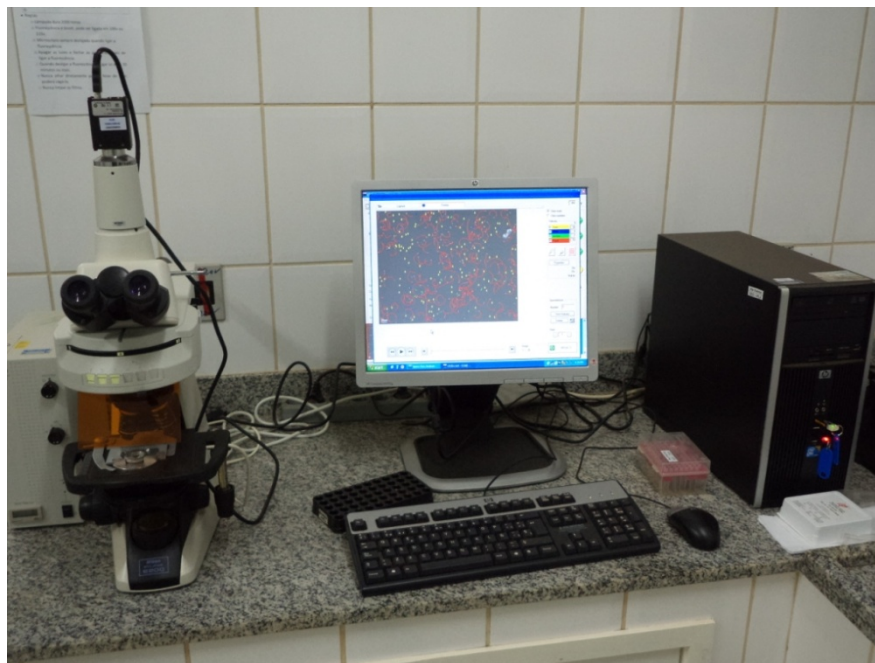


Figura 5 Sistema computadorizado de análise do sêmen (CASA)

Fonte: Gonçalves (2013).

O vigor espermático, que se caracteriza pela intensidade com que os espermatozoides se movimentam, é outro parâmetro essencial para avaliação dos

espermatozoides de peixes (COSSON et al., 1999; VERMEIRSEN et al., 2003). Sua escala segue valores de 0 a 5, em que 0 indica espermatozoides sem motilidade e 5 espermatozoides nadando rapidamente, em velocidade máxima (VIVEIROS et al., 2011).

2.3.3 Integridade da membrana espermática

Considerando o valor biológico do sêmen durante o processo de fertilização, é importante avaliar os danos impostos pela criopreservação, que podem levar à diminuição de células viáveis, definidas como aquelas que têm morfologia, atividade metabólica e membranas plasmáticas normais (ARRUDA et al., 2011). Como o potencial de fertilização depende da integridade e funcionalidade de diferentes estruturas espermáticas, o desenvolvimento de um único teste laboratorial para determinar a fertilidade seminal torna-se difícil. De forma geral, as características morfológicas espermáticas são analisadas usualmente utilizando-se esfregaços corados (corantes: Wright, Rosa de Bengala, Giemsa e eosina-nigrosina, Karras dentre outros). Avanços recentes na tecnologia de coloração têm fornecido novas metodologias para avaliação da capacidade funcional de espermatozoides em várias espécies. Vale ressaltar que nas técnicas nas quais são utilizados corantes em esfregaços de sêmen podem ocorrer danos às estruturas espermáticas o que não acontece em preparações úmidas (SOARES; GUERRA, 2009). Nesse sentido, os corantes fluorescentes (sondas epifluorescentes ou fluorocromos) são indicadores sensíveis e específicos da condição subcelular, podendo ser aplicados para mensurar alterações estruturais e metabólicas no interior das células.

As sondas fluorescentes avaliam a funcionalidade ou a integridade das estruturas dos espermatozoides, as quais possuem a capacidade de se ligar a pontos específicos das células. Como exemplo de sondas fluorescentes, o

SYBR- 14, tem especificidade pelo DNA nuclear, atravessando a membrana plasmática dos espermatozoides íntegros emitindo fótons que na microscopia de fluorescência tem coloração verde (Figura 4). O SYBR 14 tem sido usado em associação com o iodeto de propídio, o qual se liga ao DNA de células com membrana plasmática lesada emitindo fótons que tem coloração vermelha quando observados em microscópio de fluorescência (Figura 5) (CARNEIRO et al., 2012; VARELA JUNIOR et al., 2012).

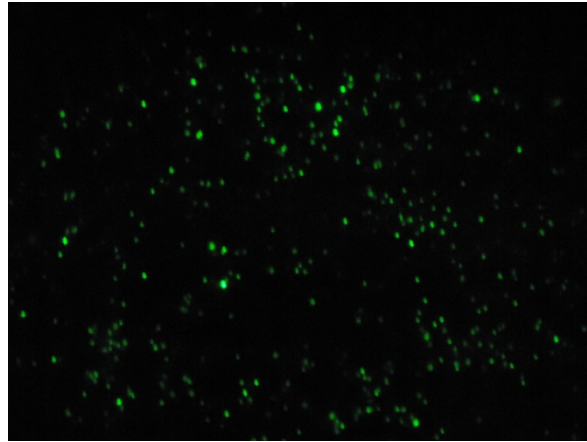


Figura 6 Coloração com SYBR- 14 em amostra de sêmen descongelado de *P. lineatus*

Fonte: Elaborado pela autora (2013)

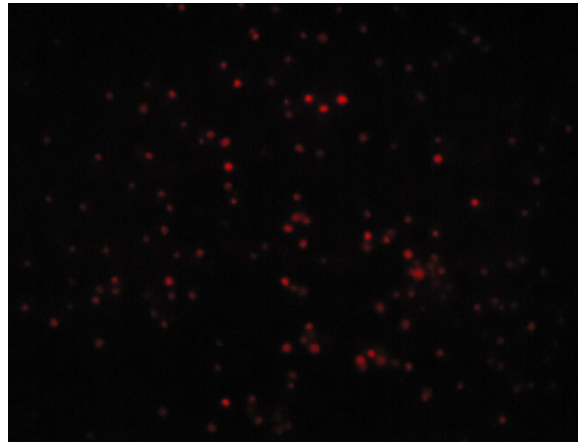


Figura 7 Coloração com iodeto de propídium em amostra de sêmen descongelado de *P. lineatus*

Fonte: Elaborado pela autora (2013)

2.4 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. A criopreservação de sêmen é uma boa alternativa para a melhoria da reprodução de peixes em cativeiro, tendo em vista que seus benefícios são variados, dentre eles: sincronização na disponibilidade de sêmen, facilidade no transporte e conservação da variabilidade genética (SUQUET et al., 2000).

Este fato torna a criopreservação de sêmen, cada vez mais, uma importante técnica utilizada na Aquicultura. Muitos trabalhos relatam metodologias de preservação, em longo prazo, de sêmen de algumas espécies de peixes nativas, tais como *B. orbignyanus* (MARIA et al., 2006), *B. insignis* (VIVEIROS et al., 2012), *P. lineatus* (VIVEIROS et al., 2009), *Piaractus brachypomus* (NASCIMENTO et al., 2010), *Colossoma macropomum*

(CARNEIRO et al., 2012), *B. nattereri* e *S. brasiliensis* (OLIVEIRA, 2006), dentre outros.

As células normalmente resistem à redução da temperatura, entretanto não suportam a formação de cristais de gelo que determina a retirada de água do sistema, levando ao desequilíbrio osmótico com conseqüente desidratação celular (HOLT, 2000). 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).

Inicialmente a água do interior do espermatozoide não se congela, levando a perda de água para o meio extracelular, desidratando progressivamente o espermatozoide. 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).

Se a velocidade de congelamento é muito lenta, o aumento da concentração de solutos intracelulares causada pela desidratação pode danificar

o espermatozoide. Se a velocidade de congelamento for muito rápida, cristais de gelo intracelular podem se formar. A velocidade de congelamento adequada é um equilíbrio entre esses fatores (SOARES; GUERRA, 2009).

2.4.1 Crioprotetores e diluidores

No processo de criopreservação, o sêmen antes de ser congelado, necessita ser diluído em meio contendo diluidor e crioprotetor. Esta solução é formulada 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 espermatozoide durante o congelamento e o descongelamento (SQUIRES et al., 1999). Os crioprotetores devem possuir uma baixa toxicidade para as células e alta solubilidade em água. Podem ser classificadas como intracelulares ou permeáveis e extracelulares ou impermeáveis. Os crioprotetores intracelulares ou permeantes atuam por meio de suas propriedades coligativas, reduzindo o ponto crioscópico intracelular. Desta forma, maior quantidade de água vai permanecer no estado líquido, quando submetida às baixas temperaturas. Apesar de seu mecanismo de ação não se encontrar perfeitamente esclarecido, sabe-se que alguns crioprotetores intracelulares penetram na membrana celular por meio de difusão passiva, permanecendo na membrana e no citoplasma, uma vez que, semelhante aos agentes não penetrantes, proporciona desidratação celular por meio do seu efeito osmótico, criando um meio hipertônico que induz a saída de água das células espermáticas (PARKS; GRAHAM, 1992). Entre os crioprotetores intracelulares mais utilizados em sêmen de peixes podem ser citados dimetilsulfóxido (Me₂SO),

metanol, glicerol e etilenoglicol. Além desses, o metilglicol também tem mostrado eficiência como crioprotetor (MARIA et al., 2006; VIVEIROS et al., 2009, 2010; NASCIMENTO et al., 2010).

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. Algumas substâncias, como lipídeos, proteínas e macromoléculas, são eficientes na proteção da célula espermática durante o processo de congelação, sem que para isso necessitem penetrar no seu interior (WATSON, 1995). Essas substâncias podem ser encontradas na gema de ovo no leite e alguns açúcares, sendo estes os crioprotetores extracelulares mais comuns (CAROLSFELD; HARVEY, 1999). Os crioprotetores externos combinados com os internos promovem uma proteção mais completa ao espermatozoide, atuando na membrana celular (LEUNG; JAMIESON, 1991).

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. Os crioprotetores são misturados às soluções aquosas (diluidores) para que atinjam o interior e a superfície dos espermatozoides no processo de congelamento. Para que não haja a ativação da motilidade dos espermatozoides, a solução aquosa deverá conter sais (KCl, NaCl, NaHCO₃, etc.) e/ou açúcares, para manter alta a osmolaridade no meio diluidor. Soluções simples como NaCl 0,9% e glicose 5%, bem como soluções mais complexas como o BTS[®] (primariamente desenvolvido como diluidor de sêmen de suíno; Minitub[®]), têm sido usadas com sucesso na criopreservação de sêmen de peixes (VIVEIROS; GODINHO, 2009).

A combinação diluidor e crioprotetor pode ser mais ou menos efetiva na proteção dos espermatozoides durante o congelamento e descongelamento, de acordo com o protocolo utilizado em cada laboratório. Alguns fatores interferem no sucesso da criopreservação, tais como: taxa de diluição, temperatura do meio no momento da adição do sêmen, tempo de exposição dos espermatozoides ao meio antes do congelamento propriamente dito, entre outros. Além disso, diferenças entre exemplares domesticados em relação aos selvagens, e diferenças na alimentação e no manejo da criação podem alterar a composição do plasma seminal e, conseqüentemente a sensibilidade dos espermatozoides ao processo de criopreservação (ARAÚJO, 2011).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho, foram avaliados os efeitos de soluções antes e durante o processo de criopreservação de sêmen, bem como metodologias de avaliação da qualidade espermática que visam aprimorar a reprodução artificial de curimatá *P. lineatus* e da piracanjuba *B. orbignyanus*.

Os danos que ocorrem durante o processo de criopreservação sobre os espermatozoides não podem ser combatidos isoladamente, em virtude da diversidade de fatores envolvidos neste processo. Desta forma, é de fundamental importância o desenvolvimento de pesquisas que permitam a elaboração de protocolos que minimizem estes efeitos, bem como a elaboração e padronização de métodos eficazes de análise da viabilidade da célula espermática submetida ao processo de criopreservação para incrementar os índices de fertilidade nos programas de reprodução artificial.

Devido à grande diversidade da ictiofauna brasileira, as informações existentes relativas à criopreservação de sêmen ainda está restrita a algumas espécies onde protocolos foram testados. As técnicas usadas neste estudo podem servir de base para outras espécies, sejam elas de importância ecológica ou comercial, as quais necessitam de mais conhecimento para a conservação ou melhoramento genético.

Embora no Brasil ainda não existam programas de reprodução artificial onde o sêmen de peixes criopreservado seja utilizado em larga escala, várias pesquisas tem sido feitas com o objetivo de formação de banco genético para espécies ameaçadas de extinção, bem como programas de hibridização com finalidade de melhoramento genético. Assim, quanto mais precisa for a predição da qualidade do sêmen mais efetivo será o programa de reprodução.

REFERÊNCIAS

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.

_____. Sperm motility in fishes: II. effects of ions and osmolality: a review. **Cell Biology International**, London, v. 30, n. 1, p. 1-14, Jan. 2006.

ALAVI, S. M. H. et al. Morphology and fine structure of *Barbus barbuis* (Teleostei: Cyprinidae) spermatozoa. **Journal of Applied Ichthyology**, Berlin, v. 24, n. 4, p. 378-381, Aug. 2008.

_____. Semen of *Perca fluviatilis* L.: sperm volume and density, seminal plasma indices and effects of dilution ratio, ions and osmolality on sperm motility. **Theriogenology**, Los Angeles, v.68, n. 2, p. 276-283, July 2007.

ARAÚJO, R. V. **Motilidade, velocidade e fertilidade do sêmen de surubim-do-paraiíba *Steindachneridium parahybae* (Siluriformes) criopreservado em diferentes diluidores**. 2011. 91 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

ARRUDA, R. P. et al. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 35, n. 2, p. 145-151, abr./jun. 2011.

BILLARD, R. Artificial insemination in fish. In: LAMMING, P. (Ed.). **Marshall's physiology of reproduction**. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1990. v. 4, p. 870-888.

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

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

BILLARD, R.; COSSON, M. P. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fishes. **Journal of Experimental Zoology**, Philadelphia, v.261, n. 2, p. 122-131, Apr. 1992.

BOLSOVER, S. R. et al. **Cell biology: a short course**. Hoboken: J. Wiley, 2004.

BOMBARDELLI, R. A. et al. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá cinza, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 35, n. 4, p. 1251-1257, jul./ago. 2006.

BONETTO, A. A. Fish of the Paraná system. In: DAVIES, B. R.; WALKER, K. F. (Ed.). **The Ecology of River System**. The Netherlands: Dr. W. Junk, 1986. p. 573-588.

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.

CARNEIRO, P. C. F. et al. Cryopreservation of tambaqui (*Colossoma macropomum*) semen: extenders, cryoprotectants, dilution ratios and freezing methods. **CryoLetters**, Lewes, v. 33, n. 5, p. 385-393, Sept./Oct. 2012.

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

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

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

COSSON, J. Frenetic activation of fish spermatozoa flagella entails short-term motility, portending their precocious decadence. **Journal of Fish Biology**, London, v. 76, n. 1, p. 240-279, July 2010.

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. et al. Analysis of motility parameters from paddlefish and shovelnose sturgeon spermatozoa. **Journal of Fish Biology**, London, v. 56, n. 6, p. 1348-1367, June 2000.

COSSON, J. et al. Movements of fish sperm flagella studied by high speed videomicroscopy coupled to computer assisted image analysis. **Polish Archives of Hydrobiology**, Cincinnati, v.44, n. 2, p.103-113, 1997.

_____. Regulation of axonemal wave parameters of fish spermatozoa by ionic factors. In: GAGNON, C. (Ed.). **The male gamete: from basic knowledge to clinical applications**. Montréal: CacheRiver, 1999. p. 161-186.

_____. Studying sperm motility in marine fish: an overview on the state of the art. **Journal of Applied Ichthyology**, Berlin, v. 24, n. 4, p. 460-486, Aug. 2008.

FLECKER, A. S. Ecosystem engineering by a dominant detritivore in a diverse tropical stream. **Ecology**, Ithaca, v. 77, n. 6, p. 1845-1854, Sept.1996.

FONSECA, V. O. et al. **Procedimentos para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1992. 69 p.

GODOY, M. P. **Peixes e pesca do Rio Paraná: área do futuro reservatório de Ilha Grande**. Florianópolis: ELETROSUL, 1986. 148 p.

GONÇALVES, A. C. S. et al. Initiation and suppression of sperm motility is osmolality-dependent in two South American fish species: streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) and piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 10, n. 1, p. 62-70, jan./mar. 2013.

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

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.

KAVAMOTO, E. T.; SILVEIRA, W. F. da. Physical, chemical and microscopic semen catfish, *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840) under field conditions. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 13, p. 95-100, 1986.

KOPEIKA, E. et al. Cryopreservation of fish sperm. In: DAY, J. G.; STACEY, G. N. (Ed.). **Cryopreservation and freeze-drying protocols**. Totowa: Human, 2007. p. 203-217.

LAHNSTEINER, F. Introduction to the special issue on 'cryopreservation of gametes in aquatic species'. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 31, n. 3, p. 229, Mar. 2000.

LAHNSTEINER, F. et al. 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.

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, 1991. cap. 20, p. 245-295.

LIN, F.; CIERESZKO, A.; DABROWSKI, K. Sperm production and cryopreservation in muskellung after carp pituitary extract and human chorionic gonadotropin injection. **The Progressive Fish Culturist**, Bethesda, v. 58, n. 1, p. 32-37, 1997.

MARIA, A. N. et al. Effects of cooling and freezing on sperm motility of the endangered fish piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Characiformes, Characidae). **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 3, n. 1, p. 55-60, jan./mar. 2006.

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

MOHD-ZAINI, S.; SAADON, K.; DAN OMAR, A. B. Ovaprim: a new technology for spawning aquarium fish. **Progressive Fisheries Research Conference**, Kuala Lumpur, n. 4, p. 257-260, 1994.

MORISAWA, M. et al. Initiation of sperm motility in teleosts. **Journal Submicroscope Cytology**, Tokyo, v. 15, n. 1, p. 61-65, Jan. 1983.

_____. Transmembrane signal transduction for the regulation of sperm motility in fishes and ascidians. In: GAGNON, C. (Ed.). **The malegamete: from basic knowledge to clinical applications**. Vienna: CacheRiver, 1999. p. 149-160.

MORISAWA, M.; MORISAWA, S. Aquisition and initiation of sperm motility. In: GAGNON, C. (Ed.). **Controls of sperm motility: biological and clinical aspects**. Boca Raton: CRC, 1990. p. 137-152.

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.

NASCIMENTO, A. F. et al. Out-of-season sperm cryopreserved in different media of the Amazonian freshwater fish pirapitinga (*Piaractus brachypomus*). **Animal Reproduction Science**, Belo Horizonte, v. 118, n. 2-4, p. 324-329, Apr. 2010.

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, 2006.

ORFÃO, L. H. et al. Sperm fertility of the subtropical freshwater streaked prochilod *Prochilodus lineatus* (Characiformes) improved after dilution and cold storage. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 41, n. 10, p. 679-687, Sept. 2010.

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

PARKS, E. J.; GRAHAM, J. K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 38, n. 2, p. 209- 222, Aug. 1992.

RAVINDER, K. et al. 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.

RESENDE, E. K.; MARQUES, D. K. S. **Criopreservação de sêmen de peixe**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2009. 5 p. (Embrapa Pantanal. Circular Técnica, 84). Disponível em: <http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/download.php?arq_pdf=CT84>. Acesso em: 20 jun. 2013.

ROSA, R. S.; LIMA, F. T. **Os peixes ameaçados de extinção**. In: MACHADO, A. B. M.; DRUMMOND, G. M.; PAGLIA, A. P. (Ed.). **Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente/Fundação Biodiversitas, 2008. p. 9-285.

RURANGWA, E. et al. Quality control of refrigerated and cryopreserved semen using computer assisted sperm analysis (CASA), viable staining standardized fertilization in African catfish (*Clarias gariepinus*). **Theriogenology**, Los Angeles, v. 55, n. 3, p. 751-769, Feb. 2001.

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.

SILVEIRA, W. F. et al. 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.

SOARES, A. T.; GUERRA, M. M. P. Efeitos da criopreservação sobre a viabilidade espermática. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v. 3, n. 2, p. 53-63, jun. 2009.

SQUIRES, E. L. et al. Principles of cryopreservation. In: _____. **Cooled and frozen Stallion Semen**. Fort Collins: Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, 1999. cap. 9.

SUQUET, M. et al. Cryopreservation of sperm in marine fish. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 31, n. 3, p. 231-243, Mar. 2000.

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, abr. 2003.

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

VARELA-JUNIOR A. S. et al. Efeito crioprotetor de diferentes concentrações de dimetilsufóxido no congelamento de sêmen de tambaqui *Colossoma macropomum*. **Atlântica**, Rio Grande, v. 34, n. 2, p. 129-137, 2012.

VAZ, M. M.; TORQUATO, V. C.; BARBOSA, N. D. C. **Guia ilustrado de peixes da bacia do Rio Grande**. Belo Horizonte: CEMIG/CETEC, 2000. 144 p.

VERMEIRSEN, E. L. M. et al. Fertility and motility of sperm from Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) in relation to dose and timing of gonadotrophin-releasing hormone agonist implant. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 230, n. 3, p. 547-567, May/June 2003.

VIEIRA, M. J. A .F. et al. Características do sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*) em latitude equatorial. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 60, n. 232, p.1263-1270, Dec. 2011.

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

_____. Sperm cryopreservation affects postthaw motility, but not embryogenesis or larval growth in the Brazilian fish *Brycon insignis* (Characiformes). **Theriogenology**, Los Angeles, v. 78, n. 4, p. 803-810, Sept. 2012.

VIVEIROS, A. T. M. et al. Sperm cryopreservation of tiete *Brycon insignis* (Characiformes): effects of cryoprotectants, extenders, thawing temperatures and activating agents on motility features. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 42, n. 6, p. 858-865, May 2011.

_____. Simple, inexpensive and successful freezing method for curimba *Prochilodus lineatus* (Characiformes) semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 112, n. 3, p. 293-300, 2009.

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

WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of their post-thawing function. **Reproduction, Fertility and Development**, Melbourne, v. 7, n. 4, p. 871-891, Aug. 1995.

YANG, H.; TIERSCH, T. R. Application of computer-assisted sperm analysis (CASA) to aquatic species. In: TIERSCH, T. R.; GREEN, C. C. (Ed.). **Cryopreservation in aquatic species**. 2nd ed. Baton Rouge: The World Aquaculture Society, 2011. p. 240-254.

YUAN, E. C. de. Fish populations of lentic environments of the Parana River. **Hydrobiologia**, Brussels, v. 237, p. 159-173, Aug. 1992.

.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1 Extender composition, osmolality, cryoprotectant and equilibration time effects on fresh sperm motility of two Characiformes fish: piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) and streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*)

**Preparado de acordo com as normas e publicado na revista *Animal
Reproduction*, v. 9, n. 2, p. 103-110, 2012**

Abstract

NASCIMENTO, A.F.; GONÇALVES, REIS NETO, R.V.; A.C.; LEAL, M.C.; VIVEIROS, A.T.M. Extender composition, osmolality, cryoprotectant and equilibration time effects on fresh sperm motility of two Characiformes fish species: *Brycon orbignyanus* and *Prochilodus lineatus*

Studies regarding the effects of extender composition, osmolality, cryoprotectant (CPA) and equilibration time on the induction/suppression of sperm motility are necessary to establish standard activating agents and immobilizing media for improving both artificial fertilization and preservation techniques. Thus, the aim of this study was to evaluate the effects of these factors on fresh sperm motility in piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) and streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*). Twenty four media, as a combination of six extenders (BTS™ and glucose solutions at 270, 315 and 360 mOsm/kg) with the CPAs DMSO, methanol, methyl glycol (MG) and a control without CPA, were prepared. Immediately after dilution, samples were observed under a light microscope to confirm whether different extender-CPA combinations would suppress the initiation of sperm motility. Motility was then triggered in NaCl at 92 mOsm/kg and evaluated immediately after dilution (non-equilibrated samples) and after a 30-min equilibration time at 4°C for motility rate and motility quality score (0 = no movement; 5 = rapidly swimming sperm). In both species, motility was initiated in all samples diluted with BTS-270-control, Glu-270-MG, Glu-270-control and in all combinations containing DMSO. In *B. orbignyanus*, motility rate (77 to 92%) and quality score (3.3 to 4.7) of non-equilibrated samples was not significantly affected by any parameter. After 30 min, however, motility quality score decreased in most of the samples, mainly when diluted with BTS™ (3.3 to 4.2). In *P. lineatus*, motility rate was significantly higher in non-equilibrated samples (overall mean = 83%) compared to 30-min equilibrated

samples (overall mean = 75%). Motility quality score of non-equilibrated samples was not affected by any parameter (3.3 to 4.2), but samples equilibrated in DMSO yielded the lowest score (3.0). Sperm motility (rate and score) was affected differently in *B. orbignyana* compared to *P. lineatus*, and this finding should be considered when developing a freezing methodology for sperm cryopreservation.

Keywords: Reproduction, semen, sperm quality, teleost.

Resumo

NASCIMENTO, A.F.; GONÇALVES, REIS NETO, R.V.; A.C.; LEAL, M.C.; VIVEIROS, A.T.M. Efeitos da composição do diluidor, osmolalidade, crioprotetores e tempo de equilíbrio na motilidade do sêmen fresco de duas espécies de peixes Characiformes: *Brycon orbignyanus* e *Prochilodus lineatus*

Estudos sobre os efeitos da composição do diluidor, osmolalidade, crioprotetor (CPA) e tempo de equilíbrio na indução/supressão da motilidade dos espermatozoides são necessários para estabelecer agentes ativadores e meios imobilizadores para melhorar tanto a fertilização artificial como técnicas de preservação. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos desses fatores sobre a motilidade do sêmen fresco de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) e curimba (*Prochilodus lineatus*). Vinte e quatro meios numa combinação de seis diluidores (BTS[®] e soluções de glicose a 270, 315 e 360 mOsm/kg) e quatro CPAs (DMSO, metanol, metil glicol (MG)) e um controle sem CPA foram preparados. Imediatamente após diluição, as amostras foram observadas em um microscópio de luz para confirmar se todas as combinações de diluidor-CPA iriam suprimir o início da motilidade do sêmen. A motilidade foi então ativada em NaCl a 92 mOsm/kg e avaliada imediatamente após diluição (amostras não-equilibradas) e depois de um tempo de equilíbrio de 30 min a 4 °C, em relação a taxa de motilidade e vigor (0 = nenhum movimento, 5 = espermatozoides nadando rapidamente). Em ambas as espécies, a motilidade foi iniciada em todas as amostras diluídas em BTS-270-controle, Glu-270-MG, Glu -270-controle, e em todas as combinações contendo DMSO. Em *B. orbignyanus*, a taxa de motilidade (77-92%) e o vigor (3,3-4,7) de amostras não equilibradas não foi significativamente afetado por qualquer parâmetro. Depois de 30 minutos, no entanto, o vigor espermático diminuiu na maioria das amostras, principalmente quando diluídas em BTS[™] (3,3-4,2). Em *P. lineatus*, a taxa de motilidade foi significativamente maior em amostras não-equilibradas (média geral = 83%) em

comparação com amostras equilibradas por 30 min (média geral = 75%). O vigor das amostras não-equilibradas não foi afetado por nenhum parâmetro (3,3-4,2), mas amostras equilibradas em DMSO apresentaram vigor mais baixo (3,0). A motilidade espermática (taxa e vigor) foi afetada de forma diferente em *B. orbignyana* em comparação com *P. lineatus*, e isso deve ser considerado quando se desenvolver uma metodologia de congelamento para a criopreservação do sêmen.

Palavras-chave: Reprodução, sêmen, qualidade espermática, teleósteos.

Introduction

Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) and streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) belong to the order Characiformes and are native to South America. These species have great potential for aquaculture and have been used in restocking programs through artificial propagation (Carolsfeld *et al.*, 2003). During the spawning season (October to February), these species migrate to spawning sites. This migratory behavior is known as *piracema* and occurs when the environment is appropriate to stimulate the fish's reproductive biology (Godinho and Godinho, 1994). Changes in the course of rivers, urbanization, pollution, overfishing and hydroelectric dams are some of the reasons why the populations of some migratory fish are declining. The genus *Brycon*, family Characidae, is highly affected by environmental changes, and many species are on the red list of Brazilian threatened fauna, such as *B. orbignyanus*, pirapitinga-do-sul (*B. opalinus*), tiete-tetra (*B. insignis*) and pirapitinga (*B. nattereri*; Rosa and Lima, 2008). *B. orbignyanus* is native to the La Plata River basin and is found in Argentina, Brazil and Uruguay (Lopez *et al.*, 1987; Lima, 2003). It is a very tasty, highly priced fish, and its aggressive behavior is appreciated for recreational fishing (Companhia Energética de Minas Gerais (CEMIG) and Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais (CETEC), 2000). *P. lineatus* belongs to the family Prochilodontidae and has a large geographical distribution throughout South America, accounting for 50-90% of the total fish biomass in the Paraná River basin. This species is popularly known as curimba, curimbatá or grumatã. Larvae from *P. lineatus* are used as live feed for hatchery-raised endangered species, such as *B. orbignyanus* and jaú (*Z. jahu*). Also, this species has been used as a model in a number of studies addressing nutrition, health, genetic diversity and reproduction (Orfão *et al.*, 2010).

Most fish spermatozoa are immotile in the seminal tract and hyposmotic media can initiate sperm motility in freshwater fish (Morisawa and Suzuki, 1980). Besides osmolality, pH, temperature and ion concentration affect sperm motility (Alavi and Cosson, 2006). Studies regarding the effects of these factors on the induction and suppression of sperm motility are necessary to establish standard activating agents (media that trigger motility) and immobilizing media (media that suppress the initiation of sperm motility, also called extenders) for improving both artificial fertilization and preservation techniques (Alavi *et al.*, 2009). In Characiformes, there are only a few studies that describe the effects of osmolality on fresh sperm motility. In those species, motility was suppressed in NaCl or glucose solutions at a minimum of 360 mOsm/kg in *Prochilodus lineatus* (Gonçalves and Viveiros; unpublished data), 325 mOsm/kg in *B. opalinus* (Orfão *et al.*, 2011), ~276 mOsm/kg in *B. orthotaenia* (Melo and Godinho, 2006) and 410 mOsm/kg in *B. insignis* (Shimoda *et al.*, 2007). In our previous study (Maria *et al.*, 2006b), some media with an osmolality ranging from 240 to 429 mOsm/kg were tested in *B. orbignyanus* sperm. Motility was suppressed in media at 285 mOsm/kg or above. The media tested, however, possessed not only different osmolalities but also different compositions, thus, conclusions regarding osmolality only could not be drawn. All these studies suggest that sperm motility in Characiformes is triggered in a hyposmotic medium, and that the minimum osmolality to suppress the initiation of sperm motility is different among species.

The aim of the present study was to investigate the effects of extender composition, osmolality, cryoprotectant agent and equilibration time on fresh sperm motility of *B. orbignyanus* and *P. lineatus*.

Materials and Methods

Fish handling, sperm collection and initial evaluation

All fish were handled in compliance with published guidelines for animal experimentation (Van Zutphen *et al.*, 1993). *B. orbignyanus* (n = 6) and *P. lineatus* (n = 6) males were selected from earthen ponds at the Hydrobiology and Fish Culture Station of Furnas, state of Minas Gerais, Brazil (20°43'07" S; 46°18'50" W) during the spawning season (November and December). All males with detectable running sperm under soft abdominal pressure were given a single intramuscular dose of carp pituitary extract (cPE; Argent Chemical Laboratory, Redmond, Washington, USA) at 3 mg/kg body weight. After 5 (*B. orbignyanus*) or 8 h (*P. lineatus*) at ~25°C, the urogenital papilla was carefully dried and approximately 5 ml of sperm from each male was hand stripped directly into test tubes. Sperm collection was carried out at room temperature (~22 °C). Soon after collection, tubes containing sperm were placed in a polystyrene box containing chemical ice (4 ± 2°C). Contamination of sperm with water, urine or feces was carefully avoided. Immediately after collection, 5 µl of each sample was placed on a glass slide and observed under a light microscope (model L1000, Bioval, Jiangbei, China) at 400X magnification. As the sperm in the seminal plasma of both species should be immotile, any sperm motility observed was attributed to urine or water contamination and the sample was discarded. All samples were immotile and sperm motility was then triggered in 25 µl of 92 mOsm/kg NaCl (~0.29% NaCl) as an activating agent (Maria *et al.*, 2006a). Because the sticking of sperm to a glass slide has not been observed in the Characiformes species, the addition of BSA or any other protein in the activating agent was unnecessary. Immediately after, motility rate was subjectively estimated and expressed as the percentage of motile sperm. All

sperm samples possessed at least 80% motile sperm and were used in the subsequent analyses. Motility quality scores were assigned using an arbitrary grading system ranging from 0 (no movement) to 5 (rapidly swimming spermatozoa), as described in Viveiros *et al.* (2011). Sperm concentration (hemacytometer Neubauer chamber, Boeco, Hamburg, Germany) was also determined. Approximately 1.5 ml of each sperm sample was centrifuged (MiniStar, Shanghai, China) at 2000 g for 30 min at room temperature and the seminal plasma osmolality (Semi-Micro Osmometer K-7400, Knauer, Berlin, Germany) was measured.

Extender composition, osmolality, cryoprotectant and equilibration time on sperm motility

Six extenders, comprised of the combination of two compositions and three osmolalities, were prepared. The extender compositions were a simple glucose solution and a more complex solution named BTS™ (80% glucose, 12.7% sodium citrate, 2.7% EDTA, 2.7% NaHCO₃, 1.5% KCl, 0.5% gentamycin sulfate; Beltsville Thawing Solution Minitüb™, Tiefenbach/Landshut, Germany). Each solution was prepared at three different osmolalities (270, 315 and 360 mOsm/kg) and referred to as Glu-270, Glu-315, Glu-360, BTS-270, BTS-315 and BTS-360. Then, each extender was combined with the following cryoprotectant agents (CPAs): dimethyl sulfoxide (DMSO, (CH₃)₂SO); methanol (CH₃OH); methyl glycol (MG, CH₃O(CH₂)₂OH) and a control without CPA (Maria *et al.*, 2006a, b). All CPAs were purchased from Vetec Química Fina Ltda™, Duque de Caxias, RJ, Brazil. In total, 24 media (6 extenders x 4 CPAs) were tested. Sperm from each male (n = 6 males of each species) was diluted in each medium to a final proportion (v/v) of 10% sperm, 10% CPA and 80% extender. Immediately after dilution, samples were observed

under a light microscope to confirm whether all extender-CPA combinations would suppress the initiation of sperm motility. Soon after, and with no equilibration time, diluted sperm was activated and evaluated for motility (rate and quality score) as described for fresh sperm. Because we aimed to test the best extender-CPA combinations as freezing media for cryopreservation, sperm was equilibrated for 30 min at $4 \pm 2^\circ\text{C}$ and evaluated again for motility. The 30-min equilibration time represents the lag period necessary for the permeation of CPA into the cells for protection against cryoinjuries and for sperm manipulation for freezing (dilution, loading, sealing straws, etc.). This experiment was carried out with six replicates for each species (1 replicate = 1 male).

Statistical analysis

Values are expressed as mean \pm standard deviation (SD). Statistical analyses were conducted with the SISVAR software program (Ferreira, 1999). Sperm motility and motility quality scores were tested for normal distribution using the univariate procedure. When data did not fit the normal distribution, an arcsin transformation was performed. Data were tested for significant differences using ANOVA, followed by the Tukey test, when applicable. The level of significance for all statistical tests was set at 0.05.

Results

Initial sperm evaluation

The following mean sperm values were found for *B. orbignyanus* males (n = 6): 92% motile sperm, quality score of 4.5, concentration of $7.1 \times$

10^9 sperm/ml and seminal plasma osmolality of 300 mOsm/kg; and for *P. lineatus* males (n = 6): 93% motile sperm, quality score of 4.3, concentration of 18.6×10^9 sperm/mL and seminal plasma osmolality of 306 mOsm/kg (Table 1).

Extender composition, osmolality, cryoprotectant and equilibration time on sperm motility

The initiation of sperm motility (number of samples in which motility was initiated/total number of samples) is presented in Table 2. In both species, motility was initiated in all samples diluted in DMSO (regardless of extender composition or osmolality), BTS-270-control, Glu-270-control and Glu-270-MG. In *B. orbignyanus*, motility was completely suppressed in all samples diluted in the BTS-360-control, BTS-360-MG and in all Glu-315 and Glu-360 samples combined with methanol, MG or control. In *P. lineatus*, motility was completely suppressed in all samples diluted in BTS and in glucose at 315 and 360 mOsm/kg combined with methanol, MG or control.

Table 1. Body weight and some fresh sperm features (mean \pm SD) of piracanjuba *Brycon orbignyanus* and streaked prochilod *Prochilodus lineatus* after carp pituitary treatment.

Characteristics	<i>B. orbignyanus</i>	<i>P. lineatus</i>
Number of males	6	6
Body weight (kg)	1.1 \pm 0.8	1.4 \pm 0.3
Concentration (sperm $\times 10^9$ /mL)	7.1 \pm 5.6	18.6 \pm 2.2
Motility rate (% motile sperm)	92 \pm 7	93 \pm 5
Motility quality score (0-5) ¹	4.5 \pm 0.5	4.3 \pm 0.4
Seminal plasma osmolality (mOsm/kg)	300 \pm 9	306 \pm 10

¹ Motility qualitative score was assigned as an arbitrary grading system ranging from 0 (no movement) to 5 (rapidly swimming sperm).

Motility rate upon activation was affected differently in *B. orbignyana* compared to *P. lineatus*. In *B. orbignyana*, sperm motility was not significantly affected by any of the parameters tested and varied from 77 to 92% motile sperm (Table 3A). In *P. lineatus*, motility rate was significantly higher (overall mean = $83 \pm 10\%$) in non-equilibrated samples compared to 30-min equilibrated samples (overall mean = $75 \pm 11\%$; Table 3B). In non-equilibrated samples, an interaction between osmolality and CPA was observed.

Table 2. Initiation of motility (number of samples where sperm motility was initiated/total number of samples) of *Brycon orbignyana* (A; n = 6 males) and *Prochilodus lineatus* (B; n = 6 males) sperm, diluted in BTS™ and glucose at different osmolalities combined with four cryoprotectants (including a control without cryoprotectant).

A) *Brycon orbignyana*

Extender		Cryoprotectant (motility initiated/total samples)			
Composition	mOsm/kg	control	DMSO	methanol	methyl glycol
BTS™	270	6/6	6/6	1/6	3/6
	315	2/6	6/6	1/6	1/6
	360	0/6	6/6	1/6	0/6
Glucose	270	6/6	6/6	2/6	6/6
	315	0/6	6/6	0/6	0/6
	360	0/6	6/6	0/6	0/6

B) *Prochilodus lineatus*

Extender	mOsm/kg	Cryoprotectant (motility initiated/total samples)			
		control	DMSO	methanol	methyl glycol
BTS™	270	6/6	6/6	1/6	2/6
	315	0/6	6/6	0/6	0/6
	360	0/6	6/6	0/6	0/6
Glucose	270	6/6	6/6	1/6	6/6
	315	0/6	6/6	0/6	0/6
	360	0/6	6/6	0/6	0/6

BTS™ (Minitüb): 80% glucose, 12.7% sodium citrate, 2.7% EDTA, 2.7% NaHCO₃, 1.5% KCl, 0.5% gentamycin sulfate

Table 3. Motility rate (mean \pm SD) of *Brycon orbignyanus* (A; n = 6 males) and *Prochilodus lineatus* (B; n = 6 males) sperm, diluted in BTS™ and glucose at different osmolalities combined with four cryoprotectants (including a control without cryoprotectant). Motility was evaluated after 0 (non-equilibrated) and 30 min of equilibration at 4 °C and 92 mOsm/kg NaCl was used as activating agent.

A) *Brycon orbignyanus*

Extender	mOsm/kg	Cryoprotectant			
		control	DMSO	methanol	methyl glycol
Non-equilibrated samples (% motile sperm)					
BTS™	270	89 \pm 2	89 \pm 2	90 \pm 0	88 \pm 7
	315	90 \pm 3	88 \pm 5	92 \pm 3	88 \pm 7
	360	92 \pm 4	88 \pm 3	92 \pm 3	88 \pm 7
Glucose	270	89 \pm 2	85 \pm 4	88 \pm 3	88 \pm 11
	315	88 \pm 5	83 \pm 5	85 \pm 12	87 \pm 14
	360	88 \pm 3	83 \pm 5	87 \pm 5	87 \pm 14
30-min equilibrated samples (% motile sperm)					
BTS™	270	84 \pm 4	77 \pm 5	80 \pm 0	78 \pm 7
	315	83 \pm 4	77 \pm 5	80 \pm 0	83 \pm 5
	360	84 \pm 4	77 \pm 5	80 \pm 0	83 \pm 5
Glucose	270	84 \pm 2	83 \pm 5	83 \pm 10	85 \pm 4
	315	83 \pm 5	83 \pm 5	78 \pm 14	82 \pm 9
	360	85 \pm 3	83 \pm 5	77 \pm 21	80 \pm 12

B) *Prochilodus lineatus*

Extender	mOsm/kg	Cryoprotectant			
		control	DMSO	methanol	methyl glycol
Non-equilibrated samples (% motile sperm)					
BTS™	270	88 ± 3	92 ± 4 ^A	75 ± 5 ^B	83 ± 8
	315	91 ± 2	85 ± 6 ^{AB}	79 ± 11 ^{AB}	82 ± 7
	360	89 ± 5	77 ± 8 ^B	85 ± 8 ^A	80 ± 14
Glucose	270	88 ± 4	92 ± 4 ^A	85 ± 10 ^A	75 ± 10
	315	91 ± 2	87 ± 8 ^{AB}	73 ± 12 ^B	77 ± 15
	360	88 ± 4	82 ± 7 ^B	75 ± 8 ^B	78 ± 16
30-min equilibrated samples (% motile sperm)					
BTS™	270	79 ± 5	75 ± 8	70 ± 11	70 ± 15
	315	78 ± 8	72 ± 10	70 ± 15	80 ± 6
	360	81 ± 5	75 ± 14	69 ± 12	78 ± 10
Mean ± SD		79 ± 6 ^a	74 ± 11 ^{ab}	70 ± 12 ^b	76 ± 11 ^{ab}
Glucose	270	78 ± 4	67 ± 12	77 ± 10	80 ± 9
	315	80 ± 6	63 ± 20	77 ± 8	85 ± 8
	360	82 ± 8	68 ± 12	75 ± 10	82 ± 4
Mean ± SD		80 ± 6 ^a	66 ± 14 ^b	76 ± 9 ^a	82 ± 7 ^a

BTS™ (Minitüb): 80% glucose, 12.7% sodium citrate, 2.7% EDTA, 2.7% NaHCO₃, 1.5% KCl, 0.5% gentamycin sulfate.

^{a-b, A-B} Means followed by different superscripts (uppercases for columns and lowercase for rows) are significantly different (Tukey; P<0.05).

Samples diluted in BTS-DMSO, Glu-DMSO and Glu-methanol produced a higher motility rate at 270 mOsm/kg compared to the same media at 360 mOsm/kg. On the other hand, samples diluted in BTS-methanol yielded a higher motility rate at 360 mOsm/kg (85%) compared to 270 mOsm/kg (75%). In 30-min equilibrated samples, an interaction between extender composition and CPA was observed. Sperm diluted in BTS-control yielded a higher motility rate (79%) compared to samples diluted in BTS-methanol (70%). Sperm equilibrated in Glu-control (80%), Glu-MG (82%) and in Glu-methanol (76%) yielded a higher motility rate than samples equilibrated in Glu-DMSO (66%).

Motility quality score was affected differently in *B. orbignyanus* compared to *P. lineatus*. In *B. orbignyanus*, the motility quality score of non-equilibrated sperm was high (above 4.0) in all samples, except in BTS-270-

control, BTS-DMSO at all osmolalities and Glu-270-control. After 30 min of equilibration, motility quality score decreased in most of the samples, mainly when diluted with BTS™. The highest scores (above 4.0) were observed only in samples equilibrated in BTS-360-control, Glu-315-DMSO, Glu-360-DMSO and in all samples in Glu-methanol and Glu-methyl glycol (Table 4A). In *P. lineatus*, the motility quality score of non-equilibrated sperm was not affected by any parameters evaluated, and varied from 3.3 to 4.2. After 30 min, samples equilibrated in DMSO yielded the lowest score (3.0) compared to the control (3.7), methanol (3.8) and MG (3.9), regardless of extender composition or osmolality (Table 4B).

Table 4. Motility quality score (mean \pm SD) of *Brycon orbignyanus* (A; n = 6 males) and *Prochilodus lineatus* (B; n = 6 males) sperm diluted in BTSTM and glucose at different osmolalities combined with four cryoprotectants (including a control without cryoprotectant). Motility was evaluated after 0 (non-equilibrated) and 30 min of equilibration at 4 °C and 92 mOsm/kg NaCl was used as activating agent.

A) *Brycon orbignyanus*

Extender	mOsm/kg	Cryoprotectant			
		control	DMSO	methanol	methyl glycol
Non-equilibrated samples (score 0-5 ¹)					
BTS TM	270	3.5 \pm 0.8 ^{B,b}	3.7 \pm 0.5 ^b	4.0 \pm 0.0 ^{B,ab}	4.7 \pm 0.5 ^a
	315	4.2 \pm 0.4 ^{A,ab}	3.7 \pm 0.5 ^b	4.3 \pm 0.5 ^{AB,ab}	4.7 \pm 0.5 ^a
	360	4.2 \pm 0.8 ^{A,ab}	3.7 \pm 0.5 ^b	4.7 \pm 0.5 ^{A,a}	4.3 \pm 1.0 ^{ab}
Glucose	270	3.3 \pm 0.8 ^{B,b}	4.7 \pm 0.5 ^a	4.0 \pm 0.0 ^{ab}	4.5 \pm 0.8 ^a
	315	4.2 \pm 0.4 ^A	4.7 \pm 0.5	4.7 \pm 0.5	4.5 \pm 0.8
	360	4.3 \pm 0.5 ^A	4.7 \pm 0.5	4.7 \pm 0.5	4.5 \pm 0.8
30-min equilibration (score 0-5 ¹)					
BTS TM	270	3.5 \pm 0.8	3.3 \pm 0.5	4.0 \pm 0.0	4.0 \pm 0.0
	315	3.8 \pm 0.4	3.3 \pm 0.5	3.7 \pm 0.5	3.7 \pm 0.5
	360	4.2 \pm 0.4	3.7 \pm 0.5	4.0 \pm 0.0	3.7 \pm 0.5
Mean \pm SD		3.9 \pm 0.7 ^a	3.4 \pm 0.5 ^a	3.9 \pm 0.3 ^a	3.8 \pm 0.4 ^a
Glucose	270	3.5 \pm 0.8	3.7 \pm 0.5	4.3 \pm 0.5	4.7 \pm 0.5
	315	3.8 \pm 0.4	4.7 \pm 0.5	4.3 \pm 1.0	4.3 \pm 1.0
	360	4.0 \pm 0.6	4.7 \pm 0.5	4.7 \pm 0.5	4.3 \pm 1.0
Mean \pm SD		3.8 \pm 0.6 ^b	4.3 \pm 0.7 ^a	4.4 \pm 0.7 ^a	4.4 \pm 0.9 ^a

B) *Prochilodus lineatus*

Extender	mOsm/kg	Cryoprotectant			
		control	DMSO	methanol	methyl glycol
Non-equilibrated samples (score 0-5 ¹)					
BTS™	270	3.5 ± 0.5	4.2 ± 0.8	3.3 ± 0.5	3.3 ± 0.8
	315	3.8 ± 0.4	4.0 ± 0.6	3.5 ± 0.5	3.7 ± 0.5
	360	4.0 ± 0.6	3.7 ± 0.5	3.8 ± 0.4	3.8 ± 0.8
Glucose	270	3.7 ± 0.8	4.0 ± 0.0	3.8 ± 0.8	3.5 ± 0.5
	315	3.8 ± 0.4	4.0 ± 0.0	3.5 ± 0.5	3.7 ± 0.5
	360	4.0 ± 0.6	3.8 ± 0.4	3.8 ± 0.4	3.5 ± 0.5
30-min equilibration (score 0-5 ¹)					
BTS™	270	3.3 ± 0.5	2.8 ± 0.4	3.8 ± 0.4	3.8 ± 0.4
	315	3.7 ± 0.5	2.8 ± 0.4	3.7 ± 1.0	4.0 ± 0.0
	360	3.8 ± 0.8	3.7 ± 0.5	3.5 ± 0.8	3.8 ± 0.4
Glucose	270	3.7 ± 0.5	3.0 ± 0.6	3.8 ± 0.8	3.8 ± 0.4
	315	3.8 ± 0.4	2.7 ± 0.5	4.2 ± 0.4	4.2 ± 0.4
	360	3.8 ± 0.4	3.3 ± 0.5	4.0 ± 0.6	4.0 ± 0.6
Mean ± SD		3.7 ± 0.5 ^a	3.0 ± 0.6 ^b	3.8 ± 0.7 ^a	3.9 ± 0.4 ^a

BTS™ (Minitüb): 80% glucose, 12.7% sodium citrate, 2.7% EDTA, 2.7% NaHCO₃, 1.5% KCl, 0.5% gentamycin sulfate.

¹Motility qualitative scores were assigned as an arbitrary grading system ranging from 0 (no movement) to 5 (rapidly swimming spermatozoa).

^{a-b, A-B} Means followed by different superscripts (uppercase for columns and lowercase for rows) are significantly different (Tukey; P<0.05).

Discussion

In the present study, some fresh sperm features and the effects of extender (composition and osmolality), cryoprotectant and equilibration time on fresh sperm motility of *B. orbignyanus* and *P. lineatus* were evaluated. Fresh sperm quality for *B. orbignyanus* and for *P. lineatus* was all within the range previously reported for both species after carp pituitary treatment (Godinho and Viveiros, 2011). A better understanding of the characteristics of fresh sperm before manipulation is necessary to evaluate sperm quality in commercial

hatcheries before artificial reproduction and in laboratories before experiments (Orfão *et al.*, 2011).

Extender composition affected neither motility rate in *B. orbignyanus* nor motility rate or motility quality score in *P. lineatus*. Similarly, in zebrafish (*Danio rerio*; Wilson-Leedy *et al.*, 2009), Northern pike (*Exos lucius* L.; Alavi *et al.*, 2009), pirapitinga (*Brycon nattereri*; Oliveira *et al.*, 2007) and *B. opalinus* (Orfão *et al.*, 2011), no difference was observed in sperm motility after dilution in NaCl or a sugar solution.

In the present study, the osmolality of 270 mOsm/kg in samples diluted in BTS-control and in Glu-control did not prevent the initiation of sperm motility for *B. orbignyanus* or *P. lineatus*. Because the seminal plasma osmolality of both species is 300 mOsm/kg or higher, the initiation of sperm motility in a medium of 270 mOsm/kg could be expected. Environmental factors, such as ions and osmolality, stimulate the initiation of sperm motility by changing the properties of the plasma membrane (Morisawa *et al.*, 1999; Krasznai *et al.*, 2000). For fresh sperm, there are some studies showing that the initiation of sperm motility was completely suppressed in glucose or NaCl at 325 mOsm/kg or higher in *B. opalinus* of the Characiformes species (Orfão *et al.*, 2011), in NaCl at ~276 mOsm/kg or higher in *B. orthotaenia* (Melo and Godinho, 2006), in NaCl at 410 mOsm/kg or higher in *B. insignis* (Shimoda *et al.*, 2007) and in glucose solution at 410 mOsm/kg or higher in *Prochilodus magdalenae* (Martínez *et al.*, 2011). It is noteworthy that in the present study, although samples diluted in media at 270 mOsm/kg showed some degree of motility, sperm motility in these samples could be triggered after 30 min of equilibration. Possibly, *B. orbignyanus* and *P. lineatus* sperm have the ability of reactivation, as has been reported for *C. carpio* sperm (Perchec *et al.*, 1995), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sperm (Christen *et al.*, 1987) and *B. opalinus* sperm (Orfão *et al.*, 2011). A transient lack of energy and its recovery

is one possible explanation, but osmotic reequilibration could occur in sperm during this 30-min equilibration period, reestablishing an internal ionic concentration compatible with a correct motility activation rate. Although the osmolality did not affect sperm motility after 30-min of equilibration compared to non-equilibrated samples, just to be on the safe side, we recommend that the sperm of *B. orbignyanus* and *P. lineatus* should be stored in a medium at 315 mOsm/kg or higher.

In this study, sperm motility was initiated in all sperm samples diluted in DMSO, regardless of extender composition or osmolality. When a CPA is added to an extender, the global osmolality of the surrounding medium is increased. The initiation of sperm motility, however, was not suppressed by such an increase in global osmolality. It has been shown that the addition of DMSO activates striped bass (*Morone saxatilis*; He and Woods, 2003) and *B. opalinus* (Orfão *et al.*, 2011) sperm kept quiescent in extenders. In *C. carpio* sperm, a swelling following the addition of DMSO at 1 to 20% (approximately 400 to 3200 mOsm/kg) has been observed, possibly caused by an influx of water (Perchee-Poupard *et al.*, 1997). In the present study, DMSO was used at 10% of the total solution, which is within the range of 1 to 20% observed for carp sperm. It is possible that a similar water influx after the addition of DMSO had occurred and triggered sperm motility, despite an increase in global osmolality. Thus, we recommend the use of methyl glycol or methanol instead. However, if DMSO is to be used, then it should be added to the sperm just before freezing to prevent the initiation of sperm motility.

Equilibration time did not affect motility rate in *B. orbignyanus* sperm, but the motility quality score decreased in most of the samples after 30-min equilibration. In *P. lineatus*, motility rate was higher in non-equilibrated samples compared to 30-min equilibrated samples. The motility quality score of *P. lineatus* sperm, however, was not affected by equilibration time, except when

DMSO was used as a CPA. Some studies suggest that equilibration time is not necessary (Aral *et al.*, 2009), and that excessive contact of spermatozoa with the cryoprotectant before cryopreservation can lead to higher toxicity effects of these cryoprotectants. Equilibration times between 10 and 20 min are the most commonly used for fish sperm (Billard and Zhang, 2001). Since a decrease in sperm motility (rate and/or motility quality score) was observed after 30 min of exposure to a CPA in both species, we suggest that freezing should occur as soon as the straws are loaded.

In conclusion, the initiation of sperm motility is triggered in a hyposmotic medium (270 mOsm/kg) or when DMSO is added to the medium. Although motility was initiated in samples diluted in these media, motility could still be triggered after a 30 min equilibration time. *B. orbignyianus* sperm should be tested for cryopreservation diluted in glucose at 315 mOsm/kg or higher and combined with MG or methanol, while *P. lineatus* sperm should be cryopreserved in BTS™ or glucose at 315 mOsm/kg or higher and MG as a CPA. In both species, freezing should occur as soon as the straws are loaded.

Acknowledgements

This study received funding from the Brazilian fostering agencies CNPq (PQ 300994/2008-7; PQ 302434/2011-9; 552471/2010-0), ANEEL P&D Furnas (017965) and FAPEMIG (PPM CVZ 00129-11; BPD-00216-11). This research is part of A.F. Nascimento's PhD project. The authors thank the undergraduate student M. Hamaue (UFLA) and the biologists D.M. Ribeiro and M.B. Goulart (Furnas) for assistance during the experiments.

References

- Alavi SMH, Cosson J.** 2006. Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: a review. *Cell Biol Int*, 30:1-14.
- Alavi SMH, Rodina M, Viveiros ATM, Cosson J, Gela D, Boryshpolets S, Linhart O.** 2009. Effects of osmolality on sperm morphology, motility and flagellar wave parameters in Northern pike (*Esox lucius* L.). *Theriogenology*, 72:32-43.
- Aral F, Sahinoz E, Dogu Z, Demirkol R.** 2009. Effect of equilibration times on sperm cryopreservation of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* W., 1792). *Int J Natural Eng Sci*, 3:9-12.
- Billard R, Zhang T.** 2001. Techniques of genetic resource banking in fish. In: Watson PF, Holt WV (Ed.). *Cryobanking the Genetic Resource*. London: Taylor and Francis. pp. 144-170.
- Carolsfeld J, Godinho HP, Zaniboni Filho E, Harvey BJ.** 2003. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. *J Fish Biol*, 63:472-489.
- Christen R, Gatti JL, Billard R.** 1987. Trout sperm motility. The transient movement of trout sperm is related to changes in the concentration of ATP following the activation of the flagellar movement. *Eur J Biochem*, 166:667-671.
- Companhia Energética de Minas Gerais (CEMIG), Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais (CETEC).** 2000. Guia ilustrado de Peixes da Bacia do Rio Grande. Belo Horizonte, MG: CEMIG. pp. 144.
- Ferreira DF.** 1999. Analysis of Variance System (SISVAR). Version 4.3 (Build 43). Lavras, MG: Department Statistics of UFLA.

Godinho HP, Godinho AL. 1994. Ecology and conservation of fish in southeastern Brazilian river basins submitted to hydroelectric impoundments. *Acta Limnol Brasil*, 5:187-197.

Godinho HP, Viveiros ATM. 2011. Current status of sperm cryopreservation of Brazilian characiform fishes. *In: Tiersch TR, Green CC. (Ed.). Cryopreservation in Aquatic Species.* 2nd ed. Baton Rouge, LA: The World Aquaculture Society. pp. 875-884.

He S, Woods LC. 2003. The effects of osmolality, cryoprotectant and equilibration time on striped bass (*Morone saxatilis*) sperm motility. *J World Aquac Soc*, 34:255-265.

Krasznai Z, Marian T, Izumi H, Damjanovich S, Balkay L, Tron L, Morisawa M. 2000. Membrane hyperpolarization removes inactivation of Ca²⁺ channels leading to Ca²⁺ influx and initiation of sperm motility in the common carp. *Proc Natl Acad Sci*, 97:2052-2067.

Lima FCT. 2003. Characidae - Bryconinae (Characins, tetras). *In: Reis RE, Kullander SO, Ferraris Jr CJ. (Ed.). Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America.* Porto Alegre, RS: EDIPUCRS. pp. 174-181.

Lopez HL, Menni RC, Miguelarena AM. 1987. *Lista de los Peces de Agua Dulce de la Argentina.* La Plata, Argentina: Instituto de Limnología Raúl Ringuelet. 50 pp. (Biología Acuática, 12).

Maria AN, Viveiros ATM, Freitas RTE, Oliveira AV. 2006a. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. *Aquaculture*, 260:298-306.

Maria AN, Viveiros ATM, Orfão LH, Oliveira AV, Moraes GF. 2006b. Effects of cooling and freezing on sperm motility of the endangered fish piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Characiformes, Characidae). *Anim Reprod*, 3:55-60.

- Martínez G, García VA, Carrasco SP.** 2011. Effect of glucose concentration on sperm motility activation in bocachico *Prochilodus magdalenae* (Pisces, Characiformes). *Rev MVZ Cordoba*, 16:2554-2563.
- Melo FCSA, Godinho HP.** 2006. A protocol for cryopreservation of spermatozoa of the fish *Brycon orthotaenia*. *Anim Reprod*, 33:380-385.
- Morisawa M, Suzuki K.** 1980. Osmolality and potassium ions: their roles in initiation of sperm motility in teleosts. *Science*, 210:114-115.
- Morisawa M, O da S, Yoshida M, Takai H.** 1999. Transmembrane signal transduction for the regulation of sperm motility in fishes and ascidians. In: Gagnon C. (Ed.). *The Male Gamete: From Basic to Clinical Applications*. Vienna, IL: Cache River Press. pp. 149-160.
- Oliveira AV, Viveiros ATM, Maria AN, Freitas RTF, Izaú AZ.** 2007. Sucesso do resfriamento e congelamento de sêmen de pirapitinga *Brycon nattereri*. *Arq Bras Med Vet Zootec*, 59:1509-1515.
- Orfão LH, Maria AN, Nascimento AF, Izaú ZA, Viveiros ATM.** 2010. Sperm fertility of the subtropical freshwater streaked prochilod *Prochilodus lineatus* (Characiformes) improved after dilution and cold storage. *Aquac Res*, 41:679-687.
- Orfão LH, Nascimento AF, Corrêa FM, Cosson J, Viveiros ATM.** 2011. Extender composition, osmolality and cryoprotectant effects on the motility of sperm in the Brazilian endangered species *Brycon opalinus* (Characiformes). *Aquaculture*, 311:241-247.
- Perchee G, Jeulin C, Cosson J, André F, Billard R.** 1995. Relationship between sperm ATP content and motility of carp spermatozoa. *J Cell Sci*, 108:747-753.

- Perchec-Poupard G, Gatti JL, Cosson J, Jeulin C, Fierville F, Billard R.** 1997. Effects of extracellular environment on the osmotic signal transduction involved in activation of motility of carp spermatozoa. *J Reprod Fertil*, 110:315-327.
- Rosa RS, Lima FT.** 2008. Os peixes ameaçados de extinção. In: Machado ABM, Drummond GM, Paglia AP (Ed.). *Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção*. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente/Fundação Biodiversitas. pp. 9-285.
- Shimoda E, Andrade DR, Vidal Junior MV, Yasui GS, Silva JFS, Godinho HP, Souza G.** 2007. Efeito da osmolaridade sobre a motilidade espermática na piabanha *Brycon insignis*. *Rev Ceres*, 54:430-433.
- Van Zutphen LFM, Baumans V, Beynen AC.** 1993. *Principles of Laboratory Animal Science*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier.
- Viveiros ATM, Amaral TB, Orfão LH, Isaú ZA, Caneppele D, Leal MC.** 2011. Sperm cryopreservation of tiete tetra *Brycon insignis* (Characiformes): effects of cryoprotectants, extenders, thawing temperatures and activating agents on motility features. *Aquac Res*, 42:858-865.
- Wilson-Leedy JG, Kanuga MK, Ingermann RL.** 2009. Influence of osmolality and ions on the activation and characteristics of zebrafish sperm motility. *Theriogenology*, 71:1054-1062.

(VERSÃO PRELIMINAR DO ARTIGO)

ARTIGO 2 Methyl glycol, methanol and Me₂SO effects on post-thaw sperm motility, velocities and membrane integrity of *Brycon orbignyanus* and *Prochilodus lineatus* (Characiformes)

Preparado de acordo com as normas da revista Cryobiology

Abstract

VIVEIROS, A.T.M.; NASCIMENTO, A.F.; GONÇALVES, A.C.S.; ORFÃO, L.H.; COSSON, J.; LEAL, M.C. Methyl glycol, methanol and Me2SO effects on post-thaw sperm motility, velocities and membrane integrity of *Brycon orbignyanus* and *Prochilodus lineatus* (Characiformes)

The aim of the present study was to evaluate the effects of cryoprotectants on post-thaw sperm motility, velocities and membrane integrity of piracanjuba *Brycon orbignyanus* and streaked prochilod *Prochilodus lineatus*. Six freezing media comprising the combination of three cryoprotectant agents (CPA; Me2SO, methanol and methyl glycol) and two extenders (BTS™ and glucose) were used. Sperm was diluted in each medium, loaded into 0.5-mL straws, frozen in a nitrogen vapor vessel (dry-shipper) and stored in liquid nitrogen at $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Post-thaw sperm motility rate and curvilinear (VCL), straight-line (VSL) and average path (VAP) velocities were evaluated using a Computer-Assisted Sperm Analyzer (CASA). Membrane integrity was determined using SYBR™ 14 and propidium iodide staining. We considered high post-thaw sperm quality when motility was above 60% and VCL above $140\text{ }\mu\text{m/s}$. In *B. orbignyanus*, high post-thaw quality was observed only in samples frozen in BTS-methyl glycol; those samples possessed VSL of $90\text{ }\mu\text{m/s}$, VAP of $113\text{ }\mu\text{m/s}$ and 57% intact sperm. All samples frozen in glucose possessed low quality with motility below 20%. In *P. lineatus*, high post-thaw quality was observed in samples frozen in BTS-methyl glycol, glucose-methyl glycol and glucose-methanol. Me2SO-frozen sperm yielded the lowest quality. Based on these results, methyl glycol is the most suitable CPA for both fish species and provides good membrane protection during the cryopreservation process.

Keywords: CASA, Semen, Neotropical, Teleost, Fish

Resumo

VIVEIROS, A.T.M.; NASCIMENTO, A.F.; GONÇALVES, A.C.S.; ORFÃO, L.H.; COSSON, J.; LEAL, M.C. Efeitos do metilglicol, metanol e Me₂SO na motilidade, velocidades e integridade de membrana no sêmen descongelado de *Brycon orbignyanus* e *Prochilodus lineatus* (Characiformes)

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos de crioprotetores na motilidade espermática, velocidades e integridade de membrana no sêmen pós-descongelamento de piracanjuba *Brycon orbignyanus* e curimba *Prochilodus lineatus*. Seis meios de congelamento compreendendo a combinação de três crioprotetores (CPA; Me₂SO, metanol e glicol metil) e dois diluidores (BTS™ e glicose); foram utilizados. O sêmen foi diluído em cada meio, envasado em palhetas de 0,5 mL, congelado num botijão de vapor nitrogênio (*dry-shipper*) e armazenado em nitrogênio líquido a -196 °C. A taxa de motilidade, e as velocidades curvilínea (VCL), média na trajetória (VAP) e linear (VSL) foram avaliadas por meio de um sistema computadorizado (CASA). A integridade de membrana foi determinada utilizando os corantes fluorescentes SYBR® 14 e iodeto de propídio. Foram considerados de alta qualidade pós-descongelamento, amostras de sêmen com motilidade acima de 60% e acima de 140 µm/s de VCL. Em *B. orbignyanus*, foi observada alta qualidade pós-descongelamento apenas em amostras congeladas em BTS-metilglicol; as amostras possuíam VSL de 90 µm/s, VAP de 113 µm/s e 57% de espermatozoides intactos. Todas as amostras congeladas em glicose apresentaram baixa qualidade com motilidade abaixo de 20%. Em *P. lineatus*, foi observada alta qualidade pós-descongelamento em amostras congeladas em BTS-metilglicol, glicose-metilglicol e glicose-metanol. O sêmen congelado em Me₂SO teve a menor qualidade. Com base nestes resultados, conclui-se que o metilglicol é o CPA mais adequado para *B. orbignyanus* e *P. lineatus* e fornece boa proteção da membrana durante o processo de criopreservação.

Palavras-chave: CASA, Sêmen, Neotropical, Teleosteo, Peixes

Introduction

The piracanjuba *Brycon orbignyanus* and streaked prochilod *Prochilodus lineatus* are native fish species to South America and belong to the order Characiformes. These species, as many other Brazilian fish species, migrate to spawn. However, the reproductive cycle of some migratory species has been disrupted by dam construction, water quality deterioration, loss of riparian habitats, and overfishing. The genus *Brycon* is highly affected by these environmental changes, and many species are in the red list of Brazilian threatened fauna including *B. orbignyanus* (ROSA; LIMA, 2008). On the other hand, *P. lineatus* is well adapted to captivity, artificial fertilization methods are well established and this species has been used as a model in a number of studies addressing nutrition, health, genetic diversity and reproduction (ORFÃO et al., 2010). In our laboratory, these two species have been submitted to a number of studies on initiation and suppression of sperm motility (GONÇALVES et al., 2013), sperm preservation (MARIA et al., 2006a; MARIA et al., 2006b; VIVEIROS et al., 2009; ORFÃO et al., 2010; VIVEIROS et al., 2010), and spawning and spermiation inducers (VIVEIROS;GONÇALVES, 2013 unpublished data).

The cryopreservation of fish sperm provides a tool by which reproduction is optimized and larval production is increased, thereby improving breeding and fish conservation programs (KOPEIKA; KOPEIKA, 2008). Sperm cryopreservation facilitates procedures for artificial reproduction, as, with viable sperm stored in liquid nitrogen, it is necessary to induce spawning and collect gametes only from females. Cryopreserved sperm may be kept in germplasm banks for an indefinite period, which allows the establishment of breeding programs, eliminates the problem of asynchronous reproductive activity between males and females, and enables maintenance of fewer male broodfish

(VIVEIROS; GODINHO, 2009). However, cryopreservation reduces sperm motility rate and velocities, and increases membrane and organelles damages (CABRITA et al., 1998; OGIER; LABBÉ; MAISSE, 1999; LI; LIU; ZHANG, 2006; GODINHO; VIVEIROS, 2011). To reduce these damages, several cryoprotectant agents (CPA) have been tested in fish species. Me2SO, methyl glycol and methanol are commonly tested as CPAs in characiforms species (GODINHO; VIVEIROS, 2011). During the past few years, our research group reported that methyl glycol was the best CPA for cryopreserving sperm of *B. orbignyanus* (MARIA et al., 2006a, MARIA et al., 2006b), *Brycon opalinus* (VIVEIROS et al., 2012a), *Brycon insignis* (VIVEIROS et al., 2011), *Piaractus mesopotamicus* (ORFÃO et al., 2008), *Piaractus brachypomus* (NASCIMENTO et al., 2010) and *P. lineatus* (VIVEIROS et al., 2009). Similar results were observed on sperm cryopreservation of *P. brachypomus* (VELASQUEZ-MEDINA, 2008). In *Colossoma macropomun*, however, the results are contrasting; one study shows that methyl glycol is better than Me2SO (CARNEIRO et al., 2012) while another shows the opposite (VIEIRA, 2010). In those studies, however, post-thaw sperm quality was mostly assessed in terms of subjective motility rate or membrane integrity using eosin-nigrosin staining with some exceptions (VELASQUEZ-MEDINA 2008; VIVEIROS et al., 2010; NASCIMENTO et al., 2010, VIEIRA, 2010; CARNEIRO et al., 2012).

Thus, the aim of this study was to further evaluate the effects of these three CPAs (Me2SO, methanol and methyl glycol) on post-thaw sperm motility rate and velocities using CASA, and membrane integrity using fluorescence dyes.

Material and Methods

Fish handling, sperm collection and initial evaluation

All fish were handled in compliance with the guidelines for animal experimentation described by Van Zutphen *et al.* (2001). *Brycon orbignyanus* ($n = 5$) and *Prochilodus lineatus* ($n = 5$) males were selected from earthen ponds at the Hydrobiology and Fish Culture Station of Furnas in the city of São José da Barra (20°43'07" S; 46°18'50" W), state of Minas Gerais, Brazil, during the spawning season (December to February). Males with detectable running sperm under soft abdominal pressure received a single intramuscular dose of carp pituitary extract (cPE; Argent Chemical Laboratory, Redmond, Washington, USA) at 3 mg/kg body weight. After 5 (*B. orbignyanus*) or 8 hours (*P. lineatus*) at ~25 °C, the urogenital papilla was carefully dried and approximately 3-5 mL of sperm of each male was hand-stripped directly into test tubes. Sperm collection was carried out at room temperature (~25 °C). Soon after collection, tubes containing sperm were placed in a cooler (4 ± 2 °C) containing dry ice foam (Polar Technics CRI Ltd., Brazil). Contamination of sperm with water, urine or feces was carefully avoided.

Determination of fresh sperm features

Immediately after collection, 5 μ L of each sample were placed on a glass slide and observed under a light microscope (model L1000, Bioval, Jiangbei, China) at 400x magnification. Samples were immotile and motility rate (expressed as % of motile sperm) was subjectively estimated following the addition of 25 μ L of an activating agent composed of 0.29% NaCl (~ 92 mOsm/kg, Maria *et al.*, 2006a; Viveiros *et al.*, 2010 among others). All samples

possessed at least 80% motile sperm and were used in the subsequent analyses. Motility quality score was assigned using an arbitrary grading system ranging from 0 (no movement) to 5 (rapidly swimming spermatozoa), as described in Viveiros *et al.* (2011). Sperm concentration was determined using a hemacytometer/ Neubauer chamber (Boeco, Hamburg, Germany). The osmolality of the seminal plasma was measured (Semi-Micro Osmometer K-7400, Knauer, Berlin, Germany) after centrifugation of the sperm at 2000 g for 30 min (MiniStar, Shanghai, China). Fresh sperm features of all samples were evaluated at room temperature (~ 25° C) by a well-trained technician.

Sperm cryopreservation

Six freezing media comprising the combinations of three CPAs and two extenders were prepared. The CPAs dimethyl sulfoxide (Me₂SO, (CH₃)₂SO); methanol (CH₃OH); and methyl glycol (MG, CH₃O(CH₂)₂OH) were purchased from Vetec Química Fina Ltda™, Duque de Caxias, RJ, Brazil. Each CPA was combined with one of the two extenders: a simple glucose solution and a more complex solution named BTS™ (Beltsville Thawing Solution, Minitüb™, Tiefenbach/Landshut, Germany; 80% glucose, 12.7% sodium citrate, 2.7% EDTA, 2.7% NaHCO₃, 1.5% KCl, 0.5% gentamycin sulfate). Both extenders were prepared at 315 mOsm/kg. Sperm from each male was diluted in each medium to a final proportion (v/v) of 10% sperm, 10% CPA and 80% extender. Immediately after, with no equilibration time (NASCIMENTO *et al.*, 2012), diluted sperm was aspirated into 0.5-mL open straws (n = 5 replicate straws x 6 media x 5 males of each species) and frozen in a nitrogen vapor vessel (Cryoporter™ LN₂ dry vapor shipper, Cryoport Systems, Brea, CA, USA) at approximately -170 °C. Within 24 h, straws were transferred to a liquid nitrogen

vessel (M.V.E. Millenium, XC 20, Chart, MN, USA) at $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ for storage. A few days later straws were transferred back to the nitrogen vapor vessel and transported by car from Furnas to the Laboratory of Semen Technology of the Federal University of Lavras (UFLA), Lavras, Minas Gerais, Brazil (approximately 260 Km). Upon arrival, straws were stored in liquid nitrogen vessel (M.V.E. Millenium, XC 20, Chart, MN, USA) until analysis. Straws were thawed in a water bath at $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 8 s and evaluated for motility and velocities six months after freezing ($n = 3$ replicate straws) and for membrane integrity and mitochondrial functionality 12 months after freezing ($n = 1$ replicate straws) (see below).

Sperm motility and velocities evaluation

Post-thaw sperm motility and velocities were estimated using the CASA system according to the methodology used in our laboratory [34]. Motility was triggered in 0.29% NaCl directly in a Makler[®] counting chamber (Sefi-Medical Instruments Ltd, Haifa, Israel) placed under a phase contrast microscope (Nikon[™] Eclipse E200, Tokyo, Japan) at 100 X magnification with a green filter and pH 1 position. The microscope was connected to a video camera (Basler Vision Technologies[™] A602FC, Ahrensburg, Germany) generating 100 images/s; video recording started 10 s post-activation. Each image was analyzed using the standard settings for fish by Sperm Class Analyzer[™] software (SCA[™] 2010, Microptics, S.L. Version 5.1, Barcelona, Spain). Sperm was considered immotile when velocity was $< 40\text{ }\mu\text{m/s}$. Although the SCA[™] simultaneously assesses more than 15 sperm motility endpoints, for brevity, only motility rate, curvilinear velocity (VCL), straight line velocity (VSL) and average path velocity (VAP) were considered for analysis. To determine these parameters, each individual sperm (an average of 340 sperm/straw for *B. orbignyana* and of

634 sperm/straw for *P. lineatus*) was followed throughout the images and sperm trajectory was calculated. We considered high post-thaw sperm quality when motility rate was above 60% and VCL was above 140 $\mu\text{m/s}$.

Membrane integrity

Membrane integrity (expressed as the percentage of intact sperm) was assessed using a membrane permeant dye SYBRTM 14 which stains DNA in living cells, and propidium iodide (PI) which stains DNA in degenerate cells that have lost membrane integrity (LIVE/DEAD[®] sperm viability kit; Molecular Probes, Invitrogen, USA). We followed the staining methodology described in Dayle and Tiersch. (2000). Briefly, 10 μL of thawed sperm (1:10) were further diluted to 1:100 (final volume: 100 μL , $\sim 1 \times 10^6$ cells/mL) in the same extender used during freezing (BTSTM or glucose). In an Eppendorf tube covered with aluminum foil 100 μL of diluted sperm and 0.5 μL of SYBRTM 14 (20 μM) was placed. This tube remained in the dark for 10 min at room temperature. After this time, 0.5 μL of PI (2.4 mM) was added and again remained for 10 min in the dark. A 50 μL aliquot of sperm with fluorochromes was placed on a slide under a cover slip and immediately analyzed in an epifluorescence microscope (NikonTM Eclipse E200, Tokyo, Japan) with excitation filter 546-590 for propidium iodide and excitation filter 450-490 for SYBRTM 14. Six pictures were taken with a digital camera (Sony DSC-W530 4x Optical Zoom, Sony Corp. China) from three different fields and a mean of 176 sperm for *B. orbignyana* and of 369 sperm for *P. lineatus* was counted.

Statistical analysis

Values are expressed as means \pm standard deviation (SD). Statistical analyses were conducted with the R software program version 2.9.0 (R Development Core Team, 2010). Sperm motility, velocities and membrane integrity were tested for normal distribution using the univariate procedure. When data did not fit the normal distribution, an arcsin transformation was performed. Data were tested for significant differences using ANOVA, followed by the Tukey test, when applicable. A Pearson test was used to determine the correlation between sperm motility, velocities and intact sperm. The level of significance for all statistical tests was $P < 0.05$.

Results

Fresh sperm features

The following mean sperm values were observed for *B. orbignyana* males (n = 5): 89% motile sperm, quality score of 4.0, concentration of 7.4×10^9 sperm/mL and seminal plasma osmolality of 300 mOsm/kg; and for *P. lineatus* males (n = 5): 96% motile sperm, quality score of 4.6, concentration of 18.4×10^9 sperm/mL and seminal plasma osmolality of 306 mOsm/kg (Table 1).

Post-thaw sperm quality

In general, post-thaw sperm of *P. lineatus* possessed higher quality than of *B. orbignyana*.

In *B. orbignyana*, high post-thaw sperm quality was observed only in samples frozen in BTS-methyl glycol. In those samples, 63% motile sperm,

VCL of 140 $\mu\text{m/s}$, VSL of 90 $\mu\text{m/s}$, VAP of 113 $\mu\text{m/s}$ and 57% intact sperm were observed. All samples frozen in glucose possessed low quality with motility below 20%, regardless of CPA (Table 2).

In *P. lineatus*, high post-thaw sperm quality was observed in samples frozen in BTS-methyl glycol, glucose-methyl glycol and glucose-methanol. In those samples, the minimum values observed were 68% motile sperm, VCL of 152 $\mu\text{m/s}$, VSL of 82 $\mu\text{m/s}$, VAP of 124 $\mu\text{m/s}$ and 68% intact sperm. The lowest post-thaw sperm quality were observed in Me₂SO-frozen samples regardless of extender composition, and in BTS-frozen samples within a given CPA. There was a positive correlation between sperm motility, velocities and intact sperm in both species (Table 3)

Table 1. Body weight and some fresh sperm features in piracanjuba *Brycon orbignyanus* and streaked prochilod *Prochilodus lineatus* after carp pituitary treatment.

Features	<i>B. orbignyanus</i>		<i>P. lineatus</i>	
	mean \pm SD	min-max	mean \pm SD	min-max
Body weight (kg)	1.3 \pm 0.5	0.8 - 1.7	1.4 \pm 0.3	0.7 - 1.85
Concentration (sperm x 10 ⁹ /mL)	7.4 \pm 3.1	4.8 - 10.7	18.4 \pm 1.3	16.9 - 20.1
Motile sperm ¹ (%)	89 \pm 5	80 - 95	96 \pm 5	90 - 100
Motility quality score ² (0-5)	4.2 \pm 0.4	4.0 - 5.0	4.6 \pm 0.5	4.0 - 5.0
Seminal plasma osmolality (mOsm/kg)	300 \pm 9	289 - 313	306 \pm 10	290 - 318

¹ Motility rate subjectively evaluated under a light microscope.

² Motility quality score was assigned using an arbitrary grading system ranging from 0 (no movement) to 5 (rapidly swimming sperm).

Table 2. Post-thaw motility and velocities (VCL = curvilinear, VSL = straight line and VAP = average path) and membrane integrity (mean \pm SD) of piracanjuba *Brycon orbignyanus* (n = 5 males) and streaked prochilod *Prochilodus lineatus* (n = 5 males) sperm frozen in three cryoprotectants (CPA) combined with either glucose or BTS™ as extender. Motility and velocities were evaluated using a Computer-Assisted Sperm Analyzer (CASA) and membrane integrity was assessed using SYBR 14 and propidium iodide (PI) staining.

Extender (315 mOsm)	CPA (10%)	Motile sperm (%)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	Intact sperm (%)
<i>B. orbignyanus</i>						
BTS™	Me2SO	31 \pm 22 ^B	102 \pm 23 ^B	58 \pm 16 ^B	80 \pm 16 ^C	27 \pm 7 ^B
BTS™	Methanol	33 \pm 18 ^B	119 \pm 16 ^{AB}	72 \pm 27 ^B	96 \pm 29 ^B	30 \pm 19 ^B
BTS™	Methyl glycol	63 \pm 18 ^A	140 \pm 24 ^A	90 \pm 23 ^A	113 \pm 24 ^A	57 \pm 11 ^A
Glucose	Me2SO	16 \pm 17 ^A	90 \pm 38 ^{AB}	49 \pm 21 ^A	76 \pm 27 ^A	13 \pm 10 ^{AB}
Glucose	Methanol	6 \pm 20 ^B	63 \pm 29 ^B	45 \pm 23 ^A	63 \pm 25 ^A	4 \pm 4 ^B
Glucose	Methyl glycol	19 \pm 16 ^A	104 \pm 23 ^A	52 \pm 22 ^A	77 \pm 23 ^A	17 \pm 8 ^A
<i>P. lineatus</i>						
BTS™	Me2SO	26 \pm 11 ^C	69 \pm 8 ^B	27 \pm 11 ^B	41 \pm 14 ^B	50 \pm 11 ^B
BTS™	Methanol	57 \pm 16 ^B	144 \pm 30 ^A	76 \pm 18 ^A	117 \pm 29 ^A	60 \pm 17 ^{AB}
BTS™	Methyl glycol	72 \pm 12 ^A	152 \pm 27 ^A	82 \pm 14 ^A	124 \pm 28 ^A	68 \pm 15 ^A
Glucose	Me2SO	45 \pm 18 ^C	77 \pm 7 ^C	41 \pm 12 ^C	58 \pm 12 ^C	57 \pm 13 ^B
Glucose	Methanol	68 \pm 17 ^B	161 \pm 38 ^B	93 \pm 22 ^B	136 \pm 36 ^B	67 \pm 22 ^{AB}
Glucose	Methyl glycol	81 \pm 10 ^A	197 \pm 31 ^A	110 \pm 20 ^A	170 \pm 30 ^A	78 \pm 14 ^A

^{A-B} Means within the same column and extender, for each species, followed by different superscript are significantly different (P<0.05; Tukey Test).

BTS™ (Minitüb): 80% glucose, 12.7% sodium citrate, 2.7% EDTA, 2.7% NaHCO₃, 1.5% KCl, 0.5% gentamycin sulfate.

Table 3. Correlations between sperm motility, velocities (VCL = curvilinear, VSL = straight line and VAP = average path) and intact sperm of piracanjuba *Brycon orbignyanus* (n = 5 males) and streaked prochilod *Prochilodus lineatus* (n = 5 males) sperm frozen in three cryoprotectants (CPA) combined with either glucose or BTS™ as extender. Motility and velocities were evaluated using a Computer-Assisted Sperm Analyzer (CASA) and membrane integrity was assessed using SYBR 14 and propidium iodide (PI) staining.

	Sperm motility	VCL	VSL	VAP	Intact sperm
Sperm motility	1.0000000	0.8639613	0.8205115	0.8469520	0.9287158
VCL	0.8639613	1.0000000	0.9731287	0.9939514	0.6705992
VSL	0.8205115	0.9731287	1.0000000	0.9799901	0.5798671
VAP	0.8469520	0.9939514	0.9799901	1.0000000	0.6382295
Intact sperm	0.9287158	0.6705992	0.5798671	0.6382295	1.0000000

Discussion

In the present study, the effects of three CPAs (Me₂SO, methanol and methyl glycol) combined with glucose and BTS™ on post-thaw sperm motility rate, velocities and membrane integrity of *B. orbignyanus* and *P. lineatus* were investigated. This is the first report where both CASA system and fluorescence dyes were used as a tool to assess post-thaw sperm quality of *B. orbignyanus* and *P. lineatus*.

Fresh gamete quality of *B. orbignyanus* and *P. lineatus* was also evaluated and the observed values were all within the range previously reported for *B. orbignyanus* and *P. lineatus* species after carp pituitary treatment (VIVEIROS; GODINHO 2009; GODINHO; VIVEIROS, 2011). A better knowledge of the characteristics of fresh sperm before manipulation is necessary

to evaluate sperm quality in commercial hatcheries before artificial reproduction as well as in laboratories before experiments (ORFÃO et al. 2011).

Cryoprotectants

In the present study, sperm frozen in the appropriate extender yielded high post-thaw sperm quality when methyl glycol was used as CPA for both fish species, and methanol *P. lineatus*. The Me2SO and methyl glycol have similar molar concentrations (approximately 78 and 76 g/mol, respectively) while the methanol has less than half of it (32.04 g/mol). In the present study, we could not measure the final osmolality of each freezing medium because our osmometer measures osmolality by freezing point depression and this is not possible when CPAs are added to the solution. But the final osmolality (measured in a vapor pressure osmometer) of the freezing medium using an extender at 300 mOsm/kg (similar to ours) was reported in another study (CUEVAS-URIBE, 2011). When 10% methanol or methyl glycol was added, the final freezing medium osmolality was close to 300 mOsm/kg; however, when 10% Me2SO was added, osmolality raised to above 2000 mOsm/kg. This huge increase in osmolality may have caused osmotic stress with elevated intracellular ion concentration in Me2SO- frozen samples, which damaged cell membrane and/or some organelles during the freezing or the thawing steps, reducing both motility rate and membrane integrity.

The reduced cryoprotective effects of Me2SO in comparison with methyl glycol in terms of motility rate have been reported for sperm of *B. orbignyanus* (MARIA et al., 2006a; MARIA et al., 2006b), *Brycon opalinus* (VIVEIROS et al., 2012a), *Brycon insignis* (VIVEIROS et al., 2011), *Colossoma macropomum* (CARNEIRO et al., 2012), *Piaractus mesopotamicus* (ORFÃO et al., 2008), *Piaractus brachypomus* (NASCIMENTO et al., 2010) and *P. lineatus*

(VIVEIROS et al., 2009). When both motility rate and membrane integrity were assessed, contrasting results were observed between the present study and the studies using *C. macropomum* sperm. We observed a decrease of both parameters in Me2SO-frozen sperm of *B. orbignyanus* and *P. lineatus*, while in *C. macropomum* motility rate decreased while membrane integrity (using SYBR/PI staining) was similar between methyl glycol- and Me2SO-frozen samples (Carneiro et al., 2012). In another study using the same fish species, sperm possessed higher membrane intact (using eosin/nigrosin staining) and lower motility rate when frozen in 20% Me2SO compared to 5-10% Me2SO (VARELA-JUNIOR et al., 2012a). In *C. macropomum*, the osmotic effects caused by Me2SO seem to affect the organelles related to motility (such as axonemes) rather than disrupting cell membrane as observed in *B. orbignyanus* and *P. lineatus*.

Extenders

In the present study, BTS™ and glucose solutions were tested as extender of *B. orbignyanus* and *P. lineatus* sperm. In *B. orbignyanus*, BTS™-frozen sperm yielded higher sperm quality in comparison with glucose-frozen sperm. On the other hand, in *P. lineatus*, post-thaw sperm quality was more related to the CPA than to the extender, as there were samples with good and bad post-thaw quality. Several solutions have been used as fish sperm extenders; some are simple saline (0.9% NaCl) or sugar (5% glucose) solutions, while others have more complex formulae, such as BTS™ and Powdered Coconut Water (ACP™), in which salts and sugars are combined. High post-thaw motility were observed when sperm of *B. orbignyanus* (MARIA et al., 2006a; MARIA et al., 2006b) and pirapitinga *Brycon nattereri* (Oliveira et al., 2007) were frozen in BTS™ compared to sperm

frozen in glucose. Despite of the great amount of glucose (almost 80%) present in BTS™, some other component (sodium citrate, EDTA, NaHCO₃, KCl or gentamycin) when associated with the CPA methyl glycol, produced a positive effect on *B. orbinyanus* sperm cells during the freezing and thawing processes for . The ion concentration is involved on the regulation of sperm motility, and Ca²⁺ and Na⁺ levels have a significant positive relationship with motility rate in some fish species, as *Cyprinus carpio*, *Oreochromis mossambicus* and *Salvelinus fontinalis* (ALAVI; COSSON, 2006) and apparently on *B. orbignyana*, as high post-thaw sperm quality (motility above 60% and VCL above 140 μm/s) was observed when *B. orbignyana* sperm was cryopreserved in NaCl-frozen sperm compared to glucose-frozen sperm (VIVEIROS; LOPEZ, 2013 unpublished data), showing a benefic effect of Na⁺ on sperm cryopreservation of this species. Ions presents in BTS™ seem to have effects on plasma membrane, leading to a better quality sperm on *B. orbignyana* after the cryopreservation process. In *P. lineatus* the extenders composition at the osmolality tested in this study did not affected sperm quality, the same was observed for these species on fresh sperm (NASCIMENTO et al., 2012) and according to these findings osmolality was most important in maintain *P. lineatus* sperm quality during the cryopreservation process. When we compared fresh sperm motility of both species with pos-thawed motility, *B. orbinyanus* sperm cryopreserved in the best cryoprotectant solution tested declined above 30% in relation to fresh sperm while *P. lineatus* sperm motility have a decline of only 15%. *P. lineatus* sperm show to be more resistant to cryopreservation process then *B. orbignyana* sperm and a simple glucose solution it was not capable to protective this species sperm.

Table 4. Reported cryoprotectant agents (CPA) and extenders tested on sperm cryopreservation of *Brycon* and *Prochilodus* species.

Species	CPA	Extender (mOsmol)*	Pos-thaw sperm quality	Reference
<i>B. amazonicus</i>	5% Me2SO	~ 277 Glucose + egg yolk	76% motile sperm ^S	CRUZ CASALLAS; ROBLES SANTAMARIA , 2006
	3.75% Ethylene glycol	~ 277 Glucose + egg yolk	68% motile sperm ^S	
	3.75% Methanol	~ 277 Glucose + egg yolk	44% motile sperm ^S	
	3.75% Propylene glycol	~ 277 Glucose + egg yolk	62% motile sperm ^S	
<i>B. insignis</i>	10% Me2SO	356 BTS TM	23% motile sperm ^S	VIVEIROS et al., 2011
	10% Me2SO	308 Glucose	45% motile sperm ^S	
	10% Me2SO	285 NaCl	46% motile sperm ^S	
	10% Methyl glycol	356 BTS TM	77% motile sperm ^S , 62% intact sperm ^{EN}	
	10% Methyl glycol	308 Glucose	77% motile sperm ^S , 69% intact sperm ^{EN}	
	10% Methyl glycol	285 NaCl	82% motile sperm ^S , 61% intact sperm ^{EN}	
<i>B. nattereri</i>	10% Me2SO	~ 429 NaCl + Tris	72% motile sperm ^S	OLIVEIRA et al., 2007
	10% Methyl glycol	~ 318 BTS TM	72% motile sperm ^S	
<i>B. nattereri</i>	10% Methyl glycol	318 BTS TM	79% motile sperm ^S	VIVEIROS et al., 2012c
		285 NaCl	70% motile sperm ^S	
<i>B. opalinus</i>	10% Me2SO	365 NaCl	72% motile sperm ^S ; 68% intact sperm ^{EN}	VIVEIROS et al., 2012a
	10% Methyl glycol	365 Glucose	82% motile sperm ^S ; 82% intact sperm ^{EN}	
<i>B. orbignyanus</i>	10% Me2SO	318 BTS TM	11% motile sperm ^S	MARIA et al., 2006a
	10% Methanol	318 BTS TM	21% motile sperm ^S	
	10% Methyl glycol	318 BTS TM	68% motile sperm ^S ; 66% intact sperm ^{EN}	
<i>B. orbignyanus</i>	10% Me2SO	285 NaCl + egg yolk	8% motile sperm ^S	MARIA et al., 2006b
	10% Methanol	285 NaCl + egg yolk	7% motile sperm ^S	
	10% Methyl glycol	285 NaCl + egg yolk	66% motile sperm ^S	

<i>B. orbignyana</i>	10% Me2SO 10% Methyl glycol	300 ACP TM 300 ACP TM	45% motile sperm ^S 43% motile sperm ^S	VIVEIROS et al., 2008
<i>B. orbignyana</i>	10% Me2SO	315 BTS TM	31% motile sperm ^C ; VCL of 102 µm/s 27% intact sperm ^{PI}	Present study
	10% Methanol	315 BTS TM	33% motile sperm ^C ; VCL of 119 µm/s 30% intact sperm ^{PI}	
	10% Methyl glycol	315 BTS TM	63% motile sperm ^C ; VCL of 140 µm/s 57% intact sperm ^{PI}	
	10% Me2SO	315 Glucose	16% motile sperm ^C ; VCL of 90 µm/s; 13% intact sperm ^{PI}	
	10% Methanol	315 Glucose	6% motile sperm ^C ; VCL of 63 µm/s; 4% intact sperm ^{PI}	
	10% Methyl glycol	315 Glucose	19% motile sperm ^C ; VCL of 104 µm/s 17% intact sperm ^{PI}	
<i>B. orthotaenia</i>	10% Me2SO 10% Propanediol 10% Ethylene glycol	315 BTS TM 315 BTS TM ~ 277 Glucose + egg yolk	70% motile sperm ^S 23% motile sperm ^S 39% motile sperm ^S	MELO; GODINHO, 2006
<i>P. lineatus</i>	10% Me2SO	318 BTS TM	80% motile sperm ^S	VIVEIROS et al., 2009a
	10% Me2SO	277 Glucose	25% motile sperm ^S	
	10% Me2SO	285 NaCl	5% motile sperm ^S	
	10% Methyl glycol	318 BTS TM	93% motile sperm ^S	
	10% Methyl glycol	277 Glucose	93% motile sperm ^S	
	10% Methyl glycol	285 NaCl	16% motile sperm ^S	
<i>P. lineatus</i>	10% Methyl glycol 10% Methyl glycol	300 ACP TM 277 Glucose	85% motile sperm ^C ; VCL of 54 µm/s; 75% motile sperm ^C ; VCL of 49 µm/s	VIVEIROS et al., 2010
<i>P. lineatus</i>	10% Me2SO 10% Methanol	~ 286 BTS TM + KI ~ 286 BTS TM	74% motile sperm ^S 74% motile sperm ^S	MURGAS et al., 2007
<i>P. lineatus</i>	10% Me2SO 10% Methyl glycol	300 ACP TM 300 ACP TM	8% motile sperm ^S 76% motile sperm ^S	VIVEIROS et al., 2008

<i>P. lineatus</i>	10% Me2SO	315 BTS TM	26% motile sperm ^C ; VCL of 69 μm/s; 50% intact sperm ^{PI} Present study
	10% Methanol	315 BTS TM	57% motile sperm ^C ; VCL of 144 μm/s 60% intact sperm ^{PI}
	10% Methyl glycol	315 BTS TM	72% motile sperm ^C ; VCL of 152 μm/s 68% intact sperm ^{PI}
	10% Me2SO	315 Glucose	45% motile sperm ^C ; VCL of 77 μm/s; 57% intact sperm ^{PI}
	10% Methanol	315 Glucose	68% motile sperm ^C ; VCL of 161 μm/s 67% intact sperm ^{PI}
	10% Methyl glycol	315 Glucose	81% motile sperm ^C ; VCL of 197 μm/s 78% intact sperm ^{PI}

*When authors presented extender as % or mM we estimated the osmolality in order to facilitate comparisons.

^S Motility rate subjectively evaluated under a light microscope

^C Motility rate evaluated under a Computer-Assisted Sperm Analyzer

^{EN}: percentage of intact sperm after eosin–nigrosin staining

^{PI}: percentage of of intact sperm after SYBR-PI staining

BTSTM (Minitüb): 80% glucose, 12.7% sodium citrate, 2.7% EDTA, 2.7% NaHCO₃, 1.5% KCl, 0.5% gentamycin sulfate.

ACPTM: powdered coconut water: 88% glucose; 0.0074% proteins; 0.124% phosphorus; 3.5% potassium; 0.35%

Conclusions

Based on sperm quality evaluated by CASA and with fluorescence dyes, we conclude that the methyl glycol is the best CPA for *B. orbignyana* and *P. lineatus* sperm, and provides a best cell protection during the cryopreservation process. Me₂SO causes a decrease on sperm quality, and possibly more cellular damage and should be avoid on sperm cryopreservation for both species. *B. orbignyana* semen is more sensitive to cryopreservation process and a cryoprotectant solution containing ions possibly decreases the deleterious effect of cryopreservation process.

Acknowledgements

This study received funding from the Brazilian fostering agencies CNPq (PQ 300994/2008-7; PQ 302434/2011-9; grant 552471/2010-0), ANEEL P&D Furnas (017965) and FAPEMIG (grant CVZ BPD 00216-11; PPM CVZ 00129-11) and is part of A.F. Nascimento's PhD project. The authors thank undergraduate student M. Hamaue, MSc student T.R. Taffarel (UFLA), and the biologists D.M. Ribeiro and M.B. Goulart (Furnas) for assistance during the experiments.

References

ALAVI, S.M.H.; COSSON, J. Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: a review. **Cell Biology International**, London, v. 30, n. 1, p. 1-14, Jan. 2006.

CABRITA, E., et al. Sublethal damage during cryopreservation of rainbow trout sperm. **Cryobiology**, San Diego, v. v. 37, n.3p. 245–53, Nov. 1998.

CRUZ CASALLAS P. E.; ROBLES V. M. M.; SANTAMARÍA, Y. M.V. Evaluación de diferentes crioprotectores para la crioconservación de espermatozoides de yamú (*Brycon amazonicus*). **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, Medellín, v.19, n. 2, p.152-159, 2006.

CUEVAS-URIBE R., et al. Production of channel catfish with sperm cryopreserved by rapid non-equilibrium cooling. **Cryobiology**, San Diego, v. 63, n. 3, p. 186-197, Dec. 2011 .

DALY J; TIERSCH T. R. Sources of variation in flow cytometric analysis of aquatic species sperm: The effect of cryoprotectants on flow cytometry scatter plots and subsequent population gating. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 370-371, p. 179-188, Dec. 2012.

GODINHO H.P.; VIVEIROS A.T.M. (2011) Current status of sperm cryopreservation of Brazilian Characiform fishes., In: TIERSCH, T.R.; GREEN, C.C., editors. Cryopreservation in aquatic species. **World Aquaculture Society**, Baton Rouge, LA, USA, 2011, p. 875–84.

GONÇALVES, A. C. S. et al. Initiation and suppression of sperm motility is osmolality-dependent in two South American fish species: streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) and piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 10, n. 1, p. 62-70, Jan./Mar. 2013.

KOPEIKA, E.; KOPEIKA, J. Variability of sperm quality after cryopreservation in fish. editors. **Fish spermatology**. In: ALAVI S.M.H., et al. Oxford: Alpha, Science, Ltd.; 2008, p. 347–96.

LI, J.; LIU, Q.; ZHANG, S. Evaluation of the damage in fish spermatozoa cryopreservation. **Chin J Oceanol Limnol** 2006;24:370–7.

MARIA, A., et al. 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, 2006a.

_____. Effects of cooling and freezing on sperm motility of the endangered fish piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Characiformes, Characidae). **Animal Reproduction**, v. 3, p. 55-60, 2006b.

MAZUR, P. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. **Cryobiology**, San Diego, v.14, n.3, p.251-72, 1977.

MELO, F.C.S.A.; GODINHO, H.P.A protocol for cryopreservation of spermatozoa of the fish *Brycon orthotaenia*. **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 3, n. 3, p. 380–385, Jul./Sept. 2006.

MURGAS, L.D.S. et al. Criopreservação do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) mediante adição de diferentes diluidores, ativadores e crioprotetores. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 36, n. 3 May/ Jun. 2007

NASCIMENTO, A.F. et al. Out-of-season sperm cryopreserved in different media of the Amazonian freshwater fish pirapitinga (*Piaractus brachypomus*). **Animal Reproduction Science**, v.118, n.2– 4, 324 –329, Jul. 2010.

_____. Extender composition, osmolality, cryoprotectant and equilibration time effects on fresh sperm motility of two Characiformes fish: piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) and streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*). **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 9, n. 2, p.103-110, Apr./ Jun. 2012.

OGIER DE BAULNY, B.; LABBÉ, C.; MAISSE G. Membrane integrity, mitochondrial activity, ATP content, and motility of the European catfish (*Silurus glanis*) testicular spermatozoa after freezing with different cryoprotectants. **Cryobiology**, Luton, v. 39, n. 2, p. 177–184, Sep. 1999.

ORFÃO, L. H., et al. Sperm fertility of the subtropical freshwater streaked prochilod *Prochilodus lineatus* (Characiformes) improved after dilution and cold storage. **Aquaculture Research** , v. 41, p. 679-687, 2010.

_____. 2008. Diluidores e crioprotetores na motilidade espermática do sêmen de pacu *Piaractus mesopotamicus*. Proceedings of the 45th Meeting of the Brazilian Animal Science Society, Lavras, MG, Brazil (abstract).

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

OLIVEIRA, A. V. et al. Sucesso do resfriamento e congelamento de sêmen de pirapitinga *Brycon nattereri*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 59, n. 6, p. 1509-1515, Dec. 2007.

R Development Core Team (2010). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.

ROSA, R. S., LIMA, F.C.T., 2008. Os peixes ameaçados de extinção. In: Machado, A. B. M., Drummond, G.M., Paglia, A.P. (Eds.), **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**. Ministério do Meio Ambiente/Fundação Biodiversitas, Brasília, Brazil, pp. 9–285.

VAN ZUTPHEN L. F., et al. 2001. **Principles of laboratory animal science**. Revised edition. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands. 428 pp

VARELA-JUNIOR A.S., et al. Efeito crioprotetor de diferentes concentrações de dimetilsufóxido no congelamento de sêmen de tambaqui *Colossoma macropomum*. **Atlântica**, Rio Grande, v.34, n. 2, p.129-137, 2012.

VELÁSQUEZ-MEDINA, S. Criopreservação do sêmen de pirapitinga, *Piaractus brachypomus* (Pisces, Characidae), Fortaleza. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) - Universidade Federal do Ceará, Instituto de Ciências do Mar, 2008. 87 p.

VIEIRA, M. J. A. F. 2010. Caracterização do sêmen de tambaqui *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818) e Criopreservação em diluente a base de água de coco em pó (ACP-104). [Tese de Doutorado]. Fortaleza (Ce): Universidade Estadual do Ceará, 2010. 114 p. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Brazil.

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

_____. Sperm cryopreservation of tiete tetra *Brycon insignis* (Characiformes): effects of cryoprotectants, extenders, thawing temperatures and activating agents on motility features. *Aquaculture Research*, 42, 858-865, 2011.

_____. Effects of extenders, cryoprotectants and freezing methods on sperm quality of the threatened Brazilian freshwater fish pirapitinga-do-sul *Brycon opalinus* (Characiformes). *Theriogenology* 78 361-368, 2012a.

_____. Sperm cryopreservation affects postthaw motility, but not embryogenesis or larval growth in the Brazilian fish *Brycon insignis* (Characiformes). *Theriogenology* 78 803-810 2012b.

_____. Spermatozoon ultrastructure and sperm cryopreservation of the Brazilian dry season spawner fish pirapitinga, *Brycon nattereri*. *Aquaculture Research*, 43, 546-555, 2012c.

_____. A simple, inexpensive and successful freezing method for curimba *Prochilodus lineatus* (Characiformes) semen. **Animal Reproduction Science**, v.112, n. 3-4, p. 293-300, May 2009a.

_____. Sensibilidade dos espermatozoides de dourado (*Salminus brasiliensis*) a diferentes meios de congelamento. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 61:883-889, 2009b.

_____. 2008. Powder coconut water (ACP-104) as extender for semen cryopreservation of Brazilian migratory fish species. *Cybium* 32 (8th ISRPF):215.

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

(VERSÃO PRELIMINAR DO ARTIGO)