

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

CRIOPRESERVAÇÃO SEMINAL DO TAMBAQUI *Colossoma macropomum*

RAYCON ROBERTO FREITAS GARCIA

Dissertação apresentada como um dos requisitos à obtenção do Grau de
Mestre em Zootecnia
Área de concentração Produção Animal.

Porto Alegre, RS
2013

CIP - Catalogação na Publicação

Garcia, Raycon Roberto Freitas
Criopreservação Seminal do Tabaqui Colossoma
macropomum / Raycon Roberto Freitas Garcia. -- 2013.
49 f.

Orientador: Danilo Pedro Streit Jr..
Coorientadores: Jayme Aparecido Povh, Ender
Rosana Oberst.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa
de Pós-Graduação em Zootecnia, Porto Alegre, BR-RS,
2013.

1. Piscicultura. 2. Congelamento de Sêmen. 3.
Crioprotetor. 4. Solução Diluidora. I. Streit Jr.,
Danilo Pedro, orient. II. Povh, Jayme Aparecido,
coorient. III. Oberst, Ender Rosana, coorient. IV.
Título.

RAYCON ROBERTO FREITAS GARCIA
Zootecnista

DISSERTAÇÃO

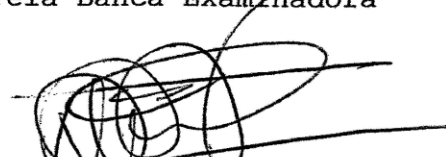
Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

MESTRE EM ZOOTECNIA

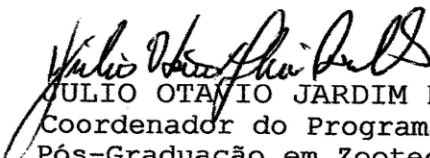
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovado em: 22.03.2013
Pela Banca Examinadora

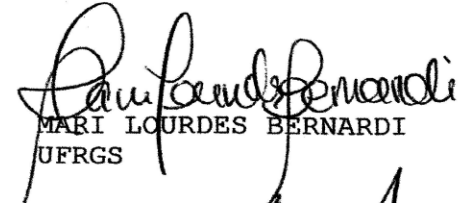
Homologado em: 17.05.2013
Por



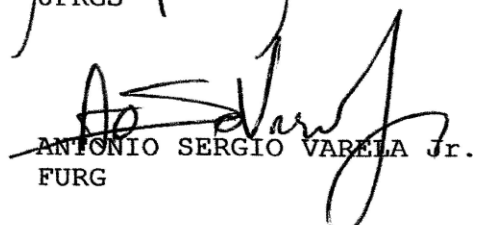
DANILO PEDRO STREIT JR.
PPG ZOOTECNIA/UFRGS
Orientador




JULIO OTAVIO JARDIM BARCELLOS
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia




MARI LOURDES BERNARDI
UFRGS



ANTONIO SERGIO VARELA Jr.
FURG



ALEXANDRE NIZIO MARIA
EMBRAPA/SE



PEDRO ALBERTO SELBACH
Diretor da Faculdade de
Agronomia

À Carlos Roberto Garcia, meu pai.
À Eunice B. Freitas Garcia, minha mãe.
À Sebastiana Firmina de Freitas (in memoriam), minha avó.
Dedico-lhes de coração esta vitória.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por ter me agraciado com o dom da vida, e me dado forças para lutar pelos meus sonhos e fé para acreditar na vitória.

A Universidade Federal do Rio Grande do Sul, por ter possibilitado o meu ingresso no Programa de Pós Graduação em Zootecnia e a realização desta dissertação de Mestrado. A CAPES pelo apoio financeiro, possibilitando o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Danilo Pedro Streit Jr., meu tutor, que pode me proporcionar a maravilhosa oportunidade de realizar um sonho, por ter sido um grande orientador e ultrapassando os limites profissionais sendo mais que um amigo, sendo um pai, obrigado pela confiança.

Aos meus co-orientadores Prof. Dr. Jayme Aparecido Povh e Ender Rosana Oberst, pelos momentos de atenção dispensados comigo, sempre de bom grado.

Ao senhor José Mario Ribeiro Mendes, proprietário da Piscicultura Buriti e ao senhor Megume Yokoyama (Pedrinho), proprietário da Piscicultura Boa Esperança e seus respectivos funcionários, que além de transmitirem todo o seu conhecimento, abriram as portas de seus estabelecimentos e forneceram todo o amparo para que este trabalho fosse desenvolvido, sem contar o apoio e a confiança.

A todos os professores e funcionários do programa de Pós-Graduação, em especial a Ione Borcelli Gonçalves que foi sempre muito prestativa, me ajudando quando eu precisei.

Aos meus pais e amigos em geral que estiveram envolvidos na minha jornada até hoje.

CRIOPRESERVAÇÃO SEMINAL DO TAMBAQUI *Colossoma macropomum*

1

Autor: Raycon Roberto Freitas Garcia

Orientador: Prof. Dr. Danilo Pedro Streit Jr.

Co-Orientadores: Prof. Dr. Jayme Aparecido Povh e Profa. Dra. Enefer Rosana Oberst

RESUMO

As soluções crioprotetoras, têm como finalidade proteger os espermatozoides da severidade produzida pela baixa temperatura no processo de criopreservação. Neste estudo o objetivo foi avaliar a qualidade do sêmen de *Colossoma macropomum* pós-descongelamento, utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) como crioprotetor combinado com duas soluções diluidoras (tratamentos): T1 (Glicose – 90,0 g/L, Citrato de Sódio - 6,0 g/L, EDTA - 1,5 g/L, Bicarbonato de Sódio - 1,5 g/L, Cloreto de Potássio - 0,8 g/L, Sulfato de Gertamicina - 0,2 g/mL) e T2 (Glicose - 90,0 g/L e Água de Coco em Pó - ACP® - 10,0 g/L). O sêmen de 26 animais machos, previamente analisados foi criopreservado em cinco momentos diferentes dentro do período reprodutivo, constituindo cinco *pools*. Quatro fêmeas foram utilizadas para observação dos índices de produtividade (taxas de fertilização e eclosão). Foram avaliados nos tratamentos, motilidade (Mot), tempo de motilidade (TMot), patologias espermáticas, taxa de fertilização e eclosão, integridade da membrana espermática, funcionalidade da mitocôndria e do DNA espermático. A Mot e o TMot não diferiram ($P>0,05$) entre os tratamentos T1 e T2 e ambos foram inferiores ao sêmen *in natura*. O número de espermatozoides normais foi significativamente diferente ($P<0,05$) nos tratamentos T1 (15,1%) e T2 (21,9%), e ambos apresentaram uma redução no percentual de espermatozoides normais quando comparados ao sêmen *in natura* (57,4%). Quanto as taxas de fertilização e eclosão não houve diferença ($P>0,05$) entre os tratamentos avaliados (T1 e T2). Após a criopreservação dos espermatozoides, não foram verificadas diferenças ($P>0,05$) entre os tratamentos, na funcionalidade da mitocôndria e integridade do DNA espermático. Quanto a integridade da membrana, no T1 (53,4%) apresentou maior percentual ($P<0,05$) de espermatozoides com a membrana íntegra do que no T2 (43,7%). A solução crioprotetora composta com duas soluções testadas não foram efetivas na proteção estrutural da célula espermática. Porém, mantiveram íntegro em quase que toda sua totalidade o DNA dos espermatozoides de *C. macropomum*.

¹ Dissertação de Mestrado em Zootecnia – Produção Animal, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (49p.) Março de 2013.

CRYOPRESERVATION OF *Colossoma macropomum* SPERM¹

Author: Raycon Roberto Freitas Garcia

Adviser: Danilo Pedro Streit Jr.

Co-Adviseres: Prof. Dr. Jayme Aparecido Povh e Profa. Dra. Ender Rosana Oberst

ABSTRACT

Cryoprotectant solutions aim to protect spermatozoa from injuries produced by low temperature in the cryopreservation process. In this study we evaluated the quality of *Colossoma macropomum* semen after thawing, using dimethyl sulfoxide (DMSO) as a cryoprotectant combined with two extender solutions (treatments): T1 (Glucose - 90.0 g/L, Sodium Citrate - 6.0 g/L, EDTA - 1.5 g/L, Sodium Bicarbonate - 1.5 g/L, Potassium Chloride - 0.8 g/L, Gertamicine Sulfate - 0.2 g/mL) and T2 (Glucose - 90.0 g/L and Powder Coconut Water - ACP[®] - 10.0 g/L). Semen from 26 males, previously cryopreserved was analyzed at five different times throughout the reproductive season, forming five pools. Four females were used for observation of reproductive indexes (fertilization and hatching rate). The following parameters were assessed: motility (Mot), motility time (TMot) sperm pathologies, fertilization rate and hatching rate, sperm membrane integrity, mitochondrial and sperm DNA function. The Mot and TMot did not differ ($P > 0.05$) between T1 and T2 and both showed lower values compared to fresh semen. The number of normal spermatozoa was significantly different ($P < 0.05$) in T1 (15.1%) and T2 (21.9%) treatments, and both showed a reduction in the percentage of normal spermatozoa when compared to fresh semen (57.4%). Regarding fertilization and hatching rates, there was no difference ($P > 0.05$) between the treatments (T1 and T2). After sperm cryopreservation, no differences were evidenced ($P > 0.05$) between the treatments for mitochondrial functionality and sperm DNA integrity. T1 showed a higher membrane integrity (53.4%) than that found in T2 (43.7%). The cryoprotectant solution tested in this study did not work effectively in protecting spermatoc cells from structural damages. However, majority of the cells remained with intact DNA after thawing.

¹ Master of Science Dissertation in Animal Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (49p.) March, 2013.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	12
1. <i>INTRODUÇÃO GERAL</i>	13
2. <i>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</i>	13
2.1 Espécie em estudo	14
2.2 Espermatozoides e parâmetros físicos e químicos do sêmen	15
2.3 Soluções diluidoras	17
2.4 Crioprotetores.....	18
2.5 Congelamento	19
3. <i>HIPÓTESE</i>	21
4. <i>OBJETIVOS</i>	22
4.1 Geral.....	22
4.2. Específicos	22
CAPÍTULO 2	23
<i>Resumo</i>	24
<i>Abstract</i>	24
1. <i>Introdução</i>	25
2. <i>Material e Métodos</i>	26
3. <i>Resultados</i>	30
4. <i>Discussão</i>	34
5. <i>Conclusão</i>	36
6. <i>Agradecimentos</i>	37
7. <i>Referências</i>	37
CAPÍTULO 3	40
1. <i>CONSIDERAÇÕES FINAIS</i>	41
2. <i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	42
3. <i>VITA</i>	49

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2	23
Tabela 1 – Lista de patologias espermáticas avaliadas segundo recomendação de Miliorini <i>et al.</i> , 2011.	27
Tabela 2 – Composição das soluções diluidoras utilizadas no presente experimento.	28

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1	12
Figura 1 – Exemplar de <i>C. macropomum</i> , espécie nativa brasileira que foi utilizada no experimento de congelamento de sêmen.	14
CAPÍTULO 2	23
Figura 1 – Média e desvio padrão da Motilidade Progressiva (Mot) e Espermatozoides Normais (Eptz N) do sêmen de <i>C. macropomum</i> , <i>in natura</i> e congelado com duas soluções diluidoras (T1 – Solução 1 e T2 – Solução 2). Método de avaliação de dados não paramétricos, pelo teste de Kruskal-Wallis.	30
Figura 2 – Média e desvio padrão do Tempo da Motilidade (TMot) do sêmen de <i>C. macropomum</i> , <i>in natura</i> e congelado com duas soluções diluidoras (T1 – Solução 1 e T2 – Solução 2). Método de avaliação de dados não paramétricos, pelo teste de Kruskal-Wallis.	31
Figura 3 – Média e desvio padrão da Taxa de Fertilização (Tx Fert) e Taxa de Eclosão (Tx Ecl) do sêmen de <i>C. macropomum</i> , congelado com duas soluções diluidoras (T1 – Solução 1 e T2 – Solução 2). Método de avaliação de dados não paramétricos, pelo teste de Kruskal-Wallis.	31
Figura 4 – Percentuais médios dos defeitos espermáticos primários do sêmen congelado de <i>C. macropomum</i> com diferentes tratamentos. Macrocefalia (MaC); Microcefalia (MiC); Cabeça Degenerada (CabD); Peça Intermediária Degenerada (PID); Cauda Enrolada (CE); Cauda Quebrada (CQ) e Cauda Dobrada (CD).....	32
Figura 5 – Percentuais médios de defeitos secundários do sêmen congelado de <i>C. macropomum</i> com diferentes tratamentos. Cauda Degenerada (CDe); Cabeça Isolada (Cabl); Gota Citoplasmática Distal (GCD) e Gota Citoplasmática Proximal (GCP).	33
Figura 6 – Média e desvio padrão dos percentuais de Integridade da Membrana (Int Memb), Funcionalidade de Mitocôndria (Fun Mit) e Integridade do DNA (Int DNA) observados nos espermatozoides de <i>C. macropomum</i> após a criopreservação.	34

LISTA DE ABREVIACES

- ACP**[®] – gua de Coco em P
- BTS**[®] – Beltsville Thawing Solution
- CabD** – Cabeça Degenerada
- Cabl** – Cabeça Isolada
- CD** – Cauda Dobrada
- CDe** – Cauda Degenerada
- CE** – Cauda Enrolada
- CFDA** – Diacetato de Carboxifluorescena
- CQ** – Cauda Quebrada
- DMF** – Dimetilformamida
- DMSO** – Dimetilsulfóxido
- EDTA** – cido Etilenodiamido Tetra-Acético
- Eptz N** – Espermatozóides Normais
- GCD** – Gota Citoplasmática Distal
- GCP** – Gota Citoplasmática Proximal
- MaC** – Macrocefalia
- MiC** – Microcefalia
- Mot** – Motilidade
- PI** – Iodeto de Propídio
- PID** – Peça Intermediária Degenerada
- T1** – Tratamento 1
- T2** – Tratamento 2
- TMot** – Taxa de Motilidade
- Tx Ecl** – Taxa de Eclosão
- Tx Fert** – Taxa de Fertilizao

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO GERAL

A produção aquícola continental está em franco crescimento de acordo com os dados estatísticos do Boletim de Pesca e Aquicultura do Ministério da Pesca e Aquicultura (BRASIL, 2012), sendo que no triênio 2008-2010 o incremento chegou a 40%. Dentro deste contexto de aumento da produção aquícola continental, o tambaqui (*Colossoma macropomum*) espécie nativa da Bacia Amazônica, é a terceira mais produzida no geral e é a espécie nativa brasileira mais produzida, em especial nas regiões norte, centro oeste e nordeste do Brasil, em função do seu grande potencial para a criação em sistemas intensivos (MELO *et al.*, 2001).

Consolidar a cadeia produtiva das espécies nacionais, principalmente o *C. macropomum* é de fundamental importância para a continuação do crescimento da produção e conseqüentemente a geração renda. Dentre algumas técnicas para a consolidação da cadeia produtiva, principalmente para a reprodução, esta a criopreservação de gametas que tem uma gama de aplicação extensa, como foi fundamental, por exemplo, no programa de melhoramento genético desenvolvido para o *C. macropomum* e *P. faciatum* nos últimos quatro anos (RESENDE *et al.*, 2010). Desenvolver e/ou aperfeiçoar biotécnicas que possam ser aplicadas nos processos da cadeia produtiva do *C. macropomum*, seguramente garantirá o seu desenvolvimento no que tange no mínimo o custo de produção. Soma-se ainda que outros benefícios da técnica de congelamento de sêmen são mencionados, como; eliminação da assincronia na maturidade gonadal entre machos e fêmeas; redução de custos e riscos de transporte de reprodutores e redução do plantel de reprodutores (SUQUET *et al.*, 2000; VIVEIROS, 2005; MARIA *et al.*, 2009; VIVEIROS *et al.* 2009b; VIVEIROS *et al.*, 2012).

Para efetivar a qualidade do método de criopreservação de sêmen, faz-se necessário estabelecer uma solução crioprotetora eficaz, com o intuito de ser o mais eficiente possível para preservar a integridade do espermatozoide. Por tanto, estudos são necessários para delimitar uma solução diluidora adequada e a concentração do crioprotetor ideal para cada espécie nativa.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O congelamento de sêmen de peixes é uma técnica valiosa para a preservação de material genético e pode ser utilizada tanto para programas de melhoramento genético de espécies de interesse econômico quanto para programas de preservação de populações nativas. Em ambas as situações, a preservação de sêmen por longos períodos tem por finalidade aumentar a viabilidade genética de uma determinada população (CARNEIRO, 2007).

2.1 Espécie em estudo

Ordem: Characiformes.

Família: Characidae.

Sub-Família: Serrasalminae.

Gênero: *Colossoma*

Espécie: *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818).

Nome Popular: Tambaqui (Figura 1).



Figura 1 – Exemplar de *C. macropomum*, espécie nativa brasileira que foi utilizada no experimento de congelamento de sêmen.

O *C. macropomum* é uma espécie que possui escamas com corpo romboidal, nadadeira adiposa curta com raios nas extremidades, dentes molariformes e rastros branquiais longos e numerosos, boca prognata pequena e fortes lábios grossos; sua coloração parda na metade superior e preta na metade inferior do corpo pode variar para mais clara ou escura dependendo da cor da água (ARAÚJO-LIMA & GOULDING, 1998). Quanto ao seu comportamento alimentar, é um onívoro em seu meio natural (FURUYA, 2001). A espécie foi introduzida nas pisciculturas do sul do país a partir da década de 70, porém, com restrição no cultivo com relação à temperatura abaixo de 22°C, crescendo muito lentamente e podendo morrer abaixo de 16°C (RANZANI-PAIVA *et al.*, 1999).

A reprodução do *C. macropomum* segundo Ceccarelli *et al.* (2000), ocorre entre outubro a março, e a maior concentração de desovas por indução tem prevalência entre os meses de novembro a fevereiro. Por ser uma espécie sincrone total, os oócitos maduros são liberados durante o período reprodutivo de uma só vez, ao contrário das espécies de desova múltipla ou parcelada, que liberam seus oócitos mais de uma vez (VAZZOLER, 1996). A espécie *C. macropomum* segundo Andrade & Yasui (2003), tem sua metodologia

reprodutiva artificial tecnicamente dominada sendo necessária a indução hormonal com extrato de hipófise de carpa. Mas atualmente com as variações ocorridas no meio ambiente, esta assincronia e a qualidade dos gametas têm variado de acordo com o período reprodutivo (GALO, 2013).

2.2 Espermatozoides e parâmetros físicos e químicos do sêmen

O sêmen é um líquido ou uma suspensão celular semi-gelatinosa, contendo gametas masculinos (espermatozoides) (GARNER & HAFEZ, 1995). Para tornar-se espermatozoide, as células germinativas masculinas dos peixes passam por uma série de mudanças, começando como espermatogônias progredindo para espermatócitos primários e secundários, espermátides, e finalmente o espermatozoide (GRIER & NEIDIG, 2011). Em peixes ainda podem existir dois tipos de testículos, os tubulares e os lobulares (GRIER & NEIDIG, 2011), onde os espermatozoides são liberados no lúmen dos túbulos anastomosados (peixes menores) ou lóbulos (peixes maiores). Com poucas exceções a morfologia espermática básica é uniforme; cabeça (arredondada), peça intermediária (curta) e cauda (flagelo) (GRIER & NEIDIG, 2011).

Existem peculiaridades nos espermatozoides da maioria das espécies de peixes, tais como, a falta do acrossoma, estrutura que está presente em todos os outros grupos de vertebrados (COSSON, 1999; MARQUES, 2001). Por outro lado, a falta do acrossoma no espermatozoide da maioria dos teleósteos é justificada pela presença da micrópila, um orifício no córion do oócito, destinado à penetração do espermatozoide (COSSON, 1999). Outras características peculiares dos espermatozoides de peixes são: a imobilidade no plasma seminal, a sua ativação quando ocorre o balanço osmótico, no momento que o sêmen entra em contato com a água e a curta duração da vida após a sua ativação (BILLARD & COSSON, 1992). Quanto ao plasma seminal, este tem funções de proteger a capacidade fertilizante do espermatozoide e preservar o metabolismo energético para ativação do mesmo (CIERESZKO *et al.*, 2011).

A ativação dos espermatozoides ocorre quando o sêmen entra em contato com a água e há a diluição da concentração do potássio presente no líquido seminal, que por estar em concentração elevada, consegue manter o gameta masculino imóvel nas gônadas (HARVEY & CAROLSFELD, 1993; ZANIBONI-FILHO & NUÑER, 2004). Outro tipo de ativação espermática ocorre pela diferença existente entre a baixa osmolaridade da água em relação aquela do plasma seminal que é essencial para iniciar a motilidade dos espermatozoides em peixes de água doce (HARVEY & CAROLSFELD, 1993).

A motilidade espermática pode ser afetada durante o processo de ativação, quando o sêmen é diluído em água e tem o seu início. Para uma adequada avaliação do sêmen, é necessária uma diluição seminal homogênea, evitando erros de avaliação decorrentes da diluição. (MARIA, 2005). Afirmação semelhante foi expressa por Mojica (2004) pois a motilidade espermática, um dos critérios de avaliação da qualidade do sêmen, usualmente é expresso em

porcentagem de espermatozoides móveis e que foram recentemente ativados pela diluição em solução ativadora.

O volume de solução ativadora adicionado ao sêmen também é muito importante. Pois, este volume determina a dinâmica de ativação dos espermatozoides (OLIVEIRA, 2006). Uma diluição relativamente alta é necessária para iniciar a motilidade simultânea de 100% dos espermatozoides. Por outro lado, em baixas diluições, somente alguns espermatozoides são ativados e os outros vão entrando em movimentação progressivamente mais tarde (BILLARD & COSSON, 1992), resultando em perdas na taxa de fertilização.

As alterações ultra estruturais dos espermatozoides de peixes foram descrita por Miliorini (2006) como sendo ocasionadas após o aumento ou redução da osmolaridade do meio que os circunda, podendo ser também de origem patológica. As alterações patológicas foram classificadas por Marques (2001) como sendo limitantes no tempo de duração da motilidade espermática. A morfologia espermática em peixes foi classificada por Miliorini *et al.* (2011) como, patologias primárias (macrocefalia; microcefalia; cabeça degenerada; peça intermediária degenerada; cauda quebrada, enrolada e dobrada) e patologias secundárias (cauda degenerada; cabeça isolada; gota citoplasmática distal e proximal). Herman *et al.* (1994) relacionaram que as patologias primárias em mamíferos, ocorrem durante a espermatogênese em decorrência de: enfermidades, consanguinidade, restrição alimentar e estresse, por exemplo. E as patologias secundárias estariam relacionadas aos procedimentos de manejo durante a coleta do sêmen e a confecção das lâminas para avaliação das patologias. Cabe ressaltar que para espermatozoides de peixes não existem parâmetros de comparação para morfologia espermática para o sêmen criopreservado e nem para o sêmen *in natura* (MILIORINI, 2006).

Com relação aos defeitos espermáticos, ao avaliar soluções ativadoras com concentrações de metanol e dimetilsulfóxido (DMSO) na qualidade de sêmen criopreservado de curimba (*Prochilodus lineatus*), Miliorini *et al.* (2011) relataram uma redução no índice de patologias totais com o aumento na concentração dos crioprotetores até 12,5% da solução crioprotetora. Kavamoto, *et al.* (1999), encontraram maiores incidências de anormalidades do tipo cauda dobrada ou enrolada e ausência de cauda nos espermatozóides de *P. scrofa* = *P. lineatus*. No sêmen de *P. mesopotamicus* Streit Jr. *et al.* (2006a) avaliaram as características qualitativas após indução hormonal e constataram a incidência elevada de patologias primárias no sêmen, especialmente, cauda enrolada, quebrada e corrugada. Quando estudaram o sêmen de dourado (*Salminus maxillosus*) em cativeiro, Streit Jr. *et al.* (2008) não encontraram diferenças significativas entre tratamentos nas patologias primárias, porém nas secundárias registraram um aumento no percentual de 13,3% do sêmen pré indução, para 19,02% no sêmen pós indução hormonal.

2.3 Soluções diluidoras

Os procedimentos para o congelamento vêm sendo estudados há algum tempo, e Carneiro (2007) cita a necessidade do uso de meios diluentes e agentes protetores para efetivar com sucesso o uso deste procedimento. Em geral as soluções diluidoras são compostas por soluções aquosas que possuam a mesma osmolaridade do plasma seminal. Soluções diluidoras são soluções de sais ou de carboidratos, que ajudam a manter a viabilidade celular durante a refrigeração. A qualidade de um diluidor reside no fato do mesmo ser isotônico (para que não ative a motilidade espermática), estável ao longo do armazenamento e estéril (MARIA, 2005). Apesar de inúmeros estudos já realizados sobre soluções diluidoras para sêmen de peixes, não existe uma solução diluidora específica para cada espécie, como ocorre para alguns mamíferos. Este fato se deve ao número elevado de espécies de peixes, com particularidades inerentes ao grupo do qual pertencem (MARIA, 2005).

Em relação à solução diluidora, a mais utilizada para peixes é a solução de glicose à 5% (OHTA & IZAWA, 1996; GODINHO & VIVEIROS, 2011), pois aumenta a pressão osmótica e evita assim a ativação do espermatozoide. Entretanto, por ser uma solução diluidora simples, geralmente necessita de adição de alguma substância protetora, sendo comumente utilizada a gema de ovo (GODINHO & VIVEIROS, 2011). Segundo Leite (2011), soluções diluidoras mais complexas podem promover uma maior proteção dos espermatozoides, dispensando a necessidade de adição de substâncias protetoras (gema de ovo). Mas o desenvolvimento de uma solução diluidora e eficiente, para determinada espécie de peixe, necessita de ensaios para avaliação dos seus eventuais efeitos tóxicos e suas influências sobre a integridade e funcionalidade espermática (OHTA & IZAWA, 1996).

Como não existe ainda uma solução diluidora para as espécies aquáticas, estão sendo realizados estudos com algumas soluções que talvez possam ser utilizadas para formular uma solução crioprotetora. Uma dessas soluções diluidoras testadas é o BTS[®] (Beltsville Thawing Solution), esta solução é utilizada para sêmen de suínos. Esta solução vem sendo utilizada para o resfriamento e até mesmo fazendo parte da solução crioprotetora para congelamento, e já tem trabalhos realizados com *C. macropomum* (VARELA JR. *et al.*, 2012a; VARELA JR. *et al.*, 2012b).

Uma das inovações mais recentes da biotecnologia de conservação de sêmen de peixe é a utilização da água de coco como meio diluidor seminal. Dentre os atributos deste meio diluidor o fato do mesmo ser um meio natural e estéril composto por sais, proteínas açúcares, vitaminas, gorduras neutras, além de indutores da divisão celular e diversos eletrólitos, pode exercer uma ação benéfica sobre a conservação de células reprodutivas (LEITE, 2011). Trabalhos foram realizados testando a utilização da água de coco para a diluição do sêmen de espécies cultivadas no Brasil. Carvalho *et al.* (2002) utilizaram a água de coco para o sêmen de *Cyprinus carpio* e concluíram que poderia ser utilizada como base do meio diluidor para a conservação do sêmen da espécie. Por outro lado, Farias *et al.* (1999) testaram para a espécie nativa

C. macropomum, e encontraram um aumento no tempo de sobrevivência e maiores valores de motilidade, quando comparados à água.

A água de coco desidratada, transformada em pó possui os mesmo constituintes bioquímicos da forma *in natura*, porém é padronizada e mais eficazmente conservada, o que facilita a sua comercialização para regiões onde o fruto não existe (SILVA *et al.*, 2006). Recentemente, a água de coco em pó (ACP[®]) foi adaptada para a criopreservação de peixes recebendo a classificação de ACP[®]-104 (LEITE, 2011). O ACP[®]-104 também foi testado para *C. macropomum* (VIEIRA, 2010; LEITE, 2011). Em geral, os resultados foram positivos para a utilização deste meio para a criopreservação de sêmen de espécies nativas.

2.4 Crioprotetores

Os crioprotetores devem ser adicionados a uma solução diluidora para que haja uma proteção do espermatozoide durante o congelamento e o descongelamento, e devem possuir como propriedade uma baixa toxicidade para as células espermáticas e alta solubilidade em água, podendo ser classificadas como intracelulares ou permeáveis e extracelulares ou impermeáveis (SQUIRES *et al.*, 1999).

Os crioprotetores intracelulares são substâncias químicas de baixo peso molecular e capazes de penetrar nas células espermáticas, onde essas substâncias diminuem a temperatura de congelamento intracelular, atuando como supressores da formação de cristais de gelo (MANZUR *et al.*, 1984; WOODS *et al.*, 1999). Os crioprotetores extracelulares são aquelas substâncias que possuem alto peso molecular, portanto não conseguem penetrar no interior da célula, mas promovem a ação protetora externamente (GODOY, 2012). A combinação destes crioprotetores (permeáveis e impermeáveis) promovem uma proteção mais completa para o espermatozoide (LEUNG & JAMIESON, 1991), e reduzem o ponto de congelamento da água (MEDEIROS *et al.*, 2002).

Existem inúmeras substâncias que podem ser usadas como crioprotetoras para a criopreservação de espécies nativas brasileiras, entre elas estão, etilenoglicol (MELO & GODINHO, 2006), dimetil acetamida (MELO & GODINHO, 2006; VARELA JR. *et al.*, 2012a;), dimetil formamida (VARELA JR. *et al.*, 2012a;), glicerol (FARIAS *et al.*, 1999; VIVEIROS *et al.*, 2009a; VARELA JR. *et al.*, 2012a), metil formamida (VARELA JR. *et al.*, 2012a), metil glicol (NASCIMENTO *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2007; VIVEIROS *et al.*, 2008; VIVEIROS *et al.*, 2009a; VIVEIROS *et al.*, 2009b; VIVEIROS *et al.*, 2010; MARIA *et al.*, 2011; VIVEIROS *et al.*, 2011; CARNEIRO *et al.*, 2012; ARAÚJO *et al.*, 2012; BARREIRO *et al.*, 2012; MORAES *et al.*, 2012) e metanol (MELO & GODINHO, 2006; MURGAS *et al.*, 2007; MILIORINI *et al.*, 2011). Mas o crioprotetor mais utilizado para espécies de piracema é o dimetil sulfóxido (DMSO - CAROLSFELD *et al.*, 2003; MELO & GODINHO, 2006; STREIT JR. *et al.*, 2006b; VELASCO-SANTAMARÍA *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2007; VIVEIROS *et al.*, 2008; STREIT JR. *et al.*, 2009; VIVEIROS *et al.*, 2009a;

VIVEIROS *et al.*, 2009b; FELIZARDO *et al.*, 2011; MILIORINI *et al.*, 2011; VIVEIROS *et al.*, 2011; CARNEIRO *et al.*, 2012; VARELA JR. *et al.*, 2012a; VARELA JR. *et al.*, 2012b), que foi apresentado como crioprotetor base para espécies da família Characidae (CAROLSFELD *et al.*, 2003), e os resultados obtidos no processo de criopreservação foram promissores.

2.5 Congelamento

A criopreservação, segundo Zhang *et al.* (2003) é um método efetivo para o armazenamento a longo prazo de espermatozoides, podendo assim facilitar o transporte de sêmen para uma possível troca e conservação de material genético entre pisciculturas comerciais ou mesmo para espécies ameaçadas de extinção.

A conservação de sêmen por longos períodos pode ter por finalidade prover a necessidade de genes para aumentar a variabilidade genética de uma determinada população. Da mesma forma que uma população natural de peixes depende de alta variabilidade genética para aumentar suas chances de adaptação ao meio onde vive, um plantel de reprodutores precisa dessa variabilidade para reduzir possíveis problemas negativos causados por endocruzamentos e homozigose (CAROLSFELD *et al.*, 2003).

Os primeiros estudos relacionados à criopreservação de sêmen de peixes ocorreu início na década de 50, com a descoberta dos primeiros crioprotetores (TIERSCH, 2008). A aplicação da técnica de criopreservação de sêmen teve início com salmonídeos (COSER *et al.*, 1987). Na década de 90 a técnica foi adaptada para espécie migradoras tropicais da América do Sul (HARVEY, 2001) e os estudos no Brasil começaram na década de 80 (KAVAMOTO *et al.*, 1989). Mas foi na década de 90 que os seus estudos foram impulsionados, principalmente com a preocupação com a preservação da variabilidade genética das populações selvagens devido à construção de barragens de usinas hidroelétricas e a degradação do habitat natural (CAROLSFELD *et al.*, 2003). No entanto, o grande avanço da criopreservação do sêmen das espécies nativas brasileiras foi quando Carolsfeld *et al.* (2003) apresentaram alguns protocolos para espécies das famílias Characidae e Pimelomidae.

O armazenamento de sêmen de peixes através do congelamento tem sido estudado em inúmeras espécies de nativos brasileiros (MELO & GODINHO, 2006), entre elas *B. amazonicus* (VELASCO-SANTAMARÍA *et al.*, 2006), *B. cephalus* (NINHAUS-SILVEIRA *et al.*, 2006), *B. insignis* (SHIMODA, 2004; VIVEIROS *et al.*, 2011; VIVEIROS *et al.*, 2012), *B. nattereri* (OLIVEIRA *et al.*, 2007), *B. opalinus* (ORFÃO, 2010), *B. orbignyanus* (NASCIMENTO *et al.*, 2007; VIVEIROS *et al.*, 2008), *B. orthotaenia* (MELO & GODINHO, 2006), *L. elongatus* (CAROLSFELD *et al.*, 2003), *L. obtusidens* (TAITSON *et al.*, 2008; VIVEIROS *et al.*, 2008), *P. brachypomus* (PESSOA, 2009; MELO, 2010; NASCIMENTO *et al.*, 2010; RAMIREZ-MERLANO *et al.*, 2011), *P. corruscans* (CAROLSFELD *et al.*, 2003), *P. lineatus* (CAROLSFELD *et al.*, 2003);

MILIORINI, 2006; VIVEIROS *et al.*, 2008; VIVEIROS *et al.*, 2009b; VIVEIROS *et al.*, 2010), *P. mesopotamicus* (CAROLSFIELD *et al.*, 2003; STREIT JR. *et al.*, 2006b), *S. brasiliensis* (VIVEIROS *et al.*, 2009a) e *S. maxillosus* (CAROLSFIELD *et al.*, 2003). E ainda pode-se citar o *C. macropomum* (VIEIRA, 2010; LEITE, 2011; MARIA *et al.*, 2011; VIEIRA *et al.*, 2011; ARAÚJO *et al.*, 2012; BARRETO *et al.*, 2012; CARNEIRO *et al.*, 2012; MORAES *et al.*, 2012; VARELA JR. *et al.*, 2012a; VARELA JR. *et al.*, 2012b), que devido sua crescente importância no setor piscícola brasileiro os estudos estão sendo cada vez mais importantes para consolidar a cadeia produtiva da espécie.

Para um melhor entendimento do processo de congelamento, deve-se ter em mente que o sêmen ao ser criopreservado por este método, necessita antes, ser diluído em soluções contendo uma solução diluidora e um crioprotetor. Este composto é formado para prevenir crioinjúrias aos espermatozoides e também deve inibir a ativação da motilidade (OLIVEIRA, 2006). Pois, para o armazenamento de sêmen em baixas temperaturas é de extrema importância que seu congelamento seja realizado sem ativá-lo, sendo imprescindível evitar o seu contato com água ou mesmo a urina do peixe durante sua extração (HARVEY & CAROLSFIELD, 1993).

O processo de congelamento, por ser severo a estrutura do espermatozoide, faz-se necessário que este método seja cautelosamente realizado com cuidado, como por exemplo, a primeira etapa de deve ser conduzida a uma temperatura de -10°C até -70°C (HARVEY & CAROLSFIELD, 1993), que é obtida através do vapor do nitrogênio líquido formado em botijões do tipo *dry shipper*. Pois quando o sêmen é colocado diretamente no nitrogênio líquido, a estrutura do espermatozoide sofre graves lesões. Porém iniciando o processo de congelamento através da vaporização o congelamento é gradual, de forma que as estruturas não sofram muitos danos (BILLARD, 1983). Após algumas horas de armazenamento em botijões *dry shipper* as amostras podem ser alocadas em botijões contendo nitrogênio líquido.

3. HIPÓTESE

Ocorre diferença de qualidade seminal no congelamento do sêmen de *C. macropomum* com diferentes diluentes soluções diluidoras associados a 10% de DMSO.

4. OBJETIVOS

4.1 Geral

Avaliar o impacto qualitativo nos espermatozoides de *C. macropomum* após a criopreservação, na presença de duas soluções diluidoras.

4.2. Específicos

Identificar a melhor solução diluidora para utilizar na crioproteção do sêmen de *C. macropomum*.

CAPÍTULO 2

INTEGRIDADE FUNCIONAL DO ESPERMATOZOIDE DE TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*) CRIOPRESERVADO COM SOLUÇÕES DILUIDORAS ENRIQUECIDAS

Resumo

As soluções crioprotetoras, têm como finalidade proteger os espermatozoides da severidade produzida pela baixa temperatura no processo de criopreservação. Neste estudo o objetivo foi avaliar a qualidade do sêmen de *Colossoma macropomum* pós-descongelamento, utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) como crioprotetor combinado com duas soluções diluidoras. Os tratamentos avaliados foram: T1 (Glicose - 90,0 g/L, Citrato de Sódio - 6,0 g/L, EDTA - 1,5 g/L, Bicarbonato de Sódio - 1,5 g/L, Cloreto de Potássio - 0,8 g/L e Sulfato de Gertamicina - 0,2 g/L) e T2 (Glicose - 90,0 g/L e Água de Coco em Pó - ACP® - 10,0 g/L). A motilidade e o tempo de motilidade não diferiram ($P > 0,05$) entre os tratamentos T1 e T2 e foram inferiores ao sêmen *in natura*. O número de espermatozoides normais foi significativamente diferente ($P < 0,05$) nos tratamentos T1 (15,1%) e T2 (21,9%), e ambos apresentaram uma redução no percentual de espermatozoides normais quando comparados ao sêmen *in natura* (57,4%). Quanto às taxas de fertilização e eclosão não houve diferença ($P > 0,05$) entre os tratamentos avaliados (T1 e T2). Não foram verificadas diferenças ($P > 0,05$) entre os tratamentos (T1 e T2), para funcionalidade da mitocôndria e DNA espermático. Quanto à integridade da membrana, no T1 (53,4%) ocorreu maior percentual ($P < 0,05$) de espermatozoides com a membrana íntegra do que no T2 (43,7%). As soluções diluidoras combinadas com 10% de DMSO mantiveram o DNA espermático íntegro em quase que toda sua totalidade nos espermatozoides de *C. macropomum*, porém ocorreram perdas da funcionalidade dos mesmos.

FUNCTIONAL INTEGRITY OF TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*) SPERMATOZOON FROZEN WITH ENRICHED EXTENDER SOLUTIONS

Abstract

Cryoprotectant solutions aim to protect spermatic cells from injuries produced by low temperature in the cryopreservation process. In this study we evaluated the quality of *Colossoma macropomum* semen after thawing using dimethyl sulfoxide (DMSO) as a cryoprotectant combined with two extender solutions. Treatments evaluated: T1 (Glucose - 90.0 g/L, Sodium Citrate - 6.0 g/L, EDTA - 1.5 g/L, Sodium Bicarbonate - 1.5 g/L, Potassium Chloride - 0.8 g/L, and Gertamicine Sulfate - 0.2 g/L) and T2 (Glucose - 90.0 g/L and Powder Coconut Water - ACP® - 10.0 g/L). Motility and time of motility did not differ ($P > 0.05$) between T1 and T2 and were lower than recorded in fresh semen. The number of normal spermatozoa was significantly different ($P < 0.05$) between the T1 (15.1%) and T2 (21.9%), and both treatments showed a decreasing in percentage of normal cells when compared to fresh semen (57.4%). Fertilization and hatching rates did not differ ($P > 0.05$) between the treatments

(T1 and T2). There were no differences ($P > 0.05$) between treatments (T1 and T2) for mitochondrial functionality and sperm DNA integrity. Membrane integrity in T1 (53.4%) was higher ($P < 0.05$) than recorded in T2 (43.7%). The extender solutions combined with 10% DMSO kept intact the sperm DNA for majority of the cells assessed after thawing, however damages on its functionality were evident.

1. Introdução

A espécie *C. macropomum* tem grande relevância para a cadeia piscícola brasileira, pois é a principal espécie nativa produzida no Brasil (BRASIL, 2012). Seu potencial de crescimento e desenvolvimento satisfatório em climas tropicais estão ressaltados constantemente (MELO *et al.*, 2001; IZEU & MELO, 2004), e inúmeros estudos estão se desenvolvendo com a espécie, a fim de consolidar a sua cadeia de produção. Por outro lado, a biologia reprodutiva do *C. macropomum* possui características que dificultam a eficiência reprodutiva durante o seu período reprodutivo, ou seja, assincronia entre machos e fêmeas (GALO, 2013) e que podem ser contornado com sêmen criopreservado.

A criopreservação de sêmen é uma biotecnia disponível e com ampla gama de aplicação na piscicultura nacional, como por exemplo: redução de custos e riscos de transporte de reprodutores; redução do plantel de reprodutores; transporte de gametas de animais selecionados em um programa de melhoramento ou manipulados geneticamente e também a eliminação da assincronia na maturidade gonadal entre machos e fêmeas (SUQUET *et al.*, 2000; VIVEIROS, 2005; MARIA *et al.*, 2009; VIVEIROS *et al.* 2009; VIVEIROS *et al.*, 2012). Quanto a sua aplicação prática e efetiva, no Brasil, foi registrada por Resende *et al.* (2010) como fundamental para a estruturação do programa de melhoramento genético do *Colossoma macropomum* no Brasil.

Assim como para algumas espécies nativas que possuem protocolos eficientes para o congelamento do sêmen; *Brycon insignis* (VIVEIROS *et al.* 2011), *B. orbignyanus* (MARIA *et al.*, 2006), *B. nattereri* (OLIVEIRA *et al.*, 2007), recentemente o protocolo de congelamento de sêmen de *C. macropomum* foi estabelecido por Maria *et al.* (2011a). Por outro lado, no estudo de Varela Jr. *et al.* (2012a) com a mesma espécie foi apresentado uma melhor solução crioprotetora, além de ter sido observada a importância da funcionalidade espermática após o processo de criopreservação, seja ela para mobilidade do espermatozoide ou integridade da sua carga genética. Todavia, cabe ressaltar que além de espécie, a individualidade de cada animal e o período reprodutivo são alguns dos fatores que influenciam na capacidade de

congelamento e descongelamento de espermatozoides (BROMAGE & ROBERTS, 1995).

Uma solução diluidora prática e eficiente, a partir de compostos comercial é de extrema importância para a padronização da técnica de criopreservação do sêmen em escala comercial. Em relação à solução diluidora, a mais utilizada para peixes é a solução de glicose à 5% (OHTA & IZAWA, 1996; GODINHO & VIVEIROS, 2011), pois mantém a pressão osmótica (isomótica) na célula espermática e evita assim a ativação do espermatozoide. Entretanto, por ser uma solução diluidora simples, geralmente necessita de adição de alguma substância protetora, sendo comumente utilizada a gema de ovo (GODINHO & VIVEIROS, 2011). Mas existem relatos que uma solução diluidora enriquecida pode ser utilizada sem a adição do componente protetor (gema de ovo) (LEITE, 2011). Para minimizar os danos no processo de criopreservação, crioprotetores são combinados a soluções diluidoras para que haja uma proteção do espermatozoide durante o processo de congelamento e descongelamento (SQUIRES *et al.*, 1999). De todo modo são conhecidos os problemas relacionados a criopreservação de células reprodutivas como alteração da estrutura física da célula espermática, comprometendo a carga de DNA e por consequência também a sua capacidade de fertilização (LABBE *et al.*, 2001; CABRITA *et al.*, 2005). Todavia, ainda assim ocorrerá perda qualitativa do sêmen criopreservado em relação ao que não sofreu este processo.

Diante dos expostos o objetivo deste estudo foi avaliar a viabilidade espermática de *C. macropomum* criopreservado em diferentes soluções diluidoras.

2. Material e Métodos

O presente experimento foi realizado nos Laboratórios de Reprodução em Nova Mutum (MT) e Pimenta Bueno (RO). Posteriormente as análises laboratoriais foram conduzidas nos laboratórios de microscopia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (*Campus* Veterinária – Laboratório de Microscopia) e Universidade Federal de Rio Grande (Laboratório de Reprodução Animal Comparada). Foram utilizados 26 animais machos e 4 fêmeas. A concentração espermática média entre os machos foi de $14,8 \times 10^9$ espermatozoides por mL de sêmen ejaculado.

Obtenção e avaliações quali-quantitativas do sêmen in natura.

O sêmen foi obtido a partir da indução de 0,7 mg de Ovopel/kg de peso corporal e coletado por uma leve massagem abdominal, no sentido cranio-caudal. O sêmen foi acondicionado em tubos cônicos de 50 mL, em seguida, foram avaliados os parâmetros quali-quantitativos do sêmen em microscopia ótica (40X), exceto avaliação das patologias espermática (100X). A seguir são descritas as metodologias utilizadas para a avaliação do sêmen.

Motilidade progressiva: O sêmen foi diluído e ativado em água destilada na razão de 2:20 μ l, respectivamente e em seguida um volume de 2 μ l desta solução foi colocado entre lâmina e lamínula para avaliação em microscópio. Foram atribuídos valores de 0 a 100% para a motilidade, em função da movimentação dos espermatozoides.

Tempo de duração da motilidade: No momento da diluição do sêmen na água destilada, para obtenção da motilidade progressiva, um cronometro foi acionado e parado quando os espermatozoides cessaram o seu movimento flagelar dentro do campo óptico.

Morfologia Espermática: uma amostra de sêmen de cada animal foi diluída em solução de formol salina tamponado. Em seguida esfregaços em laminas histológicas foram produzidos e corados com Rosa de Bengala de acordo com as recomendações de Streit Jr. *et al.* (2004) para peixes. Posteriormente, foram avaliados 100 espermatozoides e identificando os defeitos primários e secundários segundo Miliorini *et al.* (2011), como pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1 – Lista de patologias espermáticas avaliadas segundo recomendação de Miliorini *et al.*, 2011.

Patologias	
Primárias	Secundárias
Macrocefalia	Cabeça Isolada
Microcefalia	Cauda Degenerada
Cabeça Degenerada	Gota Citoplasmática Proximal
Peça Intermediaria Degenerada	Gota Citoplasmática Distal
Cauda Quebrada	
Cauda Enrolada	
Cauda Dobrada	

Tratamentos

A base da solução crioprotetora utilizada neste experimento foi composta por uma solução diluidora (8,0 fração), crioprotetor – Dimetilsulfoxido (DMSO) (1,0 fração) e *pool* de sêmen (1,0 fração) de acordo com o protocolo de Maria *et al.* (2011) para a espécie. Duas soluções diluidoras (1 e 2) foram testadas (Tabela 2).

Tabela 2 – Composição das soluções diluidoras utilizadas no presente experimento.

Componentes	Solução	
	1	2
Glicose (g/L)	90,0	90,0
Citrato de Sódio (g/L)	6,0	.
EDTA (g/L)	1,5	.
Bicarbonato de Sódio (g/L)	1,5	.
Cloreto de Potássio (g/L)	0,8	.
Sulfato de Gertamicina (g/L)	0,2	.
ACP® - 104 (g/L)	.	10,0

Um *pool* de sêmen foi produzido a fim de eliminar o efeito macho e padronizar as amostras e os seguintes tratamentos foram testados: T1 – Sêmen diluído na Solução 1 + DMSO; T2 – Sêmen diluído na Solução 2 + DMSO.

O sêmen foi envasado em palhetes de 0,25 mL, os quais foram mantidos por 24 horas em um botijão *dry shipper* para serem armazenados em um botijão de estoque de nitrogênio líquido de acordo com as recomendações de Taitson *et al.* (2008), onde permaneceram até a realização das análises posteriores. O descongelamento das amostras foi realizado com a imersão das palhetas em água (45°C/8 s). Após o descongelamento, as amostras de sêmen foram analisadas, quanto aos parâmetros quali-quantitativos seguindo a metodologia descrita para o sêmen *in natura*, e após foi analisada a funcionalidade espermática.

Análise funcional dos espermatozoides

A *funcionalidade mitocondrial* foi avaliada a partir da coloração fluorescente rodamina 123 (HE & WOODS, 2004). A *integridade de membrana* dos espermatozoides avaliada com uso de das sondas fluorescentes diacetato de carboxifluoresceína – CFDA – e iodeto de propídio – PI – (VARELA JR. *et al.*, 2012a). Quanto a *integridade do DNA*, foi utilizando a sonda laranja de acridina (VARELA JR. *et al.*, 2012a). As avaliações de

funcionalidade mitocondrial, integridade de membrana e de DNA foram realizadas em microscópio de epifluorescência (Olympus® BX 51, América INC, São Paulo - Brasil) avaliando-se 200 células/amostra a partir de 20µL de solução em lâmina sob lamínula (18 x 18 mm). As taxas foram expressas através do percentual entre células íntegras/funcionais sobre o total de células avaliadas.

Avaliação da taxa de fertilidade e eclosão

Oócitos de *C. macropomum* foram obtidos a partir da indução da espécie com 5,5 mg de extrato de hipófise de carpa por kg de peso corporal nas fêmeas. Para análise da *taxa de fertilização* foram acondicionados em um recipiente descartável 1 g de oócitos e 250 µl de sêmen descongelado com os tratamentos T1 e T2, tendo então em média uma proporção de $9,73 \times 10^5$ de espermatozoide/oócito. Logo após foi adicionada água destilada, para ativação dos espermatozoides e após 60 segundos, as estruturas embrionárias foram alocadas em incubadoras de 60 litros com fluxo contínuo de água. Após 8 horas (fechamento do blastoporo) de incubação a temperatura média de $26,5 \pm 0,9^\circ\text{C}$ obteve-se a *taxa de fertilização*. Para cada tratamento, três contagens foram realizadas, avaliando-se embriões viáveis (em desenvolvimento) e inviáveis (ovos gorados). O valor percentual médio das três contagens foi denominado percentagem de ovos fertilizados.

Cem embriões viáveis de cada amostra, após a contabilização da taxa de fertilização foram mantidos em recipientes experimentais (100 mL) os quais foram colocados dentro das incubadoras de 60 litros por mais 12 horas de incubação. A partir da contagem do número de larvas existente em cada incubadora, obtendo-se assim a *taxa de eclosão*.

Análise estatística

Foi realizada a análise de normalidade para todas as variáveis dependentes, pelo teste de Shapiro-Wilk. Em seguida, devido à distribuição não ter se comportado de forma normal, foi realizada análise de variância para médias não paramétricas através do teste de Kruskal-Wallis. Os diferentes diluentes foram considerados variáveis independentes, e as variáveis motilidade espermática, tempo de motilidade, taxa de fertilização, taxa de eclosão, funcionalidade de mitocôndrias, integridade da membrana e DNA espermático foram consideradas variáveis dependentes. Todos os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média (S.E.M.). Todas as análises foram realizadas no software Statistix 9.0 (2008).

3. Resultados

Não houve diferença estatística ($P>0,05$) para a motilidade progressiva (Mot) entre os tratamentos (T1 e T2), e ambos foram inferiores ao sêmen *in natura*. Por outro lado, o percentual de espermatozoides normais encontrados no presente experimento, 15,1% (T1) e 21,9% (T2) foram significativamente diferentes ($P<0,05$), sendo observado uma redução ($P<0,05$) no número de espermatozoides normais se comparados ao sêmen *in natura* (Figura 1).

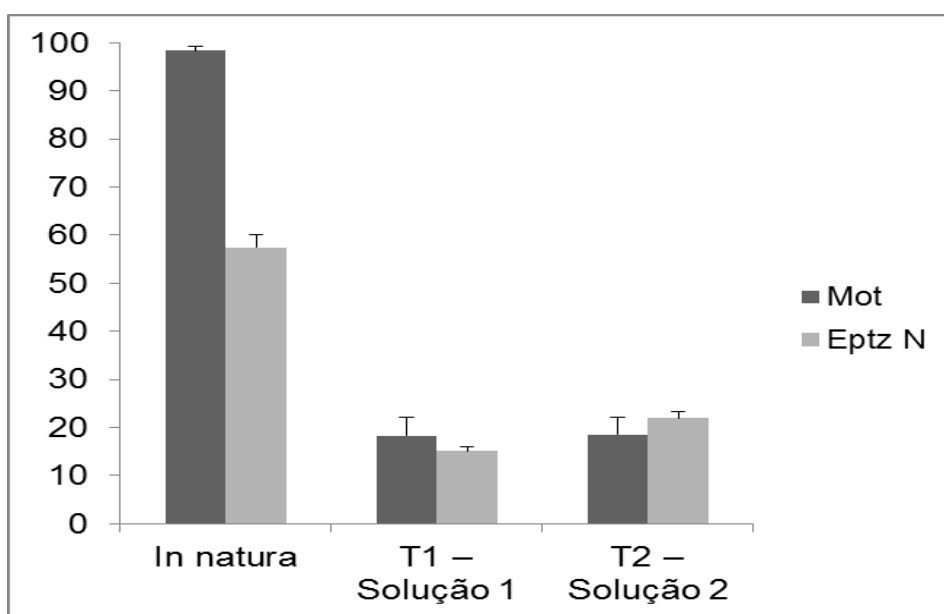


Figura 1 – Média e desvio padrão da Motilidade Progressiva (Mot) e Espermatozoides Normais (Eptz N) do sêmen de *C. macropomum*, *in natura* e congelado com duas soluções diluidoras (T1 – Solução 1 e T2 – Solução 2). Método de avaliação de dados não paramétricos, pelo teste de Kruskal-Wallis.

O tempo de motilidade do espermatozoide (TMot) não diferiu ($P>0,05$) entre os tratamentos criopreservados (T1 e T2) e o sêmen *in natura*, muito embora tenham sido observados valores abaixo da metade daqueles verificados no sêmen após criopreservação em relação ao *in natura* (Figura 2).

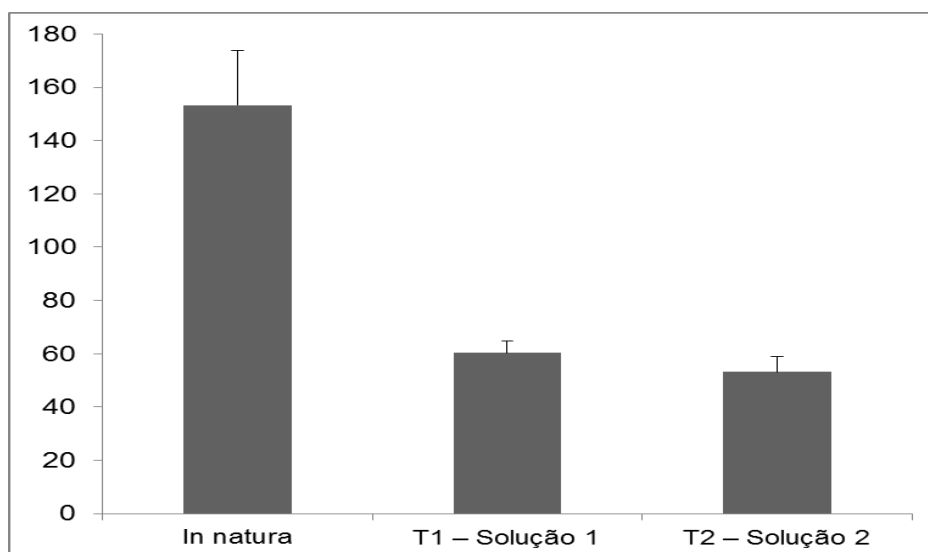


Figura 2 – Média e desvio padrão do Tempo da Motilidade (TMot) do sêmen de *C. macropomum*, *in natura* e congelado com duas soluções diluidoras (T1 – Solução 1 e T2 – Solução 2). Método de avaliação de dados não paramétricos, pelo teste de Kruskal-Wallis.

Com relação a taxa de fertilização e eclosão (Figura 3) não houveram diferença ($P > 0,05$) entre os tratamentos avaliados.

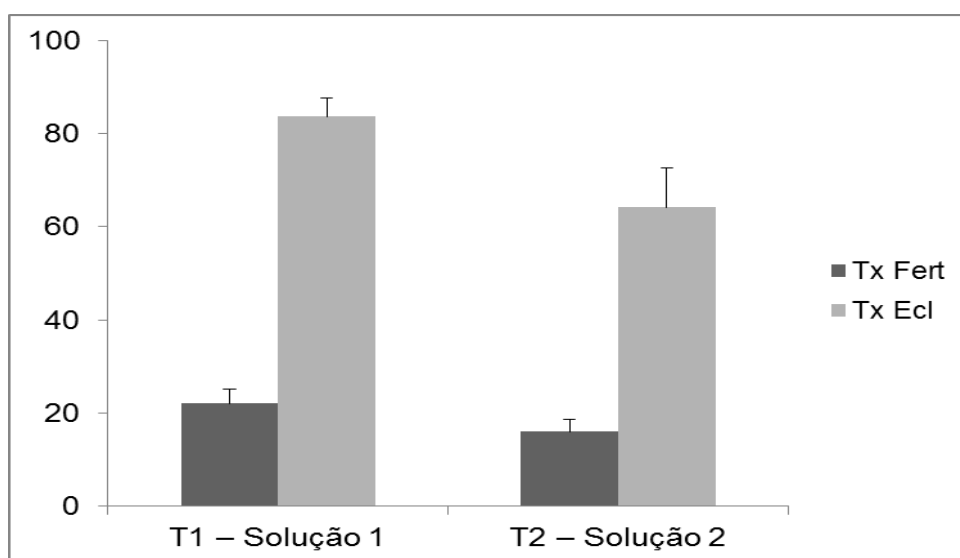


Figura 3 – Média e desvio padrão da Taxa de Fertilização (Tx Fert) e Taxa de Eclosão (Tx Ecl) do sêmen de *C. macropomum*, congelado com duas soluções diluidoras (T1 – Solução 1 e T2 – Solução 2). Método de avaliação de dados não paramétricos, pelo teste de Kruskal-Wallis.

Foi observado maior ocorrência de patologias primárias com cauda quebrada, seguidas pela cauda enrolada (Figura 4). Quanto às patologias secundárias, cauda dobrada foi a de maior evidência, indicando que as maiores patologias nas células espermáticas ocorreram no terço inferior do espermatozoide (Figura 5).

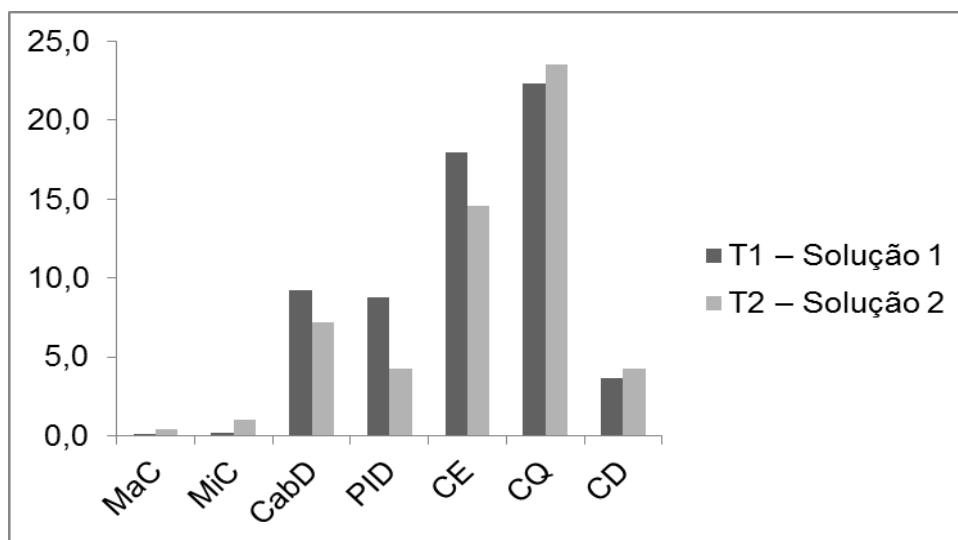


Figura 4 – Percentuais médios dos defeitos espermáticos primários do sêmen congelado de *C. macropomum* com diferentes tratamentos. Macrocefalia (MaC); Microcefalia (MiC); Cabeça Degenerada (CabD); Peça Intermediária Degenerada (PID); Cauda Enrolada (CE); Cauda Quebrada (CQ) e Cauda Dobrada (CD).

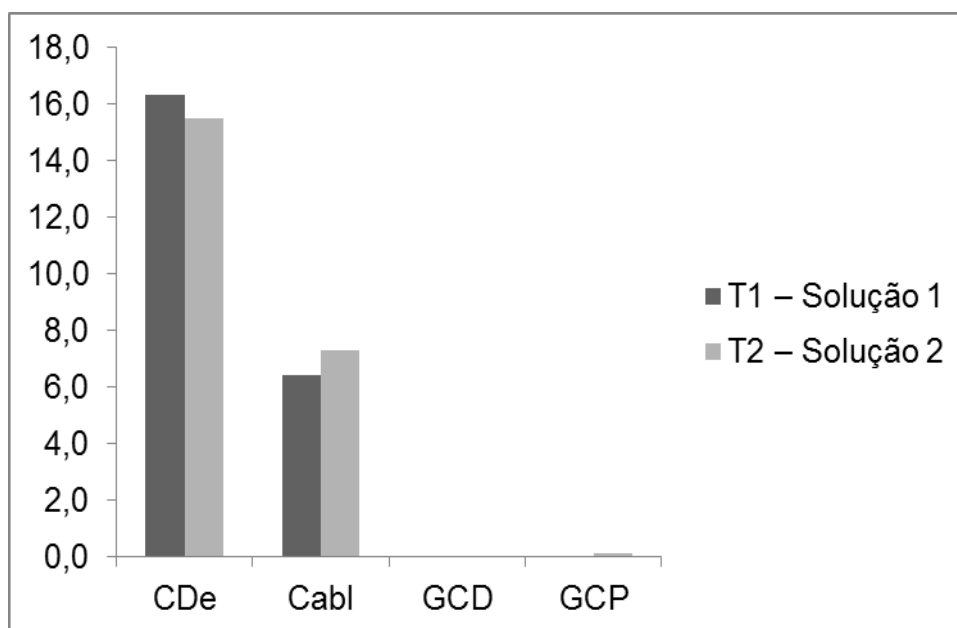


Figura 5 – Percentuais médios de defeitos secundários do sêmen congelado de *C. macropomum* com diferentes tratamentos. Cauda Degenerada (CDe); Cabeça Isolada (Cabl); Gota Citoplasmática Distal (GCD) e Gota Citoplasmática Proximal (GCP).

Após a descongelação dos espermatozoides, não foram verificadas diferenças estatísticas ($P > 0,05$) entre as diferentes soluções diluidoras, para funcionalidade de mitocôndria e integridade de DNA espermático (Figura 6). Quanto a integridade de membrana, que diferiu ($P < 0,05$) entre os tratamentos, sendo o maior com $53,4 \pm 1,8\%$ (T1) e o menor índice com $43,7 \pm 1,6\%$ (T2).

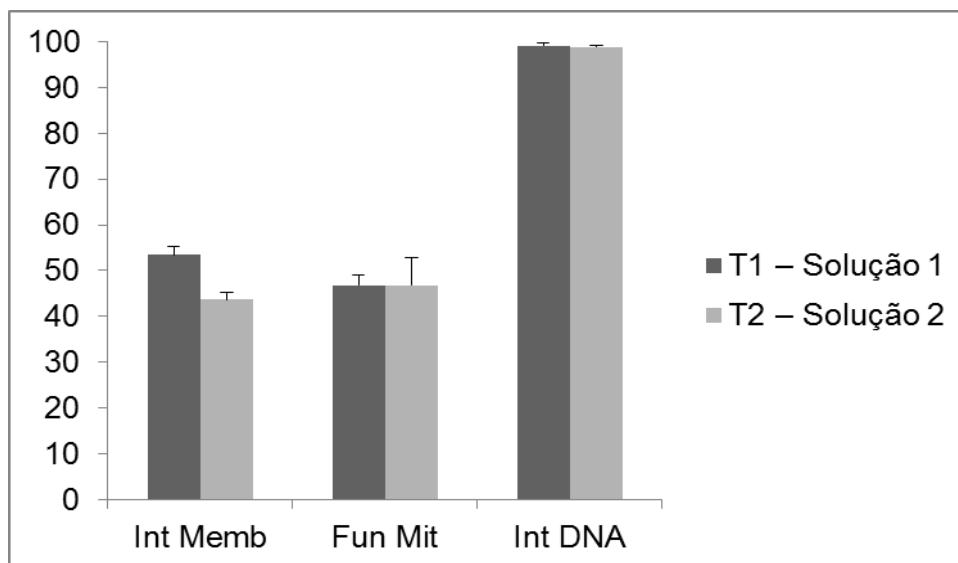


Figura 6 – Média e desvio padrão dos percentuais de Integridade da Membrana (Int Memb), Funcionalidade de Mitocôndria (Fun Mit) e Integridade do DNA (Int DNA) observados nos espermatozoides de *C. macropomum* após a criopreservação.

4. Discussão

Após a criopreservação, de um modo geral, ocorreu uma sensível perda da qualidade seminal de *C. macropomum*, o que era esperado em função do severo estresse osmótico e térmico que as células espermáticas sofrem durante este processo.

Conservar a integridade da membrana celular espermática pode ser de fundamental importância para que os espermatozoides tenham capacidade fecundante. Muito embora tenha ocorrido diferença entre os tratamentos para a integridade da membrana, as soluções crioprotetoras (T1 e T2) não possibilitaram uma boa conservação estrutural dos espermatozoides, reforçando o fato de que menos de 50% dos espermatozoides conservaram suas mitocôndrias funcionais. A baixa funcionalidade espermática verificada nos espermatozoides do *C. macropomum*, após a criopreservação, certamente acarretou reflexos nos demais parâmetros; motilidade, tempo de motilidade, morfologia espermática e por consequência nas taxas de fertilização e eclosão. Cabe ressaltar, que durante o processo de criopreservação das células espermáticas, danos podem ocorrer devido a inúmeros fatores que afetam este processo, tais como; velocidade de congelamento e descongelamento, recipiente de armazenamento e a incorporação da solução crioprotetora pela célula espermática (MARIA *et al.*, 2009).

Amostras criopreservadas devem possuir mais de 50% de motilidade espermática e espermatozoides viáveis para se obter bons resultados (MARIA *et al.*, 2011), índice não observado no presente estudo após a criopreservação

(variação em torno de 18%). Podemos considerar que as soluções crioprotetoras testadas não foram efetivas na preservação da integridade do espermatozoide, pois, a redução em mais de 50% na motilidade espermática e no tempo de motilidade do sêmen criopreservado se comparados ao sêmen *in natura* atestam este fato. É possível que a redução na integridade da membrana e a funcionalidade da mitocôndria provavelmente afetaram a capacidade do espermatozoide de *C. macropomum* produzirem energia necessária para se movimentarem. Ou seja, quando ocorre alterações nas mitocôndrias e peça intermediária do espermatozoide diminui a produção de ATP celular (YAO et al. 2000).

A redução no percentual de espermatozoides normais nos tratamentos testados confirma os processos danosos provocados pela criopreservação. Cabe ressaltar que um valor de referência de alterações morfológicas, para que seja possível considerar inapropriado o sêmen *in natura* ou após a criopreservação ainda não existe para peixes (MILIORINI, 2006). Os valores observados nas espécies são muito discrepantes dificultando ou tornando imprecisas possíveis comparações. Por exemplo, pós-criopreservação, os valores de espermatozoides com defeitos não ultrapassaram 24,3% no *P. lineatus* com DMSO + BTS[®] (MILIORINI et al., 2011). Por outro lado, os valores observados neste experimento no *C. macropomum*, assemelham-se aos de Streit Jr. et al. (2009), que registraram 68,5% de patologias espermáticas no sêmen de *P. mesopotamicus*, porém utilizando o DMSO associado a glicose e gema de ovo. Segundo Fabbrocini et al. (2000) os danos espermáticos também estão relacionado a toxidez dos crioprotetores e a ineficiência do processo de criopreservação estão relacionados como as principais causas das lesões provocadas nas células espermáticas.

Nenhuma das soluções diluidoras combinadas com o crioprotetor DMSO se mostrou efetiva para criopreservação do sêmen de *C. macropomum*. Por exemplo, Varela Jr. et al. (2012b) observaram que a combinação de DMSO + BTS[®] para criopreservação do sêmen de *C. macropomum* resultaram em baixas taxas de motilidade (20%) e tempo de motilidade (29,7 segundos). Recentemente Varela et al. (2012a), obtiveram valores em torno de 64% para motilidade e 77,1 segundo para tempo de motilidade, com a substituição do DMSO, pela dimetilformamida (DMF) para o *C. macropomum*, em função desta maior eficiência no congelamento de sêmen, abre-se expectativas para o uso de protocolos mais ajustados e eficientes para a criopreservação do sêmen de *C. macropomum*.

A integridade do DNA, ou seja, a carga genética que o espermatozoide transfere para os seus parentais, foi mantida quase que em sua totalidade no sêmen criopreservado, apesar das alterações morfológicas produzidas nos espermatozoides, bem como na integridade de membrana e funcionamento das mitocôndrias. Quando ocorre aumento da fragmentação do

DNA do espermatozoide, isso provavelmente produz um impacto negativo sobre a taxa de fertilização e eclosão, além do comprometimento do desenvolvimento embrionário (VARELA JR *et al.*, 2012a). Chama atenção o fato dos valores, no presente estudo, serem superiores aos obtidos para Varela Jr. *et al.* (2012a), 73,1% e 43,3% de células espermáticas com o DNA íntegro utilizando DMF e DMSO associados ao BTS[®], respectivamente. É fato que durante o período reprodutivo, os parâmetros qualitativos seminais variam significativamente no *C. macropomum* (GALO, 2013). Assim, espermatozoides, que não estejam maduros ou senis são mais suscetíveis aos processos severos como a criopreservação. Do ponto de vista qualitativo, quanto à maturidade do espermatozoide do *C. macropomum*, é possível que estes estivessem no seu melhor estado. Um indicativo de espermatozoide jovem em mamíferos (HERMAN *et al.*, 1994), são microcefalias, que ocorreram menos de 1,0% entre os tratamentos. Por outro lado, a gota citoplasmática em mamíferos pode ser um indicativo de espermatozoides senis, mas sua presença quase não foi detectada no presente estudo. Além disso menos de 10% dos espermatozoides foram classificados como cabeça degenerada, indicativo de que o processo de criopreservação pouco inutilizou os espermatozoides do ponto de vista genético. Leva-se em conta ainda que em mamíferos defeitos na cabeça do espermatozoide apresentam danos na cromatina, podendo acarretar baixos índices de taxa fertilidade e conseqüentemente eclosão (FRENEAU, 2011).

A baixa taxa de fertilização, em ambos os tratamentos, é provavelmente conseqüência do somatório de alterações advindas do processo de criopreservação, evidentes no presente estudo pela baixa taxa de motilidade, tempo de motilidade, aumento nas alterações de espermatozoides com defeitos (especialmente na cauda), alterações na membrana e funcionalidade da mitocôndria. Em estudos com *P. scrofa* = *P. lineatus* (KAVAMOTO *et al.*, 1999) e *P. lineatus* (MILIORINI *et al.*, 2011) foi relatado que defeitos espermáticos, principalmente na cauda do espermatozoide afetaram a taxa de fertilização do sêmen, devido a sua movimentação irregular.

5. Conclusão

Os meios crioprotetores testados contendo as diferentes soluções diluidoras foram parcialmente efetivos na proteção estrutural da célula espermática, durante o processo de congelamento. Porém, foi possível manter íntegro em quase toda sua totalidade o DNA dos espermatozoides do *C. macropomum*.

6. Agradecimentos

Agradecemos ao auxílio e apoio na realização deste estudo as Pisciculturas Boa Esperança (RO) e Buritis (MT).

7. Referências

- BRASIL - Ministério da Pesca e Aquicultura - MPA. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura**, Brasil 2010. Brasília, 2012, 129p.
- BROMAGE, N. R.; ROBERTS, R. J. **Broodstock management and egg and larval quality**. 1^o Edition. Oxford: Wiley-Blackwell, 1995. 436p.
- CABRITA, E.; et al. Evaluation of gilthead sea bream, *Sparus aurata*, sperm quality after cryopreservation in 5 ml macrotubes. **Cryobiology**, New York, v.50, n.3, p.273-284, 2005.
- FABBROCINI, A.; et al. Criopreservação de seabream (*Sparus aurata*) spermatozoa. **Cryobiology**, New York, v.40, n.10, p.46-53, 2000.
- FRENEAU, G. E. Aspectos da morfologia espermática em touros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.35, n.2, p.160-170, 2011.
- GALO, J. M. **Avaliação da qualidade dos gametas de Tambaqui (*Colossoma macropomum*) ao longo da estação reprodutiva. 2003. Tese (Doutorado em Zootecnia)**. Universidade Federal de Maringá. Maringá – Paraná, 2013.
- GODINHO, H. P.; VIVEIROS, A. T. M. Current status of sperm cryopreservation of Brazilian characiform fishes. In: TIERSCH, T. R.; GREEN, C. C. **Cryopreservation in aquatic species**. 2nd ed. Baton Rouge: The World Aquaculture Society, 2011. p. 875-884.
- HE, S.; WOODS, L. C. Effects of dimethyl sulfoxide and glycine on cryopreservation induced damage of plasma membrane and mitochondria to striped bass (*Morone saxatilis*) sperm. **Cryobiology**, New York, v.48, p.254-262, 2004.
- HERMAN, H. A.; MITCHELL, J. R.; DOAK, G. A. **The artificial insemination and embryo transfer of dairy and beef cattle**. Illinois: Interstate Publisher, 1994, 392p.
- IZEL, A. C. U.; MELO, L. A. S. **Criação de tambaqui (*Colossoma macropomum*) em tanques escavados no Estado do Amazonas**. (Embrapa Amazônia Ocidental. Documentos, 32). Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2004, 19p.

KAVAMOTO, E. T.; et al. Anormalidades morfológicas nos do Curimatá, *Prochilodus srofa* (STEINDACHNER, 1881) (OSTEICHTHYES, CHARACIFORMES, PROCHILODONTIDAE). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v.25, p.61-66, 1999.

LABBE, C.; et al. Effect of sperm cryopreservation on sperm DNA stability and progeny development in rainbow trout. **Molecular Reproduction and Development**, Hoboken, v.60, n.3, p.397-404, 2001.

LEITE, L. V. **Dose inseminante, embriogênese e criopreservação de sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*)**. 2011. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) - Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2011.

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. 1º ed. **Manejo e sanidade de peixes em cultivo**. Amapá: Embrapa Amapá, 2009, Cap. 3, p.47-63.

MARIA, A. N.; AZEVEDO, H. C.; CARNEIRO, P. C. F. Protocolo para criopreservação do sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*). Comunicado Técnico, **EMBRAPA**, Aracaju - SE. 2011, 8p.

MARIA, A. N.; et al. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing os piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v.260, n.1-4, p.298-306, 2006.

MELO, L. A. S.; IZEL, A. C. U.; RODRIGUES, F. M. **Criação de tambaqui (*Colossoma macropomum*) em viveiros de argila/barragens no Estado do Amazonas**. (Embrapa Amazônia Ocidental, 18). Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental. 2001, 30p.

MILIORINI, A. B. **Ativadores e concentrações de metanol e dimetilsulfóxido na qualidade do sêmen criopreservado de curimba (*Prochilodus lineatus*)**. 2006, 113p. Dissertação (Mestre em Ciência Veterinária). Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2006.

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

OHTA, H.; IZAWA, T. Diluent for cool storage of the Japanese eel (*Anguilla japonica*) spermatozoa. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 142, p. 107-118, 1996.

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

RESENDE, E. K.; et al. Melhoramento animal no Brasil: uma visão crítica espécies aquáticas. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO ANIMAL. 8., 2010. Maringá – PR. **Anais...** Maringá – PR: 2010. 1 CD-ROM.

- SQUIRES, E. L.; et al. **Cooled and frozen stallion semen**. Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory Bull. Colorado State University, Fort Collins, 1999. 90 p.
- STREIT JR. D. P.; et al. Motilidade, vigor e patologias seminal *in natura* e pós criopreservação de *Piaractus mesopotamicus*. **Beletim Instituto da Pesca**, São Paulo, v.35, n.2, p.159-167, 2009.
- STREIT JR., D. P.; et al. Avaliação de diferentes técnicas para coloração de sêmen de peixes. **Arquivos de Ciência Veterinária e Zoologia da Unipar**, Umuarama, v.7, n.2, p.157-162, 2004.
- SUQUET, M.; et al. Cryopreservation of sperm in marine fish. **Aquaculture Research**, Oxford, n.31, v.3, p.231-243, 2000.
- TAITSON, P. F.; CHAMI, E.; GODINHO, H. P. Gene banking of the neotropical fish *Leporinus obtusidens* (Valenciennes, 1836): a protocol to freeze its sperm in the field. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 105, p. 283-291, 2008.
- VARELA JR., A. S.; et al. Efeito crioprotetor de diferentes concentrações do dimetilsulfóxido no congelamento de sêmen de tambaqui *Colossoma macropomum*. **Atlântica**, Rio Grande, v.34, n.2, p.129-137, 2012b.
- VARELA JR., A. S.; et al. Use of amides as cryoprotectants in extenders for frozen sperm of tambaqui, *Colossoma macropomum*. **Theriogenology**, New York, v.78, p. 244-251, 2012a.
- VIVEIROS, A. T. M. Criopreservação de sêmen de peixes. In: CONGRESSO BRASILEIROS DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16., 2005, Goiânia – GO. **Anais...** Goiânia – GO: 2005. 1 CD-ROM.
- VIVEIROS, A. T. M.; et al. A simple, inexpensive and successful freezing method for curimba *Prochilodus lineatus* (Characiformes) semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.112, p.293-300, 2009.
- VIVEIROS, A. T. M.; et al. Sperm cryopreservation affects postthaw motility, but not embryogenesis or larval growth in the Brazilian fish *Brycon insignis* (Characiformes). **Theriogenology**, New York, n78, v.4, p.803-810, 2012.
- VIVEIROS, E. T. M.; et al. Sperm cryopreservation of tiete tetra *Brycon insignis* (Characiformes): effects of cryoprotectants, extenders, thawing temperatures and activating agent on motility features. **Aquaculture Research**, Oxford, v.42, p.858-865, 2011.
- YAO, Z.; et al. Motility, fertility and ultrastructural changes of ocean pout (*Macrozoarces americanus* L.) sperm after cryopreservation. **Aquaculture**, Amsterdam, v.181, p.661-375, 2000.

CAPÍTULO 3

1. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A padronização de um protocolo para criopreservação do sêmen de *C. macropomum* deve continuar a ser pesquisada. Porém, com o objetivo que o mesmo seja eficiente, prático e seguro.

As alterações estruturais identificados neste estudo sugerem que os protocolos que são propostos, conseguem proteger parcialmente os espermatozoides. Em função disso, as consequência são: baixa motilidade, tempo da motilidade, elevação do percentual de alterações morfológicas e por consequência baixa taxa de fertilização e eclosão.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, D. R.; YASUI, G. S. O manejo da reprodução natural e artificial e sua importância na reprodução de peixes no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 27, n. 2, p. 166-172, 2003.
- ARAÚJO, F. H.; et al. Influência da velocidade de descongelamento sobre a qualidade do sêmen de Tambaqui criopreservado em palhetas. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E PÓS-GRADUAÇÃO DA EMBRAPA TABULEIROS COSTEIROS. 2., 2012. Aracaju - SE. **Anais...** Brasília: Embrapa, 2012. p. 115-119. 1 CD-ROM.
- ARAÚJO-LIMA, C.; GOULDING M. **Os frutos do tambaqui**: ecologia, conservação e cultivo na Amazônia. Tefé: Sociedade Civil Mamiraúá, 1998. 187 p.
- BARRETO, G. S. et al. Morfologia espermática do sêmen de Tambaqui criopreservado em criotubos e submetido a diferentes velocidades de descongelamento. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E PÓS-GRADUAÇÃO DA EMBRAPA TABULEIROS COSTEIROS. 2., 2012. Aracaju - SE. **Anais...** Brasília: Embrapa, 2012. p. 120-124. 1 CD-ROM.
- BILLARD, R. Ultrastructure of trout spermatozoa: changes after dilution and deepfreezing. **Cell and Tissue Research**, Berlin, v. 228, p. 205-218, 1983.
- BILLARD, R.; COSSON, M. P. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. **The Journal of Experimental Zoology**, Hoboken, v. 261, n. 2, p. 122-131, 1992.
- BRASIL - Ministério da Pesca e Aquicultura - MPA. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura**: Brasil 2010. Brasília, 2012. 129 p.
- CARNEIRO, P. C. F. Tecnologias de produções e armazenamentos de sêmen de peixes. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 31, n. 3, p. 361-366, 2007.
- CARNEIRO, P. C. F. et al. Cryopreservation of tambaqui (*Colossoma macropomum*) semen: Extenders, cryoprotectants, dilution ratios and freezing methods. **Cryoletters**, London, v. 33, n. 5, p. 285-393, 2012.
- CAROLSFIELD, J. et al. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. **Journal of Fish Biology**, Oxford, v. 63, p. 472-489, 2003.
- CARVALHO, M. A. M.; NUNES, J. F.; GONDIM, J. M. Prolongamento da motilidade de espermatozoides de carpa comum, *Cyprinus carpio* L., pelo uso da água de coco (*Coccus nucifera*) como diluidor de sêmen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, n. 5, p. 184-186, 2002. Suplemento.
- CECCARELLI, P. S.; SENHORINI, J. A.; VOLPATO, G. L. **Dicas em piscicultura**: dicas e respostas. Botucatu: Santana Gráfica e Editora, 2000. 247 p.

- CIERESZKO, A.; GLOGOWSKI, J.; DABROWSKI, K. Biochemical characteristics of seminal plasma and spermatozoa of freshwater fishes. In: TIERSCH, T. R.; GREEN C. C. **Cryopreservation in aquatic species**. 2. ed. Baton Rouge: World Aquaculture Society, 2011. Cap.1, p. 46-79.
- COSER, A. M. L.; GODINHO, H. P.; TORQUATO, V. C. Criopreservação do sêmen de piau *Leporinus silvestrii* (Boulenger, 1902). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 39, n. 1, p. 37-42, 1987.
- COSSON, J. Ionic regulating the motility of fish sperm. In: GAGNON, C. (Ed.). **The male gamete: from basis in science to clinical applications**. Viena: Cache River Press, 1999. p. 162-186.
- FARIAS, J. O. et al. Avaliação “*in vitro*” e “*in vivo*” do sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*) conservado a temperatura ambiente e criopreservado em água de coco. **Revista Científica de Produção Animal**, Teresina, v. 1, n. 1, p. 44-58, 1999.
- FELIZARDO, V. O. et al. Osmolaridade e taxa de diluição na ativação do sêmen criopreservado de curimba (*Prochilodus lineatus*). **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 60, p. 1255-1262, 2011.
- FURUYA, W. M. Espécies nativas. In: MOREIRA, H. L. M. et al. **Fundamentos da moderna aquicultura**. Canoas: ULBRA, 2001. Cap. 10, p. 83-90.
- GALO, J. M. **Avaliação da qualidade dos gametas de Tambaqui (*Colossoma macropomum*) ao longo da estação reprodutiva**. 2003. Tese (Doutorado em Zootecnia). Universidade Federal de Maringá, Maringá, 2013.
- GARNER, D. L.; HAFEZ, E. S. E. Espermatozoides e plasma seminal. In: HAFEZ, E. S. E. **Produção animal**. 6. ed. São Paulo: Manole, 1995. Cap. 7, p. 167-189.
- GODINHO, H. P.; VIVEIROS, A. T. M. Current status of sperm cryopreservation of Brazilian characiform fishes. In: TIERSCH, T. R.; GREEN, C. C. **Cryopreservation in aquatic species**. 2nd ed. Baton Rouge: The World Aquaculture Society, 2011. p. 875-884.
- GRIER, H.; NEIDIG, C. Gonads and gametes of fishes. In: TIERSCH, T. R.; GREEN C. C. **Cryopreservation in aquatic species**. 2nd ed. Baton Rouge: World Aquaculture Society, 2011. Cap.1, p. 19-32.
- HARVEY, B. The application of cryopreservation in fish genetic conservation in North and South America. In: TIERSCH, T. R.; GREEN C. C. **Cryopreservation in aquatic species**. 2nd ed. Baton Rouge: World Aquaculture Society, 2011. Cap. 9, p. 783-788.
- HARVEY, B.; CAROLSFIELD, J. **Induced breeding in tropical fish culture**. Ottawa: Internacional Development Research Centre, 1993. 144 p.

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

KAVAMOTO, E. T. et al. Anormalidades morfológicas de espermatozoides de curimatá *Prochilodus scrofa* (STEINDACHNER, 1881) (OSTEICHTHYES, CHARACIFORMES, PROCHILODOTIDAE). **Boletim Instituto da Pesca**, São Paulo, v. 25, p. 61-66, 1999.

KAVAMOTO, E. T. et al. Fertilização em *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881, com sêmen criopreservado em nitrogênio líquido. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 16, n. 1, p. 29-36, 1989.

LEITE, L. V. **Dose inseminante, embriogênese e criopreservação de sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*)**. 2011. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) - Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2011.

MANZUR, P.; RALL, W. F.; LEIBO, S. P. Kinetics of water loss and the likelihood of intracellular freezing in mouse ova. Influence of the method of calculating the temperature dependence of water permeability. **Cell Biophysics**, Clifton, v. 6, n. 3, p. 197-213, 1984.

MARIA, A. N. **Diluidores e crioprotetores no resfriamento e congelamento do sêmen de Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)**. 2005. 84 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

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. **Manejo e sanidade de peixes em cultivo**. Macapá: Embrapa Amapá, 2009. Cap. 3, p. 47-63.

MARIA, A. N.; AZEVEDO, H. C.; CARNEIRO, P. C. F. **Protocolo para criopreservação do sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*)**. Aracaju: Embrapa, 2011. 8 p. (Comunicado técnico).

MARIA, A. N. et al. Influência da adição de iodeto de potássio e citrato de sódio na qualidade do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus* - Hulmberg, 1887). **Ciência Agrotecnica**, Lavras, v. 28, n. 1, p. 191-194, 2004.

MARQUES, S. **Preservação a curto prazo do sêmen de teleósteos neotropicais de água doce**. 2001. 98 f. Dissertação (Mestrado em Zoologia) - Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.

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

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

MELO, L. A. S.; IZEL, A. C. U.; RODRIGUES, F. M. **Criação de tambaqui (*Colossoma macropomum*) em viveiros de argila/barragens no estado do Amazonas**. Manaus: Embrapa Amazonia Ocidental, 2001. 30 p.

MELO, M. A. P. **Água de coco em pó (ACP-104) adicionada de crioprotetores sobre a morfometria da cabeça de espermatozoides de pirapitinda (*Piaractus brachypomus*) pós-descongelamento**. 2010. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) - Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2010.

MILIORINI, A. B. **Ativadores e concentrações de metanol e dimetilsulfóxido na qualidade de sêmen criopreservado de cubimba (*Prochilodus lineatus*)**. 2006. 99 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

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

MOJICA, C. A. P. **Análise ultraestrutural e avaliação do sêmen de peixes neotropicais, *Brycon orbignyanus*, *Rhamdia quelen* e *Brycon hilarii* (Pisces, Teleostei)**. 2004. 82 f. Dissertação (Mestre em Aquicultura) - Universidade Estadual de São Paulo, Campus de Jaboticabal, Jaboticabal, 2004.

MORAIS, C. A. R. S. et al. Criopreservação do sêmen de tambaqui em criotubos: Influência da velocidade de descongelamento sobre a cinética espermática. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E PÓS-GRADUAÇÃO DA EMBRAPA TABULEIROS COSTEIROS, 2., 2012, Aracaju - SE. **Anais...** Brasília: Embrapa, 2012. p. 125-129. 1 CD-ROM.

MURGAS, L. D. S. et al. Criopreservação do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) mediante adição de diferentes diluidores, ativadores e crioprotetores. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 36, n. 3, p. 526-531, 2007.

NASCIMENTO, A. F. et al. Fertilidade do sêmen de piraicanjuba *Brycon orbignyanus* criopreservado em água de coco em pó e em BTS. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PRODUÇÃO DE PEIXES NATIVOS DE ÁGUA DOCE E ENCONTRO DE PISCICULTUROS DE MATO GROSSO DO SUL, 1., 2007, Dourados – MS. **Anais...** Dourados – MS, 2007. 1 CD-ROM.

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

NINHAUS-SILVEIRA, A. et al. Seminal analysis, cryogenic preservation, and fertility in matrinxã fish, *Brycon cephalus* (Günther, 1869). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 49, n. 4, p. 651-659, 2006.

OHTA, H.; IZAWA, T. Diluent for cool storage of the Japanese eel (*Anguilla japonica*) spermatozoa. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 142, p. 107-118, 1996.

OLIVEIRA, A. V. **Resfriamento e criopreservação do sêmen de dourado (*Salminus maxillosus*) e pirapitinga (*Brycon nattereri*)**. 2006. 107 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

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

ORFÃO, L. H. **Diversidade genética de populações e criopreservação de sêmen de parapitinga-do-sul *Brycon opalinus***. 2010. 132 f. Tese (Doutorado em Produção Animal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

PESSOA, N. O. **Avaliação cinética do sêmen de pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) congelado em meio à base de água de coco em pó (ACP-104[®]) ou ringer em três meios de ativação**. 2009. 58 f. Dissertação (Mestre em Ciência Veterinária) - Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2009.

RAMIREZ-MERLANO, J. A. et al. Cryopreservation effects on the sperm quality of cachama blanca *Piaractus brachypomus* (Cuvier 1818). **Aquaculture Research**, Oxford, v. 42, p. 738-745, 2011.

RANZANI-PAIVA, M. J. T. et al. Análises hematológicas de curimatá (*Prochilodus scrofa*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*) das estações de piscicultura do Instituto de Pesca, Estado de São Paulo. 1998/1999. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 25, p. 77-83, 1999.

RESENDE, E. K. et al. Melhoramento animal no Brasil: uma visão crítica espécies aquáticas. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO ANIMAL, 8., 2010, Maringá. **Anais...** Maringá, 2010. 1 CD-ROM.

SHIMODA, E. **Análise e criopreservação do sêmen de piabanha *Brycon insignis* STEINDACHNER, 1977 (PISCES, CHARACIDAE)**. 2004. 124 f. Tese (Doutorado em Produção Animal) - Centro do Ciências e Tecnologias Agropecuária, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2004.

SILVA, A. R.; CARDOSO, R. C. S.; SILVA, L. D. M. Comparação entre a água de coco em pó (ACP[®]) e o Tris com diluidores na criopreservação do sêmen de cães. **Brazilian Journal Research Animal Science**, São Paulo, v. 46, n. 6, p. 767-774, 2006.

SQUIRES, E. L. et al. **Cooled and frozen stallion semen**. Fort Collins: Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory Bull. Colorado State University, 1999. 90 p.

STREIT Jr, D. P. et al. Características qualitativas do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) após indução hormonal. **Biociência Journal**, Porto Alegre, v. 22, n. 3, p. 119-125, 2006a.

STREIT JR., D. P. et al. Motilidade, vigor e patologias seminal in natura e pós criopreservação de *Piaractus mosopotamicus*. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 35, n. 2, p. 159-167, 2009.

STREIT JR., D. P. et al. Sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) criopreservado com diluentes utilizados para sêmen de suínos. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 7, n. 3, p. 289-297, 2006b.

STREIT Jr.; D. P. et al. Parâmetros qualitativos do semen de dourado (*Salminus maxillosus*) em cativo. **Boletim Instituto da Pesca**, São Paulo, v. 34, n. 3, p. 337-344, 2008.

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

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

TIERSCH, T. R. Strategies for commercialization of cryopreserved fish semen. **Revista Brasileira de Zootecnia**. Viçosa, v. 37, p. 15-19, 2008.

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

VARELA JR., A. S. et al. Use of amides as cryoprotectants in extenders for frozen sperm of tambaqui, *Colossoma macropomum*. **Theriogenology**, New York, v. 78, p. 244-251, 2012a.

VAZZOLER, A. E. A. M. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática**. Maringá: Editora da Universidade Estadual de Maringá, 1996. 169 p.

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

VIEIRA, M. J. A. F. **Caracterização do sêmen de tambaqui *Colossoma macropomum* (Curvier, 1818) e criopreservação em diluentes à base de água de coco em pó (ACP-104)**. 2010. 114 f. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) - Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2010.

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

VIVEIROS, A. T. M. Criopreservação de sêmen de peixes. In: CONGRESSO BRASILEIROS DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16., 2005, Goiânia – GO. **Anais...** Goiânia, 2005. 1 CD-ROM.

VIVEIROS, A. T. M. et al. A simple, inexpensive and successful freezing method for curimba *Prochilodus lineatus* (Characiformes) semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 112, p. 293-300, 2009b.

VIVEIROS, A. T. M. et al. Powder coconut water (ACP®) as extender for semen cryopreservation of Brazilian migratory fish species. **Cybium**, Paris, v. 32, n. 2, p. 215, 2008. Suplemento.

VIVEIROS, A. T. M. et al. Sensibilidade dos espermatozoides de dourado (*Salminus brasiliensis*) a diferentes soluções crioprotetoras. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, n. 4, p. 883-889, 2009a.

VIVEIROS, A. T. M. et al. Sperm cryopreservation affects postthaw motility, but not embryogenesis or larval growth in the Brazilian fish *Brycon insignis* (Characiformes). **Theriogenology**, New York, v. 78, n. 4, p. 803-810, 2012.

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

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

WOODS, E. et al. Equations for obtaining melting points for the ternary system ethylene glycol/sodium chloride/water and their application to cryopreservation. **Cryobiology**, New York, v. 38, p. 403-407, 1999.

ZANIBONI-FILHO, E.; NUÑER, A. P. O. Fisiologia da reprodução e propagação artificial em peixes. In: CYRINO, J. E. P. et al. **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, 2004. Cap. 4, p. 45-73.

ZHANG, Y. Z. et al. Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) sperm with a practical methodology. **Theriogenology**, New York, v. 60, p. 989-996, 2003.

GODOY, L. C. **Desenvolvimento do protocolo para criopreservação de folículos ovarianos de peixes usando vitrificação**. 2012, 114 f. Tese (Doutorado em Zootecnia). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

LEUNG, L. K. P; JAMIESON, B. G. M. Live preservation of gametes. In: JAMIESON, B. G. M. **Fish evolution and systematics: evidence from spermatozoa**. Ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1991, p.245-263.

3. VITA

Raycon Roberto Freitas Garcia, filho de Carlos Roberto Garcia e Eunice Benedita de Freitas Garcia, brasileiro, nascido em Rolim de Moura, município do Estado de Rondônia, no dia 15 de março de 1987.

Cursou quase que em toda sua totalidade o ensino fundamental e médio na Escola Estadual Cel. Aluizio Pinheiro Ferreira, em sua cidade natal.

No ano de 2006 ingressou no curso de Zootecnia da Universidade Estadual do Mato Grosso (UNEMAT). Durante a graduação realizou diversos estágios extracurriculares e curriculares nas áreas de bovinocultura de corte e leiteira, ovinocultura e piscicultura. Além de ter realizados diversos cursos para aprimorar técnicas de produção e manejo em setores da zootecnia. Nos períodos de 2008 à 2009 foi bolsista do PIBIC/CNPq juntamente com a Fundação de Amparo a Pesquisa do Mato Grosso (FAPEMAT), período cujo qual também foi monitor do laboratório de análises de alimentos (LAANA/UNEMAT). Concluiu a graduação em 2010 com a monografia intitulada “Diferentes níveis de suplementação concentrada para ovinos em pastejo sobre desempenho animal e dias de suplementação”.

Em 2011 ingressou no Programa de Pós Graduação em Zootecnia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, na área de concentração Produção Animal de Não Ruminantes com ênfase em Piscicultura e foi bolsista da CAPES.