MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

VINICIUS AUGUSTO DIAS FILHO

CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE TAMBAQUI *Colossoma macropomum* EM MACROPALHETAS

SÃO CRISTÓVÃO – SE
2015

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

VINICIUS AUGUSTO DIAS FILHO

CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE TAMBAQUI *Colossoma macropomum* EM MACROPALHETAS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Sergipe como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

Orientador
Dr. Alexandre Nizio Maria

Co-orientador
Dr. Paulo César Falanghe Carneiro

SÃO CRISTÓVÃO-SE
2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA SISTEMA DE BIBLIOTECAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

Dias Filho, Vinicius Augusto
D541c Criopreservação de sêmen de Tambaqui (*Colossoma macropomum*) em macropalhetas / Vinicius Augusto Dias Filho ; orientador Alexandre Nizio Maria. – São Cristóvão, 2015.
42 f. : il.

Dissertação (mestrado em Zootecnia)– Universidade Federal de Sergipe, 2015.

1.Zootecnia. 2. Tambaqui (Peixe). 3. Criopreservação. 4. Peixes – Reprodução. 5. Sêmen. I. Maria, Alexandre Nizio, orient. II. Título.

CDU 636:639.3.034

VINICIUS AUGUSTO DIAS FILHO

CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE TAMBAQUI *Colossoma macropomum* EM MACROPALHETAS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Sergipe como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

APROVADO em 26 de fevereiro de 2015.

Prof. Dr. Hymerson Costa Azevedo (EMBRAPA)

Prof. Dr. Rodrigo Yudi Fujimoto (EMBRAPA)

Prof. Dr. Alexandre Nizio Maria (Orientador – EMBRAPA)

SÃO CRISTÓVÃO-SE

2015

Aos meus pais Vinicius Augusto Dias e Mercêdes Silveira Vasconcelos Dias e demais familiares que sempre me apoiaram durante toda a jornada.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Alexandre Nizio Maria pela oportunidade e o conhecimento, assim como, o apoio nos momentos de maior dificuldade.

Aos professores membros PROZOOTEC, pela oportunidade e todo conhecimento proporcionado. Em especial ao Coordenador Gladston Rafael pela sua importante colaboração na solução dos problemas burocráticos no decorrer do curso.

A equipe do Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal (LABRA), em especial ao Tec. de Laboratório Claydson Eufrásio pelo fundamental suporte laboratorial que muito contribuiu na realização dos experimentos. Gradeço também a importante colaboração de Carlos Adriano, Danillo Santos, David Lopes, Rafael Venâncio e Sidney Sales, assim como os demais colegas pela contribuição e pela boa convivência.

Aos pesquisadores da Embrapa Dr. Hymerson Costa Azevedo, Dr. Paulo César Falanghe Carneiro e Dr. Rodrigo Yudi Fujimoto pela contribuição dada na revisão do manuscrito, em especial ao Dr. Hymerson pelas palavras de incentivo nos momentos mais difíceis.

Aos demais discentes do curso de mestrado em Zootecnia pelos momentos de descontração e companheirismo. Em especial a colega de turma e namorada Anna Lauren pela paciência e apoio incondicional.

Aos colegas da CODEVASF pelo apoio nas coletas e companheirismo, em especial, ao ex-chefe do Centro de Referência de Recursos Pesqueiros e Aquicultura do Itiúba Alexandre Delgado pelo apoio que tornou viável a realização deste curso de mestrado. Agradeço também ao atual chefe Álvaro de Albuquerque pela continuidade do apoio.

Ao responsável técnico da Piscicultura Santa Clara o Sr. Bonifácio e todos os funcionários pelo apoio nas coletas de sêmen.

À FAPITEC pelo financiamento das pesquisas.

A TODOS MEU MUITO OBRIGADO!!!

SUMÁRIO

RESUMO i
ABSTRACT ii
1. INTRODUÇÃO 8
2. REFERENCIAL TEÓRICO 9
2.1 Espécie em estudo 9
2.2 Sêmen de peixes 10
2.3 Criopreservação de sêmen de peixes 12
2.3.1 Injúrias espermáticas provocadas pela criopreservação 12
2.3.2 Velocidades de congelamento e descongelamento 13
2.3.3 Meio diluidor 14
2.3.4 Tempo de equilíbrio 16
2.3.5 Utilização de recipientes de grande volume na criopreservação de sêmen de peixes 17
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 21
ARTIGO 27
RESUMO 27
1. INTRODUÇÃO 28
2. MATERIAL E MÉTODOS 30
2.1 Coleta e análise do sêmen *in natura* 30
2.2 Experimento 1: Avaliação de meios diluidores e tempos de equilíbrio 31
2.3 Experimento 2: Avaliação de protocolos de descongelamento 32
2.4 Análise estatística 33
3. RESULTADOS 33
3.1 Experimento 1: Avaliação de meios de diluição e tempos de equilíbrio 33
3.1 Experimento 2: Avaliação de protocolos de descongelamento 35
4. DISCUSSÃO 36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 39

RESUMO

DIAS-FILHO, V.A**. Criopreservação de sêmen de tambaqui *Colossoma macropomum* em macropalhetas** Sergipe: UFS, 2015. 42f. (Dissertação - Mestrado em Zootecnia)

A criopreservação de sêmen de peixes é uma ferramenta para a otimização do manejo reprodutivo, a formação de bancos de germoplasma e o desenvolvimento de programas de melhoramento genético. O sucesso dessa técnica depende do domínio e o equilíbrio de vários fatores que envolvem os processos de coleta, diluição, envase, congelamento e descongelamento. Protocolos de criopreservação sêmen de tambaqui já foram desenvolvidos utilizando palhetas de 0,5mL no envase, no entanto, o elevado volume de sêmen produzido e alta fecundidade da espécie sugere o armazenamento em recipientes de maior volume para a aplicação na produção em larga escala. Com isso, o objetivo do presente estudo foi estabelecer um protocolo de criopreservação seminal do tambaqui em macropalhetas de 4,0mL, a partir da definição de um meio diluidor, tempo de equilíbrio e a melhor relação entre temperatura e o tempo de descongelamento do sêmen. O sêmen coletado foi diluído, envasado em macropalhetas, congelado em vapor de nitrogênio líquido no botijão *dry-shipper* e armazenadas em botijão criogênico a -196°C. No primeiro experimento, foram testadas diferentes composições do meio diluidor (M1 - 5% de metilglicol; M2 - 5% de metilglicol + 5% de gema de ovo; M3 - 10% de metilglicol; M4 - 10% de metilglicol + 5% de gema de ovo; M5 - 15% de metilglicol; M6 - 15% de metilglicol + 5% de gema de ovo) e três tempos de equilíbrio (4, 20 e 40 minutos). No segundo experimento, foram avaliadas diferentes velocidades de descongelamento do sêmen em banho-maria, sobre a qualidade espermática (30ºC por 50s - T1; 30ºC por 80s - T2; 60ºC por 25s - T3 e 60ºC por 40s - T4). Ao final do estudo concluiu-se, que o protocolo ideal para a criopreservação do sêmen do tambaqui em macropalhetas de 4,0mL consiste na diluição do sêmen na proporção de 1:9 (v:v) em um meio composto por 5% de metilglicol e 5% de gema de ovo, os quais devem permanecer em contato por 4 minutos até que sejam submetidos ao processo de congelamento em botijão *dry-shipper*. O descongelamento das amostras deve ser realizado em banho-maria a 60°C por 25s.

Palavras-chave: Cinética espermática, crioprotetor, gema de ovo, metilglicol, peixe.

DIAS-FILHO, V.A**. Cryopreservation of tambaqui (*Colossoma macropomum*) semen in large straws.** Sergipe: UFS, 2015. 42f. (Dissertation – Master in Zootecnia)

ABSTRACT

Cryopreservation of fish semen is a key to optimization of reproductive management, the formation of germplasm bank and the development of genetic improvement programs. The success of this technique depends on the management and balance of several factors such as the collection, dilution, packaging, freezing and thawing. Tambaqui semen cryopreservation protocols have been developed using 0.5 mL straws on packaging. However, the high volumes of semen produced and the elevated taxes of fecundity are presented by this specie, it is necessary to use larger volume storage containers for application to large-scale production. The objective of this study was to establish a tambaqui semen cryopreservation protocol in large straw 4,0mL, from the definition of cryosolution, equilibration time and the best ratio between temperature and time semen thawing. The semen collected was diluted, packaged in large straws, frozen in liquid nitrogen which was conditioned in dry-shipper and stored in cryogenic cylinder at -196 °C. In the first experiment, different cryosolutions (M1 - 5% 5% methylglycol; M2 - 5% 5% methylglycol+ 5% egg yolk; M3 - 10% 5% methylglycol; M4 - 10% 5% methylglycol + 5% egg yolk; M5 - 15% 5% methylglycol; M6 - 15% de 5% methylglycol + 5% egg yolk) and three equilibration times (4, 20 and 40 minutes) were tested. In the second experiment, different relation between temperature and time thawing on sperm quality (30ºC for 50s - T1; 30ºC for 80s - T2; 60ºC for 25s - T3 e 60ºC for 40s - T4) were evaluated. In conclusion, this study showed that the ideal protocol for cryopreservation of tambaqui semen in large straw 4,0mL is made by diluting semen at a ratio of 1: 9 (v: v) in a medium composed of 5% methylglycol and 5% egg yolk. Both of them must have remained in contact with each other for 4 minutes until both were subjected to freezing in dry-shipper. The thawing of samples required to be performed in a water bath at 60 ° C for 25s.

Keywords: Crioprotector, egg yolk, fish, methylglycol, sperm kinetics.

1.INTRODUÇÃO

O tambaqui é um peixe dulcícola migrador de grande porte, distribuindo-se amplamente em ambiente natural na bacia amazônica. Os reprodutores desta espécie, assim como outras espécies migradoras de grande porte, apresentam uma elevada produção de gametas e uma alta fecundidade (VIEIRA *et al*., 1999). Os machos da espécie liberam grande volume de sêmen após o processo de indução hormonal, podendo ser produzido até vinte e cinco vezes maior que machos não induzidos hormonalmente numa mesma época de desova (MARIA *et al*., 2010).

O desenvolvimento de um protocolo de criopreservação de sêmen de uma espécie proporciona o suprimento de gametas masculinos na reprodução artificial em criatórios comerciais, reduzindo a quantidade de animais e otimizando o manejo de reprodutores e, consequentemente, os custos de produção. Contudo, os processos que envolvem a técnica são potencialmente lesivos devido principalmente a formação dos cristais de gelo no meio intracelular no momento em que as células são expostas a temperaturas extremamente baixas. Por isso, o sucesso da técnica de criopreservação depende do domínio e equilíbrio dos fatores envolvidos no processo como: a criorresistência dos espermatozoides, as velocidades em que as células são congeladas e descongeladas e as propriedades e a ação do meio em que o sêmen é diluído.

O sêmen de várias espécies nativas de importância comercial e ecológica, a exemplo do tambaqui, já foi submetido a estudos de criopreservação, apresentando, na maioria dos casos, resultados de cinética espermática com elevado potencial de fecundação pós-descongelamento. A maioria destas experiências utilizou como recipiente de envase palhetas francesas de 0,5mL. Porém, a aplicação do sêmen criopreservado envasado em recipientes de pequeno volume e, consequentemente, com reduzida quantidade de espermatozoides, pode ser ineficiente para rotina em laboratórios comerciais em algumas espécies reofílicas de interesse comercial, devido a grande quantidade de doses necessárias à fertilização do elevado número de ovócitos liberados pelas fêmeas.

Recipientes para envase de sêmen de grande volume como macropalhetas, desenvolvidos inicialmente para a criopreservação de sêmen de outros grupos de animais como equinos, já vêm sendo estudados para sêmen de peixes. Porém, recipientes de maior capacidade de armazenamento possuem dimensões que proporcionam velocidades mais

lentas nos processos de congelamento e descongelamento em elação as palhetas francesas (MARIA *et al*., 2015), com isso há uma maior exposição das células às crio injúrias, havendo a necessidade de uma adaptação dos protocolos existentes para a criopreservação do sêmen em recipientes de pequeno volume.

As informações a respeito da criopreservação seminal do tambaqui com recipientes de pequeno volume, associadas às experiências com o sêmen criopreservado de várias espécies em recipientes de grande volume, sobretudo de 4,0 a 5,0mL, podem servir como base para a formação de um protocolo de criopreservação do sêmen de tambaqui em recipientes de grande volume para a aplicação em escala comercial. Com isso, o presente estudo teve como finalidade determinar metodologias eficientes de criopreservação de sêmen de tambaqui em macropalhetas de 4,0mL, a partir da definição de um meio diluidor, tempo de equilíbrio e a melhor relação entre temperatura e o tempo de descongelamento do sêmen.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Espécie em estudo

A espécie *Colossoma macropomum*, conhecida popularmente como tambaqui, pertence à ordem Characiformes, família Characidae e subfamília Serrasalminae, e encontra-se distribuída, em ambiente natural, nas bacias dos rios Amazonas e Orinoco, numa área que está inserida no território de três países: Brasil, Colômbia e Peru. A espécie possui grande porte, podendo ser encontrados exemplares com comprimento de 1 metro e 40 Kg de peso, sendo considerada a segunda maior da América do Sul, dentre o grupo dos peixes de escamas de água doce (LOPERA-BARRERO *et al*., 2011).

Assim como a maior parte das espécies nativas de potencial para a aquicultura, o tambaqui realiza o processo de reprodução mediante comportamento migratório (peixes reofílicos) com desova total, apresentando uma elevada produção de gametas e uma alta fecundidade, podendo superar o valor de um milhão de ovócitos fecundados por desova. Em condições de confinamento, sua reprodução ocorre, exclusivamente, com a indução hormonal, uma vez que as fêmeas não completam o processo de maturação gonadal, devido à falta de estímulos ambientais como a variação de temperatura, pH, fotoperíodo e outros (ZOHAR e MYLONAS, 2001). Esses estímulos são capturados pelos receptores sensoriais que são transmitidos para o sistema nervoso central que ativa o eixo endócrino

(hipotálamo, hipófise e gônadas), onde há a produção e a liberação de hormônios na corrente sanguínea, tendo como consequência a maturação sexual (NAGAHAMA e YAMASHITA, 2008).

O tambaqui possui hábito alimentar onívoro com grande capacidade de digerir proteína de origem animal e vegetal, apresentando fácil adaptação à alimentação artificial (NUNES *et al*., 2006). A espécie possui ainda uma série de características favoráveis à produção em escala comercial, uma vez que, possui rápido crescimento, rusticidade, boa aceitação de sua carne, domínio das técnicas de propagação artificial, tolerância a elevadas temperaturas na água dos viveiros, ao manuseio, a enfermidades e a baixos níveis de oxigênio dissolvido e adaptação aos diversos sistemas de cultivo (KUBTZA, 2004; ARAÚJO-LIMA e GOMES, 2005).

A espécie está disseminada em viveiros de cultivo nas regiões de temperaturas mais elevadas como o Norte, Centro-Oeste e Nordeste. Dentre as espécies de peixes continentais, o tambaqui está enquadrado nas listas daquelas com maior produção, sendo a segunda mais produzida em aquicultura no Brasil e a primeira entre as espécies nativas, e a 18ª em produção oriunda da pesca (MPA, 2012). Segundo dados da *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO), foram produzidos no Brasil 170.000t da espécie oriunda de cultivo, no ano de 2013, (MATIAS, 2014). A espécie é considerada de grande importância para o desenvolvimento da aquicultura no Brasil, principalmente nas regiões norte e nordeste (RESENDE, 2009). O crescimento da produção de tambaqui em sistemas de cultivo surge como alternativa para manter o estoque de espécimes em ambiente natural, que vem sofrendo com a sobrepesca desde a década de 90 em toda a Amazônia (BATISTA e PETRERE-JR, 2003).

2.2 Sêmen de peixes

O sêmen é constituído basicamente pelo plasma seminal e os espermatozoides. O plasma seminal é o fluido que atua como fornecedor de elementos necessários à manutenção, meio de suspensão e veiculo de transporte dos espermatozoides. A função dos espermatozoides dos peixes, assim como ocorre em outros grupos de vertebrados, é de ser o transmissor biológico do material genético paterno. Os espermatozoides nos peixes teleósteos, normalmente, possuem três estruturas: cabeça, peça intermediária e flagelo. A cabeça possui uma grande diversidade de tamanhos e formatos dentre as espécies, sendo

estas variações associadas ao mecanismo de penetração nos ovócitos. A cabeça ainda tem a finalidade de armazenamento do material genético, sendo ocupada, quase que em sua totalidade, pelo núcleo que é composto pela cromatina nuclear que contém o DNA. A peça intermediária abriga o colar de mitocôndrias que são responsáveis pelo fornecimento de energia necessária à propulsão do espermatozoide. O flagelo é o responsável pelo movimento do espermatozoide através de seus batimentos. Em algumas espécies são encontrados mais de um flagelo (BORELA *et al*., 2014; VIVEIROS *et al*., 2014).

Diferentemente dos outros vertebrados, os espermatozoides dos peixes, salvo algumas exceções, não possuem acrossoma. Fato este que estaria relacionado à presença de um orifício na córion dos ovócitos denominado de micrópila, estrutura essa que tem por finalidade servir de acesso ao gameta masculino (COSSON *et al*., 1999). Outra peculiaridade das células espermáticas em peixes é seu estado de inatividade nos testículos, a ativação ou motilidade espermática se dá através do contato com o meio externo, com o gradiente de osmalaridade entre o plasma seminal e o meio externo. Em espécies marinhas e estuarinas a osmolaridade do sêmen é inferior ao meio externo, já em água doce esta relação é invertida (BALDISSEROTO, 2005; VIVEIROS *et al*., 2014). Outra característica peculiar aos peixes é o reduzido tempo de atividade dos espermatozoides que de uma forma geral dura menos de dois minutos (GODINHO e VIVEIROS, 2011).

O sêmen fresco ou processado pode ser avaliado sob diferentes aspectos com vistas na análise de seu potencial fertilizante. Diversas análises podem ser utillizadas para mensusar a qualidade do sêmen e do espermatozóide como: análise de contaminação e volume seminal; concentração, cinética, morfologia e integridade da membrana plasmática (viabilidade) dos espermtozóides. Tanto no campo da pesquisa como no setor produtivo, a motilidade espermática é um fator chave que nos permite determinar a qualidade e a capacidade de fertilização do sêmen (RURAGAWA *et al*., 2004; ALAVI e COSSON, 2005; VIVEIROS *et al*., 2014). A motilidade espermática tradicionalmente é mensurada subjetivamente, porém o método é impreciso (KOH *et al*., 2010). Com o advento da análise espermática assistida por computador (CASA) a motilidade espermática pode ser aferida com uma maior precisão e, além disso, outros parâmetros de cinética espermática podem ser estudados a fim de se verificar a qualidade seminal e seu potencial de fertilização (KIME *et al.*, 2001, WILSON-LEEDY e INGERMANN, 2007). Já os métodos de avalição da morfologia e integridade de membrana plasmática dos

espermatozoides têm como objetivo mensurar a má formação dos espermatozoides e as lesões sofridas por estes após processamento (MELO-MACIEL *et al*., 2012).

Alguns estudos realizados caracterizaram o sêmen do tambaqui coletados através da maturação natural e induzida (VIEIRA *et al*., 2010; MARIA *et al*., 2010; GALO, 2013). Nestes estudos se constatou que a qualidade espermática após a indução não é prejudicada e até melhoram as condições para sua utilização no processo de reprodução artificial.

2.3 Criopreservação de sêmen de peixes

A criopreservação de sêmen de peixes é uma técnica de grande interesse que visa à conservação de material biológico em nitrogênio líquido a -196ºC. Nesta temperatura a estrutura e funcionalidade das células e tecidos vivos são mantidas, conservando-as geneticamente viáveis e reversivelmente inativas do ponto de vista metabólico (PEGG, 2007).

Os benefícios da criopreservação de sêmen incluem: eliminação do problema causado pela assincronia na maturidade gonadal entre machos e fêmeas; economia de sêmen: a utilização do volume total de sêmen disponível, especialmente quando ele é de difícil obtenção e quando pequenos volumes são retirados dos peixes mantidos em cativeiro; simplificação do manejo dos reprodutores: a desova pode ser induzida apenas nas fêmeas evitando-se a necessidade de manejo concomitante de indução dos machos onde o sêmen criopreservado pode ser utilizado para fertilizar os ovócitos; facilidade de intercâmbio de material genético entre diferentes pisciculturas, evitando o transporte de animais vivos e seus custos e; formação de bancos de germoplasma com a manutenção da diversidade genética e conservação de gametas de animais selecionados em programas de melhoramento ou manipulados geneticamente (triplóides, clones e transgênicos), e estabelecimento de programas de hibridização utilizando peixes com períodos reprodutivos diferentes (VIVEIROS, 2005; MARIA *et al*., 2009; CABRITA *et al*., 2010). Contudo, a grande maioria das experiências com sêmen criopreservado resultou na redução da qualidade espermática devido as injúrias celulares decorrentes do processo.

2.3.1 Injúrias espermáticas provocadas pela criopreservação

A aplicação da criopreservação de sêmen envolve os procedimentos de congelamento/descongelamento que provocam danos celulares devido à mudança na

temperatura e a formação de cristais de gelo, sendo os principais as alterações na membrana plasmática do espermatozoide e as lesões no DNA (SOARES e GUERRA, 2009; MARTINEZ e CARRASCO, 2010).

Durante o processo de congelamento o sêmen sofre uma grande variação de temperatura, desde a corpórea, passando pela ambiente até a extrema de -196ºC. Porém, as maiores injúrias não estão nas temperaturas extremamente baixas, mas na temperatura de 5ºC, quando há uma transição da membrana plasmática do estado líquido cristalino para o estado de gel, e entre -5 e -15ºC, quando são formados os cristais de gelo. A formação de cristais de gelo ocorre no espaço extracelular, com a formação de um gradiente osmótico entre a solução intracelular (isotônica) e a solução congelada extracelular (concentrada) (SOARES e GUERRA, 2009; MARIA *et al*., 2011). Dependendo da velocidade de resfriamento, a água contida na célula se move através da membrana e se une à fase congelada do meio extracelular ou irá congelar, formando gelo intracelular, ocasionando o desequilíbrio osmótico com posterior desidratação celular e inatividade osmótica da membrana com seu rompimento. O processo de descongelamento implica na reidratação das células provocada por um influxo de água e deve proceder de tal forma que ocorra rapidamente, de modo que evite a recristalização, ou seja, o reagrupamento de pequenos cristais de gelo que podem ser danosos às células e levá-las a inviabilidade (PEGG, 2007).

O entendimento dos mecanismos envolvidos no processo de congelamento da célula espermática tem levado ao melhoramento dos protocolos de criopreservação, por meio de pesquisa de crioprotetores menos lesivos ou combinações mais favoráveis entre eles e utilização recipientes de diferentes dimensões para armazenamento que possam modificar a quantidade e forma dos cristais de gelo (CANCIMANSI *et al*., 2010).

2.3.2 Velocidades de congelamento e descongelamento

Como indicado anteriormente, os métodos de congelamento/descongelamento são decisivos para a integridade e funcionalidade dos espermatozoides criopreservados. Na atualidade, são utilizadas algumas metodologias no congelamento de sêmen de peixes como as caixas de isopor (rampa de congelamento), o botijão portátil de vapor de nitrogênio líquido (*dry-shipper* ou botijão canadense) e freezers programáveis (SALMITO-VANDERLEY *et al*., 2012). O sêmen de peixes tropicais brasileiros, normalmente, é submetido ao processo de congelamento através da exposição ao vapor de nitrogênio

liquido (N_2L) contido em botijões específicos ao procedimento de congelamento denominados de *dry-shipper*. Já o procedimento de descongelamento tem como meio de condução de calor a água que possibilita uma boa troca com as soluções de congelamento, a metodologia mais utilizada é a imersão em banho-maria (VIVEIROS *et al*., 2014). As temperaturas aplicadas em estudos com descongelamento do sêmen de peixes, nos diferentes recipientes utilizados, variam de 5°C (WHEELER e THORGAARD, 1991) a 80°C (VELASCO-SANTAMARIA *et al*., 2006), mostrando-se inadequados os valores próximos a estes valores extremos. Temperaturas muito baixas implicam em velocidade de descongelamento lenta e temperatura final baixa. Já, temperaturas de descongelamento muito elevadas são prejudiciais, pois atuam na desnaturação de enzimas e também proporcionam velocidades muito elevadas. Em geral, os protocolos de descongelamento que apresentam melhores resultados na manutenção da qualidade espermática utilizam temperaturas entre 30 e 60°C (RICHARDSON *et al*., 1999; VIVEIROS *et al*., 2009; VIVEIROS *et al*., 2011a).

O tempo em que as amostras são congeladas e descongeladas é resultado direto da relação entre o método de resfriamento e aquecimento, as dimensões e o material dos recipientes utilizados no envase e o meio diluidor utilizado na criopreservação. O processo de congelamento em N_2L pode ser utilizado em sete minutos para palhetas francesas de 0,5mL (CAROSFELD *et al*., 2003) a vinte minutos para criotubos de 4,5mL (CARVALHO, 2013).

Carneiro *et al*. (2012) obtiveram resultados de até 73% de espermatozoides viáveis após criopreservação de sêmen de tambaqui em palhetas de 0,5 mL congeladas em vapor de nitrogênio a uma velocidade de 40°C/min. Já, Carvalho (2013) encontrou até 53% de espermatozoides viáveis após congelar criotubos de 4,5mL a uma velocidade de congelamento de 9,6°C/min e de descongelamento de 128°C/min.

2.3.3 Meio diluidor

O sêmen destinado ao processo de criopreservação deve ser diluído em um meio que tem por finalidade proteger as células das injúrias causadas pelo congelamento. Sendo assim, o conhecimento da composição e da funcionalidade deste meio é um fator determinante da qualidade seminal após o descongelamento. As soluções crioprotetoras

utilizadas no congelamento de sêmen normalmente contêm um diluidor, um crioprotetor intracelular ou permeável e um crioprotetor extracelular ou impermeável.

Os diluidores são substâncias utilizadas para aumentar o volume do sêmen e fornecer fontes de nutrientes às células. Estas substâncias devem ser isotônicas, para que não haja ativação prévia da motilidade espermática; estáveis, ou seja, suas características físico-químicas não devem ser alteradas em contato com o sêmen; altamente condutivas, de modo que possibilite a rápida transferência de calor entre o meio externo e os espermatozoides e; estéreis, não possibilitando a introdução de organismos contaminantes às células espermáticas. Os diluidores utilizados para a maior parte das espécies devem manter a osmolaridade da solução de congelamento em torno de 300 mOsm (VIVEIROS *et al*., 2014). O diluidor mais utilizado no país é a solução de glicose que pode ser facilmente adquirida como uma solução estéril ou manipulada, sendo normalmente encontrada na concentração de 5 %(VIVEIROS *et al*., 2009; SALMITO-VANDERLEY *et al*., 2012). Outras substâncias foram testadas como água de coco em pó (ACP®), BTS e Solução de Hanks, mas não obtiveram o mesmo êxito na manutenção da qualidade espermática de tambaqui após o descongelamento (FARIAS *et al*., 2009; VARELA-JR *et al*., 2012; GARCIA, 2013).

As substâncias denominadas crioprotetoras têm por finalidade a preservação da integridade celular, no momento da rápida mudança e manutenção de temperaturas extremas. Visto que, atuam na contenção da formação de gelo no interior da célula, repõe água no momento do estresse osmótico, atuam na interação de íons e macromoléculas e atuam como tampão nas variações de pH (SOARES e GUERRA, 2009). Os crioprotetores apesar de serem imprescindíveis para a preservação dos espermatozoides no processo de congelamento podem atuar como agentes tóxicos aos espermatozoides, a depender da substância e concentrações utilizadas, podendo reduzir a atividade celular ou inviabilizá-los.

Os crioprotetores intracelulares são substâncias que atuam através de suas propriedades coligativas, reduzindo o ponto de congelamento do meio intracelular. Assim, na ocasião de temperaturas baixas o meio intracelular permanecerá com água em seu estado liquido, diminuindo a concentração de solutos do meio intracelular e por consequência reduzindo o gradiente osmótico (PEGG, 2007). Muitas substâncias já foram utilizadas como crioprotetores internos dos espermatozoides, como glicerol,

dimetilsulfóxido (DMSO), etilenoglicol, metilglicol e propilenoglicol, como também combinações entre eles. Para as espécies nativas de nosso país os mais utilizados são o metilglicol e o dimetilsulfóxido (VIVEIROS *et al*., 2014). Carneiro *et al*. (2012) compararam o congelamento de sêmen de tambaqui com estas duas substâncias e encontraram melhores resultados nos parâmetros de motilidade total e viabilidade dos espermatozoides submetido à ação crioprotetor metilglicol. Um crioprotetor pode ser considerado ideal para dada espécie e altamente lesivo a outra, entretanto existem poucos estudos que explicam os mecanismos envolvidos nesta interação. Outro aspecto decisivo na aplicação de agentes crioprotetores é a determinação da aplicação em concentração e tempos de exposição ideais, visto que os crioprotetores podem apresentar efeitos tóxicos, caso a exposição for aplicada em concentrações e períodos fora da faixa ideal (MARTINEZ e CARRASCO, 2010).

Substâncias com a propriedade de proteger a membrana celular, denominadas crioprotetores externos ou impermeáveis, são adicionadas ao meio diluidor durante o processo de criopreservação. Estas substâncias, que podem ser lipídeos, proteínas (gema de ovo e leite desnatado) ou açucares (sacarose, glicose), são eficientes na proteção da célula espermática durante o processo de congelamento por repor os fosfolipídios perdidos durante o choque térmico, assim prevenindo a ruptura da membrana (VIVEIROS *et al*., 2014). A substância mais utilizada como crioprotetor externo é a gema de ovo em concentrações de 5 a 10% no meio diluidor, sendo uma desvantagem desta substância a falta de padronização de sua constituição, além de ser uma potencial fonte de microrganismos indesejados como as bactérias (MARIA *et al*., 2009). A exclusão da gema de ovo no meio diluidor se mostrou prejudicial ao sêmen do tambaqui criopreservado em palheta de 0,5mL (CARNEIRO *et al*., 2012).

2.3.4 Tempo de equilíbrio

O termo tempo de equilíbrio se refere ao período de exposição do sêmen ao meio diluidor do momento da diluição ao inicio do processo de congelamento e constitui-se como fator determinante na criopreservação. (BITTENCOURT *et al*., 2006; VIVEIROS *et al.*, 2012) O tempo de equilíbrio de um protocolo de criopreservação de sêmen esta relacionado as características seminais da espécie em conjunto com a ação do crioprotetores utilizados e a taxa de diluição (sêmen: meio diluidor) (SALMITO-VANDERLEY *et al.*, 2014).

Tempos de equilíbrios curtos podem interromper a ação dos crioprotetores e assim comprometer a qualidade seminal após o descongelamento. Já a aplicação de tempo de equilíbrio demasiado expõem os espermatozoides à ação tóxica dos crioprotetores. Suquet *et al*. (2000) relata que espécies que apresentam espermatozoides de tamanho reduzido não há necessidade de tempo de equilíbrio, ou seja, o processo de congelamento se inicia logo após a diluição, isso se justifica pela rápida penetração e ação do crioprotetor. Além disso, a mínima exposição evitaria a toxicidade do crioprotetor. O mesmo autor relata que os crioprotetores têm velocidades de penetração diferentes, sendo necessário um estudo especifico para cada agente crioprotetor. Tiba (2007) constatou na criopreservação do sêmen de *Centropomus parallelus* que a partir de 2min houve uma relação inversamente proporcional entre o tempo de equilíbrio e o percentual de espermatozoides móveis. Nascimento *et al*. (2012) compararam a influência de dois diferentes tempos de equilíbrio (0 e 30 min) de forma simultânea na criopreservação do sêmen das espécies da ordem characiformes *B. orbignyanus* e *P. lineatus* sob as mesmas condições. Para *P. lineatus* maiores percentuais de motilidade total forma encontrados na ausência de tempo de equilíbrio, já para *B. orbignyanus* não houve diferença entre os dois tempos de equilíbrio testados. Para a criopreservação do sêmen do tambaqui em palhetas franceses de 0,5mL, utilizando-se como crioprotetor interno o metilglicol, o tempo de equilíbrio de 20min proporcionou resultados de motilidade total próximos a 60% (CARNEIRO *et al*., 2012), encontrando os melhores resultados neste parâmetro para a espécie após criopreservação.

2.3.5 Utilização de recipientes de grande volume na criopreservação de sêmen de peixes

Os recipientes utilizados no processo de criopreservação de gametas em escala comercial devem possuir características técnicas vantajosas como ausência de toxicidade e facilidade de preenchimento (MARIA *et al*., 2011). O material utilizado e as dimensões do recipiente no envasamento do sêmen são parâmetros importantes no sucesso do processo de criopreservação, pois delimitam o volume de gametas armazenados e influenciam diretamente na velocidade de congelamento e descongelamento do sêmen (VIVEIROS e GODINHO, 2009).

No Brasil, a criopreservação de sêmen de peixes é um campo novo em que pouco progresso prático, em nível comercial, foi alcançado. Durante os últimos anos mais de 20 espécies de peixes nativos do Brasil já tiveram seu protocolo de criopreservação estudado (VIVEIROS *et al*., 2014). A maioria dos trabalhos de congelamento de sêmen de peixes

brasileiros tem sido realizada em palhetas francesas com volume de 0,5 mL (VIVEIROS e GODINHO, 2009; GODINHO e VIVEIROS, 2011). Estes recipientes são adequados para utilização em bancos de sêmen ou para uso comercial em espécies que necessitam de pequenas quantidades de sêmen na fertilização (VELASCO-SANTAMARIA *et al*., 2006). Nos últimos anos as instituições de pesquisa vêm buscando aprimorar um protocolo adequado de criopreservação do sêmen de tambaqui *Colossoma macropomum* em palhetas de 0,5 mL (MENEZES *et al*., 2008; VIEIRA, 2010; LEITE *et al*., 2011; CARNEIRO *et al*., 2012; VARELA-JR *et al*., 2012). O uso destes recipientes, no entanto, apresenta algumas limitações quanto à sua utilização para a produção de alevinos em larga escala, pois a sua aplicação para espécies migradoras como o tambaqui, as quais apresentam alta fecundidade, requer um grande número de espermatozoides e, consequentemente, um grande número de recipientes, necessários para fertilizar simultaneamente um grande número de ovócitos.

As macropalhetas, recipientes com capacidade de armazenamento entre 2,0 e 5,0 mL, inicialmente desenvolvidas para envasar sêmen de mamíferos de grande porte, facilitam o processo de armazenamento do sêmen criopreservado e sua a aplicação no processo de desova, devido sua maior capacidade de armazenamento de gametas (CABRITA *et al*., 2001). Além disso, a utilização de recipientes de grande capacidade volumétrica, como as macropalhetas, possibilita a reutilização, mediante lavagem e esterilização. Em contrapartida, suas maiores dimensões, principalmente maiores diâmetros, ocasionam taxas de congelamento e descongelamento mais lentos que as palhetas francesas de 0,25 e 0,50mL, proporcionando uma maior suscetibilidade aos danos gerados pelos cristais de gelo. Outra desvantagem destes recipientes seria a transmissão de temperatura desigual ao longo da solução de congelamento (CANCIMANSI *et al*., 2010).

Na última década, foram publicados alguns trabalhos com a criopreservação de sêmen de espécies da ordem Characiformes em macropalhetas. Estes estudos forma realizados com a curimba *Prochilodus lineatus* (VIVEIROS *et al*., 2009), a matrinxã *Brycon amazonicus* (VELASCO-SANTAMARIA *et al*., 2006; NINHAUS-SILVEIRA *et al*., 2006), *a* pirapitinga *Brycon nattereri* (VIVEIROS *et al*., 2011b), o pacu *Piaractus brachypomus* (RAMIREZ-MERLANO *et al*, 2011) e a pirapitinga-do-sul *Brycon opalinus* (ORFÃO, 2010). No entanto, nenhum destes estudos culminou na aplicação prática das metodologias estudadas na produção massiva em laboratórios de produção de alevinos. Na

tabela 1 estão descritos resultados de estudos que trataram de criopreservação de sêmen de peixes em macropalhetas com volume de 4,0 e 5,0mL.

Tabela 1. Resultados de motilidade total dos espermatozoides de acordo com diferentes aspectos técnicos usados no congelamento e descongelamento de sêmen de peixes criopreservado em macropalhetas de 4,0 a 5,0mL.

Espécie	Volume (mL)	Processo de descongelamento	Meio diluidor	Tempo de equilíbrio	MT (%)	Referência
Brycon amazonicus	4,0	35°C/90s	Glicose, Gema de ovo, DMSO	---	39	Velasco-Santamaria *et al*. (2006)
Brycon amazonicus	4,0	35°C/90s	Glicose, gema de ovo, DMSO	Imediatamente após envase	47	Medina-Robles *et al*. (2007)
Brycon cephalus	4,0	36°C/30 s	Glicose, gema de ovo, DMSO	---	---	Ninhaus-Silveira *et al.* (2006)
Brycon nattereri	4,0	60°C/24s	BTS ou NaCl, MG	---	81	Viveiros *et al*. (2012)
Brycon opalinus	4,0	60°C/24s	Glicose-365, MG	30min	80	Orfão (2010)
Onchorhynchus mykiss	4,0	60°C/30s	Promine®, gema de ovo, DMSO	---	53	Cabrita *et al.* (2001)
Onchorhynchus mykiss	4,0	70-80°C/15s	Gema de ovo, DMSO	---	---	Ninhaus-Silveira *et al*. (2002)
Piaractus brachypomus	5,0	35°C/90s	Glicose, gema de ovo, DMSO	---	33	Ramirez-Merlano *et al*. (2011)
Prochilodus lineatus	4,0	60°C/24s	Glicose, MG	---	95	Viveiros *et al*. (2009)
Sparus aurata	5,0	60°C/30s	NaCl, DMSO	---	70	Cabrita *et al.* (2005)

--- Não mencionado, BTS – Beltsville Thawing Solution, DMSO- Dimetilsulfóxido, MG- Metilglicol e MT - Motilidade total.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAVI, S.M.; COSSON, J. Sperm motility in fishes. I. Effects of temperature and pH: a review. **Cell Biol Int.** v. 29, n. 2, p. 101-110, 2005.

ARAÚJO-LIMA, C. A. R. M.; GOMES, L. C. Tambaqui (Colossoma macropomum). **In**: BALDISSEROTTO, B., GOMES, L.C. (Org.). Espécies nativas para piscicultura no Brasil. Santa Maria: Editora UFSM, p.175-202, 2002.

BALDISSEROTTO, B Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura. Santa Maria: UFSM, 2005. 212p.

BATISTA, V.S. e PETRERE-JR, M. Characterization of the commercial fish production landed at Manaus, Amazonas state. **Acta amazonica**, v. 33, n.1, p. 53-66, 2003.

BITTENCOURT, R. F., RIBEIRO FILHO, A. L., ALVES, S. G. G., BISCARDE, C. E., VASCONCELOS, M. F., OBA, E. O efeito do tempo de equilíbrio sobre a qualidade do sêmen caprino criopreservado. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 7, n. 1, p. 27-37, 2006**.**

BORELLA, M.I.; CHEHADE, C.; COSTA, F.G.; BATLOUNI, S.R. Gametogênese e o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas. **In:** BALDISSEROTO, B.; CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E. C. (Org.). Biologia e fisiologia de peixes neotropicais de água doce. Jaboticabal: FUNEP-UNESP, p. 285-306, 2014.

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

CABRITA, E.; ROBLES, V.; S, CUNADO; J.C. WALLACE; C. SARASQUETE; M.P. HERRAÉZ, Evaluation of gilthead sea bream, *Sparus aurata*, sperm quality after cryopreservation in 5 ml macrotubes. **Cryobiology**, v. 50, n.3, p. 273-84, 2005.

CABRITA, E.; SARASQUETE, C.; MARTÍNEZ-PÁRAMO, S.; V. ROBLES, V.; BEIRÃO, J.; PÉREZ-CEREZALES, S.; HERRÁEZ, M.P. Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 26, p. 623–635, 2010.

CANCIMANSI, J.A.N., SILVA, J.F.S. e VAN TILBURG, M.F. Recipientes de armazenamento de sêmen congelado e seu efeito sobre a crio-sobrevivência espermática. **PUBVET**, v.4, n.42, 2010.

CARNEIRO, P. C. F.; AZEVEDO, H. C.; SANTOS J. P.; MARIA, A. N. Cryopreservation of tambaqui (*Colossoma macropomum*) semen: extenders, cryoprotectants, dilution ratios and freezing methods. **CryoLetters**, v. 33, p.385-393, 2012.

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

CARVALHO, A. C. M. Criopreservação de semen de tambaqui *Colossoma macropomum* em criotubos. 2013. 55p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristovão, SE.

COSSON, J.; BILLARD, R.; CIBERT, C.; DREANNO, C.; SUQUET M. Ionic factors regulating the motility of fish sperm. **In:** Gagnon C, editor. The male gamete: from basic to clinical applications. Cache Rive Press; 1999. p. 161-186.

FARIAS, J.O.; NUNES, J.E.; CARVALHO, M.A.M.; SALGUERIO, C.C.M. Avaliação "in vitro" e "in vivo" do semen de Tambaqui *(Colossoma macropomum)* conservado a temperatura ambiente e criopreservado em agua coco. **Revista Cientifica de Ciencia Animal**. v.1, n.1, p.44-58, 1999.

GALO, J.M. Avaliação da qualidade dos gametas de tambaqui (*Colossoma macropomum*) ao longo da estação reprodutiva.2013. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR.

GARCIA, R.R.F. Criopreservação seminal de tambaqui *Colossoma macopomum.* 2013. 49p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

GODINHO, H. P. & VIVEIROS, A. T. M. Current Status of Sperm Cryopreservation of Brazilian Characiform Fishes. In: Cryopreservation in Aquatic Species, 2nd Edition. T. R. Tiersch and C. C. Green, editors. **World Aquaculture Society**, Baton Rouge, Louisiana. p. 875-884, 2011.

KIME, D.E.; VAN LOOK, K.J.W.; MCALLISTER, B.G.; HUYSKENS, G.; RURANGWA,E.; OLLEVIER, F. Computer assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish, **Comp. Biochem. Physiol**. v.130, p. 425–433, 2001.

KOH, I.C.; YOKOI. K.; TSUJI, M.; TSUCHIHASHI, Y.; OHTA, H. Cryopreservation of sperm from seven-band grouper, Epinephelus septemfasciatus. **Cryobiology,** v. 61, p. 263–7, 2010.

KUBITZA, F. Coletânea de informações aplicadas ao cultivo do tambaqui e de outros peixes redondos. **Panorama da Aquicultura**, v.12, p.27-39, 2004.

LEITE, L.V.; MELO, M.A.P.; OLIVEIRA ,F.C.E.; PINHEIRO, J.P.S.; CAMPELLO ,C.C.; NUNES , J.F.; SALMITO-VANDERLEY, C.S.B. Determinação da dose inseminante e embriogênese na fertilização artificial de tambaqui (Colossoma macropomum) **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**., v.65, n.2, p.421-429, 2013.

LOPERA-BARRERO, N. M.; RIBEIRO, R. P.; POVH, J. A.; et al. Produção de organismos aquáticos: uma visão no Brasil e no mundo. Guaíba, RS: Agrolivros, 2011. 320 p.

MARIA, A. N.; AZEVEDO, H. C.; CARNEIRO, P. C. F.. Criopreservação de sêmen de peixes no contexto do agronegócio da piscicultura. **In:** Tavares-Dias, M.. (Org.). Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo. Amapá: Embrapa Amapá, v. 1, p. 47-63, 2009.

MARIA, A. N.; AZEVEDO, H. C.; SANTOS, J. P.; SILVA, C. A.; CARNEIRO, P. C. F. Semen characterization and sperm structure of the Amazon tambaqui *Colossoma macropomum.* **Journal of Applied Ichthyology**. v. 26, p. 779–783, 2010.

MARIA, A.N.; AZEVEDO, H.C. e CARNEIRO, P.C.F. Protocolo para Criopreservação do Sêmen de Tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Comunicado Técnico 112**, Embrapa Tabuleiros Costeiros, p.8, 2011.

MARTÍNEZ, J. G.; CARRASCO, S. P. Crioconservación de semen en peces: efectos sobre la movilidad espermática y la fertilidad**. Acta biol. Colomb**., v. 15, n. 2, p. 3-24, 2010.

MATIAS, J.F.N. Aquicultura na América Latina: Situação Atual e Perspectivas In: **VIII Simpósio Internacional de Aquicultura**, Palestras..., Fortaleza, 2014.

MEDINA-ROBLES V.M.; VELASCO-SANTAMARIA Y.M.; CRUZ-CASALLAS P.E. Efecto del volumen de empaque sobre la tasa de congelación-descongelación y la fertilidad de semen crioconservado de yamú (Brycon amazonicus). **Archivos de Medicina Veterinaria**, v. 39, n. 3, p. 229-237, 2007.

MELO-MACIEL, M. A. P.; SALMITO-VANDERLEY, C. S. B.; LEITE, L. V.; OLIVEIRA, C. E.; OLIVEIRA, M. S.; LOPES, J. T.; NUNES, J. F. Métodos de avaliação da qualidade do sêmen criopreservado de characiformes brasileiros **Ciência Animal**, v. 22, n.1, p. 269-283, 2012.

MENEZES, J.T.; QUEIROZ B.L.J., DORIA, C.R.C.; MENEZES-JR, J. B. Avaliação espermática pós-descongelamento em tambaqui *Colossoma macropomum* (Curvier, 1818). **Acta Amazônica**, v.38, p.365-368, 2008.

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA (MPA). **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura - Brasil 2011**. Brasília: Ministério da Pesca e Aquicultura - MPA, 2012, 60p.

NAGAHAMA, Y. e YAMASHITA, M. Regulation of oocyte maturation in fish. **Development, Growth e Differentiation**, v. 50, p. 195-219, 2008.

NASCIMENTO, A.F.; GONÇALVES, A.C.S.; REIS-NETO, R.V.; LEAL, M.C.; VIVEIROS, A.T.M. Extender composition, osmolality, cryoprotectant and equilibration time effects on fresh sperm motility of two Characiformes fish: piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) and streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) **Anim. Reprod.**, v.9, n.2, p.103-110, 2012.

NUNES, E.S.; CAVERO, B.A.; PEREIRA-FILHO, M.; ROUBACH, R. Enzimas digestivas exógenas na alimentação de juvenis de tambaqui. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.41, n.1, p. 139-143, 2006.

NINHAUS-SILVEIRA, A.; FORESTI, F.; TABATA, Y. A.; RIGOLINO, M. G.; VERÍSSIMO-SILVEIRA R. Cryopreservation of rainbow trout semen: diluent, straw and the vapor column **B. Inst. Pesca**, v. 28, n.2, p. 135-139, 2002.

NINHAUS-SILVEIRA, A.; FORESTI, F.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R.; SENHORINI, J.A. Seminal Analysis, Cryogenic Preservation, and Fertility in Matrinxã Fish, *Brycon*

cephalus (Günther, 1869). **Brazilian Archives of Biology and Technology,** v.49, n.4, p. 651-659, 2006.

ORFÃO, L. H. Diversidade genética de populações e criopreservação de sêmen de pirapitinga-do-sul *Brycon opalinus*. 2010. 131p. Tese (Doutorado em zootecnia). Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PEGG, D. E. Principles of Cryopreservation. **In:** DAY, J. G.; STACEY, G. N. (Ed). Methods in molecular biology: Cryopreservation and freeze-drying protocols. 2ed. Totowa, NJ: Humana Press Inc. 2007.

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

RESENDE, E. K. Pesquisa em rede em aquicultura: bases tecnológicas para o desenvolvimento sustentável da aquicultura no Brasil. Aquabrasil. **Revista Brasileira de Zootecnica**, vol. 38, p. 52-57, 2009.

RICHARDSON, G. F.; WILSON, C. E.; CRIM, L. W.; YAO, Z. Cryopreservation of yellowtail flounder *Pleuronectes ferrugineus* semen in large straws. **Aquaculture**, v.174, p. 89–94, 1999.

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

SALMITO-VANDERLEY, C. C. B.; VIEIRA, M. J. A. F.; LEITE, L. V.; OLIVEIRA, F. C. E.; LINHARES, F. R. A.; SALGUEIRO, C. C. M.;. NUNES, J. F**. Meios de congelamento para conservação de sêmen de peixes da Famila Characidae.** In: VI Congresso Norte Nordeste de Reprodução Animal, Fortaleza, 2012.

SALMITO-VANDERLEY, C. S. B.; LINHARES, F. R. A.; CARVALHO, M. A. M; OLIVEIRA, M. S.; NUNES, J. F. Biotécnicas aplicadas a reprodução de ciprinídeos **Acta Veterinaria Brasilica**, v.8, supl. 2, p. 292-298, 2014.

SOARES, A. T.; GERRA, M. M. P.Efeitos da criopreservação sobre a viabilidade espermática. **Tecnol. & Ciên. Agropec**., v.3, n. 2, p.53-63, 2009.

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

TIBA, R. M. Crioconservação do sêmen de robalo-peva *Centropomus parallelus* (POEY, 1860). 2007. 67p. . Dissertação (Mestrado em Aquicultura e Pesca) Instituto de Pesca. São Paulo, SP.

VARELA-JR, A.S.; CORCINI, C.D.; STREIT-JR D.P.; RIZZOTO, G.; JARDIM, R.D.; LUCIA, J.R. T.; FIGUEIREDO, M.R.C. Efeito crioprotetor de diferentes concentrações do

dimetilsulfóxido no congelamento de sêmen de tambaqui *Colossoma macropomum*. **Atlantica,** v. 34, n.2, p. 129-137, 2012.

VELASCO- SANTAMARIA, Y. M.; MEDINA-ROBLES V.M.; CRUZCASALLAS, E.P. Cryopreservation of yamú (*Brycon amazonicus*) sperm for large scale fertilization. **Aquaculture,** v. 256, n. 4, p. 267-271, 2006.

VIEIRA, E. F.; ISAAC, V. J.; FABRÉ, N. N. Biologia Reprodutiva do Tambaqui, Colossoma macropomum CUVIER, 1818 (Teleostei, Serrasalmidae), no Baixo Amazonas, Brasil. Acta Amazonica, v. 29, n. 4, p. 625-638, 1999.

VIEIRA, M. J. A. F. Caracterização do sêmen de tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) e criopreservação em diluentes à base de água de coco em pó (ACP-104). 2011. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

VIVEIROS, A. T. M. Criopreservação de sêmen de peixes. In: **Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**, Goiânia, 2005.

VIVEIROS A.T.M. e 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, 2009.

VIVEIROS, A. T. M.; AMARAL, T. B.; ORFÃO, L. H; ISAU, Z. A; CANEPPELE, D. ; LEAL, M. C. Sperm cryopreservation of tiete tetra Brycon insignis (Characiformes): effects of cryoprotectants, extenders, thawing temperatures and activating agents on motility features **Aquaculture Research**, v. 2, n.6, p. 858-865, 2011a.

VIVEIROS, A.T.M.; MARIA, A.N.; AMARAL, T.B.; ORFÃO, L.H.; ISAÚ, Z.A.; VERISSIMO-SILVEIRA, R. Spermatozoon ultrastructure and sperm cryopreservation of the Brazilian dry season spawner fish pirapitinga, *Brycon nattereri*. **Aquaculture Research** (Print), p. 1-10, 2011b.

VIVEIROS, A. T. M.; ORFÃO, L. H.; NASCIMENTO, A. F.; CORRÊA, F. M.; CANEPPELE, D. Effects of extenders, cryoprotectants and freezing methods on sperm quality of the threatened Brazilian freshwater fish pirapitinga-do-sul *Brycon opalinus* (Characiformes). **Theriogenology**, v. 78, p. 361–368, 2012.

VIVEIROS, A.T.M.; ORFÃO, L.H.; LEAL, M.C. Biologia e conservação de espermatozoides. **In:** BALDISSEROTO, B.; CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E. C. Biologia e fisiologia de peixes neotropicais de água doce. Jaboticabal: FUNEP-UNESP, 2014.

WHEELER, P. A. e THORGAARD, G. H. Cryopreservation of rainbow trout semen in large straws. **Aquaculture**, v. 93, p. 95-100, 1991.

WILSON-LEEDY, J. G. e INGERMANN, R. L. Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. **Theriogenology**, v. 67, p. 661–672, 2007.

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

ARTIGO

CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE TAMBAQUI EM MACROPALHETAS: MEIO DILUIDOR, TEMPO DE EQUILÍBRIO E DESCONGELAMENTO

Dias-Filho VA[1], Maria AN[2]

[1] Centro Integrado de Recursos Pesqueiros e Aquicultura do Itiúba, Companhia de Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e Parnaíba - 5ª Superintendência Regional, Povoado Castro s/n, Porto Real do Colégio, Alagoas, Brasil.
vinicius.filho@codevasf.gov.br

[2]Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal – LABRA, Embrapa Tabuleiros Costeiros, Av. Beira Mar 3250, 49025-040, Aracaju, Sergipe, Brasil.
alexandre.maria@embrapa.cptc.br

RESUMO

O tambaqui tem sido alvo de diversos estudos relacionados à criopreservação seminal, tanto para dar suporte ao programa de melhoramento genético atualmente em andamento, quanto para o uso em escala comercial. Apesar da existência de alguns protocolos de criopreservação de sêmen do tambaqui em palhetas, ainda há a necessidade de estudos com outros recipientes com maior capacidade de armazenamento visando a consolidação da técnica para a aplicação em escala comercial. O objetivo do presente estudo foi estabelecer um protocolo de criopreservação seminal do tambaqui em macropalhetas de 4,0mL, a partir da definição de um meio diluidor, tempo de equilíbrio e a melhor relação temperatura/tempo no descongelamento do sêmen. Para realização dos experimentos, amostras de sêmen de tambaqui foram coletadas, analisadas e selecionadas para o congelamento. No experimento 1, amostras de sêmen foram diluídas em seis meios diluidores preparados a partir da combinação do crioprotetor metilglicol (5, 10 ou 15%) e gema de ovo (0 ou 5). Após a diluição, o sêmen permaneceu em contato com cada meio diluidor durante 4, 20 ou 40 minutos (tempo de equilíbrio) antes do início do congelamento. Imediatamente após cada um destes períodos, o sêmen foi envasado em macropalhetas, congelado em vapor de nitrogênio e posteriormente transferido para o nitrogênio líquido. No experimento 2, foi avaliada a influencia da temperatura e tempo de descongelamento das macropalhetas na qualidade seminal de tambaqui. Para isso, amostras

de sêmen congeladas foram descongeladas em banho-maria nos seguintes tratamentos: 30ºC por 50s (T1) e 80s (T2) e 60ºC por 25s (T3) e 40s (T4). Melhores resultados de cinética espermática foram obtidos com o sêmen diluído no meio composto por 5% de metilglicol acrescido de 5% de gema de ovo, o qual deve ser congelado 4 min após a diluição (motilidade total - 60%; motilidade progressiva - 9%, espermatozoides rápidos – 9%; velocidade curvilinear - 62µm/s, velocidade em linha reta - 24µm/s; velocidade da trajetória média - 37µm/s; linearidade – 39%; retilinearidade – 65%; frequência do batimento flagelar – 21Hz). O descongelamento a 60°/25s apresentou melhores resultados de motilidade total (55 ± 8%) que os protocolos 30°C/50s, 30°/80s e 60°/50s (temperatura/tempo). Ao final do estudo concluiu-se que o protocolo ideal para criopreservação do sêmen do tambaqui em macropalhetas de 4,0mL consiste na diluição do sêmen na proporção de 1:9 (v:v) em um meio diluidor composto por 5% de metilglicol e 5% de gema de ovo, os quais devem permanecer em contato por 4 minutos até que sejam submetidos ao processo de congelamento em botijão dry-shipper. O descongelamento das amostras deve ser realizado em banho-maria a 60°C por 25s.

Palavras-chave: Cinética espermática, crioprotetor, gema de ovo, metilglicol, peixe.

*** Artigo escrito sob as normas da Revista Theriogenology**

1.INTRODUÇÃO

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é uma espécie de peixe nativa da Bacia Amazônica, com ocorrência em ambiente natural nos países Bolívia, Brasil, Colômbia, Peru e Venezuela. Na atualidade, o tambaqui ocupa posição de destaque na produção aquícola brasileira, liderando o ranking de produção de pescado e ocupando a segunda posição entre todas as espécies de peixes cultivadas [15]. Quanto à biologia reprodutiva, a espécie está inserida no grupo que apresenta desova total mediante comportamento migratório (reofílicos) com a produção de um elevado número de gametas. As técnicas de reprodução artificial já são bem difundidas e o desenvolvimento da cadeia produtiva do tambaqui criou uma demanda por tecnologias que suportem ao melhoramento genético da espécie [22, 33].

A criopreservação de sêmen de peixes é uma ferramenta importante na reprodução, que pode ser utilizada na otimização do manejo, na formação de bancos de germoplasma e no desenvolvimento de programas de melhoramento genético, com a possibilidade de minimizar

ou resolver problemas como a assincronia da maturidade sexual e a distância entre os animais doadores de gametas [9, 29, 31]. Contudo, o sucesso da técnica de criopreservação de sêmen depende do domínio e o equilíbrio entre vários fatores que envolvem o processo como o conhecimento das características seminais da espécie; a composição do meio em que o sêmen é diluído; o tempo de exposição do sêmen a este meio diluidor antes do processo de congelamento; a taxa em que sêmen é diluído neste meio; os métodos utilizados no resfriamento, no momento do congelamento e no aquecimento, no momento do descongelamento [11, 29]. Atualmente, já foram reportadas experiências na criopreservação de sêmen de mais de 200 espécies de peixes, mas os protocolos de criopreservação são de caráter espécie-especifico [26].

Na criopreservação de sêmen de peixes é utilizada uma grande quantidade de substâncias a exemplo dos diluidores e crioprotetores internos e externos, assim como também, a combinação entre elas [6, 18]. A eficiência dos crioprotetores está relacionada à sua concentração e o tempo de ação junto aos gametas enquanto eles estiverem com o metabolismo ativo [14, 21]. O dimetilsulfóxido (DMSO) e o metilglicol são os crioprotetores internos mais utilizados na criopreservação seminal de peixes nativos [31]. Para o tambaqui, meios contendo o metilglicol e gema de ovo a 5% têm apresentado melhores desempenhos na preservação da qualidade espermática após o congelamento do sêmen [4].

Na atualidade, a maior parte dos protocolos de criopreservação de sêmen de espécies de peixes nativas, a exemplo do tambaqui, utilizam recipientes de pequeno volume (0,25-0,5mL) [12]. Estes recipientes de envase, apesar de comprovadamente eficazes, apresentam algumas dificuldades para a aplicação em escala comercial, tendo em vista a diferença na escala entre o volume de sêmen liberado por um individuo e o volume de sêmen utilizado para preencher um recipiente após diluição, como também a grande quantidade de gametas necessários à fertilização de espécies de alta fecundidade [9,11,16].

As etapas de congelamento e descongelamento do sêmen na criopreservação são as mais críticas e a velocidade na mudança da temperatura são determinantes para a manutenção da integridade das células [3, 20]. As injúrias celulares como as alterações estruturais na membrana plasmática são consequência da desidratação, cristalização/recristalização e toxicidade [32].

O método de congelamento de sêmen de peixes em vapor de nitrogênio se consolidou no país com o uso de botijões portáteis denominados de *dry-shipper* ou botijão canadense, proporcionando experiências satisfatórias com o sêmen de um elevado número de espécies. Para descongelamento de amostras seminais criopreservadas, tem-se utilizado usualmente o banho-maria em temperaturas que variam entre 30 e 60°C [31]. A temperatura e o tempo de imersão ideal para o descongelamento de amostras de sêmen estão estreitamente ligados a criorresistência dos espermatozoides da espécie, o meio de diluição utilizado e as dimensões do recipiente utilizado no envase das amostras [2, 21, 23, 25].

As macropalhetas, inicialmente desenvolvidas para envasar sêmen de mamíferos, já foram utilizadas para criopreservar sêmen de peixes e apresentaram resultados satisfatórios de cinética espermática e fertilização [2,28,30]. Dentre as vantagens da utilização das macropalhetas na criopreservação estão a maior capacidade de armazenamento, facilidade de envase e aplicação pós-descongelamento e a possibilidade de reutilização. Entretanto, estes recipientes apresentam velocidades de congelamento e descongelamento mais lentas que as palhetas de 0,5mL [16], dificultando a manutenção da integridade e funcionalidade das células. Até o momento, não existem estudos relativos à criopreservação do sêmen de tambaqui em macropalhetas. Deste modo, o objetivo do presente estudo foi desenvolver um protocolo de criopreservação de sêmen de tambaqui em macropalhetas com capacidade de armazenamento de 4,0 mL de volume útil, a partir da definição de um meio diluidor, tempo de equilíbrio e a melhor relação entre a temperatura e o tempo no descongelamento do sêmen.

2.MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta e análise do sêmen *in natura*

Foram utilizados tambaquis (6,7 ± 0,9 Kg) provenientes da Piscicultura Santa Clara, em Propriá-SE e do Centro Integrado de Recursos Pesqueiros e Aquicultura do Itiúba, em Porto Real do Colégio-AL, a partir de seleção prévia após liberação de sêmen obtida através de leve compressão abdominal no sentido anteroposterior. As amostras de sêmen foram coletadas após 12 horas do processo de indução hormonal que constituiu da aplicação de uma dose intramuscular de 2,5 mg de extrato bruto de hipófise de carpa *Cyprinus carpio* para cada quilo de peso corporal dos animais. A aplicação foi realizada após imobilização dos reprodutores na posição de decúbito-lateral com a vendagem dos olhos. O sêmen foi coletado

em tubos de vidro e, imediatamente resfriado e acondicionado em caixa térmica com a temperatura interna próxima a 8,0°C, para o transporte até o Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal da Embrapa Tabuleiros Costeiros, em Aracaju (~100Km).

Em laboratório as amostras foram examinadas quanto à contaminação, após análise visual para detecção da presença de sangue, urina e fezes, e quanto ao percentual de motilidade onde foram selecionadas amostras com o percentual acima de 80%, através da análise subjetiva após ativação dos espermatozoides com bicarbonato de sódio 230 mOsm.

2.2 Experimento 1: Avaliação de meios diluidores e tempos de equilíbrio

Para a criopreservação foram utilizados *pools* (n=4), formados pela união de amostras de sêmen de três machos. Amostras de sêmen (Valores médios dos parâmetros de cinética: MT - 89±4%, MP - 33±10%, rápidos - 49%, VCL - 99±6µm/s, VSL - 59±8µm/s, VAP - 82±6 µm/s, LIN - 59±7µm/s, STR - 72±6 µm/s e BCF – 26±1µm/s) provenientes dos *pools* de sêmen foram diluídas na proporção de 1:9 (sêmen: meio diluidor) em meios diluidores compostos pela solução de glicose (290 mOsm) e pelos crioprotetores metilglicol em diferentes concentrações e com a presença ou ausência de gema de ovo, formando seis diferentes meios: M1 (5% de Metilglicol); M2 (5% de Metilglicol + 5% de gema de ovo); M3 (10% de Metilglicol); M4 (10% de Metil glicol + 5% de gema de ovo) [13]; M5 (15% de Metil glicol) e M6 (15% de Metil glicol + 5% de gema de ovo. O sêmen diluído foi envasado em macropalhetas de 4,0mL (Minitub ®; polipropileno; 5 x 240 mm), sendo submetido a três diferentes tempos de exposição ao meio diluidor (4, 20 e 40minutos), antes do processo de congelamento em vapor de nitrogênio líquido (N_2L) a -166°C, em botijão *dry-shipper* (MVE SC4/2V, GA, EUA). Após um período de 24 horas os recipientes foram transferidos para o botijão criogênico (MVE VOLTA 34, GA, EUA) contendo nitrogênio liquido (N_2L) a -196ºC.

As amostras foram descongeladas em banho-maria a 60°C durantes 25s. A cinética dos espermatozoides foi analisada através do software *Sperm Class Analyzer*® (SCA, Microptics, Versão 5.1 SL, Barcelona, Espanha) configurado para sêmen de tambaqui. Alíquotas de 30 µL do sêmen diluído foram transferidas para microtubos plásticos e adicionados de solução de bicarbonato de sódio a 230 mOsm. Imediatamente após, 3µL da solução com sêmen ativado foram depositados no centro da câmara de *Makler*© e cobertas com lamínula própria, sendo acionado o início do processo de análise em aproximadamente

12s. Os parâmetros de cinética espermática avaliados foram: motilidade total (MT); motilidade progressiva (MP); percentual de espermatozoides com movimentos rápidos (VCL acima de 100µm/s); percentual de espermatozoides com movimentos médios (VCL entre 60 e 100 µm/s), percentual de espermatozoides com movimentos lentos (VCL abaixo de 60 µm/s); velocidades curvilinear (VCL), em linha reta (VSL) e da trajetória média (VAP); linearidade (LIN); retilinearidade (STR); frequência do batimento flagelar (BCF). Os resultados expressaram a média obtida através da captura três campos de imagem com aproximadamente 200 espermatozoides/cada.

2.3 Experimento 2: Avaliação de protocolos de descongelamento

Os procedimentos de coleta de sêmen, análises pré-congelamento foram idênticos aos do item 2.1.

Amostras de quatro *pools* de sêmen), formados pela união de amostras de sêmen de três machos (Valores médios dos parâmetros de cinética: MT - 91±3%, MP - 48±4%, rápidos - 53±4%, VCL - 102±2µm/s, VSL - 71±2µm/s, VAP - 88±2 µm/s, LIN - 69±1µm/s, STR - 80±1 µm/s e BCF – 26±1µm/s) foram diluídas na proporção de 1:9 (sêmen: meio diluidor) em solução de congelamento de constituída de 10% de metilglicol, 5% de gema de ovo solução e 75% de solução de glicose 290 mOsm [14].Os procedimentos de envase e congelamento foram semelhantes aos descritos no item 2.2.

Após duas semanas imersas em N_2L, amostras representativas de cada *pool* foram descongelada de acordo com quatro protocolos diferentes, utilizando banho-maria, formando os seguintes tratamentos: 30°C por 50s (T1) e 80s (T2) e 60°C por 25s (T3) e 40s (T4). As amostras descongeladas foram avaliadas quanto à cinética espermática conforme descrito no item 2.2.

A variação da temperatura durante os processos de congelamento e descongelamento do sêmen contido nas macropalhetas foi determinada através da inserção de sensores de temperatura (termômetro digital – BK Precision 710®, Yorda Linda, Califórnia, EUA) em três amostras. As curvas de congelamento e descongelamento foram geradas pelo software ThermoLink® (Yorda Linda, Califórnia, EUA) onde se registrou a temperatura a cada cinco segundos desde a temperatura inicial (8°C) até a estabilização das

amostras a -166ºC, no congelamento, e de -196°C à temperatura final de cada tratamento após o descongelamento.

2.4 Análise estatística

Os dados de cinética espermática pós-descongelamento foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-wilk (5%) pelo software Assistat versão 7.7 beta e transformados pela fórmula F(x) = arc sen √(x/100), no caso dos dados não normais. Os dados foram expressos em média ± desvio padrão e analisados pelo software Sisvar. 5.3 Build 77, através da análise de variância sendo as médias comparadas pelo teste de Scott-knott ao nível de significância de 5%.

3.RESULTADOS

A velocidade de congelamento das macropalhetas em vapor de nitrogênio em diferentes intervalos foram: 34°C/min no intervalo de 8 a -5°C; 12°C/min no intervalo de -5 a -20°C; 40°C/min entre -20 e -80°C; 15°C/min entre -80 e -166°C. O processo de congelamento das macropalhetas ocorreu em 11,6min com velocidade média 15°C/min.

3.1 Experimento 1: Avaliação de meios de diluição e tempos de equilíbrio

Os resultados de cinética espermática pós-descongelamento de acordo com o meio diluidor e o tempo de equilíbrio estão descritos na Tabela 1. Houve interação significativa entre os meios diluidores e os tempos de equilíbrio apenas nos parâmetros de MT, médios e BCF ($P<0,05$). Nos parâmetros de MT, Rápidos, VCL, VSL, VAP, LIN e STR, os melhores resultados foram obtidos no tempo de equilíbrio de 4 min. Os meios diluidores com 5% de metilglicol sem gema de ovo (M1) e 5% e 10% de metilglicol com 5% de gema de ovo (M2 e M4) foram superiores aos demais nos parâmetros de VAP, LIN e STR ($P<0,05$). No parâmetro de motilidade total houve uma superioridade dos meios diluidores contendo 5 ou 10% de metilglicol e 5% de gema de ovo (M2 e M4), no tempo de equilíbrio de 4min. A VCL dos espermatozoides diluídos no meio M2 foi superior a aquela encontrada nos demais tratamentos ($P<0,05$) expostos ao tempo de equilíbrio de 4 min.

Tabela 1. Resultados da cinética espermática pós-descongelamento do sêmen de tambaqui criopreservado em macropalhetas de 4,0mL de acordo com os tratamentos em esquema fatorial 6x3 (seis meios diluidores x três tempos de equilíbrio).

Parâmetro	Tempo de equilíbrio (min)	Meios diluidores						
		M1	M2	M3	M4	M5	M6	Média
MT (%)	4	43±4^{bA}	60±3^{aA}	45±14^{bA}	58±10^{aA}	39±12^{bA}	37±9^{bA}	
	20	45±8^{aA}	49±14^{aB}	38±9^{aA}	43±16^{aB}	29±10^{aB}	26±9^{bA}	
	40	42±9^{aA}	43±12^{aB}	31±9^{bA}	37±8^{aB}	34±11^{aB}	28±11^{bA}	
MP (%)	4	7±1	9±3	8±4	15±5	3±2	2±1	7±5^{A}
	20	6±2	10±8	3±2	9±4	0	1±1	4±4^{B}
	40	5±3	5±3	2±1	4±2	0	0	3±2^{C}
	Média	6±1^{a}	8±2^{a}	4±3^{b}	9±6^{a}	1±1^{c}	1±1^{c}	
Sptz rápidos (%)	4	6±1	10±4	7±3	13±4	2±1	2±1	7±4^{A}
	20	5±2	10±8	2±2	7±4	1±1	1±1	5±4^{B}
	40	4±2	6±3	2±1	3±2	2±1	1±1	3±2^{B}
	Média	5±1^{a}	9±2^{a}	4±3^{b}	8±5^{a}	2±1^{c}	1±1^{c}	
Sptz Médios (%)	4	7±1^{bA}	16±6^{aA}	5±3^{bA}	14±3^{aA}	5±3^{bA}	4±1^{bA}	
	20	6±2^{aA}	7±3^{aB}	3±1^{bA}	7±4^{aB}	2±1^{cA}	1±1^{cA}	
	40	6±2^{aA}	5±4^{aB}	3±1^{bA}	4±2^{bB}	3±2^{bA}	3±4^{bA}	
Sptz Lentos (%)	4	31±5	34±4	32±7	30±8	31±8	31±7	32±6^{A}
	20	33±4	31±7	32±6	29±8	27±8	23±8	29±7^{B}
	40	33±5	32±6	26±7	30±4	29±8	24±10	29±7^{B}
	Média	32±5^{a}	32±5^{a}	30±7^{b}	30±6^{b}	29±8^{b}	26±8^{c}	
VCL (µm/s)	4	53±3	62±4	51±8	57±5	45±4	47±6	52±6^{A}
	20	51±5	56±12	43±3	54±8	39±7	32±5	46±10^{B}
	40	47±5	52±4	40±4	43±5	41±6	40±7	44±5^{B}
	Média	50±3^{b}	57±5^{a}	45±6^{c}	51±7^{b}	41±3^{c}	40±7^{c}	
VSL (µm/s)	4	21±4	24±7	19±7	28±4	10±4	8±2	18±8^{A}
	20	17±3	26±12	10±4	23±8	3±1	4±3	14±10^{B}
	40	15±5	19±6	10±4	12±4	3±1	3±1	10±6^{C}
	Média	18±3^{a}	23±4^{a}	13±5^{b}	21±8^{a}	5±4^{c}	5±3^{c}	
VAP (µm/s)	4	31±5	37±7	28±8	38±4	19±5	18±2	29±9^{A}
	20	28±4	36±12	18±5	33±9	11±3	11±3	23±11^{B}
	40	24±6	29±5	18±4	21±5	13±2	12±2	19±7^{C}
	Média	27±4^{a}	34±4^{a}	21±6^{b}	31±9^{a}	14±4^{c}	14±4^{c}	
LIN (%)	4	39±5	39±9	35±10	48±7	21±7	18±2	33±12^{A}
	20	34±4	44±11	22±8	41±12	8±2	10±5	27±15^{B}
	40	32±8	35±8	23±7	27±8	8±1	7±3	22±12^{B}
	Média	35±3^{a}	39±4^{a}	27±7^{b}	39±11^{a}	13±7^{c}	12±6^{c}	
STR (%)	4	66±4	65±7	64±9	70±6	48±9	45±4	60±10^{A}
	20	65±4	69±8	53±10	67±12	29±4	28±13	52±19^{B}
	40	63±7	63±7	50±12	54±12	27±3	25±10	47±17^{B}
	Média	65±1^{a}	65±3^{a}	56±7^{b}	64±8^{a}	35±12^{c}	33±11^{c}	
BCF (Hz)	4	23±2^{aA}	21±5^{aA}	22±6^{aA}	20±3^{aA}	16±8^{aA}	16±4^{aA}	
	20	26±1^{aA}	25±3^{aA}	20±4^{aA}	22±5^{aA}	5±5^{bB}	3±3^{bB}	
	40	25±3^{aA}	22±6^{aA}	20±9^{aA}	21±9^{aA}	0^{bB}	0^{bB}	

$^{a-b,A-B}$ Médias seguidas por letras minúsculas 9 (linha) ou maiúsculas (coluna) distintas diferem entre si pelo teste de Skott-knott, dentre as soluções de congelamento ou dentre os tempos de equilíbrio, respectivamente ($p<0.05$). Sptz = espermatozoides; Rápidos (VCL acima de 100µm/s), Médios (VCAL entre 60 e 100µm/s) e lentos (VCL abaixo de 60 µm/s). MT – motilidade total, MP – motilidade progressiva, VCL – velocidade curvilinear, VSL – velocidade em Linha Reta, VAP – velocidade média da trajetória, LIN – linearidade, STR – retilinearidade e BCF -frequência do batimento flagelar. M1 - 5%

de Metilglicol; M2 - 5% de Metilglicol + 5% de gema de ovo; M3 - 10% de Metilglicol; M4 - 10% de Metilglicol + 5% de gema de ovo; M5 - 15% de Metilglicol; M6 - 15% de Metilglicol + 5% de gema de ovo.

3.1 Experimento 2: Avaliação de protocolos de descongelamento

As velocidades de descongelamento do sêmen em banho-maria a 30°C e a 60°C em diferentes intervalos de temperatura estão descritos na Tabela 3. As macropalhetas descongeladas em banho-maria a 30°C durante 50 e 80s, e a 60°C por 25 e 50s atingiram ao final do descongelamento temperaturas de 10, 24, 1 e 26°C, respectivamente. A variação de temperatura das macropalhetas descongelados em banho-maria a 30°C e 60°C está ilustrada na Figura 1.

Os resultados da cinética espermática após a submissão aos protocolos de descongelamento estão descritos na Tabela 4. O percentual de espermatozoides móveis do descongelamento T3 (60°C/25s) foi superior aos demais (P<0,05). Em relação à motilidade progressiva, as macropalhetas descongeladas às temperaturas de 30°C por 80s e a 60°C

Tabela 2. Velocidades de descongelamento (°C/min) do sêmen de tambaqui criopreservado em macropalhetas de 4,0mL após descongelamento em banho-maria a 30°C e a 60°C em diferentes intervalos de temperatura.

Tratamento	Protocolo	Intervalos de Temperatura (°C)				
		(-189 a -80)	(-80 a -20)	(-20 a -5)	(-5 a T_f)	(-189 a T*)
T1	**30°C/50s**	523	400	82	47	239
T2	**30°C/80s**				26	160
T3	**60°C/25s**	1100	720	129	90	456
T4	**60°C/40s**				89	323

* T – Temperatura atingida após a retirada das macropalhetas do descongelamento em banho-maria: $T_{1:}$ 10°C; $T_{2:}$ 24°C; $T_{3:}$ 1°C; $T_{4:}$ 26°C.

durante 25s apresentaram igualdade (P>0,05) e foram superiores aos demais tratamentos (P<0,05). Não foi detectada diferença significativa (P>0,05) nos parâmetros de percentual de rápidos, lentos, VCL, VSL e VAP entre os quatro tratamentos aplicados. Para os parâmetros LIN, STR e BCF os tratamentos T1, T2 e T3 não apresentaram diferença significativa entre si(P>0,05), sendo superiores ao T4 (p<0,05). Os tratamentos T1 e T2 tiveram percentuais de espermatozoides médios superior aos demais (p<0,05).

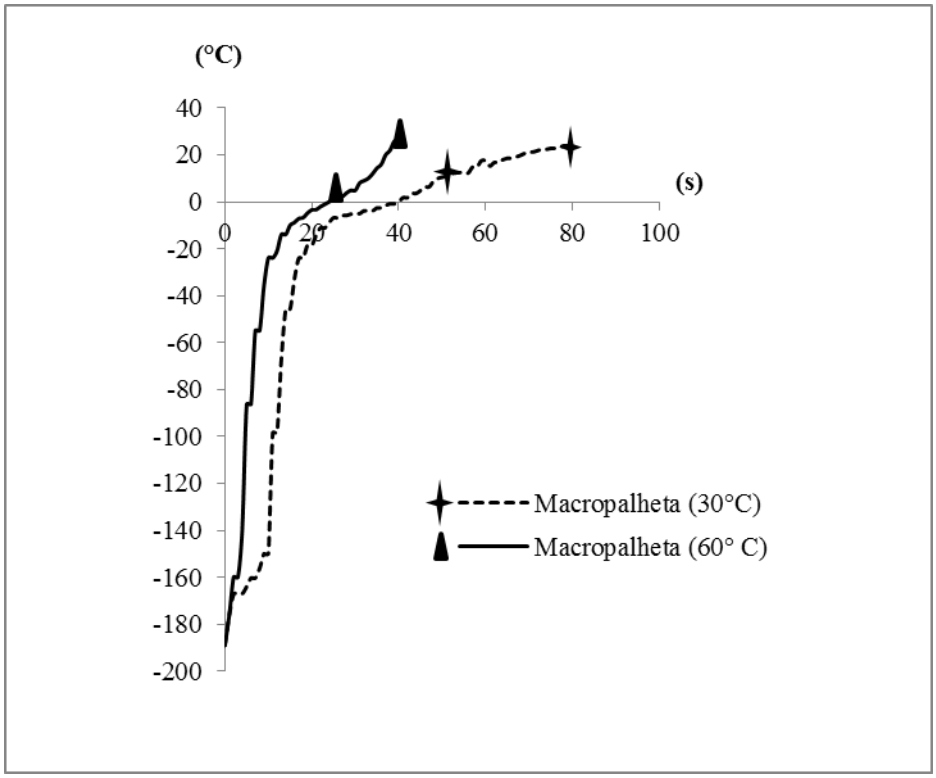

Figura 1. Curvas de descongelamento do sêmen de tambaqui envasado em macropalhetas de 4,0mL descongelados em banho-maria a 30 e 60 °C.

Tabela 4. Cinética espermática no sêmen de tambaqui criopreservado em macropalhetas de 4,0mLde acordo com o protocolo de descongelamento combinando diferentes temperaturas e tempos em banho-maria.

Parâmetro	Protocolo de Descongelamento			
	30°C/ 50s	**30°C/ 80s**	**60°C/ 25s**	**60°C/ 40s**
MT (%)	49± 6[b]	49±8[b]	55 ± 8[a]	46±8[b]
MP (%)	15±5[b]	20±7[a]	20±11[a]	12±8[b]
Sptz Rápidos (%)	13±4	17±6	18±10	12±8
Sptz Médios (%)	10±1[a]	7±1[b]	10±2[a]	4±1[c]
Sptz Lentos (%)	25±2	26±2	26±5	31±5
VCL (µm/s)	63±8	72±7	70±17	63±11
VSL (µm/s)	37±10	47±9	43±20	30±16
VAP (µm/s)	47±11	58±9	54±22	41±17
LIN (%)	59±9[a]	65±7[a]	58±20[a]	45±19[b]
STR (%)	78±4[a]	82±4[a]	76±12[a]	67±14[b]
BCF (%)	28±1[a]	28±0[a]	28±2[a]	24±1[b]

a-b Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Scott-knott ($P<0.05$). Sptz = espermatozoides; Rápidos (VCL acima de 100µm/s), Médios (VCAL entre 60 e 100µm/s) e lentos (VCL abaixo de 60 µm/s). MT – motilidade total, MP – motilidade progressiva, VCL – velocidade curvilinear, VSL – velocidade em linha reta, VAP – velocidade da trajetória média, LIN – linearidade, STR – retilinearidade e BCF -frequência do batimento flagelar.

4.DISCUSSÃO

Até o momento não há estudos com a utilização de macropalhetas na criopreservação de sêmen de tambaqui. As informações produzidas a cerca do meio diluidor, tempo de equilíbrio e a melhor relação temperatura/tempo no descongelamento do sêmen abrem novas perspectivas para a aplicação do sêmen criopreservado da espécie em escala comercial.

Os protocolos de congelamento e descongelamento do sêmen de tambaqui em macropalhetas desenvolvidos em nosso estudo apresentaram alta qualidade espermática pós-descongelamento, próxima àquela encontrada na literatura para o sêmen da mesma espécie criopreservado nas tradicionais palhetas de 0,5mL [4] e criotubos de 1,6 e 4,5mL [13]. A avaliação da cinética espermática é fundamental para se analisar o sucesso do processo de criopreservação e o potencial de fecundação dos espermatozoides [1]. Os parâmetros de espermatozoides rápidos, VCL, VSL,VAP e BCF estão correlacionados com o potencial de fertilização dos espermatozoides de peixes [5, 6, 7, 24]. O elevado percentual de espermatozoides móveis observados após o descongelamento, associados à elevada quantidade de sêmen armazenado, apontam que, o sêmen do tambaqui criopreservado em macropalhetas de 4,0mL poderá ser utilizado de forma promissora em práticas de fertilização atendendo a elevada demanda por espermatozoides frente a grande produção de ovócitos.

Em nosso estudo verificamos que a adição da gema de ovo ao meio diluidor melhora a qualidade espermática pós-descongelamento desde que combinada ao crioprotetor metilglicol até o nível de 10%, evidenciando sua importância na criopreservação do sêmen de tambaqui. A manutenção da integridade e funcionalidade dos espermatozoides submetidos ao processo de criopreservação depende, dentre outros fatores, da ação das substâncias que são utilizadas como crioprotetoras e suas concentrações no meio em que o sêmen é diluído [14, 25]. A gema de ovo é eficiente na proteção da célula espermática durante o processo de congelamento por repor os fosfolipídios perdidos durante o choque térmico, prevenindo a ruptura da membrana [31]. Até o presente momento, o protocolo de criopreservação de sêmen de tambaqui que tem proporcionado ou melhores resultados de cinética espermática pós-descongelamento é constituído de 10% de metilglicol e 5% de gema de ovo em solução de glicose 290mOsm, com um tempo de equilíbrio de 20 minutos antes do congelamento em *dry shipper* [4, 12].

Entretanto, no nosso estudo foi possível reduzir o percentual de metilglicol para 5% no meio diluidor, desde que o tempo de equilíbrio seja reduzido para 4 minutos. Este fato mostra-se importante para as práticas de fertilização, pois reduz o potencial tóxico do metilglicol junto aos ovócitos e mesmo aos espermatozoides.

Os melhores resultados no congelamento do sêmen foram observados nas amostras submetidas ao menor tempo de equilíbrio (4 minutos). Isso pode estar relacionado à toxicidade do crioprotetor metilglicol, em consequência do tempo de exposição dos espermatozoides a esta substância. Os tratamentos em que se aplicou o tempo de equilíbrio de 40min obtiveram os piores resultados de cinética espermática pós-descongelamento, assim como os meios de diluição compostos por 15% de crioprotetor, evidenciando o efeito deletério de altas concentrações de crioprotetores e/ ou elevados tempos de equilíbrio na diluição de sêmen no processo de criopreservação. O metilglicol ou 2-metoxietanol ($CH_3O(CH_2)_2OH$) é um éter glicólico obtido através da reação do metanol com o óxido de eteno. Esta substância é considerada de baixa toxicidade em relação a outros crioprotetores e vem apresentando sucesso na criopreservação de sêmen de peixes nativos do Brasil [10].

No processo de descongelamento de amostras criopreservadas ocorre a reidratação celular provocada por um influxo de água, este processo deve ocorrer forma rápida, de modo a evitar a recristalização no meio intracelular que podem ser danosos às células e levá-las a inviabilidade, no entanto se o processo for demasiadamente rápido o processo de reidratação celular pode não ser completado [20]. De maneira geral, o sêmen criopreservado de espécies de peixes tropicais apresenta melhores índices de motilidade e vigor após descongelamento em temperaturas dentro da faixa de 30 a 60 °C [31]. Apesar da temperatura de 30°C ser próxima a temperatura de 35ºC que proporcionou melhores resultados no descongelamento de sêmen de outras espécies de peixes envasadas em macropalhetas de 4,0mL [16, 19, 28], o melhor tratamento aplicado neste estudo foi o descongelamento a 60°C por 25 segundos, já que este apresentou o maior percentual de espermatozoides móveis ao final do descongelamento e sempre se manteve entre os melhores tratamentos nos outros parâmetros de cinética analisados, corroborando com os estudos existentes com o sêmen de tambaqui criopreservado em outros recipientes que utilizaram temperaturas de descongelamento variadas, mas apresentaram os melhores resultados de cinética espermática a partir do descongelamento a 60°C [4, 8, 12, 17, 27]. O descongelamento a 60°C por 25 segundos deve

ter apresentado superioridade em relação aos descongelamentos a 30ºC, devido a sua maior velocidade de reidratação.

Ao final do estudo concluiu-se que o protocolo ideal para criopreservação do sêmen do tambaqui em macropalhetas de 4,0mL consiste na diluição do sêmen na proporção de 1:9 (v:v) em um meio diluidor composto por 5% de metilglicol e 5% de gema de ovo, os quais devem permanecer em contato por 4 minutos até que sejam submetidos ao processo de congelamento em botijão *dry-shipper*. O descongelamento das amostras deve ser realizado em banho-maria a 60°C por 25s.

AGRADECIMENTOS: Os autores agradecem à FAPITEC pelo apoio financeiro e aos responsáveis-técnicos e funcionários da Piscicultura Santa Clara e do Centro Integrado de Recursos Pesqueiros e Aquicultura pelo apoio na coleta do sêmen.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Alavi SM, Cosson J. Sperm motility in fishes. I. Effects of temperature and pH: a review. Cell Biol Int. 2005; 29(2): 101-110.

[2] Cabrita E, Robles V, Alvarez R, Herraéz MP. Cryopreservation of rainbow trout sperm in large straws: application to large scale fertilization. Aquaculture 2001; 201: 301-314.

[3] Carneiro PCF. Tecnologias de produção e armazenamento de sêmen de peixes. Rev Bras Reprod Anim. 2007: 31(3); p.361-366.

[4] Carneiro PCF, Azevedo HC, Santos JP, Maria AN. Cryopreservation of tambaqui (*Colossoma macropomum*) semen: extenders, cryoprotectants, dilution ratios and freezing methods. CryoLetters 2012; 33: 385-393.

[5] Carvalho ACM. Criopreservação de sêmen de tambaqui *Colossoma macropomum* em criotubos. Aracaju: Universidade Federal de Sergipe; 2013.

[6] Cavalcante SL. Caracterização das subpopulações espermáticas do tambaqui e sua correlação com a fertilidade. Aracajú: Universidade Federal de Sergipe; 2014.

[7] Gallego V, Pérez L, Asturiano JF, Yoshida M. Relationship between spermatozoa motility parameters, sperm/egg ratio, and fertilization and hatching rates in pufferfish (Takifugu niphobles). Aquaculture 2013; 416: 238-243.

[8] Godinho HP, Viveiros ATM. Current Status of Sperm Cryopreservation of Brazilian Characiform Fishes. In: Tiersch TR, Green CC editores. Cryopreservation in Aquatic Species, 2a ed. World Aquaculture Society: Baton Rouge; 2011, p. 875-884.

[9] Lopes JT, Pinheiro JPS, Nunes LT, Pinheiro RRR, Souza MEM, Almeida PS, Nascimento RV, Campello CC, Salmito-Vanderley CSB. Avaliação de diferentes crioprotetores e taxas de diluição na criopreservação seminal de *Prochilodus brevis*. Rev. Bras. Reprod. Anim. 2014; 38(3): 170-5.

[10] Maria AN, Viveiros ATM, Freitas RTF, Oliveira AV. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (Brycon orbignyanus) semen, an endangered Brazilian teleost fish. Aquaculture 2006; 260: 298–306.

[11] Maria NA, Azevedo HC, Santos JP, Carneiro PCF Hormonal induction and semen characteristics of tambaqui Colossoma macropomum. Zygote 2011; 20: 39–43.

[12] Maria NA, Carneiro PCF. Criopreservação de sêmen de peixes no Brasil: estado da arte e perspectivas futuras. Ciência Animal 2012; 22(1); 124-131.

[13] Maria NA, Carvalho ACM, Araújo RV, Santos JP, Carneiro PCF, Azevedo HC. Use of cryotubes for the cryopreservation of tambaqui fish semen (*Colossoma macropomum*). Cryobiology 2015; 70(2):109-14.

[14] Martínez JG, Carrasco SP. Crioconservación de semen en peces: efectos sobre la movilidad espermática y la fertilidad. Acta biol. Colomb. 2010; 15(2): 3-24.

[15] Matias JFN. Aquicultura na América Latina: Situação Atual e Perspectivas. Fortaleza: Associação Brasileira de Criadores de Camarão; 2014.

[16] Medina-Robles VM, Velasco-Santamaria YM, Cruz-Casallas PE. Efecto del volumen de empaque sobre la tasa de congelación-descongelación y la fertilidad de semen crioconservado de yamú (Brycon amazonicus). Archivos de Medicina Veterinaria 2007; 39(3): 229-237.

[17] Murgas LDS, Miliorini AB, Freitas RTF, Pereira, GJM Criopreservação de sêmen de curimba (Prochilodus lineatus) mediante adição de diferentes diluidores, ativadores e crioprotetores. Revista Brasileira de Zootecnia 2007; 36(3): 526-531.

[18] Ninhaus-Silveira A, Foresti F, Veríssimo-Silveira R, Senhorini JA. Seminal Analysis, Cryogenic Preservation, and Fertility in Matrinxã Fish, *Brycon cephalus* (Günther, 1869). Brazilian Archives of Biology and Technology 2006; 49(4): 651-9.

[19] Pegg DE. Principles of Cryopreservation. In: Day JG, Stacey GN, editores. Methods in molecular biology: Cryopreservation and freeze-drying protocols. 2ª ed. Totowa: Humana Press Inc.; p. 39-58, 2007.

[20] Peñaranda DS, Pérez L, Gallego V, Jover M, Asturiano JF. Improvement of European eel sperm cryopreservation method by preventing spermatozoa movement activation caused by cryoprotectants. Cryobiology 2009; 59: 119-126.

[21] Resende EK, Oliveira CAL, Legat AP, Ribeiro RP. Melhoramento animal no Brasil: Uma visão crítica para espécies aquáticas. Maringá: Sociedade Brasileiro de Melhoramento Animal, 2010.

[23] Richardson GF, Wilson CE, Crim LW, Yao Z. Cryopreservation of yellowtail flounder *Pleuronectes ferrugineus* semen in large straws. Aquaculture 1999; 174: 89-94.

[24] Rurangwa E, Kime DE, Ollevier F, Nash JP. The measurement of sperm motility and factor affecting sperm quality in cultured fish. Aquaculture 2004; 234(1): 1-28.

[25] Salmito-Vanderley CSB, Vieira MJAF; Leite LV, Oliveira FCE, Francisco Renan Aragão Linhares FRA, Salgueiro CCM; Nunes JF. Meios de congelamento para conservação de sêmen de peixes da Famila Characidae. Ciência Animal 2012; 22(1): 255-268.

[26] Tiersch TR. Introduction. In: Tiersch TR, Mazik PM, editores. Cryopreservation in Aquatic Species. Baton Rouge: World Aquaculture Society 2000, p. 19-26.

[27] Varela Jr AS, Corcini CD, Streit Jr DP, Rizzoto G, Jardim RD, Lucia Jr T, Figueiredo MRC. Efeito crioprotetor de diferentes concentrações do dimetilsulfóxido no congelamento de sêmen de tambaqui *Colossoma macropomum*. Atlantica 2012; 34(2): 129-137.

[28] Velasco-Santamaria, Y. M.; Medina-Robles V.M.; Cruzcasallas, E.P. Cryopreservation of yamú (Brycon amazonicus) sperm for large scale fertilization. Aquaculture2006; 256(4): 267-271.

[29] Viveiros ATM Criopreservação de sêmen de peixes. Goiânia: Sociedade Brasileira de Reprodução Animal, 2005.

[30] Viveiros ATM, Orfão LH, Maria AN, Allaman, IBA. Simple, inexpensive and successful freezing method for curimba *Prochilodus lineatus* (Characiformes) semen. Animal Reproduction Science 2009; 112: 293–300.

[31] Viveiros ATM, Orfão LH, Leal MC. Biologia e conservação de espermatozoides. In: Baldisserotto B, Cyrino JEP, Urbinati EC, editores. Biologia e fisiologia de peixes neotropicais de água doce. Jaboticabal: FUNEP-UNESP; 2014, p. 307-327.

[32] Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. Animal Reproduction Science 2000; 60: 481-492.

[33] Woynarovich E, Horváth L. A propagação artificial de peixes de águas tropicais: manual de extensão. Brasília: FAO/CODEVASF/CNPq, 1983.