

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO  
CÂMPUS DE ILHA SOLTEIRA**

**INDUÇÃO A ESPERMIAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO  
ESPERMÁTICA DE *Brycon cephalus* (GUNTHER, 1869)  
(TELEOSTEI: CHARACIDAE).**

**Cristiane Bashiyo da Silva**  
Bióloga

Ilha Solteira  
2014

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO  
CÂMPUS DE ILHA SOLTEIRA**

**INDUÇÃO A ESPERMIAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO  
ESPERMÁTICA DE *Brycon cephalus* (GUNTHER, 1869)  
(TELEOSTEI: CHARACIDAE).**

**Cristiane Bashiyo da Silva**

**Prof.Dr. Alexandre Ninhaus Silveira  
Orientador**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia – Unesp, Câmpus de Ilha Solteira, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Animal.

Ilha Solteira

2014

FICHA CATALOGRÁFICA

Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

B299i Bashiyó-Silva, Cristiane.  
Indução a espermição e criopreservação espermiática de Brycon cephalus (Gunther, 1869) (teleostei: characidae) / Cristiane Bashiyó-Silva. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2014  
67 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. Especialidade: Produção Animal, 2014

Orientador: Alexandre Ninhaus Silveira

Inclui bibliografia

1. Criogenia. 2. Preservação de sêmen. 3. Reprodução induzida de peixes. 4. Produção animal. 5. Conservação das espécies. 6. Banco de germoplasma.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ILHA SOLTEIRA

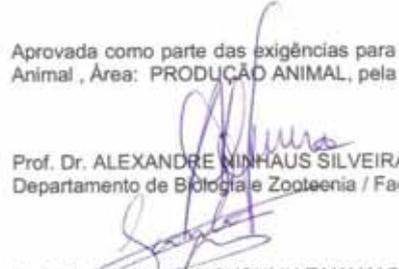
**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO:** Indução a espermição e criopreservação espermática de *Brycon cephalus* (GUNTHER, 1869) (TELEOSTEI: CHARACIDAE)

**AUTORA:** CRISTIANE BASHIYO DA SILVA

**ORIENTADOR:** Prof. Dr. ALEXANDRE NINHAUS SILVEIRA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia Animal, Área: PRODUÇÃO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. ALEXANDRE NINHAUS SILVEIRA  
Departamento de Biologia e Zootecnia / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira

  
Prof. Dr. LEONARDO SUSUMU TAKAHASHI  
Zootecnia / Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

  
Prof. Dr. EDUARDO ANTÔNIO SANCHES  
Coordenadoria de Curso de Engenharia de Pesca / Unidade de Registro

Data da realização: 11 de março de 2014.

## **Dedicatória**

Dedico esta dissertação aos meus pais e irmãos, pelo carinho e amor que sempre me deram, e o grande apoio para estar concluindo esta etapa tão importante. Aos meus orientadores, Alexandre Ninhaus Silveira e Rosicleire Veríssimo Silveira, por todo conhecimento, compreensão, carinho e atenção que tiveram comigo durante todos os anos de trabalho dentro do Laboratório de Ictiologia Neotropical.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por sempre me mostrar o caminho e me iluminar quando não tinha mais animo.

Aos meus pais, Ilza e Paulo, pelo amor, carinho, educação, compreensão, preocupação, apoio que sempre me deram. Além de sempre acreditarem no meu potencial e me tornarem uma pessoa melhor.

Aos meus irmãos, Fabiano e Daniele, por sempre estarem presentes em minha vida, compartilhando todos os momentos e me aguentando nos momentos de estresse.

Aos meus amigos do Laboratório de Ictiologia Neotropical, principalmente Laíza, Jumma, Amanda, Giovana e Diógenes, que são pessoas que quero sempre por perto, por tornarem o ambiente agradável de conviver e um grupo, no qual sei que sempre posso contar. Em especial aos meus amigos da criogenia, Raphael e Douglas, que me ensinaram tudo o que eu sei hoje sobre o assunto, nos momentos de coleta e estudos. Sei que com eles sempre posso contar. A amizade não só no laboratório mas fora dele também.

A minha orientadora de iniciação científica Rosicleire Veríssimo Silveira, e mãe científica, por todos seus ensinamentos e conselhos, exigências que contribuíram e muito para o meu crescimento como profissional. Pela grande compreensão em momentos difíceis.

Ao meu orientador, Alexandre Ninhaus Silveira, e pai científico, por me ensinar com muita paciência e atenção, por sempre ser justo e sincero, por tornar tudo a convivência muito mais fácil devido a sua grande personalidade. Por me ensinar e ensinar, repetir quantas vezes fosse dar um toque para ver se eu percebo meus erros, sempre tomando o maior cuidado para não ser grosso. O crescimento que obtive durante esses anos é tudo graças aos seus ensinamentos, por isso agradeço imensamente.

A minha melhor amiga, Tais, por sempre estar presente mesmo eu não podendo dar a atenção merecida. Por todos os anos de amizade, é como irmã mais velha que nunca tive e sempre esteve ao meu lado nos bons e maus momentos.

Aos meus amigos de faculdade, Lígia, André, Cinthia, Keila, Sirlene, Maria Fernanda, Mirian, Fabrício, mesmo com a distância sei que em vocês eu posso confiar, e quando nos reencontramos mesmo quando demora, não parece que

ficamos longe por muito tempo. Pela diversão e risadas vividas e que sempre acontece quando nos reunimos.

Aos membros da banca da qualificação, George Yasui e Edson Guilherme, pelas contribuições e dicas, que foram de enorme ajuda para meu crescimento e melhoria do meu trabalho.

Aos membros da banca de defesa, Eduardo Sanches e Leonardo Takahashi, por aceitarem participar da banca e contribuir com suas atribuições.

A Fapesp pelo auxílio durante todo o período do mestrado.

A UNESP/Ilha Solteira pelo apoio e ensino durante toda a minha vida acadêmica.

## INDUÇÃO A ESPERMIAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO ESPERMÁTICA DE *Brycon cephalus* (GUNTHER, 1869) (TELEOSTEI: CHARACIDAE).

### RESUMO

Este trabalho teve como objetivos avaliar a utilização de GnRHm associada ao inibidor da dopamina, o metoclopramide (Ovopel® – D-Ala6,Pro9 Net-mGnRH) em três concentrações diferentes 1mg/kg (T1), 2 mg/kg (T2) e 4 mg/kg (T3) , na indução a espermição de *Brycon cephalus* e, avaliar a eficiência de 2 soluções crioprotetoras: Bestvile Thawing Solution (BTS®) e outra composta por leite em pó (Ninho fortificado Nestlé) + glicose e dos crioprotetores metilglicol e metanol (Sigma Aldrich) nas concentrações de 10 e 15%, na preservação dos espermatozoides de *B. cephalus*. Para tal, foram realizados dois ensaios, no primeiro foram testadas três diferentes dosagens hormonais de Ovopel®, aonde foram avaliados os parâmetros seminais: de volume seminal, motilidade espermática subjetiva, duração da motilidade, pH, osmolaridade e concentração espermática. Após análise dos dados verificou-se que o tratamento T3 (4,66±1,52mL) apresentou maior volume seminal e valor significativamente diferente dos outros tratamentos e do controle (2,37±1,14 mL). Quanto a motilidade espermática apresentou percentual elevado (Nível 5; 80 a 100% ) nos tratamentos T2 e T3, em relação a T1 e ao controle que teve (Nível 4; 61-80%). Em relação à duração d motilidade espermática, o tratamento 3 apresentou duração de motilidade significativamente menor (22±5s), em relação aos outros tratamentos e ao controle. As dosagem hormonal de 2 mg/kg de Ovopel®, ser a mais indicada para indução hormonal de machos de *B. cephalus*, pela manutenção dos parâmetros de qualidade seminal. Para o segundo ensaio, foram utilizados seis exemplares adultos de *B. cephalus*. O sêmen coletado foi avaliado através dos parâmetros seminais e posteriormente foi realizado teste de toxicidade das soluções crioprotetoras. Após isso, o sêmen foi diluído na proporção de 1:5 (sêmen:diluyente), envasado em palhetas 0,5 ml (IMV) e congelado em vapores de nitrogênio líquido e posteriormente mantido em nitrogênio líquido. Para o teste de fertilidade o sêmen foi descongelado em banho-maria à 36°C por 12s e a fertilização dos ovócitos foi feita pelo método “a seco” numa proporção de 25000 espermatozoides/ovócito totais, com quatro repetições. Visando testar os parâmetros seminais do sêmen criopreservado, após o descongelamento foram realizadas análises deste no programa ISAS®CASA, feito o teste de fertilização e analisado em microscopia eletrônica de varredura para verificar as possíveis alterações morfológicas causadas pelo procedimento criogênico. Aos dados foi aplicado teste de ANOVA, ao nível de 5% de significância ( $\alpha < 0,05$ ). Das soluções crioprotetoras utilizadas, verificou-se que apenas o tratamento T7 (Metanol 15mL + BTS®) (3.7±4.4%) apresentou menor eficiência crioprotetora, diferindo significativamente em relação ao controle ( $\alpha < 0.05$ ). Somente VSL e STR que apresentaram correlação positiva com a fertilização ( $p < 0,05$ ). Concluindo que a solução crioprotetora mais adequada para o congelamento seminal de *B. cephalus* é o composto por metilglicol na proporção de 10 ou 15mL com BTS®, diluídos na proporção de 1:5 (sêmen:diluyente).

**Palavras-chave:** Metilglicol. Criogenia. Espermatozoide. Fertilização. Reprodução induzida.

## INDUCTION THE SPERMATION AND CRYOPRESERVATION OF SEMEN OF *Brycon cephalus* (GUNTHER, 1869) (TELEOSTEI: CHARACIDAE).

### ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the use of Ovopel ® associated with an inhibitor of dopamine in inducing spermiation and evaluate the efficiency of cryoprotectant solutions using cryoprotectants such as methyl glycol, methanol , Bestlvile Thawing Solution ( BTS ® ) and powdered milk preservation the sperm of *B. cephalus* . For this purpose, two tests were conducted , the first consisted of 20 adult male *B. cephalus* in which the application was tested in three different dosages of hormonal Ovopel ® , 1mg/kg (T1), 2 mg / kg (T2), and 4 mg / kg (T3) and control group (saline) . Seminal volume, subjective sperm motility, duration of motility, pH, osmolarity and sperm concentration: Following the analysis of seminal parameters was performed. Treatment 3 ( $4.66 \pm 1.52$  mL) showed higher semen volume compared to control ( $2.37 \pm 1.14$  mL). Sperm motility showed high percentage in treatments 2 and 3, with level 5 (81-100 %) compared to the control that had scale 4 (61-80 %). Regarding the duration of sperm motility, treatment 3 had the lowest duration of motility with  $22 \pm 5$  seconds, compared to the other treatments and control . Hormone levels 2 and 4mg/kg of Ovopel ®, demonstrated through the analysis of seminal parameters, are most appropriate for hormonal induction of males of *B. cephalus*, because they have better semen quality . In the second trial cryoprotectant solutions were evaluated : The 5.4 - g glucose 15 g whole milk powder ( fortified Nestle Nest ) ; B - 5g Bestlvile Thawing Solution (BTS ®) Minitub ®) in 10 or 15 mL of methanol and methyl cellosolve internal cryoprotectant . For this purpose, six adult specimens of *B. cephalus* were used. The collected semen was evaluated by semen parameters and was subsequently performed toxicological testing of cryoprotectant solutions. After that, the semen was diluted at a ratio of 1:5 (semen: diluent), packaged in 0.5 ml straws (IMV) and frozen in liquid nitrogen vapor and then kept in liquid nitrogen. To test the fertility semen was thawed in a water bath at 36 ° C for 12s and fertilization of oocytes was taken by "dry" in a ratio of 25000 sperm / oocyte total with four replications method. To test the semen was cryopreserved after thawing analyzes were performed in this ISAS ® HOME program , made the fertilization test and analyzed by scanning electron microscopy to determine possible morphological changes caused by the cryogenic procedure. Was applied to the data using ANOVA test at 5% level of significance ( $\alpha < 0.05$ ) . Of cryoprotectant solutions used, it was found that only the treatment T7 (15mL Methanol + BTS ®) ( $3.7 \pm 4.4$  % ) showed a lower efficiency cryoprotecting , differing significantly from the control ( $\alpha < 0,05$ ) . Only VSL and STR which showed positive correlation with fertilization ( $p < 0.05$ ). In conclusion that the most suitable cryoprotectant solution for freeze seminal *B. cephalus* is composed of methyl cellosolve in the ratio of 10 to 15mL with BTS ® , diluted in a ratio of 1:5 (semen : diluent ) .

**Keywords:** Methylglycol. Cryogenics. Sperm. Fertilization. Reproduction induced.

## SUMÁRIO

<i>Brycon cephalus</i> .....	10
Indução hormonal.....	12
Avaliação seminal e espermática .....	14
Criopreservação espermática.....	16
Descongelamento.....	20
Fertilização artificial.....	21
REFERÊNCIAS .....	23
OBJETIVOS .....	31
Geral.....	31
Específicos .....	31
CAPÍTULO 1 – Aplicação de dosagens hormonais de Ovopel em machos de <i>Brycon cephalus</i> .....	32
1 Introdução.....	34
2 Material e Métodos.....	35
3 Resultados.....	37
4 Discussão .....	38
5 Conclusão.....	40
Referências.....	40
CAPÍTULO 2– Substâncias crioprotetoras e diluentes na criopreservação espermática de <i>Brycon cephalus</i> .....	42
1 Introdução .....	44
2 Material e métodos .....	45
3 Resultados .....	49
4 Discussão .....	58
5 Conclusão.....	62
Referências.....	63

## INTRODUÇÃO

A fauna de peixes de água doce do Brasil é a mais rica do mundo, com cerca de 2.587 espécies (BUCKUP et al., 2007). Atualmente, os ambientes aquáticos vêm sofrendo diversas alterações, proporcionadas em sua maioria pela interferência humana, como a destruição das matas ciliares, a pesca predatória, introdução de espécies exóticas, poluição dos sistemas aquáticos e construção de barragens hidroelétricas, além das mudanças climáticas. Tais modificações alteram o sucesso reprodutivo dos peixes, acarretando na diminuição de populações de diversas espécies, podendo levar a extinção de algumas dessas espécies (NINHAUS-SILVEIRA, 2000; CARNEIRO, 2007).

Espécies reofílicas, que necessitam realizar a migração reprodutiva (piracema) durante o período reprodutivo, recebem estímulos ambientais como temperatura, pluviosidade e fotoperíodo, necessários para a estimulação final da maturação gonadal (LOPES; SOUZA; ROCHA, 2006). Deste modo, grande parte das espécies reofílicas Neotropicais não se reproduz naturalmente em cativeiro, por não terem os estímulos finais para maturação gonadal, sendo assim necessária a indução pelo uso de hormônios exógenos, para que possam completar a maturação gonadal (NINHAUS-SILVEIRA, 2000).

### ***Brycon cephalus***

A maior diversidade de peixes de água doce é encontrada na região Neotropical, contendo mais de 4.400 espécies já descritas. Dentro da ordem Characiforme, a maior família é a Characidae com mais de 1.350 espécies descritas (REIS; KULLANDER; FERRARIS, 2003). Onde o gênero *Brycon* possui mais de 60 espécies de peixes, dentre as quais aproximadamente 40 ocorrem na América Central e América do Sul (HOWES, 1982).

O matrinchã (*Brycon cephalus*=*Brycon amazonicus*) (Figura 1) é um peixe reofílico de água doce, da Bacia Amazônica e, apesar de ser conhecido na região Norte do Brasil vem ganhando seu espaço entre os peixes criados em cativeiro no Sudeste do país. Atinge maturidade sexual entre 2 a 3 anos de vida, dependendo do estado nutricional de cada animal. Machos do gênero *Brycon* apresentam

dimorfismo sexual aparente, principalmente com a aproximação do período reprodutivo, quando a nadadeira anal se torna áspera (GOMES; URBINATI, 2005).

Figura 1- *Brycon cephalus*=*Brycon amazonicus*



Fonte: próprio autor

Os indivíduos da espécie habitam águas claras e bem oxigenadas, e apresentam hábito alimentar onívoro, alimentam-se de frutos, sementes e pequenos organismos aquáticos. Em condições de cativeiro, adapta-se facilmente a ração, possui tecnologia de reprodução relativamente desenvolvida e possui crescimento rápido (pode atingir peso de 1 kg no período de 12 meses). Sendo uma espécie com potencial para a exploração comercial devido ao seu sabor apreciável e excelente para a pesca esportiva devido a sua agressividade (RIBEIRO, 2000; GOULDING, 1980).

Já foram desenvolvidos trabalhos com *B. cephalus* sobre a descrição da ultraestrutura das células germinativas do testículo (ROMAGOSA et al., 1999), do ciclo reprodutivo dos machos (ROMAGOSA et al., 2000), do desenvolvimento embrionário desta espécie (ALEXANDRE et al., 2009), fertilização e congelamento do sêmen utilizando como crioprotetores o dimetilsulfóxido (DMSO) e gema de ovo (NINHAUS-SILVEIRA, 2006). Entretanto, na busca de padronizar um protocolo de congelamento, busca-se avaliar a ação de outras soluções crioprotetoras que protejam o sêmen durante o processo de congelamento.

## **Indução hormonal**

Os primeiros trabalhos de indução hormonal foram produzidos na Argentina por Houssay em 1930 (ZANIBONI FILHO; WEINGARTNER, 2007) e no Brasil por Rodolpho von Ihering, Pedro de Azevedo e Dorival Cardoso, em 1935 (NINHAUS-SILVEIRA et al., 2006). Ambos obtiveram êxito na reprodução de espécies reofílicas através da indução hormonal a partir da aplicação de hormônios hipofisários homólogos de peixes maduros, técnica esta denominada de hipofisação (ZANIBONI FILHO; WEINGARTNER, 2007).

A indução hormonal é realizada como objetivo de proporcionar a maturação gonadal final aos peixes, nas fêmeas promove a ovulação e nos machos ocorre o aumento o volume seminal liberado, dando um aspecto mais fluido do sêmen nos peixes injetados (KAVAMOTO et al., 1989)

A indução hormonal funciona como um gatilho para o desenvolvimento e a maturação dos gametas. Sua aplicação é um estímulo hormonal que a partir desta, desencadeia uma série de reações neuroendócrinas em cascata no eixo-reprodutivo (hipotálamo-hipófise-gônada), levando o estímulo aos locais de produção e ação dos hormônios ligados a reprodução. Os hormônios envolvidos são: liberadores de gonadotrofina (GnRH) e os hormônios gonadotróficos: hormônio folículo estimulante (FSH ou GtHI) e hormônio luteinizante (LH ou GtHII) (NAKAYAMA, 2011).

Em geral, esses hormônios indutores exógenos, apesar de terem o mesmo propósito, diferem quanto a sua ação no órgão alvo (hipotálamo, hipófise ou gônadas) (MYLONAS; FOSTIER; ZANUY, 2010). A hipofisação consiste na utilização de um extrato bruto hipofisário, retirado da glândula pituitária de peixes doadores, no entanto estes peixes tem que estar no período reprodutivo, para que haja uma concentração hormonal adequada armazenada nas hipófises. No caso o mais utilizado é o extrato de hipófise de carpa (CPE), já sexualmente maduras. Posteriormente, esse extrato é dissolvido e injetado no músculo ou na cavidade celomática, e via corrente sanguínea os hormônios gonadotróficos atuam diretamente nas gônadas, induzindo a maturação (LOPES; SOUZA; ROCHA, 2006; HORVATH, 1996).

A utilização de CPE possui grandes vantagens como a facilidade de dosagem e aplicação, fácil estocagem e metodologia estabelecida em diversas

espécies. Entretanto, também apresenta desvantagens para obter o extrato é necessário sacrificar vários espécimes maduros para obter uma quantidade apreciável de glândulas, possui custo relativamente alto, pode permitir propagação de doenças, a eficácia varia de acordo com a idade, o sexo, estado de maturação, da condição nutricional e sanitária da espécie doadora, incerteza da concentração dos hormônios gonadotróficos nas hipófises (HORVATH, 1996; CREPALDI et al., 2006; ANDRADE E YASUI, 2003; ZANIBONI FILHO; WEINGARTNER, 2007).

Na busca por produtos que permitissem uma maior padronização da dosagem, a gonadotrofina coriônica humana (hCG) também foi testada, que é um hormônio gonadotrófico purificado da urina de mulheres grávidas com efeito semelhante ao hormônio luteinizante (LH) que estimula a produção de esteroides nas gônadas, levando a maturação da gônada. Possui as mesmas vantagens do extrato, porém não se tem metodologias definidas para a maioria das espécies reofílicas, possui custo elevado e necessita de grandes dosagens para obtenção de bons resultados (ANDRADE; YASUI, 2003).

Os hormônios liberadores de gonadotrofina (GnRH) são decapeptídeos liberados pelo hipotálamo e agem sobre a hipófise induzindo a liberação dos hormônios gonadotróficos que, por sua vez atuam sobre as gônadas (ZOHAR; MYLONAS, 2001). Uma das vantagens do GnRH está no fato deste composto atuar no nível mais alto do eixo hipotálamo-hipófise-gônada estimulando o peixe a produzir seu próprio hormônio gonadotrófico (ROTTMANN; SHIREMAN; CHAPMAN, 1991). Apresenta grande amplitude de variação das dosagens, para fêmeas se utiliza 10 a 15 mg/Kg e para os machos de 3 a 5 mg/Kg; metodologia não definida em muitas espécies; necessidade de estocagem sob refrigeração e o tempo mais prolongado de resposta dos peixes devido a atuação do hormônio no órgão alvo (ZOHAR; MYLONAS, 2001; ANDRADE; YASUI, 2003).

O centro de pesquisas húngaro, Interfish Hungary, desenvolveu um produto, denominado Ovipel®, composto por GnRH-a e um inibidor de dopamina (HORVATH, 1996; CREPALDI et al. 2006). Possui vantagens como baixo custo (30 a 40% mais barato que a hipófise), fácil armazenamento e cada glóbulo apresenta a mesma dosagem de hormônio. Por atuar na hipófise, estimulando-a a produzir os hormônios gonadotróficos, cria a vantagem de poder repetir a aplicação hormonal

após alguns dias de repouso e regeneração, caso tenha ocorrido algum fator desfavorável no meio ambiente que impediu o processo da ovulação (fêmeas) ou espermição (machos). Ao contrário da hipofiseção, cuja repetição do tratamento só poderia ocorrer no próximo ciclo de reprodução, após completa reabsorção dos ovócitos (HORVATH, 1996). Os produtos compostos como Ovopel® e Ovaprim® são mais efetivos e menos estressante do que os outros produtos (KAYIM; BOZKURT; OGRETMENT, 2010; JAMRÓZ et al., 2008; CEJKO et al., 2012).

Para desenvolver técnicas de indução eficientes é necessário o estudo primário da biologia reprodutiva da espécie, saber quando aplicar, ou seja, sua época reprodutiva, onde aplicar e a quantidade que se deve aplicar para obter melhores resultados. Tais técnicas têm por objetivo minimizar os problemas com a assincronia dos peixes reofílicos em épocas reprodutivas.

### **Avaliação seminal e espermática**

As análises seminais e espermáticas são ferramentas que podem ser utilizadas para determinar as condições de viabilidade seminal e espermático em diferentes técnicas de indução hormonal ou para verificar a eficácia das metodologias como a crioconservação dos espermatozoides (BUTTS et al., 2011; CABRITA et al., 2010). Os parâmetros mais comumente avaliados são: volume seminal, motilidade espermática, pH seminal, osmolaridade, concentração espermática e morfologia dos espermatozoides (SANCHES et al., 2011; MARIA et al., 2010; GODINHO; AMORIM; PEIXOTO, 2003; STREIT JUNIOR et al., 2009; KAVAMOTO et al., 1999).

O volume seminal irá indicar a quantidade de sêmen liberado pelo macho. A falta de acurácia deste parâmetro está ligada a espécie (a morfologia da gônada) a idade e estágio de maturação dos machos e o método de coleta (VIVEIROS et al., 2002). Viveiros e Godinho (2009) indicam em sua revisão que, como é esperado, o volume seminal aumenta quando a espécie é induzida hormonalmente e a maioria dos trabalhos com peixes neotropicais avaliam o volume seminal após a indução.

A motilidade espermática é analisada através da observação sob microscopia de luz, sendo que na maioria dos trabalhos é avaliada de forma subjetiva, pela ativação do sêmen com água e observação da movimentação espermática e avaliando segundo uma escala arbitrária de valores que varia de 0 a

5, sendo o menor valor para as amostras sem nenhum espermatozoide móvel e o valor máximo para aquelas que apresentarem 80% ou mais de células móveis (FRIBOURGH, 1966).

Outro método atualmente utilizado é através do sistema de análise espermática computadorizada, denominada de CASA (Computer Assisted Sperm Analysis). Pois, além de verificar a motilidade geral média, analisa velocidade curvilíneas, linear e média (RURANGWA et al., 2001) e parâmetros de sua trajetória durante a sua ativação. Também para ver a relação com a fertilização, taxa de eclosão, comparação com a motilidade subjetiva, tempos de ativação da motilidade (GALLEGO et al., 2013; SANCHES et al., 2013; MELO-MACIEL et al., 2012; VIVEIROS et al., 2010).

Outro parâmetro espermático avaliado que tem grande influência sob a motilidade são os íons, componentes do plasma seminal. A concentração iônica do plasma seminal é fator importante para o desencadeamento da motilidade no espermatozoide, pois os espermatozoides de peixes se encontram imóveis no plasma seminal dentro dos testículos. Quando ocorre a espermição, os espermatozoides entram em contato com a água, que apresenta osmolaridade mais baixa que o plasma seminal, acarretando em choque hiposmótico. Este choque serve como sinal para desencadear a ativação espermática (COSSON, 2004). Portanto ao entrar em contato com a água, as mudanças na pressão osmótica, íons e pH levam assim ao início da motilidade e então o espermatozoide tem poucos instantes para conseguir alcançar a micrópila e ocorrer a fertilização (MEDINA, 2008). Também influenciará na produção de ATP, molécula esta como fonte principal de energia para motilidade espermática (BILLARD; COSSON; CRIM, 1993; RAVINDER et al., 1997).

É por isso que soluções ativadoras de composição iônicas influenciam diretamente na motilidade espermática. Pois os íons influenciam no pH e osmolaridade da célula, responsáveis pela ativação do espermatozoide. A redução do pH (< 6) diminuirá o potencial da motilidade e a redução da osmolaridade induzirá a ativação dos espermatozoides. Como demonstrado no trabalho de Felizardo et al. (2011) que ativadores com alta osmolaridade podem proporcionar menores taxas e duração da motilidade do sêmen de *P. lineatus*. Assim como Shimoda et al. (2007b)

constatou que espermatozoides de *B. insignis* não são ativados quando diluídos em soluções que contêm concentrações de NaCl superiores a 1,2% (410mOsm). Viveiros e Godinho (2009) e Melo-Maciel et al. (2012) fazem revisão das espécies de água doce, mostrando os meios ativadores utilizados para Characiformes, como água destilada, NaCl 50 mM ou NaHCO<sub>3</sub> 119mM.

A avaliação da concentração espermática pode ser feita por câmara hematimétrica, citometria de fluxo e espermátocrito. Ambos servem para quantificar o número de células espermáticas por mL ou mm<sup>3</sup>. Segundo Fogli da Silveira et al. (1987) a concentração espermática é uma das medidas quantitativas que permite maximizar o aproveitamento do material fecundante e melhorar os resultados quanto às taxas de fertilização. Este parâmetro é espécie específico como demonstrado por Viveiros e Godinho (2009), mas pode sofrer influência nos valores quando se faz indução hormonal.

O método por câmara hematimétrica de Neubauer, utiliza como estimativa o número de espermatozoides presentes nos quadrantes. Já o espermátocrito mede a massa celular do sêmen após passar por centrifugação. Sanches et al. (2011) comparam os dois métodos e encontraram correlação diretamente proporcional entre eles para algumas espécies.

### **Criopreservação espermática**

A técnica de criopreservação de sêmen de peixes está em processo de desenvolvimento, entretanto teve um grande progresso durante os últimos anos em estudos principalmente com espécies reofílicas Neotropicais (VIVEIROS; GODINHO, 2009). Apesar disso, devido ao grande número de espécies de peixes e as diferenças seminais de cada espécie, dentre outros fatores, ainda não se tem uma padronização dos protocolos de congelamento. Por isso é de grande importância o conhecimento aprofundado do processo de congelamento e da ação dos produtos envolvidos na célula.

Além de ser uma forma eficaz de melhorar a reprodução em cativeiro, a criopreservação pode proporcionar o aumento na produção de larvas, facilitar a manipulação genética e a seleção dos reprodutores, reduzir a quantidade de machos produzidos devido à disponibilidade de gametas masculinos a qualquer

momento (sucesso reprodutivo). Além disso, permitir o estabelecimento de bancos de esperma, útil em programas de hibridação e conservação genética de espécies ameaçadas de extinção (NINHAUS-SILVEIRA et al., 2002; VIVEIROS et al., 2009).

A criopreservação do espermatozoide busca preservar em temperaturas de  $-196^{\circ}\text{C}$ , mantendo assim sua integridade celular e seu metabolismo em estado quiescente por período indeterminado. Entretanto para chegar a esta temperatura, a célula passa por diversas faixas de congelamento que podem causar injúrias internas que, posteriormente podem ser fatais. A formação de injúrias internamente ocorre em uma faixa intermediária de temperatura ( $-20$  e  $-40^{\circ}\text{C}$ ) que a célula atravessa duas vezes: congelamento e descongelamento (MAZUR, 1984).

A criopreservação envolve a desidratação da célula para evitar a formação de injúrias internamente, que podem ser de duas maneiras: concentração do crioprotetor e taxa de congelamento. Deve-se então fazer o balanceamento para evitar a desidratação excessiva, toxicidade, formação de cristais internamente e externamente, que levaram a morte celular. Assim para que se tenha sucesso na criopreservação deve-se balancear a diluição, taxa de congelamento e tempo de descongelamento.

A solução com a qual o sêmen será diluído é composta por crioprotetores intracelulares e os extracelulares, ambos com a função de proteger os espermatozoides durante os processos de congelamento. Segundo Maria (2005), um bom crioprotetor deve apresentar como característica baixa toxicidade e alta solubilidade em água. O crioprotetor intracelular é uma substância química que retira a água da célula, fazendo com que o seu ponto crioscópico diminua impedindo a formação de cristais de gelo. Chao (1991) apud Maria (2005) afirma que o crioprotetor proporciona ainda proteção à célula devido à ação de enzimas lábeis (ex. catalase) e a estabilidade das proteínas das soluções, entretanto estas enzimas podem induzir a desnaturação das células quando colocadas sob altas temperaturas, levando a toxicidade nos sistemas celulares.

Devido à utilização de soluções crioprotetoras para o congelamento, tem-se que tomar muito cuidado quanto à velocidade de resfriamento, pois segundo Mazur (1984) quando realizado adequadamente se tem tempo suficiente para que faça com

que os agentes protetores penetrem na célula, fazendo com que a água saia, desidratando-a. Entretanto se a velocidade de resfriamento for muito lenta, a desidratação da célula aumentara, tornando o meio hiperosmótico e aumentara a concentração dos crioprotetores, tornando o meio tóxico para a célula. Agora se a velocidade for muito rápida a célula não conseguirá perder a água para o meio externo e a água intercelular irá se congelar conforme a temperatura diminuir e formará cristais de gelo.

Vários crioprotetores internos tem sido estudados na formulação de soluções crioprotetoras para a diluição de sêmen de peixes de água doce, como dimetilsulfóxido (DMSO), metanol, metilglicol (MG), propileno glicol, dimetil acetamida (DMA). Dos trabalhos realizados com o DMSO, apresentou resultados positivos de fertilização e motilidade, com a truta arco-íris (SILVEIRA et al., 1984), truta (CABRITA et al., 2001), *Pseudoplatystoma corruscans* e *Brycon orbignyianus* (CAROLSFELD et al., 2003), *Piaractus brachypomus* (NASCIMENTO et al., 2010), algumas espécies marinhas (GWO; JAMIESON; LEUNG, 2009), teleósteos (STEIN; BAYRLE, 1978). Assim como para espécies do gênero *Brycon* com concentração de 10 e 15 % (MURGAS et al., 2004; MELO; GODINHO, 2006; NINHAUS-SILVEIRA, 2006; OLIVEIRA et al. 2007; VIVEIROS et al., 2012c).

Outro crioprotetor que vem sendo utilizado atualmente e com resultados positivos é o metilglicol (MG), também conhecido como 2-metoxietanol, propano-1,2-diol-glicol ou etileno éter monometílico (MARIA et al., 2006; VIVEIROS et al., 2010; 2012; NASCIMENTO et al., 2010). Apresentando-se em alguns casos melhor do que DMSO para criopreservação do esperma de alguns Characiformes, incluindo quatro espécies do gênero *Brycon*: *B. orbignyianus* (MARIA et al., 2006), *B. nattereri* (OLIVEIRA et al., 2007), *B. insignis* (VIVEIROS et al., 2011), *B. opalinus* (VIVEIROS et al., 2012a), todos na concentração de 10%.

Os crioprotetores extracelulares recobrem a superfície celular e estabilizam a membrana minimizando os possíveis danos celulares causados pelo processo de congelamento. Podem ser açúcares (sacarose, glicose) e proteínas de baixo peso molecular ou aminoácidos [gema de ovo, leite em pó, BSA (albumina de soro bovino), glicina]. Dos crioprotetores extracelulares já testados um dos que apresenta bons resultados é a gema de ovo em associação com o DMSO (NINHAUS-

SILVEIRA et al., 2006; SARVI et al., 2006; GODINHO; AMORIM; PEIXOTO, 2003; GWO; JAMIESON; LEUNG, 2009). Já com o leite em pó não apresenta muitas pesquisas utilizando-o como crioprotetor externo na solução. Dos trabalhos já realizados, o leite em pó foi utilizado na concentração de 15%, e testado com diferentes crioprotetores internos (ex. DMSO, Etilenoglicol, Metanol e Glicerol) para criopreservação do sêmen de *Lates calcarifer* (LEUNG, 1987), *Oreochromis niloticus* (GODINHO et al., 2003), *Pseudoplatystoma corruscans* (CAROLSFELD et al., 2003) ou na concentração de 5% *P. metaense* (RAMIREZ-MERLANO; MEDINA-ROBLES; CRUZ-CASALLAS, 2011) ou ainda com 8g *Lutjanus synagris* (GAITÁN-ESPITIA et al., 2013), variando de 30 a 80% de motilidade entre estas espécies.

O BSA na concentração de 5mg/mL combinado com 10% metanol apresenta motilidade alta para a espécie *Huso huso* (SADEGUI; IMANPOOR, 2013), para o sêmen de *M. anguillicaudatus* foram testadas sacarose, BSA, glicose e glicina, o uso de glicina 0.5% foi mais efetivo (YASUI et al., 2009).

Na composição das soluções crioprotetoras podemos também encontrar extensores, cuja finalidade é manter um ambiente adequado para o espermatozoide. Segundo Watson (1995) o extensor deve proporcionar nutrientes, energia, manter a pressão osmótica adequada para que não ocorra a ativação do espermatozoide durante o processo de congelamento. Podendo ser soluções de sais (NaCl), de carboidratos (glicose) (VIVEIROS et al., 2011; 2012; MURGAS et al., 2007; MARIA et al., 2006; ERDALH; GRAHAM, 1987; ERDALH; ERDALH; GRAHAM, 1984).

O BTS<sup>®</sup>, tem sido utilizado e com resultados satisfatórios, utilizando concentração variando de 4,5 ou 5% como para *Prochilodus lineatus* (MURGAS et al., 2007; FELIZARDO et al., 2010), *Piaractus brachypomus* (NASCIMENTO et al., 2010), *Salminus brasiliensis* (VIVEIROS et al., 2009). O BTS<sup>®</sup> vem sendo bem empregado também no gênero Brycon, como em *B. nattereri* (OLIVEIRA et al., 2007; VIVEIROS et al., 2012b), *B. orbignyanus* (MARIA et al., 2006) e *B. insignis* (VIVEIROS et al., 2011). Também são utilizados outros extensores como solução de Ringer (NaCl 123.2mM; KCl 3.75mM; CaCl<sub>2</sub> 3.0 mM; NaHCO<sub>3</sub> 2.65 mM; 214mOsm)(VIVEIROS et al., 2000) e solução ed Saad (NaCl 200 mM; Tris 30 mM; 429 mOsm) ( LINHART et al., 1993).

A escolha de cada produto tanto da solução crioprotetora quanto do extensor deve ser bem avaliada, buscando sempre causar o menor dano possível à célula. Ninhaus-Silveira et al. (2006) afirma que após o descongelamento, os espermatozoides devem apresentar uma boa motilidade para que possam atingir o local da fertilização e penetrar no óvulo.

Os maiores prejuízos conhecidos na estrutura dos espermatozoides com relação ao congelamento se deve ao frio, os efeitos do pH, a formação do gelo intracelular e extracelular, o soluto, o volume e a toxicidade dos crioprotetores, desintegração da peça intermediária e membrana plasmática (LEUNG, 1991; BILLARD, 1983).

Outro ponto importante durante o processo de congelamento, já mencionado anteriormente é a diluição, ou seja, a proporção ideal de solução que será misturada ao sêmen. Esta proporção tem que ser numa quantidade na qual proteja todos ou a maioria dos espermatozoides durante o processo de criopreservação e ainda que mantenha uma concentração elevada de espermatozoides em relação a solução (LEGENDRE; BILLARD, 1980; BILLARD, 1983).

Viveiros e Godinho (2009) mostram que a proporção sêmen:solução de 1:4 é bastante utilizada para crioprotetor DMSO e o 1:10 para o metilglicol em espécies de Characiformes. Carolsfeld et al. (2003) utiliza diluições de 1:3 e 1:4 para congelamento do sêmen de *P. corruscans* com metanol como crioprotetor.

Ainda se tem problemas para aplicação de semen criopreservado para espécies aquáticas, como problemas técnicos, volumes pequenos de esperma, resultados variáveis, falta generalizada de acesso à tecnologia e o mais importante falta de padronização as práticas (TIERSCH, 2008).

Diversas são as variáveis e dificuldades que podem interferir ou diminuir a eficiência da criopreservação do sêmen de peixes. Por isso é de grande importância o estudo mais aprofundado de cada variável para chegar a valores altos de fertilização do sêmen criopreservado que se igualem ao sêmen fresco, buscando assim aumentar a produção e aplicação em grande escala desta biotecnologia.

### **Descongelamento**

As palhetas mais comumente utilizadas para o envasamento de sêmen do gênero Brycon são as de 0,5mL, para *B. cephalus* (NINHAUS-SILVEIRA et al.,

2006), *B. nattereri* (OLIVEIRA et al., 2007), *B. orbignyana* (MARIA et al., 2006). Assim, a escolha da temperatura de descongelamento será de acordo com a dimensão da palheta, palhetas maiores levam mais tempo para descongelar.

Para o descongelamento seminal as palhetas são imersas em água (banho-maria) em temperatura pré-determinada por tempo suficiente para o descongelamento do sêmen. Esta temperatura não pode ser muito baixa, pois pode haver a recristalização do material seminal, e também nem muito elevada, pois pode ser letal para os espermatozoides devido ao superaquecimento. Os cristais de gelo intracelular danificam a membrana, diminuindo assim sua produção de ATP, e conseqüentemente queda na motilidade (BILLARD; COSSON; CRIM, 1993).

Enquanto o congelamento envolve a desidratação celular, o descongelamento envolve uma reidratação das células, ocorrendo influxo de água para o interior do citoplasma (HOLT, 2000). Portanto a velocidade de descongelamento deve ser de modo que permita a reidratação celular e evita a formação de cristais de gelo no interior da célula, pois estes podem aumentar de tamanho (regelo) e danificar a célula (CARNEIRO, 2007).

### **Fertilização artificial**

Após o descongelamento se tem o processo de fertilização artificial, que tem como intuito verificar a viabilidade da solução crioprotetora utilizada no processo de criopreservação. Porém, vários fatores podem afetar nos resultados durante a fertilização, pode ser no momento da mistura do espermatozoide com os ovócitos, onde a quantidade de solução ativadora pode influenciar no resultado final. Pois, a inclusão de volumes elevados desta solução ativadora pode causar a diluição do sêmen, diminuindo assim a possibilidade dos espermatozoides encontrarem a micrópila no momento da fertilização. Da mesma forma, as inclusões de baixos volumes podem causar a obstrução da micrópila pelo muco ovariano ou até mesmo pelo contato entre os ovócitos, prejudicando assim a entrada dos espermatozoides. Outro fator que pode causar a obstrução da micrópila é o número elevado dos espermatozoides na hora da fecundação (WOYNAROVICH; HORVÁTH, 1983; SHIMODA et al., 2007).

A fertilização dos ovócitos na maioria dos teleósteos ocorre externamente. Sendo assim, quando se tem a reprodução artificial os ovócitos são colocados

diretamente em contato com os espermatozoides em um recipiente, sendo misturados como meio ativador. O número de espermatozoides necessários para fertilizar um ovócito é relativamente elevado e varia de acordo com a espécie. Segundo Rurangwa et al. (1998) quando se tem uma proporção relativamente baixa de espermatozoides por ovócito e mesmo assim se obtém altas taxas de fertilização significa que a espécie possui alta capacidade de fertilização. Já Melo-Maciel et al. (2012) enfatiza que quando se utiliza sêmen criopreservado, a proporção de espermatozoides por ovócito geralmente é superior à utilizada para o sêmen fresco, devido a diminuição da qualidade espermática após o descongelamento.

Sendo assim a fertilização é um ponto chave para verificação da qualidade do sêmen. Ou seja, quanto maior for o número de óvulos fecundados pelos espermatozoides, maiores são os indícios de que o sêmen é viável. Deste modo, a criopreservação de sêmen de peixe contribui eficaz de melhorar a reprodução em cativeiro, aumenta a produção de larvas, facilita a manipulação genética e a seleção dos reprodutores, reduzindo assim a quantidade de machos produzidos devido a disponibilidade de gametas masculinos a qualquer momento (sucesso reprodutivo). Além de permitir o estabelecimento de bancos de esperma, útil em programas de hibridação e conservação genética de espécies ameaçadas de extinção (NINHAUS-SILVEIRA et al., 2002; VIVEIROS et al., 2009).

## REFERÊNCIAS

- ALEXANDRE, J. S.; NINHAUS-SILVEIRA, A.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R.; BUZZOLLO, H.; SENHORINI, J. A.; CHAGURI, M. P. Structural analysis of the embryonic development in *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). **Zygote**, Cambridge, v. 18, p. 173–183, 2009.
- ANDRADE, D. R.; YASUI, G. S. O manejo da reprodução natural e artificial e sua importância na produção de peixes no Brasil. **Rev. Bras. Reprod. Animal**, Belo Horizonte, v.27, n.2, p.166-172, Abr/Jun, 2003.
- 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.
- BILLARD, R.; COSSON, J.; CRIM, L.W. Motility of fresh and aged halibut sperm. **Aquat. Liv. Res.**, Cambridge, v. 6, p. 67-75, 1993.
- BUCKUP, P. A.; MENEZES, N. A.; GHAZZI, M. S. **Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil**. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2007. p.
- BUTTS, I. A. E.; TRIPPEL, E. A.; CIERESZKO, A.; SOLER C.; SŁOWINSKA, M.; ALAVI, S. M. H.; LITVAK, M. K.; BABIAK, I. Semen characteristics and their ability to predict sperm cryopreservation potential of Atlantic cod, *Gadus morhua* L. **Theriogenology**, Inglaterra, v. 75, p.1290-1300, 2011.
- CABRITA, E.; ROBLES, V.; ALVAREZ, R.; HERRÁEZ, M. P. Cryopreservation of rainbow trout sperm in large volume straws: application to large scale fertilization. **Aquaculture**. Irlanda, v. 1 n. 1 p. 301–314. 2001.
- CABRITA, E.; SARASQUETE, C.; MARTÍNEZ-PÁRAMO, S.; ROBLES, V.; BEIRÃO, J.; PÉREZ-CEREZALES, S.; HERRÁEZ, M. P. Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. **Journal of Applied Ichthyology**, Berlim, v. 26, n. 1, p. 623-635, 2010.
- CARNEIRO, P.C.F. Tecnologias de produção e armazenamento de sêmen de peixes. **Rev Bras Reprod Anim.**, Belo Horizonte, v. 31, n. 3, p. 361-366, 2007.
- CAROLSFELD, J.; GODINHO, H. P.; ZANIBONI FILHO, E.; HARVEY, B. J. Cryopreservation of sperm in brazilian migratory fish conservation. **Journal of Fish Biology**, Oxford, v. 63, n. 2, p. 472-489, Aug. 2003.
- CEJKO, B. I.; TARGONSKA, K.; KOWALSKI, R. K.; ZARSKI, D.; SAROSIEK, B.; KUCHARCZYK, D.; GLOGOWSKI, J. The effectiveness of hormonal preparations (Ovopel, Ovaprim, LHRHa, hCG and CPE) in stimulating spermiation in dace *Leuciscus leuciscus* (L.). **J. Appl. Ichthyol.**, Berlim, v. 28, n.1, p. 873–877. 2012.
- COSSON, J. The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa **Aquaculture International**, Irlanda, v. 12, n. 1, p. 69-85, 2004.
- CREPALDI, D. V.; FARIA, P. M. C.; TEIXEIRA, E. A.; RIBEIRO, L. P.; COSTA, A. A. P.; MELO, D. C.; CINTRA, A. P. R.; PRADO, S. A.; COSTA, F. A. A.; DRUMOND, M. L.; LOPES, V. E.; MORAES, V. E. Utilização de hormônios na reprodução

induzida do surubim (*Pseudoplatystoma* spp). **Rev Bras Reprod Anim**, Belo Horizonte, v. 30, n. 3/4, p. 168-173, jul./dez. 2006.

ERDAHL, A. W.; GRAHAM, E. F. Fertility of teleost semen as affected by dilution and storage in a seminal plasma-mimicking medium. **Aquaculture**, Irlanda, v. 60, n. 1, p. 311-321. 1987.

ERDAHL, A. W.; ERDAHL, D. A.; GRAHAM, E. F. Some factors affecting the preservation of salmonid spermatozoa. **Aquaculture**, Irlanda, v. 43, n. 1, p. 341-350, 1984.

FELIZARDO, V. O.; MELLO, R. A.; MURGAS, L. D. S.; ANDRADE, E. S.; DRUMOND, M. M.; ROSA, P. V. Effect of cryopreservant combinations on the motility and morphology of curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm. **Anim. Reprod. Sci.**, Illinois, v. 122, n.1, p. 259-263, 2010.

FELIZARDO, V. O.; MURGAS, L. D. S.; NAVARRO, R. D. ; GONCALVES, A. C. S.; PAULINO, M. S. Osmolaridade dos ativadores e taxa de diluição na ativação do sêmen criopreservado de curimba (*Prochilodus lineatus*). **Archivos de Zootecnia**, Espanha, v. 60, p. 1255-1262, 2011.

FOGLI DA SILVEIRA, W.; KAVAMOTO, E. T.; RIGOLINO, M. G.; PENTEADO, L. A.; CARVALHO FILHO, A. C. Primeiros resultados de fertilização com sêmen congelado de truta arco-íris, *Salmo irideus* Gibbons, no Brasil. **B. Inst. Pesca**, São Paulo, v. 11, n. 1, p. 131-36, 1984.

FOGLI DA SILVEIRA, W.; KAVAMOTO, E. T.; RIGOLINO, M. G.; TABATA, Y. A. O método espectrofotométrico na avaliação da concentração de espermatozoides da truta arco-íris, *Salmo irideus* Gibbons. **B. Inst. Pesca**, São Paulo, v. 14, n. 1, p. 69-73, 1987.

FRIBOURGH, J. H. The application of a differential staining method to low-temperature studies on goldfish spermatozoa. **Progr. Fish Cult.**, United State of America, v. 28, n. 1, p. 227-231. 1966.

GAITÁN-ESPITIA, J. D.; MARTÍNEZ-SILVA, M. A.; BORRERO, C. E. Cryogenic preservation of sperm from lane snapper (*Lutjanus synagris*): Testing the effects of extenders and freezing rates on sperm quality. **Aquaculture**, Irlanda, v. 384, n. 13, p. 6–12, 2013.

GALLEGO, V.; PÉREZ, L.; ASTURIANO, J.F.; YOSHIDA, M. Relationship between spermatozoa motility parameters, sperm/egg ratio, and fertilization and hatching rates in pufferfish (*Takifugu niphobles*). **Aquaculture**, Irlanda, v. 416, n. 47, p. 238–243, 2013.

GODINHO, H.P.; AMORIM, V.M.C.; PEIXOTO, M.T.D. Criopreservação do sêmen de *Tilapia nilotica Oreochromis niloticus*, var. chitralada: crioprotetores, soluções ativadoras e refrigerador criogênico. **Rev. Bras. Zootec.**, Brasília, v. 32, n. 6, p. 1537-1543, supl.1, 2003.

- GOMES, L. C.; URBINATI, E. C. Matrinxã (*Brycon amazonicus*). In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: Editora UFSM, 2005. p. 149-174.
- GOULDING, M. **The fishes of the forest**: exploration in amazonian natural history. Berkeley: University of California, 1980. p. 280.
- GOW, J. C.; JAMIESON, B. G. M.; LEUNG, K. P. Live preservation of fish gametes. In: JAMIESON, B. G. M. (Ed.). Reproductive biology and phylogeny (Agnathans and bony fishes). **Science Publishers**, Enfield, v. 8B, n. 1, p. 395-484. 2009.
- HOLT, W. V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, Woburn, v. 53, n. 1, p. 47-58, Jan. 2000.
- HORVATH, A. Novo produto substitui hipófise de carpas: agroinvest. **Revista Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, v. 34, n. 1 p. 1 - 2, març/abril. 1996.
- HOWES, G. Review of the genus *Brycon* (Teleostei, Characoidei). **Bull Brit Mus**, Londres, v. 43, n. 1, p. 1-47. 1982. Natural History
- KAVAMOTO, E.T.; FOGLI DA SILVEIRA, W.; GODINHO, H.M.; ROMAGOSA, E. Fertilização em *Prochilodus scrofa*, steindacher 1882, com sêmen criopreservado em nitrogênio líquido. In: CONGRESSO PAULISTA DE MEDICINA VETERINÁRIA, 1; CONFERÊNCIA ANUAL DA SPVM, 1., 1989, São Paulo. **Congresso...** São Paulo: [s.n.], 1989. p. 83.
- KAVAMOTO, E. T.; BARNABE, V. H.; CAMPOS, B. E. S.; ANDRADE-TALMELLI, E. F. Anormalidades morfológicas nos espermatozoides do curimatá, *Prochilodus scrofa* (steindachner, 1881) (Osteichthyes, Characiformes, Prochilodontidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 25, n.1, p. 61-66, 1999.
- KAYIM, M.; BOZKURT, Y.; OGRET MEN, F. Comparing the effectiveness of ovopel and carp pituitary extract (CPE) on artificial spawning of scaly carp (*Cyprinus carpio*). **Journal of Animal and Veterinary Advances**, Paquistão, v. 9, n. 1, p. 2589-2592, 2010.
- JAMROZ, M.; KUCHARCZYK, D.; HAKUC-BTAZOWSKA, A.; KREJSZEFF, S.; KUJAWA, R.; KUPREN, K.; KWIATKOWSKI, M.; TARGONSKA, K.; JARSKI, D.; CEJKO, B. I.; GLOGOWSKI, J. Comparing the effectiveness of ovopel, ovaprim, and LH-RH analogue used in the controlled reproduction of ide, *Leuciscus idus* (L.). **Archives of Polish Fisheries**, Polônia, v. 16, n. 4, p. 363-370, 2008.
- LEGENDRE, M.; BILLARD, R. Cryopreservation of rainbow trout sperm by deep-freezing. **Reprod. Nutr. Develop.**, França, v. 20, n. 6, p. 1859-1868, 1980.
- LEUNG, L. K. P. Cryopreservation of spermatozoa of the barramundi, *Lates niloticus* (Teleostei: Centropomidae). **Aquaculture**, Irlanda, v. 64, n. 1, 243-2, 1987.

- LOPES, J. P.; SOUZA, J. G.; ROCHA, M. C. F. Nova metodologia de hipofisectomia em curimatã *Prochilodus brevis* (Pisces, Prochilodontidae). **Rev. Bras. Eng. Pesca**, Maranhão, v.1, n.1, p. 91-101, 2006.
- MARIA, A. N.. **Diluidores e crioprotetores no resfriamento e congelamento do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)**. 2005. 71 f. Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal de Lavras- Ufla, Lavras, 2005.
- MARIA, A. N.; VIVEIROS, A. T. M.; FREITAS, R. T. F.; OLIVEIRA, A. V. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. **Aquaculture**, Irlanda, v. 260, p. 298-306, 2006.
- MARIA, A. N.; AZEVEDO, H. C.; SANTOS, J. P.; SILVA, C. A.; CARNEIRO, P. C. F.. Semen characterization and sperm structure of the Amazon tambaqui *Colossoma macropomum*. **J. Appl. Ichthyol.**, Berlim, v. 26, p. 779-783. 7 jul. 2010.
- MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **Am. J. Physiology**, EUA, v. 247, p. 125-142, 1984.
- MEDINA, S. P. V. **Criopreservação do sêmen de pirapitinga *Piaractus brachypomus* (Pisces, Characidae)**. 2008. 76 f. Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal do Ceará, 2008. 76 p.
- MELO, F. C. S. A.; GODINHO, H. P. A protocol for cryopreservation of spermatozoa of the fish *Brycon orthotaenia*. **Anim. Reprod.**, USA, v. 3, n. 3, p. 380-385, Jul./Sept. 2006.
- MELO-MACIEL, M. A. P.; SALMITO-VANDERLEY, C. S. B.; LEITE, L. V.; OLIVEIRA, C. E.; OLIVEIRA, M. S.; J. T.; NUNES, J. F. Métodos de avaliação da qualidade do sêmen criopreservado de characiformes brasileiros. **Ciência Animal**, Goiás, v. 22, n. 1, p. 269-28. 2012.
- MURGAS, L. S. D; FRANCISCATTO, R. T.; SANTOS, A. G. O. Avaliação espermiática pós-descongelamento em piracanjuba (*Brycon orbignyanus*), Valenciennes, 1849). **Rev Brasil Zootec**, Brasília, v. 32, p. 1810–1814, 2004.
- MURGAS L. D. S., MILIORINI, A. B., FONSECA, F. R. T., PEREIRA, G. J. M. Criopreservação do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) mediante adição de diferentes diluidores, ativadores e crioprotetores. **R. Bras. Zootec.**, Brasília, v. 36, n. 3, p. 526-531, 2007.
- MYLONAS, C. C.; FOSTIER, A.; ZANUY, F. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. **General and Comparative Endocrinology**, Maryland Heights, v. 165, p. 516–534, 2010.
- NAKAYAMA, C. L. **Reprodução induzida e criopreservação do sêmen de papaterra *Menticirrhus americanus* (Perciformes: Sciaenidae)**. 2011. 89 f. Tese (Doutorado)- Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande, 2011.

NASCIMENTO, A. F.; MARIA, A. N.; PESSOA, N. O.; CARVALHO, M. A. M.; VIVEIROS, A. T. M. Out-of-season sperm cryopreserved in different media of the Amazonian freshwater fish pirapitinga (*Piaractus brachypomus*). **Animal Reproduction Science**, Illinois, v. 118, p. 324-329. 2010.

NINHAUS-SILVEIRA, A. **Caracterização espermática, preservação criogênica e fertilidade do matrinxã, *Brycon cephalus* gunther, 1860 (Teleostei, Characidae)**. 2000. 47 f. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2000.

NINHAUS-SILVEIRA, A.; FORESTI, F.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R. SENHORINI, J. A. Seminal, analysis, cryogenic preservation, and fertility in matrinxã fish, *Brycon cephalus* (Günther, 1869). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 49, p. 651-659, 2006.

OLIVEIRA, A. V.; VIEIROS, A. T. M.; MARIA, A. N.; FREITAS, R. T. F.; IZAÚ, Z. A. Sucesso do resfriamento e congelamento de sêmen de pirapitinga *Brycon nattereri*. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 59, p. 1509-1515, 2007.

RAMIREZ-MERLANO, J.; MEDINA-ROBLES, V.M.; CRUZ-CASALLAS, P.E. Variación estacional de las características seminales del bagre rayado *Pseudoplatystoma metaense* (Teleostei, pimelodidae). **REVISTA MVZ Córdoba**, Colômbia, v. 16, n. 1, p. 2336-2348. 2011.

RAMIREZ-MERLANO, J.; VELASCO-SANTAMARIA Y. M.; MEDINA-ROBLES, V. M.; CRUZ-CASALLAS, P. E. Cryopreservation effects on the sperm quality of cachama blanca *Piaractus brachypomus* (Cuvier 1818). **Aquaculture Research**, Irlanda, v. 42, p. 738-745, 2011.

RAVINDER, K.; NASARUDDIN, K.; MAJUMBAR, K.C.; SHIVAJI, S. Computerized analysis of motility, motility patterns and motility parameters of spermatozoa of carp following short-term storage of semen. **J. Fish Biol.**, Oxford, v. 50, p.1309-1328, 1997.

REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS JUNIOR, C. J. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. 729 p.

RIBEIRO, S. C. A. **Secagem e defumação líquida de filé de peixe matrinxã (*Brycon cephalus*)**. 2000. 101 f. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos)- Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2000.

ROMAGOSA, E.; NARAHARA, M. Y.; BORELLA, M. I.; PARREIRA, S. F.; FENERICH-VERANI, N. Ultrastructure of the germ cells in the testis of matrinxã, *Brycon cephalus* (Teleostei, Characidae). **Tissue & Cell**, Oxford, v. 31, n. 6, p. 540–544, 1999.

ROMAGOSA, E.; NARAHARA, M. Y.; AYROZA, L. M. S.; BORELLA, M. I.; FENERICH-VERANI, N. Reproductive cycle of male matrinxã, *Brycon cephalus*(GÜNTHER, 1869) (TELEOSTEI: CHARACIDAE). **Braz. J. morphol. Sci.**, São Paulo, v. 17, p. 101 – 105, 2000.

- ROTTMANN, R. W.; SHIREMAN, J. V.; CHAPMAN, F. A. Hormone preparation, dosage calculation, and injection techniques for induced spawning of fish. **Southern Regional Aquaculture Center**, Mississippi, v. 425, p. 1-3, 1991.
- RURANGWA, E.; VOLCKAERT, F. A. M.; HUYSKENS, G.; KIME, D. E.; OLLEVIER, E. Quality control of refrigerated and cryopreserved semen using computer-assisted sperm analysis (CASA), viable staining and standardized fertilization in african catfish (*Clarias gariepinus*). **Theriogenology**, Inglaterra, v. 55, n. 1, p. 751-769, 2001.
- RURANGWA, E.; ROELANTS, I.; HUYSKENS, G.; EBRAHIMI, M.; KIME, D. E.; OLLEVIER, F. The minimum effective spermatozoa:egg ratio for artificial insemination and effects of mercury on sperm motility and fertilization ability in *Clarias gariepinus*. **J. Fish Biol.**, Oxford, v. 53, p. 402-13, 1998.
- SADEGUI, A.; IMANPOOR, M. R. Effects of use of combinations of permeating cryoprotectant (MeOH, DMSO) and non permeating cryoprotectant (BSA) on viability of beluga (*Huso huso*) post-thawed sperm. **World Journal of Fish and Marine Sciences**, Egito, v. 5, n. 6, p. 593-597, 2013.
- SANCHES, E. A.; BOMBARDELLI, R. A.; BAGGIO, D. M.; SYKORA, R. M.; XAVIER, A. M. M. Características seminais do cascudo-preto (*Rhinelepis aspera*). **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v. 3, n. 35, p. 357-362, 2011.
- SANCHES, E. A.; MARCOS, R. M.; OKAWARA, R. Y.; CANEPPELE, D.; BOMBARDELLI, R. A.; ROMAGOSA, E. Sperm motility parameters for *Steindachneridion parahybae* based on open-source software. **J. Appl. Ichthyol.**, Berlim, v. 29, n. 1, p.1114–1122, 2013.
- SARVI, K.; NIKSIRAT, H.; MOJAZI AMIRI, B.; MIRTORABI, S. M.; RAFIEE G.R.; BAKHTIYARI, M. Cryopreservation of semen from the endangered Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*). **Aquaculture**, Irlanda, v. 256, p. 564-569, 2006.
- SHIMODA, E.; ANDRADE, D. R.; VIDAL JÚNIOR, M. V.; GODINHO, H. P.; YASUI, G. S. Determinação da razão ótima de espermatozoides por ovócitos de piabanha *Brycon insignis* (Pisces - Characidae). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 59, n. 4, p. 877-882. 2007.
- SHIMODA, E.; ANDRADE, D. R.; VIDAL JÚNIOR, M. V.; YASUI, G. S.; SILVA, J. F. S.; GODINHO, H. P.; SOUZA, G. efeitos da osmolaridade sobre a motilidade espermática na piabanha *Brycon insignis*. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 54, n. 315, p. 430-433, 2007.
- STEIN, H.; BAYRLE, H. Cryopreservation of sperm of some fresh water teleosts. **Ann. Biol. Anim. Biophys**, França, v. 18, p.1073-6, 1978.
- STREIT JUNIOR, D. P.; OLIVEIRA, A. C.; RIBEIRO, R. P.; SIROL, R. N.; MORAES, G. V.; GALO, J. M.; DIGMAYER, M. Motilidade, vigor e patologias seminal in natura e pós criopreservação de *Piaractus mesopotamicus*. **B. Inst. Pesca**, São Paulo, v. 2, n. 35, p.159-167, 2009.

TIERSCH, T.R. Strategies for commercialization of cryopreserved fish semen. **R. Bras. Zootec.**, Brasília, v. 37, p. 15-19, 2008. Suplemento Especial.

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

VIVEIROS, A. T. M.; SO, N.; KOMEN, J. Sperm cryopreservation of african catfish *Clark garieninus*: cryoprotectants, freezing rates and sperm:egg dilution ratio. **Theriogenology**, Inglaterra, v. 54, n. 1, p. 395-408, 2000.

VIVEIROS, A. T. M.; FESSEHAYE, Y.; TER VELD M.; SZULTZ R.W.; KOMEN J. Hand-stripping of semen and semen quality after maturational hormone treatments, in African catfish *Clarias gariepinus*. **Aquaculture**, Irlanda, v. 213, p. 373-386. 2002.

VIVEIROS, A. T. M.; OLIVEIRA, A. V.; MARIA, A. N.; ORFÃO, L. H.; SOUZA, J. C. Sensibilidade dos espermatozoides de dourado (*Salminus brasiliensis*) a diferentes soluções crioprotetoras. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 61, n. 4, p. 883-889, 2009.

VIVEIROS, A. T.; NASCIMENTO, A. F.; ORFÃO, L. H.; ISAÚ, Z. A. Motility and fertility of the subtropical freshwater fish streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) sperm cryopreserved in powdered coconut water. **Theriogenology**, Inglaterra, v. 74, n. 1, p. 551–556, 2010.

VIVEIROS, A. T. M.; AMARAL, T. B.; ORFÃO, L. H.; ISAÚ, Z. A.; CANEPPEL, D.; LEAL, M. C. Sperm cryopreservation of tiete tetra *Brycon insignis* (Characiformes): effects of cryoprotectants, extenders, thawing temperatures and activating agents on motility features. **Aquaculture Research**, Irlanda, v. 42, p.858-865, 2011.

VIVEIROS, A. T. M.; MARIA, A. N.; ORFÃO, L. H.; NASCIMENTO, A. F.; CORRÊA, F. M.; CANEPPELE, D. Effects of extenders, cryoprotectants and freezing methods on sperm quality of the threatened Brazilian freshwater fish pirapitinga-do-sul *Brycon opalinus* (Characiformes). **Theriogenology**, Philadelphia, v. 1, n., p. 1-8, 2012a.

VIVEIROS, A. T. M.; ORFÃO, L. H.; AMARAL, T. B.; ORFÃO, L. H.; ISAÚ, Z. A.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R. Spermatozoon ultrastructure and sperm cryopreservation of the Brazilian dry season spawner fish pirapitinga, *Brycon nattereri*. **Aquaculture Research**, Irlanda, v. 43, p. 546–555, 2012b.

WATSON, P. F. Recent Developments and Concepts in the Cryopreservation of Spermatozoa and the Assessment of their Post-thawing Function. **Reprod. Fertil. Dev.**, Reino Unido, v. 7, p. 871-91, 1995.

WOYNAROVICH, E.; HOVARTH, L. **A propagação artificial de peixes de águas tropicais**. Brasília: FAO/CODEVASF– CNPq, 1983. 220 p.

YASUI, G. S.; ARIAS-RODRIGUEZA, L.; FUJIMOTOA, T.; ARAI, K. A sperm cryopreservation protocol for the loach *Misgurnus anguillicaudatus* and its applicability for other related species. **Animal Reproduction Science**, Illinois, v. 116, p. 335–345, 2009.

ZANIBONI FILHO, E.; WEINGARTNER, M. Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v. 31, n. 3, p.367-373. 2007.

ZOHAR, Y.; MYLONAS, C. C. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. **Aquaculture**, Irlanda, v. 197, p. 99-136, 2001.

## **OBJETIVOS**

### **Geral**

Contribuir com o desenvolvimento técnico-econômico da aquicultura e da preservação “ex situ” das espécies de peixes neotropicais, através da ampliação do conhecimento da sua biologia reprodutiva e do aperfeiçoamento de técnicas de indução hormonal, de avaliação seminal e da tecnologia para criopreservação de espermatozoides, visando à formação de um futuro Banco de Germoplasma.

### **Específicos**

- 1) Melhorar a técnica de indução hormonal para reprodução de *Brycon cephalus* através da utilização de diferentes doses de ovopel.
- 2) Conhecer e avaliar as características seminais e espermáticas de *Brycon cephalus*, no que se refere a características físico-químicas do líquido seminal (pH, osmolaridade), concentração espermática, duração da motilidade espermática, velocidades (curvilíneas e linear), integridade espermática, coloração e volume seminal médio.
- 3) Desenvolver métodos de congelamento e descongelamento para o sêmen de *Brycon cephalus*, que preservem a integridade e a viabilidade das células espermáticas.
- 4) Determinar o grau de fertilidade e, portanto, o nível de viabilidade dos espermatozoides criopreservados.

## **CAPÍTULO 1 – Aplicação de dosagens hormonais de Ovopel em machos de *Brycon cephalus*.**

### **RESUMO**

Este trabalho teve como objetivo avaliar a utilização de Ovopel® associado a um inibidor de dopamina, na indução a espermiacção de *Brycon cephalus*. Utilizou-se 20 machos, com peso médio de 0,4kg. Foram separados quatro tanques. Foi aplicada dosagem única de Ovopel® (Interfish, Hungria), hormônio liberador de gonadotrofina (GnRha) com inibidor dopaminérgico. O grupo controle aplicou-se somente soro fisiológico (0,9%NaCl), nos outros machos dos tanques restantes foram separados em 3 diferentes dosagens hormonais de Ovopel®, 1mg/kg (T1), 2 mg/kg (T2) e 4 mg/kg (T3). Ambos diluídos em 0,5 mL de soro fisiológico (0,9%NaCl). Posteriormente foi realizado as análises dos parâmetros seminais: volume seminal, motilidade espermática subjetiva, duração da motilidade, pH, osmolaridade e concentração espermática. Após indução hormonal houve aumento no volume seminal. O tratamento 3 ( $4,66\pm 1,52$  mL) apresentou maior volume seminal em relação ao controle ( $2,37\pm 1,14$  mL). Já o volume seminal do tratamento 2 ( $3,54\pm 1,35$  mL) foi semelhante ao tratamento 3. Os parâmetros espermáticos pH, osmolaridade e concentração espermática, não demonstraram diferença significativa com o controle ou entre os tratamentos. A motilidade espermática apresentou percentual elevado nos tratamentos 2 e 3, com escala 5 (81-100%), em relação ao controle que teve escala 4 (61-80%). Em relação à duração da motilidade espermática, o tratamento 3 apresentou a menor duração de motilidade com  $22\pm 5$ s, em relação aos outros tratamentos e ao controle. As dosagens hormonais de 2 e 4mg/kg de Ovopel®, demonstraram através das análises dos parâmetros seminais, serem as mais adequadas para indução hormonal de machos de *B. cephalus*, por apresentarem melhor qualidade seminal.

**Palavras-chave:** pH. Osmolaridade. Motilidade. Concentração espermática.

## Application of hormone dosages Ovopel in males *Brycon cephalus*.

### ABSTRACT

This study aimed to evaluate the use of Ovopel® associated with a dopamine inhibitor, on the induction of spermiation *Brycon cephalus*. We used 20 males, with an average weight of 0.4 kg. Four tanks were separated. Single dose of Ovopel® (Interfish, Hungary), gonadotropin releasing hormone (GnRHa) with a dopaminergic inhibitor was applied. The control group was applied physiological saline only (0.9% NaCl) in the other tanks of the remaining males were divided into 3 different dosages of hormonal Ovopel®, 1mg/kg (T1), 2 mg / kg (T2) and 4 mg / kg (T3). Both diluted in 0.5 ml saline (0.9% NaCl). Seminal volume, subjective sperm motility, duration of motility, pH, osmolarity and sperm concentration : Following the analysis of seminal parameters was performed. After hormone injection there was an increase in semen volume. Treatment 3 ( $4.66 \pm 1.52$  mL) showed higher semen volume compared to control ( $2.37 \pm 1.14$  mL). Have the seminal volume of treatment 2 ( $3.54 \pm 1.35$  mL) was similar to treatment 3. Sperm parameters pH, osmolality and sperm concentration, showed no significant difference with the control or between treatments. Sperm motility showed high percentage in treatments 2 and 3, with level 5 (81-100 %) compared to the control that had scale 4 (61-80 %). Regarding the duration of sperm motility, treatment 3 had the lowest duration of motility with  $22 \pm 5$  seconds, compared to the other treatments and control. Hormone levels 2 and 4mg/kg of Ovopel®, demonstrated through the analysis of seminal parameters, are most appropriate for hormonal induction of males of *B. cephalus*, because they have better semen quality.

**Keywords:** pH. Osmolarity. Motility. Sperm concentration.

## 1 Introdução

Espécies de peixes reofílicas necessitam do estímulo da variação sazonal dos fatores abióticos ambientais (velocidade de corrente, pH, temperatura, pluviosidade, luminosidade, etc..) e da migração reprodutiva (Piracema) para que ocorra o desenvolvimento gonadal e a reprodução efetiva. Entretanto, quando criadas em cativeiro, estas espécies estão privadas do ato migratório e muitos dos parâmetros abióticos da água são controlados, não induzindo ao fechamento do ciclo reprodutivo. Deste modo, há a necessidade da aplicação de técnicas de indução hormonal à reprodução. Que terá a função de induzir à maturação gonadal final e liberação dos gametas. Estas técnicas de reprodução artificial irão, permitir a produção destas espécies migratórias em cativeiro (Carneiro e Mikos, 2008; Mylonas, et al., 2010).

A indução hormonal funciona como um “gatilho” que a partir desta, desencadeia uma série de reações neuroendócrinas em cascata no eixo-reprodutivo (hipotálamo-hipófise-gônada), levando o estímulo aos locais de produção e ação dos hormônios ligados à reprodução, que são os hormônios liberadores de gonadotrofina (GnRH) e os hormônios gonadotróficos: hormônio folículo estimulante (FSH ou GtHI) e hormônio luteinizante (LH ou GtHII) (Nakayama, 2011). Em geral, esses hormônios indutores exógenos, apesar de terem o mesmo propósito, estimular o desenvolvimento das gônadas, diferem quanto ao órgão-alvo de cada hormônio, (GnRH – hipófise; LH e FSH - gônadas) (Mylonas et al., 2010).

Os indutores hormonais mais utilizados para estimular a espermiacção de espécies reofílicas são:

- Extrato Bruto Hipofisário (EBH) dentre as espécies tratadas, podemos citar, *B. cephalus* (Ninhaus-Silveira et al., 2006), *Pseudoplatystoma* spp (Crepaldi et al., 2006), carpa (Godinho e Godinho, 1986), *Astyanax bimaculatus* e *Tetragonopterus chalceus* (Sato et al., 2006) e *Salminus hilarii* (Honji et al., 2011);

- e Análogos de Hormônios Liberadores de Gonadotrofinas (GnRHa) associados com um inibidor de dopamina – podendo destacar espécies como *Prochilodus lineatus*, *Piaractus mesopotamicus* e *Brycon orbygnianus* (Paulino et al. 2011), *Leuciscus idus* (Jamróz et al., 2008), *Cyprinus carpio* (Kayim et al., 2010), *Barbus barbus* (Targonska et al., 2011) e *Rhamdia quelen* (Carneiro e Mikos, 2008).

A utilização de hipófise para a indução a desova de peixes reofílicos, apesar de ser o método mais difundido na piscicultura, apresenta algumas desvantagens, dentre elas: não há uma padronização da concentração de hormônios gonadotróficos nesta; possui não só hormônios gonadotróficos (FSH e LH), mas também hormônios de crescimento e osmorreguladores, entre outros, o que causa pode causar resultados irregulares, estresse nos reprodutores, reduzindo a vida útil destes (Mylonas et al., 2010). Existe também a possibilidade das hipófises dessecadas transmitirem doenças aos animais receptores, devido ao baixo controle sanitário na produção e procedência (Donaldson e Hunter, 1983). Além disso, a comercialização e a utilização do extrato bruto de hipófise encontram-se proibido em algumas regiões do Brasil, devido a questões sanitárias.

Deste modo, este trabalho teve como objetivo estabelecer um protocolo de indução a produção seminal pelo uso do Ovopel® (D-Ala6, Pro9 Net-mGnRH), de machos de *Brycon cephalus*, que propicie o aumento do volume seminal mantendo a qualidade do sêmen. Segundo Carneiro e Urbinati (2002) *B. cephalus* é uma espécie de peixe natural da Bacia Amazônica, muito apreciada na culinária, na pesca esportiva e para a produção aquícola, devido a sua adaptabilidade ao cativeiro.

## **2 Material e Métodos**

Utilizou-se exemplares adultos de *Brycon cephalus*, com dois anos de idade e peso médio de 0,4 kg, provenientes do plantel existente no Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais - CEPTA/ICMBIO, Pirassununga, São Paulo, Brasil.

### **2.1 Delineamento Experimental**

Após seleção, os machos foram separados em quatro tanques de concreto, cada um contendo cinco exemplares (n=5). Como indutor hormonal foi utilizado o

produto Ovopel<sup>®</sup> (Interfish, Hungria) que é composto por GnRHa associada ao um inibidor de dopamina, o metoclopramide (D-Ala6,Pro9 Net-mGnRH). Como tratamentos foram estabelecidos três diferentes dosagens hormonais, 1mg/kg (T1), 2 mg/kg (T2) e 4 mg/kg (T3) e um grupo controle (CO), no qual aplicou-se somente soro fisiológico (0,9% NaCl). Para diluição das dosagens hormonais foi utilizado 0,5 mL/kg de soro fisiológico (0,9% NaCl). Todos os tratamentos foram aplicados em dose única.

## **2.2 Coleta do sêmen**

Após aproximadamente 165 hora/graus ( $t = 6$  horas;  $T_{média} = 27$  °C) do momento da indução foi realizada coleta do sêmen, por meio de massagem abdominal, no sentido antero-posterior do corpo, sendo as amostras coletadas em tubos de ensaio graduados, previamente limpos e esterilizados. A seguir a cada coleta foi realizada a análise dos parâmetros seminais quanto ao volume seminal, a motilidade espermática subjetiva, a duração da motilidade, ao pH, a osmolaridade e a concentração espermática.

## **2.3 Avaliação dos parâmetros seminais**

Para estimar a motilidade espermática subjetiva foi utilizado o método de Fribourgh (1966), que estabelece uma escala arbitrária de valores que varia de 0 a 5, sendo o menor valor para as amostras sem nenhum espermatozoide (sptz) móvel e o valor máximo para aquelas que apresentarem 80% ou mais de células móveis. Para tal, uma gota de sêmen foi colocada em lâmina histológica e ativada com água do meio na proporção de 1:10 (sêmen:água destilada). A duração da motilidade foi mensurada em segundos desde a ativação dos espermatozoides até observação de 10% dos espermatozoides móveis.

Para análise do pH o sêmen foi colocado em tubos ependorf e mensurado por meio do peagâmetro (CHECKER by HANNA Instruments<sup>®</sup>, Romania, USA). Já para a osmolaridade, o sêmen foi centrifugado a 3.000 rpm durante 20 minutos, o sobrenadante foi retirado e analisado no osmômetro crioscópico (OSMOMAT<sup>®</sup> model 030, Berlim, Alemanha).

Para determinação da concentração espermática, o sêmen foi diluído em solução formol-salina na proporção 1:1000 (sêmen:solução) sendo a contagem feita em câmara hematómica de Neubauer para determinação da média de espermatozoides por mL (Sptz/mL).

$$\text{Sptz/mL} = [(\sum_n((\sum_2 \text{células das grades: } 2) \sum_3 \text{ repetições p/amostra: } 3)): n^* 50.000] * 1000$$

- n = quantidade de machos.

### 2.4 Análise estatística

Aos dados foi aplicada teste de normalidade (Shapiro-Wilk) e de homogeneidade (Bartlett). Para dados não paramétricos foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis. Os resultados que apresentaram diferença significativa ( $p < 0.05$ ), aplicaram-se ANOVA e Teste de Tukey. Rodados no programa estatístico R. Cada macho foi considerado como uma repetição ( $n = 5$ ).

## 3 Resultados

O tratamento 3 ( $4,66 \pm 1,52$  mL) foi o que propiciou a produção de maior volume seminal e estatisticamente diferente dos outros tratamentos (T1,  $2 \pm 0,9$  e T2,  $3,5 \pm 1,3$ ) e do controle ( $2,3 \pm 1,2$ ) (Fig. 1C). Quanto aos parâmetros pH, osmolaridade, relação volume/peso corporal e concentração espermática não demonstraram diferença significativa entre os tratamentos (Fig. 1A, Tabela 1).

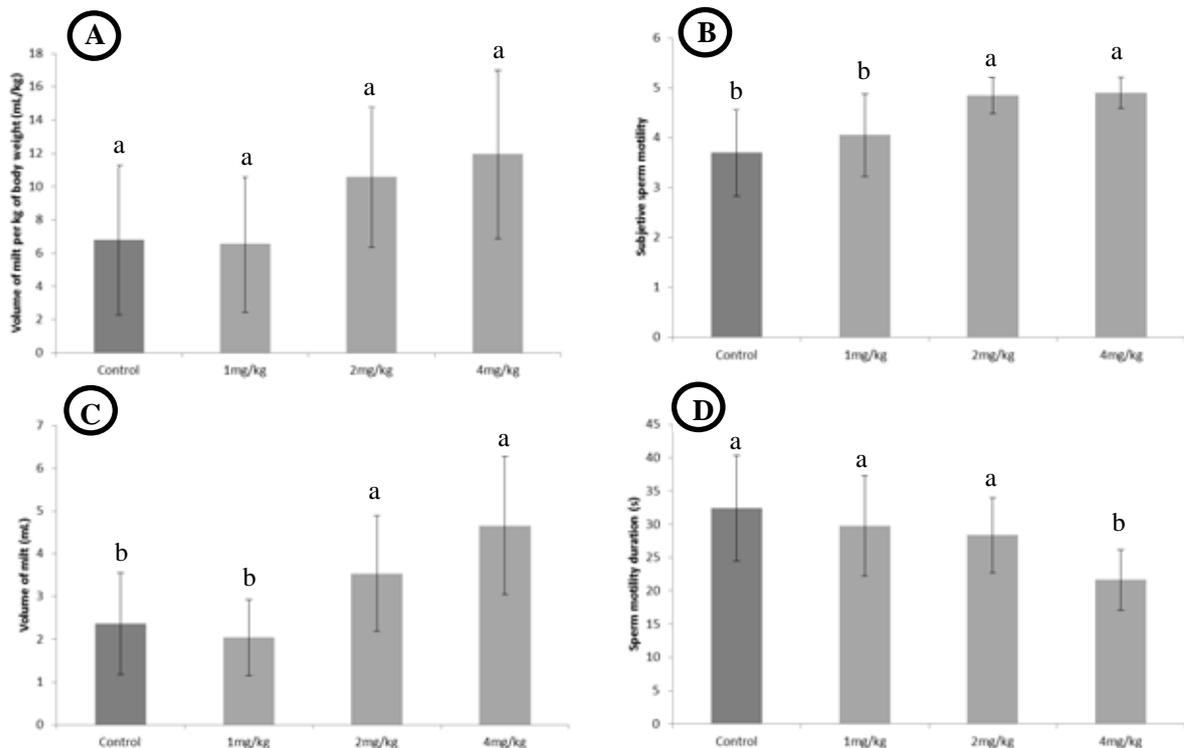
**Tabela 1** – Parâmetros seminais de *B. cephalus* após indução hormonal em diferentes dosagens ( $n=5$ ).

MACHO	PESO(kg)	COMPRIMENTO (cm)	pH	OSMOLARIDADE (mOsm/kg)	Concentração Espermática ( $\times 10^9 \text{ mL}^{-1}$ )
Controle	$0,385 \pm 0,07$	$30,25 \pm 2,21$	$7,83 \pm 0,23a$	$0,265 \pm 0,02a$	$6,82 \pm 3,9a$
T1	$0,346 \pm 0,03$	$29,917 \pm 1,36$	$7,96 \pm 0,25a$	$0,287 \pm 0,02a$	$4,52 \pm 1,7a$
T2	$0,332 \pm 0,07$	$29,55 \pm 1,98$	$7,79 \pm 0,23a$	$0,286 \pm 0,02a$	$6,28 \pm 1,7a$
T3	$0,412 \pm 0,06$	$31,917 \pm 1,77$	$8,18 \pm 0,09a$	$0,294 \pm 0,01a$	$8,1 \pm 3,4a$

\*Controle (soro fisiológico), tratamento 1 (1mg/kg ovopel), tratamento 2 (2mg/kg ovopel) e tratamento 3 (4mg/kg ovopel).

A motilidade espermática apresentou percentual elevado nos tratamentos 2 e 3, com nível 5, não diferindo entre si, mas diferem estatisticamente do tratamento 1 do controle que tiveram nível 4 para motilidade espermática subjetiva. Já a motilidade dos espermatozoides do tratamento 1 não diferiram dos valores apresentados pelo controle (Fig. 1B). Em relação à duração da motilidade espermática, o tratamento 3 apresentou a menor duração de motilidade com  $22\pm 4s$ , em relação aos outros tratamentos (T1,  $30\pm 7s$  e T2,  $28\pm 6s$ ) e ao controle ( $32\pm 8s$ ) (Fig. 1D).

**Figura 1 – Parâmetros espermáticos do sêmen de *B. cephalus*.** **A** - Volume de sêmen por kilo do peso corporal, **B** – Motilidade espermática subjetiva, escala de Fribourgh (1966), níveis de 0-5, **C**- Volume seminal, **D**- Duração da motilidade espermática, obtidos após indução hormonal com 1mg/kg (T1, n=5), 2mg/kg (T2, n=5) e 4mg/kg (T3, n=5) de Ovopel® e grupo controle (n=5). As colunas representam a média dos valores encontrados e as barras correspondem ao desvio padrão. Barras com diferentes letras indicam diferenças significativas ( $p<0.05$ ).



Fonte: Bashiyo-Silva (2014).

#### 4 Discussão

O uso de análogos como o Ovopel® em espécies reofílicas é pouco estudada. Dos trabalhos já realizados com algumas espécies a dosagem testada foi

de de 1mg/kg de Ovopel®. Cejko et al. (2012), Argonska et al. (2011) e Jamróz et al. (2008) além de verificarem que a indução a espermição com o Ovopel® foi efetivo, observaram também que o uso de Ovaprim® (composto do mesmo análogo) apresentou resultados melhores que o Ovopel®, quanto ao volume seminal e motilidade espermática. Entretanto estes resultados baixos podem ser devido a quantidade de Ovopel® utilizado para a aplicação hormonal.

Muitos dos trabalhos se atentam se a aplicação hormonal é eficaz em fêmeas, pois os machos conseguem espermiar mesmo em cativeiro, porém liberam sêmen em menor quantidade quando a retirada é por massagem abdominal. Assim a indução hormonal tem como objetivo principal estimular a espermatogênese e aumentar a produção do líquido seminal (MYLONAS, FOSTIER, ZANUY, 2010).

Assim, este aumento do volume seminal é importante para facilitar a aplicação de técnicas como a criopreservação de sêmen, além de diminuir a necessidade de um grande número de machos nos processos de reprodução artificial. Para pisciculturas a vantagem na redução do plantel esta concomitantemente ligada à redução dos custos quanto à ração, mão-de-obra e quantidade de tanques (CARNEIRO, MIKOS, 2008). A relação volume seminal/peso corporal indica se o peso influencia na quantidade de sêmen liberado pelo peixe. Por não ter apresentado diferença entre os tratamentos indica que a diferença obtida no volume após a aplicação com as diferentes dosagens não foram afetados pelo peso apresentado pelo peixe.

O fato de não ter ocorrido alteração na concentração espermática entre os diferentes tratamentos é um indicativo de viabilidade das dosagens hormonais, pois não houve alteração na produção final de espermatozoides. Como afirma Pardo-Carrasco et al. (2006) que alterações nos valores da concentração espermática influenciam na produção do fluido seminal do que na espermatogênese. Quanto ao pH e osmolaridade, Billard e Cosson (1992), informam que valores de osmolaridade na faixa de 150-200 mOsmol/kg podem iniciar a motilidade espermática além do que a alteração do pH seminal pode causar alteração na ativação espermática. A manutenção destes parâmetros é um indicativo de que não houve contaminação com fezes ou urina na hora da coleta.

Com base nos dados relatados, o tratamento com dosagem de 2mg/kg por apresentar um tempo maior na duração espermática, se torna a dosagem mais adequada para a aplicação hormonal com Ovopel® para *B. cephalus*, pois o tratamento com dosagem de 4mg/kg mesmo tendo apresentado alta motilidade teve baixa duração espermática.

## 5 Conclusão

As dosagens hormonais de 2 mg/kg de Ovopel®, demonstrou através das análises dos parâmetros seminais, ser a mais adequada para indução hormonal de machos de *B. cephalus*.

## Referências

- BILLARD, R. E.; COSSON, M. P. Some problems related to the assessment of sperm motility in fresh water motility. **The journal of Experimental Zoology**, Nova York, v. 261, p.122-131,1992.
- CARNEIRO, P. C. F.; MIKOS, J. D. Gonadotrofina coriônica humana e hormônio liberador de gonadotrofina como indutores da reprodução do jundiá. **Acta Science Animal**, Maringá, v. 30, n. 3, p. 345-350, 2008.
- CARNEIRO, P. C. F.; URBINATI, E.C. Transport stress in matrinxã, *Brycon cephalus* (Teleostei: Characidae), at different densities. **Aquaculture International**, Irlanda, v. 34, p. 1-9. 2002.
- CEJKO, B. I.; TARGONSKA, K.; KOWALSKI, R. K.; ZARSKI, D.; SAROSIEK, B.; KUCHARCZYK, D.; GLOGOWSKI, J. The effectiveness of hormonal preparations (Ovopel, Ovaprim, LHRHa, hCG and CPE) in stimulating spermiation in dace *Leuciscus leuciscus* (L.). **Journal Applied Ichthyology**, Germany, v. 28, n. 1, 873–877. 2012.
- CREPALDI, D. V; FARIA, P. M. C.; TEIXEIRA, E. A.; RIBEIRO, L. P.; COSTA, A. A. P.; MELO, D. C.; CINTRA, A. P. R.; PRADO, S. A.; COSTA, F. A. A.; DRUMOND, M. L.; LOPES, V. E.; MORAES, V. E. Utilização de hormônios na reprodução induzida do surubim (*Pseudoplatystoma* spp). **Revista Brasileira Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 30, n. 3/4, p. 168-173, 2006.
- DONALDSON, E. M & HUNTER G. M. Induced final maturation, ovulation, and spermiation. **Fish Physiology**, New York, v. 9, p. 351-403, 1983.
- DZYUBA, V. E COSSON, J. Motility of fish spermatozoa: from external signaling to flagella response. **Reproductive Biology**, Polônia, v. 101, p. 1-11, 2014.
- FRIBOURGH, J. H. The application of a differential staining method to low-temperature studies on goldfish spermatozoa. **Progressive Fish Culturist**, Philadelphia, v. 28, p. 227-31, 1966.

GODINHO, H.P.; GODINHO, A.L. Induced spawning of the pacu, *Colossoma mitrei* (Berg1895), by hypophysation with crude carp pituitary extract. **Aquaculture**, Irlanda, v. 55, p. 69-73, 1986.

HONJI, R. M; MELLO, P. H; ARAÚJO, B. C; RODRIGUES-FILHO, J. A; HILSDORF A. E. S; MOREIRA, R. G. Influence of spawning procedure on gametes fertilization success in *Salminus hilarii* Valenciennes, 1850 (Teleostei: Characidae): implications for the conservation of this species. **Neotropical Ichthyology**, Porto Alegre, v. 9, n. 3, p. 363–370. 2011.

JAMROZ, M.; KUCHARCZYK, D.; HAKUC-BTAZOWSKA, A.; KREJSZEFF, S.; KUJAWA, R.; KUPREN, K.; KWIATKOWSKI, M.; TARGONSKA, K.; JARSKI, D.; CEJKO, B. I.; GLOGOWSKI, J. Comparing the effectiveness of ovopel, ovaprim, and LH-RH analogue used in the controlled reproduction of ide, *Leuciscus idus* (L.). **Archives of Polish Fisheries**, Polônia, v.16, n. 4, p. 363-370, 2008.

KAYIM, M.; BOZKURT, Y.; OGRET MEN, F. Comparing the Effectiveness of Ovopel and Carp Pituitary Extract (CPE) on Artificial Spawning of Scaly Carp (*Cyprinus carpio*). **Journal of Animal and Veterinary Advances**, Paquistão, v. 9. p. 2589-2592, 2010.

MYLONAS, C. C.; FOSTIER, A.; ZANUY, F. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. **General and Comparative Endocrinology**, Maryland Heights, v. 165, p. 516–534, 2010.

NAKAYAMA, C. L. **Reprodução induzida e criopreservação do sêmen de papaterra *Menticirrhus americanus* (Perciformes: Sciaenidae)**. 2011.89 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande, 2011.

NINHAUS-SILVEIRA, A.; FORESTI, F.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R.; SENHORINI, J. A. Seminal, analysis, cryogenic preservation, and fertility in matrinxã fish, *Brycon cephalus* (Günther, 1869). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 49, p. 651-659, 2006.

PAULINO, M. S.; MILIRINI, A. B.; MURGAS, L. D. S.; LIMA, F. S. M.; FELIZARDO, V. O. Desempenho reprodutivo do pacu, piracanjuba e curimba induzidos com extrato de buserelina. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 37, p. 39–45. 2011.

SATO, Y.; SAMPAIO, E. V.; FERENICH-VERANI, N.; VERANI, J. R. Biologia reprodutiva e reprodução induzida de duas espécies de Characidae (Osteichthyes, Characiformes) da Bacia do São Francisco, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v. 23, n. 1, p. 267-273, 2006.

TARGOŃSKA, K.; KUCHARCZYK, D.; ŻARSKI, D.; CEJKO, B. I.; KREJSZEFF, S.; KUPREN, K.; KRÓL, R.; DRYL, K.; KOWALSKI, R. K.; GLOGOWSKI, J. Artificial reproduction of wild and cultured barbel *Barbus barbus* (Cyprinidae) under controlled conditions. **Acta Veterinaria Hungarica**, Hungria, v. 59, p. 363-72, 2011.

## **CAPÍTULO 2– Substâncias crioprotetoras e diluentes na criopreservação espermática de *Brycon cephalus*.**

### **RESUMO**

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de soluções crioprotetoras utilizando crioprotetores como o metilglicol, metanol, Bestvile Thawing Solution (BTS) e leite em pó na preservação dos espermatozoides de *B. cephalus*. Este trabalho avaliou soluções crioprotetoras: A- 5,4g glicose+15g leite em pó integral (Ninho fortificado Nestlé); B - 5g Bestvile Thawing Solution (BTS®) Minitub®, em 10 ou 15 mL de crioprotetor interno metilglicol e metanol. Para tal, foram utilizados seis exemplares adultos de *B. cephalus*. O sêmen coletado foi avaliado quanto a parâmetros de coloração, concentração espermática e motilidade subjetiva. O sêmen foi diluído na proporção de 1:5 (sêmen/diluyente), envasado em palhetas 0,5 ml (IMV) e congelado em vapores de nitrogênio líquido e posteriormente mantido em nitrogênio líquido. Para o teste de fertilidade o sêmen foi descongelado em banho-maria à 36°C por 12s e a fertilização dos ovócitos foi feita pelo método “a seco” numa proporção de 25000 espermatozoides/ovócito totais, com quatro repetições. Visando testar o sêmen que foi criopreservado, após o descongelamento foram realizadas análises deste no programa ISAS®CASA, feito o teste de fertilização e analisado em microscopia eletrônica de varredura para verificar as possíveis alterações morfológicas causadas pelo procedimento criogênico. Aos dados foi aplicado teste de ANOVA, ao nível de 5% de significância ( $\alpha < 0,05$ ). Das soluções crioprotetoras utilizadas, verificou-se que apenas o tratamento T7 (Metanol 15mL + BTS®) ( $3.7 \pm 4.4\%$ ) apresentou menor eficiência crioprotetora, diferindo significativamente em relação ao controle ( $\alpha < 0.05$ ). Somente VSL e STR que apresentaram correlação positiva com a fertilização ( $p < 0,05$ ). Concluindo que a solução crioprotetora mais adequada para o congelamento seminal de *B. cephalus* é o composto por metilglicol na proporção de 10 ou 15mL com BTS®, na proporção de 1:5.

**Palavras-chave:** Criopreservação. Sêmen. Espermatozoide. Fertilização.

**Cryoprotectant substances and extenders on sperm cryopreservation of *Brycon cephalus*.**

**ABSTRACT**

The objective of this study was to evaluate the efficiency of cryoprotectant solutions using cryoprotectants such as methyl glycol , methanol , Bestvile Thawing Solution ( BTS ) and powdered milk in the preservation of spermatozoa of *B. cephalus* . This study evaluated cryoprotectant solutions : A- 5.4 g glucose 15 g whole milk powder ( fortified Nestle Nest ) ; B - 5g Bestvile Thawing Solution (BTS ®) Minitub ®) in 10 or 15 mL of methanol and methyl cellosolve internal cryoprotectant . For this purpose, six adult specimens of *B. cephalus* were used. The collected semen was evaluated for staining parameters , sperm concentration and motility subjective . The semen was diluted at a ratio of 1:5 (semen / extender ) , packaged in 0.5 ml straws ( IMV ) and frozen in liquid nitrogen vapor and then kept in liquid nitrogen . To test the fertility semen was thawed in a water bath at 36 ° C for 12s and fertilization of oocytes was taken by " dry" in a ratio of 25000 sperm / oocyte total with four replications method. To test the semen was cryopreserved after thawing analyzes were performed in this ISAS ® HOME program , made the fertilization test and analyzed by scanning electron microscopy to determine possible morphological changes caused by the cryogenic procedure. Was applied to the data using ANOVA test at 5% level of significance (  $\alpha < 0.05$  ) . Of cryoprotectant solutions used , it was found that only the treatment T7 ( 15mL Methanol + BTS ® ) (  $3.7 \pm 4.4$  % ) showed a lower efficiency cryoprotecting , differing significantly from the control (  $\alpha < 0,05$  ) . Only VSL and STR which showed positive correlation with fertilization (  $p < 0.05$  ) . In conclusion that the most suitable cryoprotectant solution for freeze seminal *B. cephalus* is composed of methyl cellosolve in the ratio of 10 to 15mL with BTS ® at a ratio of 1:5 .

**Keywords:** Cryopreservation. Sperm. Spermatozoon. Fertilization.

## 1 Introdução

A fauna de peixes de água doce do Brasil é particularmente diversificada e muitas espécies são endêmicas, sendo por isso muito importante sua preservação. Várias destas espécies tem grande importância para a pesca artesanal e esportiva e, atualmente para a aquicultura. Muitas destas espécies necessitam realizar uma migração reprodutiva (piracema) para reproduzir, como também um acesso sazonal à lagoas de criação para o desenvolvimento de larvas e juvenis. Deste modo estas são particularmente sensíveis aos efeitos prejudiciais das variações climáticas, construção de hidrelétricas, urbanização, agricultura e a introdução de novas espécies (CAROLSFELD et al., 2003).

Visando a preservação das espécies de peixes neotropicais, técnicas de criopreservação do sêmen têm contribuído sensivelmente para o desenvolvimento e aplicação de metodologias visando o controle da reprodução, favorecendo a manipulação genética, a seleção de plantéis e a redução do estoque de machos pelo fato de tornar disponíveis os gametas a qualquer tempo. Soma-se a isso, a possibilidade da utilização de tal metodologia em programas de hibridação, programas de preservação de material genético de espécies em risco de extinção e o interesse e importância atual da implantação dos “bancos de genes” (NINHAUS-SILVEIRA et al., 2006).

Pesquisas em criogenia com espécies de peixes neotropicais aumentaram nos últimos anos, mas ainda são poucas numerosas e apontam para a necessidade de estudos mais profundos para o estabelecimento de técnicas específicas de criogenia que melhor se adaptem as nossas espécies (NINHAUS-SILVEIRA et al., 2002). Dentre os trabalhos de criogenia realizados com sêmen de espécies Neotropicais podemos destacar: *Oreochromis niloticus* (GODINHO; AMORIM; PEIXOTO, 2003), *Clarias gariepinus* (VIVEIROS; SO; KOMEN, 2000), *Cyprinus carpio* (HORVATH; MISKOLCZI; HURBANIY, 2003), *Pseudoplatystoma metaense* (RAMIREZ-MERLANO; MEDINA-ROBLES; CRUZ-CASALLAS, 2011), algumas espécies de teleósteos (STEIN; BAYRLE, 1978), revisão de peixes de água doce (VIVEIROS; GODINHO, 2009). Alguns problemas para o congelamento de sêmen de peixe estão ligados ao tipo de extensor e de substâncias crioprotetores a serem

utilizadas para protegerem as células espermáticas, que se não forem adequados acabam por inviabilizar os espermatozoides.

A espécie escolhida para o presente estudo o matrinxã, *Brycon cephalus* é natural da Bacia Amazônica, sendo muito apreciada na culinária, na pesca esportiva e para a produção aquícola, devido a sua adaptabilidade ao cativeiro (CARNEIRO; URBINATI, 2002).

Os diluentes mais utilizados para congelamento do sêmen de Characiformes continuam na composição do extensor glicose e como crioprotetor interno o dimetil sulfóxido (MURGAS, et al., 2004; CAROSFELD et al., 2003; NINHAUS-SILVEIRA et al. 2002, 2006; RAMIREZ-MERLANO et al., 2011). Atualmente tem se utilizado o Bestvile Thawing Solution (BTS®) em associação com o crioprotetor interno metilglicol em *Brycon insignis* (VIVEIROS et al., 2011, 2012a), *B. nattereri* (OLIVEIRA et al., 2007; VIVEIROS et al., 2012c), *B. opalinus* (VIVEIROS et al., 2012b), *Colossoma macropomum* (VARELA JUNIOR et al., 2006), *Piaractus brachypomus* (NASCIMENTO et al., 2010) e *Prochilodus lineatus* (VIVEIROS et al., 2009). Ou com metanol, *B. orbignyanus* (MARIA et al., 2006), *P. lineatus* (FELIZARDO et al., 2011; MURGAS et al., 2007). Entretanto também se tem trabalhos de metanol com leite em pó, *Leporinus obtusidens* (TAITSON; CHAMI; GODINHO, 2008), *B. orbignyanus* (CAROLSFELD et al., 2003), *P. lineatus* (PAULA et al., 2012). Muitos destes trabalhos utilizam a motilidade pós-descongelamento como resposta de viabilidade das soluções diluidoras, em vez de utilizarem a fertilização.

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de soluções crioprotetoras utilizando crioprotetores como o metilglicol, metanol, Bestvile Thawing Solution (BTS) e leite em pó na preservação dos espermatozoides de *B. cephalus*, buscando elaborar um protocolo de congelamento para esta espécie.

## **2 Material e métodos**

### **2.1 Coleta do sêmen.**

Foram utilizados exemplares adultos de *B. cephalus*, com peso médio de 1 kg, provenientes do plantel existente no Centro Nacional de Pesquisa e

Conservação de Peixes Continentais - CEPTA/ICMBIO, Pirassununga, São Paulo, Brasil.

Os machos foram induzidos hormonalmente a espermição (dose única de 1mg de Ovopel<sup>®</sup>/Kg peixe vivo). Após aproximadamente 162hora/graus (t = 6 horas; Tmédia = 27°C) foi realizada a coleta do sêmen por meio de massagem abdominal, no sentido antero-posterior do corpo, sendo as amostras coletadas em tubos de ensaio graduados, previamente limpos e esterilizados. Posteriormente realizou-se a análise dos parâmetros seminais de cada dosagem hormonal aplicada.

## **2.2 Avaliações espermáticas**

### *2.2.1 Sêmen fresco*

A coloração foi avaliada considerando os padrões básicos, transparente, branco e leitoso e as tonalidades intermediárias. Para estimar a motilidade espermática subjetiva foi utilizado o método de Fribourgh (1966), que estabelece uma escala arbitrária de valores que varia de 0 a 5, sendo o menor valor para as amostras sem nenhum espermatozoide (sptz) móvel e o valor máximo para aquelas que apresentarem 80% ou mais de células móveis, para tal uma gota de sêmen foi colocada em lâmina histológica e ativada com água do meio na proporção de 1:10 (sêmen:água destilada). A duração da motilidade foi mensurada em segundos desde a ativação dos espermatozoides até observação de 10% dos espermatozoides móveis. Para determinação da concentração espermática, o sêmen foi diluído em solução formol-salina na proporção 1:1000 (sêmen/sol.) sendo a contagem feita em câmara hematimétrica de Neubauer para determinação da média de sptz/mL.  $[(\sum(\text{células das grades: } 2) * 3 \text{ repetições p/amostra: } 3) * 50.000]$ .

### *2.2.2 Sêmen pós-descongelamento*

Foram medidas a motilidade total (%) e as velocidades espermáticas do sêmen pós-descongelados por meio do sistema integrado ISAS<sup>®</sup> CASA Integrated Semen Analysis System D4C20. Foram analisadas as velocidades espermáticas: velocidade curvilínea (VCL, µm/s); velocidade linear (VSL, µm/s); velocidade média (VAP, µm/s). Coeficiente de linearidade (LIN, %; calculado como VSL/VAP); coeficiente de retilinearidade (STR, %; calculado como VSL/VCL); oscilação média

da trajetória espacial do espermatozoide, oscilação, WOB (%); amplitude do movimento lateral da cabeça (ALH,  $\mu\text{m}$ ); frequência de batimento flagelar (BCF, Hz).

### 2.2.3 *Análise morfológica*

Para fazer análise ultraestrutural das possíveis alterações provocadas nas células espermáticas pelos protocolos de criopreservação, amostras de sêmen fresco e descongelado foram pré-fixadas em glutaraldeído (2,5%) e solução de paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 2% em tampão fosfato 0,1 M, a pH 7,3. E posteriormente foi encaminhada para o laboratório de microscopia eletrônica na UNESP Botucatu para o processamento usual para análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV). As eletromicrografias dos tratamentos foram realizadas na UNESP-Botucatu e UNESP-Ilha Solteira.

## 2.3 Criopreservação

### 2.3.1 *Soluções crioprotetoras.*

Foram formuladas duas soluções crioprotetoras: A) Constituída de 5,4g glicose+15g leite em pó integral (Ninho fortificado Nestlé, Nutricional Compass®, Ituiutaba, Brasil) + 10 ou 15mL de crioprotetor interno adequados a 100mL de água destilada; B) Composta por 5g de Bestvile Thawing Solution (BTS®) (Minitub, Tiefenbach, Alemanha. Composição glicose 79,9%, citrato de sódio 12,7%, EDTA 2,7%, bicarbonato de sódio 2,7% e cloreto de potássio 1,6% e sulfato de gentamicina 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) + 10 ou 15mL de crioprotetor interno adequados a 100mL de água destilada. Foram utilizados dois crioprotetores internos, metilglicol (MG, Merck®) e metanol (MET, Merck®), representados na tabela 1.

### 2.3.2 *Teste de toxicidade das soluções crioprotetoras.*

Antes do processo de congelamento seminal foi realizado teste de viabilidade das soluções crioprotetoras. O sêmen de *B. cephalus* foi diluído na proporção de 1:5 (sêmen:solução), misturado e homogeneizado com os oito tratamentos separadamente, sendo posteriormente ativados com água destilada e verificando a motilidade espermática subjetiva de cada tratamento. Foi realizado três repetições para cada solução, onde só foram escolhidas as que apresentaram

motilidade espermática subjetiva média nos índices de 4 e 5 (61-100%) (Fribourgh,1966).

**Tabela 1-** Relação das soluções crioprotetoras.

Crioprotetor interno	Solução crioprotetora A	Solução crioprotetora B
Metilglicol 10mL	T1	T2
Metilglicol 15mL	T3	T4
Metanol 10mL	T5	T6
Metanol 15mL	T7	T8

Solução crioprotetora A: 5,4g glicose+15g leite em pó integral, Solução crioprotetora B: 5g de Bestlvile Thawing Solution (BTS®).

### 2.3.3 Congelamento.

O sêmen coletado foi diluído utilizando os 5 tratamentos (T1, T3, T4, T5 e T7 (Tab. 1) selecionados do teste de toxicidade, na proporção de 1:5 (sêmen/solução), homogeneizado e envasado em palhetas de plástico de 0,5 mL (IMV) a temperatura ambiente de 25°C. Após o envasamento, as palhetas foram depositadas em uma bandeja composta por tela de aço e disposta cerca de 1 cm de distância da superfície do nitrogênio líquido, contido em uma caixa isolante de isopor® de 33 litros (33,9 cm altura x 26 cm largura x 41 cm comprimento), com temperatura ambiente de -190°C. Após as amostras atingirem -180°C, por aproximadamente 10min, mensurado por um Termopar (GULterm 200, Gulton do Brasil Ltda.), estas eram imersas em nitrogênio líquido e posteriormente transferidas para ser estocado em um “container” criogênico do tipo “líquido” (Taylor-Wharton, modelo XT21-AI-11M) por 24h.

## 2.4 Fertilização artificial

Para o teste de fertilização, foram utilizados ovócitos de fêmeas de 3 anos de idade, adultas e maduras, previamente induzidas à ovulação com solução de Ovopel® nas doses de 0,5 mg e 5 mg/kg de peso vivo, em duas aplicações, com intervalo de 10 horas, respectivamente. Os machos selecionados para o tratamento controle receberam uma aplicação hormonal nas dosagens já descritas, quando da

segunda aplicação nas fêmeas. Todos apresentaram motilidade nível 5, segundo a escala de Fribourgh (1966). Decorridas 150 hora/graus ( $t = 6$  horas;  $T_{\text{média}} = 28^{\circ}\text{C}$ ) da segunda aplicação, os óvulos foram retirados dos indivíduos por massagem abdominal no sentido antero-posterior do corpo. Os óvulos de três fêmeas foram misturados em forma de um “pool”, para o controle das características individuais das desovas. Para estabelecer a quantidade de óvulos por amostra, foram determinados quantos óvulos não hidratados em média estaria contido em 1 g de material, o que correspondeu a  $2796 \pm 183$  ovócitos/g.

Para a fertilização foi estabelecido 1g de ovócitos para uma palheta de sêmen descongelado, estabelecendo uma proporção de 25000 espermatozoides totais/ovócito. O sêmen foi descongelado por imersão da palheta em água à  $36^{\circ}$  por 12s, evitando o contato com a água com o sêmen.

O experimento foi realizado com quatro repetições para cada tratamento. Para ativar os espermatozoides foi utilizada água do tanque. Os ovócitos fertilizados (ovos) e hidratados foram levados para as incubadoras experimentais de PVC (100 mm diâmetro, 10 cm altura). Após 16 horas de incubação, os embriões foram coletados, fixados em formol 10%, e levados ao Laboratório de Ictiologia Neotropical (Departamento de Biologia e Zootecnia, UNESP Ilha Solteira) para a determinação do percentual de fertilização.

## **2.5 Análise Estatística**

As repetições foram o numero de machos ( $n=6$ ). Aos dados foi aplicada teste de normalidade (Shapiro-Wilk) e de homogeneidade (Bartlett) ( $p>0.05$ ). Para dados não paramétricos foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis. Os resultados que apresentaram diferença significativa ( $p<0.05$ ) aplicaram-se ANOVA e Teste de Tukey. Aos dados de fertilização e motilidade apresentado pelo programa ISAS® CASA, foi aplicado o teste de correlação de Pearson e regressão linear. Ambos rodados no programa estatístico R.

## **3 Resultados**

### **3.1 Avaliação das características seminais**

As características seminais foram as seguintes: coloração branca, volume  $3,92 \pm 1,84$  mL, concentração espermática  $6,5 \pm 3 \times 10^9$  espermatozoides/mL, motilidade subjetiva de  $98 \pm 2\%$  com duração de  $28 \pm 7$  s.

### 3.2 Criopreservação e nível de toxicidade das soluções crioprotetoras.

Os resultados do teste de viabilidade das soluções crioprotetoras estão na Tabela 2. As soluções que apresentaram motilidade espermática em média acima de 60% foram as seguintes: **T1** - Metilglicol 10mL + BTS® (81-100%), **T3** - Metilglicol 15mL +BTS® (61-80%), **T4** - Metilglicol 15mL+LP (61-80%), **T5** - Metanol 10mL + BTS® (81-100%), **T7** - Metanol 15mL +BTS® (61-80%).

**Tabela 2-** Teste toxicidade das soluções crioprotetoras através da análise de motilidade espermática subjetiva (n=3).

SOLUÇÕES CRIOPROTETORAS TESTADAS	MOTILIDADE SEGUNDO ESCALA DE FRIBOURGH (1966)
C. Controle (sêmen fresco)	5
T1. Metilglicol 10mL + BTS®	5*
T2. Metilglicol 10mL LP+gli	3
T3. Metilglicol 15mL +BTS®	4*
T4. Metilglicol 15mL +LP+gli	4*
T5. Metanol 10mL + BTS®	5*
T6. Metanol 10mL LP+gli	3
T7. Metanol 15mL +BTS®	4*
T8. Metanol 15mL + LP+gli	2

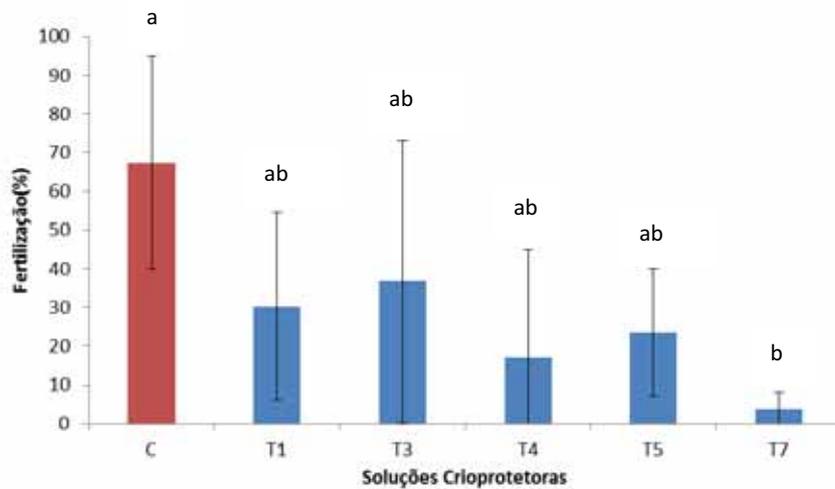
Valores da motilidade subjetiva: 0 - 0%, 1 - 1-20%, 2 - 21-40%, 3 - 41-60%, 4 - 61-80%, 5 - 81-100%.

\* Soluções crioprotetoras selecionadas para posterior congelamento seminal. LP, Leite em Pó; BTS®, Bestville Thawing Solution; gli, glicose.

Das soluções crioprotetoras utilizadas, verificou-se que T1 ( $30.2 \pm 24.2\%$ ), T3 ( $36.7 \pm 36.5\%$ ), T4 ( $17.2 \pm 27.7\%$ ) e T5 ( $23.5 \pm 16.5\%$ ) tiveram maior efeito protetor para os espermatozoides de *B. cephalus* durante os processos de congelamento e descongelamento, não apresentando diferença significativa ( $p > 0,05$ ) na percentagem de fertilização entre eles. Entretanto ambos diferiram do controle

(67.4±27.5%). Já o tratamento T7 (3.7±4.4%) apresentou menor eficiência crioprotetora, diferindo significativamente em relação ao controle ( $p<0.05$ ) (Fig.1).

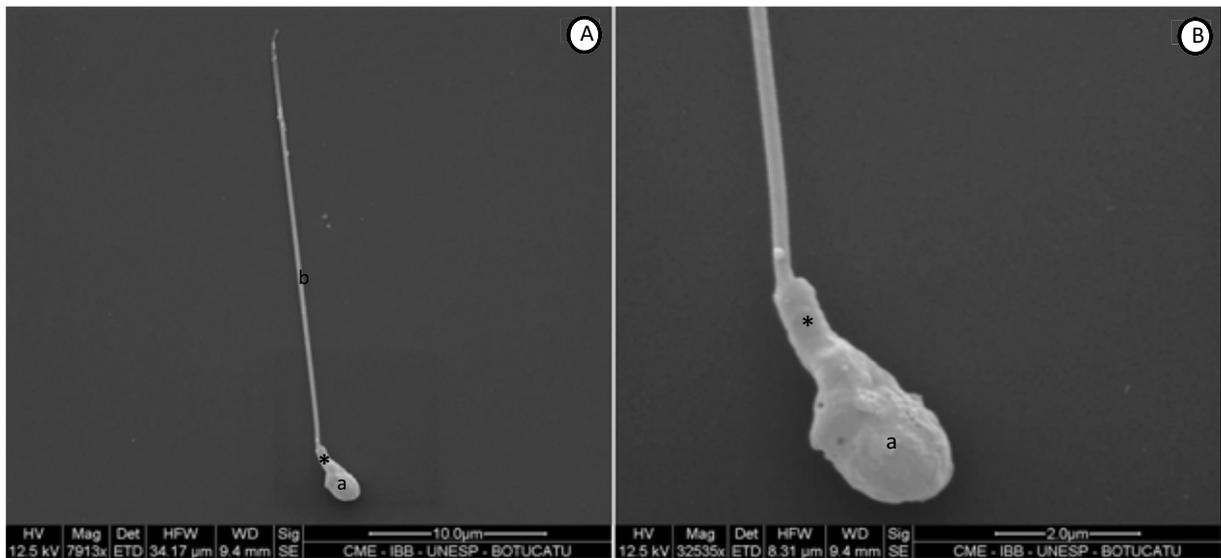
**Figura 1:** Percentual médio de fertilização do sêmen descongelado (n=6). C, Controle; T1, Metilglicol 10mL+BTS®; T3, Metilglicol 15mL+BTS®; T4, Metilglicol 15mL+LP+gli; T5, Metanol 10mL+BTS®; T7, Metanol 15mL+BTS®. LP, leite em pó; BTS®, Beltsville Thawing Solution®; gli, glicose. Barras com diferentes letras indicam diferenças significativas ( $p<0.05$ ), de acordo com teste de Tukey.



### 3.3 Sêmen pós-descongelados.

Os espermatozoides pós-descongelados dos tratamentos de metilglicol 10mL + BTS® (T1) e metilglicol 15mL + BTS® (T3) apresentaram região da peça intermediária e cauda intactos (Fig. 3A e D), igualmente ao espermatozoide do sêmen fresco (Fig.2). Entretanto a região da cabeça dos espermatozoides do T1 apresentou enrugada (Fig.3B) e alguns com retração na porção entre a cabeça e a peça intermediária (Fig. 3C). Já os espermatozoides do T3 exibiram retração na região da peça intermediária na poção basal (Fig.3E) e alguns com a peça intermediária totalmente degradada (Fig. 3F). Os espermatozoides tratados com Metilglicol 15 mL + LP + Gli (T4) apresentaram deformação na região da cabeça (Fig.4A), alguns com retração na região basal da cabeça, sendo possível a observação da inserção da cauda na região da cabeça (Fig.4B). E deformidade na região da cauda do tipo cauda dobrada (Fig.4D). Além da presença de grumos por toda a extensão do espermatozoide (Fig.4C).

**Figura 2 – Eletromicrografia do espermatozoide de *Brycon cephalus* do grupo controle. A:** regiões da cabeça (a), peça intermediária (asterisco) e cauda (b); **B:** região da cabeça.

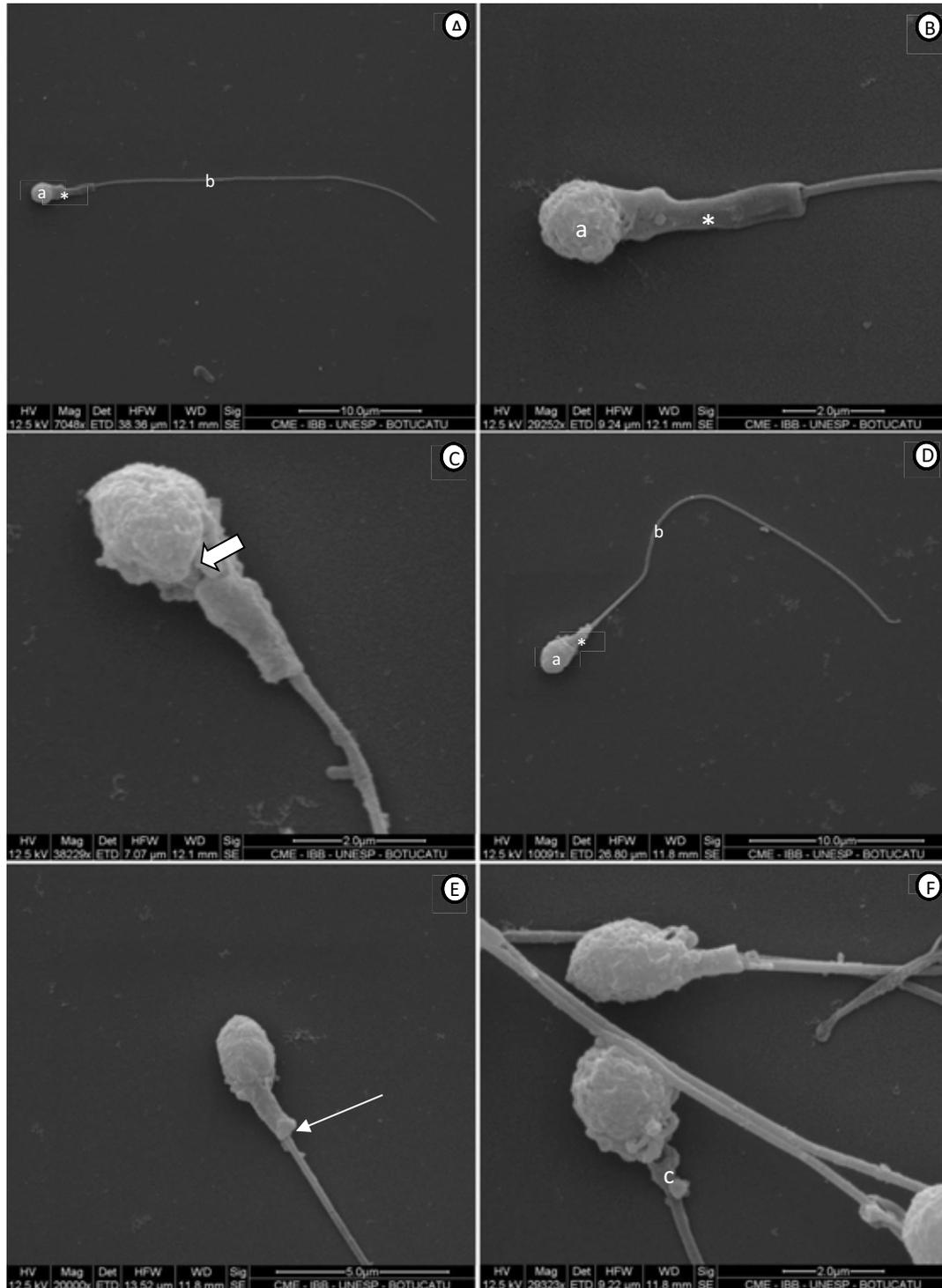


Fonte: Bashiyo-Silva (2014).

Após tratamento com metanol 10 mL + BTS® (T5), os espermatozoides pós-descongelados exibiram degradação na região da cabeça (Fig.5A, F). A peça intermediária também se mostraram degradadas em alguns casos (Fig.5A, F) e em outros ainda foi possível a observação da inserção da cauda na região da cabeça (Fig.5C), também tinham espermatozoides com retração na região entre a cabeça e peça intermediária (Fig.5B). Além destas ainda foi possível observar o rompimento da peça intermediária na região próxima a cabeça (Fig.5D). Quanto a região da cauda, os defeitos morfológicos observados foram dos tipos: cauda curta (Fig.5E), enrolada (Fig.5F) e quebrada (Fig.5H).

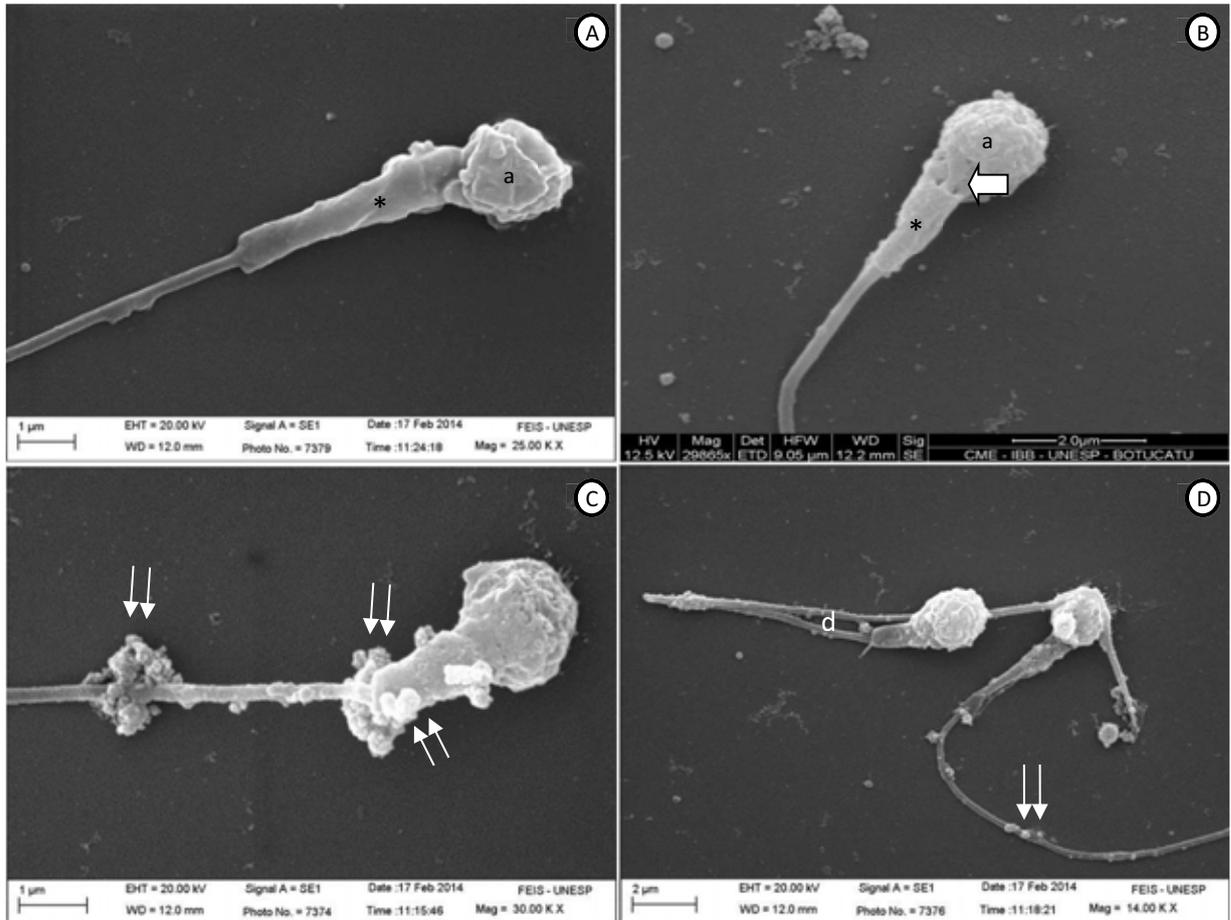
Os espermatozoides tratados com metanol 15 mL + BTS® (T7) observou-se que alguns tinham a região da cabeça totalmente degradada (Fig.6A), já a peça intermediária apresentaram-se retraídos (Fig.6A), rompidas, sendo possível a observação da inserção da cauda na região da cabeça (Fig.6B) ou degradadas totalmente (Fig.6D,E,F). Quanto a região da cauda, alguns exibiram cauda isolada (Fig.6C) e quebrada (Fig.6E,F).

**Figura 3 – Eletromicrografia dos espermatozoides de *B. cephalus* pós-descongelados dos tratamentos metilglicol 10mL + BTS® (T1, A-C) e metilglicol 15mL + BTS® (T3, D-F). A e D: espermatozoide inteiro; B: Enrugamento na região da cabeça; C: Retração na porção entre a cabeça e a peça intermediária (seta grossa); E: Retração na região da peça intermediária (seta fina); F: Peça intermediária totalmente degradada (c). **Legenda:** cabeça, a; peça intermediária, asterisco; cauda, b.**



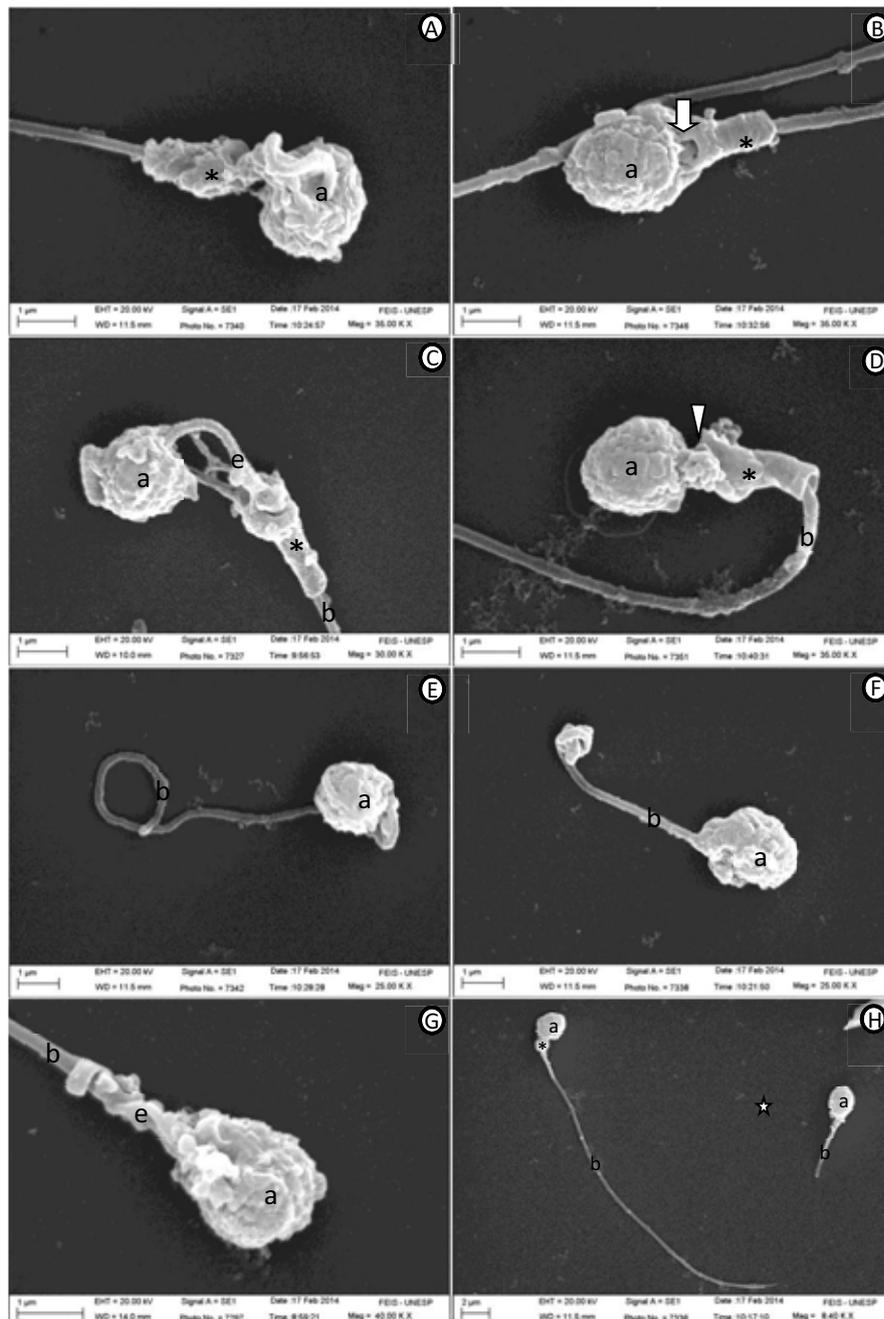
Fonte: Bashiyo-Silva (2014).

**Figura 4 – Eletromicrografia das deformidades dos espermatozoides de *B. cephalus* pós-descongelados do tratamento metilglicol 15mL + LP + Gli (T4).** **A:** Deformação na região da cabeça; **B:** Retração na região basal da cabeça, sendo possível a observação da inserção da cauda na região da cabeça (seta grossa); **C:** Presença de grumos por toda a extensão do espermatozoide (duas setas); **D:** Espermatozoide com cauda dobrada (d). **Legenda:** a, cabeça; asterisco, peça intermediária.



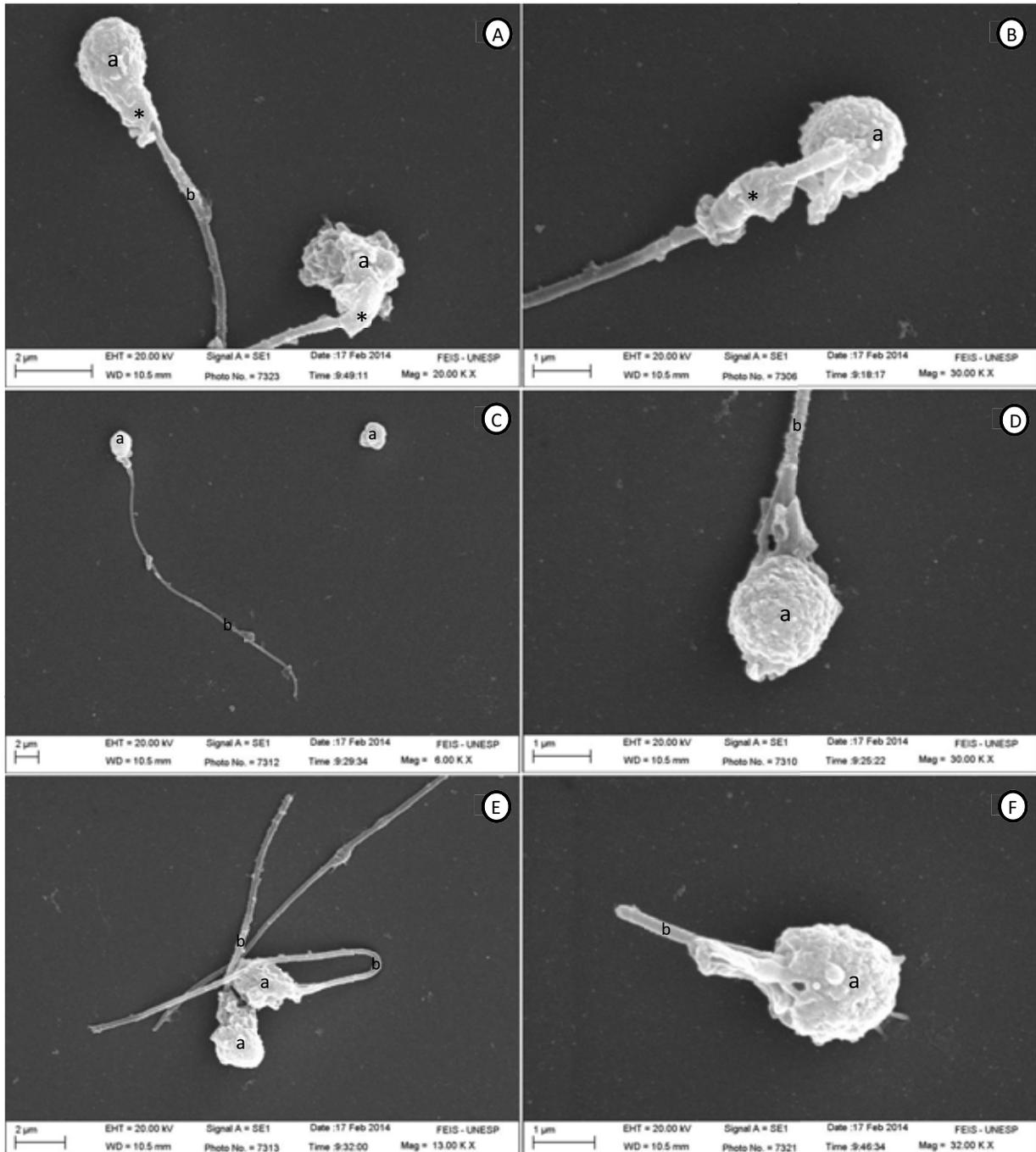
Fonte: Bashiyo-Silva (2014).

**Figura 5 – Eletromicrografia das deformidades dos espermatozoides de *B. cephalus* pós-descongelados tratamento Metanol 10mL + BTS® (T5).** **A:** Degradação da cabeça e peça intermediária; **B:** Retração na região entre a cabeça e peça intermediária (seta grossa); **C:** Degradação da peça intermediária (e), sendo possível a observação da inserção da cauda na região da cabeça; **D:** Rompimento da peça intermediária na região próxima a cabeça (cabeça de seta); **E:** Espermatozoides com cauda curta; **F:** Espermatozoide com cauda enrolada; **G:** Degradação da peça intermediária; **H:** Espermatozoide com cauda quebrada (estrela). **Legenda:** cabeça, a; peça intermediária, asterisco; cauda, b.



Fonte: Bashijo-Silva (2014).

**Figura 6 – Eletromicrografia das deformidades dos espermatozoides de *B. cephalus* pós-descongelados tratamento Metanol 15mL + BTS® (T7). A:** Cabeça totalmente degradada e peça intermediária retraída; **B:** Peça intermediária rompida, sendo possível a observação da inserção da cauda na região da cabeça; **C:** Espermatozoide com cabeça isolada; **D:** Degradação total da peça intermediária; **E- F:** Espermatozoide com cauda quebrada e peça intermediária degradada. **Legenda:** cabeça, a; peça intermediária, asterisco; cauda, b.



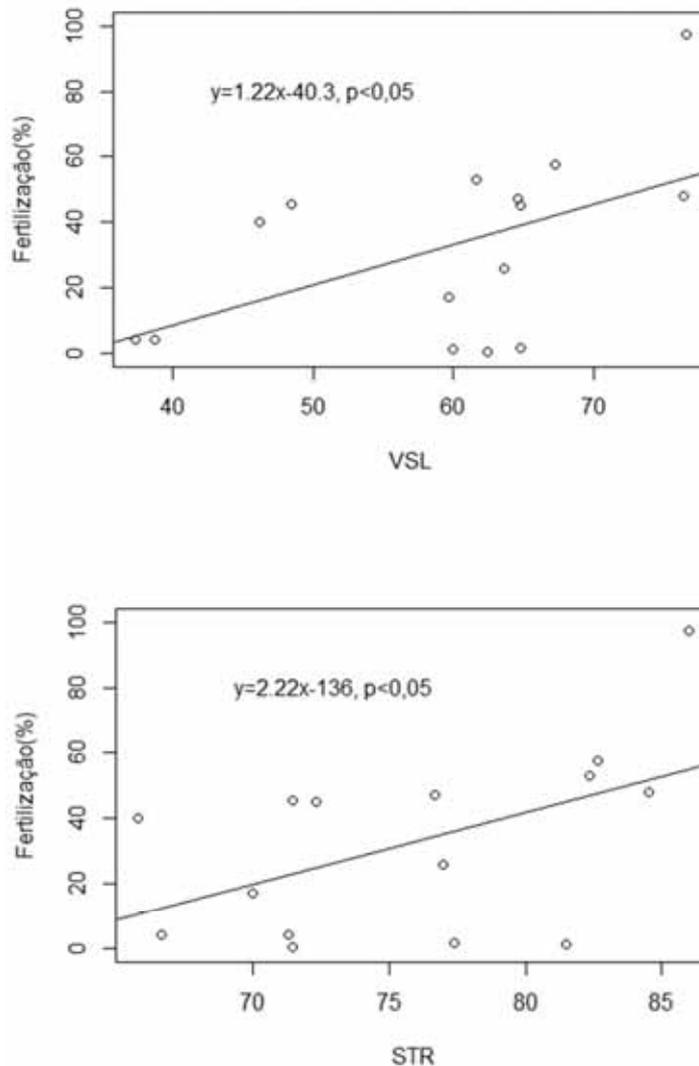
Fonte: Bashiyo-Silva (2014).

### 3.4 Correlação motilidade espermática ISAS®CASA e fertilidade artificial

Os valores médios, dos espermatozoides descongelados, obtidos pelo programa foram: motilidade total ( $15,4\pm 6,2\%$ ), VCL ( $86,4\pm 9,4 \mu\text{m/s}$ ), VSL ( $59,5\pm 11,7 \mu\text{m}$ ), VAP ( $76,8\pm 11 \mu\text{m/s}$ ), STR ( $75,8\pm 6,4\%$ ), LIN ( $67,1\pm 8,7\%$ ), WOB ( $87,4\pm 5\%$ ), ALH ( $0,96\pm 0,19 \mu\text{m}$ ), BCF ( $13,6\pm 1,3 \text{ Hz}$ ).

Dentre estes valores obtidos no programa ISAS®CASA, somente o VSL e o STR apresentaram correlação linear de Pearson positiva ( $p < 0,05$ ) com as taxas de fertilização ( $R^2 = 0,27$ ) (Fig.7).

**Figura 7 – Gráfico de correlação e Regressão linear entre os valores obtidos no programa ISAS®CASA e a fertilização.** VSL, velocidade linear ( $\mu\text{m/s}$ ); STR, coeficiente de retilinearidade, calculado por  $\text{VSL/VAP} (\%)$  ( $R^2 = 0,27$ ).



Fonte: Bashio-Silva (2014).

## **4 Discussão**

### **4.1 Avaliação das características seminais**

Características seminais e espermáticas são importantes para avaliar a capacidade reprodutiva do reprodutor. Também é fundamental para escolha das melhores amostras espermáticas para aplicação em protocolos de criopreservação (CABRITA et al., 2010). As características seminais apresentam variações intra e interespecífica, tornando assim de grande importância a análise de cada uma delas tanto na produção como para o conhecimento biológico. As características seminais para o sêmen fresco apresentam variações, mas com similaridade aos dados encontrados por Ninhaus-Silveira et al. (2006) para a mesma espécie.

A motilidade dos espermatozoides depende de diferentes aspectos da célula, tais como integridade das mitocôndrias, a produção de ATP, a atividade do canal de membrana plasmática e estrutura flagelar (CABRITA et al., 2010). Segundo Cosson (2004) a diferença no valor da motilidade pode estar relacionado a diversas variáveis como pH, concentração de diversos íons e osmolaridade, pois ambos estão intimamente relacionados na ativação da motilidade espermática.

### **4.2 Nível de viabilidade das soluções crioprotetoras.**

A solução crioprotetora ideal é aquela que promove meio adequado para o sêmen, sem que ocorra a ativação dos espermatozoides antes do congelamento, e que proteja o espermatozoide durante e após o congelamento. Portanto foi realizado o teste de viabilidade antes do congelamento serve como pré-teste, pois as soluções que já ativam o espermatozoide antes do congelamento, não são soluções que serão aptas a oferecer o melhor meio para o sêmen durante o processo de congelamento.

Tanto os íons como os crioprotetores podem afetar na motilidade espermática e na capacidade de fertilização (YASUI et al., 2012). A associação de metilglicol 10% com leite em pó e glicose não apresentou motilidade tão baixa (41-60%), porém com o aumento na concentração de metil glicol, produziu um efeito melhor sobre a célula (61-80%). Pode-se sugerir a partir destas informações que a

composição do extensor como do crioprotetor metilglicol não teve uma ação tóxica para os espermatozoides de *B. cephalus*.

Já o metanol quando colocado juntamente com leite em pó e glicose não trouxe boas taxas de motilidade (<41%), Isso pode ser devido à ação mais tóxica do crioprotetor às células germinativas (espermatozoides e/ou oócitos), pois segundo Chao e Liao (2001) os crioprotetores apesar de serem necessários para aplicação da técnica de congelamento, a sua toxidez pode provocar a mortalidade das células durante a entrada ou saída no seu interior e o grau desta toxidez pode estar relacionado a sensibilidade da espécie. O metanol, segundo Bedore (1999), é tido como o crioprotetor intracelular mais permeável à membrana, porém, é aquele que apresenta a maior toxicidade dentro de seu grupo. Melo e Godinho (2006) demonstra que o aumento da concentração de metanol na solução diminui a motilidade espermática do sêmen de *B. orthotaenia*, concentrações acima de 10% decaem de 65% para 17%. Demonstrando assim que o aumento de determinados crioprotetores podem diminuir sua efetividade e aumentar sua toxidade na célula. Porém em alguns trabalhos se obteve resultados positivos de motilidade espermática pós-descongelamento de algumas espécies como em *B. orbigyanus* (80-100%) e *P. corruscans* (60-80%) (CAROLSFELD et al., 2003).

Outro trabalho utilizando 10% metanol+15% leite em pó para o sêmen de zebra fish obteve fertilização de 0.2% (MORRIS et al., 2003), valores similares ao encontrado em nosso trabalho. Trabalhos com a mesma concentração de metanol, porém com 10% leite em pó apresentaram motilidade espermática pós-descongelamento de 1%, para o sêmen de *L. obtusensis* (TAITSON; CHAMI; GODINHO, 2008).

### **4.3 Congelamento**

Das soluções crioprotetoras selecionadas, as soluções que continham metilglicol com o BTS (T1 e T3, 30-36%) apresentaram fertilização maior que a solução associada ao leite em pó (T4, 3-23%). Sobre o crioprotetor externo leite em pó, este em associação com o metilglicol não foi encontrado trabalhos na literatura.

Como encontrado em outros trabalhos para o mesmo gênero (ORFÃO et al., 2011; VIVEIROS et al., 2012a;2012b). Recentemente este crioprotetor vem sendo utilizado com o diluidor BTS<sup>®</sup>, apresentando resultados satisfatórios para sêmen

pós-descongelado. A solução crioprotetora composta por 5% BTS<sup>®</sup> + 10% metilglicol utilizada neste trabalho, também foi utilizado para o congelamento de sêmen de outros Brycon como *B. orbignyanus* (MARIA et al., 2006), *B. insignis* (VIVEIROS et al., 2011), *B. nattereri* (VIVEIROS et al., 2012b; OLIVEIRA et al., 2007), propiciando resultados de motilidade espermática pós-descongelamento de 66, 77, 78 e 72 %, respectivamente, ambos diluídos na proporção de 1:10. Em ambos os trabalhos também foi realizada a solução contendo metilglicol porem com associação com glicose e não apresentou diferença estatística entre estes dois componentes.

Este crioprotetor também foi testado em outras espécies como *Piaractus brachypomus* (NASCIMENTO et al., 2010) e *Prochilodus lineatus* (VIVEIROS et al., 2009), apresentando taxas de motilidade espermática pós-descongelamento satisfatórios com 53 e 94%, respectivamente. Varella-Junior et al. (2012) utiliza o diluente BTS em associação com outro crioprotetor (DMSO) e obteve resultados satisfatórios de fertilização do sêmen de *C. macropomum* com 60.3%.

O crioprotetor interno apresentou resultados mais baixos que o metilglicol (T7 e T5, 3-23%). Com relação ao T5, em Maria et al. (2006) que usou a mesma solução para o sêmen de *B. orbignyanus* e obteve 21% motilidade espermática pós-descongelamento, também testou a interação deste composto com acréscimo de gema de ovo obtendo valor de 48% de motilidade. Porém a baixa fertilização no T7 pode ter sido devido ao grau de toxidez do metanol, como já mencionado anteriormente. Como encontrado em outros trabalhos (GODINHO; AMORIM; PEIXOTO, 2003; RAMIREZ-MERLANO et al., 2011; LAHNSTEINER; WEISMANN; PATZNER, 1996; SADEGUI; IMANPOOR, 2013), onde ambos apresentaram motilidade espermática pós-descongelamento <20%. Agora para a concentração de 8% de metanol, testado no sêmen de *P. lineatus*, aumenta a motilidade espermática pós-descongelamento para 48% (FELIZARDO et al., 2011). O mesmo resultado também foi encontrado quando se teve o acréscimo de gema de ovo na solução crioprotetora para o congelamento do sêmen de *B. orbignyanus* (MARIA et al., 2006) apresentando motilidade espermática de 48%, mas para *P. metaense* quando adicionado a gema de ovo a motilidade espermática pós-descongelamento é de 23,3% (RAMIREZ-MERLANO; MEDINA-ROBLES; CRUZ-CASALLAS, 2011).

Entretanto nos trabalhos de Murgas et al. (2007), Paula et al. (2012) utilizaram o mesmo crioprotetor interno para a criopreservação do sêmen de *P. lineatus* e os resultados apresentaram motilidade dos espermatozoides após o descongelamento em média cerca de 74%, 70% respectivamente. Alguns trabalhos como Horvath, Miskolczi e Hurbaniy (2003), Lahnsteiner, Weismann e Patzner (1996), Sarvi et al. (2006) e Viveiros, So e Komem (2000) ainda demonstram que o uso deste crioprotetor apresenta fertilidade elevada para o sêmen de carpa comum (74%), *Thymallus thymallus* (84%), *Salmo trutta caspius* (66,2%) e *Clarias gariepinus* (81%), respectivamente. Trabalhos demonstram que a associação com o leite em pó com o DMSO é mais efetivo do que metanol, leite em pó-10%,30% e DMSO-79.6%,>50%, respectivamente (RAMIREZ-MERLANO; MEDINA-ROBLES; CRUZ-CASALLAS, 2011; GAITAN-ESPITIA et al., 2013).

A baixa fertilização encontrada nos tratamentos com metanol foi comprovada pelas análises em microscopia eletrônica de varredura que apresentaram deformidades graves na região da cabeça e peça intermediária, onde podem ter levado a baixa eficiência durante o processo de fertilização.

#### **4.4 Sêmen pós-descongelado e Fertilização artificial**

A velocidade linear (VSL) e a linearidade (STR) terem apresentado correlação com a fertilidade indica que quanto mais linear for a trajetória do espermatozoide, maior será a taxa de fertilização. Diferentemente de outras espécies onde se observa que além da velocidade linear, a velocidade curvilínea (VCL) também aumenta as taxas de fertilização como em *Prochilodus lineatus* (VIVEIROS et al., 2010) e *Takifugu niphobles* (GALLEGO et al., 2013).

O fato da motilidade espermática apresentada pelo programa CASA® não ter relação com a fertilidade, leva a dúvidas sobre utilizar a motilidade espermática pós-descongelamento como ferramenta para indicar a efetividade da solução crioprotetora. Gwo, Jamieson e Leung (2009) enfatizam que a motilidade espermática é uma quantificação empírica, onde a melhor forma de indicar o sucesso do processo de criopreservação é a fertilização. Yasui et al. (2012) confirmam esta afirmação, demonstrando que a motilidade nem sempre é um indicador eficaz do sucesso da fertilização. Ainda para Bobe e Labbé (2010) o sucesso da fertilização é uma forma de estimar a qualidade e interação da relação

espermatozoide/ovócito. Sendo assim, segundo Rurangwa et al. (1998) não há uma relação espermatozoide/ovócito definida para um ótimo percentual de fertilização. Sendo que podemos inferir que não só esta relação influencia as taxas de fertilização, mas vários outros fatores podem afetar, tal como a qualidade dos gametas entre outras variáveis.

Portanto existem vários fatores que podem afetar na qualidade dos ovos quanto do espermatozoide como a nutrição dos animais, temperatura, foto período, salinidade, métodos de coleta (indução a desova, extrusão do sêmen, ovos que passaram do tempo) (BOBE; LABBÉ, 2010). E a qualidade também influenciara no processo de congelamento, pois estão intimamente interligados. Além deste fator existem outros já mencionados que acabam afetando no processo de criopreservação desde a qualidade do sêmen, dos crioprotetores utilizados e sua toxidez celular, da curva de resfriamento, da diluição ate a proporção de espermatozoide/ovócito. Sendo assim, tem-se que afinar cada vez mais as técnicas empregadas a fim de estabelecer o melhor protocolo para a criopreservação de sêmen. Mesmo que ainda se tenha o grande do problema da especificidade entre as espécies.

## **5 Conclusão**

A partir dos resultados obtidos a solução crioprotetora mais adequada para o congelamento seminal de *B. cephalus* é o composto por metilglicol na proporção de 10 ou 15mL com BTS®, por ter apresentado, em média, taxa de fertilização acima de 30% e menos deformações nos espermatozoides, em relação aos outros tratamentos.

Também pode-se concluir que as maiores taxas fertilização foram obtidas pelos espermatozoides que se movimentaram em linha reta. E que a motilidade espermática não igualmente com a fertilização, portanto não sendo um parâmetro eficaz para avaliar a viabilidade de soluções crioprotetoras.

## Referências

- ALAVI, S.M.H.; COSSON, J. Sperm motility in fishes (II) effects of ions and osmolality: a review. **Cell Biology International**, Londres, v. 30, p. 1-14, 2006.
- BEDORE, A.G. **Características e criopreservação do sêmen de pacu-caranha (*Piaractus mesopotamicus*) e de Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)**. 1999. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1999.
- BILLARD, R. Reproduction in rainbow trout: sex differentiation dynamics of gametogenesis, biology and preservation of gametes. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 100, n. 4, p. 263-298, 1992.
- BILLARD, R. E COSSON, M.P. Some problems related to the assessment of sperm motility in fresh water motility. **The journal of Experimental Zoology**, Nova York, v. 261, p. 122-131, 1992.
- BOBE, J. E LABBÉ, C. Egg and sperm quality in fish. **Gen. Comp. Endocrinol.**, Maryland Heights, v. 165, p.535-548, 2010.
- CABRITA, E.; SARASQUETE, C.; MARTÍNEZ-PÁRAMO, S.; ROBLES, V.; BEIRÃO, J.; PÉREZ-CEREZALES, S.; HERRÁEZ, M. P. Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. **Journal of Applied Ichthyology**, Berlim, v. 26, p. 623-635, 2010.
- CARNEIRO, P.C.F.; URBINATI, E.C. Transport stress in matrinxã, *Brycon cephalus* (Teleostei: Characidae), at different densities. **Aquaculture International**, Irlanda, v. 34, p. 1-9. 2002.
- CAROLSFELD, J.; GODINHO, H. P.; ZANIBONI FILHO, E.; HARVEY, B. J. Cryopreservation of sperm in brazilian migratory fish conservation. **Journal of Fish Biology**, Oxford, v. 63, n. 2, p. 472-489, Aug. 2003.
- CHAO, N. H.E LIAO, I. C. Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos. **Aquaculture**, v. 197, p.161-189, 2001.
- COSSON, J. The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa **Aquaculture International**, Irlanda, v. 12, p.69-85, 2004.
- FELIZARDO, V. O. ; MURGAS, L. D. S. ; NAVARRO, R. D. ; GONCALVES, A. C. S. ; PAULINO, M. S. Osmolaridade dos ativadores e taxa de diluição na ativação do sêmen criopreservado de curimba (*Prochilodus lineatus*). **Arquivos de Zootecnia**, Espanha, v. 60, p. 1255-1262, 2011.
- FRIBOURGH, J. H. The application of a differential staining method to low-temperature studies on goldfish spermatozoa. **Progr. Fish Cult.**, USA, v. 28, n. 4, p. 227-231. 1966.
- GAITÁN-ESPITIA, J. D.; MARTÍNEZ-SILVA, M. A.; BORRERO, C.E. Cryogenic preservation of sperm from lane snapper (*Lutjanus synagris*): Testing the effects of

extenders and freezing rates on sperm quality. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 384, p. 6–12, 2013.

GALLEGO, V.; PÉREZ, L.; ASTURIANO, J.F.; YOSHIDA, M. Relationship between spermatozoamotility parameters, sperm/egg ratio, and fertilization and hatching rates in pufferfish (*Takifugu niphobles*). **Aquaculture**, Irlanda, v. 416, n.1, p. 238–243, 2013.

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

GWO, J. C.; JAMIESON, B. G. M.; LEUNG, K. P. Live preservation of fish gametes. In: JAMIESON, B. G. M. (Ed.). **Reproductive biology and phylogeny (Agnathans and bony fishes)**. Enfield: Science Publishers, 2009. v. 8b, p. 395-484.

HORVATH, A.; MISKOLCZI, E.; HURBANYI, B. Cryopreservation of common carp sperm. **Aquat. Living Resour.**, França, v. 16, p. 457–460, 2003.

LAHNSTEINER F.; WEISMANN T.; PATZNER, R. A. Cryopreservation of semen of the grayling (*Thymallus thymallus*) and the Danube salmon (*Hucho hucho*). **Aquaculture**, Irlanda, v. 144, p. 265-274, 1996.

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

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

MORRIS, J. P.; BERGHMANS, S.; ZAHRIEH, D.; NEUBERG, D. S.; KANKI, J. P.; LOOK, A. T. Zebrafish sperm cryopreservation with N,N-dimethylacetamide. **Biotechniques**, Atlanta, v. 35, n. 5, p. 956-968, 2003.

MURGAS, L. S. D; FRANCISCATTO, R. T.; SANTOS, A. G. O. Avaliação espermática pós-descongelamento em piracanjuba (*Brycon orbignyanus*), Vallenciennes, 1849). **Revista Brasileira Zootecnia**, Viçosa, v. 32, p.1810–1814. 2004.

MURGAS L. D. S.; MILIORINI, A. B.; FONSECA, F. R. T.; PEREIRA, G. J. M. Criopreservação do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) mediante adição de diferentes diluidores, ativadores e crioprotetores. **Revista Brasileira Zootecnia**, Viçosa, v. 36, n. 3, p. 526-531. 2007.

NASCIMENTO, A. F.; MARIA, A. N.; PESSOA, N. O.; CARVALHO, M. A. M; VIVEIROS, A. T. M. Out-of-season sperm cryopreserved in different media of the Amazonian freshwater fish pirapitinga (*Piaractus brachypomus*). **Animal Reproduction Science**, Illinois, v. 118, p. 324-329, 2010.

- NINHAUS-SILVEIRA, A.; FORESTI, F.; TABATA, Y. A.; RIGOLINO, M. G.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R. Cryopreservation of rainbow trout semen: diluent, straw and the vapor column. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 28, n. 2, p.135-139, 2002.
- NINHAUS-SILVEIRA, A.; FORESTI, F.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R. SENHORINI, J. A. Seminal, analysis, cryogenic preservation, and fertility in matrinxã fish, *Brycon cephalus* (Günther, 1869). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 49, p. 651-659, 2006.
- OLIVEIRA, A. V; VIEIROS, A. T. M; MARIA, A. N.; FREITAS, R. T. F.; IZAÚ, Z. A. Sucesso do resfriamento e congelamento de sêmen de pirapitinga *Brycon nattereri*. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnica**, Belo Horizonte, v. 59, p. 1509-1515. 2007.
- ORFÃO, L. H.; NASCIMENTO, A. F.; CÔRREA, F. M.; COSSON, J.; VIVEIROS, A. T. M. Extender composition, osmolality and cryoprotectant effects on the motility of sperm in the Brazilian endangered species *Brycon opalinus* (Characiformes). **Aquaculture**, Irlanda, v. 311, p. 241–247. 2011.
- PAULA, D. A. J.; ANDRADE, E. S.; MURGAS, L. D. S.; FELIZARDO, V. O.; WINKALER, E. U.; ZEVIANI, W.; FREITAS, R. T. F.. Vitamin e and reduced glutathione in *Prochilodus lineatus* (curimba) semen cryopreservation (Characiformes: Prochilodontidae). **Neotropical Ichthyology**, Porto Alegre, v. 10, n. 3, p. 661-665. 2012.
- RAMIREZ-MERLANO, J.; MEDINA-ROBLES, V. M.; CRUZ-CASALLAS, P. E. Variación estacional de las características seminales del bagre rayado *Pseudoplatystoma metaense* (Telostei, pimelodidae). **REVISTA MVZ Córdoba**, Colômbia, v. 16, n. 1, p. 2336-2348. 2011.
- RAMIREZ-MERLANO, J.; VELASCO-SANTAMARIA Y. M.; MEDINA-ROBLES, V. M.; CRUZ-CASALLAS, P. E.. Cryopreservation effects on the sperm quality of cachama blanca *Piaractus brachypomus* (Cuvier 1818). **Aquaculture Research**, Irlanda, v. 42, p. 738-745. 2011.
- RURANGWA, E.; ROELANTS, I.; HUYSKENS, G.; EBRAHIMI, M.; KIME, D. E.; OLLEVIER, F. The minimum effective spermatozoa:egg ratio for artificial insemination and effects of mercury on sperm motility and fertilization ability in *Clarias gariepinus*. **Journal Fish Biology**, Oxford, v. 53, p. 402-13, 1998.
- SADEGUI, A.; IMANPOOR, M. R. Effects of use of combinations of permeating cryoprotectant (MeOH, DMSO) and non permeating cryoprotectant (BSA) on viability of beluga (*Huso huso*) post-thawed sperm. **World Journal of Fish and Marine Sciences**, Egito, v. 5, n. 6, p. 593-597, 2013.
- SARVI, K.; NIKSIRAT, H.; MOJAZI AMIRI, B.; MIRTORABI, S. M.; RAFIEE G.R.; BAKHTIYARI, M. Cryopreservation of semen from the endangered Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*). **Aquaculture**, Irlanda, v. 256, p. 564-569, 2006.

STEIN, H. E.; BAYRLE, H. Cryopreservation of sperm of some fresh water teleosts. **Ann. Biol. Anim. Biophys**, França, v.18, p.1073-6, 1978.

TAITSON, P. F.; CHAMI, E.; GODINHO, H. P. Gene banking of the neotropical fish *Leporinus obtusidens* (Valenciennes, 1836): a protocol to freeze its sperm in the field. **Animal Reproduction Science**, Illinois, v. 105, p. 283–291, 2008.

VARELA JUNIOR, A. S.; CORCINI, C. D.; STREIT JUNIOR, D. P.; RIZZOTO, G.; JARDIM, R. D.; LUCIA JUNIOR, T.; FIGUEIREDO, M. R. C.. Efeito crioprotetor de diferentes concentrações do dimetilsulfóxido no congelamento de sêmen de tambaqui *Colossoma macropomum*. **Atlântica**, Rio Grande, v. 34, n. 2, p.129-137, 2012.

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

VIVEIROS, A. T. M.; SO, N.; KOMEN, J. Sperm cryopreservation of african catfish *Clark garieninus*: cryoprotectants, freezing rates and sperm:egg dilution ratio. **Theriogenology**, Inglaterra, v. 54, n.1, p. 1395-1408, 2000.

VIVEIROS, A. T. M; ORFÃO, L. H.; MARIA, A. N.; ALLAMAN, I. B. A simple, inexpensive and successful freezing method for curimba *Prochilodus lineatus* (Characiformes) semen. **Animal Reproduction Science**, Illinois, v. 112, p. 293–300, 2009.

VIVEIROS, A. T.; NASCIMENTO, A. F.; ORFÃO, L. H.; ISAÚ, Z. A. Motility and fertility of the subtropical freshwater fish streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) sperm cryopreserved in powdered coconut water. **Theriogenology**, Inglaterra, v. 74, n.1, p. 551– 556. 2010.

VIVEIROS, A. T. M.; AMARAL, T. B.; ORFÃO, L. H.; ISAÚ, Z. A.; CANEPPEL, D.; LEAL, M. C. Sperm cryopreservation of tiete tetra *Brycon insignis* (Characiformes): effects of cryoprotectants, extenders, thawing temperatures and activating agents on motility features. **Aquaculture Research**, Irlanda, v. 42, p. 858-865, 2011.

VIVEIROS, A. T. M.; ISAÚ, Z. A.; CANEPPELE, D.; LEAL, M. C. Sperm cryopreservation affects postthaw motility, but not embryogenesis or larval growth in the Brazilian fish *Brycon insignis* (Characiformes). **Theriogenology**, Inglaterra, v. 78, n. 1, p. 803–810, 2012.

VIVEIROS, A. T. M.; MARIA, A. N.; ORFÃO, L. H.; NASCIMENTO, A. F.; CORRÊA, F. M; CANEPPELE, D. Effects of extenders, cryoprotectants and freezing methods on sperm quality of the threatened Brazilian freshwater fish pirapitinga-do-sul *Brycon opalinus* (Characiformes). **Theriogenology**, Inglaterra, v. 1., n. 1, p. 1-8, 2012b.

VIVEIROS, A. T. M.; ORFÃO, L. H.; AMARAL, T. B.; ORFÃO, L. H. ; ISAÚ, Z. A.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R. Spermatozoon ultrastructure and sperm cryopreservation of the Brazilian dry season spawner fish pirapitinga, *Brycon nattereri*. **Aquaculture Research**, Irlanda, v. 43, p. 546–555, 2012c.

YASUI, G. H.; FUJIMOTO, T.; ARIAS-RODRIGUEZ, L.; TAKAGI, Y.; ARAI, K. The effect of ions and cryoprotectants upon sperm motility and fertilization success in the loach *Misgurnus anguillicaudatus*. **Aquaculture**, Irlanda, v. 344, p. 147–152, 2012.