



ANA CARINA NOGUEIRA VASCONCELOS

**CRIOPRESERVAÇÃO E VITRIFICAÇÃO DE
SÊMEN DE CURIMBA (*Prochilodus lineatus*):
USO DE DIFERENTES CRIOPROTETORES NA
SOLUÇÃO DILUIDORA**

LAVRAS-MG

2014

ANA CARINA NOGUEIRA VASCONCELOS

**CRIOPRESERVAÇÃO E VITRIFICAÇÃO DE SÊMEN DE CURIMBA
(*Prochilodus lineatus*): USO DE DIFERENTES CRIOPROTETORES NA
SOLUÇÃO DILUIDORA**

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

Orientador

Dr: Luís David Solis Murgas

LAVRAS-MG

2014

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

Vasconcelos, Ana Carina Nogueira.

Criopreservação e vitrificação de sêmen de curimba
(*Prochilodus lineatus*) : uso de diferentes crioprotetores na solução
diluidora / Ana Carina Nogueira Vasconcelos. – Lavras : UFLA,
2014.

73 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Luís David Solis Murgas.

Bibliografia.

1. Preservação espermática. 2. Qualidade seminal. 3. Toxicidade.
4. Crioprotetor. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 639.3

ANA CARINA NOGUEIRA VASCONCELOS

**CRIOPRESERVAÇÃO E VITRIFICAÇÃO DE SÊMEN DE CURIMBA
(*Prochilodus lineatus*): USO DE DIFERENTES CRIOPROTETORES NA
SOLUÇÃO DILUIDORA**

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

APROVADA em 20 de Fevereiro de 2014

Dr. Gláucia Frasnelli Mian	UFLA
Dr. Viviane de Oliveira Felizardo	UFLA
Dr. Sheila Cristina da Silva Victorio	UNICAMP

Dr. Luis David Solis Murgas
Orientador

LAVRAS-MG

2014

A Deus, por me guiar, proteger e me dar forças, especialmente, nos momentos de tristeza e angústia. Sua presença nunca me faltou!

Aos meus pais, Antonio Lucio e Rosana Joyce, por serem meu pilar de apoio e meus exemplos de vida! Aos meus irmãos, Ana Carolina e João Vítor, por me apoiarem e me entenderem sempre! Obrigada pelo amor incondicional e por toda a felicidade proporcionada a cada dia. Amo muito vocês!

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Medicina Veterinária por fornecer todo o suporte necessário para as pesquisas e pela oportunidade concedida para a realização do meu mestrado.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Professor e orientador Luis David Solis Murgas, um especial agradecimento, pela orientação, paciência, confiança e, sobretudo, pelo carinho durante esses anos de convívio. Seus ensinamentos foram de grande relevância para meu crescimento profissional.

À Professora Gláucia Frasnelli Mian, à Dra. Viviane de Oliveira Felizardo e à Dra. Sheila Cristina da Silva Victorio, pelo tempo dispensado a fazer parte da banca de defesa.

Ao Dr. Galileu Grovatto Veras e ao Me. Raycon Roberto Freitas Garcia pela importante colaboração nas análises estatísticas.

À Viviane de Oliveira Felizardo, Aline Ferreira, Shayenne Ramos e Tássia Flávia, pelo auxílio na execução dos experimentos e análises laboratoriais.

A todos os amigos do biotério, pelas conversas que tornaram ainda mais agradáveis os dias de trabalho.

À Shayenne e Aline, pela amizade, paciência e carinho, o meu agradecimento especial.

Aos meus pais pelo apoio emocional e financeiro durante todos esses anos em que estive longe de casa. Aos meus irmãos pela amizade inabalável e sincera. Sem vocês, eu jamais teria conseguido!

Agradeço a todos!

RESUMO GERAL

Com o primeiro experimento objetivou-se comparar a toxicidade e o efeito da combinação de crioprotetores intra e extracelulares, nas células espermáticas de curimba (*Prochilodus lineatus*) submetidas à criopreservação. Alíquotas de 400 µL de sêmen, de 19 reprodutores, foram diluídas em quatro soluções crioprotetoras (DMSO+gema de ovo, DMSO+lactose, metanol+gema de ovo e metanol+lactose) e envasadas em palhetes de 0,5 ml. As amostras foram colocadas durante 24 horas em vapor de nitrogênio líquido e após esse período, foram imersas nesse fluido criogênico por 10 dias. Após o descongelamento, a maior taxa e duração de motilidade foram obtidas utilizando a lactose como crioprotetor extracelular, independente da sua combinação ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa entre os tratamentos quando se analisou a morfologia espermática após o descongelamento ($p > 0,05$). Considerando os efeitos dos tratamentos testados, recomenda-se o uso da lactose, como crioprotetor extracelular, acrescida de DMSO ou metanol, visto que essas combinações apresentaram as maiores taxas e durações de motilidade e baixo índice de alterações morfológicas após o descongelamento. Com o segundo experimento objetivou-se desenvolver um protocolo simplificado para a vitrificação de sêmen de curimba utilizando diferentes concentrações de metanol (10 e 20%). A toxicidade aguda desse crioprotetor interno foi testada e comparou-se à vitrificação com e sem metanol na solução diluidora. Alíquotas de 20 µL de sêmen, de 23 reprodutores, foram colocadas em palhetas de 0,25 ml e imersas diretamente em nitrogênio líquido. Após o descongelamento das amostras, mensurou-se a motilidade espermática e as alterações morfológicas nos espermatozoides. A diluição do sêmen em soluções crioprotetoras reduziu significativamente a motilidade espermática ($p < 0,0001$). Quando comparadas à solução contendo apenas o diluidor Belltsville Thawing Solution (BTS), a presença do metanol no meio reduziu a taxa e a duração da motilidade espermática. Após o descongelamento, não houve motilidade em nenhum dos tratamentos e a análise morfológica mostrou uma alta incidência de cauda enrolada nas amostras que foram vitrificadas na presença do metanol. Esses dados demonstram a necessidade de melhoria da técnica para essa espécie e mostram que a morfologia espermática não é suficiente para avaliar os danos causados durante o processo de vitrificação.

Palavras-chaves: Preservação espermática. Qualidade seminal. Toxicidade. Crioprotetor.

GENERAL ABSTRACT

The first experiment aimed at comparing the toxicity and the effect of the combination of intra and extracellular cryoprotectants, in sperm cells of curimba (*Prochilodus lineatus*) subjected to cryopreservation. Aliquots of 400 μ l of semen from 19 males were diluted in four cryoprotectant solutions (DMSO+egg yolk, lactose+DMSO, methanol+egg yolk and lactose+methanol) and placed in 0.50 ml sterile straws. The samples were placed for 24 hours in liquid nitrogen vapor and, later, immersed in the cryogenic fluid for 10 days. After thawing, the highest motility rate and duration was obtained by using lactose as extracellular cryoprotectant, independent of its combination ($p < 0.05$). There was no significant difference between treatments when analyzing sperm morphology after thawing ($p > 0.05$). Considering the effects of the tested treatments, we recommend the use of lactose as extracellular cryoprotectant, added with DMSO or methanol, since these combinations presented the highest motility rates and durations as well as low morphological change rate after thawing. The second experiment aimed at developing a simplified protocol for curimba semen vitrification using different methanol concentrations (10 and 20%). The acute toxicity of this internal cryoprotectant was tested and we compared vitrifications with and without methanol in the diluting solution. Aliquots of 20 μ l of semen from 23 males were placed in 0.25 ml sterile straws and directly immersed into liquid nitrogen. After thawing, we measured sperm motility and morphological changes in spermatozoa. The dilution of the semen in cryoprotectant solutions significantly reduced sperm motility ($p < 0.0001$). When compared to the solution containing only Belltsville Thawing Solution (BTS), the presence of methanol in the medium reduced sperm motility rate and duration. After thawing, there was no motility in any of the treatments and the morphological analysis showed a high incidence of curled tail in the samples which were vitrified in the presence of methanol. These data demonstrate the need to improve the technique for this species and show that sperm morphology is not sufficient to assess the damage caused during the vitrification process.

Keywords: Sperm preservation. Semen quality. Toxicity. Cryoprotectant.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1 Características das alterações morfológicas encontradas no sêmen de curimba.....	37
Tabela 2 Média da taxa de motilidade (%) no sêmen de curimba diluído nas soluções crioprotetoras.....	39
Tabela 3 Contraste para a taxa de motilidade (%) no sêmen fresco e diluído .	40
Tabela 4 Média da duração da motilidade (s) no sêmen de curimba diluído nas soluções crioprotetoras.....	41
Tabela 5 Média da taxa de motilidade (%) no sêmen de curimba após o descongelamento.....	42
Tabela 6 Contraste para a taxa de motilidade (%) no sêmen fresco e diluído .	42
Tabela 7 Média da duração da motilidade (s) no sêmen de curimba após o descongelamento.....	43
Tabela 8 Contraste para o tempo de motilidade (s) no sêmen fresco, diluído e descongelado.....	44
Tabela 9 Médias das alterações morfológicas (%) maiores e menores, no sêmen de curimba após o descongelamento.....	44
Tabela 10 Média detalhada das alterações morfológicas (%) no sêmen de curimba após o descongelamento.....	45

CAPÍTULO 3

Tabela 1 Soluções utilizadas como tratamento para o sêmen de curimba.....	58
Tabela 2 Características das alterações morfológicas encontradas no sêmen de curimba.....	60
Tabela 3 Hierarquia das alterações espermáticas encontradas no sêmen de curimba.....	61
Tabela 4 Valores médios para a taxa e duração da motilidade no sêmen de curimba.....	62
Tabela 5 Médias das alterações morfológicas (%) no sêmen de curimba após o descongelamento.....	68

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 Introdução geral	11
1 INTRODUÇÃO	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1 Curimba (<i>Prochilodus lineatus</i>).....	13
2.2 Características gerais e biologia seminal.....	15
2.2.1 Motilidade espermática	16
2.3 Efeito da criopreservação e vitrificação na qualidade do sêmen. 17	
2.4 Soluções diluidoras do sêmen de peixes.....	18
2.5 Soluções crioprotetoras do sêmen de peixes	19
2.6 Descongelamento do sêmen de peixes.....	20
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	22
REFERÊNCIAS	23
CAPÍTULO 2 Criopreservação de sêmen de curimba (<i>Prochilodus lineatus</i>): efeito da combinação de crioprotetores na motilidade e morfologia de células espermáticas	28
1 INTRODUÇÃO	30
2 MATERIAL E MÉTODOS	32
2.1 Local e seleção de reprodutores	32
2.2 Indução hormonal	32
2.3 Coleta e avaliação do sêmen.....	33
2.4 Determinação da concentração espermática	34
2.5 Criopreservação e descongelamento do sêmen.....	35
2.6 Análise da morfologia espermática.....	36
2.7 Delineamento experimental e análise estatística	37
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
3.1 Concentração espermática	39
3.2 Motilidade espermática no sêmen diluído nas soluções.....	39
3.3 Motilidade espermática no sêmen descongelado	41
3.4 Morfologia espermática após o descongelamento.....	44

4	CONCLUSÃO.....	48
	REFERÊNCIAS	49
	CAPÍTULO 3 Vitrificação de sêmen de curimba (<i>Prochilodus lineatus</i>): toxicidade do metanol sobre as células espermáticas..	52
1	INTRODUÇÃO.....	54
2	MATERIAL E MÉTODOS	56
2.1	Local e seleção de reprodutores	56
2.2	Indução hormonal.....	56
2.3	Coleta e avaliação do sêmen.....	57
2.4	Avaliação da toxicidade do metanol antes da vitrificação.....	57
2.5	Vitrificação e descongelamento do sêmen	58
2.6	Análise da morfologia espermática	59
2.7	Delineamento experimental e análise estatística	61
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
3.1	Avaliação da toxicidade do metanol antes da vitrificação.....	62
3.2	Motilidade espermática do sêmen descongelado	64
3.3	Morfologia espermática do sêmen descongelado.....	66
4	CONCLUSÃO.....	69
	REFERÊNCIAS	70

CAPÍTULO I

Introdução geral

1 INTRODUÇÃO

O interesse no aperfeiçoamento de técnicas de criopreservação de sêmen de peixes vem aumentando a cada dia devido a questões econômicas e sociais. Vários fatores são apontados como responsáveis pelo declínio do estoque de peixes e dentre eles, destacam-se a pesca predatória, a construção de hidrelétricas e a urbanização, que inclui a poluição dos rios e o desmatamento da mata ciliar. A eficiência reprodutiva dos peixes de piracema é drasticamente reduzida ou cessada pelo obstáculo que as barragens hidrelétricas representam, pois modificam o curso natural dos rios. Já a urbanização prejudica por desaparecer, parcial ou completamente, com o habitat aquático natural (GODINHO, 2000).

A criopreservação ganhou impulso quando foi descoberta a capacidade do glicerol em proteger as células espermáticas contra os efeitos deletérios do congelamento (GODINHO, 2000) e desde essa descoberta, várias substâncias vêm sendo testadas com esse objetivo.

Outro processo de preservação de material genético é a vitrificação, a qual desempenha um importante papel na conservação das características do sêmen, porém exige mais cuidados no desenvolvimento de protocolos devido à imersão do material diretamente em nitrogênio líquido (-196°C) a partir da temperatura ambiente.

Ambas as técnicas envolvem o armazenamento do material de interesse em nitrogênio líquido por tempo indeterminado. Dessa forma, elas são fundamentais na rotina de reprodução induzida e na melhoria genética das espécies. Além de facilitar o transporte de material e minimizar a assincronia na

maturação dos gametas, esses processos possibilitam a limitação do estoque de machos na piscicultura fazendo com que haja uma redução nos custos de criação e uma exploração mais racional de reprodutores.

Apesar das técnicas serem muito utilizadas, ambas apresentam importantes limitações, pois reduzem os parâmetros de motilidade e consequentemente, a taxa de fertilização. Uma das maneiras de se minimizar os efeitos deletérios causados por esses processos é a utilização de soluções crioprotetoras que protegem a célula espermática. Outro aspecto a ser considerado é a diferença de sensibilidade dos espermatozoides, de espécies distintas, à redução da temperatura e à diluição em soluções crioprotetoras, o que dificulta na definição de um protocolo específico de criopreservação e vitrificação.

A curimba (*Prochilodus lineatus*) é um peixe nativo da América Central e América do Sul e apresenta uma alta importância econômica pela facilidade de manejo e alta produtividade. Além disso, devido ao declínio de suas populações nativas por interferências antropológicas, o interesse pela preservação da espécie aumentou significativamente.

Portanto, torna-se imprescindível o estudo de protocolos eficazes de criopreservação e vitrificação, capazes de preservar o material genético da curimba, permitindo assim, a realização de uma fertilização *in vitro* bem sucedida.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Curimba (*Prochilodus lineatus*)

A curimba é um peixe teleósteo de coloração cinza-prateada, com faixas transversais escuras e inconspícuas no dorso (Figura 1). Como possui hábito alimentar iliófago, seus pequenos e numerosos dentes enfileirados servem para raspar detritos e perifíton, e sua boca forma um disco quando é projetada (LOGATO, 2000). A curimba possui cabeça larga, corpo alto e alongado com nadadeiras escamadas na base. Os indivíduos podem atingir até 70 cm de comprimento e peso corporal superior a 6 Kg (SVERLIJ; ROS; ORTI, 1993; CRUZ, 2001).

A classificação taxonômica da curimba é feita da seguinte forma:

Reino: Animalia;

Filo: Chordata;

Classe: Actinopterygii;

Ordem: Characiformes;

Família: Prochilodontidae;

Subfamília: Prochilodontinae;

Gênero: *Prochilodus*;

Espécie: *Prochilodus lineatus*, Valenciennes, 1836.



Figura 1. Curimba, *Prochilodus lineatus*

No Brasil, a curimba possui outros nomes populares como curimbatá, curimatã, papa-terra e grumatã, e pode ser encontrada em todo o território brasileiro, principalmente na região Norte, Centro-Oeste e Nordeste, além dos estados de São Paulo, Minas Gerais e Paraná (Figura 2).

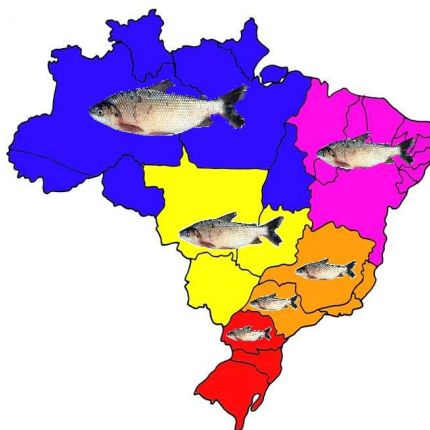


Figura 2. Distribuição geográfica da curimba, *Prochilodus lineatus*

Assim como outros prochilodontídeos, a curimba é uma espécie reofílica que realiza migrações ascendentes com fins reprodutivos e essas atividades estão sincronizadas com o aumento do nível das águas na época das enchentes. Sua reprodução inicia-se na primavera e tem o pico no verão, podendo desovar entre 500.000 a 1.200.000 óvulos (SANTOS, 1981). Ela é uma espécie de desova total e normalmente é encontrada em ambientes lóticos de águas mais lentas (WINEMILLER, 1996).

Em cativeiro, a curimba necessita de indução hormonal para se reproduzir, e o desenvolvimento de biotecnologias para essa finalidade tem sido esmiuçado pelo fato de suas larvas serem utilizadas como alimento para espécies carnívoras na fase larval, como a piracanjuba (*Brycon orbignyanus*), o dourado (*Salminus brasilienses*) e o jaú (*Zungaro jahu*). Além disso, a curimba

também é utilizada como modelo para pesquisas reprodutivas devido a sua alta taxa de fecundidade e facilidade de manejo (MURGAS et al., 2003).

Devido à construção de hidrelétricas, urbanização, sobrepesca, captura em períodos de desova e introdução de espécies exóticas nos rios, o estoque de peixes de piracema tem diminuído significativamente (CAROLSFELD et al., 2003) fundamentando o interesse em conservar a biodiversidade desse prochilodontídeo.

2.2 Características gerais e biologia seminal

Apesar das variações, o sêmen apresenta características semelhantes entre todas as espécies existentes, sendo composto pelo plasma seminal e células espermáticas. Sua composição varia de indivíduo para indivíduo, apresentando uma interação complexa entre fatores ambientais, genéticos e fisiológicos (BILLARD, 1986; RURANGWA et al., 2004).

O plasma seminal contém componentes orgânicos e inorgânicos, fornece nutrientes adequados para o metabolismo espermático, mantém o estado quiescente das células e protege os espermatozoides contra danos proteolíticos e oxidativos (CIERESZKO, 2008).

Os componentes do plasma seminal são encontrados em quantidades bastante variadas. Ele é constituído principalmente por compostos minerais - magnésio, cálcio, potássio e sódio - sendo os dois últimos os íons mais predominantes e diretamente relacionados com a imobilidade dos espermatozoides no plasma (BILLARD et al., 1995). Apesar de proteínas e substratos energéticos serem encontrados em baixa concentração, as proteínas exercem uma importante função de proteger as células espermáticas contra ataques proteolíticos. Os componentes antioxidantes encontrados em

abundância no plasma seminal são os ácidos - ascórbico e úrico - ambos responsáveis pela proteção da membrana.

Na maioria das espécies de peixes teleósteos, o espermatozoide não possui acrossoma e é dividido em três compartimentos principais: a cabeça, onde se encontra o núcleo com o DNA paterno, a peça intermediária composta pela mitocôndria que fornece energia para o batimento flagelar, e o flagelo que é responsável pelo movimento espermático (LAHNSTEINER; PATZNER, 2008).

2.2.1 Motilidade espermática

Em peixes teleósteos, os espermatozoides permanecem quiescentes no trato genital e a motilidade espermática se inicia após a liberação do espermatozoide em ambiente aquático, devido à diferença de osmolaridade e a composição iônica do meio de ativação (BILLARD, 1986; BILLARD et al., 1995).

A pressão osmótica desempenha um importante papel na regulação da motilidade, visto que esse fator sozinho é capaz de iniciar a movimentação espermática (MORISAWA et al., 1983). Em peixes de água doce, a diminuição na concentração intracelular de K^+ em função da exposição ao meio hipotônico provoca a ativação da motilidade, enquanto que em espécies marinhas, ela é ativada pelo mecanismo contrário (TAKAI; MORISAWA, 1995).

Devido ao gradiente de concentração entre o meio intra e extracelular, a célula espermática altera o seu volume na tentativa de equilibrar a osmolaridade entre os meios. Em espécies marinhas são observados a perda de água e o encolhimento celular, ao passo que o influxo de água ocorre em peixes dulcícolas, através da difusão passiva da água. É importante salientar que estas alterações são fenômenos progressivos, que ocorrem após o início da motilidade em função da variação na osmolaridade externa (HU et al., 2009).

2.3 Efeito da criopreservação e vitrificação na qualidade do sêmen

As técnicas da criopreservação e vitrificação consistem no armazenamento de espermatozoides em nitrogênio líquido e são amplamente empregadas na conservação do sêmen de diferentes espécies de peixes, incluindo as espécies nativas do Brasil (FELIZARDO et al., 2010; ORFÃO et al., 2011). Esses métodos são seguros para a preservação de recursos genéticos, uma vez que, a motilidade espermática e capacidade de fertilização são recuperadas após o processo de congelamento e descongelamento. No entanto, a manutenção do espermatozoide à baixa temperatura exige a utilização de um adequado protocolo dependente da qualidade e quantidade do meio diluidor, tipo e concentração dos crioprotetores, volume da amostra e características do espermatozoide (KOPEIKA; KOPEIXA, 2008).

A variabilidade do sêmen pode afetar diretamente o sucesso da criopreservação e vitrificação devido a fatores intrínsecos que determinam a crioresistência da célula espermática, que consiste na habilidade do espermatozoide em preservar suas características após a criopreservação, mantendo suas estruturas intracelulares e funções básicas (KOPEIKA; KOPEIXA, 2008).

A exposição às técnicas de criopreservação ocasiona estresse osmótico à célula e pode danificar suas funções, afetando a motilidade, a morfologia, a composição do plasma seminal e a atividade antioxidante (BUTTS et al., 2011; MARTINEZ-PÁRAMO et al., 2012).

A morfologia espermática também é afetada pelos processos de criopreservação e vitrificação, devido à alteração na osmolaridade do meio que circunda as células. Estas alterações ultraestruturais reduzem a motilidade e a capacidade de fertilização e são causadas por rompimento da membrana,

redução da função mitocondrial, espiralização, ruptura ou aderência do axonema (MARQUES, 2001).

As alterações espermáticas podem ser fisiológicas ou patológicas e são divididas em dois grupos: primárias e secundárias. As alterações primárias (cauda dobrada, cabeça isolada e gotas citoplasmáticas distal e proximal) ocorrem durante a espermatogênese em decorrência de fatores que acometem os reprodutores, e as secundárias (caudas quebrada, enrolada e degenerada, macro e microcefalia) estão relacionadas a procedimentos de manejo durante a coleta (MILIORINI, 2006).

Segundo Leung (1991), os maiores prejuízos na estrutura das células espermáticas ocorrem no intervalo crítico entre 0 e -40°C. Para minimizar os danos, algumas técnicas de criopreservação padrão colocam o sêmen primeiramente em vapor de nitrogênio líquido para que os espermatozoides sofram um congelamento gradual e suas estruturas membranosas não sejam muito alteradas (BILLARD, 1983). Em temperaturas entre -5 e -10°C, o processo de desidratação se inicia e microcristais de gelo começam a se formar no meio extracelular (MEDEIROS et al., 2002).

Para se processar o congelamento de sêmen de peixes, é necessária uma taxa mínima de 90% de motilidade espermática (COSSON et al., 1999) e de acordo com Cruz (2001), o período de permanência do material à temperatura constante de -196°C não altera a qualidade do sêmen de forma significativa.

2.4 Soluções diluidoras do sêmen de peixes

Com o objetivo de manter a viabilidade espermática durante a redução da temperatura, soluções de sais ou carboidratos são adicionadas ao sêmen. Para que uma substância seja aceita como diluidor, ela deve ser: isotônica, para que a motilidade espermática não seja ativada precocemente; estável, para que suas

características físico-químicas não sejam alteradas em contato com o sêmen; condutora térmica, para permitir a rápida transferência da temperatura externa para os espermatozoides; estéril, sendo isenta de microrganismos nocivos às células e finalmente, a solução deve servir como carreadora de crioprotetores (LEGENDRE; BILLARD, 1980).

Alguns diluidores utilizados na criopreservação de sêmen de mamíferos têm sido empregados com êxito em espécies de peixes, em especial, o *Beltsville Thawing Solution* (BTS, Minitüb®) acrescido ao sêmen suíno durante seu resfriamento e congelamento (MURGAS et al., 2001). Pesquisadores utilizaram o mesmo diluidor na concentração de 5% e obtiveram resultados expressivos em sêmen de curimba (MILIORINI et al., 2004), pacu (MILIORINI et al., 2002; MURGAS et al., 2004), piapara (MURGAS; MILIORINI; SILVA, 2003) e piracanjuba (MURGAS et al., 2004). Esses trabalhos foram pioneiros na adequação do diluidor BTS ao sêmen de peixes migradores.

2.5 Soluções crioprotetoras do sêmen de peixes

Quando pesquisas relataram a capacidade do glicerol em proteger as células espermáticas contra efeitos deletérios do congelamento (GODINHO, 2000), a criopreservação adquiriu um impulso e várias outras substâncias vêm sendo testadas com esse objetivo.

As soluções crioprotetoras são acrescidas ao meio diluidor com o propósito de proteger os espermatozoides, mas podem se tornar tóxicas quando utilizadas em altas concentrações (MARIA et al., 2006). Essas substâncias são divididas em crioprotetores intracelulares (ou solúveis) e extracelulares (ou insolúveis), sendo os primeiros capazes de retirar a água da célula e diminuir a temperatura de congelamento no seu interior, impedindo a formação de cristais de gelo. Já os crioprotetores extracelulares possuem a função de revestir a célula

externamente, estabilizando a membrana e diminuindo os danos provocados pelo congelamento (CAROLSFELD et al., 2003).

Entre os crioprotetores intracelulares mais utilizados, destacam-se o dimetilsulfóxido (DMSO), o metanol, o glicerol e o etilenoglicol. Os extracelulares mais utilizados são a glicose, a sacarose, a gema de ovo, o leite desnatado, o soro e a água de coco.

Segundo Chao (1991), o uso de crioprotetores internos envolve um grande risco, pois podem provocar a desnaturação proteica causando uma toxicidade nos sistemas enzimáticos e celulares. Isso ocorre principalmente quando as concentrações dos crioprotetores internos são muito elevadas (CRUZ, 2001) e aparentemente eles provocam resultados distintos em espécies diferentes.

A associação entre crioprotetores internos e externos é indicada por Carolsfeld e Harvey (1999) e Godinho (2000), e segundo Bedore (1999), o metanol apesar de ser o crioprotetor mais permeável à membrana, é o que apresenta a maior toxicidade dentro do seu grupo.

2.6 Descongelamento do sêmen de peixes

Ao contrário do congelamento, o descongelamento do sêmen envolve uma reidratação das células devido à entrada de água para o meio intracelular (HOLT, 2000). A fim de evitar o reagrupamento de pequenos cristais de gelo, o descongelamento rápido é necessário, e a velocidade e temperatura devem ser obtidas através de ensaios experimentais devido às particularidades seminais de cada espécie (CAROLSFELD et al., 2003).

As taxas de descongelamento que envolvem altas temperaturas e tempo reduzido de exposição são as mais bem sucedidas (SCOTT; BAYNES, 1980), entretanto, o superaquecimento deve ser evitado. Em geral, as palhetas são

imersas em água aquecida e as temperaturas mais adequadas estão entre 50 e 60°C (MARIA et al., 2006), embora haja uma numerosa variação com relação à taxa de descongelamento.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos nos dois trabalhos mostram as modificações espermáticas causadas por diferentes métodos de criopreservação seminal. Para trabalhos futuros, sugere-se a realização de análises mais elaboradas que visem explicar com maior clareza, as reais causas da diminuição da motilidade espermática no sêmen descongelado.

REFERÊNCIAS

- BEDORE, A. G. **Características criopreservação do sêmen de pacu-caranha (*Piaractus mesopotamicus*) e de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)**. 1999. 53 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1999.
- BILLARD, R. et al. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 129, n. 1-4, p. 95-112, Jan. 1995.
- BILLARD, R. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. **Reproduction Nutrition Development**, Paris, v. 26, n. 4, p. 877-920, 1986.
- BILLARD, R. Ultrastructure of trout spermatozoa: changes after dilution and deep-freezing. **Cell Tissue Research**, New York, v. 228, n. 2, p. 205-218, 1983.
- CAROLSFELD, J. et al. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. **Journal of Fish Biology**, London, v. 63, p. 472-481, 2003.
- CAROLSFELD, J.; HARVEY, B. **Conservação de recursos energéticos de peixes: teoria e prática**. Canadá: World Fisheries Trust, 1999.
- CHAO, N. H. **Fish sperm cryopreservation in Taiwan: technology advancement and extension efforts**. Taiwan: Department of Aquaculture, 1991.
- CIERESZKO, A. Chemical composition of seminal plasma and its physiological relationship with sperm motility, fertilizing capacity and cryopreservation success in fish. In: ALAVI, S. N. H. et al. (Ed.). **Fish spermatology**. Oxford: Alpha Science International, 2008. p. 215-241.

COSSON, J. et al. Ionic factors regulating the motility of fish sperm. In: GAGNON, C. (Ed.). **The male gamete: from basic science to clinical applications**. Vienna: Cachê River, 1999. Chap. 16, p. 162-186.

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

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

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

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

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

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

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

LEGENDTRE, M.; BILLARD, R. Cryopreservation of rainbow trout sperm by deep-freezing. **Reproduction Nutrition Development**, Paris, v. 20, n. 6, p. 1859-1868, 1980.

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

LOGATO, P. V. R. **Nutrição e alimentação de peixes de água doce**. Viçosa: Aprenda Fácil, 2000.

MARIA, N. 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, Sept. 2006.

MARQUES, S. **Preservação a curto prazo do sêmen de Teleósteos Neotropicais de água doce**. 2001. 83 p. Dissertação (Mestrado em Zoologia) - Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.

MARTINEZ-PARAMO, S. et al. Incorporation of ascorbic acid and α -tocopherol to the extender media to enhance antioxidant system of cryopreserved sea bass sperm. **Theriogenology**, Stoneham, v. 77, n. 6, p. 1129-1136, Apr. 2012.

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

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

MILIORINI, A. B. et al. Resfriamento do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) à 4°C, utilizando diferentes concentrações de dimetilsulfóxido. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 26, n. 3, p. 209-211, jul./set. 2002.

MILIORINI, A. B. et al. The effects of cryoprotectants and activators on sperm motility of curimba (*Prochilodus lineatus*). In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION-ICAR, 15., 2004, Bahia. **Abstracts...** Bahia: ICAR, 2004.

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

MURGAS, L. D. S. et al. Crioconservación espermática en la espécie porcina: estudio de dos sistemas de congelación con semen heterospérmico. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 10., 2001, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: ABRAVES, 2001.

MURGAS, L. D. S. et al. **Reprodução/espécies próprias para a piscicultura**. Lavras: UFLA, 2003.

MURGAS, L. D. S. et al. Viabilidade espermática do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) resfriado a 4°C. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 33, n. 6, p. 1361- 1365, dez. 2004.

MURGAS, L. D. S.; MILIORINI, A. B.; SILVA, M. O. B. Viabilidade do sêmen de piapara (*Leporinus obtusidens*) resfriado a 4°C, empregando-se diferentes diluidores. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, 12., 2002, Goiânia, Goiás. **Anais...** Jaboticabal: Associação Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, 2003.

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

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

SANTOS, G. M. Estudos alimentares e hábitos alimentares de *Schizodonfasciatus* Agasiz, 1829, *Rhytiodus microlepis* Kner, 1859 e *Rhytiodus argenteofuscus* Kner, 1859, do lago Janaucá – AM. (Osteichthyes, Characoidei, Anostomidae). **Acta Amazônica**, Manaus, v. 11, n. 2, p. 267-283, 1981.

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

SVERLIJ, S.; ROS, A.; ORTI, G. Sinopsis de los datos biológicos y pesqueros del Sabalo *Prochilodus lineatus*. **FAO Sinopsis sobre la pesca**, Rome, v. 154, p. 1-64, 1993.

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

WINEMILLER, K. O. Factors driving spatial and temporal variation in aquatic floodplain food webs. In: POLIS, F. A.; WINEMILLER, K. O. (Ed.). **Food webs: integration of patterns and dynamics**. New York: Chapman and Hall, 1996. p. 298-312.

CAPÍTULO 2 Criopreservação de sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*): efeito da combinação de crioprotetores na motilidade e morfologia das células espermáticas

RESUMO

O estudo foi conduzido entre janeiro e fevereiro de 2012 no município de Itutinga em Minas Gerais, com o objetivo de comparar a toxicidade e o efeito da combinação de crioprotetores intra e extracelulares, nas células espermáticas de curimba submetidas à criopreservação. O sêmen de 19 reprodutores foi analisado e diluído em quatro soluções compostas por crioprotetores internos e externos nas seguintes combinações: metanol + lactose, metanol + gema de ovo, DMSO + lactose e DMSO + gema de ovo. Uma parte do sêmen diluído foi congelada enquanto que a fração restante foi mantida em repouso e avaliada após 10 minutos. Para o congelamento, as amostras diluídas foram envasadas em palhetas de 0,50 ml, colocadas em botijão de vapor de nitrogênio líquido por 24 horas e após esse tempo, foram submergidas em nitrogênio líquido por 10 dias. O descongelamento ocorreu em água a 60°C, por 8 segundos. A combinação de DMSO + lactose se mostrou menos tóxica para o sêmen diluído, resultando nas maiores taxas e durações de motilidade quando comparada aos demais tratamentos ($p < 0,05$). Após o descongelamento, a maior taxa e duração de motilidade foram obtidas utilizando a lactose como crioprotetor extracelular, independente da sua combinação ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa entre os tratamentos quando se analisou a morfologia espermática após o descongelamento ($p > 0,05$). Dentre as alterações mais encontradas estão cauda enrolada, seguida por cauda fraturada e cabeça isolada. Considerando os efeitos dos tratamentos testados, recomenda-se o uso da lactose como crioprotetor extracelular, acrescida de DMSO ou metanol, visto que essas combinações apresentaram as maiores taxas e durações de motilidade e baixo índice de alterações morfológicas após o descongelamento.

Palavras-chave: Preservação genética. Criobiologia. Análise espermática.

ABSTRACT

The study was conducted between January and February of 2012 in the municipality of Itutinga, Minas Gerais, Brazil, with the objective of comparing the toxicity and the effect of the combination of intra and extracellular cryoprotectants in curimba sperm cells subjected to cryopreservation. Semen from 19 males were analyzed and diluted in four solutions comprise of inner and external cryoprotectants in the following combinations: methanol + lactose, methanol + egg yolk, DMSO + lactose and DMSO + egg yolk. A portion of the diluted semen was frozen while the remaining fraction was kept in repose and evaluated after 10 minutes. For freezing, the diluted samples were packaged in 0.50 ml straws and placed into liquid nitrogen vapor for 24 hours and, after this time, submerged into liquid nitrogen for 10 days. The thawing was conducted in water at 60°C for 8 seconds. The combination of DMSO + lactose was less toxic to the diluted semen, resulting in higher motility rates and durations when compared to the other treatments ($p < 0.05$). After thawing, the highest motility rate and duration were obtained using lactose as extracellular cryoprotectant, regardless of its combination ($p < 0.05$). There was no significant difference between treatments when analyzing sperm morphology after thawing ($p > 0.05$). Among the most frequent changes was curled tail, followed by fractured tail and isolated head. Considering the effects of the tested treatments, we recommend the use of lactose as a extracellular cryoprotectant added with DMSO or methanol, since these combinations presented the highest motility rates and durations and low morphological change rate after thawing.

Keywords: Genetic preservation. Cryobiology. Sperm analysis.

1 INTRODUÇÃO

A curimba (*Prochilodus lineatus*) é um peixe teleósteo nativo da América do Sul, amplamente utilizado em reprodução assistida. Além de oferecer grandes vantagens à piscicultura, devido à facilidade de manejo e elevada taxa de crescimento (MURGAS et al., 2007), essa espécie responde facilmente à indução hormonal (FRANCISCATTO et al., 2002; NAVARRO et al., 2007). Desta forma, o interesse pela preservação da curimba tem aumentado consideravelmente, fazendo com que o desenvolvimento de técnicas para essa finalidade se torne essencial.

A criopreservação é uma técnica utilizada para preservar o material genético de espécies de interesse, por tempo indeterminado. Esse procedimento objetiva manter a viabilidade de células, tecidos e órgãos, armazenando-os em nitrogênio líquido (-196°C). Além de ser indicada para minimizar a assincronia na maturação de gametas e facilitar o transporte dos mesmos, essa técnica limita o estoque de machos na piscicultura intensiva, reduzindo os custos na produção.

Em peixes teleósteos, o declínio de populações selvagens e a expansão da produção aquícola impulsionaram o interesse pela criopreservação do sêmen (BUTTS et al., 2011). Embora seja um método amplamente utilizado em mamíferos, essa técnica requer bastante estudo devido à diferença celular entre as espécies de peixes, fazendo com que haja respostas individuais.

Durante o resfriamento, as células espermáticas ficam expostas a condições externas que as danificam, interferindo diretamente na sua sobrevivência. A exposição das células a temperaturas muito baixas e o contato com as soluções crioprotetoras desencadeiam uma série de eventos como, estresse osmótico, alterações na bioquímica do plasma seminal, danos oxidativos, desidratação e cristalização celular (KOPEIKA; KOPEIKA, 2008). Como consequência, diversos parâmetros da atividade espermática são afetados

negativamente, com destaque para a motilidade e morfologia espermática (BUTTS et al., 2011; MARTÍNEZ-PARÁMO et al., 2012).

Para evitar danos à célula espermática, o uso de crioprotetores torna-se importante no processo de criopreservação. Essas substâncias têm a finalidade de proteger os espermatozoides durante o congelamento e descongelamento celular, impedindo as criolesões causadas pela queda da temperatura.

Os crioprotetores intracelulares são utilizados para reduzir a formação de microcristais de gelo dentro da célula, enquanto que os extracelulares atuam estabilizando e reparando a membrana externa.

Portanto, o principal objetivo desse trabalho foi estudar o efeito da interação de diferentes crioprotetores internos e externos na criopreservação de células espermáticas de curimba.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local e seleção de reprodutores

O estudo foi conduzido durante o período de reprodução (piracema) nos meses de janeiro e fevereiro de 2012, no município de Itutinga e no laboratório de Fisiologia da Universidade Federal de Lavras, ambos localizados no sul do estado de Minas Gerais.

Foram utilizados 19 machos de curimba ao longo do experimento, com pesos corporais entre 910 a 2050 gramas, os quais foram mantidos em viveiros de terra na Estação Ambiental de Itutinga, da Companhia Energética de Minas Gerais (EAI-CEMIG). Os reprodutores foram alimentados *ad libitum*, três vezes ao dia, com ração comercial extrusada de oito milímetros de diâmetro com 28% de proteína bruta, entre os meses de março e agosto de 2011. Durante o período reprodutivo (setembro a fevereiro), os animais foram alimentados com ração extrusada de mesmo diâmetro, contendo 32% de proteína bruta.

Com o auxílio de redes de arrasto, foram selecionados somente os reprodutores que liberaram sêmen sob delicada massagem sobre a parede da cavidade celomática. Estes foram transportados para aquários de alvenaria de 2000 litros e foram mantidos a uma densidade de seis animais por aquário. O nível de oxigênio foi monitorado e a temperatura da água mantida em torno de 28°C.

2.2 Indução hormonal

Para serem submetidos ao tratamento hormonal com extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC), os animais ficaram em jejum por 24 horas antes da aplicação. Cada reprodutor foi pesado e recebeu duas doses para espermição

que consistiram em injeções intramusculares de 0,50 e 5,0 mg de EBHC kg⁻¹ de peso corporal, próximo à base da nadadeira dorsal. Houve um intervalo de 12 horas entre as aplicações e a coleta de sêmen ocorreu em torno de 7 horas após a última dose de EBHC.

2.3 Coleta e avaliação do sêmen

Antes da coleta do material, a papila urogenital foi limpa com papel toalha para evitar a contaminação, por fezes ou urina, e a ativação prematura das células espermáticas. Em seguida, coletou-se o sêmen por meio de leve massagem na parede celomática no sentido crânio-caudal e as amostras foram colocadas em tubos de ensaio estéreis e mantidas em temperatura ambiente (23°C).

Após a coleta, uma alíquota de 10µL de sêmen fresco foi depositada em uma lâmina histológica de vidro e homogeneizada com 40µL de água destilada, para a mensuração da taxa e duração da motilidade espermática. Esses parâmetros foram observados em microscópio óptico de luz, sob aumento de 100 dioptrias e estimadas em porcentagem média desde a homogeneização com água destilada até que somente 10% dos espermatozoides se encontrassem móveis. A mensuração da motilidade espermática foi realizada no sêmen *in natura*, após a diluição nas soluções crioprotetoras e no sêmen descongelado.

Para o estudo da criopreservação, uma alíquota de 400µL de sêmen *in natura* foi mantida à temperatura de $26 \pm 0,8$ °C durante a manipulação e análise das demais amostras.

2.4 Determinação da concentração espermática

Uma alíquota de 10 μ L de sêmen de cada animal foi coletada e diluída em 990 μ L de solução de formol citrato (2,9g de citrato de sódio, 4ml de solução comercial de formaldeído 35% e 100ml de água destilada). Em seguida, 10 μ L da amostra diluída foi adicionada a 990 μ L de solução de formol citrato, resultando numa diluição final de 1:10⁴ (sêmen:formol citrato). A determinação da concentração espermática foi feita em câmara de Neubauer e estimada pela seguinte fórmula:

$$CE = N \times FC;$$

Onde:

CE é a concentração espermática (espermatozoides por mm³);

N é o número de células contadas na câmara de Neubauer

e *FC* é o fator de correção dado por:

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

em que:

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

fd é o fator de diluição da alíquota de sêmen (10⁴);

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

2.5 Criopreservação e descongelamento do sêmen

As amostras de sêmen foram diluídas na proporção de 1:5 (100µL de sêmen:500µL de solução crioprotetora). As soluções foram preparadas utilizando BTS a 5% (*Belltsville Thawing Solution*), crioprotetores intracelulares a 8% (DMSO e metanol) e extracelulares a 5% (gema de ovo e lactose), diluídos em 100 ml de água destilada. Quatro combinações de crioprotetores intra e extracelulares foram testadas: DMSO + gema de ovo, DMSO + lactose, metanol + gema de ovo e metanol + lactose. As amostras de sêmen fresco ficaram em contato com as soluções crioprotetoras durante 10 minutos (período de estabilização) e, após esse tempo, foram envasadas em palhetas de 0,50 ml (uma palheta por tratamento) que por sua vez, foram vedadas com massa cirúrgica estéril. Em seguida, as palhetas foram colocadas em botijão de vapor de nitrogênio líquido (Taylor-Wharton, CP 300, “dry shipper”, Theodore, AL, USA) por 24 horas, o qual possui taxa de congelamento padrão de $-35,6^{\circ}\text{C min}^{-1}$ entre 23 e -170°C . Após esse período, as amostras foram imersas diretamente em botijão de nitrogênio líquido a -196°C (Cryometal, DS-18, Kolovratska, Czech Republic), por 10 dias.

As palhetas foram descongeladas individualmente por imersão em água (banho-maria) a 60°C por 8 segundos (MARIA et al., 2006; PAULINO et al., 2012) sendo agitadas durante todo o procedimento. As mesmas foram enxugadas com toalha de papel e a extremidade foi cortada para descartar a massa cirúrgica. Uma alíquota de 10µL de sêmen foi depositada sobre uma lâmina histológica previamente focalizada em microscópio óptico sob o aumento de 100 dioptrias. Após a confirmação da ausência de ativação, a amostra foi ativada mediante homogeneização com 40µL de água destilada.

A avaliação quantitativa da motilidade foi estimada em função da porcentagem média dos espermatozoides móveis e a duração (em segundos) foi

estimada desde a homogeneização com a água destilada até que somente 10% das células espermáticas se encontrassem móveis.

2.6 Análise da morfologia espermática

Foram utilizadas amostras de sêmen descongelado dos 19 animais e as análises morfológicas foram realizadas em microscópio óptico de luz sob o aumento de 1000 dioptrias.

Uma alíquota de 10 μ L de sêmen descongelado foi diluída em 990 μ L de solução formol citrato e uma fração de 10 μ L dessa mistura foi depositada em uma lâmina histológica juntamente com 10 μ L de corante Rosa Bengala 1%. Após a secagem, foi observada a morfologia de 100 células espermáticas ao longo de toda a lâmina conforme esquematizado na Figura 1.

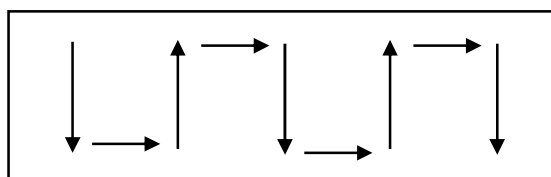


Figura 1. Sequência de campos observados durante a análise morfológica do sêmen de curimba. As setas indicam o sentido da avaliação

Foram observadas alterações na cabeça, peça intermediária e cauda, resumidas na Tabela 1 (MILIORINI, 2006).

Tabela 1. Características das alterações morfológicas encontradas no sêmen de curimba

Alterações primárias	Características
Cabeça isolada normal	Cabeça sem qualquer alteração, porém sem cauda
Cauda dobrada	Dobradura em diversos graus sem envolver a si mesma ou a cabeça
Alterações secundárias	Características
Macrocefalia	Cabeça gigante, com contornos e formas anormais
Microcefalia	Cabeça reduzida, com contornos e formas anormais
Cabeça degenerada	Cabeça e forma normais, com contorno irregular ou degenerações cromatínica ou vacuolar
Peça intermediária degenerada (PID)	Alterações na espessura, densidade e comprimento
Cauda fraturada	Células com fratura e retenção de cauda
Cauda enrolada	Dobradura e enovelamento da cauda sobre si mesma ou sobre a cabeça
Cauda degenerada	Descontinuidade da cauda a partir da peça intermediária

Fonte: MILIORINI, 2006 (adaptado)

2.7 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado. As análises de normalidade para todas as variáveis dependentes foram realizadas pelo teste de Shapiro-Wilk. As variáveis “anormalidades na cabeça e na cauda” dos espermatozoides foram transformadas em $\log_{10}x$ para sua normalização, sendo as médias posteriormente convertidas em seu antilogaritmo para apresentação dos resultados. Os dados coletados foram submetidos à análise de variância e teste F. Quando detectadas diferenças entre as médias, foi realizado o teste de Tukey.

As análises foram efetuadas com auxílio do procedimento "general linear model" (GLM). As variáveis "taxa e tempo de motilidade" foram comparadas pelo teste de t pareado, comparando antes e depois da criopreservação do sêmen. Para as demais variáveis, devido à distribuição não ter se comportado de forma normal, foi realizada análise de variância para as médias não paramétricas por meio do teste de Kruskal-Wallis. O programa estatístico utilizado foi o SAS versão 9.0 (2002) e adotou-se 5% como o nível de significância máximo das análises.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Concentração espermática

No presente estudo, a concentração espermática média encontrada no sêmen de curimba foi de 23.4×10^9 espermatozoide/mL. A variação encontrada entre estudos é esperada, pois essa variável é afetada por diversos fatores como, mudanças ambientais, fase reprodutiva, tipo de hormônio utilizado para a indução e o volume seminal (SILVA et al., 2009).

3.2 Motilidade espermática no sêmen diluído em soluções crioprotetoras

Os dados mostram uma maior taxa de motilidade ($p < 0,0001$) nos tratamentos utilizando metanol + gema de ovo e DMSO + lactose (Tabela 2).

Embora as taxas de motilidade tenham sido inferiores ($p < 0,05$) quando comparadas ao sêmen fresco (Tabela 3), as amostras de sêmen de curimba exibiram altas porcentagens de células móveis após a diluição nas soluções. Esses dados demonstram que essas combinações de crioprotetores não se mostraram tóxicas ao sêmen de curimba, alcançando uma taxa de motilidade média de 82,43%.

Tabela 2. Média da taxa de motilidade (%) no sêmen de curimba diluído nas soluções crioprotetoras, antes do congelamento (n=19)

Crioprotetor extracelular (5%)	Crioprotetor Intracelular (8%)	
	DMSO	METANOL
GEMA DE OVO	80,59 bB	90,29 aA
LACTOSE	88,24 aA	70,59 bB

^{a,b} Médias seguidas de letras distintas, nas colunas, diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade; ^{A,B} Médias seguidas de letras distintas, nas linhas, diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade

A diluição do sêmen em soluções crioprotetoras é uma etapa necessária para realizar a criopreservação. Em testes utilizando 7,5% de metanol e DMSO, Miliorini (2006) obteve respectivamente, 87 e 90% de taxa de motilidade no sêmen diluído de curimba, sendo semelhante aos valores encontrados no presente estudo, 88,24 e 90,29%, quando foram utilizados 8% de metanol e DMSO.

Tabela 3. Contraste para a taxa de motilidade (%) no sêmen fresco e diluído

	Média da taxa de motilidade (%)
Sêmen fresco	98,53 a
Sêmen diluído	82,43 b

^{a,b} Médias seguidas de letras distintas, nas colunas, diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade

Segundo Bedore (1999), a concentração elevada de crioprotetores pode provocar redução significativa na qualidade do sêmen de peixes, porém nossos dados mostram que o uso de crioprotetores intra e extracelulares não apresentou uma toxicidade relevante em nenhuma das combinações testadas.

Na tabela 4 estão apresentadas as médias das durações de motilidade, em segundos, do sêmen de curimba diluído, mostrando uma interação entre os crioprotetores intra e extracelulares, com destaque para uma maior duração de motilidade ($p < 0,05$) nos tratamentos utilizando lactose como crioprotetor extracelular, combinado com DMSO (77,59 segundos) ou metanol (80,35 segundos).

Miliorini et al. (2011) verificaram que as amostras de sêmen de curimba acrescidas de metanol e DMSO apresentaram durações de motilidade de 43 e 37 segundos, respectivamente, sendo inferiores às encontradas no presente estudo.

Tabela 4. Média da duração da motilidade (s) no sêmen de curimba diluído nas soluções crioprotetoras, antes do congelamento (n=19)

Crioprotetor extracelular (5%)	Crioprotetor Intracelular (8%)	
	DMSO	METANOL
GEMA DE OVO	59,88 bA	60,82 bA
LACTOSE	77,59 aA	80,35 aA

^{a,b} Médias seguidas de letras distintas, nas colunas, diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade; ^{A,B} Médias seguidas de letras distintas, nas linhas, diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade

Em ensaios de criotoxicidade, o período de estabilização entre o sêmen e as soluções é necessário e alguns estudos podem não avaliar o real efeito dos crioprotetores sobre as células espermáticas (CRUZ, 2001; RIBEIRO; GODINHO, 2003). No presente trabalho, esse período favoreceu a manutenção da qualidade seminal do curimba permitindo o congelamento das amostras com viabilidade assegurada. Esse período (10 minutos) é viável visto que os procedimentos que antecedem o congelamento de sêmen de peixes geralmente despendem pouco tempo.

3.3 Motilidade espermática no sêmen descongelado

Houve interação entre os crioprotetores intra e extracelulares com uma maior taxa de motilidade do sêmen ($p < 0,05$) nos tratamentos utilizando lactose como crioprotetor extracelular, combinado com DMSO (55,29%) ou metanol (57,35%) (Tabela 5). As soluções que continham gema de ovo promoveram menores taxas ($p < 0,05$) de motilidade independente do crioprotetor interno utilizado. Ribeiro e Godinho (2003) não consideram satisfatório o uso da gema de ovo na criopreservação de sêmen de *Leporinus macrocephalus*, atribuindo isso à falta de sinergia entre os crioprotetores.

Tabela 5. Média da taxa de motilidade (%) no sêmen de curimba, após o descongelamento (n=19)

Crioprotetor extracelular (5%)	Crioprotetor Intracelular (8%)	
	DMSO	METANOL
GEMA DE OVO	41,18 bB	50,10 bA
LACTOSE	55,29 aA	57,35 aA

^{a,b} Médias seguidas de letras distintas, nas colunas, diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade; ^{A,B} Médias seguidas de letras distintas, nas linhas, diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade

Murgas et al. (2007) utilizando DMSO e metanol na criopreservação de sêmen de curimba, obtiveram taxas de motilidade inferiores ao presente estudo porém a combinação de crioprotetores intra e extracelulares não foi utilizada, podendo ser a causa da menor taxa encontrada por eles.

Processos de congelamento e descongelamento podem danificar ou matar as células espermáticas, comprometendo a capacidade de fertilização (MARTINEZ; EKWALL, 1998). Nesse estudo, a taxa de motilidade após o descongelamento decresceu 48% quando comparada ao sêmen fresco e 38% em relação ao sêmen diluído (Tabela 6).

Tabela 6. Contraste para a taxa de motilidade (%) no sêmen fresco, diluído e descongelado

Sêmen	Média da taxa de motilidade (%)	
Fresco x Diluído	98,53 A	82,43 B
Diluído x Descongelado	82,43 A	50,98 B

^{A,B} Médias seguidas de letras distintas, nas linhas, diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade

Para a duração da motilidade espermática, os maiores valores ($p < 0,05$) foram encontrados nos tratamentos utilizando lactose combinada com DMSO (73,94 segundos) ou metanol (74,18 segundos) (Tabela 7).

Tabela 7. Média da duração da motilidade (s) no sêmen de curimba, após o descongelamento (n=19)

Crioprotetor extracelular (5%)	Crioprotetor Intracelular (8%)	
	DMSO	METANOL
GEMA DE OVO	59,65 bA	63,76 bA
LACTOSE	73,94 aA	74,18 aA

^{a,b} Médias seguidas de letras distintas, nas colunas, diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade; ^{A,B} Médias seguidas de letras distintas, nas linhas, diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade

Esses resultados foram maiores que os obtidos por Murgas et al. (2007) cujo estudo encontrou uma duração de motilidade de 18 segundos no sêmen descongelado utilizando metanol ou DMSO. Essa diferença pode ser explicada pelo uso dos crioprotetores extracelulares, os quais promoveram uma maior proteção à célula espermática.

O efeito positivo do metanol nas variáveis da motilidade pode estar relacionado com sua osmolaridade (HARVEY; KELLEY, 1984) e a rápida penetração intracelular (JAMIESON, 1991).

Em ensaios de criopreservação, Miliorini et al. (2011) verificaram que o uso da gema de ovo apresentou certa toxicidade para o sêmen de curimba e nossos dados também demonstram uma redução significativa na taxa e duração da motilidade espermática ($p < 0,05$) após o descongelamento quando se utilizou essa substância como crioprotetor externo.

Apesar da redução observada no tempo de motilidade do sêmen descongelado, 68 segundos (Tabela 8), é possível afirmar que o método utilizado no presente estudo foi bem sucedido quando comparado à criopreservação realizada por Murgas et al. (2007), onde a duração da motilidade foi de 18 segundos. Essa diferença provavelmente está relacionada ao uso dos crioprotetores externos combinados com o DMSO e metanol.

Tabela 8. Contraste para a duração da motilidade (s) no sêmen fresco, diluído e descongelado

Sêmen	Média da duração da motilidade (s)	
Fresco x Diluído	90,41 A	74,66 B
Diluído x Descongelado	74,66 A	67,88 A

^{A,B} Médias seguidas de letras distintas, nas linhas, diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade

A lactose combinada com o DMSO ou metanol pode ter exercido uma melhor proteção sobre as membranas do sistema mitocondrial, diminuindo os danos durante os processos de congelamento e descongelamento, promovendo assim, um maior tempo de batimento flagelar (MILIORINI, 2006).

A duração da motilidade em sêmen de peixes teleósteos de água doce é muito curta e varia entre as espécies (COSSON et al., 1999; LEGENDRE; LINHART; BILLARD, 1996). É mais prático partir do pressuposto de que a motilidade do sêmen *in natura* é aquela que melhor se adapta à biologia dos oócitos mesmo em condições mais controladas que o habitat natural. A variação de motilidade encontrada entre diferentes estudos pode ser explicada pelas condições individuais dos reprodutores e o período de coleta do sêmen.

3.4 Morfologia espermática após o descongelamento

Não foi verificada diferença significativa entre os tratamentos para a análise de morfologia espermática no sêmen descongelado ($p > 0,05$) (Tabela 9).

Tabela 9. Médias das alterações morfológicas (%) primárias e secundárias, no sêmen de curimba, após o descongelamento (n=19)

Tratamentos	Alterações morfológicas (%)		
	Primárias	Secundárias	Total
DMSO+gema	5,84	20,76	26,60
Metanol+gema	4,48	19,88	24,36
DMSO+lactose	4,96	20,96	25,92
Metanol+lactose	3,88	20,97	24,85

Além da motilidade, a morfologia espermática é um fator importante a ser considerado. Possivelmente, as anormalidades encontradas nesse trabalho (24 a 27%) estão associadas à diminuição da taxa de motilidade espermática.

Assim como no estudo realizado por Moraes et al. (2004), a principal alteração encontrada no presente ensaio foi cauda enrolada, seguida por cauda fraturada e cabeça isolada (Tabela 10). Essas anormalidades comprometem a motilidade progressiva dos espermatozoides, promovendo movimentos circulares e oscilatórios que reduzem a taxa de fertilização (KAVAMOTO et al., 1999).

Tabela 10. Média detalhada das alterações morfológicas (%) no sêmen de curimba, após o descongelamento (n=19)

	Tratamentos				
	T1	T2	T3	T4	P*
Alterações primárias					
Cabeça isolada	5,63	4,06	4,29	3,50	0,5013
Cauda dobrada	0,21	0,42	0,67	0,38	0,7568
Alterações secundárias					
Macrocefalia	1,88	2,19	2,18	1,63	0,4163
Microcefalia	1,44	1,25	2,06	1,75	0,5885
Cabeça degenerada	1,31	0,88	1,19	0,65	0,6692
PID	2,88	1,69	2,41	2,50	0,4035
Cauda fraturada	5,56	3,56	5,06	5,56	0,3144
Cauda enrolada	6,50	9,00	7,47	8,00	0,7243
Cauda degenerada	1,19	1,31	0,59	0,88	0,6697
TOTAL	26,60	24,36	25,92	24,85	0,7607

T1 = DMSO + gema de ovo; T2 = metanol + gema de ovo; T3 = DMSO + lactose; T4 = metanol + lactose. *Valores de probabilidade de acordo com o teste Kruskal-Wallis, ao nível de 5%.

As concentrações utilizadas para os crioprotetores intra e extracelulares promoveram um efeito protetor sobre as características bioquímicas dos espermatozoides, cuja proteção refletiu nos aspectos físicos das células após o descongelamento, permitindo a ocorrência de somente 25% das alterações totais.

A fecundação artificial em curimba utiliza uma proporção elevada entre espermatozoides e oócitos em um ambiente controlado, sendo provável que o percentual crítico de anormalidades espermáticas oscile em torno de 50% (MILIORINI et al., 2011).

Outras considerações podem ser feitas observando-se a Tabela 10 e levando-se em conta o segmento da célula espermática afetado.

a) Alterações na cabeça

Como comentado anteriormente, a alteração de cabeça mais frequente foi a cabeça isolada, cuja anormalidade pode ter sido em decorrência da estação reprodutiva ou do manejo.

Embora a macro e microcefalia tenham ocorrido em baixa escala, essas anormalidades são atribuídas, respectivamente, ao influxo ou efluxo de líquido para o citoplasma devido a um possível efeito osmótico da solução de formol citrato utilizada na fixação espermática. Esse efeito pode ser minimizado através do tamponamento dessa solução fixadora e correção da sua isotonicidade (MILIORINI et al., 2011).

b) Alterações na peça intermediária (PID)

Com relação à ocorrência de PID, todos os tratamentos apresentaram baixa porcentagem dessa alteração, não diferindo significativamente entre eles ($p > 0,05$). Segundo Miliorini et al. (2011) essa anormalidade, provavelmente, é consequência da desestabilização de membranas lipoprotéicas dos espermatozoides quando as células são submetidas ao congelamento.

c) Alterações de cauda

A alteração cauda enrolada apresentou a maior frequência entre todas as anormalidades espermáticas consideradas nesse estudo. Esse resultado não era esperado visto que os crioprotetores protegem a membrana citoplasmática do espermatozoide de curimba, evitando esse tipo de alteração morfológica.

Percentuais elevados de cauda fraturada e cabeça isolada podem estar relacionados ao processo de preparação de lâminas de esfregaços corados para a análise morfológica (MORAES et al., 2004).

4 CONCLUSÃO

Todas as soluções testadas nesse estudo foram efetivas para a criopreservação do sêmen de curimba e não apresentaram diferenças quanto às alterações morfológicas dos espermatozoides. Entretanto, a lactose se destacou como crioprotetor extracelular, apresentando maiores taxas e durações de motilidade para o sêmen descongelado, independente da sua combinação com metanol ou DMSO.

REFERÊNCIAS

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

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

COSSON, J. et al. Ionic factors controlling the motility of fish sperm. In: GAGNON, C. (Ed.). **The male gamete: from basic science to clinical applications: volume 16**. Vienna: Cache River, 1999. p. 162–186.

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

FRANCISCATTO, R. T. et al. Qualidade do sêmen de curimbatá (*Prochilodus lineatus*) e taxa de fertilidade após resfriamento a 4°C. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 26, n. 3, p. 213-215, 2002.

HARVEY, B.; KELLEY, R. N. Chilled storage of *Sarotherodon mossambicus* milt. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 36, n. 1-2, p. 85–95, Jan. 1984.

JAMIESON, B. G. M. **Fish evolution and systematics: evidence from spermatozoa**. Cambridge: Cambridge University Press, 1991. p. 231–244.

KAVAMOTO, E. T. et al. Anormalidades morfológicas nos espermatozoides do Curimatá, *Prochilodus scrofa* (Steidachner, 1881) (osteichthyes, characiformes, prochilodontidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 25, p. 61-66, 1999.

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

LEGENDRE, M.; LINHART, O.; BILLARD, R. Spawning and management of gametes, fertilized eggs and embryos in Siluroidei. **Aquatic Living Resources**, Montrouge, v. 9, p. 59-80, 1996.

MARIA, N. 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, p. 298–306, Sept. 2006.

MARTINEZ, H. R.; EKWALL, H. **Electron microscopy in the assessment of cryopreserved spermatozoa viability**. London: The Americas Microscopy and Analysis, 1998.

MARTINEZ-PARAMO, S. et al. Incorporation of ascorbic acid and α -tocopherol to the extender media to enhance antioxidant system of cryopreserved sea bass sperm. **Theriogenology**, Stoneham, v. 77, n. 6, p. 1129-1136, Apr. 2012.

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

MILIORINI, A. B. et al. A morphological classification proposal for curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm damages after cryopreservation. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 42, n. 2, p. 177-187, Jan. 2011.

MORAES, G. V. et al. Ação de diferentes indutores reprodutivos hormonais no aparecimento de anormalidades morfológicas em espermatozoides de piavuçu (*Leporinus macrocephalus*), curimatá (*Prochilodus lineatus*) e carpa comum (*Cyprinus carpio*). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 109-116, 2004.

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, p. 526-531, 2007.

NAVARRO, R. D. et al. Uso de extrato bruto de hipófise de rã touro na desova de curimbatá (*Prochilodus affinis*). **Zootecnia Tropical**, Maracay, v. 25, p. 143-147, 2007.

PAULINO, M. S. et al. Anormalidades espermáticas de *Piaractus mesopotamicus* após descongelamento utilizando diferentes metodologias. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 64, n. 6, p. 1591-1596, 2012.

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

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

**CAPÍTULO 3 Vitrificação de sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*):
toxicidade do metanol sobre as células espermáticas**

RESUMO

A vitrificação pode ser utilizada para preservar amostras em campo e oferece uma alternativa à criopreservação convencional, embora não tenha sido estudada sistematicamente para as células espermáticas de peixes. O presente trabalho foi conduzido durante os meses de janeiro e fevereiro de 2013 e teve como objetivo geral desenvolver um protocolo simplificado para a vitrificação de sêmen de curimba utilizando diferentes concentrações de metanol. A toxicidade aguda desse crioprotetor interno foi testada ao nível de 10 e 20% e comparou-se à vitrificação com e sem metanol na solução diluidora. Para avaliar os danos causados pela técnica da vitrificação, mensurou-se a motilidade espermática e as alterações morfológicas nos espermatozoides após o descongelamento das amostras. A diluição do sêmen em soluções crioprotetoras reduziu significativamente a motilidade espermática já no momento da diluição ($p < 0,0001$). Quando comparadas à solução contendo apenas BTS, a presença do metanol no meio reduziu 37% a taxa de motilidade e 25% a duração da mesma. Após o descongelamento, não houve motilidade espermática em nenhum dos tratamentos. A análise morfológica mostrou uma alta incidência de cauda enrolada nas amostras que foram vitrificadas na presença do metanol, mostrando um indício de choque osmótico causado por essa substância. Esses dados mostram que o metanol, nas proporções utilizadas, não é indicado como solução crioprotetora no processo de vitrificação do sêmen de curimba e a análise morfológica, sozinha, não consegue explicar as reais causas do insucesso dessa técnica para essa espécie.

Palavras-chave: Crioprotetor intracelular. Avaliações espermáticas. Choque osmótico.

ABSTRACT

Vitrification can be used to preserve samples in the field and offers an alternative to conventional cryopreservation, although it has not been systematically studied for fish sperm cells. This work was conducted during the months of January and February of 2013 and had the main objective of developing a simplified protocol for the vitrification of curimba semen using different concentrations of methanol. The acute toxicity of this intracellular cryoprotectant was tested at 10 and 20% and we compared vitrifications with and without methanol in the diluting solution. To assess the damage caused by this technique, we measured sperm motility and morphological changes in sperm after thawing. The dilution of semen in cryoprotectant solutions significantly reduced sperm motility at the time of dilution ($p < 0.0001$). When compared to the solution containing only BTS, the presence of methanol reduced motility rate in 37% and motility duration in 25%. After thawing, sperm motility was not found in any of the treatments. Morphological analysis showed a high incidence of curled tail in the samples which were vitrified in the presence of methanol, indicating osmotic shock caused by this substance. These data demonstrate that methanol in the proportions used in this work is not indicated as cryoprotectant solution in the vitrification process of curimba semen and that morphological analysis alone does not explain the real causes of failure of the technique for this species.

Key-words: Intracellular cryoprotectant. Sperm evaluations. Osmotic shock.

1 INTRODUÇÃO

A curimba (*Prochilodus lineatus*) é uma espécie nativa da bacia do Rio Grande e apresenta alta produtividade quando criada comercialmente. Além da importância econômica, o declínio de suas populações selvagens também impulsionou o estudo de novas técnicas capazes de preservar o material genético dessa espécie.

A vitrificação é uma alternativa promissora para a criopreservação padrão e atualmente é utilizada em espermatozoides, ovócitos, embriões, células-tronco e órgãos de mamíferos, incluindo seres humanos, macacos e bovinos (BAGCHI; WOODS; CRITSER, 2008; LIEBERMANN; TUCKER, 2002; SCOTT; BAYNES, 1980; VIVEIROS; GODINHO, 2009; DONG; CORREA; VANDEVOORT, 2009). Essa técnica, além de rápida, não requer equipamentos caros e pode ser utilizada na preservação de amostras no campo.

A vitrificação consiste na imersão direta, do material a ser preservado, em nitrogênio líquido (-196 °C) objetivando armazenar o germoplasma de reprodutores e espécimes de alto valor comercial ou biológico (HARVEY, 1998; KOPEIKA; KOPEIKA, 2008).

Apesar das vantagens dessa técnica, esse método não é rotineiro em programas de fertilização devido a diversos fatores que limitam a utilização do sêmen vitrificado (BUTTS et al., 2011). A exposição da célula espermática a condições fisiologicamente inadequadas acarreta em uma significativa perda na qualidade seminal em consequência de estresse osmótico, alterações bioquímicas no plasma seminal, danos oxidativos, desidratação e cristalização celular (KOPEIKA; KOPEIKA, 2008). Esses eventos afetam negativamente a morfologia, a motilidade e a viabilidade espermática (BUTTS et al., 2011; MARTÍNEZ-PARÁMO et al., 2012).

Desta forma, para desenvolver um protocolo de vitrificação, o primeiro passo é identificar soluções diluidoras adequadas e verificar a toxicidade de agentes crioprotetores.

Até o presente momento, poucos estudos foram publicados com espermatozoides de peixes (MERINO et al., 2011a; MERINO et al., 2011b; CUERVAS-URIBE et al., 2011; FIGUEROA et al., 2013) e não há relatos de vitrificação de sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*). Sendo assim, o objetivo geral desse estudo foi o desenvolvimento de um protocolo simplificado para a vitrificação de sêmen dessa espécie.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local e seleção de reprodutores

O estudo foi conduzido durante o período de reprodução (piracema) nos meses de janeiro e fevereiro de 2013, no município de Itutinga, localizado no sul do estado de Minas Gerais. A temperatura média local foi de 28°C.

Foram utilizados 23 machos de curimba ao longo do experimento, com pesos corporais entre 700 a 2400 gramas. Os animais foram mantidos em viveiros de terra na Estação Ambiental de Itutinga, da Companhia Energética de Minas Gerais (EAI-CEMIG). Os reprodutores foram alimentados *ad libitum*, três vezes ao dia, com ração comercial extrusada de oito milímetros de diâmetro com 28% de proteína bruta, entre os meses de março e agosto de 2012. Entre os meses de setembro e fevereiro de 2013 (período reprodutivo), os animais receberam ração extrusada de mesmo diâmetro, contendo 32% de proteína bruta.

Com o auxílio de redes de arrasto, foram selecionados somente os reprodutores que liberaram sêmen sob delicada massagem sobre a parede da cavidade celomática. Estes foram transportados para aquários de alvenaria de 2000 litros e mantidos a uma densidade de seis animais por aquário. O nível de oxigênio foi monitorado e a temperatura da água mantida em torno de 28°C.

2.2 Indução hormonal

Para ser submetido ao tratamento hormonal com extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC), cada reprodutor foi pesado e recebeu duas doses para espermição. Estas consistiram em injeções intramusculares de 0,5 e 5,0 mg de EBHC kg⁻¹ de peso corporal, próximo à base da nadadeira dorsal. Houve um

intervalo de 12 horas entre as aplicações e a coleta de sêmen ocorreu em torno de 7 horas após a última dose de EBHC.

2.3 Coleta e avaliação do sêmen

Antes da coleta, a papila urogenital foi limpa com papel toalha para evitar a contaminação e ativação prematura das células espermáticas. Em seguida, coletou-se o sêmen em tubos de ensaio estéreis por meio de leve massagem na parede celomática no sentido crânio-caudal e as amostras foram mantidas em temperatura ambiente (23°C).

A taxa e duração da motilidade espermática foram mensuradas no sêmen *in natura* depositando-se uma alíquota de 10µL de sêmen de cada animal em uma lâmina histológica de vidro e homogeneizada com 40µL de água destilada. A motilidade foi observada em microscópio óptico de luz, sob aumento de 100 dioptrias e estimada em porcentagem média desde a homogeneização com água destilada até que somente 10% dos espermatozoides se encontrassem móveis.

2.4 Avaliação da toxicidade do metanol antes da vitrificação

Para avaliar a toxicidade do metanol, utilizou-se a solução diluidora constituída de BTS - *Belltsville Thawing Solution* (79,9g de glicose; 12,71g de citrato de sódio; 2,65g de ácido etilenodiaminotetracético; 2,65g de carbonato ácido de sódio; 159g de cloreto de potássio e 0,50g de sulfato de gentamicina) na concentração final de 5% (massa:volume - m:v).

Após a análise inicial, 200µL de sêmen *in natura* dos 23 reprodutores foi diluído lento e gradativamente em três soluções (Tabela 1), na proporção de 1:1 (sêmen:solução). A avaliação foi feita no sêmen diluído sem crioprotetor e nas concentrações de 10 e 20% de metanol (volume:volume - v:v).

Tabela 1. Soluções utilizadas como tratamentos para o sêmen de curimba

Tratamento	BTS* (% m :v)	Crioprotetor	Concentração (% v:v)
T1	5,0	---	---
T2	5,0	Metanol	10
T3	5,0	Metanol	20

* *Belltsville Thawing Solution*, Minitub do Brasil – LTDA

Todas as soluções foram preparadas com uma hora de antecedência da diluição para que houvesse a estabilização dos crioprotetores e término das reações exotérmicas prejudiciais às células espermáticas, e foram mantidas a 4°C até o momento da utilização.

Uma parte do sêmen diluído foi vitrificada, enquanto que a fração restante foi deixada em repouso por 5 minutos à 4°C para averiguação da toxicidade das soluções através da estimativa da motilidade espermática, pela ativação dos espermatozoides com água destilada.

2.5 Vitrificação e descongelamento do sêmen

Imediatamente após a diluição do sêmen, 20µL de cada amostra foram envasados em palhetas de 0,25 ml (três palhetas por tratamento) que por sua vez, foram vedadas com massa cirúrgica estéril. Em seguida, as palhetas foram imersas diretamente em nitrogênio líquido e permaneceram por 30 dias. O descongelamento ocorreu no Biotério Central da Universidade Federal de Lavras (UFLA), localizada no sul de Minas Gerais.

As palhetas foram descongeladas individualmente por imersão em água (banho-maria) a 40°C durante 10 segundos (CUERVAS-URIBE et al., 2011), sendo agitadas durante todo o procedimento. Estas foram enxugadas com toalha

de papel e a extremidade da palheta foi cortada para descartar a massa cirúrgica. Uma alíquota de 10 μ L de sêmen foi depositada sobre uma lâmina histológica previamente focalizada em microscópio óptico sob o aumento de 100 dioptrias. Após a confirmação da ausência de ativação, a amostra foi homogeneizada com 40 μ L de água destilada para que as células espermáticas fossem ativadas.

A avaliação quantitativa da motilidade foi estimada em função da porcentagem média dos espermatozoides móveis e a duração (em segundos) foi aferida desde a homogeneização com a água destilada até que somente 10% das células se encontrassem móveis.

2.6 Análise da morfologia espermática

Foram utilizadas amostras de sêmen descongelado dos 23 animais e as análises morfológicas foram realizadas em microscópio óptico de luz sob o aumento de 1000 dioptrias.

Uma alíquota de 10 μ L de sêmen descongelado foi diluída em 990 μ L de solução de formol-citrato e uma fração de 10 μ L dessa amostra foi depositada em uma lâmina histológica juntamente com 10 μ L de corante Rosa Bengala 1%. Após a homogeneização, foi realizado um delicado esfregaço e a morfopatologia de 100 células espermáticas foi observada ao longo de toda a lâmina conforme esquematizado na Figura 1.

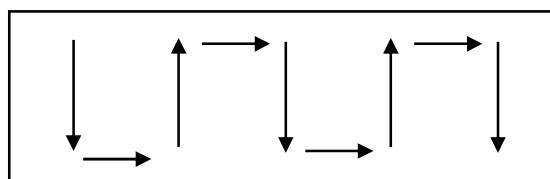


Figura 1. Sequência de campos observados durante a análise morfológica do sêmen de curimba. As setas indicam o sentido da avaliação

Foram observadas anormalidades na cabeça, peça intermediária e cauda, conforme resumidas na Tabela 2 (MILIORINI, 2006).

Tabela 2. Características das alterações morfológicas encontradas no sêmen de curimba

Alterações primárias	Características
Cabeça isolada normal	Cabeça sem qualquer alteração, porém sem cauda
Cauda dobrada	Dobradura sem envolver a si mesma ou a cabeça
Alterações secundárias	Características
Macrocefalia	Cabeça gigante, com contornos e formas anormais
Microcefalia	Cabeça reduzida, com contornos e formas anormais
Cabeça degenerada	Cabeça com contorno irregular
PID	Alterações na espessura, densidade e comprimento
Cauda fraturada	Células com fratura e retenção de cauda
Cauda enrolada	Dobradura sobre si mesma ou sobre a cabeça
Cauda degenerada	Descontinuidade a partir da peça intermediária

Fonte: MILIORINI, 2006 (adaptado)

Quando os espermatozoides apresentaram alterações primárias e secundárias ao mesmo tempo, foram consideradas as secundárias e quando dois tipos da mesma categoria foram encontrados na mesma célula, aquela de maior implicação sobre a fertilização foi considerada (Tabela 3).

Tabela 3. Hierarquia das alterações espermáticas encontradas no sêmen de curimba

Tipo de anormalidade	Ordem de sobreposição das alterações	
Alterações secundárias	1º: Cabeça degenerada	4º: Cauda fraturada
	2º: PID	5º: Cauda enrolada
	3º: Cauda degenerada	6º: Macro e microcefalia
Alterações primárias	1º: Cabeça isolada normal	2º Cauda dobrada

Fonte: Miliorini, 2006 (adaptado)

2.7 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado. Foi realizada a análise de normalidade para todas as variáveis dependentes, através do teste de Shapiro-Wilk. A variável “taxa de motilidade” seguiu distribuição normal. A variável “tempo de motilidade” foi transformada em $\log_{10}x$ para sua normalização, sendo as médias posteriormente convertidas em seu antilogaritmo para apresentação dos resultados. Os dados coletados foram submetidos à análise de variância e teste F. Quando detectadas diferenças entre as médias, foi realizado o teste de Tukey.

As análises foram efetuadas com auxílio do procedimento "general linear model" (GLM). Para as demais variáveis, devido à distribuição não ter se comportado de forma normal, foi realizado análise de variância para médias não paramétricas através do teste de Kruskal-Wallis. Foi realizado teste de regressão em função dos níveis de inclusão de metanol na solução crioprotetora utilizada na vitrificação do sêmen.

O programa estatístico utilizado foi o SAS versão 9.0 (SAS, 2002) e foi adotado 5% como o nível de significância máximo das análises.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação da toxicidade do metanol antes da vitrificação

Os valores médios de motilidade das amostras de sêmen, submetidas à análise de toxicidade antes da vitrificação, estão representados na Tabela 4.

Tabela 4. Valores médios para a taxa e duração da motilidade no sêmen de curimba, antes da vitrificação (n=23)

Tratamentos	Taxa de Motilidade (%)	Duração da Motilidade (s)
Sêmen fresco	98,70 a	66,79 a
Diluído em BTS (T1)	84,78 b	55,17 b
10% de metanol (T2)	64,35 c	45,96 c
20% de metanol (T3)	53,04 d	40,90 c
P*	<0,0001	<0,0001
CV**	13,08%	4,78%

^{a,b,c,d} Médias seguidas de letras distintas, nas colunas, diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. *Probabilidade entre tratamentos (5%); **Coeficiente de variação

As mensurações realizadas 5 minutos após a diluição do sêmen mostraram uma diferença significativa na taxa e duração da motilidade nos tratamentos quando comparadas ao sêmen fresco ($p < 0,0001$), apresentando uma queda em ambas as variáveis, já no momento da diluição do sêmen nas diferentes soluções crioprotetoras.

Os resultados encontrados para a taxa de motilidade mostraram que a adição do crioprotetor nas soluções reduziu significativamente a porcentagem de células espermáticas móveis e a duração desta motilidade, quando comparada à diluição em BTS, mostrando uma queda de 37% e 25%, respectivamente.

Em estudo de toxicidade com o sêmen de curimba, Miliorini et al. (2011) encontraram resultados semelhantes ao utilizarem metanol a 10% (v:v) e obtiveram 43 segundos de duração de motilidade, embora a porcentagem de células espermáticas móveis tenha sido mais elevada (88%).

Em geral, a técnica utilizada para realizar a vitrificação não requer um tempo de equilíbrio com os crioprotetores antes de iniciar o processo, a qual difere dos protocolos de criopreservação tradicional em que a desidratação e a permeação dos crioprotetores ocorrem antes de iniciar o resfriamento.

Essa técnica pode ser melhorada com o uso de altas concentrações de crioprotetor (40-60%) (LEIBO, 1989; LEIBO; SONGSASEN, 2002; SHAW; JONES, 2003) embora a maioria desses agentes tenda a ter efeitos tóxicos e hipertônicos quando utilizados em concentrações eficazes para uma vitrificação de sucesso (YAVIN; ARAV, 2007).

A toxicidade de um crioprotetor está relacionada com a sua concentração, duração e temperatura de exposição. Altas concentrações de crioprotetor utilizadas em vitrificação requerem uma avaliação de toxicidade aguda e tempos curtos de exposição (CUERVAS-URIBE et al., 2011).

Em estudos realizados com o bagre do canal, Cuervas-Uribe et al. (2011) não encontraram motilidade espermática no sêmen diluído em soluções com crioprotetores de concentração acima de 30%. E quando utilizaram o metanol a 10 e 20% durante 5 minutos, obtiveram aproximadamente 50 e 33% de motilidade, respectivamente, enquanto que o presente estudo encontrou 64 e 53% de células móveis utilizando as mesmas concentrações de metanol.

De acordo com Cuervas-Uribe et al. (2011), uma possível razão para o encontro de motilidade espermática em altas concentrações de metanol é a produção de menor dano osmótico causado por esse crioprotetor quando comparado a outros.

Em geral, os espermatozoides de peixes de água doce tornam-se móveis em resposta a uma redução da pressão osmótica (hipotônica ao plasma sanguíneo) e Inoda e Morisawa (1987) observaram que o sêmen de peixes dulcícolas apresenta osmolaridade em torno de 250 mOsmol. Portanto, o metanol a 10 e 20% (v:v) pode ser utilizado em soluções crioprotetoras por não ser capaz de ativar a motilidade espermática precocemente, embora apresente uma certa toxicidade às células espermáticas quando utilizado em altas concentrações.

3.2 Motilidade espermática no sêmen descongelado

Amostras de cada tratamento foram descongeladas e não houve motilidade espermática em nenhuma delas. Todas as células permaneceram imóveis durante 60 segundos de observação.

Em peixes, os fatores mais importantes para determinar a ativação espermática e a duração da motilidade são a osmolaridade, a composição iônica e o pH do plasma seminal (HAMAMAH; GATTI, 1998; MORISAWA; SUZUKI, 1980). Entretanto, a mudança da osmolaridade é o fator que mais influencia na ativação dos espermatozoides (BILLARD et al., 1995; GWO, 1995).

Em estudos de vitrificação realizados com sêmen de bagre africano, Steyn et al. (1985) não encontraram motilidade espermática após o descongelamento utilizando 5% de metanol (v:v) nas soluções crioprotetoras. O mesmo ocorreu quando Gwo et al. (2005) testaram diferentes concentrações de metanol (10, 20 e 30%) para vitrificar sêmen de atum rabilho do Pacífico.

Embora não tenha havido motilidade espermática nesses estudos, Merino et al. (2011b) encontraram 86% de células móveis no sêmen descongelado de truta arco-íris, submetido à vitrificação sem o uso de

crioprotetores, reforçando a hipótese de que o sucesso dos protocolos é dependente da espécie e que a toxicidade de crioprotetores pode ser letal em alguns casos (STEYN et al., 1985).

O sêmen dos peixes é composto principalmente por minerais e contém baixa concentração de açúcares (CIERESZKO et al., 2008), o que não permite uma proteção natural à célula espermática e provoca danos às mesmas. Com base nos resultados obtidos nesse estudo, é provável que a membrana plasmática tenha sido danificada pela formação de cristais de gelo (THIRUMALA et al., 2005) ou por mudanças nas propriedades físicas do ambiente extracelular (MORRIS, 2006).

A permeabilidade e a toxicidade dos crioprotetores permeáveis são importantes propriedades que desempenham um papel de liderança na criopreservação (GILMORE et al., 1997), porém são estreitamente relacionadas ao dano osmótico devido à saturação celular com crioprotetores antes de resfriamento e a remoção de células após o descongelamento (MERINO et al., 2011b).

Os estudos têm demonstrado que as técnicas de congelamento podem causar grandes danos físico-químicos nas membranas extra e intracelulares dos espermatozoides devido ao aumento na peroxidação lipídica durante a saturação com crioprotetores, congelamento ou após o descongelamento (GAO et al., 1997; MOSSAD et al., 1994). A peroxidação lipídica leva a uma diminuição da motilidade espermática e atividades mitocondriais (MOSSAD et al., 1994; O'CONNELL; MCCLURE; LEWIS, 2002).

Para todas as espécies, a função mitocondrial normal é um fator-chave na fertilidade dos espermatozoides e para os peixes ela é especialmente crítica, pois a alta motilidade normalmente tem duração de apenas 30 segundos a poucos minutos, e pode ser reduzida pelos danos causados à mitocôndria durante a criopreservação (MAISSE, 1996).

O método da vitrificação utiliza crioprotetores altamente concentrados que podem ser letais aos espermatozoides devido ao choque osmótico. A vitrificação bem sucedida de espermatozoides humanos foi conseguida sem a utilização de agentes crioprotetores permeáveis (ISACHENKO et al., 2005, 2008).

Merino et al. (2011b) obtiveram resultados satisfatórios na vitrificação de células espermáticas de truta arco-íris, ao utilizarem parte do plasma seminal na solução crioprotetora. Porém, a técnica consistiu em colocar as células em contato direto com o nitrogênio líquido sem o uso de palhetas ou qualquer material protetor. Essa é uma grande desvantagem, pois qualquer tecnologia em biologia reprodutiva deve garantir a proteção integral das células contra contaminação por microorganismos capazes de sobreviver à temperatura do nitrogênio líquido (GARDNER, 1998; BIELANSKI et al., 2003; TEDDER, et al., 1995).

3.3 Morfologia espermática no sêmen descongelado

Embora a motilidade espermática tenha sido nula em todos os tratamentos, seguiu-se com as análises de morfologia para constatar os danos à célula e o grau dos mesmos.

Em virtude do pequeno número de ocorrências de gotas citoplasmáticas, distal e proximal, essas alterações foram desconsideradas na análise dos dados.

As taxas de alterações morfológicas, primárias e secundárias encontradas no sêmen *in natura* foram 3,75 e 4,42%, respectivamente. A porcentagem média (7,87%) foi semelhante à encontrada por Paulino (2009) e Kavamoto et al. (1999), os quais constataram, respectivamente, uma ocorrência de 7,45 e 7,22% de células anormais no sêmen *in natura* de curimba, ao passo que Murgas et al. (1998) observaram 40,2% de anormalidades espermáticas.

Essas variações indicam que as análises morfológicas dos espermatozoides de peixes também refletem as variações genéticas e ambientais individuais.

Foi verificada diferença significativa ($p < 0,0001$) entre os tratamentos sobre as alterações morfológicas, primárias e secundárias (Tabela 5). Os dados indicam que houve uma menor ocorrência quando foi utilizado apenas o BTS sem a presença de crioprotetores. A maior taxa de anormalidade espermática foi encontrada no tratamento com 20% de metanol.

A adição de crioprotetores modifica o meio externo à célula, podendo resultar em um maior enrolamento de cauda quando os espermatozoides são submetidos ao resfriamento e descongelamento (AGHA-RAHIMI et al., 2013). É provável que a concentração elevada de metanol utilizada no recente trabalho tenha provocado um choque osmótico nas células, pois houve uma alta incidência dessa anormalidade espermática nos tratamentos que utilizaram o crioprotetor.

Segundo Morris et al. (2012), o gelo intracelular não pode ser formado no interior das células espermáticas em nenhuma taxa de resfriamento ou mesmo durante o processo de descongelamento.

O presente trabalho parte do princípio de que o choque osmótico causado pelas altas concentrações de metanol tenha sido a principal razão da imobilidade espermática, visto que a menor taxa de anormalidades foi encontrada no sêmen contendo apenas BTS. Por outro lado, a elevada incidência de cauda fraturada e cabeça isolada sugere que possa ter ocorrido falha técnica durante a realização do protocolo de vitrificação, e a não diferença significativa entre os tratamentos para essa anormalidade reforça essa hipótese. A ativação precoce dos espermatozoides também é uma possibilidade a ser considerada já que a incidência total de anormalidades não explica com precisão a anulação da motilidade.

Tabela 5. Médias das alterações morfológicas (%) do sêmen de curimba, após o descongelamento (n=23)

Alterações primárias	Tratamentos			
	T1	T2	T3	P*
Cabeça isolada	7,93	7,61	8,17	0,5243
Cauda dobrada	3,39	3,27	3,43	0,9483
Alterações secundárias	T1	T2	T3	P*
Macrocefalia	1,48 b	3,65 a	4,57 a	<0,0001
Microcefalia	1,17 b	2,00 a	3,26 a	<0,0001
Cabeça degenerada	2,17 b	4,13 a	5,52 a	<0,0001
PID	2,87 b	2,65 ab	4,00 a	0,0100
Cauda fraturada	5,52	7,70	6,65	0,3591
Cauda enrolada	3,09 b	8,22 a	11,00 a	0,0002
Cauda degenerada	2,96 b	4,57 a	3,87 ab	0,0265
TOTAL	30,58 c	43,80 b	51,47 a	<0,0001

T1 = BTS; T2 = BTS + 10% metanol; T3 = BTS + 20% metanol.

^{a,b,c} Médias seguidas de letras distintas, nas linhas, diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis, ao nível de 5% de probabilidade. *Probabilidade entre tratamentos (5%)

Em estudos com sêmen de humanos, Satirapod et al. (2012) observaram um aumento significativo nos danos do DNA de células submetidas à vitrificação onde 59% tiveram o DNA fragmentado, e Zribi et al. (2012) também reportaram uma alta oxidação dessa molécula. Esses danos estão diretamente relacionados a injúrias mecânicas causadas pela formação de cristais de gelo e por estresse oxidativo (SAID; GAGLANI; AGARWAL, 2010; ZRIBI et al., 2012).

4 CONCLUSÃO

As soluções testadas nesse estudo não foram efetivas para a vitrificação do sêmen de curimba visto que não houve motilidade espermática após o descongelamento das amostras e a análise morfológica, sozinha, não consegue explicar as causas do insucesso da técnica para a espécie estudada.

REFERÊNCIAS

AGHA-RAHIMI, A. et al. Vitrification is not superior to rapid freezing of normozoospermic spermatozoa: effects on sperm parameters, DNA fragmentation and hyaluronan binding. **Reproductive BioMedicine Online**, Amsterdam, v. 28, n. 3, p. 352-358, Mar. 2013.

BAGCHI, A.; WOODS, E. J.; CRITSER, J. K. Cryopreservation and vitrification: recent advances in fertility preservation technologies. **Expert Review of Medical Devices**, London, v. 5, n. 3, p. 359–370, May 2008.

BIELANSKI, A. et al. Microbial contamination of embryos and semen during long term banking in liquid nitrogen. **Cryobiology**, New York, v. 46, n. 2, p. 146–152, Apr. 2003.

BILLARD, R. et al. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 129, n. 1-4, p. 95-112, Jan. 1995.

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

CIERESZKO, A. Chemical composition of seminal plasma and its physiological relationship with sperm motility, fertilizing capacity and cryopreservation success in fish. In: *Spermatology*, F. (Ed.). **Alpha science international**. Oxford: United Kingdom, 2008. p. 215–240.

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

DONG, Q.; CORREA, L. M.; VANDEVOORT, C. A. Rhesus monkey sperm cryopreservation with TEST: yolk extender in the absence of permeable cryoprotectant. **Cryobiology**, New York, v. 58, n. 1, p. 20–27, Feb. 2009.

FIGUEROA, E. et al. Spermatozoa vitrification of sex-reversed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effect of seminal plasma on physiological parameters. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 372-375, p. 119–126, Jan. 2013.

GAO, D.; MAZUR, P.; CRITSER, J. Fundamental cryobiology of mammalian spermatozoa. In: KAROW, A. M.; CRITSER, J. K. (Ed.). **Reproductive tissue banking**. New York: Academic Press, 1997. p. 263–328.

GARDNER, D. K. Development of serum-free media for the culture and transfer of human blastocysts. **Human Reproduction**, Oxford, v. 13, suppl. 4, p. 218–225, Dec. 1998.

GILMORE, J. A. et al. Determination of optimal cryoprotectants and procedures for their addition and removal from human spermatozoa. **Human Reproduction**, Oxford, v. 12, n. 1, p. 112–118, Jan. 1997.

GWO, H. H. et al. Development of cryopreservation procedures for semen of Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 249, n. 1-4, p. 205–211, Sept. 2005.

GWO, J.-C. Ultrastructural study of osmolality effect on sperm of three marine teleosts. In: GOETZ, F.W.; THOMAS, P. (Ed.). **Proceedings of the fish international symposium on the reproductive physiology of fish**. Texas: University of Texas at Austin, 1995.

HAMAMAH, S.; GATTI, J. L. Role of the ionic environment and internal pH on sperm activity. **Human Reproduction**, Oxford, v. 13, n. 4, p. 20-30, 1998.

HARVEY, B. An overview of action before extinction. In: HARVEY, B. et al. (Ed.). **An International conference on conservation of fish genetic diversity**. Vancouver: World Fisheries, 1998. p. 1–18.

INODA, T.; MORISAWA, M. Effect of osmolality on the initiation of sperm motility in *Xenopus laevis*. **Comparative Biochememistry and Physiology**, London, v. 88, n. 3, p. 539-545, 1987.

ISACHENKO, E. et al. Acrosomal status and mitochondrial activity of human spermatozoa vitrified with sucrose. **Reproduction**, Cambridge, v. 136, n. 2, p. 167–173, Aug. 2008.

ISACHENKO, V. et al. Clean technique for cryoprotectant-free vitrification of human spermatozoa. **Reproductive Biomedicine Online**, Cambridge, v. 10, n. 3, p. 350–354, Mar. 2005.

KAVAMOTO, E. T. et al. Anormalidades morfológicas nos espermatozoides do Curimatá, *Prochilodus scrofa* (Steidachner, 1881) (osteichthyes, characiformes, prochilodontidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 25, p. 61-66, 1999.

KOPEIKA, E., KOPEIKA, J. Variability of sperm quality after cryopreservation in fish. In: ALAVI, S. M. et al. (Ed.). **Fish spermatology**. Oxford: Alpha Science International, 2008. p. 347–396.

LEIBO, S. P. Equilibrium and nonequilibrium cryopreservation of embryos. **Theriogenology**, Stoneham, v. 31, n. 1, p. 85–93, Jan. 1989.

LEIBO, S. P.; SONGSASEN, N. Cryopreservation of gametes and embryos of nondomestic species. **Theriogenology**, Stoneham, v. 57, n. 1, p. 303–326, Jan. 2002.

LIEBERMANN, J.; TUCKER, M. J. Effect of carrier system on the yield of human oocytes and embryos as assessed by survival and developmental potential after vitrification. **Reproduction**, Cambridge, v. 124, n. 4, p. 483–489, Oct. 2002.

MAISSE, G. Cryopreservation of fish semen: a review. In: PROCEEDINGS OF REFRIGERATION AND AQUACULTURE. Bordeaux: IIR, 1996. p. 443–466.

MARTÍNEZ-PÁRAMO, S. et al. Incorporation of ascorbic acid and α -tocopherol to the extender media to enhance antioxidant system of cryopreserved sea bass sperm. **Theriogenology**, Stoneham, v. 77, n. 6, p. 1129-1136, Apr. 2012.

MERINO, O. et al. Cryoprotectant-free vitrification of fish (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa: first report. **Andrologia**, Berlin, v. 44, suppl. 1, p. 390-395, May 2011b.

MERINO, O. et al. Fish (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa cryoprotectantfree vitrification: stability of mitochondrion as criterion of effectiveness. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 124, n. 1-2, p. 125–131, Mar. 2011a.

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

MILIORINI, A. B. et al. A morphological classification proposal for curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm damages after cryopreservation. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 42, n. 2, p. 177-187, Jan. 2011.

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

MORRIS, G. et al. Freezing injury: the special case of the sperm cell. **Cryobiology**, New York, v. 64, n. 2, p. 71–80, Apr. 2012.

MORRIS, G. J. Rapidly cooled human sperm: no evidence of intracellular ice formation. **Human Reproduction**, Oxford, v. 21, n. 8, p. 2075–2083, Aug. 2006.

MOSSAD, H. et al. Impact of cryopreservation on spermatozoa from infertile men: implication for artificial insemination. **Archives of Andrology**, New York, v. 33, n. 1, p. 51–57, 1994.

MURGAS, L. D. S. et al. Características seminais de curimbas (*Prochilodus lineatus*) capturadas no Rio Grande e Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: CONGRESSO SULAMERICANO DE AQUICULTURA, 1., 1998, Recife. **Anais...** Recife: [s.n], 1998. p. 274.

O'CONNELL, M.; MCCLURE, N.; LEWIS, S. E. M. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. **Human Reproduction**, Oxford, v. 17, n. 1, p. 704–709, 2002.

PAULINO, M. S. **Criopreservação do sêmen de Curimba (*Prochilodus lineatus*): técnicas para o descongelamento**. 2009. 94 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009. Disponível em: <http://www.livrosgratis.com.br/arquivos_livros/cp118771.pdf>. Acesso em: 09 ago. 2013.

SAID, T. M.; GAGLANI, A.; AGARWAL, A. Implication of apoptosis in sperm cryoinjury. **Reproductive Biomedicine Online**, Cambridge, v. 21, n. 4, p. 456–462, Oct. 2010.

SATIRAPOD, C. et al. Comparison of cryopreserved human sperm from solid surface vitrification and standard vapor freezing method: on motility, morphology, vitality and DNA integrity. **Andrologia**, Berlin, v. 44, supl. 1, p. 786–790, May 2012.

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

SHAW, J. M.; JONES, G. M. Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos. **Human Reproduction**, Oxford, v. 9, n. 5, p. 583–605, 2003.

STEYN, G. J. et al. Preliminary investigations on the cryopreservation of *Clarias gariepinus* (Clariidae: pisces) sperm. **Water AS**, Amsterdam, v. 11, n. 1, p. 15–18, Jan. 1985.

TEDDER, R. S. et al. Hepatitis-B transmission from contaminated cryopreservation tank. **Lancet**, London, v. 346, n. 8968, p. 137–140, July 1995.

THIRUMALA, S. et al. A theoretically estimated optimal cooling rate for the cryopreservation of sperm cells from a live-bearing fish, the Green swordtail *Xiphophorus helleri*. **Theriogenology**, Stoneham, v. 63, n. 9, p. 2395–2415, June 2005.

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

YAVIN, S.; ARAV, A. Measurement of essential physical properties of vitrification solutions. **Theriogenology**, Stoneham, v. 67, n. 1, p. 81–89, Jan. 2007.

ZRIBI, N. et al. Effect of freezing–thawing process and quercetin on human sperm survival and DNA integrity. **Cryobiology**, New York, v. 65, n. 3, p. 326–331, Dec. 2012.