UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP (CAUNESP)
São Paulo State University - Aquaculture Center

Parâmetros seminais, ultraestruturais, criopreservação e androgênese de espécies do gênero *Brycon* ameaçadas de extinção

FRANCINE FAUSTINO
Bióloga

Jaboticabal
São Paulo - Brasil
2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP (CAUNESP)
São Paulo State University - Aquaculture Center

Parâmetros seminais, ultraestruturais, criopreservação e androgênese de espécies do gênero *Brycon* ameaçadas de extinção

Francine Faustino

Orientadora: Profa. Dra. Laura Satiko Okada Nakaghi
Coorientador: Prof. Dr. Alexandre Ninhaus Silveira

Tese apresentada ao Programa de Pós graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Aquicultura.

Jaboticabal
São Paulo - Brasil
2014

unesp **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

REITORIA

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: **""PARÂMETROS SEMINAIS, ULTRAESTRUTURAIS, CRIOPRESERVAÇÃO E ANDROGÊNESE DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Brycon* AMEAÇADAS DE EXTINÇÃO"**

AUTORA: FRANCINE FAUSTINO

ORIENTADORA: Profa. Dra. LAURA SATIKO OKADA NAKAGHI
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. ALEXANDRE NINHAUS SILVEIRA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Aquicultura , pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. LAURA SATIKO OKADA NAKAGHI
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Profa. Dra. ELIZABETH ROMAGOSA
Centro de Pesquisa Em Peixes Ornamentais / Instituto de Pesca de São Paulo

Prof. Dr. SÉRGIO FONSECA ZAIDEN
Fundação de Ensino Superior de Rio Verde, Rio Verde-GO

Prof. Dr. GEORGE SHIGUEKI YASUI
Departamento de Zootecnia / Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos de Pirassununga

Prof. Dr. PAULO SERGIO CECCARELLI
Departamento de Ictiopatologia / Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renovaveis

Data da realização: 26 de fevereiro de 2014.

Faustino, Francine
F268p Parâmetros seminais, ultraestruturais, criopreservação e androgênese de espécies do gênero *Brycon* ameaçadas de extinção / Francine Faustino. – – Jaboticabal, 2014
xxii, 128 p.: il; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2014
Orientadora: Laura Satiko Okada Nakaghi
Coorientador: Alexandre Ninhaus Silveira
Banca examinadora: Elizabeth Romagosa, George Shigueki Yasui, Paulo Sérgio Ceccarelli, Sergio Fonseca Zaiden
Bibliografia

1. Androgênese. 2. Criopreservação. 3. Espermatozoide. 4. Peixe. 5. Ultraestrutura. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 639.3.034.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

*“**O caminho começa em uma encruzilhada.** Ali você pode parar e pensar em que direção seguir. Mas não fique muito tempo pensando, ou jamais sairá do lugar. Faça a clássica de Castañeda: qual destes caminhos tem um coração? Reflita bastante sobre as escolhas que estão adiante, mas uma vez dado o primeiro passo, esqueça definitivamente a encruzilhada, ou sempre ficará sendo torturado pela inútil pergunta: “Será que escolhi o caminho certo? Se você escutou seu coração antes de fazer o primeiro movimento, você escolheu o caminho certo.*

***O caminho não dura para sempre.** É uma bênção percorrê-lo durante algum tempo, mas um dia ele irá terminar, portanto esteja sempre pronto para despedir-se a qualquer momento. Por mais que você fique deslumbrado por certas paisagens, ou assustado com algumas partes onde é necessário muito esforço para seguir adiante, não se apegue a nada. Nem às horas de euforia, nem aos intermináveis dias onde tudo parece difícil e o progresso é lento. Cedo ou tarde um anjo virá, e sua jornada chega ao final, não esqueça.*

***Honre seu caminho.** Foi sua escolha, sua decisão, e na medida em que você respeita o chão onde pisa, também este chão passa a respeitar seus pés. Faça sempre o que for melhor para conservar e manter seu caminho, e ele fará o mesmo por você.*

***Esteja bem equipado.** Leve um ancinho, uma pá, um canivete. Entenda que para as folhas secas os canivetes são inúteis, e para as ervas muito enraizadas os ancinhos são inúteis. Saiba sempre que ferramenta utilizar a cada momento. E cuide delas, porque são suas maiores aliadas.*

***O caminho vai para frente e para trás.** Às vezes é preciso voltar porque foi perdido algo, ou uma mensagem que devia ser entregue foi esquecida no seu bolso. Um caminho bem cuidado permite que você volte atrás sem grandes problemas.*

***Cuide do caminho, antes de cuidar do que está a sua volta.** Atenção e concentração são fundamentais. Não se deixe distrair pelas folhas secas que estão nas margens, ou pela maneira como os outros estão cuidando dos seus caminhos. Use sua energia para cuidar e conservar o chão que acolhe seus passos.*

Tenha paciência. *Às vezes é preciso repetir as mesmas tarefas, como arrancar ervas daninhas ou fechar buracos que surgiram depois de uma chuva inesperada. Não se aborreça com isso, faz parte da viagem. Mesmo cansado, mesmo com certas tarefas repetitivas, tenha paciência.*

Os caminhos se cruzam. *As pessoas podem dizer como está o tempo. Escute os conselhos, tome suas próprias decisões. Só você é responsável pelo caminho que lhe foi confiado.*

A natureza segue suas próprias regras. *Desta maneira, você tem que estar preparado para súbitas mudanças do outono, o gelo escorregadio no inverno, as tentações das flores na primavera, a sede e as chuvas de verão. Em cada uma dessas estações, aproveite o que há de melhor, e não reclame das suas características.*

Faça do seu caminho um espelho de si mesmo. *Não se deixe de maneira nenhuma influenciar pela maneira como os outros cuidam de seus caminhos. Você tem sua alma para escutar, e os pássaros para contar o que sua alma está dizendo. Que suas histórias sejam belas e agradem tudo que está a sua volta. Sobretudo, que as histórias que sua alma conta durante a jornada sejam refletidas em cada segundo de percurso.*

Ame seu caminho: *sem isso, nada faz sentido".*

(O Livro dos Manuais - Paulo Coelho)

“Quando tudo nos parece dar errado
Acontecem coisas boas
Que não teriam acontecido
Se tudo tivesse dado certo...”

(Renato Russo)

Dedicatória

Dedico a realização deste trabalho...

Aos meus pais ***Maria Luiza Brunhera Faustino*** *e* ***Amador Carlos Faustino****, pelo apoio constante e incondicional, força e coragem oferecidos durante esta longa jornada, que em muitos momentos apresentou-se árdua e desanimadora... pela imensa torcida e por sempre acreditarem em mim. Vocês são meu porto seguro, a base necessária para eu seguir em frente!*

À minha irmã, ***Fernanda Faustino Guiaro****, e ao meu cunhado,* ***Cleber das Neves Guiaro****, pela amizade, conselhos, apoio e força no decorrer da jornada e, especialmente, por sempre estarem ao meu lado me oferecendo suporte e carinho necessários para que eu pudesse superar medos e conquistar sonhos!*

E ao meu grande amor, ***Rômulo Theodoro Costa****, minha fonte de paz, de alegria e de renovação... pela companhia em muitas das viagens necessárias ao desenvolvimento deste trabalho, pela ajuda ao longo da jornada, especialmente na etapa final e, principalmente, pela imensa paciência e suporte emocional a mim dedicados, por me mostrar sempre que "Nada é por acaso" e que "No fim tudo sempre dá certo, do jeito que tem que ser". Ao seu lado a caminhada se tornou menos árdua!*

Obrigada por estarem ao meu lado em cada momento de felicidade ou dificuldade!

"Talvez meio caminho andado seja a gente acreditar no que faz.
Mas acima de tudo, o que mais nos incentiva,
o que mais nos valoriza e também nos torna mais conscientes
de nossas responsabilidades é saber que os outros creem em nós.
E não há palavras que descrevam o que sentimos ao saber
dos sacrifícios a que eles se impõem por crerem não apenas em nós, mas também no que cremos."
(Albert Einstein)

Homenagem

À minha orientadora, ***Profa. Dra. Laura Satiko Okada Nakaghi****, pelos ensinamentos, oportunidades e confiança desde a graduação. Pela credibilidade ao me deixar ter "asas para voar" durante a escolha do tema do doutorado. Pela compreensão e disponibilidade para ajudar em qualquer situação surgida ao longo da jornada. Pelas palavras de incentivo e apoio nos momentos em que a jornada tornou-se árdua, fazendo-me lembrar sempre que "Esperança é a última que morre" e "A fé move montanhas".*

Ao meu coorientador, ***Prof. Dr. Alexandre Ninhaus Silveira,*** *por aceitar o convite para me coorientar, apesar de mal me conhecer... pela ajuda na elaboração do Projeto inicial e construção do Capítulo III da Tese, pela gentileza e atenção nos momentos em que me recebeu na UNESP-Ilha Solteira para tratarmos de assuntos relacionados ao trabalho.*

Ao querido ***Dr. George Shigueki Yasui,*** *o qual tive a honra e sorte de conhecer durante os experimentos no CEPTA/ICMBio e que, portando de imensa humildade e sabedoria, transmitiu-me seus conhecimentos a respeito de criopreservação e androgênese, sugeriu-me ideias e dicas valiosas que me motivaram na caminhada, permitindo também a utilização dos equipamentos e material necessários ao desenvolvimento da técnica de androgênese, que enriqueceram e deram um brilho especial ao meu trabalho.*

Minha gratidão e reconhecimento!

Agradecimentos especiais

A Deus e a todos meus mentores espirituais por me guiarem nas decisões, por me instruírem em cada momento difícil, e por cada vez mais me fazerem entender o sentido da frase "Provações não são castigos, mas oportunidades de aprendizado", porque a provação quando vencida promove o crescimento humano e espiritual.

Aos companheiros do Laboratório de Histologia e Embriologia do Depto. De Morfologia e Fisiologia Animal pelos momentos de companhia, aprendizagem e descontração, pela troca de ideias e sugestões concedidas: Breno Manzini, Cleonice Cristina Hilbig, Fernanda Nogueira Valentin, Lilian Cristina Makino, Maria do Carmo Faria Paes, Marcelo Henrique Correa Assunção, Matheus Pereira dos Santos, Nivaldo Ferreira do Nascimento, Regiane Cristina da Silva e Sheryll Corchuelo Chavarro.

Aos companheiros da FCAV/UNESP - Jaboticabal, Andréa Cristina Scarpa Bosso, José Roberto Ferreira Alves Júnior e Márcio Alves dos Santos pelos momentos de descontração, amizade, sugestões e conselhos.

À Família Costa (Silvan, Cristina, Elaine e Juninho) pela imensa torcida e apoio para que meu trabalho fosse concretizado... pelo carinho e compreensão nos momentos difíceis... pela deliciosa companhia e momentos de descontração que, muitas vezes, fortaleceram-me para continuar a jornada.

A todos da "Igrejinha" (Ádamo Davi Diógenes Siena, Amanda de Faria Santos, Marcel Getaruck, Néviton de Oliveira Junior, Rômulo Theodoro Costa, Rullian César Ribeiro, Sofia Bergamini, Wagner Cavalari Silva Junior) pelos bons e inesquecíveis momentos de bate-papo, churrascos, cervejadas, risadas, jogos e, é claro, muita crítica!

À Fernanda Nogueira Valentin, Lilian Cristina Makino e Regiane Cristina da Silva pela companhia e disponibilidade em participar do primeiro treinamento realizado no CEPTA/ICMBio, junto ao coorientador Prof. Dr. Alexandre Ninhaus-Silveira, para que pudéssemos nos familiarizar com a técnica de criopreservação.

À Lilian Cristina Makino e Regiane Cristina da Silva pela companhia e disponibilidade em participar do segundo treinamento realizado no CEPTA/ICMBio, junto ao pesquisador Dr. George Shigueki Yasui, para que pudéssemos praticar as etapas da técnica de criopreservação.

À Cleonice Cristina Hilbig e Regiane Cristina da Silva por estarem ao meu lado durante toda a execução do projeto, por dividirem comigo, especialmente nos primeiros experimentos, momentos de agonia, de dúvidas, de erros e acertos... muito obrigada pela valiosa ajuda em toda jornada de experimentos com B. vermelha e B. orbignyanus.

Ao Nivaldo Ferreira do Nascimento pela importante ajuda durante a jornada de experimentos com B. orbignyanus, e pela inestimável colaboração na interpretação e análise estatística de todo o trabalho, de forma sempre tão atenciosa e paciente.

À Lilian Cristina Makino que, percebendo minha inexperiência nos estudos com sêmen/espermatozoides, dispôs-se a ir até à FMRP/USP - Ribeirão Preto, para me auxiliar, de forma tão gentil e amiga, na interpretação das eletronmicrografias de transmissão dos espermatozoides da B. vermelha. E também pela leitura da Tese antes da defesa final, com excelentes correções e dicas!

Ao Matheus Pereira dos Santos pela ajuda inestimável nos experimentos relacionados à técnica de androgênese e que, por vezes, com o intuito de contribuir com meu trabalho, executou-os mesmo sem minha presença, demonstrando um grande ato de amizade.

Ao Breno Manzini, Cleonice Cristina Hilbig, Donizete Sant'Anna, Lilian Cristina Makino, Laura Satiko Okada Nakaghi e Valdecir Fernandes de Lima por terem assumido o papel de "motorista", única e exclusivamente com o intuito de transportar a equipe e materiais para os locais onde ocorreram os experimentos ao longo desta jornada.

Obrigada por compartilharem comigo momentos de conquistas, alegrias, frustrações e tristezas.

"Gente não nasce pronta e vai se gastando; gente nasce não-pronta e vai se fazendo."

(Não nascemos prontos! Provocações Filosóficas - Mario Sergio Cortella)

Agradecimentos

Ao Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP) que me trouxe a oportunidade de ingressar no mundo da pós-graduação, possibilitando-me um enriquecimento acadêmico e intelectual em Aquicultura.

Ao Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (CEPTA/ICMBio), Pirassununga-SP, especialmente na pessoa de José Augusto Senhorini e funcionários, por ter fornecido o material biológico (B. vermelha, B. orbignyanus e B. amazonicus) e infraestrutura necessários a este trabalho.

À Estação de Pesquisa e Desenvolvimento Ambiental de Volta Grande (CEMIG), Conceição de Alagoas-MG, especialmente em nome de Caissor Lemes da Costa, Sônia Maria Ramos, João de Magalhães Rosa, Alessandra Gomes Bedore, por ter disponibilizado o material biológico (B. orbignyanus) e infraestrutura indispensáveis a este trabalho.

Aos profissionais do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da FCAV/UNESP - Jaboticabal, em especial, àqueles do Laboratório de Histologia com os quais convivi durante todo esse período.

Ao Sr. Orandi Mateus, histotécnico do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da FCAV/UNESP - Jaboticabal, pelos momentos de bate-papo, descontração e experiências transmitidas.

Aos profissionais do Laboratório de Microscopia da FMRP/USP - Ribeirão Preto, Maria Dolores Seabra Ferreira pelo processamento das amostras para microscopia eletrônica, e José Augusto Maulin pela captura das eletronmicrografias, ambos sempre muito atenciosos e prestativos.

Ao Prof. Dr. Eduardo Antônio Sanches e ao Dr. George Shigueki Yasui pelas valiosas sugestões concedidas durante o Exame Geral de Qualificação.

À Profa. Dra. Elizabeth Romagosa, ao Dr. George Shigueki Yasui, ao Dr. Paulo Sérgio Ceccarelli e ao Prof. Dr. Sergio Fonseca Zaiden, pelas importantes recomendações e correções realizadas durante a Defesa da Tese visando o aprimoramento de meu trabalho.

Ao prof. Dr. Alexandre Nizio Maria pelos valiosas sugestões a respeito do tema criopreservação e trabalhos enviados que me auxiliaram na elaboração do projeto de doutorado, por se mostrar tão atencioso e se dispor a me ajudar na análise do sêmen pelo Software CASA.

À Profa. Dra. Ana Tereza de Mendonça Viveiros e Profa. Dra. Laura Helena Orfão pelas valiosas sugestões a respeito do tema criopreservação durante troca de e-mails.

Ao Prof. Dr. Raul Franzolin Neto, da FZEA/USP - Pirassununga, pela gentil e compreensiva doação de nitrogênio líquido para abastecer um dos botijões na ocasião do início dos experimentos de criopreservação.

Ao Prof. Dr. Sergio Ricardo Batlouni por conceder o lote de B. orbignyanus existente no CAUNESP para utilização em meus experimentos.

Ao Prof. Dr. Takafumi Fujimoto, renomado pesquisador da Universidade de Hokkaido/Japão, com enorme experiência e trabalhos publicados na área de manipulação cromossômica, especialmente androgênese, e que tive o prazer de conhecer durante sua visita pelo Brasil, mostrando-se humilde, disposto a ensinar e a esclarecer qualquer dúvida sobre a técnica, despertando-me grande admiração.

Ao prof. Dr. João Ademir de Oliveira, da FCAV/UNESP - Jaboticabal, pela colaboração nas análises estatísticas.

Ao Rafael Marini Ferreira por ter aceito com tamanha presteza, de forma tão gentil e atenciosa, o desafio de recuperar o HD de meu notebook após o Windows ter sido corrompido, fazendo com que eu não perdesse totalmente os dados referentes ao meu Doutorado e demais arquivos de cunho acadêmico.

Ao Rafael Yutaka Kuradomi pelos momentos em que, muito atencioso, proporcionou-me interessantes sugestões para meu trabalho.

Ao Patrick Hainfellner, Daniel Figueiredo e Thiago Gonçalves de Souza por terem se disponibilizado a passar a rede no viveiro do CAUNESP na ocasião da seleção dos reprodutores de B. orbignyanus para meus experimentos.

À Diretoria, Coordenadores e Funcionários da Pós-Graduação do CAUNESP, especialmente à Veralice Cappatto e David Oliveira Lorente pela compreensão e atenção dispensados em todos os momentos necessários.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Capes, pelo auxilio concedido na forma de Bolsa de Doutorado no início do Curso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pelo auxílio concedido na forma de Bolsa de Doutorado (Processo: 2010/12108-2).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pelo auxílio concedido na forma de Auxílio à Pesquisa/Edital Universal (Processo: 483995/2011-8).

SUMÁRIO

Lista de Figuras xii
Lista de Tabelas xv
Anexos..... xvi
Resumo geral xix
General abstract..... xxii

ESTRUTURAÇÃO DOS CAPÍTULOS DA TESE..... 23
Introdução geral..... 27
1. Caracterização do gênero *Brycon*..... 27
    1.1. Reprodução induzida de espécies reofílicas..... 29
2. Espécies experimentais..... 30
    2.1. *Brycon vermelha* (LIMA & CASTRO, 2000)..... 30
    2.2. *Brycon orbignyanus* (VALENCIENNES, 1849)..... 31
    2.3. *Brycon amazonicus* (SPIX & AGASSIS, 1829)..... 33
3. Importância dos temas abordados..... 34
    3.1. Características físicas e morfológicas do sêmen..... 34
    3.2. Ultraestrutura dos espermatozoides..... 39
    3.3. Criopreservação de sêmen..... 41
    3.4. Androgênese..... 47
4. Objetivos..... 52
    4.1. Objetivo geral..... 52
    4.2. Objetivos específicos..... 52
5. Referências..... 53

Capítulo I: Ultraestrutura dos espermatozoides e parâmetros seminais de *Brycon vermelha* Lima & Castro, 2000 (Characiformes, Characidae)
Resumo..... 66
1. Introdução..... 67
2. Material e métodos..... 68
3. Resultados..... 71
4. Discussão..... 76
5. Conclusão..... 81
6. Agradecimentos..... 82
7. Referências..... 82

Capítulo II: Ultraestrutura dos espermatozoides de *Brycon orbignyanus* Valenciennes, 1849 (Characiformes, Characidae) durante o processo de criopreservação
Resumo..... 86
1. Introdução..... 87
2. Material e métodos..... 89
3. Resultados..... 96
4. Discussão..... 116
5. Conclusão..... 122
6. Agradecimentos..... 122
7. Referências..... 123

Capítulo III: Solução para inativação dos ovócitos de *Brycon amazonicus* Spix & Agassiz, 1829 (Characiformes, Characidae)
Resumo..... 127
1. Introdução..... 128
2. Material e métodos..... 140
3. Resultados..... 133
4. Discussão..... 136
5. Conclusão..... 140
6. Agradecimentos..... 140
7. Referências..... 141

Considerações finais..... 144

Lista de Figuras

CAPÍTULO I

Figura 1. A e B: Microscopia eletrônica de varredura dos espermatozoides de *Brycon vermelha* em secção longitudinal. **Abreviaturas:** c = cabeça; f = flagelo; pi = peça intermediária. **Escala das barras:** A: 5µm; B: 1µm..... 73

Figura 2. Microscopia eletrônica de transmissão do espermatozoide de *Brycon vermelha* em secções longitudinais. **A:** Três partes distintas: cabeça, peça intermediária, flagelo; **B:** Evidenciação da fossa nuclear, complexo centriolar (centríolos proximal e distal) e mitocôndrias; **C:** Evidenciação da bainha citoplasmática; **D:** Presença de faixa citoplasmática ao redor do flagelo. **Abreviaturas:** asterisco = canal citoplasmático; b = bainha citoplasmática; c = cabeça; cc = complexo centriolar; cd = centríolo distal; cp = centríolo proximal; f = flagelo; fn = fossa nuclear; m = mitocôndria; mn = membrana nuclear; n = núcleo; pi = peça intermediária; seta pontilhada = citoplasma ao redor do flagelo. **Escala das barras:** 1µm..... 74

Figura 3. Microscopia eletrônica de transmissão do espermatozoide de *Brycon vermelha* em secções transversais (A, B, C e D2) e em secção longitudinal (D1). **A:** Detalhe do núcleo - cromatina compactada heterogeneamente e corpúsculo basal de onde se inicia o flagelo; **B:** Detalhe da região posterior da cabeça e região apical da peça intermediária - núcleo, porção inicial do flagelo detectada pela observação do axonema, par de mitocôndrias; **C:** Detalhe da região apical da peça intermediária - axonema e mitocôndria; **D:** Flagelo envolvido em toda extensão pela membrana flagelar (D1); Detalhe do flagelo mostrando o axonema com padrão morfológico de nove duplas de microtúbulos periféricos e dois microtúbulos centrais (D2). **Abreviaturas:** a = axonema; cb = corpúsculo basal; m = mitocôndria; mf = membrana flagelar; mn = membrana nuclear; mp = membrana plasmática; n = núcleo; ponta de seta = par central de microtúbulos; seta = pares periféricos de microtúbulos. **Escala das barras:** 1µm..... 75

CAPÍTULO II

Figura 1. Espermatozoides de *Brycon orbignyanus* frescos (grupo controle). **A** e **B:** MEV: Evidenciação das três partes distintas - cabeça, peça intermediária e flagelo. **C-J:** MET (C, D, E, F, G, I em secções longitudinais e H, J em secções transversais). **C:** Núcleo rodeado por uma pequena faixa citoplasmática; cromatina condensada em pequenos grumos e mitocôndrias na região anterior da peça intermediária. **D:** Fossa nuclear abrigando centríolos proximal e distal e início do segmento flagelar. **E - F:** Peça intermediária evidenciando mitocôndrias. **G:** Detalhe das mitocôndrias delimitadas por membranas interna e externa. **H:** Anel concêntrico membranoso. **I:** Flagelos envolvidos pela membrana flagelar. **J:** Detalhe do flagelo mostrando o axonema com padrão morfológico de nove duplas de microtúbulos periféricos e dois microtúbulos centrais. **Abreviaturas:** a = axonema; b = bainha citoplasmática; c = cabeça; cc = canal citoplasmático; cd = centríolo distal; cp = centríolo proximal; f = flagelo; fc: faixa citoplasmática; fn = fossa nuclear; m = mitocôndria; mf: membrana flagelar; mn = membrana nuclear; n = núcleo; pi = peça intermediária; ponta de seta = par centra de microtúbulos; seta = par de microtúbulos periféricos; seta pontilhada: porção inicial do flagelo rodeada por citoplasma. **Escala das barras:** A: 5µm, B a G: 1µm, H a J: 0,5µm..... 102

Figura 2. Espermatozoides de *Brycon orbignyanus* após criopreservação em solução contendo DMSO. MET: A e B - 1 dia de congelamento; C e D - 1 mês de congelamento. MEV: E e F - 1 dia de congelamento; G e H - 1 mês de congelamento. **A:** Membrana nuclear expandida; **B:** Dobramento da membrana nuclear, formação de vesículas na região do citoplasma; **C:** Ruptura da membrana nuclear; **D:** Membrana nuclear expandida e dilatação da mitocôndria; **E:** Enrugamento e dilatação da cabeça, com deformidades e peça intermediária dilatada; **F:** Enrugamento da cabeça, com deformidades e peça intermediária com deformidades. **G:** Dilatação da cabeça, peça intermediária com deformidades; **H:** Enrugamento da cabeça, com deformidades e peça intermediária dilatada; **Abreviaturas:** c = cabeça; cc = canal citoplasmático; f = flagelo; m = mitocôndria; mn = membrana nuclear; n = núcleo; pi = peça intermediária; seta = ruptura membrana nuclear; v = vesícula. **Escala das barras:** 1µm..... 106

Figura 3. Espermatozoides de *Brycon orbignyanus* após criopreservação em solução contendo DMSO. 1 ano de congelamento. A–D: MET. E–H: MEV. **A:** Dobramento da membrana nuclear e alterações morfológicas na peça intermediária; **B:** Dobramento da membrana nuclear, formação de vesículas na região do citoplasma, ruptura da membrana nuclear, cromatina com arranjo não característico alterações morfológicas na peça intermediária; **C:** Membrana nuclear parcialmente desintegrada, cromatina com arranjo não característico e peça intermediária com aspecto de desintegração; **D:** Membrana nuclear parcialmente desintegrada e desintegração total da peça intermediária; **E:** Deformação da cabeça e peça intermediária com evidências de desintegração; **F:** Cabeça e peça intermediária com dilatação; **G e H:** Enrugamento da cabeça, com deformidades e peça intermediária com aparência de desintegração. **Abreviaturas:** c = cabeça; cc = canal citoplasmático; cr = cromatina; f = flagelo; m = mitocôndria; mn = membrana nuclear; n = núcleo; pi = peça intermediária; seta = ruptura da membrana nuclear; v = vesícula. **Escala das barras:** 1µm..... 107

Figura 4. Espermatozoides de *Brycon orbignyanus* após criopreservação em solução contendo metilglicol. MET: A e B - 1 dia de congelamento; C e D - 1 mês de congelamento. MEV: E e F - 1 dia de congelamento; G e H - 1 mês de congelamento. **A:** Dobramento da membrana nuclear, presença de vesículas citoplasmáticas e peça intermediária danificada; **B e C:** Ruptura da membrana nuclear, cromatina com arranjo não característico, perda da conexão entre a cabeça do espermatozoide e da porção inicial do flagelo com a peça intermediária, peça intermediária intensamente danificada; **D:** Dobramento da membrana nuclear, formação de vesículas; **E:** Enrugamento da cabeça, peça intermediária com sinal de desintegração; **F:** Dilatação e enrugamento da cabeça, peça intermediária dilatada. **G:** Dilatação e enrugamento da cabeça e peça intermediária com sinais de desintegração; **H:** Enrugamento da cabeça, peça intermediária dilatada; **Abreviaturas:** c = cabeça; cabeça de seta = perda de conexão; cc = canal citoplasmático; cr = cromatina; f = flagelo; m = mitocôndria; mn = membrana nuclear; n = núcleo; pi = peça intermediária; seta = ruptura da membrana nuclear; v = vesícula. **Escala das barras:** 1µm..... 110

Figura 5. Espermatozoides de *Brycon orbignyanus* após criopreservação em solução contendo metilglicol. 1 ano de congelamento. A–D: MET. E–H: MEV notando-se enrugamento da cabeça e deformidades. **A:** Dobramento da membrana nuclear, formação de vesículas citoplasmáticas e peça intermediária danificada; **B:** Desintegração parcial da membrana nuclear, intensas alterações morfológicas na peça intermediária e mitocôndria intensamente dilatada; **C:** Desintegração e ruptura da membrana nuclear, cromatina com arranjo não característico, formação de vesículas e peça intermediária danificada; **D:** Membrana nuclear parcialmente desintegrada, peça intermediária intensamente alterada e desorganizada; perda da conexão entre a cabeça do espermatozoide e da porção inicial do flagelo com a peça intermediária; **E-H:** Desintegração da peça intermediária sendo que em **G** notou-se a dilatação da mesma. **Abreviaturas:** c = cabeça; cabeça de seta = perda de conexão; cr = cromatina; f = flagelo; m = mitocôndria; mn = membrana nuclear; n = núcleo; pi = peça intermediária; ponta de seta = pequena vesícula; seta = ruptura da membrana nuclear; seta pontilhada: vesículas pequenas; v = vesícula. **Escala das barras:** 1µm..... 111

Figura 6. Espermatozoides de *Brycon orbignyanus* após criopreservação em solução contendo metanol. MET: A e B - 1 dia de congelamento; C e D - 1 mês de congelamento. MEV: E e F - 1 dia de congelamento; G e H - 1 mês de congelamento. **A:** Dobramento e ruptura da membrana nuclear, cromatina com arranjo não característico, peça intermediária danificada; **B:** Ruptura da membrana nuclear, condensação da cromatina com arranjo não característico, perda da conexão entre a peça intermediária com a cabeça do espermatozoide e a porção inicial do flagelo, peça intermediária intensamente danificada; **C:** Ruptura da membrana nuclear, cromatina com arranjo não característico, peça intermediária danificada **D:** Intensa desintegração da membrana nuclear, cromatina com arranjo não característico, peça intermediária danificada; **E e F:** Enrugamento da cabeça, com deformidades e peça intermediária dilatada; **G:** Dilatação e enrugamento da cabeça, com deformidades, peça intermediária dilatada; **H:** Enrugamento da cabeça, com deformidades e peça intermediária dilatada. **Abreviaturas:** c = cabeça; cabeça de seta = perda de conexão; cc =

canal citoplasmático; cr = cromatina; f = flagelo; m = mitocôndria; mn = membrana nuclear; n = núcleo; pi = peça intermediária; seta = rompimento da membrana nuclear. **Escala das barras:** 1µm..... 114

Figura 7. Espermatozoides de *Brycon orbignyanus* após criopreservação em solução contendo metanol. 1 ano de congelamento. A–D: MET evidenciando a intensa deformação da membrana nuclear e peça intermediária alterada e desorganizada. E–H: MEV destacando a cabeça deformada, com enrugamento e desintegração. **B:** Perda da conexão entre a peça intermediária com a cabeça do espermatozoide e aparente condensação não completa da cromatina; **C:** Membrana nuclear parcialmente desintegrada e perda da conexão entre a cabeça do espermatozoide com a peça intermediária; **E-G:** Peça intermediária com sinal de desintegração; **H:** Dilatação da peça intermediária. **Abreviaturas:** c = cabeça; cabeça de seta = perda de conexão; cr = cromatina; f = flagelo; m = mitocôndria; mn = membrana nuclear; n = núcleo; pi = peça intermediária; seta = membrana nuclear rompida. **Escala das barras:** 1µm..... 115

CAPÍTULO III

Figura 1. Ovócitos de *Brycon amazonicus* mantidos por 120 minutos na solução de Ringer (A e B), solução de Hanks (C e D) e na solução de D-PBS (E e F). Abreviatura: ep = espaço perivitelínico. Escala das barras: A, C e E: 2000 µm; B, D e F: 500 µm..... 133

Figura 2. Porcentagem média de ovos "Não fertilizados", larvas "Não eclodidas", larvas "Normais" e larvas "Anormais" após preservação dos ovócitos de *Brycon amazonicus* nas soluções de Ringer, Hanks e D-PBS com tempos de permanência de 30, 60, 90 e 120 minutos..... 136

Lista de Tabelas

CAPÍTULO I

Tabela 1. Parâmetros seminais de *Brycon vermelha*..... 71

Tabela 2. Dimensões dos espermatozoides de *Brycon vermelha*..... 72

CAPÍTULO II

Tabela 1. Características seminais dos reprodutores de *Brycon orbignyanus* utilizados nas Coletas 1 e 2..... 97

Tabela 2. Motilidade espermática de *Brycon orbignyanus* nos tratamentos em cada tempo de congelamento (coluna), e por tratamento ao longo do tempo (linha)..... 98

Tabela 3. Duração da motilidade espermática de *Brycon orbignyanus* nos tratamentos em cada tempo de congelamento (coluna), e por tratamento ao longo do tempo (linha)..... 98

Tabela 4. Temperatura e oxigênio dissolvido na água das incubadoras no CEPTA/ICMBio e na CEMIG..... 99

Tabela 5. Taxa de fertilização de *Brycon orbignyanus* nos tratamentos em cada tempo de congelamento (coluna), e por tratamento ao longo do tempo (linha)..... 100

Tabela 6. Taxa de eclosão de *Brycon orbignyanus* nos tratamentos em cada tempo de congelamento (coluna), e por tratamento ao longo do tempo (linha)..... 100

Anexos

CAPÍTULO I

Anexo 1. A: Exemplar de *Brycon vermelha*; **B:** Viveiro externo do ICMBio onde ficam exemplares de *Brycon vermelha;* **C:** Captura dos exemplares de *Brycon vermelha* utilizados para o experimento; **D:** Indução hormonal em macho de *Brycon vermelha*. **E:** Coleta do sêmen de *Brycon vermelha* em tudo de ensaio graduado. Fonte própria..... 146

CAPÍTULO II

Anexo 2. A: Exemplar de *Brycon orbignyanus*; **B:** Viveiro externo do ICMBio onde ficam exemplares de *Brycon orbignyanus;* **C:** Viveiro externo da CEMIG onde ficam exemplares de *Brycon orbignyanus* **D:** Coleta de sêmen de *Brycon orbignyanus*. Fonte própria..... 147

Anexo 3. Esquema representativo das duas coletas realizadas, com respectivos tempos de armazenamento (1 dia, 1 mês, 1 ano) soluções (DMSO, Metilglicol, Metanol e Grupo controle) e repetições (Inc.). Abreviaturas: Inc. = incubadora; M = macho; F = fêmea..... 148

Anexo 4. A: Distribuição de aproximadamente 5 g de ovócitos de *Brycon orbignyanus* em recipientes devidamente identificados; **B:** Momento da adição do sêmen pós-descongelado aos ovócitos de *Brycon orbignyanus;* **C:** Incubadora confeccionada de material PVC. C1 e C2: Visão da parte superior; C3 e C4: Visão da parte inferior telada; **D:** Disposição das incubadoras na caixa. Fonte própria.... 149

CAPÍTULO III

Anexo 5. A: Coleta de ovócitos de *Brycon amazonicus;* **B:** Coleta de sêmen de *Brycon amazonicus;* **C:** Ovócitos em placas de Petri em manutenção nas soluções de D-PBS (C1), Ringer (C2) e Hanks (C3); Embriões e larvas do grupo controle (Controle); Embriões e larvas após manutenção por 30, 60, 90 e 120 minutos em cada uma das três soluções. Fonte própria..... 150

FAUSTINO, Francine. **Parâmetros seminais, ultraestruturais, criopreservação e androgênese de espécies do gênero *Brycon* ameaçadas de extinção**. 2014. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.

Resumo geral

A Tese de Doutorado foi estruturada em três capítulos, além da "Introdução Geral", que abrange uma revisão bibliográfica das espécies em estudo e dos temas abordados, e das "Considerações Finais". Os três capítulos darão origem a artigos científicos em revistas indexadas. O primeiro artigo (Capítulo I) descreve os parâmetros seminais e a ultraestrutura dos espermatozoides de *Brycon vermelha*, "vermelha" (Characiformes, Characidae). O sêmen da *B. vermelha* possuiu consistência viscosa, e concentração espermática média de 4,34 ± 0,75x10^{10} espermatozoides.mL^{-1}. O tempo de motilidade espermática, quando ativado com água destilada, foi curto, sendo necessários 46,48 ± 0,07 segundos para perda da motilidade de 100% dos espermatozoides. A análise dos espermatozoides por MEV revelou três regiões distintas: cabeça, peça intermediária e flagelo, sendo cada região caracterizada detalhadamente em MET. Tais características sugerem que os espermatozoides de *B. vermelha* apresentam características ancestrais próprias de peixes com fecundação externa classificando-os como "espermatozoides aquáticos uniflagelados anacrossomais", ou seja, *aquasperm* do Tipo I. Estas informações são as primeiras em relação ao sêmen e espermatozoides de *B. vermelha*, podendo ser uma referência para futuros estudos, embasando especialmente pesquisas que adotem biotécnicas, como a criopreservação e androgênese. O segundo artigo (Capítulo II) descreve, ultraestruturalmente, as alterações dos espermatozoides da *Brycon orbignyanus*, "piracanjuba" (Characiformes, Characidae) durante o processo de criopreservação. O exame ultraestrutural dos espermatozoides descongelados criopreservados em soluções contendo DMSO, metilglicol e metanol, em três tempos de armazenamento (1 dia, 1 mês e 1 ano), revelou a presença de alterações no espermatozoide, variando desde pequenas injúrias nas diferentes partes da célula até a destruição total do espermatozoide. A solução contendo DMSO diminuiu as crioinjúrias quando comparada às soluções contendo metilglicol e metanol. Em relação à duração do armazenamento, 1 dia e 1 mês de armazenamento causaram alterações ultraestruturais semelhantes, mas as crioinjúrias aumentaram após 1 ano de armazenamento. As alterações descritas foram nas regiões da cabeça (membrana nuclear e núcleo) e peça

intermediária, e essas lesões afetaram significativamente a motilidade espermática e as subsequentes taxas de fertilização e eclosão. O terceiro artigo (Capítulo III) corresponde à avaliação de diferentes meios de irradiação dos ovócitos de *Brycon amazonicus*, "matrinxã" (Characiformes, Characidae), para a inativação do genoma por irradiação UV. As soluções Dulbecco's-PBS (D-PBS), Ringer e Hanks foram enriquecidas com 0,5% de albumina bovina sérica (BSA), e avaliadas quanto à eficiência na preservação dos ovócitos após o tempo de manutenção 0 (controle), 30, 60, 90 e 120 minutos, à temperatura ambiente de 25.0ºC. Os ovócitos mantidos em solução de Ringer apresentaram a formação de espaço perivitelínico, indicando que a solução é capaz de ativar os ovócitos. Além disso, os valores para eclosão larval, cujos ovócitos vieram da manutenção em solução de Ringer, em todos os tempos, foram zero, sugerindo menor capacidade de preservação desta solução. As soluções D-PBS e Hanks foram capazes de manter a capacidade de fertilização dos ovócitos. No entanto, a solução D-PBS manteve os ovócitos preservados por 90 minutos, mas diminui significativamente quando comparado ao grupo controle, conforme o tempo de manutenção. Com 30 minutos de manutenção em D-PBS, foram registradas os maiores valores para eclosão larval (14,79 ± 21,60%) e larvas normais (9,41 ± 13,11%). Partindo destes resultados, a solução D-PBS poderá ser utilizada como meio de irradiação para os ovócitos de *B. amazonicus*, e estas informações abrem novas possibilidades no campo da androgênese para reconstituição de espécies de *Brycon* ameaçadas de extinção.

Palavras-chave: Androgênese; Criopreservação; Espermatozoide; Peixe; Ultraestrutura.

FAUSTINO, Francine. **Cryopreservation, androgenesis, seminal and ultrastructural parameters of endangered species of the *Brycon* genus**. 2014. Thesis (Doctorate in Aquaculture) – Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.

General abstract

The doctoral thesis consisted of three main chapters besides the "General Introduction", which includes a bibliographic review of the species studied and the topics discussed, and the "Final Remarks". Scientific research articles will be published from the data of the three chapters in the scientific journals listed in the index. The first scientific article (Chapter I) describes the seminal parameters and the spermatozoa structure of *Brycon vermelha*, "vermelha" (Characiformes, Characidae). The semen of the *Brycon vermelha* is viscous and contains, in average, $4.34 \pm 0.75x10^{10}$ spermatozoa.mL^{-1}. Spermatozoa motility was of short duration when activated with distilled water, 46.48 ± 0.07 seconds until 100% of spermatozoa lost their motility. Scanning transmission electron microscopy (STEM) of spermatozoa revealed three distinctive parts: head, middle piece and tail (flagellum). Each part was analysed in detail by transmission electron microscopy (TEM). The characteristics observed suggest that the spermatozoa of *B. vermelha* posses ancestral characteristics of fish that reproduce by external fertilization, and can thus be classified as "uniflagellate anacrosomal aquasperms", or aquasperms Type I. These are the first reports on *B. vermelha* semen and spermatozoa and, therefore, could be used as a reference and benchmark for research studies using biotechniques such as cryopreservation and androgenesis. The second scientific article (Chapter II) describes the ultrastructural alterations of *Brycon orbignyanus*, "piracanjuba" (Characiformes, Characidae) spermatozoa after cryopreservation. Spermatozoa were cryopreserved for 1 day, 1 month or 1 year in solutions containing DMSO, methyl glycol and methanol. The ultrastructural analysis of the frozen-thawed spermatozoa revealed alterations varying from small damages to the different parts of the cell to total destruction of spermatozoa. The solution containing DMSO resulted in less cryodamages than the solutions containing methyl glycol or methanol. Spermatozoa cryopreserved for 1 day showed similar ultrastructural alterations as those cryopreserved for 1 month; however, damages significantly increased after 1 year of cryopreservation. The alterations observed were on the head (nuclear membrane and nucleus) and the middle piece, and significantly affected spermatozoa motility and subsequent fertilization and hatching rates. The third scientific

article (Chapter III) reports the analysis of different irradiation media on *Brycon amazonicus*, "matrinxã" (Characiformes, Characidae) oocytes for genome inactivation by UV irradiation. Dulbecco's-PBS (D-PBS), Ringer and Hanks solutions were enriched with 0.5% bovine serum albumin (BSA) and analysed according to their efficacy in preserving the oocytes after 0 (control), 30, 60, 90 and 120 minutes, at 25.0ºC. The Ringer solution ability to activate the oocytes was confirmed by the presence of the perivitelline space. However, a hatching rate of zero, observed in oocytes kept in this solution for any length of time, suggests low preservation capability. The D-PBS and Hanks solutions were able to maintain the fertilization capability of the oocytes. The D-PBS solution was able to preserve the oocytes up to 90 minutes, however preservation rates were significantly lower than those of the control group. Larval hatching (14.79 ± 21.60%) and normal larval rates (9.41 ± 13.11%) were highest after 30 minutes in D-PBS. Based on these results, it can be concluded that the D-PBS solution can be used as a medium for *B. amazonicus* oocyte irradiation. Furthermore, these findings enable advancements in androgenesis for reconstitution the population of *Brycon* species in danger of extinction.

Keywords: Androgenesis; Cryopreservation; Fish; Spermatozoa; Ultrastructure.

ESTRUTURAÇÃO DOS CAPÍTULOS DA TESE

Esclarecer os motivos que levaram à construção de minha Tese de Doutorado, implica em retomar os fatos desde meu ingresso no curso de Doutorado. Ao iniciar a redação do projeto de pesquisa de Doutorado, eu tinha dois propósitos: 1. Trabalhar com *Brycon* spp. (em alguma espécie do gênero que estivesse com risco de extinção); 2. Trabalhar com sêmen. Ao mesmo tempo, estava disposta a continuar minha linha de pesquisa, desenvolvimento inicial de peixes, que foi tema do meu trabalho na Iniciação Científica e no Mestrado. A partir dessa situação, surgiu a ideia de investigar o efeito da criopreservação do sêmen no desenvolvimento embrionário e larval. Ou seja, a questão que norteou toda a redação do projeto de Doutorado foi: O sêmen criopreservado posteriormente utilizado para fertilização afeta o desenvolvimento dos peixes (*Brycon* spp.)?

Diante disso, e após alguns contatos com o Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – CEPTA/ICMBio, em Pirassununga-SP, decidimos desenvolver o trabalho com *Brycon opalinus* (pirapitinga-do-sul), testando os crioprotetores mais indicados na literatura para *Brycon* spp., enfatizando os estudos da ontogenia inicial para verificar o efeito do sêmen criopreservado sobre a prole. Vale ressaltar que foi realizado um levantamento bibliográfico não sendo encontrado nenhum estudo com a referida espécie envolvendo esta situação. Contudo, no final deste ano (durante os preparativos para execução dos primeiros experimentos), ao ser realizado um novo levantamento bibliográfico, foi encontrada uma Tese de Doutorado com *B. opalinus*, cujo foco era a criopreservação do sêmen. Porém, decidi dar continuidade ao trabalho com esta espécie, já que o enfoque das duas pesquisas era diferente. Ademais, surgiu a ideia de utilizar dados da Tese de Doutorado como, por exemplo, os crioprotetores que apresentaram os melhores resultados, focando-se na investigação das taxas de fertilização, eclosão e sobrevivência larval, além do acompanhamento da embriogênese e desenvolvimento larval (ultraestrutura, morfologia e morfometria). Ao final do mês de dezembro de 2010, foram capturados exemplares adultos de *B. opalinus* nos tanques pertencentes ao CEPTA/ICMBio e preparação do material para a realização do experimento. Porém, como os reprodutores não espermiaram, recorremos à eutanásia de alguns exemplares para observação dos testículos. Assim, pode-se notar que tais peixes já estavam em fase de regressão testicular, havendo a necessidade de espera da próxima estação reprodutiva (em 2011). É importante salientar que os trabalhos de reprodução

induzida com *B. opalinus* no CEPTA/ICMBio foram iniciados na estação reprodutiva de 2010 e, apesar do conhecimento teórico embasado na literatura, não havia ainda a prática e o conhecimento do melhor período para se realizar a reprodução da espécie. A existência da referida Tese de Doutorado (que gerou um artigo publicado em 2011), entre outros motivos, desmotivou-me a continuar o estudo com esta espécie. Neste trabalho, a autora relata que no rio Paraibuna (SP), a reprodução desta espécie ocorre precocemente, entre agosto e novembro, o que pode explicar o fato da espécie já se encontrar em regressão testicular no mês de dezembro.

Aliado a minha desmotivação em trabalhar com *B. opalinus*, surgiu a oportunidade de pesquisa com a *Brycon vermelha* (conhecida como vermelha), o que me entusiasmou muito, já que era a espécie de maior interesse para eu desenvolver minha Tese de Doutorado. Sendo assim, a tese passou a ter como espécie alvo a *B. vermelha*, um peixe com alto risco de extinção, com poucos relatos na literatura, e nenhum trabalho científico com criopreservação de sêmen e estudos morfológicos dos processos da fertilização e pós-fertilização. A partir do mês de setembro de 2011, começaram os estudos com esta espécie nas instalações do CEPTA/ICMBio. Contudo, provavelmente devido ao pouco tempo de adaptação da vermelha em cativeiro (os exemplares haviam sido capturados recentemente no rio Mucuri), os reprodutores mostraram-se sensíveis ao manuseio e às práticas necessárias para a reprodução induzida. Os machos que receberam as doses hormonais espermiaram após cerca de seis horas, vindo a óbito. As fêmeas induzidas hormonalmente morreram antes do término do tempo de espera para extrusão dos ovócitos. Além disso, o transporte de alguns exemplares desde o tanque externo até o laboratório foi suficiente para provocar grande estresse e consequente morte de exemplares. Todos estes fatores culminaram na morte de quase 100% do lote da espécie existente no CEPTA/ICMBio, impossibilitando a continuidade da pesquisa com a vermelha.

É importante salientar que o tempo percorrido de doutorado já perfazia quase dois anos e, dessa forma, senti a necessidade e urgência em iniciar os trabalhos com criopreservação ainda na estação reprodutiva de 2011. Diante disso, como opção para minha pesquisa de doutorado, a espécie do gênero *Brycon* escolhida foi a *B. orbignyanus*, piracanjuba (grande disponibilidade de exemplares). Apesar da existência de trabalhos com criopreservação de sêmen desta espécie, o foco desta pesquisa seria o efeito do sêmen criopreservado sobre o desenvolvimento embrionário e larval da piracanjuba. Assim, em dezembro de 2011, iniciamos os trabalhos com os lotes de *B. orbignyanus* do

CEPTA/ICMBio. Apesar de existir inúmeros exemplares da espécie, em todos os experimentos realizados (em 2011 e 2012), os valores obtidos para as taxas de fertilização e eclosão foram baixos, o que prejudicou a coleta de amostragens (ovos/embriões/larvas) para realização das análises propostas (morfologia/morfometria dos embriões e larvas), e as larvas de todos estes experimentos morreram precocemente, impossibilitando avaliar a sobrevivência larval. Ademais, a escassez de fêmeas desta espécie nos Institutos e Centros de pesquisa (fundamental para obtenção de ovócitos para fertilização com sêmen criopreservado) também prejudicou o andamento dos trabalhos. Geralmente, em lotes com cerca de 100 indivíduos, menos de 10% eram fêmeas. Devido a estes acontecimentos, o objetivo do trabalho passou a ser, principalmente, a análise das injúrias causadas pelas soluções crioprotetoras sobre os espermatozoides e sua relação com os diferentes tempos de armazenamento do sêmen no botijão de nitrogênio líquido, com a motilidade pós-descongelamento e as taxas de fertilização/eclosão.

Diante dos fatos, no decorrer do ano de 2012, senti a necessidade de enriquecer meu trabalho, acrescentando análises ou desenvolvendo alguma técnica relacionada ao contexto do problema, já que a proposta inicial do meu projeto havia sido totalmente perdida, gerando certa insatisfação. Em dezembro de 2012, surgiu a oportunidade de trabalhar com a técnica conhecida como androgênese. A ideia de desenvolver tal procedimento veio após algumas discussões com um renomado pesquisador da área, Dr. George Shigueki Yasui, com o qual foram levantados certos questionamentos como: Atualmente, existe a capacidade de se manter um banco de sêmen, mas ainda há insucesso na criopreservação de ovócitos. Logo, como serão adquiridos os ovócitos para se proceder à fertilização e garantir a perpetuidade da *B. orbignyanus*? O que fazer com o estoque de sêmen criopreservado? A aplicação do método chamado androgênese seria uma saída para a continuidade (reconstituição) desta espécie. A androgênese consiste na produção de linhagens que apresentam somente o genoma paterno, sendo uma técnica de produção de peixes por manipulação cromossômica. Para fazer parte de minha Tese de Doutorado, foram realizados experimentos relacionados à primeira etapa da técnica.

Diante do exposto, a Tese de Doutorado foi estruturada em três capítulos, além da "Introdução geral" que permitiu identificar o tema e sua problematização, sendo apresentadas as espécies envolvidas na pesquisa e as "Considerações finais" baseadas nas informações obtidas na literatura e no desenvolvimento do trabalho e algumas recomendações para aplicações e trabalhos futuros.

Os três capítulos foram construídos com base nos resultados obtidos e darão origem a artigos científicos, sendo:

Capítulo I: Ultraestrutura dos espermatozoides e parâmetros seminais de *Brycon vermelha* Lima & Castro, 2000 (Characiformes, Characidae). A coleta do sêmen de três exemplares da vermelha possibilitou o conhecimento da qualidade seminal e ultraestrutura dos espermatozoides, sendo estes os primeiros dados a respeito da biologia reprodutiva desta espécie;

Capítulo II: Ultraestrutura dos espermatozoides de *Brycon orbignyanus* Valenciennes, 1849 (Characiformes, Characidae) durante o processo de criopreservação. As injúrias causadas pelas soluções crioprotetoras sobre os espermatozoides da piracanjuba foram descritas ultraestruturalmente, sendo possível mostrar detalhes inéditos das mudanças provocadas pelo processo de criopreservação nas células espermáticas da espécie;

Capítulo III: Solução para preservação dos ovócitos de *Brycon amazonicus* Spix & Agassiz, 1829 (Characiformes, Characidae). A escolha da solução propícia para preservar os ovócitos da matrinxã (para ser o meio de irradiação UV para inativação do genoma materno) foi estabelecida com sucesso, sendo inéditos estes resultados referentes à primeira etapa para o desenvolvimento da androgênese em espécies do gênero *Brycon* como forma de proporcionar a reconstituição das espécies deste gênero que se encontram ameaçadas de extinção.

Introdução geral

1. Caracterização do gênero *Brycon*

As espécies da ordem Characiformes estão distribuídas pela América do Sul (90%) e África, havendo também algumas espécies na América Central. No Brasil existem aproximadamente 1300 espécies distribuídas em 16 famílias (BRITSKI et al. 1999).

A família Characidae é uma das maiores e mais complexas dentre as famílias da ordem Characiformes, e engloba um número de espécies maior que o de todas as demais famílias da ordem (NAKATANI et al. 2001). A complexidade é tal que se torna muito difícil caracterizar a família como um todo e diferenciar das demais famílias de Characiformes utilizando-se apenas caracteres externos (BRITSKI et al. 1999), pois a forma do corpo e os biótopos que habitam são extremamente variados (NAKATANI et al. 2001). Na América do Sul, esta família compreende cerca de 30 subfamílias e 250 gêneros, e inclui peixes de hábitos alimentares variados (herbívoros, onívoros, carnívoros) que exploram uma grande variedade de habitats (BRITSKI et al. 1988).

Entre as subfamílias dos caracídeos, destacam-se os Bryconinae, compreendendo espécies de porte mediano a grande, com ampla distribuição geográfica, da América Central à América do Sul (BRITSKI et al. 1988). Os peixes da subfamília Bryconinae possuem hábitos alimentares herbívoros ou onívoros, e caracterizam-se pela presença de três séries de dentes no pré-maxilar, duas séries no dentário, e uma série no maxilar, o qual apresenta dentes por quase toda extensão. A linha lateral localiza-se abaixo do meio do flanco. A nadadeira anal é longa e a caudal bifurcada (BRITSKI et al. 1999). De acordo com Lima (2003), a subfamília Bryconinae compreende três gêneros: *Brycon*, *Chilobrycon* e *Henochilus*.

O nome *Brycon* descende da palavra grega *Brycho*, que significa morder ou devorar com certo barulho (GODOY, 1975). O gênero *Brycon* está distribuído da América Central à América do Sul (HOWES, 1982), do México à Bacia do Rio Prata (LIMA E CASTRO, 2000), distribuindo-se pelas principais bacias hidrográficas brasileiras, tais como Amazônica, Paraná, Paraguai e Araguaia-Tocantins (ANTUNES et al. 2010).

Os peixes do gênero *Brycon* possuem corpo alongado, cabeça com duas grandes fontanelas, e as escamas, tanto abaixo quanto acima da linha lateral, são muito semelhantes entre si quanto à forma. A linha lateral é completa, estando abaixo da linha

mediana do corpo, decurvada na parte anterior, sendo o ventre arredondado, tornando o corpo fusiforme, sobretudo em formas jovens (BALDISSEROTTO e GOMES, 2005). São peixes de piracema (reofílicos) e dependentes de alimentação alóctone (frutos e sementes) (CASTAGNOLLI, 1992).

Segundo o IBAMA (In MMA 05/04, 2008), a interferência antrópica nos ecossistemas fluviais influencia diretamente o hábitat destas espécies de peixes. A combinação de dois fatores, em especial, constitui a principal ameaça à conservação das espécies. O primeiro fator é a destruição das matas ciliares, juntamente com a poluição dos rios, que trazem um impacto particularmente relevante sobre estas espécies em razão do caráter essencialmente alóctone dos itens que compõem sua dieta. O segundo fator é a construção de barragens, que constituem uma barreira intransponível na rota migratória das espécies de piracema, reduzindo ou eliminando sua eficiência reprodutiva.

O IBAMA (In MMA 05/04, 2008), destaca que o efeito deletério notório causado por uma hidrelétrica é a criação de uma barreira intransponível à migração das espécies. Contudo, a criação de um obstáculo é, provavelmente, o menor dos problemas causado por hidrelétricas aos peixes migradores. A "regulação" do fluxo de águas pelas hidrelétricas ocasiona a perda de intensidade das enchentes de jusante, uma vez que a maior parte da água é armazenada na represa para a geração de energia, sendo liberada em um ritmo irregular, de acordo com a demanda energética. A biota aquática fluvial evoluiu de modo a beneficiar-se dos pulsos de cheia, quando acontece o aporte de nutrientes liberados pelo solo recém-inundado e quando novos habitats tornam-se disponíveis para os peixes e larvas. Por eliminar essas grandes cheias, o represamento tem um severo impacto nas planícies de inundação situadas abaixo do reservatório. A redução e imprevisibilidade de enchentes provocam a drástica redução de produtividade do ecossistema. Outro efeito é a retenção de sedimentos e nutrientes pela represa ou, como expresso por Baxter (1977), o que é retido pelo lago (do reservatório) como calor, sedimento, nutrientes orgânicos e inorgânicos, é perdido pelo curso d'água.

Como consequência das alterações físicas/ecológicas mencionadas anteriormente, o gênero *Brycon* apresenta muitas espécies na "Lista de Espécies Aquáticas Ameaçadas de Extinção". São elas: *Brycon devillei*, *Brycon insignis*, ambos conhecidos como piabanha, *Brycon nattereri*, vulgarmente chamado pirapitinga, *Brycon opalinus*, denominado também pirapitinga ou pirapitinga-do-sul, *Brycon orbignyanus*, chamado piracanjuba, picaranjuva, bracanjuba ou bracanjuva e *Brycon vermelha*, conhecida como vermelha (In MMA 05/04, 2008).

Nos últimos anos, vários grupos de pesquisa têm intensificado estudos visando a viabilização dos peixes do gênero *Brycon* não só na piscicultura, mas também no repovoamento de regiões onde estejam ameaçados de extinção (OLIVEIRA et al. 2004). Algumas características, como qualidade e sabor da carne, além do rápido crescimento e ganho em peso demonstrados em criações experimentais, tornam estas espécies como alternativa para o desenvolvimento da piscicultura em todo o Brasil (MURGAS et al. 2003).

1.1. Reprodução induzida de espécies reofílicas

Para a criação dos peixes reofílicos em cativeiro, é necessária a utilização da técnica de reprodução induzida. Na natureza, em uma determinada época do ano, em resposta a estímulos ambientais, ocorrem periódicas descargas de gonadotrofina na corrente sanguínea que induzem o início da fase de vitelogênese. Concluída a vitelogênese, a atividade ovariana se torna mais reduzida e permanece em sintonia com a adequação das condições ambientais, garantindo que a liberação dos ovócitos coincida com o período em que as características ambientais estejam adequadas para propiciar a máxima sobrevivência da prole. Esta fase é conhecida como "período de dormência" e sua duração varia de uma espécie para outra, sendo observado, para peixes nativos, um período desde poucas semanas até alguns meses. Durante o "período de dormência", quando as condições ambientais são propícias, tem início a etapa final de maturação gonadal (ZANIBONI-FILHO e WEINGARTNER, 2007).

A fase final de maturação dos ovócitos é caracterizada pela migração da vesícula germinativa (núcleo) para a periferia celular e a sua posterior desintegração, quando os ovócitos estão prontos para serem eliminados do envelope folicular. Se o período de dormência transcorrer, mas as condições ambientais não forem propícias para desencadear a maturação final e posterior desova, tem início o processo de atresia folicular ou reabsorção celular, seguido pelo rearranjo gonadal (WOYNAROVICH E HORVÁTH, 1983; VAZZOLER, 1996). Em cativeiro, a etapa de maturação final é bloqueada, sendo indispensável o uso da indução à maturação gonadal por meio da aplicação de hormônios (ZANIBONI-FILHO e WEINGARTNER, 2007).

Os primeiros trabalhos de indução à desova de peixes reofílicos foram desenvolvidos paralelamente na Argentina e Brasil, com resultados positivos de indução à maturação final e desova de peixes migradores, a partir da aplicação de hormônios naturais presentes na hipófise de peixes maduros. Essa técnica continua sendo uma das

alternativas utilizadas para induzir a reprodução de peixes migradores pelo mundo, sendo conhecida como técnica de "hipofisação" (ANDRADE e YASUI, 2003).

As condições de criação afetam o desenvolvimento gonadal, principalmente durante a fase de vitelogênese, de modo que, uma limitação na qualidade ou quantidade do alimento, densidade de estocagem excessiva e o estresse, podem induzir a reabsorção de ovócitos vitelogênicos, resultando em menor número de ovócitos maduros, ou ainda, podem atuar em uma mais precoce fase, impedindo o início da vitelogênese (HARVEY e CAROLSFELD, 1993).

A capacidade de seleção de peixes maduros é vital para o sucesso do processo de indução da maturação final e desova, sendo considerada a etapa para o sucesso da desova (ZANIBONI-FILHO e WEINGARTNER, 2007). Apesar da diversidade de procedimentos recomendados para garantir a seleção adequada dos reprodutores, persistem as diferenças que são observadas entre indivíduos ou situações, talvez afetados pela temperatura, estresse ou outro fator ambiental, ou ainda, algum fator do processo de maturação gonadal ainda não determinado (CAROLSFELD, 1989). Esse fato pode ser comprovado pela dificuldade das estações de piscicultura em obter a desova da totalidade dos peixes migradores brasileiros selecionados (ZANIBONI-FILHO e WEINGARTNER, 2007).

2. Espécies experimentais

2.1. *Brycon vermelha* (LIMA & CASTRO, 2000)

Brycon vermelha é uma espécie nativa, que atinge pelo menos 40 cm de comprimento padrão, e recebe o nome comum de vermelha devido à coloração avermelhada das nadadeiras. A análise do conteúdo estomacal de alguns exemplares tem evidenciado hábito alimentar diversificado, com a ingestão de peixes, frutos e insetos aquáticos (LIMA e CASTRO, 2000).

A espécie é endêmica da Bacia do Rio Mucuri, estado de Minas Gerais, Brasil, e está inserida na categoria "vulnerável" (VU) no Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção, conforme relata o IBAMA (In MMA 05/04, 2008), sendo os registros da espécie bastante esporádicos.

Ainda de acordo com o IBAMA (In MMA 05/04, 2008), a destruição e alteração do habitat da *B. vermelha* constituem o principal tipo de ameaça à espécie. Na bacia do rio Mucuri, particularmente importantes são a construção de reservatórios, responsáveis pela alteração ou eliminação dos ambientes lóticos, desmatamento e lançamento de

esgotos doméstico e industrial. Ademais, a introdução de espécies exóticas, como tucunaré (*Cichla monoculus*), tambaqui (*Colossoma macropomum*) e bagre-africano (*Clarias gariepinnus*), é comum no rio Mucuri e representa uma ameaça real à conservação da espécie.

Dentre os 45 mil exemplares de peixes transpostos na piracema de 2003/2004 junto à barragem da Usina Hidrelétrica de Santa Clara, Nanuque-MG, localizada na região de transição entre o baixo e o médio curso do rio Mucuri, apenas dois exemplares eram desta espécie (POMPEU, 2005). Drummond et al. (2005) relatam que a construção de Pequenas Centrais Hidrelétricas (PCHs) na bacia do Rio Mucuri representa grande risco à preservação de espécies de peixes, como a vermelha. Aliado à esta questão, o fato da vermelha ser considerada uma bela espécie, fez com que fosse muito apreciada na culinária da região, sendo constantemente alvo da pesca amadora, contribuindo para a redução da espécie (POMPEU e VIEIRA, 2008).

O IBAMA (In MMA 05/04, 2008) relata que a principal estratégia para a conservação da vermelha consiste na manutenção de trechos significativos de rio com as características lóticas originais, associadas a programas de revegetação ciliar. Adicionalmente, é necessária a avaliação da distribuição atual da espécie e abundância da população, bem como a realização de estudos acerca de suas necessidades biológicas, em especial com relação à distribuição e comportamente migratório.

Por ser uma espécie recentemente conhecida pela comunidade científica, não foram encontrados na literatura detalhes sobre a biologia reprodutiva ou qualquer pesquisa envolvendo a espécie. Dessa forma, estudos com *B. vermelha* são oportunos e urgentes, não somente para trazer conhecimento a respeito da espécie, mas também para o desenvolvimento de técnicas que possam contribuir para sua conservação/recuperação.

2.2. ***Brycon orbignyanus*** (VALENCIENNES, 1849)

Brycon orbignyanus, popularmente conhecida por piracanjuba (GO, MG, MS, SP, PR, SC, RS), piracanjuva, bracanjuva ou bracanjuba (SC e RS), é uma espécie de grande porte, reofílica, que habita águas claras (GOULDING, 1980). É principalmente frugívora ou onívora, com preferência na ingestão de frutas e sementes (ZANIBONI-FILHO e SCHULZ, 2003), sendo os insetos e pequenos peixes considerados itens secundários (HAHN et al. 1997).

Trata-se de uma espécie amplamente distribuída na América do Sul, encontrada nas Bacias dos rios Paraná e Uruguai, no Brasil (CASTAGNOLLI, 1992), e consta no

Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção, inserida na categoria "em perigo" (EM), ou seja, sofre risco muito alto de extinção num futuro próximo, segundo o IBAMA (In MMA 05/04, 2008). Em 2003, a Fundação Biodiversitas relatou a situação delicada da piracanjuba, quando divulgou a lista de espécies em extinção, sendo que a mesma se enquadrou nos três itens considerados: redução dos estoques naturais, maior número de machos do que fêmeas e pesca abusiva na qual exemplares são capturados sem ter atingido peso e comprimento estabelecidos por lei.

A situação da *B. orbignyanus* é cada vez mais preocupante e, como medida, o IAP (Instituto Ambiental do Paraná) por meio da Portaria nº 211 de 23 de outubro de 2012, proibiu a pesca desta espécie durante três anos no Paraná. Esta decisão foi baseada em estudos que apontam a redução dos estoques pesqueiros ao longo dos anos nos rios Iguaçu, Paraná e Paranapanema (IAP, Portaria 211, 2012).

A piracanjuba encontra-se ameaçada por uma combinação de quatro fatores: destruição das florestas ciliares, represamentos, poluição e introdução de espécies. Dificilmente encontrada nos rios da Bacia do Uruguai, e praticamente extinta nos rios da Bacia do Paraná, com registros recentes esporádicos nos rios Grande e Paranapanema, e provavelmente extinta do rio Tietê (IBAMA – In MMA 05/04, 2008).

A remoção das florestas ciliares, juntamente com a poluição dos rios, foi o primeiro fator apontado como causa do declínio da espécie nos rios da Bacia do Paraná (GODOY, 1975). Espinach-Ros e Ríos (1997) consideram a retirada das florestas ciliares como o principal fator para o desaparecimento da espécie nos rios da Bacia do Uruguai.

A construção de reservatórios hidrelétricos não só estabelece uma barreira à migração reprodutiva da espécie, mas também altera o regime de cheias a jusante e reduz a disponibilidade de habitats adequados, pelo alagamento permanente de trechos da bacia. A piracanjuba é uma espécie altamente dependente dos pulsos naturais de cheias e, como se tornou muito notório no alto Paraná, não se adapta aos rios com vazão regulada. O estímulo para a reprodução da espécie, tão logo a temperatura deixe de ser um fator limitante, está na dependência da ocorrência de fluxo adequado de água (ZANIBONI-FILHO e SCHULZ, 2003).

Outros fatores, como a predação e competição de espécies exóticas, também vêm contribuindo para o declínio da piracanjuba. Percebe-se que, nos anos em que as cheias são elevadas e duradouras, inúmeros juvenis de piracanjuba se dispersam por toda a região, mas desaparecem em alguns meses. Acredita-se que a predação natural pelo homem, aliada à falta de alimento para as formas adultas, que são mais estenófagas

(seletivas) e frugívoras, leva a altas taxas de mortalidade dos juvenis. É nesse interim que vem se destacando a proliferação de espécies exóticas como a corvina (*Plagioscion squamosissimus*) e, mais recentemente, o tucunaré (*Cichla* spp.) (IBAMA – In MMA 05/04, 2008).

A piracanjuba é uma das espécies mais dependente de recursos alóctones na dieta, particularmente da vegetação ciliar (ZANIBONI-FILHO e SCHULZ, 2003). Dessa forma, o IBAMA (In MMA 05/04, 2008) enfatiza que a recomposição da floresta ciliar parece imprescindível para a conservação da espécie. Além disso, as áreas críticas ao ciclo de vida (locais de desova e criadouros naturais), necessitam ser identificadas e protegidas e/ou recuperadas.

O aprimoramento da piscicultura com espécies nativas é de grande interesse para a conservação da biodiversidade e se constitui prioridade do IBAMA (CONTE et al. 1995). Contudo, sabe-se que a prática da reprodução induzida para a piracanjuba apresenta uma série de dificuldades. A espécie, assim como outros peixes, tem problemas relacionado ao manejo, de caráter estressante, identificado pela presença de grande descamação do corpo, que levam a perdas econômicas devido à morte dos reprodutores (GANECO e NAKAGHI, 2003). Essa sensibilidade ao manejo reprodutivo da espécie reflete também na qualidade das desovas, acarretando, geralmente, em baixas taxas de fertilização/eclosão e sobrevivência larval, fato observado por Dumont-Neto et al. (1997), Oliveira et al. (2012) e Paes (2013).

Como se pode perceber ao longo do exposto, *B. orbignyanus* merece especial atenção no que diz respeito à reprodução em cativeiro e, consequentemente, foco na conservação/recuperação da espécie. Neste contexto, a técnica conhecida como criopreservação surge como uma ferramenta propícia à manutenção de bancos de sêmen, para utilização futura em processos de reconstituição da espécie. Porém, ainda se faz necessária a concretização da técnica, por meio da averiguação de fatores que mostrem a eficácia do procedimento, com garantia de espermatozoides viáveis.

2.3. ***Brycon amazonicus*** (SPIX & AGASSIZ, 1829)

Antes da revisão do gênero *Brycon* realizada por Lima (2003), a matrinxã era nomeada como *Brycon cephalus*. Entretanto, a distribuição de *B. cephalus* está restrita ao alto rio Amazonas no Peru e Bolívia, enquanto *Brycon amazonicus* tem ampla distribuição na bacia do rio Amazonas e seus tributários da parte brasileira. *B. amazonicus* é conhecida com o nome vulgar de matrinxã (ou matrinchã) na maior parte da Amazônia

Central (LIMA, 2003; SANTOS et al. 2006), sendo também chamada de "jatuarana" na bacia do rio Madeira (GOULDING, 1979).

É uma espécie de grande porte, podendo alcançar 40 cm de comprimento. Possui coloração cinza-amarelada, mais clara no ventre, e escamas com as bordas escuras. A espécie é onívora, consumindo basicamente frutos, sementes, insetos e outros invertebrados. Os juvenis têm maior preferência por peixes e artrópodes, enquanto os adultos preferem frutos e sementes (FERREIRA et al. 1998; SANTOS et al. 2006).

Segundo dados do IBAMA (In MMA 05/04, 2008), a matrinxã é a segunda espécie mais cultivada nos empreendimentos de aquicultura na Amazônia Ocidental, sendo considerada uma espécie promissora e de importância para piscicultura regional, além de bem aceita no mercado consumidor local (IZEL e MELO, 2004).

O Ministério da Pesca e Aquicultura de 2013, por meio do Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura, em 2013, lançou os dados referentes à produção aquícola continental de 2011, mostrando que a produção da matrinxã perfez 1% da produção total. Este dado é interessante e merece destaque, visto que o quadro geral mostra que os peixes mais cultivados (tilápia, tambaqui, tambacu, carpa e pacu) representaram 87% da produção total, que foi de 544.490 toneladas.

Em se tratando de reprodução em cativeiro, a biologia reprodutiva da matrinxã indica grande potencial para a produção de juvenis. Por apresentar elevados valores de fecundidade relativa, além de características zootécnicas favoráveis como grande adaptabilidade às condições de cativeiro e rápido crescimento, a espécie é considerada um grande potencial para a aquicultura (ZANIBONI-FILHO et al. 2006).

A matrinxã não está inserida no "Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção" e, pode ser considerada uma espécie modelo/padrão para estudos que estejam relacionados com a recuperação/reconstituição das demais espécies do gênero *Brycon*, que se encontram fortemente ameaçadas de extinção.

3. Importância dos temas abordados

3.1. Características físicas e morfológicas do sêmen

Para o sucesso tanto técnico quanto econômico na aquicultura, é necessário que a seleção dos reprodutores seja realizada levando-se em consideração, principalmente, a produção de gametas de alta qualidade (MURGAS et al. 2011).

Nos procedimentos de inseminação artificial, normalmente a preocupação com relação à qualidade dos gametas é focada na obtenção de ovócitos de boa qualidade,

estando a produção de gametas masculinos de qualidade em segundo plano. Muitas vezes, a utilização do sêmen, tanto em termos de quantidade como em relação à qualidade, é inadequada, o que faz a fertilização não ser bem sucedida e, caso prossiga o desenvolvimento, afetando também a saúde das larvas (RURANGWA et al. 2004).

A qualidade do sêmen é determinada pela sua habilidade em fertilizar com sucesso um ovócito (BOBE e LABBÉ, 2010). Portanto, todo parâmetro físico que estiver relacionado direta ou indiretamente com a capacidade de fertilização pode ser usado como uma medida da qualidade do sêmen (RURANGWA et al. 2004).

As características seminais são de grande importância para o estabelecimento de técnicas como a fertilização artificial. Para a descrição do perfil espermático de uma espécie, devem ser avaliadas características físicas como volume, motilidade e concentração, além das características morfológicas dos espermatozoides (ROUTRAY et al. 2007). O conhecimento dessas características é importante para que se possa avaliar a qualidade do sêmen coletado e, com isso, otimizar sua utilização no processo de fertilização artificial (MURGAS et al. 2011).

Apesar dos esforços significativos para a melhor compreensão dos fatores que afetam a qualidade dos gametas, o quadro está longe de ser elucidado. Alguns dos fatores responsáveis pela variabilidade da qualidade dos gametas permanecem largamente desconhecidos ou mal compreendidos e muito pouco se sabe sobre os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na qualidade de ovócitos e sêmen (BOBE e LABBÉ, 2010).

Volume seminal

O volume seminal não tem um valor intrínseco biológico, mas sim na quantidade de células fecundantes. O volume é variável entre as diversas espécies e inclusive na mesma espécie, por ser influenciado pela estação do ano, clima, período de repouso testicular, uso de indutores e método de coleta (MURGAS et al. 2011). Em relação ao método de coleta, por exemplo, as variações quanto ao volume de sêmen liberado são devido à maneira como é realizada a extrusão dos gametas, que não garante a liberação total do sêmen presente nos testículos (FERREIRA et al. 2001).

Algumas espécies podem liberar um volume relativamente grande de sêmen (>10 mL, como *Brycon orbignyanus*), enquanto em outras espécies o o sêmen é muito difícil de se obter, sendo necessário realizar a coleta intratesticular, como em *Luciobrama macrocephalus* e *Zungaro jahu* (VIVEIROS e GODINHO, 2009). É observado um

aumento significativo do volume seminal na maioria das espécies de peixes que recebem tratamento hormonal (MURGAS et al. 2011).

Concentração espermática

A concentração espermática é uma das medidas quantitativas mais importantes utilizadas na pesquisa, sendo rotina de avaliação do sêmen de peixes de fecundação externa ou interna, com o intuito de maximizar o aproveitamento do material fecundante subsequente fertilização (FOGLI DA SILVEIRA et al. 1987). O número de espermatozoide.mL^{-1} é altamente variável entre as espécies brasileiras (TAITSON e GODINHO, 2003).

Segundo Salisbury e Vandemark (1964), a determinação da concentração espermática é um dado fundamental no sentido de se conhecer a quantidade de material fecundante. Esta medida expressa a quantidade de espermatozoides por volume de sêmen, e os valores podem variar de acordo com peso e idade do peixe, época do ano (SILVA et al. 2009), frequência de coleta e volume do ejaculado (MURGAS et al. 2011). Por este motivo, Taitson e Godinho (2003) relatam uma grande variação na concentração espermática dos peixes em geral, acarretando informações diferenciadas dentro da mesma espécie.

Sanches et al. (2011) relatam que a mensuração da concentração espermática oferece informações básicas para o desenvolvimento de estratégias de reprodução artificial em peixes, como a seleção de animais com bom potencial reprodutivo e o emprego de doses inseminantes adequadas para cada espécie.

Estudos sobre a composição do sêmen têm demostrado grandes variações intraespecíficas e interespecíficas, principalmente na concentração espermática e na composição do plasma seminal. Estas variações têm sido atribuídas a fatores como variabilidade genética, envelhecimento dos espermatozoides no testículos, sazonalidade, estado gonadal e estratégia reprodutiva (RANA, 1995; SHANGGUAN e CRIM, 1995).

A concentração espermática pode variar de 7,3 x 10^9 espermatozoides.mL^{-1} em *B. orbignyanus* (FELIZARDO et al. 2010) a 125 x 10^9 espermatozoides.ml^{-1} em *Rhamdia quelen* (BORGES et al. 2005). O aspecto visual do sêmen de peixes alterna de aquoso a denso e pode estar relacionado aos valores de concentração espermática dos machos, concluindo-se que quanto mais viscoso for o sêmen, maior será sua concentração espermática (LUZ et al. 2001).

Motilidade espermática

A motilidade espermática é um dos principais parâmetros a serem considerados na análise da qualidade do sêmen de peixes, embora espermatozoides inférteis possam apresentar algum tipo de motilidade (BILLARD et al. 1995). As células espermáticas apresentam características espécie-específicas como, por exemplo, início, duração e padrão da motilidade (COSSON et al. 2000). Deve-se levar em conta que a motilidade espermática é influenciada por inúmeros fatores, como temperatura, estado nutricional, estado sanitário, condições de análise, soluções ativadoras empregadas e espécie estudada (MURGAS et al. 2011).

Os espermatozoides de peixes permanecem em estado quiescente enquanto se encontram no lúmen testicular, e sua motilidade ocorre após a espermiação em um meio aquoso no caso de peixes de fertilização externa, ou dentro do trato reprodutivo feminino, em espécies de fertilização interna (STOSS, 1983; MORISAWA, 1985).

De uma maneira geral, a motilidade espermática em peixes de água doce é suprimida pela osmolaridade isotônica do plasma seminal e, quando ocorre uma diminuição na osmolaridade externa, a motilidade espermática é iniciada (TAKAI e MORISAWA, 1995). Ou seja, os espermatozoides de peixes de água doce são ativados quando entram em contato com uma solução que apresente osmolaridade inferior à do plasma seminal, que é próxima a 300 $mOsm.Kg^{-1}$ (ALAVI e COSSON, 2006). Esta ativação ocorre por meio da troca de íons entre a solução e o espermatozoide, por diferença osmótica. Como a solução é hiposmótica em relação ao espermatozoide, ocorre um influxo de água para dentro das células, que posteriormente utilizam os íons K^+, Na^+ e Ca^{2+} como gatilhos para liberação de energia, conforme a espécie (CIERESZKO et al. 2000).

A diminuição da capacidade de movimentos dos espermatozoides é originada, em parte, pela diminuição do estoque de energia ocorrida durante o período de motilidade (MURGAS et al. 2011). A qualidade do sêmen, em termos de motilidade espermática, é usualmente expressa pela porcentagem de espermatozoides móveis em uma amostra de sêmen adequadamente ativado (MELO e GODINHO, 2006).

Além desta taxa, outro critério para o sucesso da reprodução é a duração da motilidade, pois normalmente os espermatozoides de teleósteos permanecem móveis por um curto período de tempo, geralmente inferior a um minuto (MELO e GODINHO, 2006).

Diversos autores utilizam diferentes escalas para avaliarem a taxa de motilidade espermática pelo método subjetivo. Por exemplo, Maggese et al. (1984) estabeleceram uma escala arbitrária de 0 a 2, sendo que o valor 0 indica espermatozoides imóveis, 1 indica espermatozoides com movimentos vibratórios e 2 indica espermatozoides com motilidade direcional. Suquet et al. (1992) basearam-se na escala de 0 a 5, na qual 0 significa espermatozoides imóveis, 1 significa uma taxa de 0 a 20% de células móveis, 2 significa taxa de 20 a 40%, 3 significa taxa de 40 a 60%, 4 significa taxa de 60 a 80%, e 5 significa taxa de 80 a 100% de células móveis.

Morfologia espermática

Morfologicamente, os espermatozoides da maioria dos peixes teleósteos são caracterizados pela ausência do acrossoma e consistem de três compartimentos distintos: cabeça, peça intermediária e cauda (NAGAHAMA, 1983). Como na maioria dos teleósteos não existe o acrossoma (vesícula com enzimas que digerem a parede do ovócito) o espermatozoide penetra no ovócito por meio de um orifício presente no córion dos ovócitos, denominado micrópila (COSSON et al. 1999). Vale destacar que a presença de um acrossoma ativo nos espermatozoides de esturjão é intrigante, devido à ocorrência de múltiplas micrópilas nos ovócitos da espécie (JAMIESON, 1991).

A integridade das estruturas espermáticas (cabeça, peça intermediária e cauda) são essenciais para o bom desempenho dos espermatozoides (KAVAMOTO et al. 1999). Sendo assim, a avaliação morfológica dos espermatozoides de peixes pode auxiliar na caracterização de amostras seminais, tanto de sêmen fresco como de congelado, interferindo no potencial fertilizante, explicando talvez os insucessos de reprodutores tidos como aptos após análises convencionais de motilidade espermática (MILIORINI, 2006).

A análise da morfologia espermática, muitas vezes, poderá explicar a redução da motilidade do espermatozoide e, por consequência, perda da capacidade fertilizante (STREIT JR. et al. 2008). Esta análise é realizada por meio da observação dos espermatozoides em microscopia de luz, e a classificação das patologias é feita de forma subjetiva (MELO-MACIEL et al. 2012).

Segundo Herman et al. (1994), as alterações morfológicas nos espermatozoides, podem ser classificadas como patologias primárias ou maiores (flagelo dobrado, cabeça isolada, gotas citoplasmáticas proximal e distal), quando ocorrem durante a espermatogênese em decorrência de causas que acometem os reprodutores, tais como

enfermidades, consanguinidade, restrição alimentar e estresse ambiental; e patologias secundárias ou menores (flagelo quebrado, enrolado, degenerado, macrocefalia, microcefalia) as quais estão relacionadas aos procedimentos de manipulação do sêmen durante a coleta.

De acordo com Melo-Maciel et al. (2012), em estudos de criopreservação de sêmen de Characiformes, poucos trabalhos avaliam a morfologia espermática como critério de definição da qualidade seminal pós-descongelamento. Ainda segundo os autores, em procedimento de avaliação de sêmen de mamíferos, a morfopatologia dos espermatozoides é considerada um parâmetro para a escolha do sêmen a ser utilizado na inseminação artificial ou monta natural de mamíferos, e o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998) recomenda a não utilização de sêmen com índices de espermatozoides com anormalidade acima de 30%, em bovinos e equinos, e acima de 20% para ovinos e suínos. Porém, para peixes essas referências ainda não foram estabelecidas.

3.2. Ultraestrutura dos espermatozoides

A análise da ultraestrutura de espermatozoides e da espermatogênese em teleósteos tem revelado importantes características morfológicas (MATTEI, 1991; SPADELLA, 2004), além de ser uma ferramenta útil para esclarecer questões a respeito da filogenia das espécies de peixes (JAMIESON, 1991; MATTEI, 1991). Dentre as diversas características que podem ser analisadas, estão: o tipo de espermiogênese, a forma e dimensão do núcleo, o padrão de compactação da cromatina, a presença ou não de fossa nuclear, canal citoplasmático e projeções laterais nos flagelos, forma e distribuição de mitocôndrias e a presença de vesículas na peça intermediária (SPADELLA, 2004).

Um dos aspectos a ser verificado está relacionado ao núcleo e a posição deste em relação ao flagelo, e esta característica depende do tipo de espermiogênese, que pode ser do tipo I ou II, segundo a classificação de Mattei (1970). Para o autor, a espermiogênese é classificada de acordo com a ocorrência ou não da rotação nuclear em relação ao flagelo, sendo que, no tipo I a rotação faz com que o núcleo posicione-se sobre o complexo centriolar e, como resultado, o eixo flagelar torna-se perpendicular à base do núcleo, enquanto no tipo II a rotação nuclear não ocorre e o flagelo permanece lateralmente em relação ao núcleo.

Em 1991, Jamieson sugeriu uma classificação para os espermatozoides dos peixes em *aquasperm* e *introsperm*, para designar, respectivamente, espermatozoides de peixes com fertilização externa, liberados no meio aquático, e espermatozoides de peixes de fertilização interna, liberados diretamente no trato reprodutivo da fêmea. O autor ainda estende esta classificação considerando também a presença ou a ausência do acrossoma e o número de flagelos no espermatozoide. Com isso, tem-se no caso do *aquasperm*, o tipo *anacrosomal aquasperm,* subdividido em uniflagelado, biflagelado ou aflagelado. Com relação ao *introsperm* há o *anacrosomal introsperm* e este pode ainda ser simples ou complexo.

Considerando-se os relatos dos autores, a espermiogênese do tipo I de Mattei (1970) leva à formação de um *anacrosomal aquasperm* do tipo I (JAMIESON, 1991), enquanto a espermiogênese do tipo II de Mattei (1970) leva à formação de um *anacrosomal aquasperm* do tipo II (JAMIESON, 1991).

Na espermiogênese tipo I, os espermatozoides possuem núcleos pequenos, com formato que varia de ovoide a arredondado. O complexo centriolar movimenta-se em direção ao núcleo, trazendo a membrana plasmática e o segmento inicial do flagelo que se invaginam. Ocorre uma depressão no contorno nuclear sendo denominado de fossa nuclear, onde os centríolos, em ângulo reto, situam-se. A peça intermediária é pequena e forma um colar ao redor da região inicial do flagelo. As mitocôndrias, pequenas e pouco numerosas, situam no colar citoplasmático, separadas do início do flagelo pelo canal citoplasmático. O centríolo distal forma o corpúsculo basal e desenvolve o flagelo, o qual apresenta o axonema clássico com nove pares de microtúbulos periféricos e um par central. A membrana flagelar pode ou não apresentar uma, duas ou três projeções laterais. Neste processo de espermiogênese tipo I, o núcleo faz uma rotação de 90° em relação ao eixo flagelar, sendo que, ao final do processo, o flagelo fica perpendicular ao núcleo (MATTEI, 1970; JAMIESON, 1991).

O processo de espermiogênese tipo II é semelhante ao tipo I, mas difere deste por não ocorrer rotação nuclear em relação ao flagelo, resultando num flagelo paralelo à base do núcleo**.** Também ocorre a formação da fossa nuclear, mas os centríolos encontram-se fora da fossa nuclear. Além disso, a peça intermediária pode ser pequena e o canal citoplasmático pode estar ausente. No axonema, os microtúbulos A de alguns pares (um, dois, cinco e seis) podem apresentar material denso no lúmen, constituindo as diferenciações intratubulares (MATTEI, 1970; JAMIESON, 1991).

Tipos intermediários de espermatozoides também podem ser encontrados, uma vez que o padrão descrito para os espermatozoides dos tipos I e II pode variar quanto ao posicionamento do flagelo, quando a rotação nuclear for incompleta, à presença e dimensão da fossa nuclear, à presença e tamanho do canal citoplasmático, ao tamanho e quantidade de mitocôndrias e ao número de flagelos (JAMIESON, 1991; MATTEI, 1970, 1991).

Recentemente, foi descrita a espermiogênese do tipo III para Siluriformes da família Pimelodidae (QUAGIO-GRASSIOTTO e OLIVEIRA, 2008). Este tipo de espermiogênese leva à formação de um *aquasperm anacrosomal*, o qual apresenta como principal diferença, quando comparado com os espermatozóides do tipo I e II, a ausência da fossa nuclear e do canal citoplasmático.

De acordo com Jamieson (1991), os espermatozoides encontrados na maioria dos Neopterygii correspondem à um típico *anacrosomal aquasperm* uniflagelado, os quais apresentam, da região anterior para posterior: núcleo esférico, sem vesícula acrossomal, presença de fossa nuclear, centríolos proximal e distal frequentemente arranjados em ângulo reto e inseridos na fossa nuclear; centríolo distal se diferenciando em corpúsculo basal e desenvolvendo o axonema, mitocôndrias arredondadas e pouco numerosas e flagelo contendo apenas o axonema clássico (9+2). Ainda segundo o autor, a perda do acrossoma neste grupo é uma característica que o distinguiu dos demais grupos de peixes, e esta perda vem acompanhada da presença do orifício nos ovócitos, a micrópila, a qual permite a passagem do espermatozoide no momento da fertilização.

3.3. Criopreservação de sêmen

A busca por técnicas cada vez mais apuradas de preservação de sêmen de peixes vem de encontro às questões econômicas e ecológicas atuais (MARQUES e GODINHO, 2004). A constituição de bancos de germoplasma de espécies ameaçadas tem sido uma medida eficiente adotada em vários países, pela sua relativa simplicidade e pelo baixo custo de implantação e manutenção, e tornou-se uma poderosa ferramenta de conservação, especialmente quando se observa a numerosa quantidade de espécies com alto risco de extinção. A criopreservação é uma técnica de armazenamento sob baixas temperaturas, para preservar as células vivas e tecidos estruturalmente intactos por um período prolongado de tempo (TSAI e LIN, 2012).

Além do benefício dos bancos de sêmen como forma de conservação de espécies ameaçadas, há diversas outras aplicações da criopreservação de sêmen em piscicultura,

como a) utilização de número adequado de machos na produção em massa de juvenis com o propósito de se evitar ou reduzir endogenia; b) eliminação do problema da assincronia reprodutiva entre machos e fêmeas; c) facilidade no estabelecimento de programas de melhoramento genético; d) redução de custos relativos à manutenção do plantel de reprodutores machos; e) maior segurança quanto à sanidade do plantel; f) oportunidade de transporte de gametas sem perda da viabilidade (RIBEIRO e GODINHO, 2003).

O sucesso da criopreservação depende de diversos fatores, dentre eles a composição do diluidor (extensor). Diluidores são soluções aquosas em que o crioprotetor e o sêmen são diluídos antes do congelamento. O uso de diluidores é fundamental para proporcionar um meio osmótico e nutricional adequado aos espermatozoides durante a aplicação desta biotecnologia (LEGENDRE e BILLARD, 1980). Além disso, essas soluções serão importantes para diluir sêmen viscoso e de pouco volume, que geralmente apresentam altas densidades de espermatozoides, facilitando assim a ação do crioprotetor (MUCHLISIN, 2005).

Inúmeras soluções foram testadas como diluidores para sêmen de peixe, entre elas sais ou açúcares simples (como NaCl e glicose, respectivamente) (VIVEIROS e GODINHO, 2009). Além de soluções de sais ou carboidratos, existem formulações mais complexas, como o diluidor BTS (*Beltsville Thawing Solution*), normalmente utilizado para o resfriamento do sêmen suíno, mas com bons resultados no resfriamento do sêmen de peixes (MILIORINI et al. 2002, FRANCISCATTO et al. 2002, MURGAS et al. 2004, OLIVEIRA et al. 2007), e também os diluidores Kurokura e Ginsburg Fish Ringer utilizados em espécies comumente criadas na Europa (VIVEIROS et al. 2000). As condições exigidas de um diluidor é que seja estéril, carreador de crioprotetores e que não ative a motilidade espermática, a qual deve se manter estável ao longo do armazenamento (CAROSLFELD e HARVEY, 1999).

Os crioprotetores, por sua vez, devem ser adicionados ao meio diluidor para que haja uma proteção do espermatozoide durante o congelamento e o descongelamento, devendo possuir características como baixa toxicidade para as células e alta solubilidade em água (SQUIRES et al. 1999). Os crioprotetores podem ser classificados como intracelulares (internos ou permeáveis) e extracelulares (externos ou impermeáveis), e o determinante são as propriedades físico-químicas (principalmente o peso molecular) e a interação existente entre a substância e a membrana citoplasmática da célula (LEUNG, 1991).

Os crioprotetores intracelulares possuem baixo peso molecular, são permeáveis à membrana e indispensáveis para o sucesso da criopreservação, pois atuam desidratando e reduzindo o ponto de congelamento do interior das células, dificultando a formação de cristais de gelo intracelulares que danificam a célula. Os crioprotetores extracelulares têm alto peso molecular, não atravessam a membrana e podem ou não ser adicionados ao meio de congelamento, e servem para auxiliar na proteção celular recobrindo a superfície da célula e estabilizando a membrana (WATSON, 1995). Os crioprotetores externos combinados com os internos promovem uma proteção mais completa ao espermatozoide (LEUNG, 1991), e a associação entre crioprotetores intracelulares e extracelulares é conveniente e indicada por Carolsfeld e Harvey (1999).

Segundo Chao (1991), há um grande risco, porém, na utilização de crioprotetores internos, porque estes podem, alternativamente, promover a desnaturação proteica, sobretudo sob elevadas temperaturas, causando uma toxicidade nos sistemas enzimáticos e, por conseguinte, celulares. Isso ocorre, principalmente, quando as concentrações de crioprotetores internos são muito elevadas (CRUZ, 2001). Entre os crioprotetores internos estão o dimetilsulfóxido (DMSO), metanol, etilenoglicol, propilenoglicol, propanodiol, glicerol, dimetilacetamida (DMA), butanodiol; como crioprotetores extracelulares podem-se citar açúcares (sacarose, glicose, trealose), polímeros (dextrano, PVP) e proteínas (gema de ovo e leite em pó), soro e água de coco (CRUZ, 2001; VIVEIROS, 2005).

A seleção do crioprotetor mais adequado a ser utilizado pela primeira vez em uma espécie deve ser feita em testes de tentativa e erro (BEDORE, 1999). Devido ao fato dos peixes terem evoluído para se adaptarem a praticamente todas as superfícies de água da Terra (de água doce à lagos hipersalinos, de águas geladas do Ártico às águas quentes do deserto da Califórnia), existem diferenças substanciais em sua morfofisiologia e, consequentemente, os espermatozoides de cada espécie demonstram reações diferentes aos protocolos de conservação (KOPEIKA et al. 2007).

Segundo Viveiros (2005), os crioprotetores intracelulares que oferecem resultados satisfatórios para o sêmen de peixes são: glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilacetamida (DMA) e metanol, mostrando elevadas taxas de motilidade pós-descongelamento e valores satisfatórios de percentuais de fecundação.

Em estudo de criopreservação de sêmen de Characiformes, o crioprotetor interno mais utilizado é o dimetilsulfóxido (DMSO), que já foi testado com sucesso para várias espécies desta família, tendo sido efetivo na maioria das espécies quando utilizado na

concentração entre 5 e 15% (VIVEIROS e GODINHO, 2009; GODINHO e VIVEIROS, 2011).

O metilglicol (MG), usado como crioprotetor de embriões de bovino, também é recomendado para Characiformes, segundo Viveiros e Godinho (2009). O metilglicol foi testado em algumas espécies de peixes e produziu resultados semelhantes e, às vezes, até superiores ao DMSO em sêmen de piracanjuba *Brycon orbignyanus* (MARIA et al. 2006a, 2006b), pirapitinga *Brycon nattereri* (OLIVEIRA et al. 2007) e curimba *Prochilodus lineatus* (VIVEIROS et al. 2009).

Em relação ao crioprotetor externo, a gema de ovo de galinha é uma das mais utilizadas, pois a fosfatidilcolina (lecitina) e lipoproteínas da gema atuam recobrindo a célula e estabilizando a membrana. Este crioprotetor já foi utilizado com sucesso na preservação de sêmen de Characiformes (CAROLSFELD et al. 2003; CRUZ-CASALLAS et al. 2006; VELASCO-SANTAMARÍA et al. 2006). A glicose é um diluidor (e também crioprotetor externo) de fácil acesso, e, em combinação com o DMSO e gema de ovo, ou apenas em combinação com o metilglicol, tem sido o diluidor de sêmen mais utilizado em espécies de peixes da ordem Characiformes (VIVEIROS e GODINHO, 2009).

O meio de congelamento composto por glicose (diluidor) e metilglicol é simples, barato e tem produzido excelentes resultados na criopreservação de sêmen de várias espécies de peixes nativos (VIVEIROS e GODINHO, 2009). Porém, um maior sucesso no congelamento do sêmen tem sido obtido mediante a adição de gema de ovo, prevenindo assim os danos na membrana plasmática causada pelo congelamento (OLIVEIRA et al. 2007).

De acordo com Amaral (2009), em estudo com *B. insignis*, o sêmen criopreservado em metilglicol combinado com qualquer um dos quatro diluidores testados (NaCl, Glicose, BTS ou MIII) produziu as maiores taxas de motilidade espermática (76 a 88%) em relação às amostras criopreservadas em DMSO (23 a 59%).

Em trabalho com *B. amazonicus*, Ninhaus-Silveira et al. (2006), utilizando duas soluções, uma à base de NaCl e outra à base de glicose (juntamente com a gema de ovo de galinha e DMSO), observaram que os valores das taxas de eclosão das larvas produzidas com sêmen criopreservado para verificação da qualidade do sêmen pós-descongelado, relatando a eficácia destes diluentes na preservação da viabilidade dos espermatozoides da espécie.

Para *B. orbignyanus*, há variados meios de congelamento considerados eficazes para criopreservação de sêmen da espécie. O tratamento que obteve resultados mais expressivos para o congelamento de sêmen foi o crioprotetor interno dimetilsulfóxido (DMSO) a 10% juntamente com gema de ovo e glicose como crioprotetores externos (BEDORE, 1999; CAROLSFELD et al. 2003; MURGAS et al. 2003; GALO et al. 2011). No entanto, outras pesquisas apontam que o crioprotetor interno de maior sucesso para piracanjuba é o metilglicol a 10%, com adição de gema de ovo e NaCl (MARIA et al. 2006a, 2006b). Já Felizardo, em 2008, concluiu que soluções contendo DMSO ou metanol (8%) como crioprotetores internos e gema de ovo ou lactose como crioprotetores externos seriam os mais indicados para o congelamento de sêmen desta espécie. De acordo com estas pesquisas, têm sido alcançados bons resultados após o descongelamento do sêmen da piracanjuba, com a motilidade pós-descongelamento acima de 50%.

Apesar de ser um método seguro, a criopreservação do sêmen ainda não é uma prática de rotina nos programas de fertilização. Isso se dá em função de fatores que limitam a utilização do sêmen criopreservado, como por exemplo 1) protocolos de criopreservação não padronizados, 2) variabilidade na qualidade inicial do sêmen, 3) perda de qualidade seminal pós-descongelamento (BUTTS et al. 2011), 4) necessidade de alta dose inseminante devido à elevada fecundidade.

A falta de padronização torna a aplicação prática dos protocolos de criopreservação de sêmen disponíveis uma tarefa difícil. Os dados sobre a viabilidade pós-descongelamento são altamente heterogêneos, inclusive para uma mesma espécie, ou seja, vários meios de congelamento têm sido definidos como o melhor para a mesma espécie quando testado por diferentes pesquisadores (VIVEIROS e GODINHO, 2009). Para ajudar na partilha de conhecimentos, deve-se enfatizar cada etapa do procedimento: coleta do sêmen, taxa de diluição, extensores, crioprotetores, tempo de equilíbrio, taxas de resfriamento, taxas de descongelamento, relação do ovócitos: espermatozoides nos testes de fertilização, entre outros (KOPEIKA e KOPEIKA, 2008).

Para se obter sucesso no processo de congelamento de sêmen, é preciso ter material fresco de boa qualidade, aliado a uma técnica apropriada de criopreservação. A qualidade do sêmen pode ser afetada por condições adversas, tanto no processo de espermatogênese, armazenamento intratesticular, assim como pelo tempo de permanência dos espermatozoides nos ductos testiculares (CIERESZKO et al. 2000).

O sucesso da criopreservação também pode ser afetado pela alta variabilidade na qualidade do sêmen a ser utilizado. Esta variabilidade está associada, principalmente,

a fatores intrínsecos que determinam a crioresistência da célula espermática, que é a habilidade do espermatozoide em preservar suas características morfofuncionais após a criopreservação. A crioresistência se dá em função da resistência da membrana e a capacidade da célula em manter suas estruturas intracelulares e funções básicas (KOPEIKA e KOPEIKA, 2008).

Outro fator a ser considerado é que, durante o processo de criopreservação, a célula espermática é exposta a condições externas que não são fisiologicamente adequadas, acarretando na perda da qualidade seminal, por interferir em diversos parâmetros da atividade do espermatozoide, tais como composição do plasma seminal e morfologia (BUTSS et al. 2011; MARTINEZ-PÁRAMO et al. 2012).

A diluição no meio extensor e o uso do crioprotetor alteram a constituição do plasma seminal, uma vez que também são responsáveis por diluírem componentes, como proteínas e enzimas antioxidantes. A redução da capacidade antioxidante total do sêmen em função do processo de criopreservação foi observada durante a criopreservação do sêmen de robalo (*Dicentrarchus labrax*) (MARTÍNEZ-PARÁMO et al. 2009) e pargo (*Pagrus major*) (CHEN et al. 2010). Constituintes do plasma seminal quando presentes em condições subótimas podem prejudicar a função de proteção do espermatozoide e, consequentemente, o potencial de congelabilidade (BUTSS et al. 2011).

A morfologia espermática também pode ser afetada pelo processo de criopreservação. Alterações ultraestruturais no espermatozoide podem ocorrer em função da alteração nos valores de osmolaridade extracelular. Estas alterações incluem rompimento da membrana, redução da função mitocondrial, danos ao flagelo como espiralização, ruptura ou aderência do axonema (MARQUES, 2001). Os danos causados pelo processo de criopreservação podem levar a consequências adicionais que incluem deformação estrutural das organelas celulares, anormalidades na estrutura da cromatina espermática, além de alterações no genoma (BILLARD, 1986). Todas estas alterações são responsáveis por deficiências funcionais e causas de redução da motilidade e capacidade de fertilização (MARQUES, 2001).

A qualidade seminal pós-descongelamento, em muitos casos, tem sido somente avaliada em termos de motilidade, mas alterações morfológicas da estrutura dos espermatozoides podem também ter influência direta na fertilidade do reprodutor (RURANGWA et al. 2004).

Segundo Rana e McAndrew (1989), a taxa de fertilização dos ovos é sem dúvida o mais apropriado e prático critério nos protocolos de avaliação para a criopreservação de

espermatozoides. Porém, Bobe e Labbé (2010) ressaltam que a qualidade dos gametas é determinada através da habilidade em promover máximas taxas de fertilização e também pelo desenvolvimento embrionário/larval normal, embora seja importante destacar que ovócitos de boa qualidade nem sempre estão disponíveis (VIVEIROS et al. 2009).

Em peixes nativos, estudos em criopreservação de sêmen ainda estão em fase de testes quanto à sua capacidade de fertilização em larga escala (MARIA et al. 2006a; VIVEIROS et al. 2008). Embora existam muitos protocolos de congelamento de sêmen de peixes Neotropicais testados e publicados, ainda há muito trabalho a ser feito para aperfeiçoar essa tecnologia. De uma maneira geral, cerca de 40 a 90% dos espermatozoides de peixes de água doce sofrem algum tipo de dano durante o processo de congelamento e descongelamento (KOPEIKA et al. 2007).

O sucesso na criopreservação do sêmen poderá facilitar o processo de reprodução da espécie em cativeiro promovendo a piscicultura em escala comercial, possibilitar o repovoamento visando manter a população dos rios que sofreu com a ação antrópica, e também poderá ser útil para aplicação de metodologias para manipulação genética, além de seleção de planteis para formação de um futuro banco de genes. Porém, um passo importante nos trabalhos relacionados à criopreservação de sêmen é a análise ultraestrutural dos espermatozoides pós-descongelamento, como indicativo das condições de preservação dos gametas. Aliado a isso, o acompanhamento dos valores das taxas de fertilização, eclosão e sobrevivência larval, além da análise da morfologia das larvas (como indicativo da qualidade das larvas oriundas de fertilização com sêmen criopreservado) também são imprescindíveis.

3.4. Androgênese

Sabe-se que é totalmente possível o armazenamento em nitrogênio líquido de espermatozoides de várias espécies de peixes (bancos de sêmen) para, futuramente, serem utilizados na fertilização dos ovócitos das fêmeas da mesma espécie (MELO e GODINHO, 2006). Por outro lado, sabe-se também que a criopreservação de ovócitos de peixes ainda é um entrave para a biotecnologia, sendo vários os motivos que dificultam o congelamento de ovócitos de teleósteos, como grande quantidade de vitelo presente no ovo, baixa relação superfície/volume, células de grandes dimensões, semipermeabilidade das membranas que rodeiam o ovócito, alta sensibilidade a baixas temperaturas (RALL, 1993).

Diante deste quadro, surgem questões como: Se existe a capacidade de se manter um banco de sêmen, mas ainda não há sucesso na criopreservação de ovócitos, como serão adquiridos os ovócitos para se proceder à fertilização e se obter os embriões de uma determinada espécie extinta ou criticamente ameaçada?

É neste ínterim que as biotecnologias genéticas, atualmente amplamente estudadas e aplicadas na piscicultura, são imprescindíveis. Dentre estas biotecnologias, destaca-se a técnica chamada androgênese. A aplicação deste método seria especialmente interessante, visto que a técnica de criopreservação de esperma foi desenvolvido para muitas espécies de peixes, ao passo que o problema do armazenamento de ovócitos e embriões de peixes ainda está longe de ser resolvido (CHAO e LIAO, 2001).

A androgênese consiste em um procedimento por manipulação cromossômica que pode ser definido como reprodução uniparental, sem qualquer contribuição do núcleo materno, o qual é geneticamente inativado por irradiação e fertilizado com um espermatozoide normal (MORISHIMA et al. 2011).

Os peixes são conhecidos por sua incrível capacidade de tolerar genomas haploides a heptaploides, genomas cuja contribuição tenha vindo somente do macho ou da fêmea, além de contribuições desiguais de pais que pertencem à mesma ou diferentes espécies (PANDIAN e KOTEESWARAN, 1998). Três fenômenos podem ser induzidos pela manipulação dos conjuntos cromossômicos: a androgênese, a ginogênese e a poliploidia (PURDOM, 1983).

O interesse pelo procedimento chamado androgênese é caracterizado, principalmente, pela possibilidade de se produzir parentais machos homogaméticos, conhecidos como "supermachos", bastante utilizado em espécies de peixes nas quais prefere-se cultivar os machos por apresentarem um maior crescimento em relação às fêmeas (CARRILLO e CHACÓN, 1995).

Por outro lado, a androgênese pode também ser utilizada para auxiliar na recuperação de espécies ameaçadas de extinção, utilizando espermatozoides criopreservados como um banco de genes (FUJIMOTO et al. 2007). No caso da *B. orbignyanus,* a aplicação do método chamado androgênese seria uma saída para a continuidade (reconstituição) da espécie.

Sabe-se que em algumas espécies, como *Betta splendens* (GEORGE et al. 1994), os machos homogaméticos não sobrevivem, no entanto, a técnica já foi utilizada com êxito em algumas espécies de ciprinídeos, ciclídeos e salmonídeos. Considerando-se o imenso potencial para a produção de novas estirpes de peixes comercialmente

importantes, e a perda de linhagens/espécies disponíveis devido à atividade antrópica, há uma necessidade de se desenvolver novas técnicas para preservá-las (PANDIAN e KIRANKUMAR, 2003).

Em peixes, esta técnica obrigatoriamente envolve dois ou três passos: (i) eliminação ou inativação do genoma dos ovócitos; (ii) ativação do desenvolvimento embrionário por gameta haploide ou gameta diploide e/ou (iii) recuperação da diploidia por supressão da primeira clivagem mitótica, quando o desenvolvimento embrionário é ativado por um espermatozoide haploide (PANDIAN e KIRANKUMAR, 2003).

Embora a combinação de espermatozoides criopreservados e androgênese já tenha sido discutido como um meio para restaurar genomas ameaçados, poucos protocolos foram estabelecidos para um número limitado de espécies, de acordo com as revisões de Pandian e Kirankumar (2003) e Komen e Thorgaard (2007). A maioria das espécies de peixes com as quais foram produzidos androgenéticos pertence às famílias Salmonidae, Cichlidae e, principalmente, Cyprinidae.

Combinando as técnicas criopreservação e androgênese foram produzidas truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* (SCHERER et al. 1991; BABIAK et al. 2002), kinguio *Carassius auratus* (BERCSENYI et al. 1998), barbo rosado, *Puntius conchonius*, (KIRANKUMAR e PANDIAN, 2004), esturjão estrelado, *Acipenser stellatus* (GRUNINA et al. 2006, 2011), *Hemigrammus caudovittatus* (DAVID e PANDIAN, 2006), dojo loach ou weather loach, *Misgurnus anguillicaudatus* (YASUI et al. 2010).

Além disso, houve a produção de androgenéticos a partir de sêmen fresco em truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* (SCHEERER et al. 1986), carpa comum, *Cyprinus carpio* (GRUNINA et al. 1990; BONGERS et al. 1994), esturjão siberiano, *Acipenser baerii* (GRUNINA e NEIFAKH, 1991), tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus* (MYERS et al. 1995), zebrafish, *Brachydanio rerio* (CORLEY-SMITH et al. 1996), salmão amago, *Oncorhynchus masou ishikawae* (NAGOYA et al. 1996), kinguio, *Carassius auratus* (BERCSENYI et al. 1998), mud loach, *Misgurnus mizolepis* (NAM et al. 2002), barbo sumatra, *Puntius tetrazona* (SANTHAKUMAR et al. 2003).

Dessa forma, os androgenéticos tornam-se um potencial interesse para restauração de espécies que estejam ameaçadas de extinção, como a *B. orbignyanus*. Porém, vale destacar que, na literatura pertinente à técnica de androgênese, nenhuma envolvia espécies nativas.

Para a realização da primeira etapa da técnica (inativação/eliminação do genoma materno), o primeiro passo é desenvolver um meio de irradiação para os ovócitos. A não

visibilidade do núcleo dos ovócitos de muitos peixes torna-os não passíveis de enucleação (manipulação nuclear) e, consequentemente, eliminação do genoma materno (BONGERS et al 1995). Por isso, a indução de androgênese envolve obrigatoriamente irradiação dos ovócitos (PANDIAN e KIRANKUMAR, 2003).

O tipo de solução ideal na qual os ovócitos devem permanecer durante o processo de irradiação é aquela capaz de manter a viabilidade dos ovócitos não fertilizados, apresentando baixa viscosidade e toxicidade para os gametas (YASUI et al. 2010). Soluções naturais, como plasma seminal ou fluido do ovário foram utilizados com sucesso como um meio de irradiação em *Danio rerio* (CORLEY-SMITH et al. 1996), *Esox masquinongy* (LIN e DABROWSKI, 1998), *Cyprinus carpio* (ROTHBARD et al. 1999) e também para *Misgurnus anguillicaudatus* (FUJIMOTO et al. 2007). No entanto, o conteúdo de tal soluções podem variar devido a variação sazonal e não estão prontamente disponíveis em todo o ano (YASUI et al. 2010).

Outro ponto a ser levado em consideração é a intensidade e o tempo de exposição ideal de irradiação. Inicialmente, a irradiação limitou-se à utilização de raios gama a uma dose variando a partir de 36 a 88 kR (SCHEERER et al, 1986; GRUNINA et al. 1995) e raios-X nas doses entre 25 e 30 kR (GRUNINA et al. 1995). Contudo, além dos riscos para o operador, estes tipos de irradiação podem deixar resquícios e, consequentemente, transferir algum material genético à progênie, resultando na indesejada "impureza genômica" dos androgenéticos, uma transferência acidental de fragmentos de cromossomas (ARAI et al. 1995).

Além disso, devido à elevada penetrância, a irradiação por raios-X ou gama também tem potencial para destruir produtos maternos essenciais para o desenvolvimento inicial dos embriões (como enzimas, RNAm e mtDNA). Diante disso, a irradiação por raios-X e gama foram utilizados para eliminar o genoma materno dos ovócitos, especialmente nos salmonídeos, até 1991 (PANDIAN e KIRANKUMAR, 2003).

Posteriormente, o sucesso na indução à androgênese foi alcançado em várias espécies de peixes por irradiação ultravioleta (UV) nos ovócitos (ARAI et al. 1992, BONGERS et al. 1994, 1995; MYERS et al., 1995; LIN e DABROWSKI, 1998; KIRANKUMAR e PANDIAN, 2003). A irradiação UV também pode provocar danos, incluindo formação de dímeros de pirimidina e produção de ligações cruzadas nas cadeias de DNA. No entanto, em teleósteos, a formação de dímero de pirimidina é reparado pelo processo chamado fotorreativação enzimática, enquanto as ligações cruzadas são reparadas por excisão de nucleotídeos (FRIEDBERG, 1985).

Por outro lado, fragmentos cromossômicos derivados a partir do genoma materno irradiado são frequentemente observados na progênie androgenética como consequência de uma incompleta irradiação UV, muitas vezes devido à fraca penetração (ARAI et al. 1992; LIN e DABROWSKI, 1998). Bongers et al. (1994) foram os primeiros a obter 100% de inativação do genoma nos ovócitos de *Cyprinus carpio* (carpa) por irradiação UV. Neste estudo, os ovócitos foram imersos no fluido ovariano sintético e expostos à irradiação UV na dose de 250 mJ/cm^2. Portanto, a determinação da dose ótima (intensidade e duração) da irradiação UV são etapas imprescindíveis para uma efetiva eliminação do genoma (PANDIAM e KIRANKUMAR, 2003).

Embora a inativação nuclear do ovócito seja um passo indispensável para a produção de embriões androgenéticos em teleósteos, poucos estudos experimentais têm-se centrado na determinação dos meios mais eficazes para atingir a inativação completa do genoma de origem materna (FUJIMOTO et al. 2007).

A segunda etapa da androgênese (ativação do desenvolvimento embrionário por gameta haploide) é o momento em que os ovócitos tratados com irradiação são fundidos com os espermatozoides que tiveram o genoma conservado, formando-se um embrião haploide (KOMEN e THOGAARD, 2007).

Porém, estes embriões haploides resultantes mostram-se inviáveis, por apresentarem anormalidades devido à chamada "Síndrome Haploide" (CHRISTOPHER et al. 2012). Estudos têm mostrado que os haploides morrem durante o desenvolvimento embrionário, ou em estágios larvais iniciais, antes do início da alimentação, devido às anormalidades características (ROMASHOV e BELYAEVA, 1964; PURDOM, 1969; ARAI et al. 1979). Dentre estas anormalidades, podem ser citadas o nanismo, a microcefalia (distúrbio em que a circunferência da cabeça é menor do que o embrião normal), a microftalmia (anormalidade no tamanho do olho), ascite, edema, além de uma variedade de defeitos na região da cabeça (ROMASHOV e BELYAEVA, 1964; PURDOM, 1969; ARAI et al. 1979; CHRISTOPHER et al. 2012).

Dessa forma, a obtenção de androgenéticos diploides é essencial, e estes podem ser produzidos duplicando-se o cromossomo paterno, caracterizando a etapa final da androgênese (CHRISTOPHER et al. 2012). Sendo assim, nesta terceira etapa da androgênese, que se caracteriza pela restauração da diploidia do embrião após a fertilização com espermatozoide haploide (FUJIMOTO et al. 2007), o embrião haploide torna-se diploide por inibição da primeira divisão celular, e esta etapa normalmente é

realizada por um choque de calor ou pressão administrada nos ovos recém-fertilizados, no momento da prófase da primeira divisão mitótica (KOMEN e THOGAARD, 2007).

4. Objetivos

4.1. Objetivo geral

Considerando-se a importância econômica e, especialmente, a relevância biológica das espécies do gênero *Brycon*, este trabalho teve como objetivo geral estudos referentes a três espécies deste gênero: a) conhecer as características do sêmen e dos espermatozoides de *B. vermelha*; b) averiguar o ofeito da criopreservação sobre os parâmetros seminais e células espermáticas de *B. orbignyanus;* c) estabelecer a solução adequada para preservar ovócitos de *B. amazonicus.*

4.2. Objetivos específicos

Para *B. vermelha:*

1- Verificar os parâmetros espermáticos;

2- Averiguar as dimensões de cada uma das partes que compõem o espermatozoide (cabeça, peça intermediária e flagelo);

3- Descrever os espermatozoides por meio da microscopia eletrônica de varredura e transmissão.

Para *B. orbignyanus*:

1 -Verificar a influência de diferentes soluções crioprotetoras e diferentes tempos de congelamento sobre as células espermáticas;

2- Registrar o efeito da criopreservação sobre a taxa e duração da motilidade espermática, assim como sobre as taxas de fertilização e eclosão;

3- Investigar as alterações morfológicas dos espermatozoides pós-descongelmento por meio da ultraestrutura.

Para *B. amazonicus*:

1- Estabelecer a solução propícia para preservar os ovócitos para que possa ser o meio de irradiação UV.

5. Referências

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

AMARAL, T.B. Resfriamento e criopreservação de sêmen do peixe teleósteo piabanha *Brycon insignis*. 61f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Lavras. Lavras, Minas Gerais, 2009.

ANDRADE, D.R.; YASUI, G.S. O manejo da reprodução natural e artificial e sua importância na produção de peixes no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, p.166-172, 2003.

ANTUNES, R.S.P.; GOMES, V.N.; PRIOLI, S.M.A.P.; PRIOLI, R.A.; JULIO, J.R., H.F.; PRIOLI, L.M.; AGOSTINHO, C.S.; PRIOLI, A.J. Molecular characterization and phylogenetic relationships among species of the genus *Brycon* (Characiformes: Characidae) from four hydrographic basins in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v.9, p.674-684, 2010.

ARAI, K.; IKENO, M.; SUZUKI, R. Production of androgenetic diploid loach *Misgurnus anguillicaudatus* using spermatozoa of natural tetraploids. **Aquaculture**, v.137, p.131-138. 1995.

ARAI, K.; MASAOKA, T.; SUZUKI, R. Optimum conditions of UV ray irradiation for genetic inactivation of loach eggs. **Nippon Suisan Gakkaishi** v.58, p.1197-1201, 1992.

ARAI, K.; ONOZATO, H.; YAMAZAKI, F. Artificial androgenesis induced with gamma irradiation in masu salmon, *Oncorhynchus masou.* **Bulletin of the Faculty of Fisheries Hokkaido University**, 30, p.181-186, 1979.

BABIAK, I.; DOBOSZ, S.; GORYCZKO, K.; KUZMINSKI, H.; BRZUZAN, P.; CIESIELSKI, S. Androgenesis in rainbow trout using cryopreserved spermatozoa: the effect of processing and biological factors. **Theriogenology**, v.57, p.1229-1249, 2002.

BALDISSEROTTO, B.E; GOMES, L.C. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Ed. da UFSM, Santa Maria, 2005. 468p.

BAXTER, R.M. Environmental effects of dams and impoundments. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, v.8, p.255-283. 1977.

BEDORE, A.G. **Características e criopreservação do sêmen de pacu-caranha (*Piaractus mesopotamicus*) e de piracanjuba (*Brycon orbigqnyanus*).** 52f. Dissertação. (Mestrado em Biologia Celular), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 1999.

BERCSENYI, M.; MAGYARY, I.; URBANYI, B.; ORBAN, L.; HORVATH, L. Hatching out goldfish from common carp eggs: interspecific androgenesis between two cyprinid species. **Genome**, v.41, p.573-579, 1998.

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

BILLARD, R.; COSSON, J.; PERCHEC, G.; LINHART, O. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. **Aquaculture**, v.129, p.95-112, 1995.

BOBE, J., LABBÉ, C. Egg and sperm quality in fish. **General and Comparative Endocrinology**. New York, v.165, n,3, p.535-548, 2010.

BONGERS, A.B.J.; ABRACA, J.B.; DOULABI, Z.; EDING, E.H., KOMEN, J. RICHTER, C.J.J. Maternal influence on development development of androgenetic clones of common carp, *Cyprinus carpio* L. **Aquaculture**, v.137, p.139-147, 1995.

BONGERS, A.B.J.; IN'T VELD, E.P.C.; ABO-HASHEMA, K., BREMMER, I.M. DING, E.H., KOMEN, J.; RICHTER, C.J.J. Androgenesis in common carp (*Cyprinus carpio* L.) using UV irradiation in a synthetic ovarian fluid and heat shocks. **Aquaculture,** v.122, p.119-132, 1994.

BORGES, A; SIQUEIRA, D.R.; JURINITZ, D.F.; ZANINI, R.; AMARAL, F.; GRILLO, M.L. Biochemical composition of seminal plasma and annual variations in semen characteristics of jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, Pimelodidae). **Fish Physiology and Biochemistry**, v.31, p.45-53, 2005.

BRITSKI, H.A., SATO, Y., ROSA, A.B.S. **Manual de identificação de peixes da região de Três Marias: com chave de identificação para os peixes da bacia do São Francisco**. 3. ed. Brasília: Câmara dos Deputados, Coordenação de Publicações, 1988. p.115.

BRITSKI, H.A.; SILIMON, K.S.S.; LOPES, B.S. **Peixes do Pantanal: Manual de Identificação**. Brasília: EMBRAPA – SPI. 1999.

BUTTS, I.A.E.; BABIAK, I.; CIERESZKO, A.; LITVAK, M.K.; SŁOWIŃSKA, M.; SOLER, C.; TRIPPEL, E.A. Semen characteristics and their ability to predict sperm cryopreservation potential of Atlantic cod, *Gadus morhua* L. **Theriogenology** Stoneham, v.75, p.1290-1300, 2011.

CAROLSFELD, J. **Reproductive physiology and induced breeding of fish as related to culture of Colossomas.** *In*: Hernandez A. *Cultivo de Colossoma*. Bogotá: Editora Guadalupe, p.37-73. 1989.

CAROLSFELD, J.; GODINHO, H.P.; ZANIBONI FILHO, E.; HARVEY, B.J. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. **Journal of Fish Biology**, v.63, p.72-489, 2003.

CAROLSFELD, J.; HARVEY, B. Conservação de recursos genéticos de peixes: teoria e prática. In: **Curso de treinamento brasileiro**. Victoria, Canadá: World Fisheries Trust, 1999. 47p.

CARRILLO, M.; CHACÓN, M. **Ensayo de androgénesis diploide en tilápia roja mediante manipulación cromosomal.** Tesis de grado. Facultad de biologia marina. Universidad Jorge Tadeo Lozano. Bogotá, 1995.

CASTAGNOLLI, N. **Criação de peixes de água doce**. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista, 1992. 189p.

CHAO, N. Fish sperm cryopreservation in Taiwan: Technology advancement and extension efforts. Academia Sinica, Monogragh. **Bulletin of the Intitute Zoology**, v.16, p.263-283, 1991.

CHAO, L.H.; LIAO, I.C. Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos. **Aquaculture**, v.197, p.161-189, 2001.

CHEN, Y.K.; LIU, Q.H.; LI, J.; XIAO, Z.Z.; XU, S.H.; SHI, X.H.; MA, D.Y. Effect of long-term cryopreservation on physiological characteristics, antioxidant activities and lipid peroxidation of red seabream (*Pagrus major*) sperm. **Cryobiology**, San Diego, v.61, p.189-193, 2010.

CHRISTOPHER, J.G.; MURUGESAN, A.G.; SUKUMARAN, N. Optimization of UV treatment to induce haploid androgenesis in the stinging catfish, Heteropneustes fossilis. **International Aquatic Research**, v. p.1-8, 2012.

CIERESZKO, A.; GLOGOWSKI, J.; DABROWSKI, K. Biochemical characteristics of seminal plasma and spermatozoa of freshwater fishes. *In*: **Cryopreservation in Aquatic Species.** Tiersch, T.R. and Mazik, P.M., Editors. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, p.20-48, 2000.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL - CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal**. 2. ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49 p.

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

CORLEY-SMITH, G.E.; LIM, C.J.; BRANDHORST, B.P. Production of androgenetic zebrafish (*Danio rerio*). **Genetics**, v.142, p.1265-1276, 1996.

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

COSSON, J.; LINHART, O.; MIMS, S.; SHELTON, W.; RODINA, M. Analysis of motility parameters from paddlefish and shovelnose sturgeon spermatozoa. **Journal of Fish Biology** v.56, p.1348-1367, 2000.

CRUZ CASALLAS, PABLO E, MEDINA ROBLES, VÍCTOR M AND VELASCO SANTAMARÍA, YOHANA M Evaluación de diferentes crioprotectores para la

crioconservación de espermatozoides de yamú (Brycon amazonicus). **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v.19, p.152-159, 2006.

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

DAVID, C.J.; PANDIAN T.J. Cadaveric sperm induces intergeneric androgenesis in the fish, *Hemigrammus caudovittatus*. **Theriogenology**, v.65, p.1048-1070, 2006.

DRUMMOND, G.M.; MARTINS, C.S.; A.B.M. MACHADO; SEBAIO, F.A.; ANTONINI, Y. **Biodiversidade em Minas Gerais: um atlas para a sua conservação.** Belo Horizonte, Fundação Biodiversitas. 2005, 222p.

DUMONT-NETO, R.; PELLI, A.; FREITAS, J.L.; COSTA, C.L.; FREITAS, A.E.; N.D.C. BARBOSA. Reprodução induzida da piracanjuba (*Brycon orbignyanus* Valenciennes, 1903), cultivada em cativeiro na Estação de Pesquisa e Desenvolvimento Ambiental de Volta Grande-CEMIG**. Boletim do Instituto de Pesca**, v.24, p.105-107, 1997.

ESPINACH-ROS, A. RÍOS, P.C. **Conservación de la fauna ictica en el Embalse de Salto Grande.** Comision Administradora del Rio Uruguay (CARU) / Comision Tecnica Mixta de Salto Grande (CTMSG), 1997, 37p.

FELIZARDO, V.O. **Manejo reprodutivo da piracanjuba *(Brycon orbignyanus)*: congelamento de sêmen e taxas de fertilidade**. 84f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais. 2008.

FELIZARDO, V.O.; MURGAS, L.D.S.; DRUMOND, M.M.; SILVA, J.A. Dose inseminante utilizada na fertilização artificial de ovócitos de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). **Revista Ceres**, v.57, p.648-652, 2010.

FERREIRA, A.A.; NUÑER, A.P.O.; LUZ, R.K.; TATAJE, D.A.R., ESQUIVEL, J.R.; RESTREPO, J.B. Avaliação qualitativa e quantitativa do sêmen do Jundiá, *Rhamdia quelen*. **Boletim do Instituto de Pesca,** v. 27, p.57-60, 2001.

FERREIRA, E.J.G.; ZUANON, J.A.S.; SANTOS, G.M. **Peixes comerciais do médio Amazonas: região de Santarém.** 1. Ed., Brasília: ProVázea-IBAMA, 1998. 210p.

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. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.14, p.69-73, 1987.

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

FRIEDBERG, E. C. **DNA Repair**, W. H. Freeman Inc. New York, 1985, p.505-574.

FUJIMOTO, T., SAKAO, S., YAMAHA, E., ARAI, K. Evaluation of different doses of UV irradiation to loach eggs for genetic inactivation of the maternal genome. **Journal of Experimental Zoology**, v.307A, p.449-462. 2007.

GALO, J.M.; STREIT-JUNIOR, D.P.; SIROL, R.N.; RIBEIRO, R.P.; DIGMAYER, M.; ANDRADE, V.X.L.; EBERT, A.R. Spermatic abnormalities of piracanjuba Brycon orbignyanus (Valenciennes, 1849) after cryopreservation. **Brazilian Journal of Biology,** v.71, p.693-699, 2011.

GANECO, L.N.; NAKAGHI, L.S.O. Morfologia da micrópila e da superfície dos ovócitos de piracanjuba, *Brycon orbignyanus* (Osteichthyes, Characidae), sob microscopia eletrônica de varredura. **Acta Scientiarum: Biological Sciences**, v.25, p.227-231, 2003.

GEORGE, T.; PANDIAN, T.J.; KAVUMPURATH, S. Inviability of YY zygotes of the fighting fish *Betta splendens*. **The Israeli Journal of** *Aquaculture*, v.46, p.3-8. 1994.

GODINHO, H.P.; VIVEIROS, A.T.M. Current Status of Sperm Cryopreservation of Brazilian Characiform Fishes. In: Cryopreservation in Aquatic Species, Tiersch TR, Green CC (Ed.), **World Aquaculture Society**, p.875-884. 2011.

GODOY, M.P. **Peixes do Brasil: subordem Characoidei**. Piracicaba, Franciscana, v.4. p.629-634. 1975.

GOULDING, M. **Ecologia da pesca do rio Madeira**. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq. Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, INPA. Manaus, Amazonas. 1979, 172 p.

GOULDING, M. **The fishes and the forest.** Berkeley: University of California Press. 1980. 280p.

GRUNINA, A. S.; REKOUBRATSKY, A.V.; TSVETKOVA, L.I.; BARMINTSEVA, A.E.; VASIL'EVA, E.D.; KOVALEV, K.V.; POLUEKTOVA, O.G. Dispermic androgenesis in sturgeons with the use of cryopreserved sperm: production of androgenetic siberian sturgeon and androgenetic hybrids between siberian and russian sturgeons. **Russian Journal of Developmental Biology**, v.42, p.108-119, 2011.

GRUNINA, A.S.; GOMELSKI, B.I.; NEIFAKH, A.A. Diploid androgenesis in carp. **Genetika** v.26, p.2037–2043, 1990.

GRUNINA, A.S.; NEIFAKH, A.A. Induction of diploid androgenesis in the Siberian sturgeon *Acipenser baeri* **Brandt. Ontogenez** v.22, p.53-56, 1991.

GRUNINA, A.S.; RECOUBRATSKY, A.V.; EMELYANOVA, O.V.; EYFAKH, A.A. Induced androgenesis in fish: Production of viable androgenetic diploid hybrids. **Aquaculture**, v.137, p.149. 1995.

GRUNINA, A.S.; RECOUBRATSKY, A.V.; TSVETKOVA, L.I.; BARMINTSEV, V.A. Investigation on dispermic androgenesis in sturgeon fish: the first successful production

of androgenetic sturgeons with cryopreserved sperm. **International Journal of Refrigeration**, v.29, p,379-386, 2006.

HAHN, N.S., I.F. ANDRIAN, R. FUGI E V.L.L. ALMEIDA. Ecologia trófica. *In*: A.E.A.M. Vazzoler, A.A.Agostinho e N.S. Hahn (ed.). **A planície de inundação do alto rio Paraná: aspectos físicos, biológicos e socioeconômicos**. Maringá, Editora da Universidade Estadual de Maringá. 1997. 460p.

HARI, N.H. Fertilization in teleost fishes: Mechanisms of sperm-egg interactions. **International Review of Cytology**, v.121, p.1-66, 1990.

HARVEY, B.; CAROLSFELD, J. **Induced breeding in tropical fish culture**. Ottawa: IDRC, p.144. 1993.

HERMAN, H.A; MITCHELL, J.R.; DOAK, G.A. **The artificial insemination and embryo transfer of diary and beef cattle**. Illinois: Interstate Publisher, p.392,1994.

HOWES, G. Review of the genus Brycon (Teleostei, Characoidei). **Bulletin of the British Museum Natural History (Zoology)**, v.43, p.1-47. 1982.

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis In: **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção** / Eds. Angelo Barbosa Monteiro Machado, Gláucia Moreira Drummond, Adriano Pereira Paglia. - 1.ed. - Brasília, DF: MMA; Belo Horizonte, MG: Fundação Biodiversitas, v.2, 2008. 1420 p.

INSTITUTO AMBIENTAL DO PARANÁ – Portaria 211 de 23 de outubro de 2012. Disponível em: <http://www.iap.pr.gov.br/arquivos/File/portaria_211_2012.pdf> Acesso em: 26 de novembro de 2013.

IZEL, A.C.U.; MELO, L.A.S. Criar matrinxã (Brycon cephalus): atividade econômica potencial para o agronegócio amazonense. Manaus: Embrapa Amazônica Ociedental, 2004, 22p (Embrapa Amazônica Ociedental, Documentos, 31).

JAMIESON, B. G. M. **Fish Evolution and Systematics: Evidence from Spermatozoa**. Cambridge: Cambridge University Press, 1991.

KAVAMOTO, E.T.; BARNABE, V.H.; CAMPOS, B.E.S.; TALMELLI, E.F.A.. Anormalidades morfológicas nos espermatozóides do curimbatá, *Prochilodus lineatus* (Steindachner, 1881) (Osteichthyes, Characiformes, Prochilodontidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v.25, p.61-66, 1999.

KIRANKUMAR, S.; PANDIAN, T.J. Interspecific androgenetic restoration of rosy barb using cadaveric sperm. **Genome,** v.47, p.66-73, 2004.

KOMEN, H.; *THORGAARD*, G.H. Androgenesis, gynogenesis and the production of clones in fishes: a review. **Aquaculture**, v.269, p.150-173. *2007.*

KOPEIKA, E., KOPEIKA, J. Variability of sperm quality after cryopreservation in fish. In: **Fish spermatology**, Alavi SMH, Cosson JJ, Coward R, Rafiee G (Ed.), Oxford: Alpha Science Ltd. p.347-96, 2008.

KOPEIKA, E., KOPEIKA, J.; ZHANG, T. Cryopreservation of fish sperm. In: Day, J.G. and Stacey, G.N. (Eds) Methods Mol. Biol. Vol. 368**: Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols,** 2 ed. Humana Press Inc., Totowa, NJ. p.203-217, 2007.

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

LEUNG, L.K.P. Principles of biological cryopreservation. In: Jamieson, G.M. (Ed.). **Fish evolution and systematics: evidence from spermatozoa.** Cambridge: University Press, p.231-244, 1991.

LIMA, F.C.T. Characidae – Bryconidae (Characins, tetras), p.174-181. *In*: Reis, RE; Kullander, SO; Ferraris Jr, CJ. (Eds). **Checklist of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre, EDIPUCRS, p.742. 2003.

LIMA, F.C.T; CASTRO, R.M.C. *Brycon vermelha*, a new species of characid fish from the Rio Mucuri, a coastal river of eastern Brazil (Ostariophysi: Characiformes). **Ichthyological Exploration in Freshwater**, v.11, p.155-162. 2000.

LIN, F.; DABROWSKI, K. Androgenesis and homozygous gynogenesis in muskellunge (*Esox masquinongy*): evaluation using flow cytometry**. Molecular Reproduction and Development,** v.49, p.10-18. 1998.

LUZ, R.K.; FERREIRA, A.A.; REYNALTE, D.A.T.; ZANIBONI-FILHO, E. Avaliação qualitativa e quantitativa do sêmen de suruvi, *Steindachneridion scripta* (Pimelodidae), **Boletim do Instituto de Pesca**, v.27, p.39-42, 2001.

MAGGESE, M.C.; CUKIER, M.; CUSSAC, V.E. Morphological changes, fertilizing ability and motility of *Rhamdia sapo* (Pisces, Pimelodidae) sperm induced by media of different salinities. **Revista Brasileira de Biologia**, v.44, p.541-546, 1984.

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

MARIA, A.N.; VIVEIROS, A.T.M.; ORFÃO, L.H.; OLIVEIRA, A.V.; MORAES, G.F. Effects of cooling and freezing on sperm motility of the endangered fish piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Characiformes, Characidae). **Animal Reproduction**, v.3, p.55-60, 2006b.

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

MARQUES, S.; GODINHO, H.P. Short term cold storage of sperm from six Neotropical Characiformes fishes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Brasil, v.47, p.799-804, 2004.

MARTÍNEZ-PÁRAMO, S.; PÉREZ-CEREZALES, S.; GÓMEZ-ROMANO F.; BLANCO, G.; SÁNCHEZ, J.A.; HERRÁEZ, M.P. Cryobanking as tool for conservation of biodiversity: effect of brown trout sperm cryopreservation on the male genetic potential. **Theriogenology**, Stoneham, v.71, p.594-604, 2009.

MATTEI, X. Spermatozoon ultrastructure and its systematic implications in fishes. **Canadian Journal of Zoology**, v. 69, p.3038-3055, 1991.

MATTEI, X. Spermiogenése comparé des poisson. In **Comparative Spermatology** (Baccetti, B., ed.), pp.57-72. New York: Academic Press. 1970.

MELO, F.C.S.A.; GODINHO, H.P. A protocol for cryopreservation of spermatozoa of the fish, *Brycon orthotaenia*. **Animal Reproduction**, v.33, p.380-385, 2006.

MELO-MACIEL, M.A.P.; SALMITO-VANDERLEY, C.S.B.; LEITE, L. V.; OLIVEIRA, C. E. DE; OLIVEIRA, M. S.; LOPES, J. T.; NUNES, J. F. Métodos de avaliação da qualidade do sêmen criopreservado de Characiformes brasileiros, **Ciência Animal**, v.22, p.269-283, 2012.

MILIORINI, A.B. **Ativadores e concentrações de metanol e dimetilsulfóxido na qualidade do sêmen criopreservado de curimba (Prochilodus lineatus).** 113f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2006.

MILIORINI, A.B.; MURGAS, L.D.S.; VIVEIROS, A.T.M. FRANCISCATTO, R. T.; SILVA, M.O.B.; MARIA, A.N. Resfriamento do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) a 4ºC, utilizando diferentes concentrações de dimetilsulfóxido. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, p.209-211, 2002.

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA – Boletim Estatistico da Pesca e Aqcuicultura 2011. Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20MPA%202011FINAL.pdf> Acesso em 26 de novembro de 2013.

MORISAWA, M. Initiation mechanism of sperm motility at spawning in teleosts. **Zoological Science.** v.2, p.605-615, 1985.

MORISHIMA, K.; FUJIMOTO, T.; SATO, M; KAWAE1, A.; ZHAO, Y.; YAMAHA, E.; ARAI1, K. Cold-shock eliminates female nucleus in fertilized eggs to induce *androgenesis* in the loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) ***BMC Biotechnology*** v.11, p.1-16, 2011.

MUCHLISIN, A. Z. Review: Current Status of Extenders and Cryoprotectants on Fish Spermatozoa Cryopreservation. **Biodiversitas**, v.6, p.12-15, 2005.

MURGAS, L.D.S.; FELIZARDO, V.O.; FERREIRA, M.R.; ANDRADE, E.S.; VERAS G.C. *Importância da avaliação dos parâmetros reprodutivos em peixes nativos*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, p.186-191, 2011.

MURGAS, L.D.S.; FRANCISCATTO, R.T.; SANTOS, A.G.O. Avaliação espermática pós-descongelamento em piracanjuba (*Brycon orbignyanus*, Vallenciennes, 1849). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, suppl.2, p.1810-1814, 2003.

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

MYERS, J.M.; PENMAN, D.J.; BASAVARAJU, Y.; POWELL, S.F.; BAOPRASERTKUL, P.; RANA, K.J.; BROMAGE, N.; MCANDREW, B.J. Induction of diploid androgenetic and mitotic gynogenetic Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). **Theoretical and Applied Genetics,** v.90, p.205-210, 1995.

NAGAHAMA Y. The functional morphology of teleost gonads. In: Hoar WS, Randall DJ, Donaldson EM (Ed.). **Fish physiology**. New York: Academic, v.9, p.233-275, 1983.

NAGOYA, H.; OKAMOTO, H.; NAKAYAMA, I; ARAKI, K.; ONOZATO, H. Production of androgenetic diploids in amago salmon, *Oncorhynchus masou ishikawae*. **Fisheries Science** (Tokyo) v.62, p.380-383, 1996.

NAKATANI, K., AGOSTINHO, A.A, BAUMGARTNER, G., BIALETZKI, A., SANCHES, P.V., MAKRAKIS, M.C., PAVANELLI, C.S. **Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e anual de identificação**. EDUEM. Maringá. 2001. 378 p.

NAM, Y.K.; CHO, Y.S.; CHO, H.J.; KIM, D.S. Accelerated growth performance and stable germ-line transmission in androgenetically derived homozygous transgenic mud loach, Misgurnus mizolepis. **Aquaculture**, v.209, p.257-270, 2002.

NINHAUS-SILVEIRA, A.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R.; SENHORINI, J.A; ALEXANDRE, J.S.; CHAGURI, M.P. Fertilidade do sêmen de matrinxã (*Brycon amazonicus*) criopreservado em nitrogênio líquido**. Boletim Técnico do CEPTA**, v.19, p.1-8, 2006.

OLIVEIRA, A.M.B.M.S.; CONTE, L.; CYRINO, J.E.P. Produção de Characiformes autóctones. In CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALOSSI, D. M.; CASTAGNOLLI, N. **Tópicos especiais em piscicultura de água doce**. São Paulo: TecArt. 2004. 533p.

OLIVEIRA, A.V.; VIVEIROS, A.T.M.; MARIA, A.N.; FREITAS, R.T.F.; ISAÚ, Z.A. Sucesso do resfriamento e congelamento de sêmen de pirapitinga *Brycon nattereri*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, p.1509-1515, 2007.

OLIVEIRA, D.J.; SENHORINI, J.A.; ASHIKAGA, F.Y.; FORESTI, F. Reprodução em cativeiro da piracanjuba, *Brycon orbignyanus* (Characiformes, Characidae) como

estratégia de conservação. *In:* **Anais do IV Seminário de Pesquisa e Iniciação Científica**, v.4. p.49. 2012.

PAES, M.C.F. **Viabilidade de embriões de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) submetidos a diferentes protocolos de resfriamento**. 66f. Tese (Doutorado em Aquicultura), Centro de Aquicultura da Unesp, Jaboticabal, São Paulo, 2013.

PANDIAN, T. J.; KIRANKUMAR, S. Androgenesis and conservation of fishes, **Current Science**, v.85, 2003.

PANDIAN, T.J.; KOTEESWARAN, R. Ploidy induction and sex control in fish. **Hydrobiologia**, v.384, p.167-243. 1998.

POMPEU, P.; VIEIRA, F. *Brycon vermelha* (Lima & Castro, 2000). In: MACHADO, A. B. M; DRUMMOND, G. M.; PAGLIA, A. P. (eds). Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. Volume II. 1.ed. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente, p.57-58, 2008.

POMPEU, P.S. **Estudo da regra operativa e avaliação de um mecanismo de transposição de peixes do tipo elevador com caminhão-tanque.** 190f. Tese (Doutorado em Meio Ambiente, Saneamento e Recursos Hídricos com ênfase em Hidráulica e Recursos Hídricos), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2005.

PURDOM, C.E. Genetic engineering by the manipulation of chromosomes. **Aquaculture** v.33, p.287-300, 1983.

PURDOM, C.E. Radiation-induced gynogenesis and androgenesis in fish. **Heredity (Edinburgh),** v., p.431-434, 1969.

QUAGIO-GRASSIOTTO, I.; OLIVEIRA, C. A new type of spermiogenesis and spermatozoa ultrastructure in Pimelodidae with a comparative review on spermatozoa ultrastructure of the Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi). **Zoologischer Anzeiger**, v.247, p.55-66, 2008.

RALL, W.F. Recent advances in the cryopreservation of salmonid fishes. In: **Genetic Conservation of Salmonid Fishes** (J.G. Cloud & G.H. Thorgaard, eds.), Plenum, New York, p.137-58, 1993.

RANA, K. Preservation of Gametes. *In:* **Broodstock Management and Egg and Larval Quality.** Eds. Bromage, N. R. and Roberts, R.J. Blackwell Science. 1995, 424p.

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

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

ROMASHOV, D.D.; BELYAEVA, V.N. Cytology of radiation gynogenesis and androgenesis in the loach *(Misgurnus/ossilis* L.). **Doklady Akademii Nauk SSSR**, v.157, p.964-967, 1964.

ROTHBARD, S.; RUBINSHTEIN, I.; DAVID, L.; SHELTON, W.L. Ploidy manipulations aimed to produce androgenetic Japanese ornamental (koi) carp, *Cyprinus carpio* **The Israeli Journal of** *Aquaculture – Bamidgeh*, v.51, p.26-39, 1999.

ROUTRAY, P.; VERMA, D.K.; SARKAR, S.K.; SARANGI, N. Recent advances in carp seed production and milt cryopreservation. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.33, p.413-427, 2007.

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

SALISBURY, Y.G.W.; VANDERMARK, N.L. **Fisiología de la reproducción e inseminación artificial de los bóvidos**. Trad. D. José Maria Santiago Luque. Zaragoza, ACRIBIA, 707 p.1964.

SANCHES, E.A.; BOMBARDELLI, R.A.; BAGGIO, D.M.; SYKORA, R.M.; XAVIER, AM.M. Características seminais do cascudo-preto (*Rhinelepis aspera*) Seminal characteristics of "cascudo-preto" (*Rhinelepis aspera*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, p.357-362, 2011.

SANTHAKUMAR, K.; PANDIAN, T.; KIRANKUMAR, S. Production of androgenetic tiger barb, *Puntius tetrazona*. **Aquaculture**, v.228, p.37-51, 2003.

SANTOS, G.M.; FERREIRA E.J.G.; ZUANON J.A.S. **Peixes comerciais de Manaus**. Manaus: IBAMA/AM, ProVárzea, 2006. 144p.

SCHEERER, P.D.; THORGAARD, G.H.; ALLENDORF, F.W. Genetic analysis of androgenetic rainbow trout. **Journal of Experimental Zoology,** v.260, p.382-390, 1991.

SCHEERER, P.D.; THORGAARD, G.H.; ALLENDORF, F.W.; KNUDSEN, K.L. Androgenetic rainbow trout produced from inbred and outbred sperm sources show similar survival. **Aquaculture,** v.57, p.289-298. 1986.

SHANGGUAN, B.; CRIM, L.W. The effect of stripping frequency on sperm quantity and quality in winter flounder (*Pleuronectes americanus* Walbaum). *In* July Goetz, F.W. and Thomas, P. Eds. **Proceedings of the Fish International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish.** University of Texas At Austin – Austin, Texas, 1995.

SILVA, J.M.A.; MURGAS, L.D.S.; FELIZARDO, V.O.; PEREIRA, G.J.M.; NAVARRO, R.D.; MELLO, R.A. Características seminais e índices reprodutivos de curimba (*Prochilodus lineatus*) em diferentes períodos reprodutivos. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.10, p.668-677, 2009.

SPADELLA, M.A. **Estudo filogenético na superfamília Loricarioidea (Teleostei: Siluriformes) com base na ultraestrutura dos espermatozoides.** 94f. Dissertação

(Mestrado em Biologia Celular e Estrutural), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

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

STOSS, J. Fish gamete preservation and spermatozoan physiology. *In*: **Fish Fisiology**, Vol. IX B, Hoar, W.; Randall, D. And Donaldson, E., Eds. Academic Press, New York, Chap. 6, 1983.

STREIT JR, D.P.; SIROL, R.N.; RIBEIRO, R.P.; MORAES, G.V.; GALO, J.M.; DIGMAYER, D. Parâmetros qualitativos do sêmen de dourado (*Salminus brasiliensis*) em cativeiro. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 34, p.337-344, 2008.

SUQUET, M.; OMNES, M.H; NORMANT, Y.; FAUVEL, C. Assessment of spermconcentration and motility in turbot (*Scophthalmus maximux* L.). **Aquaculture**, v.101, p.177-185, 1992.

TAITSON, P.F.; GODINHO, H.P. Evaluation of fish sperm concentration using two counting chambers. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v55, p.238-239, 2003.

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

TSAI, S.; LIN, C. Advantages and Applications of Cryopreservation in Fisheries Science. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.55, p.425-433, 2012.

VAZZOLER, A.E.A.M. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática.** Maringá: EDUEM, 1996.196p.

VELASCO-SANTAMARIA, Y.M.; MEDINA-ROBLES, V.M.; CRUZ-CASALLAS, P.E. Cryopreservation of yamu (*Brycon amazonicus*) sperm for large scale fertilization. **Aquaculture**, v.256, p.264-271. 2006.

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

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

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**, v.112, p.293-300, 2008.

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** v.112, p.293-300, 2009.

VIVEIROS, A.T.M.; SO, N.; KOMEN, J. Sperm cryopreservation of African catfish (*Clarias gariepinus*) cryoprotectants, freezing rates and sperm: egg dilution ratio. **Theriogenology**, v.54, p.1395-1408, 2000.

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

WOYNAROVICH, E.; HORVÁTH, L. **A propagação artificial de peixes de águas tropicais: manual de extensão**. Brasília: FAO/CODEVASF/CNPq. 1983. 225p.

YASUI, G.S.; FUJIMOTO, T.; ARAI, K. Restoration of the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*, from cryopreserved diploid sperm and induced androgenesis. **Aquaculture**, v.308, p.S140–S144, 2010.

ZANIBONI-FILHO, E.; BARBOSA, N.D.C. Priming hormone administration to induce spawning of some brazilian migratory fish. **Revista Brasileira de Biologia**, v.56, p.655-659, 1996.

ZANIBONI-FILHO, E.; REYNALTE-TATAJE, D.; WEINGARTNER, M. Potencialidad del género *Brycon* en la piscicultura brasileña. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v.19, p.233-240, 2006.

ZANIBONI-FILHO, E.; SCHULZ, U.H. Migratory fishes of the Uruguay river, p.135-168. *In:* J. Carolsfeld, B. Harvey, A. Baer and C. Ross (eds.), **Migratory fishes of the South America: biology, social importance and conservation status**. IDRC/ World Bank/ World Fisheries Trust, Canada, 2003. 372p.

ZANIBONI-FILHO, E.; WEINGARTNER, M. Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, p.367-373, 2007.

CAPÍTULO I

Ultraestrutura dos espermatozoides e parâmetros seminais de *Brycon vermelha* Lima & Castro, 2000 (Characiformes, Characidae)

Revista: Animal Reproduction Science (ISSN: 0378-4320)

Qualis Capes A2 (Zootecnia/Recursos Pesqueiros); Fator de impacto: 1,897

Resumo

Neste estudo, a ultraestrutura dos espermatozoides e os parâmetros seminais de *Brycon vermelha* foram analisados. O sêmen apresentou coloração branca e consistência viscosa, com volume médio de 5,0 ± 2,6 mL.Kg^{-1}. A concentração média de espermatozoides foi 4,34 ± 0,75x10^{10} espermatozoides.mL^{-1}, e a motilidade espermática subjetiva foi 90%, podendo-se constatar que 50% dos espermatozoides apresentavam-se móveis até 34,97 ± 0,05 segundos, e aos 46,49 ± 0,07 segundos, 100% dos espermatozoides encontrava-se imóvel. O espermatozoide de *B. vermelha* consistiu de três partes distintas: cabeça, peça intermediária e flagelo. A cabeça é ovoide, apresentando comprimento, referente ao diâmetro maior (1,89 ± 0,17 µm), e largura, diâmetro menor (1,31 ± 0,11 µm), sendo quase totalmente ocupada por um núcleo e recoberta por uma membrana nuclear de contorno irregular, sem vesícula acrossomal. Apresentou a fossa nuclear que abrigou o complexo centriolar e o início do segmento flagelar. A peça intermediária mostrou-se simétrica em relação ao flagelo, comprimento médio de 1,29 ± 0,25 µm, com presença de poucas mitocôndrias restritas à região anterior, e ausência de vesículas. A região posterior da peça intermediária era caracterizada pela ausência de mitocôndrias e presença de uma bainha citoplasmática. O flagelo era longo, com comprimento médio de 29,61 ± 3,42 µm, formado por axonema com padrão morfológico do tipo (9+2) microtúbulos e recoberto em toda sua extensão pela membrana flagelar. Tais características sugerem que os espermatozoides de *B. vermelha* possuem características ancestrais próprias de peixes com fecundação externa, classificando-os como espermatozoides aquáticos uniflagelados anacrossomais, ou seja, "aquasperm" do Tipo I.

Palavras-chave: *Brycon vermelha*; Biologia reprodutiva; Espermatozoide; Sêmen; Ultraestrutura.

1. Introdução

Brycon vermelha (Characiformes, Characidae) (**Anexo 1A**) é uma espécie que pode atingir pelo menos 40 cm de comprimento padrão, e recebe o nome comum de vermelha devido à coloração avermelhada das nadadeiras. A análise do conteúdo estomacal de alguns exemplares evidenciou hábito alimentar diversificado, com a ingestão de peixes, frutos e insetos aquáticos (LIMA e CASTRO, 2000). Segundo relatos, a vermelha pode atingir até 9 Kg de peso (comunicação pessoal).

A espécie é endêmica da Bacia do Rio Mucuri, estado de Minas Gerais, Brasil, e está inserida no Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção na categoria "vulnerável" (VU), sendo os registros da espécie bastante esporádicos, segundo o IBAMA (In MMA 05/04, 2008). Por ser uma espécie recentemente conhecida pela comunidade científica, não foram encontrados na literatura detalhes sobre a biologia reprodutiva ou qualquer pesquisa envolvendo a espécie.

Toth et al. (1997) ressaltaram a importância de se conhecer as características morfológicas e funcionais dos espermatozoides para o entendimento da biologia reprodutiva e para a produção em cativeiro de qualquer espécie íctica. Para tanto, é importante a descrição do perfil espermático das espécies, no qual são analisadas as características físicas do sêmen (volume, motilidade, vigor e concentração) e as características morfológicas dos espermatozoides (ROUTRAY et al. 2007).

Através dessas informações, pode-se avaliar a qualidade do sêmen coletado e, com isso, otimizar sua utilização no processo de fertilização artificial (VIVEIROS, 2005). De acordo com Tuset et al. (2008), a morfologia do espermatozoide está relacionada com a velocidade e a capacidade de fertilização. Além disso, a avaliação morfológica dos espermatozoides de peixes pode auxiliar na caracterização de amostras seminais, fazendo inferência sobre seu potencial fertilizante ou de amostras congeladas de sêmen e explicando insucessos de reprodutores tidos como aptos após análises convencionais de motilidade espermática (MURGAS et al. 2011).

Outra questão importante é que a partir do conhecimento morfofuncional dos gametas, aliado a estudos de fisiologia e metabolismo, torna-se possível o desenvolvimento de técnicas que contribuirão para a conservação das espécies (SUQUET et al. 1998; LAHNSTEINER, 2000). Além das aplicações práticas, o estudo da ultraestrutura e morfologia de espermatozoides de peixes fornecem informações importantes para a compreensão da taxonomia e das relações evolutivas (JAMIESOM, 1991; LAHNSTEINER e PATZNER, 2007).

O objetivo deste estudo foi investigar as características seminais e descrever ultraestruturalmente os espermatozoides da *B. vermelha*. O conhecimento da biologia do sêmen da espécie constitui uma ferramenta para estudos taxonômicos/filogenéticos, bem como poderão ser a base para a implementação de medidas de conservação da espécie, como a criopreservação dos gametas masculinos.

2. Material e métodos

O estudo foi conduzido nas dependências do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - CEPTA/ICMBio, Pirassununga, Estado de São Paulo (SP), Brasil (**Anexo 1B**), em Novembro de 2011.

O CEPTA/ICMBio é o único Centro de Pesquisa a possuir um plantel de reprodutores da *B. vermelha*, e tem o foco de desenvolver trabalhos conservacionistas da espécie. O manejo das vermelhas deve ser cuidadoso, por se tratar de uma espécie ainda não domesticada, que se mostra intensamente estressada durante os trabalhos de reprodução artificial, o que muitas vezes resulta na morte dos exemplares. Estes fatos justificam o número (N) amostral mínimo utilizado no presente trabalho.

Os estudos em microscopia eletrônica ocorreram no Laboratório de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Medicina, Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FMRP/USP), SP, Brasil.

2.1. Coleta de sêmen

Três exemplares de *B. vermelha* adultos e maduros morfologicamente (que liberavam sêmen sob leve pressão da papila urogenital) foram selecionados do plantel de reprodutores (**Anexo 1C**) e levados para tanques de alvenaria, cuja temperatura foi de 25,35 ± 0,25ºC. A espermiação foi estimulada por meio da injeção de solução de Ovopel® (D-Ala, Pro-Net-mGnRH, Unic-trade, Hungary), na dosagem única de 1,0 $mg.Kg^{-1}$ de peso vivo, na base da nadadeira peitoral (**Anexo 1D**).

Após seis horas, os peixes foram imediatamente retirados de suas caixas e transferidos para recipientes contendo solução anestésica de mentol (marca Êxodo Científica - concentração de 100 a 200 $mg.L^{-1}$, de acordo com o comportamento do peixe, até que atingisse o estágio profundo de anestesia), visando minimizar os efeitos do estresse durante o manejo, garantindo o bem-estar animal. Posteriormente, estes peixes

foram submetidos à massagem abdominal, no sentido céfalo-caudal, para coleta do sêmen, com precaução para que não houvesse a contaminação do sêmen com urina, sangue ou água do tanque, circunstâncias que poderiam ativar o sêmen. O sêmen foi coletado em tubo de ensaio graduado (**Anexo 1E**).

2.2. Parâmetros seminais

Os seguintes parâmetros seminais de *B. vermelha* foram analisados:

- *Cor e consistência*: empregou-se o método subjetivo da observação da cor e consistência do sêmen.

- *Volume (mL)*: a massagem na região abdominal para coleta do sêmen foi realizada até que houvesse redução na liberação, evitando-se qualquer sinal de sangramento; procedeu-se à leitura do volume de sêmen colhido nos tubos de ensaio graduados (**Anexo 1D**).

- *Motilidade*: Taxa de motilidade (%) - empregou-se o método subjetivo expresso em porcentagem (0 a 100%); Duração da motilidade - por meio de cronômetro, foi analisado o tempo em que 50% dos espermatozoides permaneciam móveis e o tempo em que todos já se encontravam imóveis. Para a análise da motilidade, procedeu-se a diluição da amostra utilizando-se a solução não ativadora de *B. insignis* NaCl 1,2% (SHIMODA et al. 2007), como forma de facilitar a observação da motilidade, uma vez que o sêmen é bastante viscoso. Em um microtubo de 1,5 mL, colocou-se 450,0 µL de NaCl 1,2% adicionando-se 50,0 µL de sêmen fresco, gerando uma proporção de 1:9 (diluição de 10x). Posteriormente, retirou-se 1,0 µL desta solução diluída colocando-a sobre uma lâmina de vidro (previamente limpa em solução 1:1 de éter: álcool) a qual foi observada ao microscópio de luz (objetiva de 10x) previamente focalizado. Adicionou-se, logo em seguida, 29,0 µL de água destilada para a ativação dos espermatozoides, homogeneizando-se vigorosamente com a pipeta e, neste mesmo momento, foi acionado o cronômetro para contagem da duração da motilidade e para estimativa da taxa de espermatozoides móveis presentes na amostra observada. A porcentagem de motilidade foi avaliada conforme a quantidade de espermatozoides que apresentaram qualquer tipo de movimento (progressivo ou vibratório). Foram realizadas três repetições para cada macho analisado.

- *Concentração (espermatozoides.mL^{-1})*: para este estudo, utilizou-se a solução fixadora de sêmen formol salino tamponado (Hancock, 1957) conforme recomendado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA) (1998). A diluição do sêmen

nesta solução foi realizada na proporção 1:2000 (sêmen: solução fixadora). Feito isso, foi retirado um pequeno volume deste sêmen diluído e aplicado por capilaridade nos campos de contagem da câmara de Neubauer. Aguardaram-se cerca de cinco minutos, tempo suficiente para visualizar os espermatozoides assentados no campo de contagem, quando então foi realizada a contagem, em microscópio de luz (objetiva de 10x). Os dois campos da câmara de Neubauer foram utilizados na contagem, sendo que dos 50 retículos presentes, contaram-se dez, cinco em um campo e cinco no outro. Foram realizadas três repetições para cada macho analisado.

2.3. Ultraestrutura dos espermatozoides

As amostras de sêmen de *B. vermelha* foram fixadas em solução de Karnovsky modificada (glutaraldeído a 2,5% e paraformaldeído a 2,5%), por 24 horas, sendo lavadas e conservadas em tampão Cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,4 à temperatura de aproximadamente 4,0ºC, em geladeira.

Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

O sêmen foi ressuspenso em ágar a 2%, formando um bloco. Este bloco foi então pós-fixado em solução de tetróxido de ósmio a 1% por duas horas e lavado em tampão fosfato. A desidratação ocorreu em série de concentrações crescentes de acetona (30%, 50%, 70%, 80%, 90% 95%) por 10 minutos cada e em acetona 100%, três vezes, por 20 minutos cada. A pré-infiltração foi feita com resina araldite e acetona 100% (proporção 1:1) permanecendo "overnight". A infiltração ocorreu em resina pura por duas horas, à temperatura de 40,0ºC, e a inclusão e polimerização foram feitas em resina por 72 horas, à temperatura de 60,0ºC. O bloco foi aparado, sendo realizados cortes semifinos (0,5 µm de espessura) em ultramicrótomo com lâmina de vidro, e corados com Azul de Toluidina a 1%. Os cortes foram selecionados para a realização dos cortes ultrafinos com navalha de diamante a 70 nm de espessura, em seguida contrastados em acetato de uranila e citrato de chumbo e observados e eletronmicrografados em microscópio eletrônico de transmissão (marca JEOL, modelo JEM-100 CX II, Tokyo, Japan).

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Uma gota de sêmen foi colocada em lamínula de vidro estéril e previamente tratada com Biobond® (Electron Microscopy Science), mantida à temperatura ambiente

por 20 minutos para aderência das células. Posteriormente, foi pós-fixada em solução de tetróxido de ósmio a 1% por duas horas à temperatura de aproximadamente 4,0ºC, em geladeira, e lavada em tampão fosfato. Em seguida, a amostra foi desidratada em concentrações crescentes de etanol (30%, 50%, 70%, 80%, 90% 95%) por 10 minutos cada e em etanol 100%, três vezes, por 20 minutos cada. Feito isso, foi então levada à Secadora de Ponto Crítico com CO_2 líquido (marca BAL-TEC, modelo CPD 030, Oberland, Principality of Liechtenstein), montada em suporte de cobre, metalizada com ouro (Metalizadora marca BAL-TEC, modelo SCD 050, Oberland, Principality of Liechtenstein) e eletronmicrografadas em microscópio eletrônico de varredura (marca JEOL, modelo JSM-6610LV, Tokyo, Japan).

Morfometria dos espermatozoides

Após a obtenção das eletronmicrografias em Microscópio Eletrônico de Varredura, foram aferidas as dimensões dos espermatozoides utilizando o programa de análise de imagens "Image J" (http://rsb.info.nih.gov/ij/), sendo determinado o comprimento e a largura da cabeça, o comprimento da peça intermediária e do flagelo, e o comprimento total, em micrômetros. De cada macho (n = 3) foram utilizados 25 para esta finalidade, totalizando 75 espermatozoides.

3. Resultados

3.1. Parâmetros seminais de *B. vermelha*

Os reprodutores de *B. vermelha* possuíram peso médio corporal de 1.100 ± 0 g. O sêmen apresentou coloração branca e consistência viscosa. Os valores relativos aos parâmetros seminais da espécie encontram-se sumarizadas na Tabela 01.

Tabela 01. Parâmetros seminais de *B. vermelha*.

Características	Média ± Erro Padrão	Mín.	Máx.
Volume sêmen por quilograma peixe ($mL.Kg^{-1}$)	5,0 ± 2,6	2,7	7,1
*Motilidade (%)	>90 ± 0	>90	>90
*Duração motilidade (50% móveis) (s)	34,9 ± 5,0	26,5	42,5
*Duração motilidade (100% imóveis) (s)	46,4 ± 7,6	34,3	58,6
Concentração ($espermatozoides.mL^{-1}$)	$4,3 \pm 0,7x10^{10}$	$3,8x10^{10}$	$5,2x10^{10}$

N=3; *N=9. Valor mínimo (Mín.) e máximo (Máx.) observado para cada característica.

3.2. Ultraestrutura dos espermatozoides de *B. vermelha*

Os espermatozoides de *B. vermelha* apresentaram-se alongados, cilíndricos, com simetria radial e uniflagelados. O comprimento médio total dos espermatozoides foi de 32,40 ± 3,36µm. Cada espermatozoide era constituído por três regiões distintas: cabeça, peça intermediária e flagelo (**Figuras 1A e 1B**). A média das dimensões de cada uma destas partes, e o comprimento total dos espermatozoides, encontram-se na **Tabela 02**.

Tabela 02. Dimensões dos espermatozoides de *B. vermelha*.

Medida (µm)	Média ± Erro Padrão	Mín.	Máx.
Comprimento da cabeça	1,89 ± 0,17	1,23	2,30
Largura da cabeça	1,31 ± 0,11	1,11	1,65
Comprimento da peça intermediária	1,29 ± 0,25	0,49	2,08
Comprimento do flagelo	29,61 ± 3,42	19,77	37,40
Comprimento total	32,40 ± 3,36	22,97	40,32

N=75. Valor mínimo (Mín.) e máximo (Máx.) observado para cada característica.

Cabeça

A cabeça era ovoide, com diâmetro maior no sentido horizontal, referente ao comprimento, e diâmetro menor, aferido como largura. Era recoberta por uma membrana nuclear de contorno irregular, e não apresentava vesícula acrossomal (**Figura 2B**).

O núcleo, que acompanhava o formato da cabeça, consistiu-se de material eletrodenso (escuro) e granular (cromatina compactada aos grumos) intercalados por áreas eletrolúcidas (claras) e interligados por fibras mais finas e ocupava quase totalmente a região da cabeça (**Figuras 2A - 2D**). A área citoplasmática ao redor do núcleo era estreita, não sendo encontradas organelas. A fossa nuclear profunda, em forma de arco único e medial à base do núcleo, alojou o complexo centriolar e o segmento inicial do flagelo (**Figuras 2B e 2D**).

O complexo centriolar foi constituído por um centríolo proximal e um distal (**Figura 2B**) de forma que, o centríolo proximal apresentava-se numa posição anterior e levemente oblíqua em relação ao distal. Aparentemente, um material eletrodenso também conecto os centríolos (**Figura 2B**). O centríolo distal diferenciou-se em corpúsculo basal, dando início à formação do flagelo (**Figura 3A**).

Peça intermediária

A peça intermediária apresentou-se simétrica em relação ao flagelo (**Figuras 2A e 2C**), desde a base do núcleo até a bainha citoplasmática (**Figuras 2A - 2D**). Possuía mitocôndrias e era desprovida de vesículas.

As mitocôndrias, de tamanho médio, e aparentemente em pequeno número, estavam presentes na região anterior da peça intermediária e possuíam formato alongado (**Figuras 2B, 2C, 3B e 3C**). A parte posterior era caracterizada pela ausência de mitocôndrias e presença de uma bainha citoplasmática (**Figura 2C**). Um espaço extracelular entre a peça intermediária e o flagelo formou o canal citoplasmático, caracterizado por uma invaginação na membrana plasmática (**Figuras 2A, 2B e 2C**).

Flagelo

Cada flagelo apresentou eixo perpendicular e medial à base do núcleo, exibindo o axonema com padrão morfológico do tipo 9+2, ou seja, nove pares de microtúbulos periféricos e dois microtúbulos centrais (**Figuras 3B, 3C e 3D**). O flagelo estava envolvido em toda sua extensão pela membrana flagelar (**Figura 3D**). A porção do flagelo inserida no canal citoplasmático mostrou uma maior quantidade de citoplasma (**Figura 2D**). Não foram observadas projeções alares da membrana flagelar e nem diferenciações intratubulares.

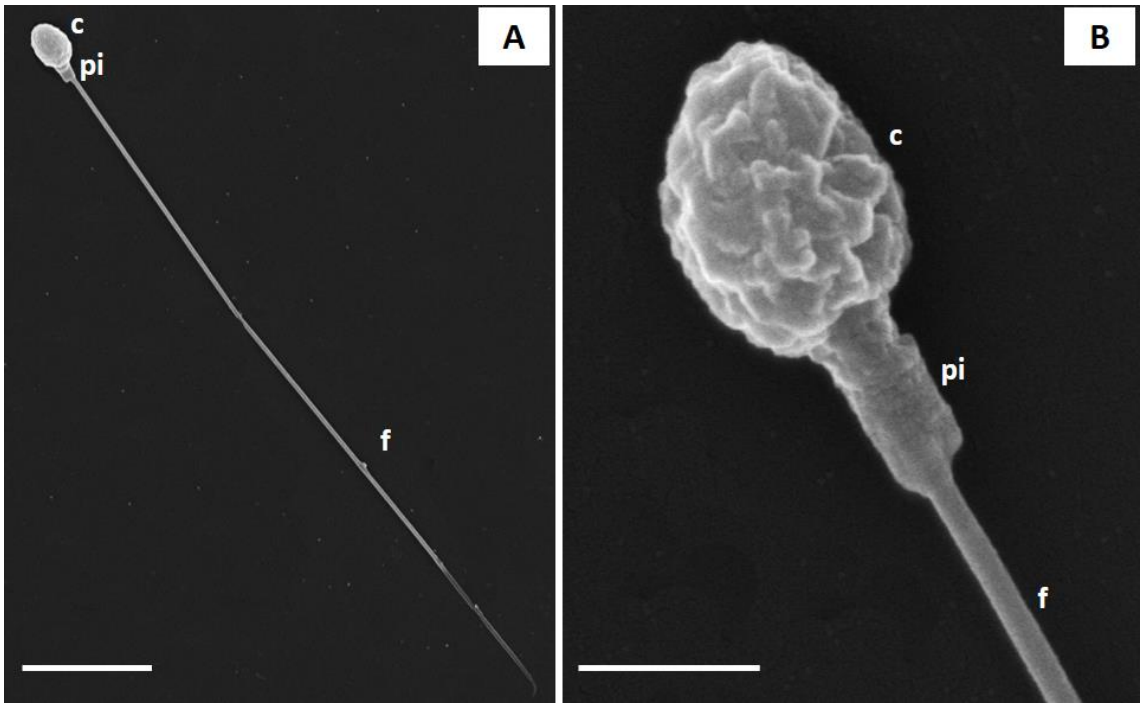


Figura 1. A e B: Microscopia eletrônica de varredura dos espermatozoides de *Brycon vermelha* em secção longitudinal. Abreviaturas: c = cabeça; f = flagelo; pi = peça intermediária. Escala das barras: A: 5µm; B: 1µm.

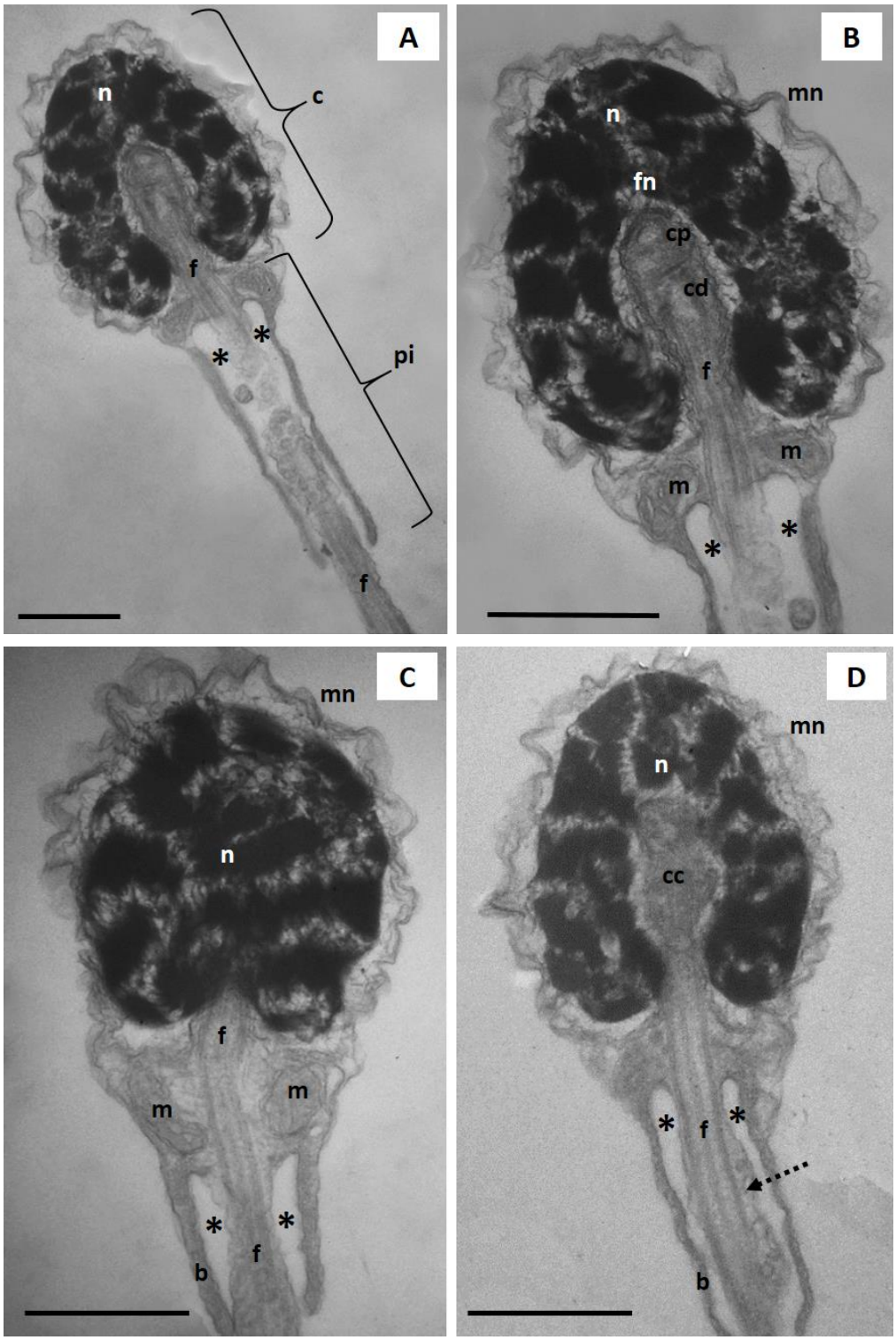


Figura 2. Microscopia eletrônica de transmissão do espermatozoide de *Brycon vermelha* em secções longitudinais. **A:** Três partes distintas: cabeça, peça intermediária, flagelo; **B:** Evidenciação da fossa nuclear, complexo centriolar (centríolos proximal e distal) e mitocôndrias; **C:** Evidenciação da bainha citoplasmática; **D:** Presença de faixa citoplasmática ao redor do flagelo. **Abreviaturas:** asterisco = canal citoplasmático; b = bainha citoplasmática; c = cabeça; cc = complexo centriolar; cd = centríolo distal; cp = centríolo proximal; f = flagelo; fn = fossa nuclear; m = mitocôndria; mn = membrana nuclear; n = núcleo; pi = peça intermediária; seta pontilhada = citoplasma ao redor do flagelo. **Escala das barras:** 1µm.

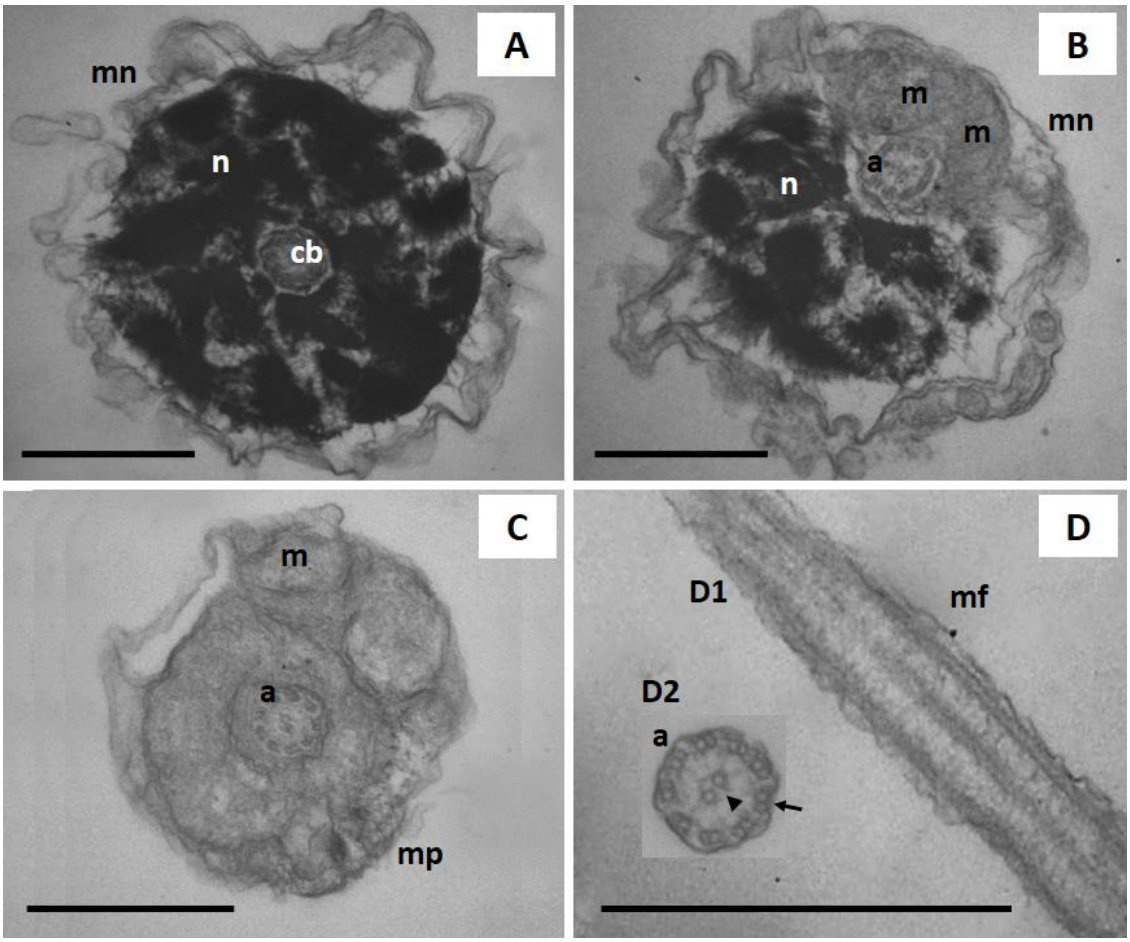


Figura 3. Microscopia eletrônica de transmissão do espermatozoide de *Brycon vermelha* em secções transversais (A, B, C e D2) e em secção longitudinal (D1). **A:** Detalhe do núcleo - cromatina compactada heterogeneamente e corpúsculo basal de onde se inicia o flagelo; **B:** Detalhe da região posterior da cabeça e região apical da peça intermediária - núcleo, porção inicial do flagelo detectada pela observação do axonema, par de mitocôndrias; **C:** Detalhe da região apical da peça intermediária - axonema e mitocôndria; **D:** Flagelo envolvido em toda extensão pela membrana flagelar (D1); Detalhe do flagelo mostrando o axonema com padrão morfológico de nove duplas de microtúbulos periféricos e dois microtúbulos centrais (D2). **Abreviaturas:** a = axonema; cb = corpúsculo basal; m = mitocôndria; mf = membrana flagelar; mn = membrana nuclear; mp = membrana plasmática; n = núcleo; ponta de seta = par central de microtúbulos; seta = pares periféricos de microtúbulos. **Escala das barras:** 1µm.

4. Discussão

A descrição de um perfil seminal é imprescindível na rotina de reprodução artificial de qualquer espécie de peixe (MURGAS et al. 2011). O aspecto visual do sêmen de peixes, geralmente alternando de aquoso a denso, pode estar relacionado aos valores de concentração espermática, concluindo-se que, quanto mais viscoso for o sêmen, maior será sua concentração espermática (LUZ et al. 2001).

Segundo Salisbury e Vandemark (1964), a determinação da concentração espermática é fundamental na rotina da reprodução artificial, no sentido de se conhecer a quantidade de material fecundante. Ainda, Sanches et al. (2011) relataram que a mensuração da concentração espermática oferece informações básicas para o desenvolvimento de estratégias de reprodução artificial em peixes, como a seleção de animais com bom potencial reprodutivo e o emprego de doses inseminantes adequadas para cada espécie.

A concentração espermática apresenta grande variação, tanto dentro da mesma espécie, quanto entre espécies diferentes (LUZ et al. 2001) e dependerá de inúmeros fatores como idade do peixe, época do ano (SILVA et al. 2009), frequência de coleta e volume do ejaculado (MURGAS et al. 2011). Outro fator é a seleção de reprodutores que serão submetidos à indução hormonal. No momento da seleção, alguns peixes liberando sêmen mediante massagem abdominal são considerados aptos para a desova, mas muitas vezes podem não estar no ápice da produção espermatogênica, o que contribui para uma menor concentração espermática (LUZ et al. 2001).

Nas condições experimentais deste trabalho, os machos de *Brycon vermelha* apresentaram concentração espermática média de $4{,}34 \pm 0{,}75x10^{10}$ espermatozoides.mL^{-1}, com aspecto viscoso. Segundo Leung (1991), peixes teleósteos podem variar a concentração espermática desde $2x10^{6}$ a $6{,}5x10^{10}$ espermatozóides.mL^{-1} de sêmen, o que leva a inferir que o valor encontrado para a vermelha pode ser considerado alto.

Na literatura, valores de concentração espermática foram registrados para outros peixes do mesmo gênero. Para *B. insignis*, $2{,}47 \pm 0{,}18x10^{10}$ espermatozóides.mL^{-1} (ANDRADE-TALMELLI et al. 2001) e $2{,}43 \pm 0{,}38x10^{10}$ espermatozóides.mL^{-1} (SHIMODA et al. 2007), para *B. orbignyanus* valores de $8{,}21 \pm 2{,}26x10^{9}$ espermatozóides.mL^{-1} (MURGAS et al. 2004), $5{,}4 \pm 2{,}5x10^{9}$ espermatozóides.mL^{-1} (MARIA et al. 2006) e $1{,}04 \pm 0{,}31x10^{10}$ espermatozóides.mL^{-1} (FELIZARDO et al. 2010), para *B. cephalus* $9{,}61 \pm 1{,}63x10^{9}$ espermatozóides.mL^{-1} (NINHAUS-SILVEIRA

et al. 2006). Como pode ser notado, a concentração espermática encontrada para *B. vermelha* foi superior às concentrações das demais espécies do mesmo gênero.

Em relação ao volume seminal em teleósteos, Godinho (2007) relatou que esta variável depende do tamanho do indivíduo, época e metodologia de coleta. Quanto ao método de coleta, por exemplo, as variações no volume de sêmen liberado são devido à maneira como é realizada a extrusão dos gametas, que não garante a liberação total do sêmen presente nos testículos (FERREIRA et al. 2001). Outro ponto importante a ser considerado, segundo Kavamoto (1993), é o fato do volume de sêmen após o tratamento hormonal superar a quantidade obtida antes da aplicação hormonal. Os exemplares de *B. vermelha* deste estudo receberam dosagem hormonal antes da espermiação, com o intuito de se obter maior volume seminal.

Outra medida imprescindível a ser estimada é o tempo de duração da motilidade espermática, pois além de determinar a viabilidade dos espermatozoides, permite o controle do tempo necessário para realizar a mistura dos gametas com o meio fertilizante no momento da reprodução artificial (SANCHES et al. 2009). Normalmente, os espermatozoides de teleósteos permanecem móveis por um curto período de tempo, geralmente inferior a um minuto (MELO e GODINHO, 2006), fato constatado para a *B. vermelha*.

O tempo de duração da motilidade espermática é fortemente influenciado por fatores como o tipo de solução ativadora (CAROLSFELD et al. 2003). Dessa forma, devido ao curto tempo de motilidade espermática encontrada na maioria dos peixes teleósteos, como *B. vermelha*, Luz et al. (2011) relataram sobre a necessidade da escolha de um bom ativador nos processos de reprodução induzida, pois quanto maior a atividade no princípio da ativação, possivelmente maior a chance de ocorrer a fecundação.

Em relação às características ultraestruturais dos espermatozoides de *B. vermelha*, é possível inferir que a espécie apresenta espermiogênese do tipo I (MATTEI, 1970), que resulta na formação de espermatozoides aquáticos do tipo I (JAMIESON, 1991). Apesar da existência de três tipos de espermiogênese para a ordem Characiformes, o tipo I é o mais predominante, descrito para a maioria das espécies da ordem.

Como características, estes gametas possuem núcleo pequeno, de forma ovoide ou arredondada, centríolos em ângulos variados situando-se total ou parcialmente na fossa nuclear, quando presente. A peça intermediária é pequena e forma um colar ao redor da região inicial do flagelo. As mitocôndrias, pequenas e pouco numerosas, situam-se no colar citoplasmático, separadas do início do flagelo por um espaço existente entre as

membranas plasmáticas e flagelar, o canal citoplasmático. O flagelo apresenta o axonema clássico formado por nove pares periféricos de microtúbulos e um par central. A membrana flagelar pode ou não apresentar projeções laterais (JAMIESON, 1991, MATTEI, 1991, QUAGIO-GRASSIOTTO e OLIVEIRA, 2008).

O padrão primitivo destes espermatozoides dos tipos I, II ou III, característico das espécies com fecundação externa, traz como características básicas espermatozoides constituídos, em sua maioria, por cabeça, sem vesícula acrossomal, peça intermediária, poucas mitocôndrias e flagelo longo (GRIER, 1981; BILLARD, 1983; MATTEI, 1988). Por serem desprovidos de acrossoma e possuírem apenas um flagelo, são denominados "espermatozoides aquáticos uniflagelados anacrossomais" (JAMIESON, 1991).

Em espécies de uma mesma família, a estrutura dos espermatozoides é pouco variada (JAMIESON, 1991; MATTEI, 1991; QUAGIO-GRASSIOTTO e OLIVEIRA, 2008) tornando sua caracterização bastante útil na identificação de padrões de relacionamento interfamiliar. No entanto, existem caracteres que exibem altos níveis de variabilidade entre espécies de uma mesma família, como por exemplo localização da fossa nuclear, posição e arranjo do complexo centriolar, distribuição e formato das mitocôndrias (VERÍSSIMO-SILVEIRA, 2007).

Um núcleo esférico é característica de Characiformes de fertilização externa, segundo Jamieson (1991) e Mattei (1991). Grier (1981) relatou que o espermatozoide ancestral, com núcleo arredondado, foi retido pelas espécies com fecundação externa, enquanto as espécies que praticam a fecundação interna sofreram modificações na morfologia do espermatozoide, apresentando núcleo alongado e peça intermediária bem desenvolvida. Porém, em Characidae também estão presentes espermatozoides com núcleo ovoide (eixo maior no sentido horizontal), como descrito para *Piaractus mesopotamicus* (CRUZ-LANDIM et al. 2003) e *Serrapinus notomelas* (GUSMÃO-POMPIANI, 2003). O núcleo ovoide, com eixo maior no sentido horizontal, também foi observado neste estudo em *B. vermelha*.

O padrão de compactação da cromatina nos espermatozoides dos Teleostei apresenta diferentes aspectos (JAMIESON, 1991), e a compactação progressiva da cromatina no núcleo das espermátides e sua forma final, nos espermatozoides, depende do tipo de proteína associada ao DNA (SAPERAS et al. 1993). Na ordem Characiformes, o padrão de compactação da cromatina mostra-se de duas formas: homogênea, na qual a cromatina é gradativamente compactada na forma de filamentos justapostos ao longo da espermiogênese, podendo ou não apresentar áreas eletrolúcidas, ou heterogênea, em que

a cromatina é formada por feixes filamentosos na forma de grumos justapostos (VERÍSSIMO-SILVEIRA, 2007).

Segundo Veríssimo-Silveira (2007), normalmente a compactação da cromatina segue um padrão dentro da família, porém em Characidae o padrão ocorre ao nível de subfamílias. Em Characidae, das 597 espécies de peixes descritas para o Brasil distribuídas em 12 subfamílias (além daquelas colocadas em "incertae-sedis"), a compactação heterogênea da cromatina foi observada somente para Serrasalminae e Bryconinae e na espécie "incertae-sedis" *Salminus brasiliensis* (GUSMÃO-POMPIANI, 2003; VERÍSSIMO-SILVEIRA et al. 2006).

Este tipo de compactação heterogênea na forma de grumos foi relatado nos espermatozoides de *Brycon cephalus* (ROMAGOSA et al. 1999), *Brycon hilarii* (ZAIDEN, 2000), *Brycon microlepis*, *Brycon orbignyanus* (VERÍSSIMO-SILVEIRA et al. 2006), *Piaractus mesopotamicus* (CRUZ-LANDIM et al. 2003) e também é o tipo de compactação de cromatina encontrada na *Brycon vermelha*.

A fossa nuclear, uma depressão encontrada na região do núcleo voltada para o flagelo, pode ou não estar presente nos espermatozoides dos Teleósteos (JAMIESON 1991; MATTEI, 1991). As características dadas à fossa, especialmente o posicionamento, estão mais associadas ao espermatozoide do tipo I, uma vez que, durante a espermiogênese do tipo II, embora a fossa nuclear esteja presente, não ocorre rotação do eixo flagelar em relação ao núcleo e os centríolos se encontram fora dela.

Durante a espermiogênese do tipo I, o complexo centriolar movimenta-se em direção ao núcleo, o centríolo distal diferencia-se em corpúsculo basal originando o segmento inicial do flagelo, dispondo-se tangencialmente ao núcleo, e nesta face do contorno nuclear forma-se uma depressão ou fossa (ORTIZ, 2012). Geralmente, o núcleo sofre uma rotação de 90º em relação ao eixo flagelar e, neste caso, a fossa nuclear torna-se medial e o flagelo perpendicular ao núcleo. Porém, quando a rotação nuclear não é completa, a fossa nuclear tem posição excêntrica (VERÍSSIMO-SILVEIRA, 2007).

Nas espécies em que está presente, esta estrutura pode apresentar formato e profundidade variáveis. Quanto ao formato, por exemplo, pode-se mostrar em semiarco, arco único e duplo (VERÍSSIMO-SILVEIRA, 2007). Em relação à profundidade, a fossa nuclear pode ser considerada rasa (se fossa nuclear $\leq$ ¼ comprimento do núcleo), moderada (¼ < fossa nuclear $\geq$ ½ comprimento nuclear) e profunda (fossa nuclear > ½ comprimento nuclear) (VERÍSSIMO-SILVEIRA, 2007). No que diz respeito à *B. vermelha*, observou-se uma fossa nuclear medial, em arco único e profunda. Observações

semelhantes foram feitas por Romagosa et al. (1999) em *B. cephalus*, por Zaiden (2000) em *B. hilarii* e por Gusmão-Pompiani (2003) em *B. orbignyanus* e *B. microlepis*.

Por sua vez, a posição do complexo centriolar em relação ao núcleo está associada à existência, formato e profundidade da fossa nuclear (SPADELLA, 2004). Pode-se mencionar a posição do complexo frente à fossa nuclear, podendo estar total ou parcialmente inserido na fossa nuclear, ou fora (distante ou próxima) da fossa nuclear. E também a posição relativa que o centríolo proximal assume frente ao distal. Nos Characidae, o arranjo dos centríolos entre si pode ser variável e é considerado espécie-específico (VERÍSSIMO-SILVEIRA, 2007).

Como a *B. vermelha* apresentou uma fossa nuclear profunda, esta abrigou todo o complexo centriolar além do segmento inicial do flagelo. O centríolo proximal assumiu posição anterior e levemente oblíqua em relação ao centríolo distal, característica similar encontrada em outras espécies de peixes neotropicais (ROMAGOSA et al., 1999; ZAIDEN, 2000; GUSMÃO-POMPIANI, 2003).

Quanto à peça intermediária em teleósteos, esta é geralmente curta e contém o canal citoplasmático. No entanto, a peça intermediária pode ser longa e exibir um canal citoplasmático longo, com ou sem bainha citoplasmática (JAMIESON 1991; MATTEI, 1991). Uma longa peça intermediária com uma bainha citoplasmática foi visualizada em *B. vermelha*, sendo esta uma característica de Bryconinae (ROMAGOSA et al. 1999; ZAIDEN 2000; VERÍSSIMO-SILVEIRA et al. 2006). A bainha citoplasmática é constituída por uma estreita projeção citoplasmática envolta pela membrana das regiões periférica e interna da peça intermediária e, geralmente, possui as extremidades dilatadas (VERÍSSIMO-SILVEIRA, 2007).

A formação do canal citoplasmático ocorre em quase todos os Characiformes. Segundo Mattei (1970) e Jamieson (1991), a formação desta estrutura ocorre nas espermiogêneses dos tipos I e II, com a ressalva de que, neste último, o canal citoplasmático pode estar ausente se a peça intermediária for muito pequena. Ainda em Characiformes, Jamieson (1991) e Mattei (1988, 1991) descreveram a presença de vesículas, túbulos e mitocôndrias de diferentes formas, tamanhos e distribuição na região da peça intermediária, podendo, entretanto, vesículas e túbulos estarem ausentes.

Veríssimo-Silveira et al. (2006) relataram, em *B. microlepis* e *B. orbignyanus*, a presença de mitocôndrias grandes, alongadas e ramificadas, restritas à região anterior da peça intermediária, sendo a região posterior caracterizada pela ausência desta organela e presença de bainha citoplasmática. Esta descrição foi a mesma observada para *B.*

vermelha. Os autores evidenciam que a forma alongada e ramificada das mitocôndrias provavelmente seja resultado da fusão destas organelas durante a espermiogênese.

A ausência de vesículas na região da peça intermediária dos espermatozoides, constatada em *B. vermelha*, também foi observada em outros Characidae (CRUZ-LANDIM et al. 2003; GUSMÃO-POMPIANI, 2003; VERÍSSIMO-SILVEIRA et al. 2006). Quando ocorrem, as vesículas podem se apresentar isoladas, conectadas umas às outras e também à membrana plasmática (SPADELLA, 2004).

O flagelo do espermatozoide é a região onde a célula obtém sua propulsão, e tem a função de manter a eficiência do movimento (BACCETTI, 1970). Na maioria dos Ostariophysi, o espermatozoide apresenta um único flagelo constituído pelo axonema clássico (9+2) (JAMIESON; 1991; MATTEI, 1988), sendo a ocorrência de espermatozoides uniflagelados observada em todas as espécies de Characiformes descritas na literatura. Em alguns Ostariophysi, o flagelo pode apresentar expansões membranosas laterais denominadas projeções da membrana flagelar (projeções alares/laterais) (JAMIESON, 1991). Nas espécies de Bryconinae, os espermatozoides não possuem tais projeções, sendo o fato constatado para *B. vermelha* e em outros estudos (ROMAGOSA et al. 1999; ZAIDEN 2000; VERÍSSIMO-SILVEIRA et al. 2006).

A tendência atual, especialmente para espécies que se encontram ameaçadas de extinção, é a adoção de biotécnicas, como criopreservação e androgênese. Para a implantação destas tecnologias, é imprescindível, além do domínio da reprodução artificial, o estudo dos aspectos básicos da qualidade seminal, relatados nesta pesquisa. Além disso, o estudo ultraestrutural dos espermatozoides de *B. vermelha* constituiu uma rica fonte de informação, fornecendo características complementares sobre o gameta masculino da espécie.

5. Conclusão

As informações contidas neste estudo são as primeiras relacionadas ao sêmen e espermatozoides de *B. vermelha*, e poderão ser referência para futuros estudos, embasando especialmente pesquisas que adotem biotécnicas, como a criopreservação e androgênese, nas quais o conhecimento dos aspectos básicos do gameta masculino se torna imprescindível.

6. Agradecimentos

Esta pesquisa foi conduzida com a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (017011/10), estando de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação. Este estudo recebeu o apoio financeiro da FAPESP (2010/12108-2) na forma de Bolsa de Doutorado e do CNPq (483995/2011-8). Os autores são gratos aos funcionários do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - CEPTA/ICMBio, pela oportunidade em coletar amostras de sêmen de *Brycon vermelha*, e à equipe do Laboratório de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP/USP), especialmente à Maria Dolores Seabra Ferreira e José Augusto Maulin, pelo processamento das amostras e captura das imagens, respectivamente.

7. Referências

ANDRADE-TALMELLI, E.F.; KAVAMOTO, E.T.; FENERICH-VERANI, N. Características seminais da piabanha, *Brycon insignis* (Steindachner, 1876), após estimulação hormonal. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.27, p.149-154, 2001.

BACCETTI, B. Comparative Spermatology. Academic Press, New York, p.169-182, 1970.

BILLARD, R. Spermiogenesis in the rainbow trout (*Salmo gairdenerii*). **Cell Tissue Research**, v.233, p.265-284, 1983.

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

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL - CBRA. **Manual para exames andrológicos e avaliação de sêmen animal**. 2.ed. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1998. 49p.

CRUZ-LANDIM, C.; ABDALLA, F.C.; CRUZ-HOFLING, M.A. Morphological study of the spermatogenesis in the teleost *Piaractus mesopotamicus*. **Biocell,** v.27, p.319-328, 2003.

FELIZARDO, V.O.; MURGAS, L.D.S.; DRUMOND, M.M.; SILVA, J.A. Dose inseminante utilizada na fertilização artificial de ovócitos de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). **Revista Ceres**, v.57, p.648-652, 2010.

FERREIRA, A.A.; NUÑER, A.P.O.; LUZ, R.K.; TATAJE, D.A.R., ESQUIVEL, J.R.; RESTREPO, J.B. Avaliação qualitativa e quantitativa do sêmen do Jundiá, *Rhamdia quelen*. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 27, p.57-60, 2001.

GODINHO, H.P. Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.31, p.351-360, 2007.

GRIER, H.J. Celular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. **American Zoologist**, v. 21, p.345-357, 1981.

GUSMÃO-POMPIANI, P. **Ultraestrutura da espermiogênese e dos espermatozóides de peixes da Ordem Characiformes, Família Characidae (Teleostei, Ostariophysi) uma abordagem filogenética.** 86f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Brasil, 2003.

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis In: **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção** / Eds. Angelo Barbosa Monteiro Machado, Gláucia Moreira Drummond, Adriano Pereira Paglia. - 1.ed. - Brasília, DF: MMA; Belo Horizonte, MG: Fundação Biodiversitas, v.2, 2008. 1420 p.

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

KAVAMOTO, E.T. **Efeito da ação hormonal sobre as características seminais do curimbatá, *Prochilodus scrofa* Steindachner**. 101f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária e Zootecnia). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1993.

LAHNSTEINER, F. Introduction to the special issue on Cryopreservation of gametes in aquatic species. **Aquaculture Research**, v.31, p.229, 2000.

LAHNSTEINER, F.; PATZNER, R.A. Sperm morphology and ultrastructure in fish. In: Alavi SMH, Cosson J, Coward K, Rafiee G, editors. **Fish spermatology**. Oxford: Alpha Science Ltd. p.1-61, 2007.

LEUNG, L.K.P. Principles of biological cryopreservation. In: Jamieson, G.M. (Ed.). **Fish evolution and systematics: evidence from spermatozoa**. Cambridge: University Press, p.231-244, 1991.

LIMA, F.C.T; CASTRO, R.M.C. *Brycon vermelha*, a new species of characid fish from the Rio Mucuri, a coastal river of eastern Brazil (Ostariophysi: Characiformes). **Ichthyological Exploration in Freshwater**, v.11, p.155-162. 2000.

LUZ, R.K.; FERREIRA, A.A.; REYNALTE, D.A.T.; ZANIBONI-FILHO, E. Avaliação qualitativa e quantitativa do sêmen de suruvi, *Steindachneridion scripta* (Pimelodidae), **Boletim do Instituto de Pesca**, v.27, p.39-42, 2001.

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**, v.260, p.298-306, 2006.

MATTEI, X. Spermatozoon ultrastructure and its systematic implications in fishes. **Canadian Journal of Zoology** v.69, p.3038-3055, 1991.

MATTEI, X. Spermiogenése compare dês Poisson. In: Baccetti, B. (Ed.) **Comparative spermatology**. New York: Academic Press, p.57-72, 1970.

MATTEI, X. The flagella apparatus of spermatozoa in fish. Ultrastructure and evolution. **Biology of the Cell**, v.63, p.151-158, 1988.

MELO, F.C.S.A.; GODINHO, H.P. A protocol for cryopreservation of spermatozoa of the fish, *Brycon orthotaenia*. **Animal Reproduction**, v.33, p.380-385, 2006.

MURGAS, L.D.S.; FELIZARDO, V.O.; FERREIRA, M.R.; ANDRADE, E.S.; VERAS G.C. Importância da avaliação dos parâmetros reprodutivos em peixes nativos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, p.186-191, 2011.

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

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**, v.49, p.651-659, 2006.

ORTIZ, R.J. **Características espermáticas na subfamília cichlinae (Perciformes: Cichlidae) e suas implicações filogenéticas.** 94f. Tese (Doutorado em Biologia Geral e Aplicada), Instituto de Biociências – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Brasil, 2012.

QUAGIO-GRASSIOTTO, I.; OLIVEIRA, C. A new type of spermiogenesis and spermatozoa ultrastructure in Pimelodidae with a comparative review on spermatozoa ultrastructure of the Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi). **Zoologischer Anzeiger**, v.247, p.55-66, 2008.

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 and Cell**, v.31, p.540-544, 1999.

ROUTRAY, P.; VERMA, D.K.; SARKAR, S.K.; SARANGI, N. Recent advances in carp seed production and milt cryopreservation. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.33, p.413-427, 2007.

SALISBURY, Y.G.W.; VANDERMARK, N.L. Fisiología de la reproducción e inseminación artificial de los bóvidos. Trad. D. José Maria Santiago Luque. Zaragoza, ACRIBIA, 707p., 1964.

SANCHES, E.A.; BOMBARDELLI, R.A.; BAGGIO, D.M.; SOUZA, B.E. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de dourado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.2091-2098, 2009.

SANCHES, E.A.; BOMBARDELLI, R.A.; BAGGIO, D.M.; SYKORA, R.M.; XAVIER, A.M.M. Características seminais do cascudo-preto (*Rhinelepis áspera*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.35, p.357-362, 2011.

SAPERAS, N.; RIBES, E.; BUESA, C.; GARCIA-HEGART, F.; CHIVA, M. Differences in chromatin condensation during spermiogenesis in two species of fish with distinct protamines. **Journal Experimental Zoology** v.265, p.185-194, 1993.

SHIMODA, E.; ANDRADE, D.R.; VIDAL JÚNIOR, M.V.; GODINHO, H.P.; YASUI, G.S. Determinação da razão ótima de espermatozoides por ovócito de piabanha *Brycon insignis* (Pisces - Characidae). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, p.877-882, 2007.

SILVA, J.M.A.; MURGAS, L.D.S.; FELIZARDO, V.O.; PEREIRA, G.J.M.; NAVARRO, R.D.; MELLO, R.A. Características seminais e índices reprodutivos de curimba (*Prochilodus lineatus*) em diferentes períodos reprodutivos. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.10, p.668-677, 2009.

SPADELLA, M.A. **Estudo filogenético na superfamília Loricarioidea (Teleostei: Siluriformes) com base na ultraestrutura dos espermatozoides**. 94f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, 2004.

SUQUET, M.C.; DREANNO, C.; DORANGE, G.; NORMANT, Y.; QUEMENER, L.; GAIGNON, J.L.; BILLARD, R. The ageing phenomenon of turbot spermatozoa: effects on morphology, motility and concentration, intracellular ATP content, fertilization, and storage capacities. **Journal Fish Biology**, v.52, p.31-41, 1998.

TOTH, G.P.; CIERESZKO, A.; CHRIST, S.A.; DOBROWSKI, K. Objective analysis of sperm motility in the lake sturgeon (Acipenser fulvescens): activation and inhibition conditions. **Aquaculture**, v.154, p.337-348, 1997.

TUSET, V.M.; TRIPPEL, E.A.; DE MONSERRAT, J. Sperm morphology and its influence on swimming speed in Atlantic cod. **Journal of Applied Ichthyology,** v.24, p.398-405, 2008.

VERÍSSIMO-SILVEIRA, R. GUSMÃO-POMPIANI, P.; VICENTINI, C.A.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I. Spermiogenesis and spermatozoa ultrastructure in *Salminus* and *Brycon*, two primitive genera in Characidae (Teleostei:Ostariophysi: Characiformes). **Acta Zoologica**, v.87, p.305-313, 2006.

VERÍSSIMO-SILVEIRA, R. **Ultraestrutura da espermiogênese e dos espermatozoides de peixes da subordem Characoidei (Teleostei, Characiformes): uma abordagem filogenética.** 131f. Tese. (Doutorado em Ciências Biológicas). Instituto de Biociências – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brasil, 2007.

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

ZAIDEN, S.F. **Morfologia gonadal e metabolismo energético da Piraputanga, *Brycon hilarii* (Cuvier e Valenciennes, 1849) (Pisces, Characidae), em cativeiro, durante o ciclo reprodutivo anual.** 152f. Tese (Doutorado em Aquicultura) Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura – Jaboticabal - Brasil, 2000.

CAPÍTULO II

Ultraestrutura dos espermatozoides de *Brycon orbignyanus* Valenciennes, 1849 (Characiformes, Characidae) durante o processo de criopreservação

Revista: Cryobiology (ISSN: 0011-2240)

Qualis Capes A2 (Zootecnia/Recursos Pesqueiros); Fator de impacto: 2,137

Resumo

O objetivo foi descrever as alterações ultraestruturais dos espermatozoides de *B. orbignyanus* que foram submetidos ao processo de criopreservação em nitrogênio líquido, utilizando-se como crioprotetores internos, a 10%, o dimetilsulfóxido (DMSO), metilglicol ou metanol, averiguando também o efeito do tempo de congelamento. Foi realizado um "pool" de sêmen proveniente de três reprodutores, o qual foi adicionado em cada solução crioprotetora, na proporção de 1:3 (1:3, v/v, sêmen:solução crioprotetora) e envasado em palhetas criogênicas de 0,5 mL. Estas palhetas foram alojadas em "racks" e congeladas em botijão de vapor de nitrogênio, por cinco horas, e mantidas em botijão de armazenamento com nitrogênio líquido, por períodos de um dia, um mês e um ano. Posteriormente, as palhetas foram descongeladas em banho-maria a 30,0ºC por 10 segundos. O exame ultraestrutural dos espermatozoides descongelados criopreservados nas três soluções, nos três tempos de armazenamento revelou a presença de alterações no espermatozoide, variando desde pequenas injúrias nas diferentes partes da célula até a destruição total do espermatozoide. A solução contendo DMSO diminuiu as crioinjúrias quando comparada às soluções contendo metilglicol e metanol. Em relação à duração do armazenamento, 1 dia e 1 mês de armazenamento causaram alterações ultraestruturais semelhantes, mas as crioinjúrias aumentaram após 1 ano de armazenamento. As alterações descritas foram nas regiões da cabeça (membrana nuclear e núcleo) e peça intermediária, e essas lesões afetaram significativamente a motilidade espermática e as subsequentes taxas de fertilização e eclosão.

Palavras-chave: *Brycon orbignyanus*; Crioinjúrias; Criopreservação; Espermatozoide; Ultraestrutura.

1. Introdução

Brycon orbignyanus, popularmente conhecida por piracanjuba (**Anexo 2A**), encontra-se no Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção, segundo o IBAMA (In MMA 05/04, 2008), inserida na categoria "em perigo" (NA), ou seja, sofre risco muito alto de extinção em um futuro próximo. Ainda de acordo com o IBAMA, a piracanjuba encontra-se ameaçada por uma combinação de quatro fatores: destruição das matas ciliares, represamentos, poluição e introdução de outras espécies.

Diante deste quadro, a busca por técnicas cada vez mais apuradas de preservação de sêmen de peixes vem de encontro às questões econômicas e ecológicas atuais (MARQUES e GODINHO, 2004), visto que tais técnicas possuem relativa simplicidade e baixo custo de implantação e manutenção, além de se tornarem uma poderosa ferramenta de conservação, especialmente quando se observa a numerosa quantidade de espécies com alto risco de extinção (VIVEIROS e GODINHO, 2009).

Segundo Billard (1992), a criopreservação é uma técnica que permite a manutenção da viabilidade celular por tempo indeterminado, preservando assim os recursos genéticos de espécies de interesse econômico ou ameaçadas de extinção. A constatação da eficácia da técnica tem sido avaliada, em muitos casos, somente em termos de motilidade espermática pós-descongelamento, mas a capacidade de fertilização é um dos parâmetros importantes a ser registrado, assim como as investigações das alterações morfológicas da estrutura dos espermatozoides (RURANGWA et al. 2004; VIVEIROS et al. 2009).

Em trabalhos com sêmen com *B. orbignyanus*, o tratamento que obteve resultados mais expressivos para o congelamento de sêmen foi o crioprotetor interno dimetilsulfóxido (DMSO) a 10% juntamente com gema de ovo e glicose como crioprotetores externos (BEDORE, 1999; CAROLSFELD et al. 2003; MURGAS et al. 2001, MURGAS et al. 2003; GALO et al. 2011). No entanto, pesquisas apontam que o crioprotetor interno de maior sucesso para piracanjuba é o metilglicol a 10%, com adição de gema de ovo e cloreto de sódio (NaCl) (MARIA et al. 2006a, 2006b). Já Felizardo, em 2008, concluiu que soluções contendo DMSO ou metanol (8%) como crioprotetores internos, e gema de ovo ou lactose como crioprotetores externos seriam os mais indicados para o congelamento de sêmen da espécie. De acordo com estas pesquisas, têm sido alcançados bons resultados após o descongelamento do sêmen, com a motilidade pós-descongelamento acima de 50%.

É preciso enfatizar que espermatozoides inférteis podem apresentar algum tipo de motilidade, como registrado por Billard et al. (1995). Dessa forma, faz-se necessária a análise de outras variáveis, como taxas de fertilização e eclosão, além da verificação das injúrias causadas pela técnica de criopreservação, para que se possa confirmar a eficiência da mesma.

Segundo McClean et al. (2007), uma abordagem para investigar as razões para o insucesso da criopreservação seria analisar o efeito da criopreservação por meio da ultraestrutura dos espermatozoides e documentar a crioinjúria resultante no interior da célula. Esse tipo de investigação tem sido usado em mamíferos, revelando mudanças ultraestruturais significativas após a criopreservação dos espermatozoides, principalmente na membrana plasmática, acrossoma e mitocôndrias.

Em peixes, foram encontrados na literatura registros de estudos utilizando a ultraestrutura dos espermatozoides para averiguar os efeitos da criopreservação em truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss* (BILLARD, 1983), "atlantic croaker", *Micropogonias undulatus* (GWO e ARNOLD, 1992), "grayling", *Thymallus thymallus* (LAHNSTEINER et al. 1992), truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*e truta-marrom, *Salmo trutta F. fario* (DROKIN et al. 1998), "rohu", *Labeo rohita* (GOPALAKRISHNAN et al. 2000), "cetti", *Diplodus puntazzo* (TADDEI et al. 2001).

Estes estudos demonstraram que a diluição do sêmen em criodiluentes, a congelação e subsequente descongelação causaram mudanças estruturais dos espermatozoides, tais como deformação do núcleo, danos na peça intermediária, ruptura de membranas. Segundo Gwo e Arnold (1992) estas crioinjúrias resultam em motilidade reduzida, prejudicando a fertilização. Taddei et al. (2001) sugeriram que as anomalias ultraestruturais devem ser investigadas para compreender os danos causados aos espermatozoides que foram submetidos ao processo de criopreservação.

O presente trabalho teve por objetivo descrever as alterações ultraestruturais dos espermatozoides de *B. orbignyanus* que foram submetidos ao processo de criopreservação, utilizando-se crioprotetores internos considerados eficazes, segundo a literatura, averiguando também o efeito do tempo de permanência de congelamento sobre os espermatozoides. Vale ressaltar que não foram encontrados na literatura registros de análises ultraestruturais de sêmen pós-descongelado envolvendo espécies de peixes nativos do Brasil.

2. Material e Métodos

2.1. Preparação dos experimentos

Os experimentos foram conduzidos nas dependências do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - CEPTA/ICMBio, Pirassununga, Estado de São Paulo (SP) (**Anexo 2B**), e na Estação de Pesquisa e Desenvolvimento Ambiental de Volta Grande - CEMIG, Conceição das Alagoas, Estado de Minas Gerais (MG) (**Anexo 2C**), ambas no Brasil, entre os meses de Outubro de 2011 e Dezembro de 2012. Os estudos em microscopia eletrônica ocorreram no Laboratório de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Medicina, Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FMRP/USP), SP, Brasil.

Coleta de sêmen

No total, 24 reprodutores maduros morfologicamente, ou seja, que liberavam sêmen sob leve pressão da papila urogenital, foram utilizados para as coletas. Os machos pertencentes ao CEPTA/ICMBio não receberam tratamento hormonal, enquanto os machos pertencentes à CEMIG foram induzidos com uma injeção de solução de macerado de hipófise de *Clarias gariepinus* ("catfish"), na dosagem de 4,0 $mg.Kg^{-1}$ de peso vivo, de acordo com a rotina do local.

Os machos que receberam o tratamento hormonal foram acondicionados em caixas e, após aproximadamente seis horas, foram imediatamente retirados de suas caixas e transferidos para recipientes contendo solução anestésica de mentol (marca Êxodo Científica - concentração de 100 a 200 $mg.L^{-1}$, de acordo com o comportamento do peixe, até que atingisse o estágio profundo de anestesia), visando minimizar os efeitos do estresse durante o manejo, garantindo o bem-estar animal. Após anestesia, os peixes foram submetidos à massagem abdominal, no sentido céfalo-caudal, para coleta do sêmen. Os reprodutores foram manipulados com precaução, para que não houvesse o contato do sêmen com urina, sangue ou água do tanque, circunstâncias que poderiam ativar o sêmen. O sêmen foi coletado em tubo de ensaio graduado (**Anexo 2D**).

Efeito da exposição do sêmen sobre os crioprotetores

Previamente à coleta de sêmen que daria origem ao "pool" de sêmen para a realização dos experimentos, foi avaliado o efeito dos crioprotetores selecionados para o processo de criopreservação sobre o sêmen de *B. orbignyanus*. Cada uma das três

soluções crioprotetoras foram preparadas e homogeneizadas ao sêmen de um macho de *B. orbignyanus* coletado para esta finalidade. As três amostras foram mantidas em repouso por dez minutos, à temperatura ambiente e protegidas da luz. Decorrido este período, estas amostras foram ativadas com uma gota de água destilada para verificação da motilidade espermática.

Avaliação do sêmen

Imediatamente após a coleta de sêmen, foram observadas as seguintes características: Volume individual (mL), realizando-se a massagem na região abdominal para coleta do sêmen foi realizada até que houvesse redução na liberação, evitando-se qualquer sinal de sangramento; Cor do líquido seminal; Qualidade do sêmen para criopreservação: uma pequena gota de sêmen de cada alíquota coletada era observada ao microscópio de luz para verificar a imobilidade dos espermatozoides. As alíquotas cujos espermatozoides encontravam-se imóveis eram ativadas com uma gota de água destilada para se observar a taxa de motilidade espermática. Apenas amostras com motilidade igual ou superior a 80% foram utilizadas nos experimentos para formação de uma amostra composta por "pool" de sêmen. Para cada "pool" foi utilizado sêmen de três machos, sendo que cada macho participou com volume igual de sêmen. Em seguida, realizou-se a etapa de diluição, envasamento e criopreservação do sêmen.

Após a conclusão desta etapa, deu-se continuidade ao processo de avaliação do sêmen, sendo aferidas a duração da motilidade e a concentração espermática, baseados nos seguintes procedimentos:

Motilidade espermática - empregou-se o método subjetivo expresso em porcentagem (0 a 100%); solução não ativadora de NaCl 1,2% como diluidor seminal (SHIMODA et al. 2007). Em um microtubo do tipo "eppendorf", colocou-se 450,0 µL de NaCl 1,2% adicionando-se 50,0 µL de sêmen fresco, gerando uma proporção de 1:9 (diluição de 10x). Posteriormente, retirou-se 1 µL desta solução diluída, colocando-a sobre uma lâmina de vidro (previamente limpa com solução 1:1 de éter: álcool) a qual foi observada ao microscópio de luz (objetiva de 10x) previamente focalizado. Adicionou-se, logo em seguida, 29,0 µL de água destilada para iniciar a ativação dos espermatozoides, homogeneizando-se vigorosamente com a pipeta e, neste mesmo momento, foi acionado o cronômetro para contagem do tempo de motilidade (sendo registrado o tempo em que apenas 10% dos espermatozoides estavam móveis), e estimada a taxa de espermatozoides móveis presentes na amostra observada. A porcentagem de

motilidade foi avaliada conforme a quantidade de espermatozoides que apresentaram qualquer tipo de movimento (progressivo ou vibratório). Foram realizadas três repetições para cada macho analisado.

Concentração espermática - utilizou-se uma solução fixadora de sêmen composta por 5,0% de $NaHCO_3$ e 1,0% de formalina em água destilada. A diluição do sêmen na solução foi realizada na proporção 1:2000 (sêmen: solução fixadora). Feito isso, foi retirado um pequeno volume deste sêmen diluído e aplicado por capilaridade nos campos de contagem da câmara de Neubauer. Aguardaram-se cerca de cinco minutos, tempo suficiente para visualizar os espermatozoides assentados no campo de contagem, quando então foi realizada a contagem, em microscópio com objetiva de 10x. Os dois campos da câmara de Neubauer foram utilizados na contagem, sendo que dos 50 retículos presentes, foram contados apenas dez, cinco em um campo e cinco no outro. Foram realizadas três repetições para cada macho analisado.

Diluição, envasamento e criopreservação

Foram utilizadas três soluções crioprotetoras. É importante ressaltar que foram utilizados crioprotetores internos considerados satisfatórios para a criopreservação de sêmen de *B. orbignyanus*, mas os protocolos foram modificados. Sendo assim, foram preparadas as seguintes soluções:

Solução 1: Dimetilsulfóxido (DMSO) (10,0%) + gema de ovo de galinha (6,5%) + glicose (10,0%); Solução 2: Metanol (10,0%) + gema de ovo de galinha (6,5%) + glicose (10,0%); Solução 3: Metilglicol (10,0%) + gema de ovo de galinha (6,5%) + glicose (10,0%).

O crioprotetor DMSO utilizado era da marca Dinâmica Química Contemporânea Ltda. (Diadema, São Paulo, Brasil). Os crioprotetores Glicose e Metilglicol pertenciam à marca Vetec Química Fina Ltda. (Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil), enquanto o Metanol era da Merck KGaA (Darmstadt, Hessen, Alemanha).

As soluções crioprotetoras foram preparadas com uma hora de antecedência da diluição (previamente à coleta de sêmen) para que houvesse a estabilização dos crioprotetores e término das reações exotérmicas prejudiciais às células espermáticas. O "pool" de sêmen foi adicionado em cada solução crioprotetora (tratamento) na proporção de 1:3 (1:3, v/v, sêmen:solução crioprotetora) e, posteriormente, por aspiração, envasado em palhetas de 0,5 mL. Imediatamente após o envasamento, as palhetas foram alojadas em "racks" e armazenadas em botijão de vapor de nitrogênio (Botijão *Dry Shipper* Marca

CRYOFARM, Modelo YDH 8, Savigliano Cuneo, Itália) por um período de cinco horas, de acordo com a rotina experimental.

Decorrido este tempo, as "racks" contendo as palhetas foram transferidas para o botijão de armazenamento com nitrogênio líquido (Botijão Marca CRYOFARM, Modelo YDS 10, Savigliano Cuneo, Itália), onde permaneceram por um dia, um mês e um ano.

Após este tempo, as palhetas foram descongeladas a 30,0ºC por 10 segundos. Imediatamente após o descongelamento, o conteúdo da palheta foi utilizado para a fertilização dos ovócitos e, logo após esta etapa, a qualidade do sêmen foi verificada medindo-se a taxa e duração da motilidade espermática, empregando-se os mesmos procedimentos descritos para o sêmen fresco.

O experimento foi arranjado num Delineamento em Blocos Casualizados (DBC) com três soluções crioprotetoras (DMSO, Metilglicol e Metanol) em três diferentes tempos de armazenamento (1 dia, 1 mês e 1 ano) além de um tratamento controle (sêmen fresco). No total, foram realizados dois experimentos (duas Coletas), nos quais cada tratamento teve três repetições. Vale destacar que um "pool" de sêmen oriundo de três machos deu origem à Coleta 1, e um outro "pool" de sêmen de três machos originou a Coleta 2 (**Anexo 3**).

Coleta de ovócitos

Dezoito fêmeas maduras, morfologicamente aptas para a reprodução (abdômen arredondado, papila urogenital avermelhada e coloração e tamanho dos ovócitos uniformes) foram selecionadas para receberem o tratamento hormonal. O tipo de hormônio e dosagem utilizada variou de acordo com a rotina do local dos experimentos. As fêmeas pertencentes ao CEPTA/ICMBio foram induzidas com injeção de solução de Ovopel® (D-Ala, Pro-Net-mGnRH, Unic-trade, Hungary) em duas aplicações, com intervalo de 12 horas, nas doses de 0,5 mg e 5,0 $mg.Kg^{-1}$ de peso vivo, respectivamente. Já as fêmeas pertencentes à CEMIG foram induzidas com injeção de solução de macerado de hipófise de *Clarias gariepinus* ("catfish") em duas aplicações, com intervalo de 12 horas, nas doses de 0,5 mg e 4,0 $mg.Kg^{-1}$ de peso vivo, respectivamente.

Seis horas após a segunda dose, as fêmeas foram retiradas de suas caixas e transferidas para recipientes contendo solução anestésica de mentol (marca Êxodo Científica - concentração de 100 a 200 $mg.L^{-1}$, de acordo com o comportamento do peixe, até que atingisse o estágio profundo de anestesia), visando minimizar os efeitos do

estresse durante o manejo, garantindo o bem-estar animal. Após anestesia, as fêmeas foram submetidas à massagem abdominal, no sentido céfalo-caudal, para extrusão dos ovócitos em recipientes plásticos.

Para cada experimento (em cada um dos tempos de congelamento estudados) foram utilizadas 3 fêmeas para constituir o "pool" de ovócitos para posterior fertilização (**Anexo 3**). Com o propósito de se obter a relação espermatozoides:ovócito utilizada na fertilização, foi feita a contagem do número de ovócitos existente em 1,0 g de ovócitos de cada fêmea. Esta relação foi feita levando-se em consideração apenas as taxas de motilidade pré-congelamento, para cada uma das Coletas.

É importante destacar que a escolha em se trabalhar com "pool" (tanto de sêmen quanto de ovócitos) foi com o propósito de se amenizar as características individuais (qualidade dos gametas) de cada reprodutor.

Fertilização

A fertilização foi realizada pelo método "a seco", adicionando-se sêmen aos ovócitos, sendo realizadas fertilizações com sêmen fresco (considerado grupo controle) e com sêmen pós-descongelado oriundo das amostras criopreservadas nas três soluções, sendo realizadas três fertilizações para cada tratamento, e também para o controle (utilização de três incubadoras por tratamento e para o controle) (**Anexo 3**). Para se proceder à fertilização, utilizou-se o total de ovócitos contido em uma colher de plástico (peso aproximado de 5 g de ovócitos), sendo a medida padrão utilizada para os tratamentos, inclusive o controle. Os ovócitos foram armazenados em copos plásticos (**Anexo 4A**).

Imediatamente após o descongelamento das palhetas, as mesmas foram secas com papel toalha, as duas extremidades cortadas com auxílio de uma tesoura e o conteúdo recolhido em um copo plástico contendo os ovócitos (**Anexo 4B**). Cada palheta (volume total 0,5 mL) continha 0,125 mL de sêmen. Para se proceder à fertilização, utilizou-se o conteúdo existente em duas palhetas (total 0,250 mL de sêmen) e 5 g de ovócitos.

Cada grama de ovócitos continha cerca de 1.254,9 ± 293,5 ovócitos. Levando-se em consideração o porcentual de espermatozoides móveis pré-congelamento (Tabela 1 - sem considerar os efeitos da criopreservação sobre a motilidade espermática), pode-se inferir que a relação espermatozoides:ovócito para a Coleta 1 foi de $1{,}4 \times 10^6$ espermatozoides.ovócito^{-1}. Da mesma forma, a relação existente para a Coleta 2 foi de $1{,}8 \times 10^6$ espermatozoides.ovócito^{-1}.

Logo em seguida, foram adicionados 20,0 mL de água do tanque para ativação dos espermatozoides e hidratação dos ovos, quando então foram transportados para incubadoras. Houve a aclimatação dos ovos antes de introduzi-los nas incubadoras. Esta aclimatação ocorreu imergindo-se parcialmente o copo contendo os ovos na caixa com água onde se encontravam as incubadoras, deixando-os por cerca de sete minutos, para somente depois inserir os ovos nas incubadoras. Durante este tempo, houve o cuidado de se realizar leves movimentos giratórios com os copos. É importante ressaltar que o sêmen fresco utilizado para a fertilização do grupo controle foi diluído em NaCl a 1,2% (proporção de 1:3) para que atingisse a mesma diluição do sêmen presente nas palhetas, sendo utilizado também o mesmo volume de sêmen (0,250 mL) referente a duas palhetas.

Para a incubação dos ovos em pequena quantidade foram confeccionadas incubadoras flutuantes com material policloreto de vinila (PVC), com fundo de tela e volume total de 700 mL (**Anexo 4C**). Foram utilizadas três incubadoras para cada tratamento, inclusive o tratamento controle (**Anexo 3**), sendo cada incubadora considerada uma repetição. Estas incubadoras foram acondicionadas em caixas de água de 1.000 litros de capacidade, com sistema de circulação de água constante e aeração (**Anexo 4D**). Foram monitorados temperatura e oxigênio dissolvido da água das incubadoras, utilizando o aparelho YSI® modelo 550A.

Taxa de fertilização (%)

A taxa de fertilização foi calculada após o fechamento do blastóporo, em estereomicroscópio, com amostragens individuais em cada uma das três incubadoras, por tratamento. Em um tudo de ensaio graduado, foram coletados, aleatoriamente, o conteúdo de ovos existente em 3,0 mL (descartando a água) e observados em estereomicroscópio. Aplicou-se então a seguinte fórmula: Taxa de fertilização = 100 X (número de embriões viáveis / total da amostra).

Taxa de eclosão (%)

A estimativa da taxa de eclosão das larvas foi calculada, em estereomicroscópio, com amostragens individuais em cada uma das três incubadoras, por tratamento. Em um tubo de ensaio graduado, foram coletadas, aleatoriamente, o conteúdo de larvas existente em 3,0 mL (descartando a água) e observadas em estereomicroscópio, aplicando-se a seguinte fórmula: Taxa de eclosão = 100 X (número de total larvas eclodidas (normais e anormais) / total da amostra).

2.2. Processamento das amostras

Para cada tratamento, nos diferentes tempos de congelamento, cerca de 50 espermatozoides foram investigados nos estudos de microscopia eletrônica. As palhetas foram descongeladas (a 30,0ºC por 10 segundos) para fixação do sêmen em solução de Karnovsky modificada (glutaraldeído a 2,5% e paraformaldeído a 2,5%), por 24 horas, lavadas e conservadas em tampão Cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,4, à temperatura de aproximadamente 4,0ºC, em geladeira, para posterior análise em microscopia eletrônica.

Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

O sêmen foi ressuspenso em ágar a 2%, formando um bloco. Este bloco foi então pós-fixado em solução de tetróxido de ósmio a 1% por duas horas e lavado em tampão fosfato. A desidratação ocorreu em série com concentrações crescentes de acetona (30%, 50%, 70%, 80%, 90% 95%) por 10 minutos cada e em acetona 100%, três vezes, por 20 minutos cada. A pré-infiltração foi feita com resina araldite e acetona 100% (proporção 1:1) permanecendo "overnight" A infiltração ocorreu em resina pura por duas horas, à temperatura de 40,0ºC, e a inclusão e polimerização foram feitas em resina por 72 horas, à temperatura de 60,0ºC. O bloco foi aparado, sendo realizados cortes semifinos (0,5 µm de espessura) em ultramicrótomo com lâmina de vidro e corados com Azul de Toluidina a 1%. Os melhores cortes foram selecionados para a realização dos cortes ultrafinos com navalha de diamante a 70 nm de espessura, em seguida contrastados em acetato de uranila e citrato de chumbo e observados e eletronmicrografados em microscópio eletrônico de transmissão (marca JEOL, modelo JEM-100 CX II, Tokyo, Japan).

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Uma gota de sêmen foi colocada em lamínula de vidro estéril e previamente tratada com Biobond® (Electron Microscopy Science), e mantida à temperatura ambiente por 20 minutos para aderência das células. Posteriormente, foi pós-fixada em solução de tetróxido de ósmio a 1% por duas horas à aproximadamente 4,0ºC, em geladeira, e lavada em tampão fosfato. Em seguida, a amostra foi desidratada em concentrações crescentes de etanol (30%, 50%, 70%, 80%, 90% 95%) por 10 minutos cada e em etanol 100%, três vezes, por 20 minutos cada. Feito isso, foi então levada à Secadora de Ponto Crítico com CO_2 líquido (marca BAL-TEC, modelo CPD 030, Oberland, Principality of Liechtenstein), montada em suporte de cobre, metalizada com ouro (Metalizadora marca

BAL-TEC, modelo SCD 050, Oberland, Principality of Liechtenstein) e eletronmicrografadas em microscópio eletrônico de varredura (marca JEOL, modelo JSM-6610LV, Tokyo, Japan).

2.3. Análise estatística

Os dados foram expressos como Média ± Erro Padrão. Os valores foram submetidos ao teste de normalidade (Lilliefors; α=5%) e transformados pelo arco seno da raiz quadrada do valor.

Os valores do parâmetro taxa de fertilização foram submetidos à análise de variância ANOVA e, havendo diferença significativa entre médias (entre os tratamentos), estas foram comparadas entre si pelo teste paramétrico de Tukey (α=5%). Os valores dos parâmetros taxa e duração de motilidade e taxa de eclosão (entre os tratamentos) foram comparados pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis (α=5%).

O efeito do tempo (1 dia, 1 mês e 1 ano) sobre a taxa e duração da motilidade e taxas de fertilização e eclosão, para cada tratamento (exceto para o controle das taxas de fertilização e eclosão), foi avaliado pelo teste não-paramétrico de Friedman (α=5%), e os valores do grupo controle (taxas de fertilização e eclosão) foram comparados pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis (α=5%). O software empregado foi o STATISTICA v.7.0 (StatSoft).

3. Resultados

3.1. Efeito da exposição do sêmen sobre os crioprotetores

A exposição do sêmen de *B. orbignyanus* às soluções crioprotetoras utilizadas foram satisfatórios, pois após serem deixadas em repouso por dez minutos, as amostras de sêmen + solução crioprotetora foram ativadas com uma gota de água destilada, podendo-se observar que os espermatozoides encontravam-se móveis, comprovando que a exposição do sêmen às soluções não comprometeu a motilidade dos espermatozoides.

3.2. Avaliação do sêmen pré-congelamento

O sêmen de *B. orbignyanus* apresentou coloração branca e consistência leitosa. O peso corporal médio dos reprodutores utilizados para a coleta 1 foi de 1.046,00 ± 55,10 g, e dos reprodutores utilizados para a coleta 2 foi de 1.000,00 ± 91,70 g. As informações a respeito dos parâmetros seminais dos reprodutores utilizados para as duas coletas encontram-se sumarizadas na **Tabela 1**.

Tabela 1. Características seminais dos reprodutores de *Brycon orbignyanus* utilizados nas Coletas 1 e 2.

Características	**Coleta 1**	**Coleta 2**
Volume sêmen por quilograma peixe (mL.Kg^{-1})	9,80 ± 1,20	9,80 ± 0,90
Concentração (sptz/mL)	4,21 ± 0,23x10^{10}	5,14 ± 0,92x10^{10}
*Motilidade (%)	88,33 ± 2,89	90,00 ± 5,00
*Duração motilidade (10% móveis) (s)	26,74 ± 1,33	27,82 ± 4,55

Dados expressos em média ± erro padrão (N=3;*N=9).

3.3. Efeito da criopreservação sobre os espermatozoides

3.3.1. Efeitos sobre a taxa e tempo de motilidade espermática

A motilidade do sêmen descongelado de *B. orbignyanus*, dos tratamentos, nos três tempos de armazenamento estudados, obteve médias reduzidas em relação ao sêmen fresco (grupo controle), o qual se apresentou sempre superior (P<0,05), com média de 89,17 ± 3,16% (**Tabela 2**).

A solução contendo DMSO, estatisticamente (P>0,05), mostrou-se semelhante ao controle e aos demais tratamentos (metilglicol e metanol), em 1 dia e 1 mês de congelamento. Com 1 ano de congelamento, porém, a solução com DMSO apresentou-se semelhante ao controle e à solução contendo metilglicol (P>0,05), enquanto que a solução contendo metanol mostrou o menor valor, sendo inferior e estatisticamente semelhante ao metilglicol (P<0,05) (**Tabela 2**).

Levando-se em consideração cada tratamento por tempo de congelamento, não se verificou nenhuma diferença estatística (P>0,05), permanecendo as taxas de motilidade espermática estatisticamente iguais ao longo do tempo (**Tabela 2**).

O tempo de duração da motilidade do sêmen de *B. orbignyanus*, quando descongelado, também foi inferior (P<0,05) quando comparado ao tempo de duração registrada para sêmen fresco, cuja média foi de 27,28 ± 3,05 segundos, valor sempre superior aos demais (**Tabela 3**).

A solução contendo DMSO apresentou assemelhou-se estatisticamente (P>0,05) ao controle e aos demais tratamentos (metilglicol e metanol), em 1 dia e 1 mês de congelamento. As soluções contendo metilglicol e metanol apresentaram os menores resultados (P<0,05). Da mesma forma como para taxa de motilidade, com 1 ano de congelamento, porém, o DMSO apresentou-se semelhante ao controle e à solução contendo metilglicol (P>0,05), e a solução contendo metanol mostrou o menor valor, estando inferior e estatisticamente semelhante ao metilglicol (P<0,05) (**Tabela 3**).

Em se tratando de cada tratamento por tempo de congelamento, não se registrou nenhuma diferença estatística (P>0,05), ou seja, o tempo de duração da motilidade espermática permaneceu igual, estatisticamente, ao longo do tempo (**Tabela 3**).

Analisando-se estatisticamente e verificando as **Tabelas 2 e 3**, pode-se perceber que houve um comportamento semelhante entre a taxa e o tempo de duração da motilidade espermática de *B. orbignyanus*, tanto dentro dos blocos avaliados (tempos de congelamento), como para cada tratamento individualmente ao longo do tempo.

Tabela 2. Motilidade espermática de *B. orbignyanus* nos tratamentos em cada tempo de congelamento (coluna), e por tratamento ao longo do tempo (linha).

	1 dia	**1 mês**	**1 ano**
DMSO	$40,00 \pm 7,07^{ABa}$	$8,00 \pm 10,95^{ABa}$	$50,00 \pm 43,82^{ABa}$
Metilglicol	$4,00 \pm 5,48^{Ba}$	0 ± 0^{Ba}	$2,50 \pm 2,74^{CBa}$
Metanol	$2,50 \pm 5,00^{Ba}$	0 ± 0^{Ba}	0 ± 0^{Ca}
Fresco	$89,17 \pm 3,16^{Aa}$	$89,17 \pm 3,16^{Aa}$	$89,17 \pm 3,16^{Aa}$

Letras maiúsculas idênticas em coluna denotam diferenças não significativas pelo Teste de Kruskal-Wallis (P>0,05) e letras minúsculas idênticas em linha denotam diferenças não significativas pelo Teste de Friedman (P>0,05). Dados expressos em média ± erro padrão; N=6.

Tabela 3. Duração da motilidade espermática de *B. orbignyanus* nos tratamentos em cada tempo de congelamento (coluna), e por tratamento ao longo do tempo (linha).

	1 dia	**1 mês**	**1 ano**
DMSO	$20,64 \pm 2,37^{ABa}$	$7,38 \pm 10,21^{ABa}$	$19,81 \pm 5,94^{ABa}$
Metilglicol	$7,65 \pm 10,48^{Ba}$	0 ± 0^{Ba}	$8,81 \pm 9,87^{CBa}$
Metanol	$5,32 \pm 10,64^{Ba}$	0 ± 0^{Ba}	0 ± 0^{Ca}
Fresco	$27,28 \pm 3,05^{Aa}$	$27,28 \pm 3,05^{Aa}$	$27,28 \pm 3,05^{Aa}$

Letras maiúsculas idênticas em coluna denotam diferenças não significativas pelo Teste de Kruskal-Wallis (P>0,05) e letras minúsculas idênticas em linha denotam diferenças não significativas pelo Teste de Friedman (P>0,05). Dados expressos em média ± erro padrão; N=6.

3.3.2. Efeitos sobre as taxas de fertilização e eclosão larval

Os valores obtidos para temperatura e oxigênio dissolvido na água das incubadoras experimentais onde embriões/larvas de *B. orbignyanus* permaneceram até a eclosão, do CEPTA/ICMBio e da CEMIG, durante as coletas, encontram-se na **Tabela 4**.

Tabela 4. Temperatura e oxigênio dissolvido na água das incubadoras no CEPTA/ICMBio e na CEMIG.

	Temperatura (ºC)	**Oxigênio dissolvido (mg.L^{-1})**
CEPTA/ICMBio	25,69 ± 0,92	6,48 ± 1,38
CEMIG	25,70 ± 0,22	7,35 ± 0,54

Dados expressos em média ± erro padrão; N=7.

Em relação à taxa de fertilização, o grupo controle mostrou-se superior (P<0,05) aos demais tratamentos nos três tempos de congelamento considerados, sendo que, as três soluções (DMSO, metilglicol e metanol) apresentaram-se estatisticamente iguais (*P*>0,05) (**Tabela 5**).

Observando-se o efeito do tempo de congelamento para cada tratamento, não houve, estatisticamente (*P*>0,05), diferenças nas taxas de fertilizações ao longo do tempo (**Tabela 5**).

A taxa de eclosão no tempo 1 dia de congelamento foi igual (*P*>0,05) para os tratamentos (DMSO, metilglicol, metanol e grupo controle), sendo que os assumiram valores zero (**Tabela 6**). No tempo 1 mês de congelamento, o grupo controle foi superior aos demais (*P*<0,05). A solução contendo DMSO apresentou valor estatisticamente semelhante (*P*<0,05) ao controle e aos demais tratamentos (metilglicol e metanol). Estas duas soluções, por sua vez, mostraram os menores valores, sendo estatisticamente inferiores aos demais tratamentos (*P*<0,05) (**Tabela 6**).

Com 1 ano de congelamento, não houve o registro do valor da taxa de eclosão do grupo controle, impossibilitando a comparação com os demais tratamentos, os quais, por sua vez, mostraram-se iguais (*P*<0,05), assumindo valores iguais a zero (**Tabela 6**).

Analisando-se os tratamentos ao longo do tempo de congelamento, a solução contendo metilglicol diferiu no tempo 1 mês de congelamento (*P*<0,05), sendo que para 1 dia e 1 ano de congelamento os valores encontrados foram estatisticamente iguais (*P*<0,05). Da mesma forma, o grupo controle no tempo 1 mês de congelamento assumiu o maior valor (*P*<0,05) diferindo dos demais tempos de estudo, 1 dia e 1 ano, que, por sua vez, também foram iguais estatisticamente (*P*<0,05).

Verificando-se os valores e a análise estatística apresentada para os valores das taxas de fertilização e eclosão, diferente do que ocorre para taxa e tempo de duração da motilidade espermática, não se observa um comportamento semelhante para estas duas variáveis. Ou seja, houve o registro de valores consideráveis para taxa de fertilização, mostrando que havia embriões em desenvolvimento oriundos da fertilização realizada

com sêmen criopreservado em todas as soluções (exceto para solução contendo metanol em 1 dia e 1 ano).

Porém, quando se observa as taxas de eclosão em 1 dia e 1 ano, percebe-se que o desenvolvimento destes embriões não progrediu, uma vez que os valores assumidos foram iguais a zero. Para 1 mês de congelamento, por sua vez, percebe-se que do porcentual registrado para taxa de fertilização, para todos os tratamentos, apenas uma pequena porcentagem atingiu a eclosão.

Tabela 5. Taxa de fertilização de *B. orbignyanus* nos tratamentos em cada tempo de congelamento (coluna), e por tratamento ao longo do tempo (linha).

	1 dia	**1 mês**	**1 ano**
DMSO	$0,18 \pm 0,45^{Ba}$	$5,73 \pm 1,80^{Ba}$	$3,20 \pm 4,72^{Ba}$
Metilglicol	$0,11 \pm 0,27^{Ba}$	$1,37 \pm 0,89^{Ba}$	$3,95 \pm 9,38^{Ba}$
Metanol	0 ± 0^{Ba}	$6,54 \pm 8,15^{Ba}$	0 ± 0^{Ba}
***Controle**	$9,43 \pm 7,96^{Aa}$	$78,14 \pm 13,94^{Aa}$	$37,19 \pm 37,73^{Aa}$

Letras maiúsculas idênticas em coluna denotam diferenças não significativas pelo Teste de Tukey (P<0,05) e letras minúsculas idênticas em linha denotam diferenças não significativas pelo Teste de Friedman (P<0,05). *Teste de Kruskal-Wallis (P<0,05). Dados expressos em média ± erro padrão; N=6.

Tabela 6. Taxa de eclosão de *B. orbignyanus* nos tratamentos em cada tempo de congelamento (coluna), e por tratamento ao longo do tempo (linha).

	1 dia	**1 mês**	**1 ano**
DMSO	0 ± 0^{Aa}	$15,99 \pm 12,66^{ABa}$	0 ± 0^{Aa}
Metilglicol	0 ± 0^{Aa}	$3,12 \pm 1,56^{Bb}$	0 ± 0^{Aa}
Metanol	0 ± 0^{Aa}	$9,45 \pm 12,97^{Ba}$	0 ± 0^{Aa}
***Controle**	0 ± 0^{Aa}	$52,42 \pm 28,52^{Ab}$	NC

Letras maiúsculas idênticas em coluna denotam diferenças não significativas pelo Teste de Kruskal-Wallis (P<0,05) e letras minúsculas idênticas em linha denotam diferenças não significativas pelo Teste de Friedman (P<0,05). *Teste de Kruskal-Wallis (P<0,05). Dados expressos em média ± erro padrão; N=6. NC: não coletado.

3.4.2. Efeitos sobre a ultraestrutura dos espermatozoides

Quando frescos, os espermatozoides de *B. orbignyanus* apresentaram as três partes (cabeça, peça intermediária e flagelo) bem delimitadas, observadas em MEV em secções longitudinais, visualizando-se o formato esférico da cabeça e a superfície lisa (**Figura 1A e 1B**).

Em MET, foi possível observar que o núcleo é rodeado por uma estreita faixa citoplasmática, sem presença de organelas (**Figura 1C**). Dentro do núcleo, a cromatina é

compactada em pequenos grumos (material eletrodenso – áreas escuras), intercalados por zonas eletrolúcidas (áreas claras) e interligados por fibras mais finas (**Figuras 1C e 1D**).

A fossa nuclear é profunda, e contém o complexo centriolar com o segmento inicial do flagelo (**Figura 1D**). Nos espermatozoides desta espécie, a peça intermediária é ligeiramente assimétrica e longa, estendendo-se desde a base do núcleo até a extremidade da bainha citoplasmática (**Figura 1D**). Apresentam canal citoplasmático (**Figura 1D**) e, ao longo deste canal, aneis concêntricos membranosos são encontrados (**Figura 1E**).

Na porção anterior da peça intermediária, um pouco grandes e longas, são encontradas as mitocôndrias (**Figura 1C, E, F e G**), cada uma delimitada por membranas interna e externa. A parte posterior da peça intermediária é caracterizada pela ausência de mitocôndria e presença de uma bainha citoplasmática (**Figura 1C**). O flagelo é completamente cercado pela membrana flagelar e exibe o axonema clássico de nove duplas de microtúbulos periféricos e um par central (9+2) (**Figura 1F**). A porção do flagelo que é inserido no canal citoplasmático mostra uma maior quantidade de citoplasma (faixa citoplasmática) (**Figura 1F**). Não apresentam diferenciações intratubulares e nem aletas laterais nos flagelos.

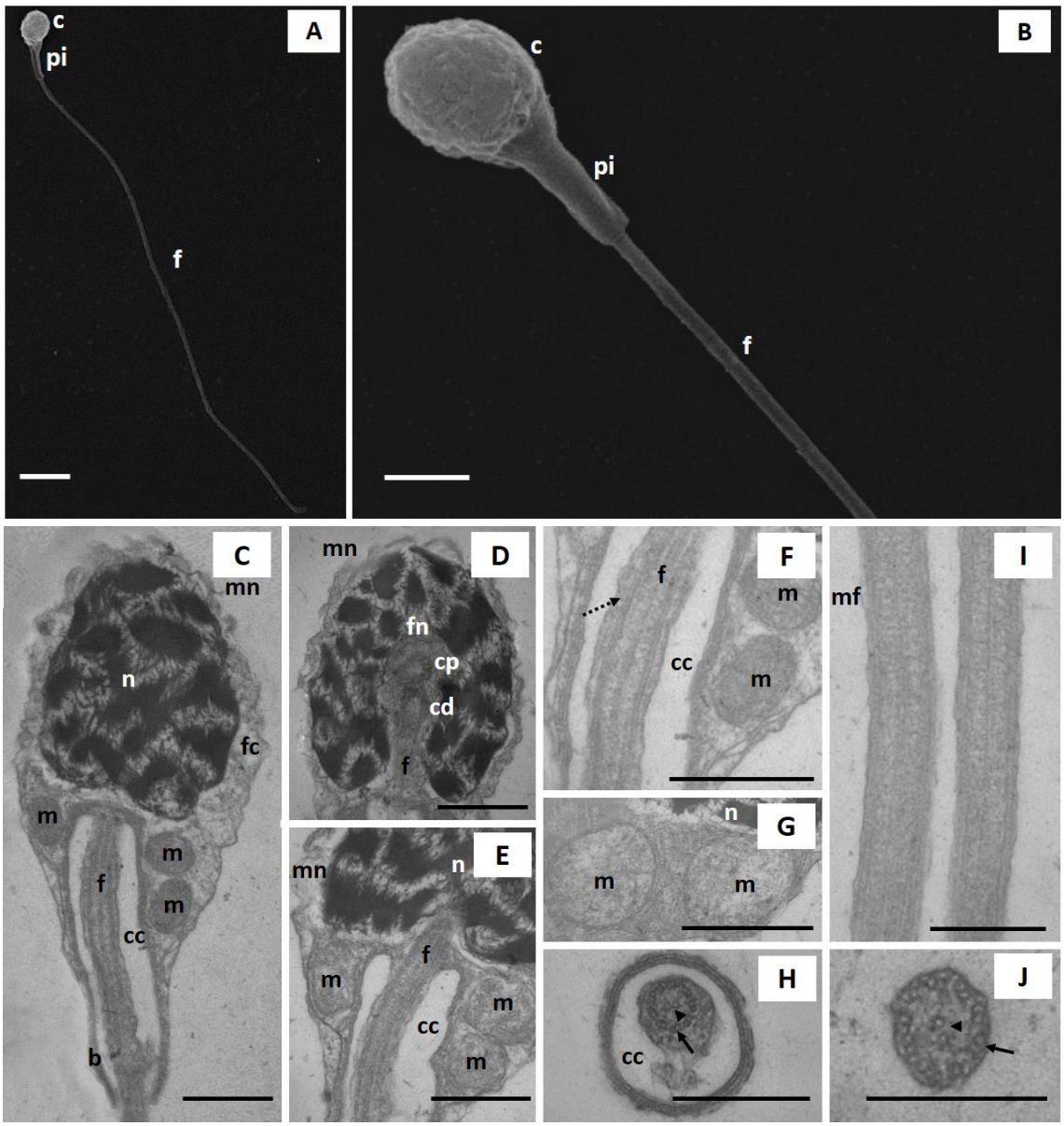


Figura 1. Espermatozoides de *Brycon orbignyanus* frescos (grupo controle). **A** e **B:** MEV: Evidenciação das três partes distintas - cabeça, peça intermediária e flagelo. **C-J:** MET (C, D, E, F, G, I em secções longitudinais e H, J em secções transversais). **C:** Núcleo rodeado por uma pequena faixa citoplasmática; cromatina condensada em pequenos grumos e mitocôndrias na região anterior da peça intermediária. **D:** Fossa nuclear abrigando centríolos proximal e distal e início do segmento flagelar. **E - F:** Peça intermediária evidenciando mitocôndrias. **G:** Detalhe das mitocôndrias delimitadas por membranas interna e externa. **H:** Anel concêntrico membranoso. **I:** Flagelos envolvidos pela membrana flagelar. **J:** Detalhe do flagelo mostrando o axonema com padrão morfológico de nove duplas de microtúbulos periféricos e dois microtúbulos centrais. **Abreviaturas:** a = axonema; b = bainha citoplasmática; c = cabeça; cc = canal citoplasmático; cd = centríolo distal; cp = centríolo proximal; f = flagelo; fc: faixa citoplasmática; fn = fossa nuclear; m = mitocôndria; mf: membrana flagelar; mn = membrana nuclear; n = núcleo; pi = peça intermediária; ponta de seta = par centra de microtúbulos; seta = par de microtúbulos periféricos; seta pontilhada: porção inicial do flagelo rodeada por citoplasma. **Escala das barras:** A: 5µm, B a G: 1µm, H a J: 0,5µm.

O exame ultraestrutural dos espermatozoides de *B. orbignyanus* descongelados oriundos da criopreservação nas soluções (DMSO, metilglicol e metanol), nos três tempos de congelamento (1 dia, 1 mês e 1 ano), quando comparados aos espermatozoides não tratados (frescos), revelou a presença de alterações na célula, variando desde pequenas injúrias nas diferentes partes da célula (cabeça, peça intermediária, flagelo) até a destruição total do espermatozoide, mostrando o efeito deletério da criopreservação sobre a célula espermática, de acordo com o tipo de solução utilizada e com tempo de congelamento.

A solução contendo DMSO revelou ser a mais eficaz para a proteção da célula espermática de *B. orbignyanus* durante o processo de criopreservação, quando comparada às soluções contendo metilglicol e metanol, nesta ordem. Levando em consideração as alterações ultraestruturais causadas por cada solução crioprotetora, vale destacar que, nos tempos 1 dia e 1 mês de congelamento, tais alterações foram semelhantes, observando-se o efeito do tempo em 1 ano de congelamento. Neste tempo, nenhuma das três soluções mostrou-se potencialmente eficaz, uma vez que foi observada a destruição da maioria dos espermatozoides, com acentuadas crioinjúrias celulares e comprometimento praticamente total da integridade ultraestrutural, principalmente para as soluções de metilglicol e metanol, nesta ordem.

Ainda que de forma escassa, nas amostras criopreservadas com DMSO, no tempo 1 ano de congelamento, foi possível encontrar espermatozoides parcialmente íntegros, apresentando alguma característica de preservação ultraestrutural, nas regiões da cabeça e peça intermediária, fato não percebido nas demais amostras. Vale destacar que, para as três soluções, em todos os tempos de congelamento, mesmo nas observações em que o espermatozoide apresentava o flagelo destruído (rompido) ou até mesmo se desintegrando, o padrão clássico de nove duplas de microtúbulos periféricos e um par central (9+2) do axonema continuava sendo exibido, assim como permaneciam cercados pela membrana flagelar.

Espermatozoides oriundos de criopreservação com solução de DMSO: a maioria dos espermatozoides encontrava-se íntegro nos tempos 1 dia e 1 mês de congelamento. Nestes tempos, as mudanças ultraestruturais durante a criopreservação nas células espermáticas foram encontradas na cabeça, especificamente na região da membrana nuclear, e na peça intermediária.

Cabeça: na membrana nuclear, constatou-se aspecto de expansão (**Figura 2A**), assim como dobramentos nas células espermáticas (**Figuras 2A e 2B**) e, algumas vezes, formação de vesículas na região do citoplasma entre o núcleo e a membrana nuclear, os quais apresentaram-se de formato esférico ou ovalado (**Figuras 2B**). A ruptura da membrana também foi registrada (**Figura 2C**). O núcleo mostrou-se íntegro, com a cromatina compactada aos grumos, visualizando-se áreas eletrodensas e eletrolúcidas com arranjo característico, sem alterações (**Figuras 2A - 2D**). Quando visualizada ao microscópio eletrônico de varredura, a cabeça dos espermatozoides mostrava-se com aspecto de dilatado (**Figura 2E e 2G**), com sinais de deformidades e aparência enrugada na maioria dos espermatozoides visualizados (**Figuras 2E - 2H**).

Peça intermediária: em alguns espermatozoides era possível visualizar mitocôndrias com suas características preservadas (inalteradas), porção do flagelo inserido na fossa nuclear, e região do canal citoplasmático inalterado. Porém, em alguns espermatozoides, a mitocôndria apresentava-se dilatada (**Figura 2B e 2D)**, às vezes com uma correspondente diminuição da densidade da matriz (**Figura 2B)**, a porção inicial do flagelo corrompida, sem visualização dos limites do canal citoplasmático (**Figura 2B e 2D**). Ao microscópio eletrônico de varredura, a região da peça intermediária mostrou-se com deformidades (**Figuras 2F e 2G**) e aparência dilatada (**Figura 2E e 2H**).

Em contrapartida, no tempo 1 ano de congelamento, a solução que continha DMSO não teve êxito para a proteção da maioria dos espermatozoides e, as alterações ultraestruturais foram recorrentes na cabeça, na região da membrana nuclear e no núcleo e, de forma acentuada na peça intermediária. Pode-se dizer que tais alterações ocorreram de forma mais intensa quando comparadas àquelas encontradas nos espermatozoides oriundos de 1 dia e 1 mês de congelamento.

Cabeça: em relação à membrana nuclear, houve a constatação de dobramentos (**Figuras 3A e 3B**), rompimento e formação de vesículas (**Figura 3B**). Em muitos espermatozoides, foram visualizadas membranas parcialmente desintegradas, sendo que a porção que persistiu apresentou-se intensamente deformada (**Figuras 3C e 3D**). Da mesma forma, o núcleo mostrou-se lesionado, uma vez que a condensação da cromatina

apresentou-se com as áreas eletrodensas e eletrolúcidas com arranjo não característico (**Figuras 3A e 3C**). Ao microscópio eletrônico de varredura, a cabeça dos espermatozoides mostrou-se dilatada (**Figura 3F**), com sinais de deformidades (**Figuras 3E, 3G e 3H**), sendo que o aspecto enrugado esteve presente em grande parte dos espermatozoides visualizados (**Figuras 3G e 3H**).

Peça intermediária: mostrou-se alterada em grande parte dos espermatozoides analisados (**Figuras 3A e 3B**) comprometendo a distinção do canal citoplasmático, início do flagelo e mitocôndrias. Em outras vezes, a peça intermediária encontrava-se com aparência de desintegração (**Figura 3C**) ou totalmente desintegrada (**Figura 3D**). A distinção das mitocôndrias tornou-se difícil (**Figura 3A**) e, em algumas células espermáticas, as mitocôndrias mostravam-se, aparentemente, com diminuição da densidade da matriz (**Figura 3C**). Em microscópio eletrônico de varredura, a peça intermediária mostrou-se dilatada (**Figura 3F**) e, na maioria das vezes, apresentou aparência de desintegração (**Figuras 3E, 3G e 3H**).

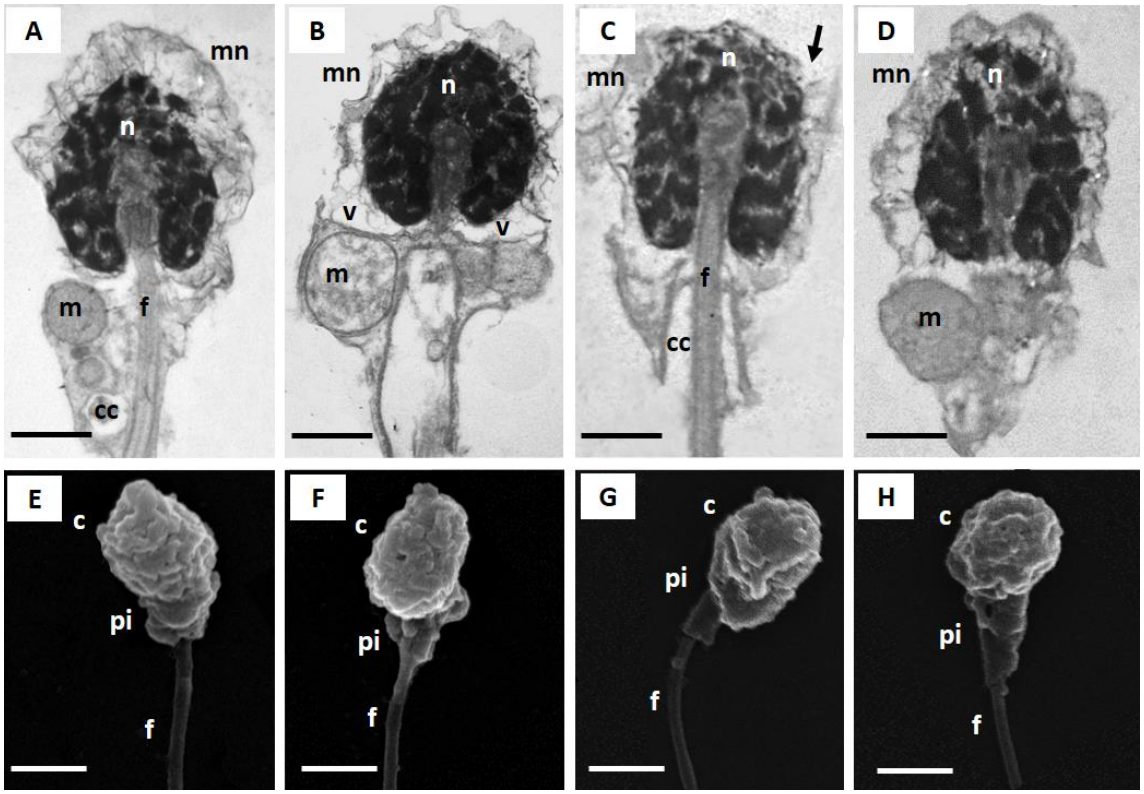


Figura 2. Espermatozoides de *Brycon orbignyanus* após criopreservação em solução contendo DMSO. MET: A e B - 1 dia de congelamento; C e D - 1 mês de congelamento. MEV: E e F - 1 dia de congelamento; G e H - 1 mês de congelamento. **A:** Membrana nuclear expandida; **B:** Dobramento da membrana nuclear, formação de vesículas na região do citoplasma; **C:** Ruptura da membrana nuclear; **D:** Membrana nuclear expandida e dilatação da mitocôndria; **E:** Enrugamento e dilatação da cabeça, com deformidades e peça intermediária dilatada; **F:** Enrugamento da cabeça, com deformidades e peça intermediária com deformidades. **G:** Dilatação da cabeça, peça intermediária com deformidades; **H:** Enrugamento da cabeça, com deformidades e peça intermediária dilatada; **Abreviaturas:** c = cabeça; cc = canal citoplasmático; f = flagelo; m = mitocôndria; mn = membrana nuclear; n = núcleo; pi = peça intermediária; seta = ruptura membrana nuclear; v = vesícula. **Escala das barras:** 1µm.

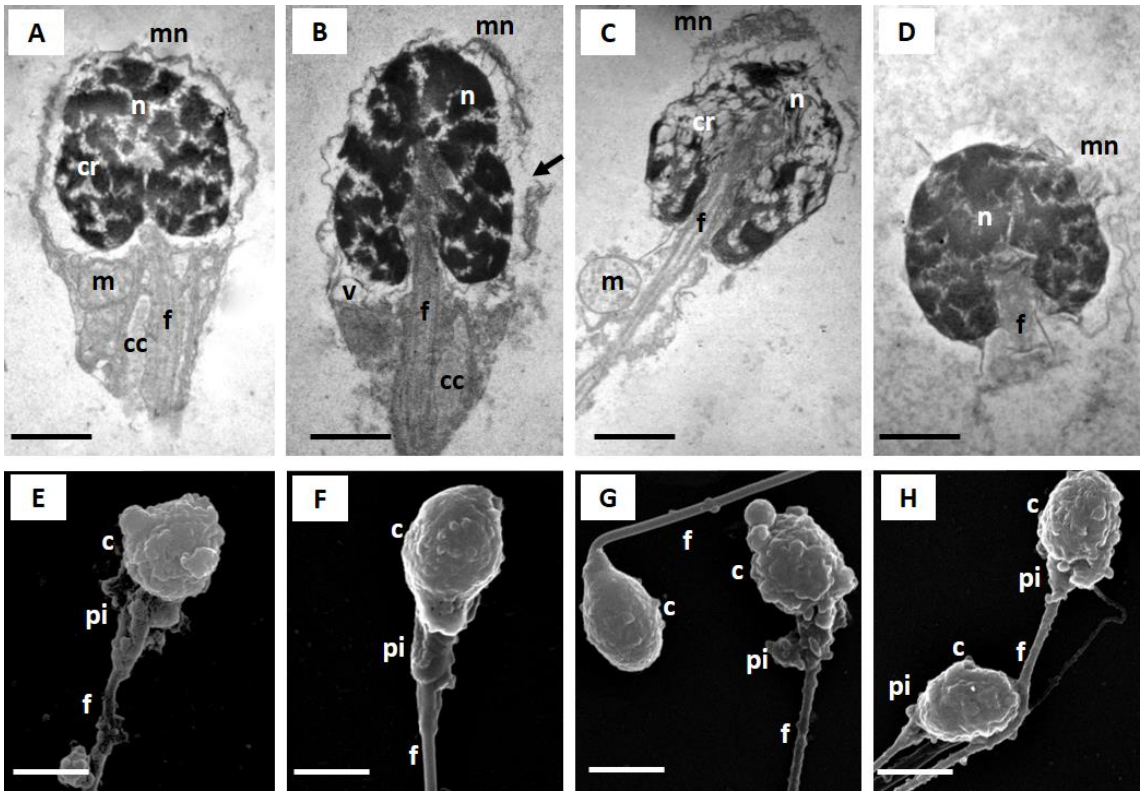


Figura 3. Espermatozoides de *Brycon orbignyanus* após criopreservação em solução contendo DMSO. 1 ano de congelamento. A–D: MET. E–H: MEV. **A:** Dobramento da membrana nuclear e alterações morfológicas na peça intermediária; **B:** Dobramento da membrana nuclear, formação de vesículas na região do citoplasma, ruptura da membrana nuclear, cromatina com arranjo não característico alterações morfológicas na peça intermediária; **C:** Membrana nuclear parcialmente desintegrada, cromatina com arranjo não característico e peça intermediária com aspecto de desintegração; **D:** Membrana nuclear parcialmente desintegrada e desintegração total da peça intermediária; **E:** Deformação da cabeça e peça intermediária com evidências de desintegração; **F:** Cabeça e peça intermediária com dilatação; **G e H:** Enrugamento da cabeça, com deformidades e peça intermediária com aparência de desintegração. **Abreviaturas:** c = cabeça; cc = canal citoplasmático; cr = cromatina; f = flagelo; m = mitocôndria; mn = membrana nuclear; n = núcleo; pi = peça intermediária; seta = ruptura da membrana nuclear; v = vesícula. **Escala das barras:** 1µm.

Espermatozoides oriundos de criopreservação com solução de metilglicol: pode-se dizer que é a solução intermediária, dentre as três soluções testadas neste estudo, em termos de eficácia na proteção dos espermatozoides de *B. orbignyanus.* Puderam ser visualizados espermatozoides com a estrutura íntegra nos tempos 1 dia e 1 mês de congelamento, mas em menor intensidade quando comparado aos espermatozoides oriundos da preservação contendo DMSO nestes mesmos tempos. As mudanças ultraestruturais durante a criopreservação nos espermatozoides, nestes tempos, foram especialmente registradas na região da cabeça, de forma específica na membrana nuclear e no núcleo e, de forma muito acentuada, na peça intermediária.

Cabeça: os dobramentos (**Figuras 4A e 4D**) e a ruptura (**Figuras 4B e 4C**) da membrana foram constantes na maioria das células espermáticas e, algumas vezes, houve formação de vesículas na região do citoplasma entre o núcleo e a membrana, os quais apresentavam-se de formato esférico ou ovalado (**Figuras 4A e 4D**). O núcleo mostrou-se íntegro em algumas células (**Figuras 4A e 4D**), mas apresentou sinais de danos em alguns espermatozoides, nos quais a cromatina possuía áreas eletrodensas e eletrolúcidas em arranjo não característico (**Figuras 4B e 4C**). Em microscópio eletrônico de varredura, a cabeça dos espermatozoides apresentou aspecto dilatado (**Figuras 4F e 4G**) e aparência de enrugado (**Figuras 4E - 4H**).

Peça intermediária: na maioria dos espermatozoides analisados, mostrou-se intensamente danificada, com comprometimento das delimitações das regiões do canal citoplasmático e início do flagelo (**Figuras 4B e 4D**). As mitocôndrias puderam ser observadas com características de preservação em alguns espermatozoides (**Figura 4B**), mas em outras células, possuíam aspecto ligeiramente dilatado (**Figura 4A**) ou sua distinção tornava-se difícil **(Figura 4C e 4D**). Em algumas células, houve a ruptura da peça intermediária, constatada pela falta de conexão entre a cabeça do espermatozoide e da porção inicial do flagelo com a peça intermediária (**Figuras 4B e 4C**). Ao microscópio eletrônico de varredura, a peça intermediária mostrou-se com deformidades, apresentando aparência de desintegração (**Figuras 4E e 4G**), aspecto dilatado (**Figuras 4F e 4H**).

Com 1 ano de congelamento, a solução que continha metilglicol proporcionou espermatozoides com alterações ultraestruturais acentuadas na região da cabeça (membrana nuclear e núcleo) e peça intermediária, ocorrendo de forma mais intensa quando comparadas às deformações encontradas nos espermatozoides oriundos de 1 dia e 1 mês de congelamento.

Cabeça: em relação à membrana nuclear, houve a constatação de dobramentos (**Figura 5A**), rupturas (**Figura 5C**), formação de grandes vesículas (**Figura 5A**) e membranas parcialmente desintegradas, sendo que a porção que estava presente apresentava-se intensamente deformada (**Figuras 5B, 5C e 5D**). O núcleo apresentou-se lesionado, com sinais de danos à condensação da cromatina, a qual mostrou um arranjo não característico das áreas eletrodensas e eletrolúcidas (**Figura 5C**). Quando observada ao microscópio eletrônico de varredura, a cabeça dos espermatozoides mostrou-se deformada com aspecto de enrugado (**Figuras 5E - 5H**).

Peça intermediária: em grande parte dos espermatozoides esteve totalmente alterada e desorganizada (**Figuras 5B e 5D**) comprometendo a distinção do canal citoplasmático, início do flagelo e mitocôndrias. Em algumas células, a mitocôndria mostrou-se intensamente dilatada, com correspondente diminuição da densidade da matriz (**Figura 5B**) e, em outras, tornou-se difícil sua distinção, notando-se um rompimento em suas membranas (**Figura 5C**). Houve formação de pequenas vesículas na região entre a membrana nuclear e a peça intermediária (**Figura 5C**). A perda de conexão da peça intermediária com a região da cabeça e segmento flagelar inicial também foi constatada (**Figura 5D**). Ao microscópio eletrônico de varredura, a peça intermediária mostrou-se com aparência de dilatada (**Figura 5G**) e, na maioria das vezes, apresentou intensos sinais de desintegração (**Figuras 5E - 5H**).

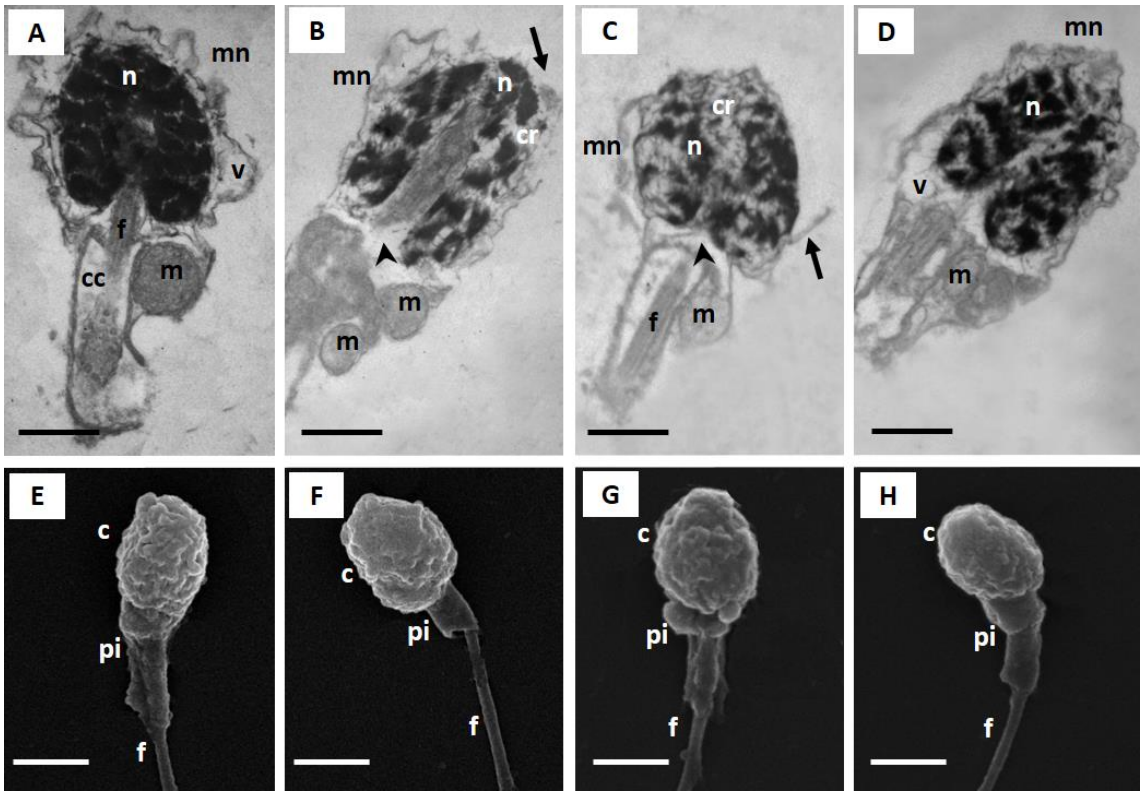


Figura 4. Espermatozoides de *Brycon orbignyanus* após criopreservação em solução contendo metilglicol. MET: A e B - 1 dia de congelamento; C e D - 1 mês de congelamento. MEV: E e F - 1 dia de congelamento; G e H - 1 mês de congelamento. **A:** Dobramento da membrana nuclear, presença de vesículas citoplasmáticas e peça intermediária danificada; **B e C:** Ruptura da membrana nuclear, cromatina com arranjo não característico, perda da conexão entre a cabeça do espermatozoide e da porção inicial do flagelo com a peça intermediária, peça intermediária intensamente danificada; **D:** Dobramento da membrana nuclear, formação de vesículas; **E:** Enrugamento da cabeça, peça intermediária com sinal de desintegração; **F:** Dilatação e enrugamento da cabeça, peça intermediária dilatada. **G:** Dilatação e enrugamento da cabeça e peça intermediária com sinais de desintegração; **H:** Enrugamento da cabeça, peça intermediária dilatada; **Abreviaturas:** c = cabeça; cabeça de seta = perda de conexão; cc = canal citoplasmático; cr = cromatina; f = flagelo; m = mitocôndria; mn = membrana nuclear; n = núcleo; pi = peça intermediária; seta = ruptura da membrana nuclear; v = vesícula. **Escala das barras:** 1µm.

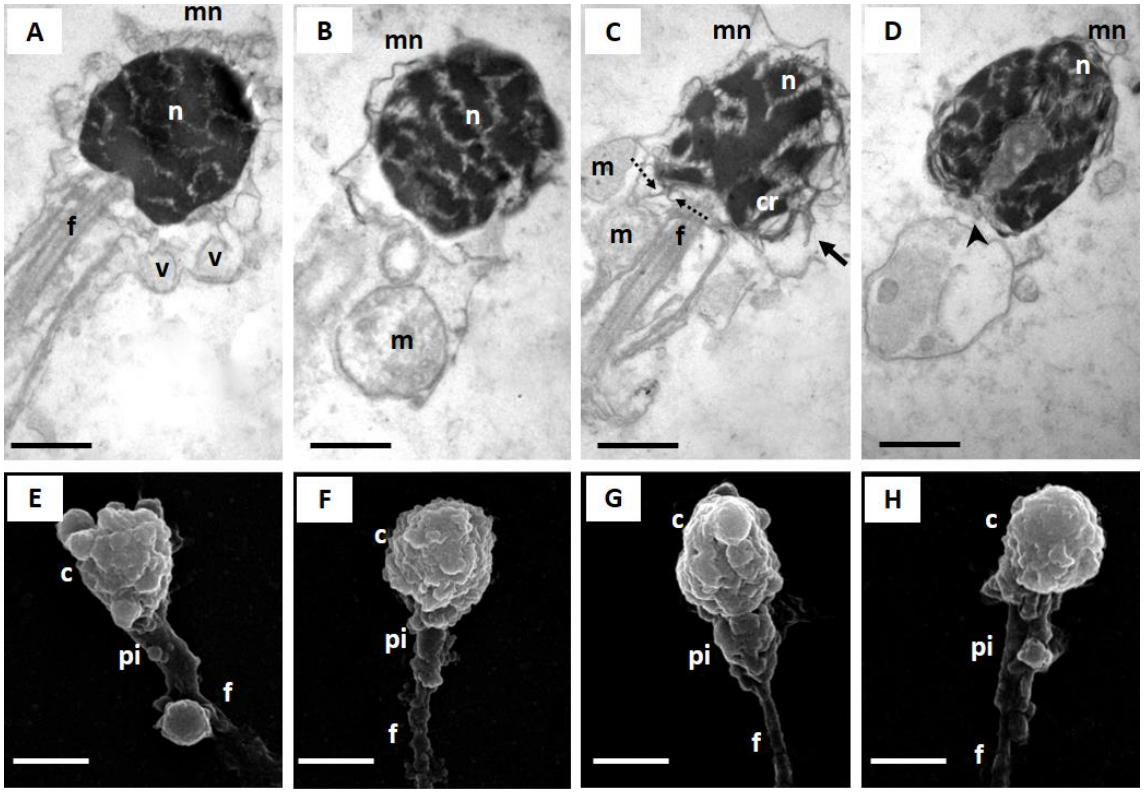


Figura 5. Espermatozoides de *Brycon orbignyanus* após criopreservação em solução contendo metilglicol. 1 ano de congelamento. A–D: MET. E–H: MEV notando-se enrugamento da cabeça e deformidades. **A:** Dobramento da membrana nuclear, formação de vesículas citoplasmáticas e peça intermediária danificada; **B:** Desintegração parcial da membrana nuclear, intensas alterações morfológicas na peça intermediária e mitocôndria intensamente dilatada; **C:** Desintegração e ruptura da membrana nuclear, cromatina com arranjo não característico, formação de vesículas e peça intermediária danificada; **D:** Membrana nuclear parcialmente desintegrada, peça intermediária intensamente alterada e desorganizada; perda da conexão entre a cabeça do espermatozoide e da porção inicial do flagelo com a peça intermediária; **E-H:** Desintegração da peça intermediária sendo que em **G** notou-se a dilatação da mesma. **Abreviaturas:** c = cabeça; cabeça de seta = perda de conexão; cr = cromatina; f = flagelo; m = mitocôndria; mn = membrana nuclear; n = núcleo; pi = peça intermediária; ponta de seta = pequena vesícula; seta = ruptura da membrana nuclear; seta pontilhada: vesículas pequenas; v = vesícula. **Escala das barras:** 1µm.

Espermatozoides oriundos de criopreservação com solução de metanol: a solução apresentou desempenho negativo sobre praticamente todos os espermatozoides de *B. orbignyanus* analisados, não sendo visualizados espermatozoides com a estrutura íntegra nos tempos 1 dia e 1 mês de congelamento. Nestes tempos, as mudanças ultraestruturais durante a criopreservação nos espermatozoides foram intensas e se concentraram na região da cabeça (membrana nuclear e núcleo) e peça intermediária.

Cabeça: os dobramentos e os rompimentos da membrana foram constantes em praticamente todas as células espermáticas visualizadas (**Figuras 6A - 6D**) e, algumas vezes, a membrana foi visualizada quase que totalmente desintegrada, e a porção que permanecia visível encontrava-se deformada (**Figura 6B, 6C e 6D**). O núcleo apresentou sinais de lesões em alguns espermatozoides, com as áreas eletrodensas e eletrolúcidas da condensação da cromatina com arranjo não característico (**Figuras 6A - 6D**). Sob o microscópio eletrônico de varredura, a cabeça de alguns espermatozoides apresentou-se com aspecto dilatado (**Figuras 6E**), e a característica de enrugado com deformidades esteve presente em praticamente todas as células (**Figuras 6E - 6H**).

Peça intermediária: intensamente danificada na maioria dos espermatozoides, com comprometimento das delimitações das regiões do canal citoplasmático e mitocôndrias **(Figuras 6A - 6D**). As mitocôndrias puderam ser observadas com características de preservação da membrana em alguns espermatozoides (**Figura 6B**), enquanto que em outras células mostraram-se alteradas, com a percepção de ruptura das membranas (**Figura 6C e 6D**). Em alguns espermatozoides, houve a ruptura da peça intermediária, constatada pela falta de conexão entre a cabeça do espermatozoide e da porção inicial do flagelo com a peça intermediária (**Figuras 6B**) e, em outras vezes, foi registrada apenas a conexão da peça com a porção inicial do flagelo (**Figura 6D**). Ao microscópio eletrônico de varredura, a peça intermediária mostrou-se com enrugamento e deformidades (**Figuras 6E, 6F e 6H**) e aparência de dilatação (**Figura 6G**).

Os espermatozoides que permaneceram na solução de metanol pelo tempo de 1 ano de congelamento apresentaram-se com alterações ultraestruturais acentuadas na região cabeça (membrana nuclear e núcleo) e peça intermediária, sendo estas alterações mais intensas quando comparadas àquelas encontradas nos espermatozoides oriundos de 1 dia e 1 mês de congelamento.

Cabeça: no que diz respeito à membrana nuclear, os espermatozoides analisados apresentaram-na intensamente deformada (**Figuras 7A - 7D**), e parcialmente desintegradas (**Figura 7C**). O núcleo apresentou sinais de danos relativos à condensação

da cromatina em diferentes graus de comprometimento, com arranjo não característico das áreas eletrolúcidas e eletrodensas (**Figura 7B e 7C**). As mitocôndrias mostraram alterações quanto à percepção de sua membrana (**Figuras 7C e 7D**). A cabeça dos espermatozoides, quando vistas ao microscópio eletrônico de varredura, mostrou acentuados sinais de deformação e aspecto de enrugado (**Figuras 7E - 7H**).

Peça intermediária: em grande parte dos espermatozoides, mostrou-se alterada e desorganizada (**Figuras 7A - 7H**) comprometendo a distinção do canal citoplasmático, início do flagelo e mitocôndrias (**Figuras 7C e 7D**). A maioria das mitocôndrias mostraram-se indistinguíveis, com percepção de rompimento das membranas (**Figuras 7B e 7D**). Constatou-se também a perda de conexão da peça com a região da cabeça (**Figura 7B e 7C**). Ao microscópio eletrônico de varredura, a peça intermediária apresentou-se com aparência de dilatada (**Figura 7H**) e, na maioria das vezes, mostrou-se com aparência de desintegração (**Figuras 7E - 7G**).

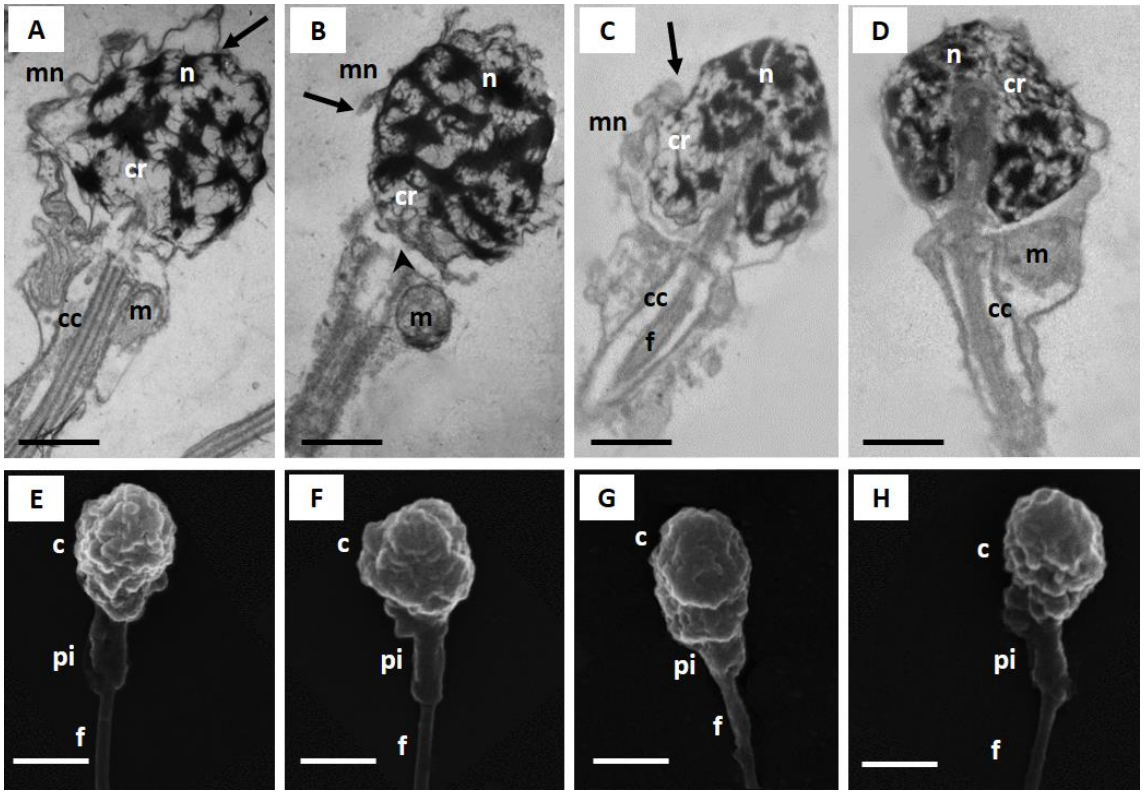


Figura 6. Espermatozoides de *Brycon orbignyanus* após criopreservação em solução contendo metanol. MET: A e B - 1 dia de congelamento; C e D - 1 mês de congelamento. MEV: E e F - 1 dia de congelamento; G e H - 1 mês de congelamento. **A:** Dobramento e ruptura da membrana nuclear, cromatina com arranjo não característico, peça intermediária danificada; **B:** Ruptura da membrana nuclear, condensação da cromatina com arranjo não característico, perda da conexão entre a peça intermediária com a cabeça do espermatozoide e a porção inicial do flagelo, peça intermediária intensamente danificada; **C:** Ruptura da membrana nuclear, cromatina com arranjo não característico, peça intermediária danificada **D:** Intensa desintegração da membrana nuclear, cromatina com arranjo não característico, peça intermediária danificada; **E e F:** Enrugamento da cabeça, com deformidades e peça intermediária dilatada; **G:** Dilatação e enrugamento da cabeça, com deformidades, peça intermediária dilatada; **H:** Enrugamento da cabeça, com deformidades e peça intermediária dilatada. **Abreviaturas:** c = cabeça; cabeça de seta = perda de conexão; cc = canal citoplasmático; cr = cromatina; f = flagelo; m = mitocôndria; mn = membrana nuclear; n = núcleo; pi = peça intermediária; seta = rompimento da membrana nuclear. **Escala das barras:** 1µm.

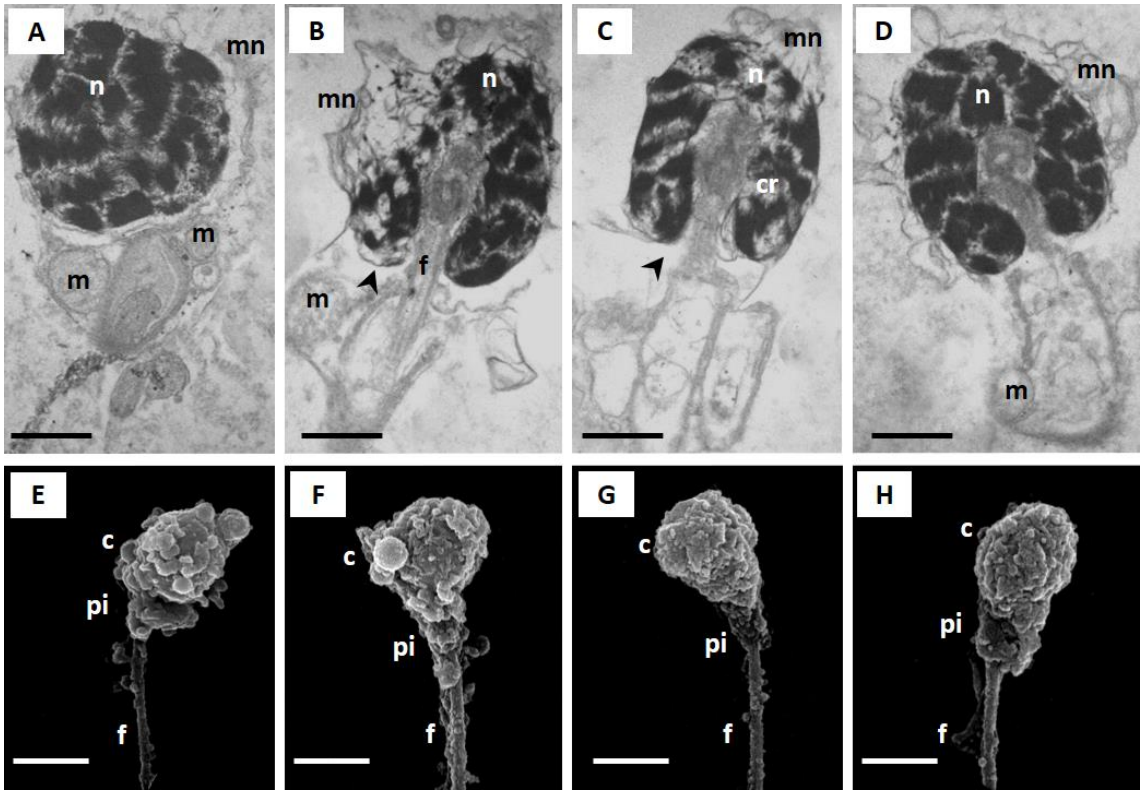


Figura 7. Espermatozoides de *Brycon orbignyanus* após criopreservação em solução contendo metanol. 1 ano de congelamento. A–D: MET evidenciando a intensa deformação da membrana nuclear e peça intermediária alterada e desorganizada. E–H: MEV destacando a cabeça deformada, com enrugamento e desintegração. **B:** Perda da conexão entre a peça intermediária com a cabeça do espermatozoide e aparente condensação não completa da cromatina; **C:** Membrana nuclear parcialmente desintegrada e perda da conexão entre a cabeça do espermatozoide com a peça intermediária; **E-G:** Peça intermediária com sinal de desintegração; **H:** Dilatação da peça intermediária. **Abreviaturas:** c = cabeça; cabeça de seta = perda de conexão; cr = cromatina; f = flagelo; m = mitocôndria; mn = membrana nuclear; n = núcleo; pi = peça intermediária; seta = membrana nuclear rompida. **Escala das barras:** 1µm.

4. Discussão

Este foi o primeiro estudo abordando as alterações ultraestruturais em espermatozoides de *B. orbignyanus* após serem submetidos ao processo de criopreservação. A porcentagem de espermatozoides móveis, em geral, é um atributo comum utilizado para avaliar a viabilidade pós-descongelamento de espermatozoides criopreservados (HE e WOODS, 2004). No entanto, esta característica não deve ser bem correlacionada com a capacidade de fertilização do espermatozoide (GWO et al. 1991; KERBY, 1983).

Outros atributos, tais como a viabilidade celular (por exemplo espermatozoides com membranas plasmáticas intactas), e função mitocondrial, são importantes indicadores para avaliar a qualidade da célula espermática, uma vez que as membranas plasmáticas e mitocôndrias podem ser danificadas durante o processo de congelação-descongelação (OGIER DE BAUNLY et al. 1997; OGIER DE BAUNLY et al. 1999; SEGOVIA et al. 1999).

No presente estudo, houve redução da viabilidade espermática e integridade estrutural dos espermatozoides oriundos dos crioprotetores testados (DMSO, metilglicol e metanol), nos distintos tempos de congelamento (1 dia, 1 mês e 1 ano). Os valores da taxa e do tempo de duração da motilidade do sêmen descongelado de *B. orbignyanus* obtiveram médias reduzidas em relação ao sêmen fresco. Porém, a solução contendo DMSO apresentou sempre os maiores valores, mostrando maior eficiência no processo de criopreservação. Da mesma forma, considerando-se as alterações ultraestruturais nos espermatozoides descongelados, a solução contendo DMSO revelou ser mais eficaz para a proteção da célula espermática de *B. orbignyanus* quando comparada às soluções contendo metilglicol e metanol.

O dano observado constantemente nas células espermáticas foi em relação à membrana nuclear, a qual se apresentou com dobramentos, rompimentos, dilatação ou desintegração. Estes tipos de alterações foram observados em amostras de espermatozoides mantidos nas três soluções, em todos os tempos analisados. Tais observações corroboraram os relatos de Lahnsteiner et al. (1992) sobre a membrana nuclear dos espermatozoides de *Thymallus thymallus* após o processo de criopreservação, os quais citaram a desestabilização e os intensos dobramentos desta estrutura. Taddei et al. (2001), em estudos com criopreservação de sêmen de *Diplodus puntazzo*, também descreveram a presença de rompimentos, dobramentos ou ausência da membrana nuclear nos espermatozoides após o descongelamento.

A membrana plasmática dos espermatozoides é uma das principais estruturas afetadas pela criopreservação, muitas vezes se separando do citoesqueleto ou mesmo se quebrando, seja na região ao redor da cabeça, na peça intermediária ou no flagelo (OGIER DE BAUNLY et al. 1997). Esta importante estrutura envolve o espermatozoide e desempenha um papel fundamental na ativação da motilidade espermática através da detecção de alterações iônicas, sendo composta basicamente por fosfolipídios e proteínas que são responsáveis por conferir fluidez e permeabilidade (BOBE e LABBÉ, 2010). Os danos na membrana plasmática dos espermatozoides podem ter influências negativas sobre a iniciação da motilidade devido ao seu papel de sinalização (BOITANO e OMOTO, 1992), ou podem conduzir à incapacidade do potencial de despolarização (GATTI et al. 1990).

Além destes prejuízos relacionados à redução da motilidade do espermatozoide, é preciso ressaltar que as alterações da membrana plasmática da célula espermática também podem afetar a capacidade da membrana plasmática do espermatozoide em se fundir com a membrana plasmática do ovócito (OGIER DE BAUNLY et al. 1997), acarretando em problemas na fertilização.

A mitocôndria, por sua vez, é outra estrutura constantemente desorganizada durante o processo de criopreservação (OGIER DE BAUNLY et al. 1997). De acordo com a literatura, danos nas mitocôndrias são os principais responsáveis pela diminuição na porcentagem de espermatozoides móveis e duração da motilidade observada após a congelação (MAISSE, 1996). Estes efeitos negativos sobre a manutenção da motilidade é devido à queda de ATP intracelular, que só é produzido quando as mitocôndrias permanecem funcionais. Os baixos níveis de ATP podem causar um mau funcionamento das bombas iônicas e uma desestabilização da membrana plasmática (OGIER DE BAUNLY et al. 1997)

Para *B. orbignyanus*, foram registradas alterações na morfologia das mitocôndrias após o processo de criopreservação, como dilatação (com ou sem correspondente diminuição da densidade da matriz), rompimento das membranas e, muitas vezes, a não distinção desta organela na peça intermediária.

Alterações morfológicas nas mitocôndrias foram constatadas por Lahnsteiner et al. (1992) em *T. thymallus* e Yao et al. (2000) em *Macrozoarces americanus* L. que verificaram mitocôndrias intensamente dilatadas. Gwo e Arnold (1992), em *Micropogonias undulatus*, relataram dilatação das mitocôndrias com uma correspondente diminuição da densidade da matriz, além do rompimento das membranas e, em

espermatozoides severamente danificados, puderam observar mitocôndrias exibindo grande vacuolização com um desaparecimento da maior parte das cristas.

Segundo Yao et al. (2000), essas alterações podem afetar negativamente a função da mitocôndria, reduzindo o fornecimento de energia para o movimento flagelar do espermatozoide. A integridade estrutural e funcional da membrana plasmática e das mitocôndrias dos espermatozoides, bem como a motilidade, são fundamentais para o sucesso da fertilização em peixes teleósteos (HE e WOODS, 2004).

Taddei et al. (2001) em *D. puntazzo* notaram alterações na orientação espacial das mitocôndrias após o processo de criopreservação, sendo que as mesmas não apresentaram nenhuma mudança estrutural. Segundo os autores, o alto índice de motilidade dos espermatozoides descongelados pode ser correlacionado com a falta de efeitos deletérios sobre a mitocôndria e flagelo, cujas estruturas mostraram-se bem preservadas.

Considerando-se a importância de ambas as estruturas (membrana plasmática e mitocôndria) pode-se inferir que os prejuízos relacionados à redução da motilidade do espermatozoide de *B. orbignyanus* estejam relacionados às crioinjúrias provocadas pelas etapas do processo de criopreservação nestas estruturas. Ademais vale ressaltar que os danos na membrana plasmática dessa espécie podem ter influenciado a fertilização, acarretando em baixos valores, como elucidado por He e Woods (2004).

De acordo com Billard (1983), alterações ultraestruturais consideráveis são aquelas visíveis na estrutura da cromatina após o descongelamento dos espermatozoides, uma vez que, tais alterações poderiam impedir a fertilização ou alterar o desenvolvimento embrionário. O autor relata que, após o processo de criopreservação, os espermatozoides geralmente apresentam menor motilidade, mas podem alcançar taxas de fertilização semelhantes ao controle (sêmen fresco), desde que haja um maior número de espermatozoides por fertilização e integridade dos cromossomos dos espermatozoides descongelados. Considerando-se que possam ocorrer alterações da cromatina, o estado dos animais deve ser verificado em um estágio mais avançado de desenvolvimento.

Neste estudo, especialmente em relação às baixas taxas de fertilização e eclosão, sugerem que tenha ocorrido a influência dos dois fatores relatados por Billard (1983). Primeiramente em relação ao número de espermatozoides pós-descongelados utilizados na fertilização. Segundo Felizardo et al. (2010), a dose inseminante considerada eficiente para obtenção de altas taxas de fertilização, em *B. orbignyanus*, é de $1{,}0x10^6$ a $4{,}1x10^6$ espermatozoides.ovócito^{-1}. Para as fertilizações realizadas neste trabalho, o número

médio de espermatozoides por ovócito foi de $1,4x10^6$ e (coleta 1) e $1,8x10^6$ (coleta 2), uma relação considerada baixa, visto que, tais concentrações são comumente utilizadas para fertilização com sêmen fresco, como enfatiza Felizardo et al. (2010).

Pérez-Cerezales et al. (2010) relataram que uma das causas para os elevados valores para taxas de fertilização registrados, após utilização de sêmen criopreservado de *Oncorhynchus mykiss*, truta-arco-íris, possam estar associadas à alta dose inseminante utilizada nos experimentos de fertilização ($1,6x10^7$ espermatozoides.ovócito^{-1}), mesmo observando uma diminuição significativa da viabilidade do sêmen pós-descongelado.

Da mesma forma, a comparação entre os dados ultraestruturais dos espermatozoides descongelados e o elevado valor da taxa de eclosão obtido para *B. amazonicus*, em estudo realizado por Ninhaus-Silveira et al. (2006), levaram os autores a sugerirem duas hipóteses: as alterações estruturais resultantes do processo de congelamento/descongelamento, como dilatação da membrana e retração da peça intermediária, não afetaram a viabilidade espermática ou, a grande quantidade de espermatozoides por ovócito utilizada durante a fertilização permitiu a minimização dos efeitos causados por espermatozoides com defeitos.

Varela Junior et al. (2012) ao realizar a fertilização com sêmen pós-descongelado de *Colossoma macropomum*, tambaqui, também utilizaram uma concentração de sêmen geralmente empregada em fertilizações com sêmen fresco para a espécie ($7x10^4$ espermatozoides.ovócito^{-1}) e consideraram que, provavelmente, também tenha havido influência nos valores das taxas de fertilização.

Embora a taxa de fertilização seja um importante indicador da qualidade do sêmen descongelado, a utilização de altas doses inseminantes pode mascarar esta estimativa (BILLARD e ZHANG, 2001), uma vez que, mesmo a amostra apresentando uma porcentagem reduzida de células espermáticas funcionais, pode ser erroneamente considerada altamente fértil (VIVEIROS et al. 2000).

Ainda de acordo com Billard (1983), o segundo fator que poderia estar influenciando para os baixos valores de taxas de eclosão para *B. orbignyanus* está associado à integridade dos cromossomos dos espermatozoides descongelados. Estudos enfatizam que a lesão do DNA está correlacionada com uma redução na capacidade de fertilização, com falhas no desenvolvimento após a fertilização e problemas na prole (KOPEIKA et al. 2004; EVENSON e WIXON, 2006; FERNANDEZ-GONZALEZ et al. 2008; BARROSO et al. 2009; SCHULTE et al. 2010). Ou seja, apesar dos danos no DNA, os espermatozoides mantêm a capacidade para fertilizar, mas a sobrevivência embrionária

é afetada (PÉREZ-CEREZALES et al. 2010). Estes autores relataram que alguns danos do DNA são reversíveis e reparados pelos ovócitos durante a primeira clivagem.

Para *B. orbignyanus*, observou-se taxas de eclosão com valor zero para todos os tratamentos após 1 dia e 1 ano de criopreservação, mesmo tendo sido registrados valores consideráveis para taxas de fertilização. No tempo 1 mês de congelamento, percebeu-se que do porcentual registrado para taxa de fertilização, para todos os tratamentos, apenas uma pequena porcentagem atingiu a eclosão. Ou seja, no geral, os espermatozoides foram capazes de fertilizar os ovócitos, mas não promoveram o desenvolvimento dos embriões.

Como pode ser constatado por meio das imagens em microscopia eletrônica de transmissão, em todos os tratamentos, ao longo do tempo de congelamento (excetuando-se a solução contendo DMSO em 1 dia de congelamento) houve a presença de crioinjúrias do DNA dos espermatozoides. Provavelmente, estas lesões no DNA tiveram um impacto negativo sobre os valores das taxas de eclosão, uma vez que levaram ao comprometimento do desenvolvimento dos embriões.

Porém, é preciso destacar que, quando se trata de taxas de fertilização e eclosão, há também o fator "efeito materno" interferindo no resultado. Segundo Kamler (2005), o efeito materno contribui para a sobrevivência do embrião, uma vez que é a relação "parental-ovo-progênie" que atuará na variabilidade da larva em resistir a períodos críticos e sobreviver. Em outras palavras, a qualidade dos ovócitos (especificamente a presença de vitaminas A, E, fatores imunitários, antioxidantes e andrógenos) é fortemente influenciada por fatores que envolvem as matrizes, como como idade, quantidade e qualidade da dieta, saúde, tempo de ovulação (DZYUBA et al. 2006, ALLAMAN et al. 2012).

É fato que, apesar de registrados os valores de taxas de fertilização para todos os tratamentos ao longo do tempo, chamam a atenção os baixos valores, inclusive para o grupo controle. Diante disso, é provável que as tais valores possam ter sido influenciados, também, pela variabilidade dos ovócitos utilizados nos processos de fertilização ao longo dos experimentos. Vale ressaltar ainda que, durante as coletas, houve dificuldade em se obter fêmeas aptas para a reprodução e, em alguns casos, os ovócitos utilizados para a fertilização, aparentemente, não apresentavam boa qualidade.

Sendo assim, o que se percebe é que, os valores baixos de taxa de fertilização e eclosão, provavelmente, sejam consequência do somatório de alterações advindas das etapas fundamentais do processo de criopreservação (como diminuição da taxa e duração da motilidade, alterações nos espermatozoides observadas por meio da ultraestrutura na

região da membrana plasmática, mitocôndria, cromatina), aliado a fatores relacionados ao processo de fertilização (dose inseminante, qualidade dos ovócitos).

É importante lembrar também que, nas condições do presente estudo, a integridade estrutural dos espermatozoides de *B. orbignyanus* reduziu de acordo com o aumento do tempo de estocagem em nitrogênio líquido. Ou seja, levando em consideração as crioinjúrias causadas por cada solução crioprotetora, foi possível notar que, após 1 dia e 1 mês de congelamento, as alterações ocorridas nas células espermáticas foram semelhantes, observando-se o efeito do tempo após 1 ano de congelamento, quando as alterações foram mais acentuadas. Apesar disso, vale destacar que a viabilidade espermática, em termos de valores para taxa e duração da motilidade, permaneceram estatisticamente iguais ao longo do tempo, como observado nas Tabelas 2 e 3.

Mazur (1984) relatou que as células podem suportar o armazenamento em baixas temperaturas, como -196°C, durante séculos. Gao e Critser (2000) enfocaram que há uma aparente contradição entre o conceito de criopreservação e os resultados experimentais, quando os estudos mencionam que células podem ser danificadas pela criopreservação em si. Mazur (1984) enfatizou que, contrariamente ao pensamento habitual, o desafio para as células durante o congelamento não é a sua capacidade de suportar o armazenamento em baixas temperaturas, e sim no fato das células encontrarem, por duas vezes (uma vez durante o resfriamento e outra durante o aquecimento) a letalidade da zona intermédia de temperatura entre -15 a -60°C, período no qual podem ocorrer as criolesões.

Gao e Critser (2000) relataram que as lesões que ocorrem nas células/tecidos são causadas por cada etapa ou uma combinação das etapas necessárias à criopreservação, que podem ser resumidas em 1- adicionar agentes crioprotetores para células/tecidos antes do resfriamento; 2- resfriar células/tecidos em direção a uma temperatura baixa (por exemplo, a -196°C); 3- aquecer as células/tecidos; 4- retirar as soluções crioprotetoras das células/tecidos após o descongelamento.

Durante o tempo de armazenamento em si, o metabolismo biológico das células diminui dramaticamente, sendo que, em temperatura inferior a -120°C, as reações químicas só poderiam ocorrer após muitos anos, e a -196°C as únicas reações que poderiam ocorrer seriam eventos fotofísicos, tais como a formação de radicais livres e a quebra de macromoléculas resultantes da lenta acumulação da radiação ionizante ou raios cósmicos, mas esse acúmulo provavelmente se tornaria significativo apenas depois de séculos de armazenamento (MAZUR, 1984).

Diante disso, pode-se sugerir que fatores não controlados na presente pesquisa, relacionados às etapas do processo de criopreservação, ou até mesmo fatores externos (por exemplo associados às etapas do processamento das amostras), certamente influenciaram para a observação de crioinjúrias mais acentuadas nos espermatozoides oriundos da criopreservação por tempo de permanência de 1 ano em nitrogênio líquido.

5. Conclusão

As informações a respeito das crioinjúrias causadas aos espermatozoides de *B. orbignyanus* são valiosas para o processo de criopreservação de sêmen. Por meio das análises da viabilidade espermática (valores das taxa e duração da motilidade) e das observações ultraestruturais dos espermatozoides pós-descongelados, pode-se constatar que a solução contendo DMSO proporcionou crioinjúrias menos acentuadas às célula espermática de *B. orbignyanus*, quando comparada às soluções à base de metilglicol e metanol.

6. Agradecimentos

Esta pesquisa foi conduzida com a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (017011/10), estando de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação. Este estudo recebeu o apoio financeiro da FAPESP (2010/12108-2) na forma de Bolsa de Doutorado e do CNPq (483995/2011-8). Os autores são gratos aos funcionários do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – CEPTA/ICMBio, pelo fornecimento do material biológico e utilização da infraestrutura no decorrer do desenvolvimento desta pesquisa; à equipe do Laboratório de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP/USP), especialmente à Maria Dolores Seabra Ferreira e José Augusto Maulin, pelo processamento das amostras e captura das imagens, respectivamente; ao prof. Dr. João Ademir de Oliveira, da FCAV/UNESP Jaboticabal, pelas análises estatísticas.

7. Referências

ALLAMAN, I.B.; FREITAS, R.T.F.; VIVEIROS, A.T.M.; NASCIMENTO, A.F.; OLIVEIRA, G.R.REIS NETO, R.V. Efeito materno e paterno sobre as taxas de fertilização e eclosão em curimba (*Prochilodus lineatus)*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia,** v.64, p.1584-1590, 2012.

BARROSO, G.; VALDESPIN, C.; VEGA, E.; KERSHENOVICH, R.; AVILA, R.; AVENDAÑO, C.; OEHNINGER, S. Developmental sperm contributions: fertilization and beyond. **Fertility and Sterility,** v.92, p.835-848, 2009.

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

BILLARD, R. Reproduction in rainbow trout: sex differentiation, dynamics of gametogenesis, biology and preservation of gametes. **Aquaculture**, v. 100, p.263-298, 1992.

BILLARD, R. Ultrastructure of trout spermatozoa: changes after dilution and deep-freezing. **Cell and Tissue Research**, v. 228, p.205-218, 1983.

BILLARD, R.; COSSON, J.; PERCHEC, G.; LINHART, O. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. **Aquaculture**, v.129, p.95-112, 1995.

BILLARD, R.; ZHANG, T. Techniques of genetic resource banking in fish. In: Watson, P.F., Holt, W.V. (Eds.), Cryobanking the genetic resource: wildlife conservation for the future? Taylor and Francis, London, 2001, pp.156-170.

BOBE, J., LABBÉ, C. Egg and sperm quality in fish. **General and Comparative Endocrinology**. New York, v.165, p.535-548, 2010.

BOITANO, S.; OMOTO, C.K. Trout sperm swimming patterns and role of intracellular Ca. **Cell Motility and the Cytoskeleton**, v.21, p.74-82, 1992.

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

DROKIN, S.; STEIN, H.; BARTSCHERER, H. Effect of cryopreservation on the fine structure of spermatozoa of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Brown trout (*Salmo trutta F. Fario*). **Cryobiology**. v.37, p.263-270, 1998.

DZYUBA, B.; LOOK, K.J.W.V.; CLIFFE, A.; KOLDEWEY; H.J.; HOLT, W.V. Effect of parental age and associated size on fecundity, growth and survival in the yellow seahorse *Hippocampus kuda*. **Journal of Experimental Biology**, v.209, p.3055-3061, 2006.

EVENSON, D.P.; WIXON, R. Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. **Theriogenology,** v.65, p.979-991, 2006.

FELIZARDO, V.O. **Manejo reprodutivo da piracanjuba *(Brycon orbignyanus)*: congelamento de sêmen e taxas de fertilidade**. 84f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais. 2008.

FELIZARDO, V.O.; MURGAS, L.D.S.; DRUMOND, M.M.; SILVA, J.A. Dose inseminante utilizada na fertilização artificial de ovócitos de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). **Revista Ceres**, v.57, p.648-652, 2010.

FERNANDEZ-GONZALEZ, R., MOREIRA, P.N.; PEREZ-CRESPO, M.; SANCHEZ-MARTIN, M.; RAMIREZ, M.A.; PERICUESTA, E.; BILBAO, A.; BERMEJO-ALVAREZ, P.; DE DIOS HOURCADE, J.; DE FONSECA, F.R. et al. Long-term effects of mouse intracytoplasmic sperm injection with DNA-fragmented sperm on health and behavior of adult offspring. **Biology of Reproduction** v.78, p.761-772, 2008.

GALO, J.M.; STREIT-JUNIOR, D.P.; SIROL, R.N.; RIBEIRO, R.P.; DIGMAYER, M.; ANDRADE, V.X.L.; EBERT, A.R. Spermatic abnormalities of piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849) after cryopreservation. **Brazilian Journal of Biology**, v.71, p.693-699, 2011.

GAO, D.; CRITSER, J.K. Mechanisms of cryoinjury in living cells. **The ILAR Journal,** v.41, p.187-196, 2000.

GATTI, J.L.; BILLARD, R.; CHRISTEN, R. Ionic regulation of the plasma membrane potential of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) spermatozoa: role in the initiation of sperm motility. **Journal of Cellular Physiology,** v.143, p.546-54, 1990.

GOPALAKRISHNAN, A.; PONNIAH, A.G; LAL, K. K. Fine structural changes of Rohu (*Labeo rohita*) sperm after dilution with cryoprotectants. **Indian Journal of Fisheries**, v.47, p.21-27, 2000.

GWO, J.; STRAWN, K.; LONGNECKER, M.T.; ARNOLD, C.R. Cryopreservation of Atlantic croaker spermatozoa, **Aquaculture**, v.94, p.355-375, 1991.

GWO, J.C.; ARNOLD, C.R. Cryopreservation of Atlantic croaker spermatozoa: evaluation of morphological changes. **Journal of Experimental Zoology**, v.264, p.444-453, 1992.

HE, S.; WOODS, L.C. Effects of dimethyl sulfoxide and glycine on cryopreservation induced damage of plasma membranes and mitochondria to striped bass (*Morone saxatilis*) sperm. **Cryobiology**, v.48, p.254-262, 2004.

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis In: **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção** / Eds. Angelo Barbosa Monteiro Machado, Gláucia Moreira Drummond, Adriano Pereira Paglia. – 1.ed. – Brasília, DF: MMA; Belo Horizonte, MG: Fundação Biodiversitas, v.2, 2008. 1420 p.

KAMLER, E. Parent-egg-progeny relationships in teleost fishes: an energetics perspective. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v.15, p.399-421, 2005.

KERBY, J.H. Cryogenic preservation of sperm from striped bass, **Transactions of the America Fisheries Society**, v.112, p.86-94, 1983.

KOPEIKA, J.; KOPEIKA, E.; ZHANG, T.; RAWSON, D.M.; HOLT, W.V. Effect of DNA repair inhibitor (3-aminobenzamide) on genetic stability of loach *(Misgurnus fossilis*) embryos derived from cryopreserved sperm. **Theriogenology**, v.61, p.1661-1673, 2004.

LAHNSTEINER, R.; WEISMANN, T.; PATZNER, D.R.A. Fine structural changes in spermatozoa of the grayling, *Thymallus thymallus* (Pisces: Teleostei), during routine cryopreservation. **Aquaculture,** v.103, p.73-84, 1992.

MAISSE, G. Cryopreservation of fish semen: a review. *In* **Proceedings of Refrigeration and Aquaculture Conference**, Bordeaux, France, March/1996, p.443-466, 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,** v.260, p.298-306, 2006a.

MARIA, A.N.; VIVEIROS, A.T.M.; ORFAO, L.H.; OLIVEIRA, A.V.; MORAES, G.F. Effects of cooling and freezing on sperm motility of the endangered fish piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Characiformes, Characidae). **Animal Reproduction**, v.3, p.55-60, 2006b.

MARQUES, S.; GODINHO, H.P. Short term cold storage of sperm from six Neotropical Characiformes fishes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.47, p.799-804, 2004.

MAZUR, P. Freezing of living cells, mechanisms and implications**. American Journal of Physiology**, v.247, (Cell Physiology 16) p.C125-C142, 1984.

MCCLEAN, R.V.; HOLT, W.V.; JOHNSTON, S.D. Ultrastructural observations of cryoinjury in kangaroo spermatozoa. **Cryobiology**, v.54, p.271-280, 2007.

MURGAS, L.D.S.; FRANCISCATO, R.T.; SANTOS, A.G.O. Avaliação espermática pós-descongelamento em piracanjuba (*Brycon orbignyanus*, Vallenciennes, 1849). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, p.1810-1814, 2003.

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

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**, v.49, p.651-659, 2006.

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

OGIER DE BAULNY, B.; LE BERN, L.; KERBOEUF, D.; MAISSE, G. Flow cytometric evaluation of mitochondrial activity and membrane integrity in fresh and

cryopreserved rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) spermatozoa, **Cryobiology**, v.34, p.141-149, 1997.

PÉREZ-CEREZALES, S.; MARTÍNEZ-PÁRAMO, S.; BEIRÃO, J.; HERRÁEZ, M.P. Fertilization capacity with rainbow trout DNA-damaged sperm and embryo developmental success. **Reproduction**, v139. p.989-997, 2010.

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

SCHULTE, R.T.; OHL, D.A.; SIGMAN, M.; SMITH, G.D. Sperm DNA damage in male infertility: etiologies, assays, and outcomes. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics** v.27, p.3-12, 2010.

SEGOVIA, M.; JENKINS, J.A.; PANIAGUA-CHAVEZ, C.; TIERSCH, TR. Flow cytometric evaluation of antibiotic effects on viability and mitochondrial of refrigerated spermatozoa of Nile tilapia, **Theriogenology,** v.53, p.1489-1499, 1999.

SHIMODA, E.; ANDRADE, D.R.; VIDAL JÚNIOR, M.V.; GODINHO, H.P.; YASUI, G.S. Determinação da razão ótima de espermatozoides por ovócito de piabanha *Brycon insignis* (Pisces - Characidae). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, p.877-882, 2007.

TADDEI, A.R.; BARBATO, F.*;* ABELLI, L.*; CANES*E, S.; FAUSTO, A.M.; RANA, K.J.; MAZZINI, M. Is cryopreservation a homogeneous process? Ultrastructure and motility of untreated, prefreezing, and postthawed spermatozoa of *Diplodus puntazzo* (Cetti). **Cryobiology**, v. 42, p.244-255, 2001.

VARELA JUNIOR, A.S.; CORCINIB, C.D.; GHELLERB, S.M.M.; JARDIM, R.D.; LUCIA JR., T.; STREIT JR., D.P.; FIGUEIREDO, M.R.C. *Use of amides as cryoprotectants in extenders for frozen sperm* of *tambaqui*, *Colossoma macropomum*. **Theriogenology**, v.78, p.244-251, 2012.

VIVEIROS, A.T.; SO, N.; KOMEN, J. Sperm cryopreservation of African catfish, *Clarias gariepinus:* cryoprotectants, freezing rates and sperm:egg dilution ratio. **Theriogenology**, v.54, p.1395-1408, 2000.

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

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) sêmen. **Animal Reproduction Science** v.112, p.293-300, 2009.

YAO, Z.; CRIM, L.W.; RICHARDSON, G. F.; EMERSON, C.J. Motility, fertility and ultrastructural changes of ocean pout (*Macrozoarces americanus* L.) sperm after cryopreservation. **Aquaculture**, v.181, p.361-375, 2000.

CAPÍTULO III

Solução para inativação dos ovócitos de *Brycon amazonicus* Spix & Agassiz, 1829 (Characiformes, Characidae)

Revista: "The Journal of Experimental Zoology - Part A: Ecological Genetics and Physiology" (ISSN: 932-5231); Qualis Capes A2 (Zootecnia/Recursos Pesqueiros); Fator de impacto: 1,608

Resumo

Para obter sucesso, as investigações que envolvem estudos androgenéticos devem estar focadas não somente na dose de irradiação UV para inativação do genoma dos ovócitos, mas também na solução utilizada durante a irradiação. As soluções Dulbecco's-PBS (D-PBS), Ringer e Hanks foram enriquecidas com 0,5% de albumina bovina sérica (BSA), e avaliadas quanto à eficiência na preservação dos ovócitos após o tempo de manutenção 0 (controle), 30, 60, 90 e 120 minutos, à temperatura ambiente de 25ºC. Os ovócitos mantidos em solução de Ringer apresentaram a formação de espaço perivitelínico, indicando que a solução é capaz de ativar os ovócitos. Além disso, os valores para eclosão larval, cujos ovócitos vieram da manutenção em solução de Ringer, em todos os tempos, foram zero, sugerindo menor capacidade de preservação desta solução. As soluções D-PBS e Hanks foram capazes de manter a capacidade de fertilização dos ovócitos. No entanto, a solução D-PBS manteve os ovócitos preservados por 90 minutos, mas diminui significativamente quando comparado ao grupo controle, conforme o tempo de manutenção. Com 30 minutos de manutenção em D-PBS, foram registradas os maiores valores para eclosão larval (14,79 ± 21,60%) e larvas normais (9,41 ± 13,11%). Partindo destes resultados, a solução D-PBS poderá ser utilizada como meio de irradiação para os ovócitos de *B. amazonicus*, e estas informações abrem novas possibilidades no campo da androgênese para reconstituição de espécies de *Brycon* ameaçadas de extinção.

Palavras-chave: *Brycon amazonicus*; Androgênese; Biotecnologia reprodutiva; Meio para Irradiação UV; Ovócito.

1. Introdução

A androgênese consiste em um procedimento por manipulação cromossômica que pode ser definido como reprodução uniparental, sem qualquer contribuição do núcleo materno, o qual é geneticamente inativado por irradiação e fertilizado com um espermatozoide normal (MORISHIMA et al. 2011).

A técnica oferece uma promissora abordagem para auxiliar na recuperação de espécies ameaçadas de extinção, utilizando-se espermatozoides criopreservados, por exemplo, como um banco de genes (FUJIMOTO et al. 2007). Apesar das vantagens que a criopreservação oferece, servindo para a reprodução artificial de rotina, por exemplo, este procedimento, caso não seja aliado à outra técnica, não se torna proveitoso quando se leva em consideração a restauração de espécies, haja vista que ainda não é satisfatória a tecnologia para criopreservar ovócitos de peixes para futuras fertilizações (RALL, 1993).

Sendo assim, a androgênese torna-se a via prática para recuperar espécies que estejam ameaçadas de extinção, por meio da utilização de bancos de germoplasma. Em outras palavras, é a combinação das técnicas de criopreservação e indução à androgênese que poderá permitir a reconstituição de espécies ameaçadas de extinção (THORGAARD et al. 1990; GWO et al. 1999; YASUI et al. 2010).

A inativação genética completa do núcleo do ovócito é a primeira etapa indispensável à produção de embriões androgenéticos em teleósteos, pois cromossomos maternos são frequentemente observados na progênie androgenética como consequência de uma incompleta irradiação UV, muitas vezes devido à fraca penetração (ARAI et al. 1992; LIN e DABROWSKI, 1998). Esta transferência acidental de cromossomos à progênie resulta na indesejada "impureza genômica" dos androgenéticos (ARAI et al. 1995).

O primeiro passo para esta etapa é desenvolver um meio de irradiação para os ovócitos e, neste caso, a solução na qual os ovócitos devem permanecer durante o processo de irradiação é aquela capaz de manter a viabilidade dos ovócitos não fertilizados. Para tanto, este meio deve apresentar baixa viscosidade e toxicidade para os gametas (YASUI et al. 2010).

Outro ponto a ser levado em consideração na primeira etapa é a dose propícia de exposição à irradiação UV, de forma a garantir que não haja permanência de resquícios de cromossomos que possam ser transferidos à progênie (ARAI et al. 1995).

Abordagens que utilizam apenas a análise do fenótipo como comprovação da androgênese não podem excluir a possibilidade de que a inativação do genoma materno foi parcialmente bem sucedida, e que o material genético materno residual está presente na progênie (FUJIMOTO et al. 2007). Por isso, a citogenética e a citometria de fluxo para averiguar o conteúdo do DNA são ferramentas importantes para confirmar o sucesso do desenvolvimento androgenético, com inativação completa do núcleo do ovócito (LIN e DABROWSKI, 1998).

Apesar da importância de se realizar a primeira etapa da indução à androgênese com sucesso, poucos estudos experimentais têm-se centrado na determinação dos meios mais eficazes para atingir a inativação completa do genoma de origem materna (FUJIMOTO et al. 2007).

Estudos que envolvem a técnica de androgênese em espécies nativas não foram encontrados na literatura, sendo de grande valia o início das investigações envolvendo, especialmente, espécies de peixes nativos que estejam ameaçadas de extinção. O gênero *Brycon*, por exemplo, apresenta muitas espécies na "Lista de Espécies Aquáticas Ameaçadas de Extinção", sendo *Brycon devillei*, *Brycon insignis*, *Brycon nattereri*, *Brycon opalinus*, *Brycon orbignyanus* e *Brycon vermelha* (In MMA 05/04, 2008).

Abordando o tema androgênese, podem ser citados os trabalhos em truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss* (SCHEERER et al. 1986), carpa comum, *Cyprinus carpio* (GRUNINA et al. 1990; BONGERS et al. 1994), esturjão siberiano, *Acipenser baerii* (GRUNINA e NEIFAKH, 1991), tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus* (MYERS et al. 1995), "zebrafish", *Brachydanio rerio* (CORLEY-SMITH et al. 1996), kinguio, *Carassius auratus* (BERCSENYI et al. 1998).

Aliando as técnicas de criopreservação e androgênese, podem ser citadas algumas pesquisas como truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* (SCHEERER et al. 1991; BABIAK et al. 2002), kinguio *Carassius auratus* (BERCSENYI et al. 1998), barbo rosado *Puntius conchonius* (KIRANKUMAR e PANDIAN, 2004), esturjão estrelado *Acipenser stellatus* (GRUNINA et al. 2006, 2011), *Hemigrammus caudovittatus* (DAVID e PANDIAN, 2006), "dojo loach" ou "weather loach", *Misgurnus anguillicaudatus* (YASUI et al. 2010).

Considerando os aspectos acima mencionados, este trabalho teve como objetivo encontrar a solução propícia para preservar os ovócitos de *B. amazonicus* para que, posteriormente, a primeira etapa de indução à androgênese seja concretizada, podendo

esta técnica ser empregada em outras espécies do gênero *Brycon* que estejam ameaçadas de extinção.

2. Material e métodos

O estudo foi conduzido nas dependências do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - CEPTA/ICMBio, Pirassununga, São Paulo, Brasil, entre Novembro de 2012 e Dezembro de 2013.

2.1. Coleta de ovócitos

B. amazonicus (= *B. cephalus*), matrinxã, foi a espécie escolhida como doadora dos ovócitos para o presente trabalho. A espécie pode ser considerada modelo padrão para estudos relacionados com a recuperação/reconstituição das demais espécies do gênero *Brycon*, que se encontram fortemente ameaçadas de extinção.

No total, foram utilizadas três fêmeas de *B. amazonicus* morfologicamente aptas para a reprodução (abdômen arredondado, papila urogenital avermelhada e coloração e tamanho dos ovócitos uniformes) que receberam tratamento hormonal com injeção de solução de Ovopel® (D-Ala, Pro-Net-mGnRH, Unic-trade, Hungary), em duas aplicações, com intervalo de 12 horas, nas doses de 0,5 mg e 5 $mg.Kg^{-1}$ de peso vivo, respectivamente.

Seis horas após a segunda aplicação, as fêmeas foram retiradas das caixas e transferidas para recipiente contendo solução anestésica de mentol (marca Êxodo Científica - concentração de 100 a 200 $mg.L^{-1}$, de acordo com o comportamento do peixe, até que atingisse o estágio profundo de anestesia), visando minimizar os efeitos do estresse durante o manejo, garantindo o bem-estar animal. Após anestesia, as fêmeas foram submetidas à massagem abdominal, no sentido céfalo-caudal, para extrusão dos ovócitos e coleta em béquer (**Anexo 5A**).

2.2. Coleta do sêmen

Foram utilizados um total de três machos de *B. amazonicus* (=*B. cephalus*) morfologicamente aptos para a reprodução (liberavam esperma sob leve pressão da papila urogenital) os quais não receberam tratamento hormonal. A fertilização dos ovócitos foi realizada utilizando-se um único macho que era retirado de sua caixa e transferido para recipiente contendo solução anestésica de mentol (marca Êxodo Científica - concentração

de 100 a 200 mg.L^{-1}, de acordo com o comportamento do peixe, até que atingisse o estágio profundo de anestesia), visando minimizar os efeitos do estresse durante o manejo, garantindo o bem-estar animal.

Após anestesia, foi submetido à massagem abdominal, no sentido céfalo-caudal, para coleta do sêmen. O reprodutor foi manipulado com precaução para que não houvesse a contaminação do sêmen com urina, sangue ou água do tanque, circunstâncias que poderiam ativar o sêmen. O sêmen foi coletado em béquer (**Anexo 5B**) e mantido à temperatura controlada de 2,5ºC (em incubadora refrigerada tipo B.O.D.).

2.3. Avaliação do meio para irradiação UV

Com a finalidade de se encontrar a solução propícia para preservar os ovócitos da *B. amazonicus* foram testadas soluções que possuem em sua composição sais e componentes essenciais para a manutenção da célula, sendo a escolha das soluções de Ringer e Hanks baseada em dados obtidos por DAVID E PANDIAN (2006) e YASUI et al. (2010). A presente pesquisa foi a primeira a utilizar a solução de D-PBS com a finalidade de preservação de ovócitos:

- Solução de Ringer (7,5 g/L NaCl, 0,2 g/L KCl, 0,2 g/L $CaCl_2$) contendo 0,5% de BSA (*Bovine serum albumin* - albumina bovina sérica);

- Solução de Hanks - *Hanks*' *Balanced Salt Solution* (*HBSS*) (137mM NaCl, 5,4 mM KCl, 0,25 mM Na_2HPO_4, 0,44 mM KH_2PO_4, 1,3 mM $CaCl_2$, 1mM $MgSO_4$, 4,2 mM $NaHCO_3$) contendo 0,5% de BSA;

- Solução de D-PBS - *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* (9,6g/L), contendo 0,5% de BSA.

Após o preparo das três soluções, 150 mL de cada uma foram armazenados em placas de Petri (150 mm de diâmetro e 30 mm de profundidade), separadamente, e permaneceram à temperatura ambiente de 25ºC (temperatura controlada). Logo em seguida, uma alíquota de ovócitos oriundos de uma fêmea, foi mantida em cada uma das soluções.

A cada 30 minutos após a manutenção destes ovócitos nas soluções, até perfazer o total de duas horas (tempo total de avaliação), ou seja, aos 30, 60, 90 e 120 minutos, grupos de 0,5 mL de ovócitos foram retirados das placas de Petri e transferidos para um béquer, sendo fertilizados com 50 µL de sêmen fresco de *B. amazonicus* e ativados com 3 mL de água do tanque.

Posteriormente, os ovos foram incubados em placas de Petri (150 mm de diâmetro e 25 mm de profundidade), adicionando-se cerca de 250 mL de água do tanque, permanecendo à temperatura ambiente de 25,0ºC (temperatura controlada). Um lote de ovócitos "secos" (sem contato com as soluções) também foi fertilizado com sêmen fresco, ativado com água do tanque, e incubado em placa de Petri nas mesmas condições experimentais dos tratamentos, no início do experimento, e serviu como grupo controle. Considerando-se as três soluções com os quatro tempos de armazenamento, mais o grupo controle, houve um total de 13 tratamentos (**Anexo 5C**).

Foram realizadas três repetições acerca da solução propícia para preservar os ovócitos de *B. amazonicus*, utilizando-se no total três fêmeas. É necessário que os ovócitos sejam oriundos de uma única fêmea, para se realizar a confirmação da paternidade através de marcadores moleculares. Para que se possa afirmar que foram produzidos androgenéticos, amostras das nadadeiras das fêmeas doadoras de ovócitos e dos machos utilizados para a androgênese devem ser coletados para posterior análise.

A fim de que fosse garantido um aporte de oxigênio aos embriões que permaneceram incubados nas placas de Petri, ocorreu a troca de água por quatro vezes até o momento da eclosão das larvas, sendo a primeira troca realizada no momento da observação da fase de blástula. Nesta fase, perfazendo cerca de 2 horas pós-fertilização (hpf), e na fase de somitogênese (15 hpf), foram contados os embriões vivos e mortos, sendo estes últimos retirados da placa de Petri para que não interferissem no desenvolvimento normal dos demais embriões. A taxa de eclosão foi mensurada entre 22 e 24 hpf, intervalo no qual as larvas dos tratamentos eclodiram, determinando-se também a porcentagem de larvas normais e anormais.

2.4. Análise estatística

Os dados foram expressos como Média ± Erro Padrão. Os resultados foram submetidos ao teste de normalidade (Lilliefors; α=5%). Os valores dos parâmetros avaliados (porcentagem de eclosão larval e de larvas normais) foram transformadas pelo arco seno da raiz quadrada do valor da variável, submetidas à análise de variância ANOVA e, havendo diferença significativa entre médias, comparados entre si pelo teste de Tukey (α=5%). O software empregado foi o STATISTICA v.7.0 (StatSoft).

3. Resultados

A análise sob estereomicroscópio de amostras dos ovócitos mantidos nas diferentes soluções mostrou que, em solução de Ringer, os mesmos apresentaram a formação de espaço perivitelínico, fato observado desde o tempo de permanência de 30 minutos na solução até o tempo total de avaliação, 120 minutos (**Figura 1A e 1B**).

Por outro lado, este fenômeno não foi constatado para os ovócitos mantidos nas outras duas soluções, Hanks (**Figura 1C e 1D**) e D-PBS (**Figura 1E e 1F**), quando se observou os ovócitos ao longo do tempo de permanência nas soluções, até perfazer o tempo total de avalição do estudo, e também não foi constatado nos ovócitos "secos" (grupo controle).

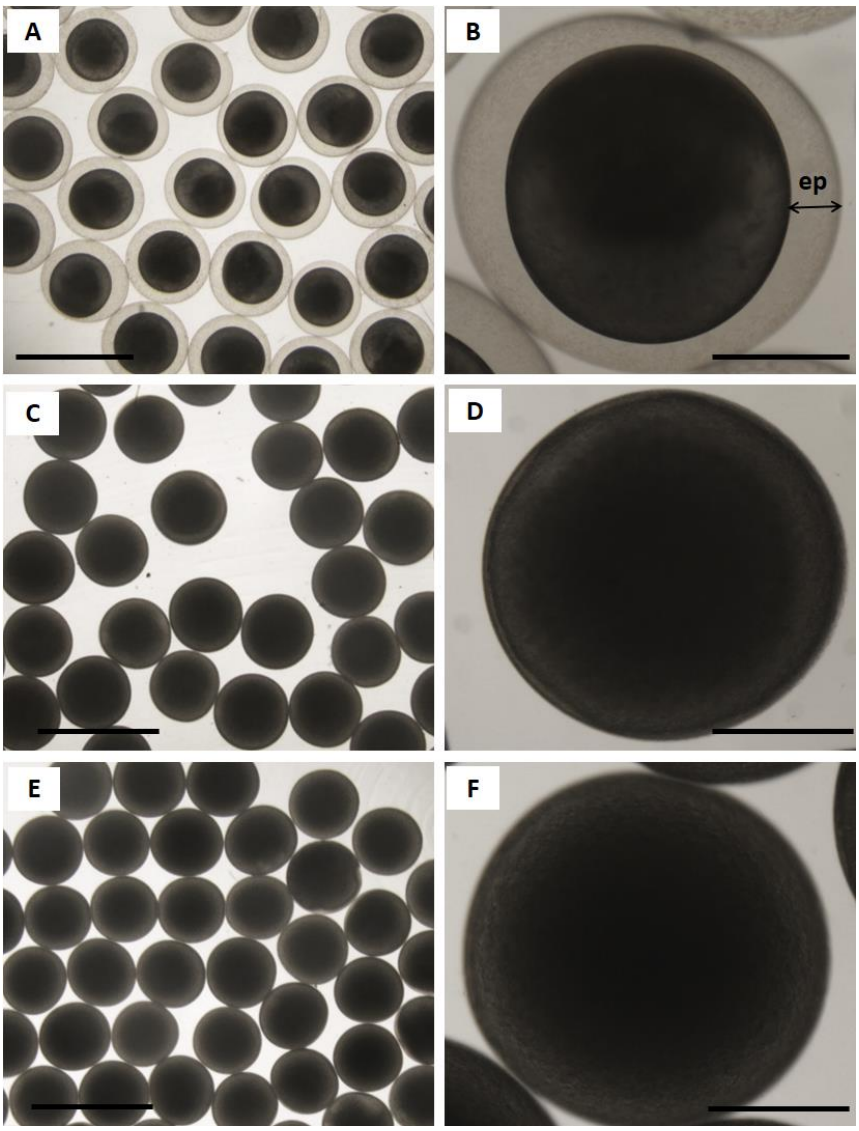


Figura 1. Ovócitos de *Brycon amazonicus* mantidos por 120 minutos na solução de Ringer (A e B), solução de Hanks (C e D) e na solução de D-PBS (E e F). Abreviatura: ep = espaço perivitelínico. Escala das barras: A, C e E: 2000 µm; B, D e F: 500 µm.

Realizado o processo de fertilização das amostras de ovócitos após manutenção nos tempos de 30, 60, 90 e 120 minutos, nas três soluções, foi possível perceber que houve uma grande quantidade de ovócitos fertilizados (fase de blástula, cerca de 2 horas pós-fertilização - hpf) em todos os tratamentos. O percentual de ovócitos fertilizados é verificado na **Figura 2** como a somatória de "Não eclodidos", "Normais" e "Anormais" uma vez que se refere à porcentagem de embriões em fase de blástula que prosseguiram o desenvolvimento. Pode-se observar que ovócitos "Não fertilizados" referem-se ao total de ovócitos da amostra inicial de cada tratamento subtraindo-se a porcentagem de embriões em fase de blástula.

Com 15 hpf, na fase de somitogênese, foi observada a morte de todos os embriões oriundos dos ovócitos mantidos na solução de Ringer durante os quatro tempos avaliados, sendo estes descartados. Dessa forma, os estudos prosseguiram com os embriões provenientes da permanência em solução de Hanks e D-PBS.

Pode-se perceber que, apesar da grande quantidade de ovócitos fertilizados, como relatado anteriormente, apenas uma pequena porcentagem desenvolveu-se atingindo o estágio de eclosão, mostrado na **Figura 2** como a somatória da porcentagem de larvas "Normais" e "Anormais". Observando-se a comparação das médias da variável eclosão larval, na **Figura 2**, percebe-se que o grupo controle foi superior (29,72 ± 18,15%) e diferiu dos demais tratamentos (P<0,05).

Os tratamentos D-PBS nos tempos de permanência 30, 60 e 90 minutos de manutenção na solução mostraram os maiores valores para eclosão larval, 14,79 ± 21,60%, 7,69 ± 3,98% e 4,01 ± 4,27%, respectivamente, não diferindo estatisticamente entre si (P>0,05), sendo semelhantes ao controle (29,72 ± 18,15%) e aos demais tratamentos (P<0,05), cujos valores foram 6,48 ± 11,22% para Hanks com tempo de permanência dos ovócitos de 30 minutos, 0,77 ± 1,33% para Hanks com 60 minutos de manutenção e 0% para os tratamentos restantes (**Figura 2**).

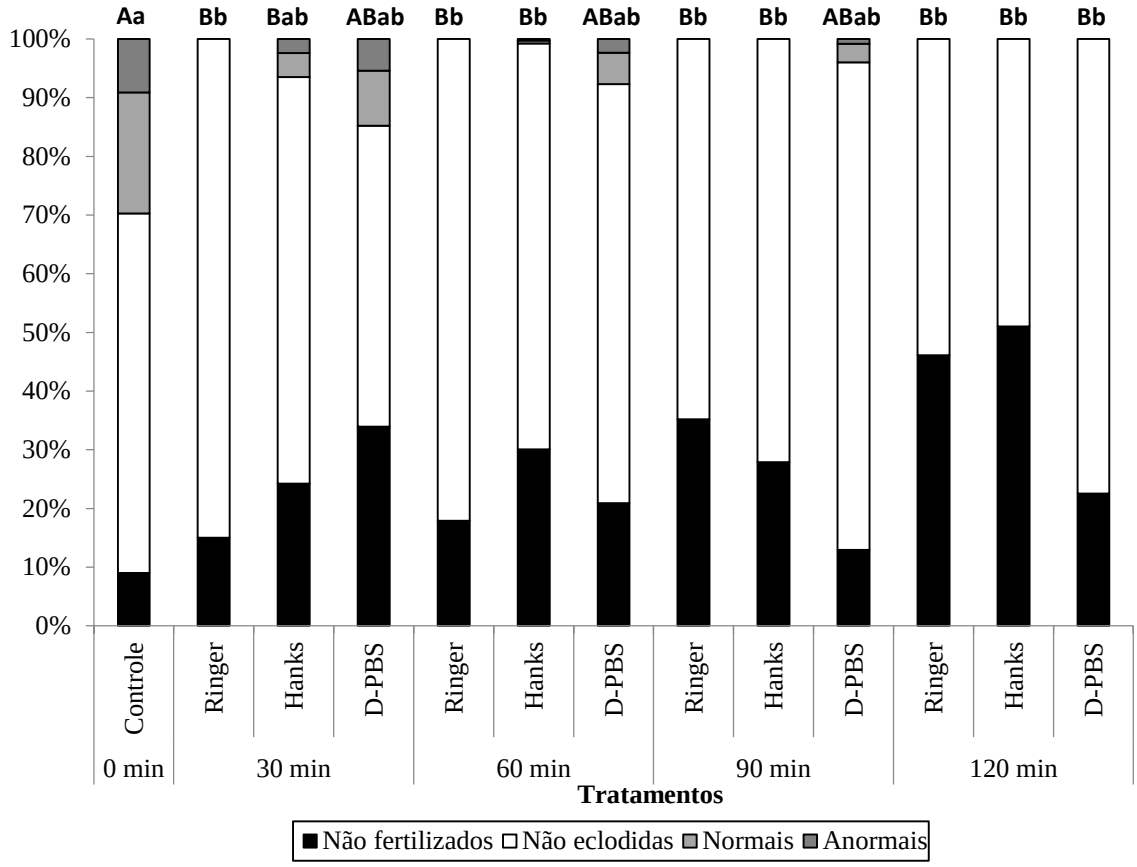
Apesar de serem considerados estatisticamente iguais, quando se observa os tratamentos percebe-se que, em termos de média, ocorre uma diminuição dos valores conforme o tempo de permanência dos ovócitos na solução, sendo que, ovócitos mantidos em D-PBS por 30 minutos registraram o maior porcentual de eclosão larval (14,79 ± 21,60%), enquanto ovócitos com tempo de permanência de 90 minutos na mesma solução originou uma porcentagem baixa de eclosão (4,01±4,27%).

Este fato implica que o tempo de permanência maior dos ovócitos nas soluções influencia negativamente no desenvolvimento das larvas. É possível observar pela **Figura**

2 que as larvas advindas dos ovócitos com tempo de permanência de 120 minutos, nas três soluções, não atingiram a eclosão. Percebeu-se também que a solução de Hanks com tempo de manutenção dos ovócitos de 60 minutos causou baixa porcentagem de eclosão (0,77 ± 1,33%), sendo que, com 90 minutos de permanência nesta mesma solução, a porcentagem de larvas eclodidas registrada foi de 0%.

Em relação à porcentagem de larvas "Normais", a maior porcentagem (20,63 ± 15,20%) foi relatada para o grupo controle, diferindo dos demais tratamentos ($P<0,05$). Para esta variável, não foi verificada diferença significativa ($P>0,05$) entre os tratamentos D-PBS nos tempos de permanência 30, 60 e 90 minutos e o tratamento Hanks com 30 minutos de manutenção, os quais apresentaram valores 9,41 ± 13,11%, 5,37 ± 4,03%, 3,17 ± 4,91 e 4,05 ± 7,01%, respectivamente, sendo considerados estatisticamente semelhantes ao controle (20,63 ± 15,20%) e aos demais tratamentos ($P<0,05$), cujos valores assumidos foram 0,51 ± 0,89% para a solução de Hanks com permanência de 60 minutos dos ovócitos, e 0% para os demais.

Assim como observado para os valores de eclosão, embora sejam considerados estatisticamente iguais, os valores para solução D-PBS com tempos 30, 60 e 90 minutos de manutenção são, em termos de média, decrescentes, mostrando que uma maior porcentagem de larvas normais foi registrada quando os ovócitos permanecem por menos tempo na solução.



Valores assinalados com letras maiúsculas idênticas e minúsculas idênticas denotam diferenças não significativas pelo Teste de Tukey (P<0,05). Letras maiúsculas comparam porcentagem de eclosão larval ("Normais" + "Anormais") e letras minúsculas comparam porcentagem de larvas "Normais".

Figura 2. Porcentagem média de ovos "Não fertilizados", larvas "Não eclodidas", larvas "Normais" e "Anormais" após preservação dos ovócitos de *Brycon amazonicus* nas soluções de Ringer, Hanks e D-PBS com tempos de permanência de 30, 60, 90 e 120 minutos.

4. Discussão

Embora a inativação genética do núcleo dos ovócitos seja um passo indispensável para a produção de embriões androgenéticos em teleósteos, poucos estudos experimentais têm-se focado na determinação dos meios mais eficazes para atingir a inativação completa do genoma de origem materna (FUJIMOTO et al. 2007).

Para se obter sucesso e alcançar melhores taxas de sobrevivência, as investigações que envolvem androgenéticos devem estar focadas não somente na dose de irradiação UV para inativação dos ovócitos, mas também no meio de irradiação. O tipo de solução utilizada para preservação dos ovócitos durante a irradiação é um fator-chave (YASUI et al. 2010) e, no entanto, poucos estudos têm registrado a capacidade de

fertilização e taxa de eclosão das distintas espécies de peixes de água doce, após manutenção dos ovócitos em soluções de preservação (LINHART et al. 2001).

A adição de uma solução durante o momento de irradiação UV é importante para manter a capacidade de fertilização dos ovócitos após a irradiação, além de proporcionar a dispersão dos ovócitos em monocamada, especialmente quando ovócitos possuem a característica de serem adesivos. Esta dispersão em monocamada favorece uma irradiação UV homogênea nos ovócitos, importante para androgênese (LINHART et al. 2001).

Apesar de soluções sintéticas serem as mais recomendadas pelo fato de soluções naturais, como plasma seminal e fluido ovariano, exibirem diferentes teores devido à variação sazonal, e não serem prontamente disponíveis o ano todo (YASUI et al. 2010), diversos trabalhos utilizaram, com sucesso, soluções naturais como meio de irradiação para o peixe-zebra, *Danio rerio* (CORLEY-SMITH et al. 1996), muskellunge, *Esox masquinongy* (LIN e DABROWSKI, 1998), carpa comum, *Cyprinus carpio* (ROTHBARD et al. 1999) e também para o loach, *Misgurnus anguillicaudatus* (FUJIMOTO et al. 2007).

O uso de soluções sintéticas como meio de irradiação UV podem ser citados por Bongers et al. (1994; 1995), com fluido ovariano sintético, Myers et al. (1995), os quais utilizaram água, David e Pandian (2006), com solução de Ringer, Yasui et al. (2010), que obtiveram sucesso com a solução de Hanks e Taati et al. (2011), com fluido ovariano sintético (CACF - *Carp Artificial Coelomic Fluid*). No presente estudo, a solução sintética D-PBS foi utilizada pela primeira vez como meio de preservação para ovócitos, sendo testadas também as soluções sintéticas de Ringer e Hanks, baseadas na literatura.

A formação de espaço perivitelínico relatada nos ovócitos de *B. amazonicus* mantidos em solução de Ringer indicou que tal solução é capaz de hidratar os ovócitos desta espécie e, dessa forma, não tem potencial para ser um meio de manutenção durante a irradiação UV.

Quando ocorre a fertilização, a expansão do córion em ovos de peixe é devido à ativação da reação cortical, um processo em que ocorre a exocitose das enzimas contidas nos alvéolos corticais, fazendo com que seja iniciado um influxo osmótico, distanciando o córion da membrana plasmática do ovo, formando o chamado espaço perivitelínico (YAMAMOTO, 1961).

Porém, a reação cortical também pode ser induzida por vários agentes químicos (YAMAMOTO, 1961) e físicos (IWAMATSU, 1989). Sendo assim, pode-se inferir que

a hidratação constatada nos ovócitos de *B. amazonicus* mantidos em solução de Ringer, provavelmente foi consequência da ativação da reação cortical provocada pela solução.

Hsu e Goetz (1993) sugeriram que a formação do espaço perivitelínico acarreta em perda de capacidade de fertilização. Segundo Szollosi e Billard (1974), a perda da capacidade de fertilização é o resultado da vedação do orifício interno da micrópila.

Hsu e Goetz (1993) avaliaram a habilidade de inibidores de protease (adicionado à solução de Ringer) em bloquear a expansão do córion e preservar a fertilidade dos ovócitos de goldfish, (*Carassius auratus*), baseados no fato de que a expansão do córion durante a fertilização ou ativação dos ovócitos quando presentes na água das incubadoras esteja relacionado à proteólise.

Este estudo mostrou que a expansão do córion em ovos de goldfish pode ser completamente bloqueada com a utilização do inibidor de protease adequado na solução fisiológica salina Ringer, como o inibidor de tripsina da soja. Para examinar se os ovos se desenvolveram normalmente neste tratamento, o desenvolvimento dos embriões foi examinado às 48hpf, registrando-se uma taxa de 75,3 ± 14,2%, um valor não significativamente diferente do controle (88,0 ± 3,8%).

Iwamatsu et al. (1997) relataram que em estudo realizado por Takano e Onitake em 1989, com *Oryzias latipes*, medaka, utilizando tripsina em ovócitos não fertilizados por cinco minutos, houve oclusão total do terço inferior da micrópila, mesmo na ausência de exocitose de alvéolos corticais. E de acordo com Saad e Billard (1987) a capacidade de fertilização dos ovócitos de *Cyprinus carpio,* carpa comum, foi perdida três minutos após a imersão em água doce, sendo este fato documentado por Kudo et al. (1994), provavelmente devido ao fechamento do canal micropilar.

Hart e Yu (1980) relataram que, mesmo na ausência de sêmen, ovócitos ativados sofrem uma série programada de etapas de desenvolvimento. Inicialmente há uma redução quase instantânea no tamanho do ovócitos devido à contração da superfície, resultando em uma pequena separação inicial do córion da membrana plasmática do ovócito. Lee et al. (1999) complementaram dizendo que no momento em que a reação cortical é iniciada, o córion começa a se elevar e, alguns segundos após os primeiros sinais morfológicos de ativação, os espermatozoides já não são capazes de atingir a membrana plasmática por meio da micrópila.

Em *B. amazonicus*, porém, apesar da constatação da formação do espaço perivitelínico nos ovócitos mantidos na solução de Ringer, foi possível observar uma grande quantidade de embriões em fase de blástula (2 hpf), sugerindo a ocorrência de

fertilização pelos espermatozoides. Contudo, 100% destes embriões morreram na fase de somitogênese (15 hpf), fato que demonstra, provavelmente, toxicidade da solução de Ringer aos embriões.

É preciso salientar porém que, as fertilizações com espermatozoides ocorreram após 30, 60, 90 e 120 minutos de manutenção nas soluções, tempos em que os ovócitos mantidos na solução de Ringer apresentavam espaço perivitelínico e, de acordo com alguns pesquisadores (Hart e Yu, 1980; Saad e Billard, 1987; Hsu e Goetz, 1993; Kudo et al. 1994, Iwamatsu et al. 1997; Lee et al. 1999), tempos suficientes para o fechamento do orifício da micrópila e perda da capacidade de fertilização dos ovócitos.

Leung e Jamieson (1991) enfatizam que o impedimento da ativação do ovócito é um ponto crítico para o sucesso no armazenamento em curto prazo de ovócitos de peixes. No presente trabalho, as soluções D-PBS e Hanks foram capazes de manter a viabilidade e capacidade de fertilização dos ovócitos. Porém, a solução D-PBS trouxe as melhores taxas de eclosão larval e larvas normais de *B. amazonicus*, quando comparada às taxas advindas da solução de Hanks. Pode-se dizer que a solução de Hanks apresentou maior toxicidade, acarretando em menores taxas em relação à D-PBS e, além disso, com 90 e 120 minutos de manutenção em Hanks, os embriões morreram anteriormente à eclosão, mostrando que uma maior permanência na solução tornou-se prejudicial.

A solução D-PBS mostrou-se como a solução propícia para manutenção dos ovócitos com tempo máximo de permanência de 90 minutos. De acordo com Yasui et al. (2010), sabe-se que o tempo necessário para se inativar o núcleo dos ovócitos e fertilizar um lote é de, normalmente, menos de 10 minutos. Diante disso, e considerando que as maiores médias das taxas foram obtidas com 30 minutos de preservação, pode-se inferir que este tempo é satisfatório para ovócitos de *B. amazonicus*.

Yasui et al. (2010) testaram as soluções Hanks, Ringer (acrescidas de 0,5% de BSA) e plasma seminal de salmão, e tempos de permanência dos ovócitos de 10, 30, 60 e 120 minutos em loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. Os autores relatam que, em todas as soluções avaliadas, os valores das taxas de eclosão começaram a reduzir apenas após 60 minutos de armazenamento, e que as diferenças entre as soluções foram observadas apenas no tempo 120 minutos de manutenção, indicando como mais eficaz a solução de Hanks, cujas taxas de eclosão relativas foram de 85,6±7,1% e 32,0±18,5% para 10 e 120 minutos, respectivamente. Para o grupo controle, a taxa de eclosão foi de 54,3±14,9%.

Partindo dos resultados obtidos nesta pesquisa, pode-se dar continuidade ao processo da primeira etapa da androgênese, realizando-se os estudos com as doses de

irradiação necessária para inativação completa do genoma dos ovócitos de *B. amazonicus*, com utilização, como demonstrado, da solução D-PBS para preservação dos ovócitos da espécie.

5. Conclusão

A solução D-PBS é adequada para preservação dos ovócitos de *B. amazonicus*, considerando-se o tempo máximo de permanência na solução de 90 minutos, à temperatura ambiente de 25,0ºC.

6. Agradecimentos

Esta pesquisa foi conduzida com a aprovação do Comissão de Ética no Uso de Animais (017011/10), estando de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação. Este estudo recebeu o apoio financeiro da FAPESP (2010/12108-2) na forma de Bolsa de Doutorado e do CNPq (483995/2011-8). Os autores são gratos aos funcionários do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - CEPTA/ICMBio, pelo fornecimento do material biológico e utilização da infraestrutura no decorrer do desenvolvimento desta pesquisa.

7. Referências

ARAI, K.; IKENO, M.; SUZUKI, R. Production of androgenetic diploid loach *Misgurnus anguillicaudatus* using spermatozoa of natural tetraploids. **Aquaculture**, v.137, p.131-138. 1995.

ARAI, K.; MASAOKA, T.; SUZUKI, R. Optimum conditions of UV ray irradiation for genetic inactivation of loach eggs. **Nippon Suisan Gakkaishi** v.58, p.1197-1201, 1992.

BABIAK, I.; DOBOSZ, S.; GORYCZKO, K.; KUZMINSKI, H.; BRZUZAN, P.; CIESIELSKI, S. Androgenesis in rainbow trout using cryopreserved spermatozoa: the effect of processing and biological factors. **Theriogenology**, v.57, p.1229-1249, 2002.

BERCSENYI, M.; MAGYARY, I.; URBANYI, B.; ORBAN, L.; HORVATH, L. Hatching out goldfish from common carp eggs: interspecific androgenesis between two cyprinid species. **Genome**, v.41, p.573-579, 1998.

BONGERS, A.B.J.; ABRACA, J.B.; DOULABI, Z.; EDING, E.H., KOMEN, J. RICHTER, C.J.J. Maternal influence on development development of androgenetic clones of common carp, *Cyprinus carpio* L. **Aquaculture**, v.137, p.139-147, 1995.

BONGERS, A.B.J.; IN'T VELD, E.P.C.; ABO-HASHEMA, K., BREMMER, I.M. DING, E.H., KOMEN, J.; RICHTER, C.J.J. Androgenesis in common carp (*Cyprinus carpio* L.) using UV irradiation in a synthetic ovarian fluid and heat shocks. **Aquaculture,** v.122, p.119-132, 1994.

CORLEY-SMITH, G.E.; LIM, C.J.; BRANDHORST, B.P. Production of androgenetic zebrafish (*Danio rerio*). **Genetics**, v.142, p.1265-1276, 1996.

DAVID, C.J.; PANDIAN, T.J. Cadaveric sperm induces intergeneric androgenesis in the fish, *Hemigrammus caudovittatus*. **Theriogenology**, v.65, p.1048-1070, 2006.

FUJIMOTO, T., SAKAO, S., YAMAHA, E., ARAI, K. Evaluation of different doses of UV irradiation to loach eggs for genetic inactivation of the maternal genome. **Journal of Experimental Zoology**, v.307A, p.449-462. 2007.

GRUNINA, A. S.; REKOUBRATSKY, A.V.; TSVETKOVA, L.I.; BARMINTSEVA, A.E.; VASIL'EVA, E.D.; KOVALEV, K.V.; POLUEKTOVA, O.G. Dispermic androgenesis in sturgeons with the use of cryopreserved sperm: production of androgenetic siberian sturgeon and androgenetic hybrids between siberian and russian sturgeons. **Russian Journal of Developmental Biology**, v.42, p.108-119, 2011.

GRUNINA, A.S.; GOMELSKI, B.I.; NEIFAKH, A.A. Diploid androgenesis in carp. **Genetika,** v.26, p.2037–2043, 1990.

GRUNINA, A.S.; NEIFAKH, A.A. Induction of diploid androgenesis in the Siberian sturgeon *Acipenser baeri* Brandt. **Ontogenez**, v.22, p.53-56, 1991.

GRUNINA, A.S.; RECOUBRATSKY, A.V.; TSVETKOVA, L.I.; BARMINTSEV, V.A. Investigation on dispermic androgenesis in sturgeon fish: the first successful production of androgenetic sturgeons with cryopreserved sperm. **International Journal of Refrigeration**, v.29, p,379-386, 2006.

GWO, J.C., OHTA, H., OKUZAWA, K., WU, H.C. Cryopreservation of sperm from the endangered Formosan landlocked salmon (*Oncorhynchus masou formosanus*). **Theriogenology**, v.51, p.569-582, 1999.

HART, N.H.; YU, S.F. Cortical granule exocytosis and cell surfasse reorganization in eggs of *Brachidanio*. **Journal of Experimental Zoology**, v.213, p.137-159, 1980.

HSU, S.Y.; GOETZ, F.W. Inhibition of chorion expansion and preservation of fertility in goldfish (*Carassius auratus*) eggs by protease inhibitors. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v.50, p.932-935, 1993.

IWAMATSU, T. Exocytosis of cortical alveoli and its initiation time in medaka eggs induced by microinjection of vaious agents. **Development, Growth & Differentiation** v.31, p.39-44, 1989.

IWAMATSU, T.; YOSHIZAKI, N.; SHIBATA, Y. Changes in the chorion and sperm entry into the micropyle during fertilization in the teleostean fish, *Oryzias latipes*. **Development, Growth & Differentiation**, v.39, p.33-41, 1997.

KIRANKUMAR, S.; PANDIAN, T.J. Interspecific androgenetic restoration of rosy barb using cadaveric sperm. **Genome,** v.47, p.66-73, 2004.

KUDO, S.; LINHART, O.; BILLARD, R. Ultrastructural studies of sperm penetration in the egg of the European catfish (*Silurus glanis* L.). **Aquatic Living Resources**, v.7, p.93-98, 1994.

LEE, K.W.; WEBB, S.E.; MILLER, A.L. A wave of free cytosolic calcium traversers zebrafish eggs on activation. **Developmetal Biology**, v.214, p.168-180, 1999.

LEUNG, L.K.P.; JAMIESON, B.G.M. **Live preservation of fish gametes**. In: Jamieson BGM, editor. Fish evolution and systematics: evidence from spermatozoa. Cambridge: Cambridge University Press, pp: 245-69, 1991.

LIN, F.; DABROWSKI, K. Androgenesis and homozygous gynogenesis in muskellunge (*Esox masquinongy*): evaluation using flow cytometry**. Molecular Reproduction and Development,** v.49, p.10-18, 1998.

LINHART, O.; GELA, D.; RODINA M; RODRIGUEZ GUTIERREZ, M. Short-term storage of ova of common carp and tench in extenders. **Journal of Fish Biology**, v.59, p.616–623, 2001.

MORISHIMA, K.; FUJIMOTO, T.; SATO, M; KAWAE1, A.; ZHAO, Y.; YAMAHA, E.; ARAI1, K. Cold-shock eliminates female nucleus in fertilized eggs to induce *androgenesis* in the loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) ***BMC Biotechnology*** v.11, p.1-16, 2011.

MYERS, J.M.; PENMAN, D.J.; BASAVARAJU, Y.; POWELL, S.F.; BAOPRASERTKUL, P.; RANA, K.J.; BROMAGE, N.; MCANDREW, B.J. Induction of diploid androgenetic and mitotic gynogenetic Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). **Theoretical and *Applied Genetics***, v.90, p.205-210, 1995.

RALL, W.F. Recent advances in the cryopreservation of salmonid fishes. In: **Genetic Conservation of Salmonid Fishes** (J.G. Cloud & G.H. Thorgaard, eds.), Plenum, New York, p.137-58, 1993.

ROTHBARD, S.; RUBINSHTEIN, I.; DAVID, L.; SHELTON, W.L. Ploidy manipulations aimed to produce androgenetic Japanese ornamental (koi) carp, *Cyprinus carpio* L. **The Israeli Journal of *Aquaculture*/Bamidgeh,** v.51, p.26-39, 1999.

SAAD, A.; BILLARD, R. The composition and use of a sperm diluent in the carp, *Cyprinus carpio*. **Aquaculture,** p.66, p.329-345, 1987.

SCHEERER, P.D.; THORGAARD, G.H.; ALLENDORF, F.W. Genetic analysis of androgenetic rainbow trout. **Journal of Experimental Zoology,** v.260, p.382-390, 1991.

SCHEERER, P.D.; THORGAARD, G.H.; ALLENDORF, F.W.; KNUDSEN, K.L. Androgenetic rainbow trout produced from inbred and outbred sperm sources show similar survival. **Aquaculture,** v.57, p.289-298. 1986.

SZOLLOSI, D.; BILLARD, R. The micropyle of trout eggs and its reaction to different incubation media. **Journal of Microscopy**, v.21, p.55-62, 1974.

THORGAARD, G.H., SCHEERER, P.D., HERSHBERGER, W.K., MYERS, J.M. Androgenetic rainbow trout produced using sperm from tetraploid males show improved survival. **Aquaculture**, v.85, p.215-221, 1990.

YAMAMOTO. T. *Physiology of fertilization* in fish eggs. **International Review of Cytology**, v.12. p.361-405, 1961.

YASUI, G.S.; FUJIMOTO, T.; ARAI, K. Restoration of the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*, from cryopreserved diploid sperm and induced androgenesis. **Aquaculture**, v.308, p.S140-S144, 2010.

Considerações finais

As informações fornecidas neste trabalho a respeito da *Brycon vermelha* são inéditas. O conhecimento da biologia reprodutiva da vermelha é oportuno e urgente, especialmente quando se leva em consideração que a espécie foi recentemente descrita e já se encontra vulnerável devido à ação antrópica por meio da destruição e alteração do habitat, pesca predatória e uso para preparo de um prato típico da região onde ocorre (rio Mucuri-MG). Há uma grande necessidade de continuidade de pesquisas no tocante à sua recuperação/conservação e, certamente, a aplicação de biotecnologias como a criopreservação e a androgênese, que envolvem os estudos do sêmen. Conhecer as características seminais e a ultraestrutura dos espermatozoides da *B. vermelha* é, indubitavelmente, a base para estudos futuros, especialmente biotecnologia reprodutiva.

***

Com relação aos estudos com a *Brycon orbignyanus*, é de suma importância salientar que, embora as pesquisas referentes à criopreservação do sêmen da espécie não sejam inéditas, trabalhos que relatem a integridade dos espermatozoides que foram submetidos ao processo de criopreservação não foram encontrados na literatura. Esta integridade, observada por meio de imagens tridimensionais obtidas em microscopia eletrônica de varredura, mostraram as deformidades da superfície da cabeça e, principalmente, da peça intermediária. Da mesma forma, a visualização dos espermatozoides em microscopia eletrônica de transmissão forneceu detalhes necessários para verificar os danos causados ao revestimento da célula espermática (membrana nuclear) e às organelas, especialmente núcleo e mitocôndrias. As informações sobre as crioinjúrias trazidas por meio destas imagens correlacionadas aos valores da taxa e do tempo de duração da motilidade espermática pós-descongelamento e dos valores das taxas de fertilização e eclosão oriundas da utilização de sêmen criopreservado certamente tornaram o estudo inovador.

Fato interessante seria aprimorar a solução crioprotetora que proporcionou as menores crioinjúrias (à base de DMSO), criando uma solução capaz de trazer mínimas alterações ultraestruturais às células espermáticas. Existe uma demanda crescente em conservar os gametas de espécies ameaçadas de extinção. Em vista disso, é imprescindível que o processo de criopreservação não induza a alterações nas células espermáticas que possam prejudicar o desenvolvimento da progênie. Aperfeiçoar um protocolo de criopreservação de sêmen da *B. orbignyanus* é de grande valia, pois se

bancos de sêmen da espécie puderem ser mantidos, a reconstituição da espécie poderá ser realizada por meio de tecnologias altamente inovadoras, a androgênese. Um ponto importante a ser levado em consideração é a da queda da sobrevivência espermática ao longo do tempo de congelamento, com crioinjúrias acentuadas em um ano de armazenamento. Estes fatos sugerem a necessidade de maiores investigações para a compreensão de tais eventos, determinando-se quais fatores estariam agindo para esta ocorrência.

***

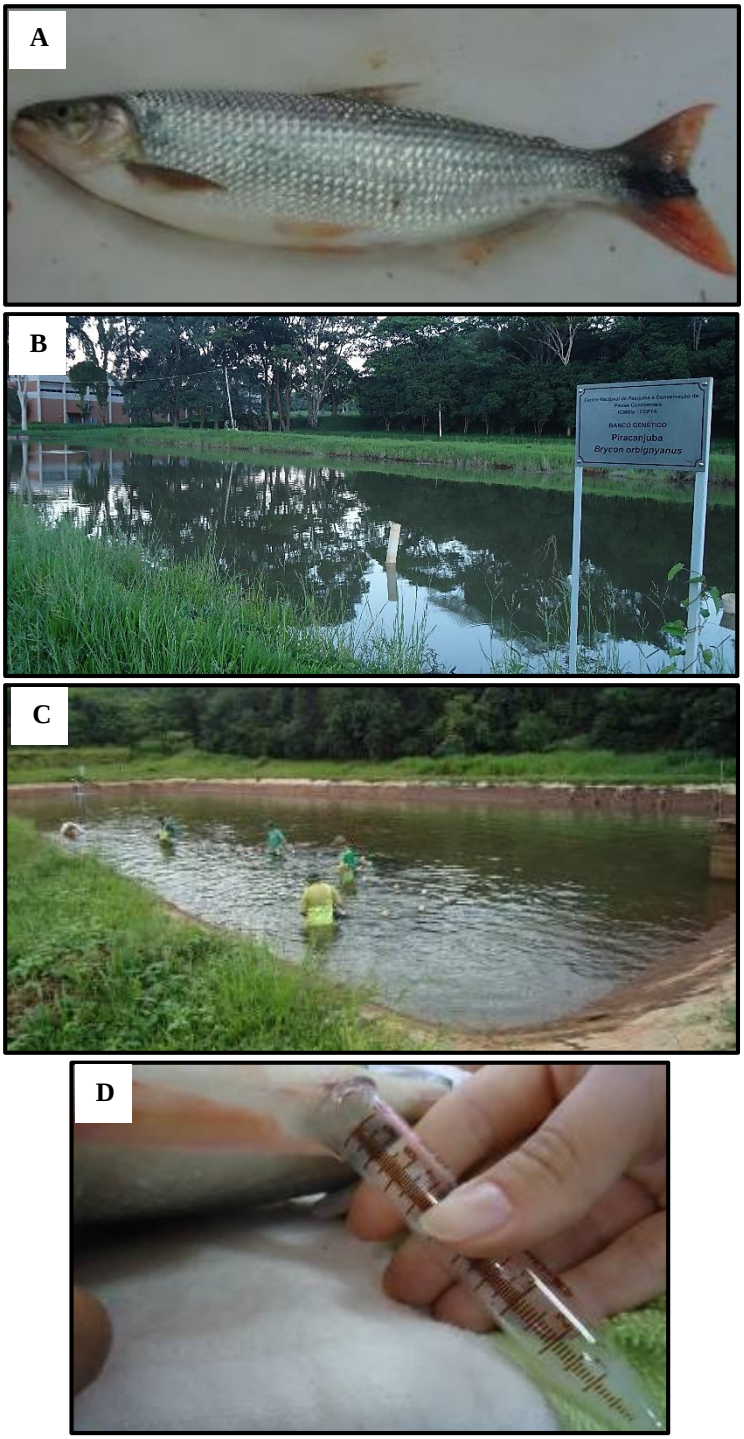
B. orbignyanus encontra-se em perigo, com risco alto de extinção em um futuro próximo, e necessita de medidas que garantam sua conversação/recuperação. Pesquisas que adotem biotecnologias, como a androgênese, com o intuito de reconstituição das espécies que se encontram ameaçadas são bem-vindas. A realização dos estudos que envolvem a primeira etapa da androgênese (inativação do genoma do ovócito) forneceu os primeiros relatos sobre a solução propícia para manter os ovócitos da *Brycon amazonicus* (espécie doadora de ovócitos). Com estas informações, os estudos com a biotécnica podem prosseguir, avaliando-se a dose ótima de irradiação UV para inativar o genoma dos ovócitos da espécie doadora. Dessa forma, por indução à androgênese, a reconstituição de espécies do gênero *Brycon* poderá ser concretizada.

ANEXO 1



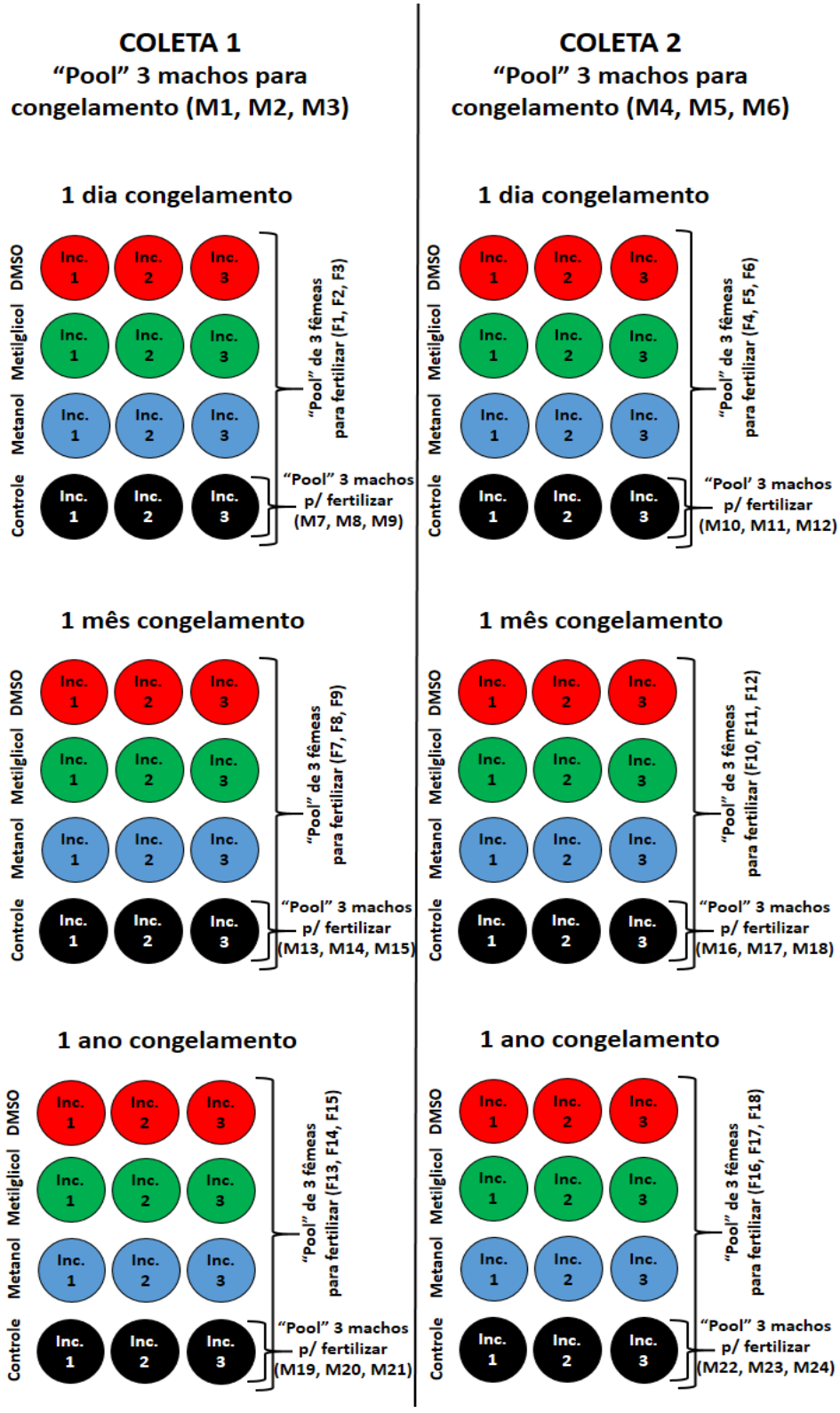
A: Exemplar de *Brycon vermelha*; **B:** Viveiro externo do ICMBio onde ficam exemplares de *Brycon vermelha;* **C:** Captura dos exemplares de *Brycon vermelha* utilizados para o experimento; **D:** Indução hormonal em macho de *Brycon vermelha*. **E:** Coleta do sêmen de *Brycon vermelha* em tudo de ensaio graduado. Fonte própria.

ANEXO 2



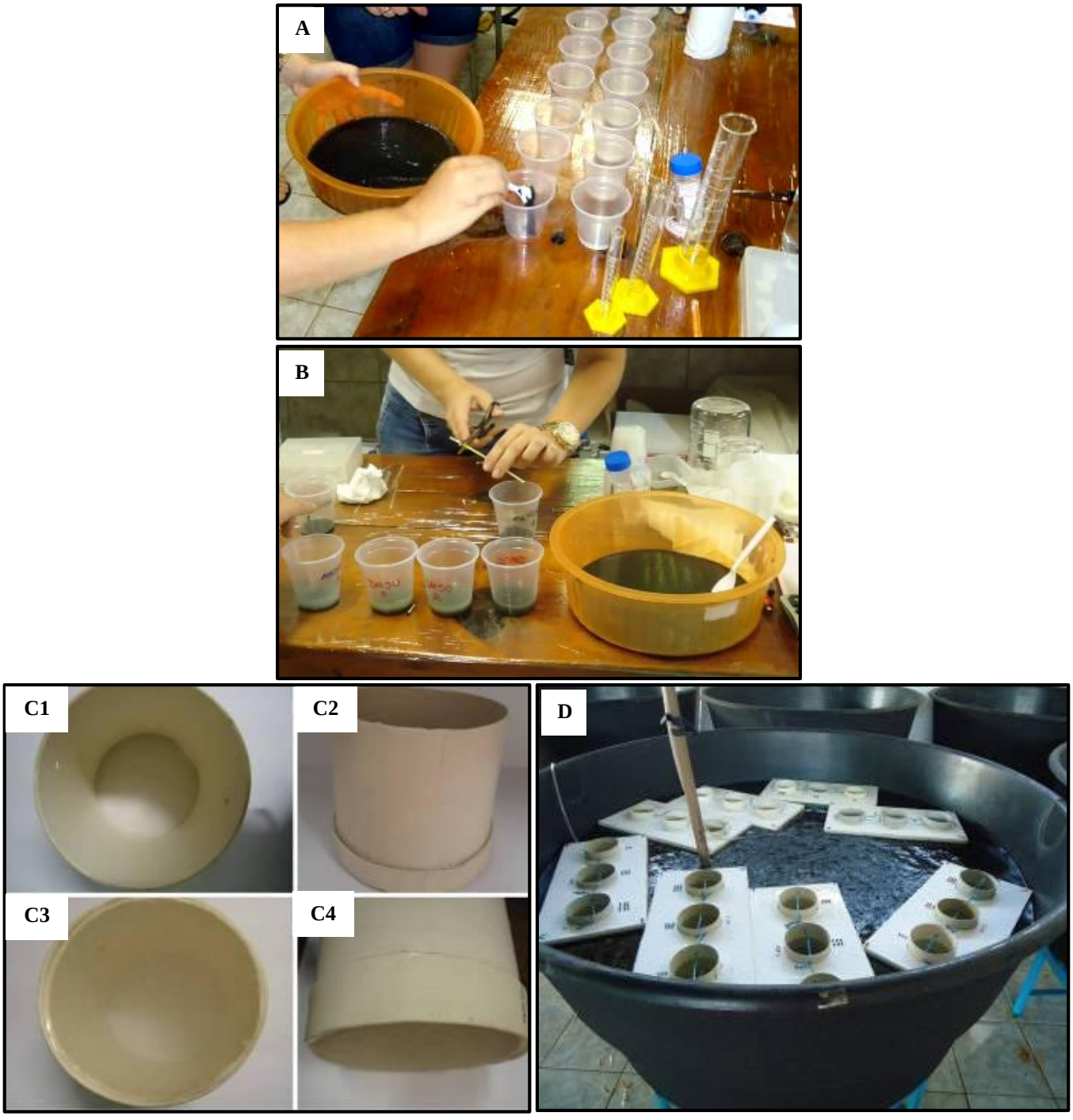
A: Exemplar de *Brycon orbignyanus*; **B:** Viveiro externo do ICMBio onde ficam exemplares de *Brycon orbignyanus;* **C:** Viveiro externo da CEMIG onde ficam exemplares de *Brycon orbignyanus* **D:** Coleta de sêmen de *Brycon orbignyanus*. Fonte própria.

ANEXO 3



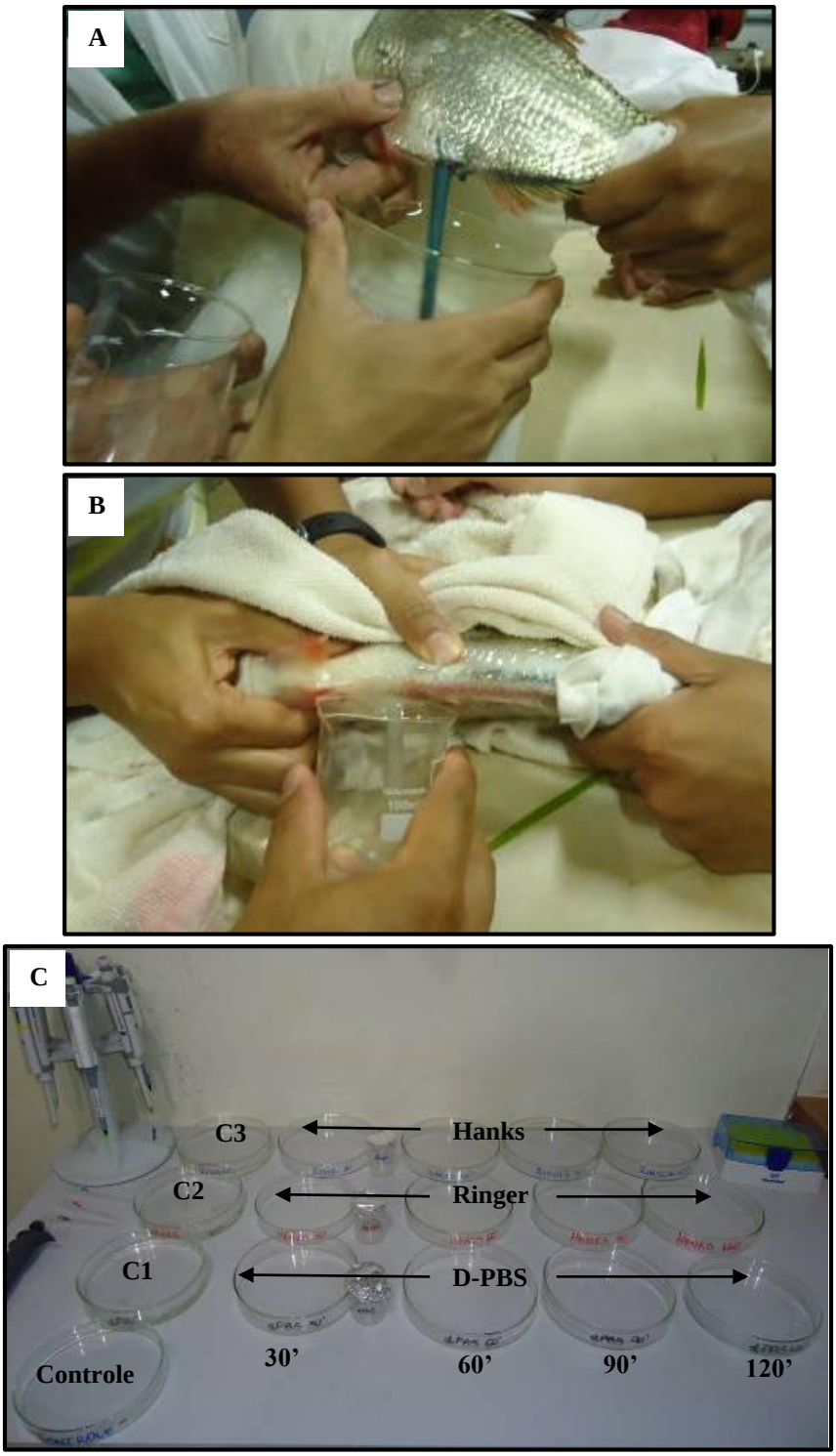
Esquema representativo das duas coletas realizadas, com respectivos tempos de armazenamento (1 dia, 1 mês, 1 ano) soluções (DMSO, Metilglicol, Metanol e Grupo controle) e repetições (Inc.). Abreviaturas: Inc. = incubadora; M = macho; F = fêmea

ANEXO 4



A: Distribuição de aproximadamente 5 g de ovócitos de *Brycon orbignyanus* em recipientes devidamente identificados; **B:** Momento da adição do sêmen pós-descongelado aos ovócitos de *Brycon orbignyanus;* **C:** Incubadora confeccionada de material PVC. C1 e C2: Visão da parte superior; C3 e C4: Visão da parte inferior telada; **D:** Disposição das incubadoras na caixa. Fonte própria.

ANEXO 5



A: Coleta de ovócitos de *Brycon amazonicus;* **B:** Coleta de sêmen de *Brycon amazonicus;* **C:** Ovócitos em placas de Petri em manutenção nas soluções de D-PBS (C1), Ringer (C2) e Hanks (C3); Embriões e larvas do grupo controle (Controle); Embriões e larvas após manutenção por 30, 60, 90 e 120 minutos em cada uma das três soluções. Fonte própria.