

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

EFEITO DA CONTAMINAÇÃO NA QUALIDADE DO SÊMEN DO TAMBAQUI  
(*Colossoma macropomum*)

LUIS FERNANDO GUERRERO GRACIA  
Médico Veterinário/UFRGS

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

Porto Alegre (RS), Brasil  
Março, 2013



## AGRADECIMENTOS

Ao Ser Supremo por me permitir participar desta aventura.

Ao prof. Danilo Streit Jr. e à profa. Enefer Oberst, pelos ensinamentos e orientação para o meu crescimento pessoal e profissional.

Ao “Sr. Pedrinho”, à sua filha Simone Yokoyama e a todos os funcionários da piscicultura Boa Esperança, pela paciência, ajuda, amizade e calorosa recepção.

A todos os amigos do Grupo de Pesquisa - *AQUAM*, especialmente à Maira Corso que participou de todas as etapas do meu mestrado, ao Raycon, Diego, Luis Guerreiro, Juliana, Raquel, Pedro Henrique, Macgaiver, Thaynam, Gabriele, pela ajuda e amizade;

Aos meus amigos, especialmente ao meu grande irmão Ângelo que há muito tempo me acompanha nesta jornada;

Ao meu primo-irmão Rafael, vó Neida e tio Neco, pelo amparo, carinho e amor incondicional;

Aos membros da banca examinadora, que gentilmente aceitaram o convite para colaborarem com este trabalho;

A todos do Departamento e do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da UFRGS;

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudo e apoio financeiro para execução deste trabalho;

**Agradeço a todos que me fortaleceram com sua energia positiva e me ajudaram a chegar até aqui.**

## DEDICATÓRIA

Dedico esta etapa de minha vida àqueles que abdicam de agradecimentos. Àqueles que sempre foram os meus exemplos, minha inspiração, o grilo falante da minha cabeça, meu porto-seguro, meus grandes amores: meu pai, Luis Guerrero Gracia, e minha tia, Sabrina Pereira de Abreu. Sem vocês eu nada seria!

## EFEITO DA CONTAMINAÇÃO NA QUALIDADE DO SÊMEN DO TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*)<sup>1</sup>

Autor: Luis Fernando Guerrero Gracia

Orientador: Danilo Pedro Streit Jr.

Co-orientadora: Enefer Rosana Oberst

### RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade do sêmen fresco e congelado de tambaqui (*Colossoma macropomum*), submetido à contaminação com diferentes fontes. O estudo foi conduzido na região da amazônia brasileira, estado de Rondônia, durante fevereiro e março de 2012. Foram utilizadas amostras de sêmen de 13 machos, divididas em quatro tratamentos: controle (sem contaminante) e contaminado com 10% de urina, sangue ou fezes. Foram avaliadas a motilidade e tempo de duração da motilidade espermática das amostras frescas, e motilidade, integridade de membrana, integridade de DNA, e funcionalidade de mitocôndria das amostras congeladas. A motilidade do sêmen fresco não diferiu ( $P < 0,05$ ) entre as amostras contaminadas por sangue, urina ou fezes (79,6; 76,1 e 78,8%, respectivamente) mas foi inferior em relação ao grupo controle (96,1%). Já nas amostras congeladas, não houve diferença ( $P > 0,05$ ) na motilidade entre as amostras contaminadas com sangue, urina ou fezes (11,1; 22,3 e 34,6%, respectivamente) e as amostras sem contaminantes (40,8%). O tempo de duração da motilidade das amostras, fresco, sem contaminantes (125,5 s) foi superior ( $P < 0,05$ ) ao das amostras contaminadas com sangue ou fezes (85,7 e 77,0 s, respectivamente), e as contaminadas com urina (98,7 s) não diferiram dos outros tratamentos. Os tratamentos contaminados com urina ou fezes (94,0 e 102,5 s, respectivamente) não diferiram ( $P > 0,05$ ) entre si ou em relação aos demais tratamentos. Para a análise de integridade de membrana, os valores 72,4; 77,0 e 68,0% obtidos no sêmen contaminado com sangue, urina e fezes, respectivamente, foram menores ( $P < 0,05$ ) que o controle cuja média foi 91,5%. O tratamento contaminado com urina foi inferior ( $P < 0,05$ ) ao tratamento controle para a integridade de DNA (82,8 e 93,4%, respectivamente) e para a funcionalidade de mitocôndrias (87,1% e 94,9%, respectivamente). Assim, a qualidade seminal é prejudicada com a inclusão dos contaminantes testados (fezes, urina ou sangue), em concentração de 10%, para a maioria dos parâmetros avaliados.

**Palavras-chave:** criopreservação, contaminação seminal, qualidade espermática, piscicultura.

---

<sup>1</sup>Dissertação de Mestrado em Zootecnia – Produção Animal, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (54 p.) Março, 2013.

## EFFECT OF CONTAMINATION IN SEMEN QUALITY OF TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*)<sup>2</sup>

### ABSTRACT

The objective was to evaluate the quality of fresh and thawed semen of *C. macropomum*, subject to contamination from various sources. The study was conducted in the Brazilian Amazon region, state of Rondônia, during February and March of 2012. Semen samples of 13 males were divided into four treatments: control (no contaminants) and 10% contaminated with urine, blood or feces. Motility was evaluated in fresh and thawed samples whereas membrane integrity, DNA integrity, and functionality of mitochondria were evaluated in thawed samples. The motility of fresh semen was lower ( $P < 0.05$ ) in samples contaminated by blood, urine or feces (79.6, 76.1 and 78.8%, respectively) when compared with control group (96.1%), but did not differ among them. However in post thawed samples, motility was similar ( $P > 0.05$ ) in samples contaminated with blood, urine or feces (11.1, 22.3 and 34.6%, respectively) compared to samples without contaminants (40.8%). In post thawed semen, only blood contaminated semen (71.2 s) was lower than the control treatment (140.8 s). Treatments contaminated with urine or feces (94.0 and 102.5 s, respectively) did not differ ( $P > 0.05$ ) among themselves or with respect to other treatments. For the membrane integrity analysis, values of 72.4, 77.0 and 68.0% obtained in semen contaminated with blood, urine and feces, respectively, were lower ( $P < 0.05$ ) than the control whose average was 91.5%. Treatment contaminated with urine was lower ( $P < 0.05$ ) than the control treatment for DNA integrity (82.8 and 93.4%, respectively) and mitochondria functionality (87.1% and 94.9%, respectively). Therefore, most parameters of semen quality were impaired by the inclusion of contaminants tested (feces, urine or blood) at a concentration of 10%.

**Key words:** cryopreservation, seminal contamination, sperm quality, fish breed.

---

<sup>2</sup>Master of Science dissertation in Animal Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (54 p.) March, 2013.

## SUMÁRIO

	Página
<b>CAPÍTULO I</b> .....	<b>10</b>
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1. Piscicultura brasileira.....	12
2.2. Espécie estudada.....	12
2.3. Processos reprodutivos de espécies nativas reofílicas.....	12
2.4. Criopreservação.....	13
2.5. Contaminação do sêmen.....	14
3. HIPÓTESE.....	16
4. OBJETIVOS.....	17
4.1. Objetivo Geral:.....	17
4.2. Objetivos Específicos:.....	17
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>18</b>
RESUMO.....	19
ABSTRACT.....	20
1. INTRODUÇÃO.....	21
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
2.1. Obtenção do sêmen.....	23
2.1. Coleta de amostras e delineamento experimental.....	23
2.2. Análise do sêmen fresco.....	23
2.3. Congelamento e descongelamento.....	24
2.4. Análise do sêmen congelado.....	24
2.3. Análise estatística.....	25
3. Resultados.....	26
4. Discussão.....	29
5. Conclusão.....	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>37</b>
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
VITA.....	42

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Taxa de motilidade (média e desvio padrão) do sêmen fresco e do sêmen congelado, de *C. macropomum*, submetido a quatro tratamentos (controle, contaminado com urina, sangue ou fezes)..... 26
- FIGURA 2.** Integridade de membrana (média e desvio padrão) do sêmen congelado, de *C. macropomum*, submetido a quatro tratamentos (controle, contaminado com urina, sangue ou fezes). Avaliação pelo método de coloração com diacetato de carboxifluoresceína e iodeto de propídio e visualização em microscópio de epifluorescência (400X). ..... 27
- FIGURA 3.** Integridade de DNA (média e desvio padrão) do sêmen congelado, de *C. macropomum*, submetido a quatro tratamentos (controle, contaminado com urina, sangue ou fezes). Avaliação pelo método de coloração com laranja de acridina e visualização em microscópio de epifluorescência (400X)..... 27
- FIGURA 4.** Funcionalidade de mitocôndria (média e desvio padrão) do sêmen congelado, de *C. macropomum*, submetido a quatro tratamentos (controle, contaminado com urina, sangue ou fezes). Avaliação pelo método de coloração com rhodamina 123 e visualização em microscópio de epifluorescência (400X). ..... 28

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ATP** - Adenosina trifosfato  
**BTS** - Beltsville Thawing Solution  
**DNA** - Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)  
**CFDA** - Diacetato de carboxifluoresceína  
**DMF** - Dimetilformamida  
**DMSO** - Dimetilsulfóxido  
**EDTA** - Ethylenediamine tetraacetic acid (Ácido etilendiamino tetra-acético)  
**EMBRAPA** - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
**LDL** - Low Density Lipoproteins (Lipoproteínas de baixa densidade)

## **CAPÍTULO I**

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Para o desenvolvimento do setor aquícola e manutenção da biodiversidade, é fundamental o domínio do manejo reprodutivo das espécies alvo, o que evidencia a necessidade de desenvolver técnicas mais eficientes na conservação de sêmen. Essa necessidade é reforçada pela constante ameaça de perda da diversidade genética das populações de peixes nativos, devido a problemas como destruição de matas ciliares, pesca predatória, construção de barragens hidroelétricas e poluição dos ecossistemas aquáticos (MARIA *et al.*, 2011a). Para amenizar os impactos gerados pelos problemas relacionados, torna-se importante implantar programas que visem o armazenamento de gametas a longo prazo (MARIA *et al.*, 2011a). O congelamento do sêmen de peixes é uma possível solução para esta necessidade, sendo uma técnica essencial para a preservação de material genético, permitindo seu armazenamento e sua disponibilidade por períodos indeterminados (NINHAUS-SILVEIRA *et al.*, 2006).

A criação e organização de bancos de germoplasma do tambaqui (*Colossoma macropomum*) são úteis tanto no suporte a programas de recuperação de populações naturais, quanto no auxílio na construção de um programa de melhoramento genético desta espécie. A conservação dos recursos genéticos animais existentes na natureza é fundamental para a preservação da base genética, especialmente quando se pensa na existência de genes e combinações genéticas únicas que poderão ser úteis no futuro (VILLELA *et al.*, 2009). Soma-se o fato de que há uma tendência de ocorrer um aumento na comercialização de sêmen congelado (CAFFEY & TIERSCH, 2000). A preservação do sêmen pode sofrer sérios prejuízos se ocorrer contaminação das amostras com sangue, fezes (SATTERFIELD & FLICKINGER, 1995) ou urina (NYNCA *et al.*, 2012). Na prática, o sêmen contaminado é utilizado imediatamente após a coleta, mas nunca é congelado. No entanto, há poucos estudos sobre a utilização do sêmen contaminado com sangue, urina ou fezes, tanto fresco quanto congelado. O objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade seminal do *C. macropomum*, fresco e congelado, contaminado por urina, sangue ou fezes.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Piscicultura brasileira

De acordo com as bases estatísticas pesquisadas, o Brasil produziu 1.240.813 t de pescado (proveniente de extrativismo e cultivo) em 2009, representando 0,86% da produção mundial deste segmento (MPA, 2012). Em 2010, a produção aquícola nacional (proveniente somente de cultivo) foi de 479.399 t, sendo a aquicultura continental responsável por 82,3% desta produção. Ainda, de acordo com a mesma fonte de pesquisa, o *C. macropomum* é a espécie nativa mais produzida no país, ficando atrás apenas das carpas (*Cyprinus carpio*, *Aristichthys nobilis*, *Hypophthalmichthys molitrix* e *Ctenopharyngodon idella*) e da tilápia (*Oreochromis niloticus*). Sua produção foi de 54.313,1 t em 2010, crescendo, aproximadamente, 40% em relação a 2008 (38.833 t), denotando o grande potencial da espécie para a piscicultura brasileira. Trata-se da principal espécie nativa produzida no norte e centro-oeste do Brasil (MPA, 2011), selecionada pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) como uma das espécies prioritárias para a aquicultura (QUEIROZ *et al.*, 2002), devido à facilidade de manejá-lo e ao seu crescimento rápido (MARIA *et al.*, 2011b).

### 2.2. Espécie estudada

O *C. macropomum* é um peixe originário da bacia amazônica, nativo dos rios Solimões, Madeira e Orenoco e seus afluentes, com larga distribuição nestes rios, e em áreas próximas a Manaus (VIEIRA, 2010). A desova da espécie na natureza ocorre, principalmente, nos meses de dezembro a janeiro, coincidindo com as enchentes dos rios Negro e Amazonas (VIEIRA, 2010). A temperatura é a maior restrição para o cultivo do *C. macropomum* em outras regiões do país, pois o mesmo cresce muito lentamente em temperaturas abaixo de 22° C e não sobrevive quando em temperaturas inferiores a 16° C (RANZANI-PAIVA *et al.*, 1998) e, desse modo, não se recomenda sua criação nas regiões sul e sudeste do país. Em cativeiro, perde a capacidade de se reproduzir naturalmente, sendo necessária a indução à desova, através da aplicação de hormônios gonadotróficos exógenos (VIEIRA *et al.*, 2011).

### 2.3. Processos reprodutivos de espécies nativas reofílicas

Para o desenvolvimento da aquicultura é necessário que haja alevinos em quantidade significativa, para serem estocados e para tal é imprescindível que as técnicas reprodutivas da espécie trabalhada sejam dominadas. Muito embora a técnica de reprodução induzida tenha sido descoberta desde a década de 30 no processo de desova artificial com o uso de hipofisação (IHERING & WRIGHT, 1935), a sua popularização ocorreu no país no fim dos anos 70. Todavia, o seu desenvolvimento continua em ritmo lento frente a outras atividades relacionadas à piscicultura de espécies nativas, como por exemplo, nutrição e processamento do pescado.

A reprodução artificial da maioria das espécies é otimizada pelo uso da indução hormonal. Este procedimento possibilita a maturação final e liberação dos gametas de peixes mantidos em cativeiro, além de permitir maior eficiência da reprodução em condições laboratoriais (CARNEIRO, 2007). As

induções hormonais também podem ser utilizadas para aumentar a produção seminal, antecipar o período reprodutivo, restringí-lo ou mesmo sincronizar a reprodução de um lote de matrizes (ANDRADE & YASUI, 2003). A técnica mais utilizada no Brasil para a indução hormonal da maturação final de peixes é o extrato bruto de hipófise de peixes maduros (ZANIBONI-FILHO & NUÑER, 2004). A indução hormonal com extrato hipofisário, em algumas espécies, é importante por possibilitar o aumento do volume de sêmen obtido, facilitando os procedimentos da reprodução em laboratório (CARNEIRO, 2007) e permitindo a utilização de um menor número de machos, permitindo a redução do plantel de reprodutores (CARNEIRO, 2007).

#### 2.4. Criopreservação

A criopreservação é uma biotécnica importante no controle reprodutivo de inúmeras espécies e sua aplicação em peixes está em amplo desenvolvimento (MURGAS, 2007), e pode ser utilizada em diferentes campos de pesquisa e produção (CABRITA *et al.*, 2001). Pela sua alta aplicabilidade para a preservação de material genético, pode ser utilizada tanto em programas de melhoramento genético de espécies de interesse econômico, quanto em programas de preservação de populações selvagens, com vistas à sua recuperação em ambientes que sofreram degradação (CARNEIRO, 2007). É uma técnica eficiente para armazenar o material genético dos machos, fazendo com que este material fique disponível por períodos indeterminados (NINHAUS-SILVEIRA *et al.*, 2006). A conservação de sêmen por longos períodos tem por finalidade prover a necessidade de genes para aumentar a variabilidade genética de uma determinada população (CARNEIRO, 2007).

Uma aplicação, talvez única no Brasil, foi a utilização de um banco de germoplasma na área de produção animal para a construção do programa de melhoramento genético de *C. macropomum*. Neste caso, o banco de germoplasma foi fundamental para a viabilização do programa iniciado em 2009. As pesquisas para aumentar a eficiência na criopreservação do sêmen do *C. macropomum* para dar continuidade no programa de melhoramento genético, são realizadas a partir dos protocolos produzidos por Carolsfeld *et al.* (2003) para Characidae. A avaliação dos diluidores e crioprotetores nestes processos, a fim de evitar os danos causados pelo congelamento e descongelamento do sêmen, é um fator relevante na avaliação da qualidade do sêmen (ZEMOR, 2011). Em estudo realizado com *C. macropomum*, Varela Jr. *et al.* (2012) observaram que o dimetilformamida (DMF) utilizado no sêmen criopreservado permitiu uma maior taxa de eclosão, motilidade espermática, integridade espermática, viabilidade espermática, integridade do DNA espermático e funcionalidade mitocondrial, quando comparado com outras duas amidas (dimetilacetamida e metilformamida) e com dois crioprotetores tradicionais (glicerol e dimetilsulfóxido - DMSO). Ainda, os autores observaram que a taxa de fertilização e eclosão, foram similares às do sêmen fresco, o que possibilitou aos autores concluir que o DMF é o melhor crioprotetor para o congelamento do sêmen desta espécie.

A implantação de protocolos de reprodução artificial e o desenvolvimento de métodos de preservação de sêmen eficientes requerem um profundo conhecimento da biologia reprodutiva e características seminais

(concentração de espermatozoides, cor e volume de sêmen, morfologia do esperma dentre outros) das espécies estudadas (NINHAUS-SILVEIRA, 2006).

## 2.5. Contaminação do sêmen

A preservação do sêmen, principalmente quando realizada a campo ou em larga escala, pode sofrer sérios prejuízos se ocorrer a contaminação de amostras com sangue, fezes (SATTERFIELD & FLICKINGER, 1995) ou urina (NYNCA *et al.*, 2012).

### - Urina

Na maioria das espécies de peixes de água doce, a fecundação ocorre no meio externo. Os espermatozoides estão imóveis no trato genital e plasma seminal, tornam-se móveis após a liberação, quando encontram o meio externo hiposmótico - normalmente água doce (NYNCA *et al.*, 2012). A contaminação de sêmen com urina possui grande influência sobre a qualidade dos espermatozoides de peixes de água doce. Essa contaminação ocorre, em geral, sob as condições de coleta por compressão abdominal, pois o ducto espermático e o urinário se juntam no ducto eferente com uma abertura através da papila urogenital (NYNCA *et al.*, 2012). A motilidade espermática pode ser desencadeada, durante a coleta, pela contaminação do sêmen com a urina e, desta forma, determinar alterações nos índices de fertilização (BILLARD *et al.*, 1995).

A baixa osmolaridade da urina, possivelmente seja responsável por uma ativação precoce dos espermatozoides no trato urinário, o que induz uma redução inicial do armazenamento de ATP intracelular (POUPARD *et al.*, 1998) e, caso ocorra uma demora para o sêmen entrar em contato com os oócitos, os espermatozoides podem estar imóveis no momento da fecundação (RURANGWA *et al.*, 2004). A ativação espontânea dos espermatozoides de tenca (*Tinca tinca*), no sêmen contaminado com urina, foi de até 100% (LINHART *et al.*, 2003). Mas, de acordo com os autores, esta ativação precoce poderia ter sido prevenida por coleta em uma solução imobilizadora. A contaminação do sêmen de trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) a partir de 0 a 30% de urina, levou à redução da osmolaridade do plasma seminal, de 301 para 203 mOsm/kg de solvente, respectivamente (NYNCA *et al.*, 2012). Em tilápias (*Oreochromis mossambicus*) a urina foi considerada uma boa ativadora da motilidade espermática (LINHART *et al.*, 1999). A redução da motilidade espermática em amostras contaminadas por urina também foi observada em *O. mykiss* (NYNCA *et al.*, 2012), pregado (*Psetta maxima*) (DREANNO *et al.*, 1998) e em *C. carpio* (BILLARD *et al.*, 1995; POUPARD *et al.*, 1998). Segundo Poupard *et al.* (1998), a contaminação do sêmen por urina em peixes, durante a coleta, pode ser evitada por uma leve compressão do abdômen antes de iniciar-se o procedimento e, em seguida, pela introdução de um cateter na bexiga urinária, para recolher a urina remanescente. Este método pode ser utilizado para coletar sêmen livre de contaminação por urina, sangue e fezes (CABRITA *et al.*, 2001). Em contrapartida, Cierezsko *et al.* (2004) afirmam ser impossível evitar a contaminação com urina pela utilização deste método, mesmo que seja realizado com cuidado. Consideram que, apesar de ser um procedimento minimamente traumático e não causar hemorragia, é possível

que ocorra introdução de bactérias no ducto espermático ou ainda produza danos ao ducto espermático.

#### - Sangue

A presença de células sanguíneas no sêmen de peixes pode estar relacionada com diferentes eventos, fisiológicos ou patológicos, no trato reprodutivo masculino (CIERESZKO *et al.*, 2004), descritos a seguir:

- Pequenas quantidades destas células podem estar relacionadas com a fisiologia normal do animal;
- Uma pequena quantidade de sangue pode estar presente devido a lesões causadas pelo manuseio dos peixes, ou adquiridas durante a migração reprodutiva. Hemorragias no trato reprodutivo podem, muitas vezes, ocorrer na piscicultura devido à grande densidade de peixes, manejo dos reprodutores e à coleta de sêmen por compressão abdominal. A ocorrência de hemorragia pode ser indicada pela presença de eritrócitos no sêmen;
- Inflamações do trato reprodutivo;
- Consequência de eventos relacionados com a involução do sistema reprodutivo após a ejaculação. Um número elevado de células sanguíneas, eritrócitos e células linfóides pode ser encontrado em algumas amostras de sêmen, apesar de uma falta de quaisquer sinais visíveis de contaminação com sangue. A contaminação do sêmen por pequena quantidade de sangue parece não prejudicar gravemente a qualidade seminal.

A qualidade seminal de ervado (*Stizostedion vitreum*) não foi afetada quando avaliada após refrigeração, e contaminado por sangue (SATTERFIELD & FLICKINGER, 1995). Neste clássico trabalho os autores observaram um fato importante, ocorrendo um aumento no tempo de estocagem (13,3 dias) e da duração da motilidade (56s) das amostras contaminadas, quando comparadas com os resultados das amostras do grupo controle, 11,7 dias e 51 s respectivamente. Este fato corrobora com a observação de Ciereszko *et al.* (2004) referente aos benefícios para o sêmen, após contaminação com sangue.

Em mamíferos a influência do sangue no sêmen também é observada. No caso de adição de 10% de sangue ao sêmen de cães, não foram observados efeitos negativos nas características funcionais (motilidade, motilidade progressiva, integridade de membrana, morfologia e integridade de acrossomo) de espermatozoides armazenados durante 4 dias a 4°C (RIJSSELAERE *et al.*, 2004). Porém, os autores observaram que a adição de 2% ou mais de sangue em um ejaculado influenciou negativamente os parâmetros quali-quantitativos do sêmen congelado.

#### - Fezes

A contaminação do sêmen de *S. vitreum* com fezes reduziu em 2 dias o período de estocagem e o tempo de duração de motilidade de 51 s (controle) para 5,6 segundos (SATTERFIELD & FLICKINGER, 1995). Em amostras de sêmen de galos, contaminadas por fezes, foi observada redução acentuada da motilidade e do vigor espermáticos (BOONE & HUGHES, 1970),

sendo que, quanto maior foi a contaminação, maior foi o efeito deletério. Os autores recomendaram após o estudo que a contaminação por fezes deve ser evitada, para prevenir um significativo decréscimo do período de armazenamento do sêmen refrigerado e do tempo de duração de motilidade, pois altas quantidades de micro-organismos saprófitos tais como coliformes, enterobacteriaceae e enterococos podem competir com espermatozoides pelos nutrientes presentes no plasma seminal ou nos diluidores, ou ambos, reduzindo a qualidade do sêmen e, conseqüentemente, a fertilidade. Os micro-organismos podem causar um efeito deletério, diretamente, ao causar danos à estrutura espermática (DIEMER *et al.*, 1996) ou, indiretamente, ao estimular a produção de anticorpos que podem agir contra os espermatozoides (KURPISZ & ALEXANDER, 1995).

### **3. HIPÓTESE**

**3.1** A contaminação do sêmen fresco e congelado de *C. macropomum* com 10% de urina, sangue ou fezes reduz a sua qualidade.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo Geral:

Avaliar a qualidade seminal do *C. macropomum*, fresco e congelado, contaminado com 10% de urina, sangue ou fezes.

### 4.2. Objetivos Específicos:

Avaliar os parâmetros clássicos, quali-quantitativos do sêmen contaminado fresco e congelado: motilidade e tempo de duração da motilidade dos espermatozoides de *C. macropomum*.

Avaliar as alterações estruturais dos espermatozoides (integridade da membrana espermática e do DNA e funcionalidade mitocondrial) de *C. macropomum*, congelado.

## **CAPÍTULO 2**

## EFEITO DA CONTAMINAÇÃO NA QUALIDADE DO SÊMEN DO TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*)

### RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade do sêmen fresco e congelado de tambaqui (*Colossoma macropomum*), submetido à contaminação com diferentes fontes. O estudo foi conduzido na região da amazônia brasileira, estado de Rondônia, durante fevereiro e março de 2012. Foram utilizadas amostras de sêmen de 13 machos, divididas em quatro tratamentos: controle (sem contaminante) e contaminado com 10% de urina, sangue ou fezes. Foram avaliadas a motilidade e tempo de duração da motilidade espermática das amostras frescas, e motilidade, integridade de membrana, integridade de DNA, e funcionalidade de mitocôndria das amostras congeladas. A motilidade do sêmen fresco não diferiu ( $P < 0,05$ ) entre as amostras contaminadas por sangue, urina ou fezes (79,6; 76,1 e 78,8%, respectivamente) mas foi inferior em relação ao grupo controle (96,1%). Já nas amostras congeladas, não houve diferença ( $P > 0,05$ ) na motilidade entre as amostras contaminadas com sangue, urina ou fezes (11,1; 22,3 e 34,6%, respectivamente) e as amostras sem contaminantes (40,8%). O tempo de duração da motilidade das amostras, fresco, sem contaminantes (125,5 s) foi superior ( $P < 0,05$ ) ao das amostras contaminadas com sangue ou fezes (85,7 e 77,0 s, respectivamente), e as contaminadas com urina (98,7 s) não diferiram dos outros tratamentos. Os tratamentos contaminados com urina ou fezes (94,0 e 102,5 s, respectivamente) não diferiram ( $P > 0,05$ ) entre si ou em relação aos demais tratamentos. Para a análise de integridade de membrana, os valores 72,4; 77,0 e 68,0% obtidos no sêmen contaminado com sangue, urina e fezes, respectivamente, foram menores ( $P < 0,05$ ) que o controle cuja média foi 91,5%. O tratamento contaminado com urina foi inferior ( $P < 0,05$ ) ao tratamento controle para a integridade de DNA (82,8 e 93,4%, respectivamente) e para a funcionalidade de mitocôndrias (87,1% e 94,9%, respectivamente). Assim, a qualidade seminal é prejudicada com a inclusão dos contaminantes testados (fezes, urina ou sangue), em concentração de 10%, para a maioria dos parâmetros avaliados.

**Palavras-chave:** criopreservação, contaminação seminal, qualidade espermática, piscicultura.

## EFFECT OF CONTAMINATION IN SEMEN QUALITY OF TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*)

### ABSTRACT

The objective was to evaluate the quality of fresh and thawed semen of *C. macropomum*, subject to contamination from various sources. The study was conducted in the Brazilian Amazon region, state of Rondônia, during February and March of 2012. Semen samples of 13 males were divided into four treatments: control (no contaminants) and 10% contaminated with urine, blood or feces. Motility was evaluated in fresh and thawed samples whereas membrane integrity, DNA integrity, and functionality of mitochondria were evaluated in thawed samples. The motility of fresh semen was lower ( $P < 0.05$ ) in samples contaminated by blood, urine or feces (79.6, 76.1 and 78.8%, respectively) when compared with control group (96.1%), but did not differ among them. However in post thawed samples, motility was similar ( $P > 0.05$ ) in samples contaminated with blood, urine or feces (11.1, 22.3 and 34.6%, respectively) compared to samples without contaminants (40.8%). In post thawed semen, only blood contaminated semen (71.2 s) was lower than the control treatment (140.8 s). Treatments contaminated with urine or feces (94.0 and 102.5 s, respectively) did not differ ( $P > 0.05$ ) among themselves or with respect to other treatments. For the membrane integrity analysis, values of 72.4, 77.0 and 68.0% obtained in semen contaminated with blood, urine and feces, respectively, were lower ( $P < 0.05$ ) than the control whose average was 91.5%. Treatment contaminated with urine was lower ( $P < 0.05$ ) than the control treatment for DNA integrity (82.8 and 93.4%, respectively) and mitochondria functionality (87.1% and 94.9%, respectively). Therefore, most parameters of semen quality were impaired by the inclusion of contaminants tested (feces, urine or blood) at a concentration of 10%.

**Key words:** cryopreservation, seminal contamination, sperm quality, fish breed.

## 1. INTRODUÇÃO

A criopreservação é uma técnica importante no controle reprodutivo de muitas espécies e sua aplicação em peixes está em amplo desenvolvimento (MURGAS, 2007). Esta biotécnica pode ser aplicada em diferentes campos de pesquisa e produção (CABRITA *et al.*, 2001) e por ser muito valiosa para a preservação de material genético, pode ser utilizada tanto em programas de melhoramento genético de espécies de interesse econômico, bem como em programas de preservação de populações nativas (CARNEIRO, 2007). Desse modo, assegurar que sejam implantados programas de manutenção de banco de germoplasma, é fundamental em função da constante degradação do ambiente natural em que vive esta espécie (MARIA *et al.*, 2011a)

Um banco de germoplasma pode ser uma excelente alternativa para espécies como o tambaqui (*Colossoma macropomum*). Atualmente é a espécie nativa mais produzida no país, ficando atrás apenas de carpas e tilápia, muito embora seja originário da bacia amazônica, nativo dos rios Solimões, Madeira e Orenoco e seus afluentes (VIEIRA, 2010) O potencial zootécnico da espécie contribui fortemente para a necessidade de manter bancos genéticos desta espécie que possam ser utilizados no desenvolvimento do seu programa de melhoramento genético, por exemplo.

Os parâmetros quali-quantitativos como a concentração de espermatozóides e a motilidade espermática têm sido utilizados como critérios de avaliação da qualidade do sêmen e considerados bons indicadores da capacidade fertilizante (VIEIRA, 2010). Recentemente, foram utilizados com *C. macropomum* (Varela Jr. *et al.*, 2012) novos indicadores de qualidade espermática para peixes: integridade espermática, viabilidade espermática, integridade do DNA espermático e funcionalidade mitocondrial.

Muito embora tenha ocorrido substancial evolução nos protocolos de criopreservação das espécies nativas desde o extenso estudo realizado por Carolsfeld *et al.* (2003) em Characidae, a contaminação do sêmen no momento da coleta é uma ocorrência comum. Essa possível contaminação está relacionada à falta de padronização na técnica de coleta, especialmente em função da compressão abdominal. Neste momento pode haver eliminação de urina, sangue ou fezes, juntamente com o sêmen, que, em maior ou menor grau, afetam a qualidade seminal e podem inviabilizar a utilização do material coletado.

Na maioria das espécies de peixes de água doce a fecundação ocorre no meio externo e, deste modo, os espermatozoides estão imóveis no trato genital e plasma seminal e tornam-se móveis após a liberação para o meio externo hiposmótico. A urina, por exemplo, em geral está em baixa osmolaridade, contribuindo para a ativação espermática. Parece que a baixa osmolaridade da urina é responsável por uma ativação precoce dos espermatozoides no trato urinário, o que induz uma redução inicial do armazenamento de ATP intracelular (POUPARD *et al.*, 1998). A redução da motilidade espermática foi observada em *O. mykiss* (NYNCA *et al.*, 2012), pregado (*Psetta máxima*) (DREANNO *et al.*, 1998) e em carpa (*Cyprinus carpio*) (POUPARD *et al.*, 1998). Segundo Poupard *et al.* (1998), a contaminação do sêmen com urina, durante a coleta, pode ser evitada por uma

leve compressão do abdômen antes de iniciar o procedimento e, em seguida, introdução de um cateter na bexiga urinária para recolher a urina remanescente.

A presença de células sanguíneas no sêmen pode estar relacionada com diferentes eventos, fisiológicos ou patológicos, no trato reprodutivo, sendo na maioria das vezes necessário o descarte do sêmen. De todo modo, a contaminação seminal com pequena quantidade de sangue parece não alterar significativamente a qualidade do sêmen (CIERESZKO *et al.*, 2004). Já a adição de 2% ou mais de sangue em um ejaculado influenciou negativamente os parâmetros quali-quantitativos do sêmen de cães descongelado (RIJSSELAERE *et al.*, 2004). Por outro lado, a contaminação do sêmen com fezes deve ser evitada para prevenir um significativo decréscimo no período de armazenamento e tempo de duração de motilidade, do sêmen refrigerado (SATTERFIELD & FLICKINGER, 1995).

O objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade do sêmen do *C. macropomum*, fresco e congelado, contaminado por urina, sangue ou fezes.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Obtenção do sêmen

Treze machos de *C. macropomum* ( $6,48 \pm 2,82$  kg) foram selecionados aleatoriamente e, em seguida, induzidos com dose única de 2,5 mg/kg de extrato de hipófise de carpa diluída em 0,5 mL de solução salina estéril (0,9% NaCl). Doze horas após a indução hormonal o sêmen foi coletado.

### 2.1. Coleta de amostras e delineamento experimental

A partir da compressão abdominal no sentido craniocaudal, com a papila urogenital previamente seca, o sêmen foi coletado em copos coletores descartáveis (individuais). O processo foi extremamente cuidadoso, a fim de evitar qualquer contaminação prévia do sêmen. Imediatamente após a coleta, o sêmen de cada animal foi dividido em quatro alíquotas de 250  $\mu$ L e quatro grupos foram constituídos: Controle, apenas sêmen (a); urina (b); sangue (c) e fezes (d) diluídos em 25  $\mu$ L.

Os contaminantes seguiram um padrão de obtenção. O sangue foi colhido através da punção do vaso caudal dos reprodutores com seringa descartável introduzida em direção à região ventral da coluna vertebral, local onde se localizam a artéria e a veia caudal e, imediatamente acrescido ao sêmen. A urina foi obtida por compressão abdominal dos reprodutores, um pouco antes da liberação do sêmen, sendo coletada na papila urogenital com o auxílio de copos coletores descartáveis (POUPARD *et al.*, 1998). As fezes foram obtidas por dissecação intestinal (ABIMORAD & CARNEIRO, 2004) de três alevinos de *C. macropomum* eutanasiados por secção da medula espinhal na região cervical. As fezes foram diluídas em BTS (Beltsville Thawing Solution - Minitube - Alemanha) na proporção de 5:1 (fezes:BTS) e, em seguida, homogeneizado com o sêmen. O BTS é diluidor para sêmen de suínos contendo 79,9% de glicose, 12,7% de citrato de sódio, 2,7% de EDTA, 2,7% de NaHCO<sub>3</sub>, 1,6% de KCl, e 0,4% de sulfato de gentamicina.

As amostras permaneceram em temperatura ambiente por 10 minutos, sendo analisadas e congeladas após esse período. Cada amostra foi analisada antes e após o congelamento.

Para os procedimentos de indução hormonal, coleta do sêmen e obtenção das amostras de sangue, urina e fezes, todos os animais foram previamente anestesiados com uma diluição de 65 mg/L de eugenol, sendo considerados anestesiados ao atingirem o quarto estágio anestésico (perda do tônus muscular, imobilidade e redução dos movimentos operculares) (TREVES-BROWN, 2000).

### 2.2. Análise do sêmen fresco

Para a avaliação da motilidade e o tempo da motilidade espermática, uma alíquota de 2  $\mu$ L de cada amostra fresco foi diluída com 20  $\mu$ L de água destilada e colocada entre lâmina e lamínula para observação em microscópio óptico (40x). Assim, para a motilidade progressiva foram atribuídos valores de 0 a 100% para o percentual de espermatozoides móveis no campo óptico. Para o

tempo de duração de motilidade, no momento da diluição, um cronômetro foi acionado e a contagem foi interrompida quando cessaram todos os movimentos espermáticos no campo óptico.

### **2.3. Congelamento e descongelamento**

As amostras foram diluídas na proporção de 1:3 (sêmen:diluyente) em um meio composto por 92% de BTS e 8% de dimetilformamida (DMF) e envasadas em palhetas de 250  $\mu$ L (VARELA JR. *et al.*, 2012). Em seguida, as amostras foram congeladas por 12 horas em um “dry-shipper”, e então armazenadas em nitrogênio líquido (-196 °C) durante 15 dias. Para descongelamento, as palhetas foram submergidas em banho-maria (38°C) por 8 segundos e, em seguida, foi analisada a qualidade seminal.

### **2.4. Análise do sêmen congelado**

Além da análise da motilidade espermática, foram analisadas integridade de membrana e do DNA e a funcionalidade de mitocôndria. Amostras de duas palhetas de cada tratamento de cada macho foram descongeladas, diluídas novamente em 400  $\mu$ L de BTS (1:3) a 22 °C. Foram contados 200 espermatozoides de cada amostra e avaliados em microscópio de epifluorescência em um aumento de 400 X (Olympus BX 51, América INC, São Paulo - Brasil). Para a avaliação da integridade de membrana, uma amostra de 10 $\mu$ L de sêmen foi diluída em 40 $\mu$ L de solução salina isotônica, contendo 1,7 mM de formaldeído, 20 M de diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e 7,3  $\mu$ M de propídio iodeto (IP). Os espermatozoides que possuíam fluorescência verde foram considerados como possuindo a membrana íntegra, pois a sua membrana não permitiu que o diacetato de carboxifluoresceína saísse do citoplasma. Já os espermatozoides que possuíam fluorescência com coloração vermelha ou vermelha e verde na cabeça foram classificados como não possuindo a membrana íntegra (HARRISON & VICKERS, 1990). A porcentagem de viabilidade dos espermatozoides foi determinada pela proporção dos que emitiram fluorescência verde em comparação com o número total de espermatozoides (emissores de fluorescência verde, vermelho ou vermelho e verde).

A integridade do DNA foi avaliada após colocar uma amostra de 45  $\mu$ L de sêmen em 50  $\mu$ L de TNE (0,01 M Tris-HCl; 0,15 M NaCl; 0,001 M EDTA, pH 7,2). Depois de 30 segundos, 200 $\mu$ L de solução Triton 1X foi adicionado e, 30 segundos depois, 50 $\mu$ L de laranja de acridina (2 mg / mL em água deionizada). Após cinco minutos, foram contados 200 espermatozoides; aqueles com fluorescência verde foram considerados com o DNA íntegro, enquanto aqueles com fluorescência vermelha ou laranja foram considerados com o DNA não íntegro (BENCHARIF *et al.*, 2010). A taxa de integridade do DNA foi determinada pela proporção de espermatozoides emissores de fluorescência verde comparado ao número total de espermatozoides (fluorescência verde, vermelha ou laranja).

A funcionalidade mitocondrial foi avaliada após a incubação de uma amostra de 10  $\mu$ L de sêmen com 40  $\mu$ L de solução de rodamina 123 (13 $\mu$ M), a 20°C durante 10 minutos. Espermatozoides com coloração rodamina

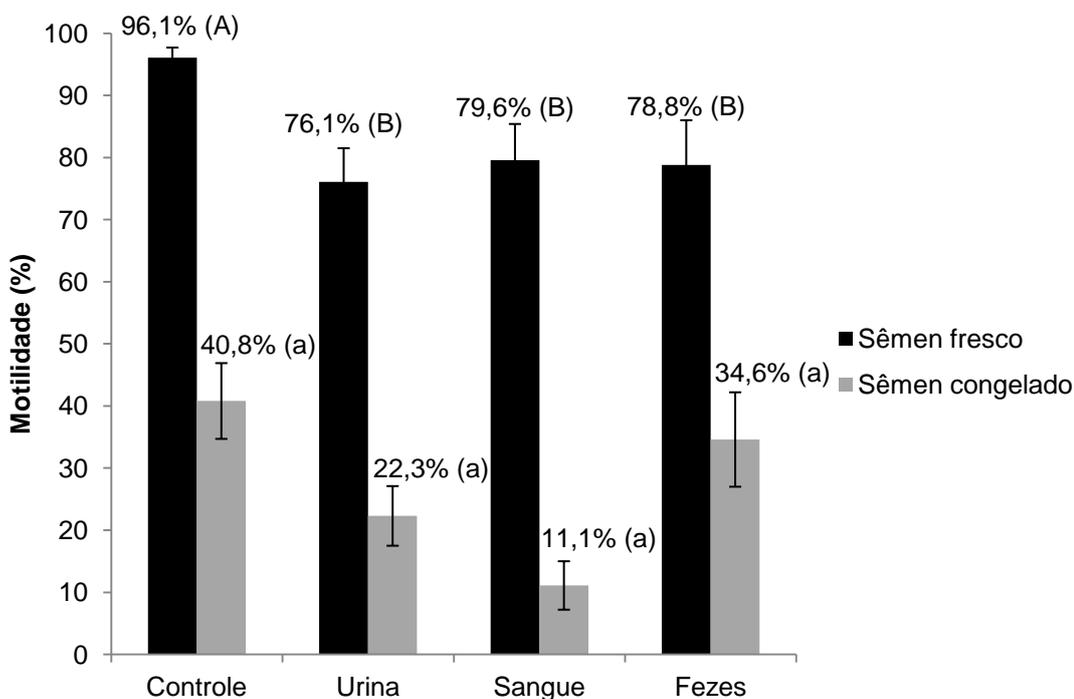
positivo (fluorescência verde) foram considerados com mitocôndrias funcionais. Já as mitocôndrias não funcionais caracterizaram-se por coloração negativa com rhodamina, isto é, sem fluorescência (HE & WOODS, 2004). A taxa de funcionalidade mitocondrial foi determinada pela proporção de espermatozoides emissores de fluorescência verde em comparação ao total de espermatozoides (verde ou ausência de fluorescência).

### **2.3. Análise estatística**

O desenho experimental considerou as amostras controle, 10% com urina, sangue e fezes como as variáveis independentes e os parâmetros qualitativos seminais como as dependentes. Cada um dos reprodutores foi considerado uma unidade experimental. A normalidade das variáveis (motilidade, integridade de membrana, integridade de DNA e funcionalidade mitocondrial) foi testada pelo teste de Shapiro-Wilk. Por não possuírem distribuição normal, foram submetidas à análise de variância não paramétrica e os tratamentos foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis. Todas as análises foram realizadas com Statistix 9, Analítica Software (Tallahassee, FL, EUA).

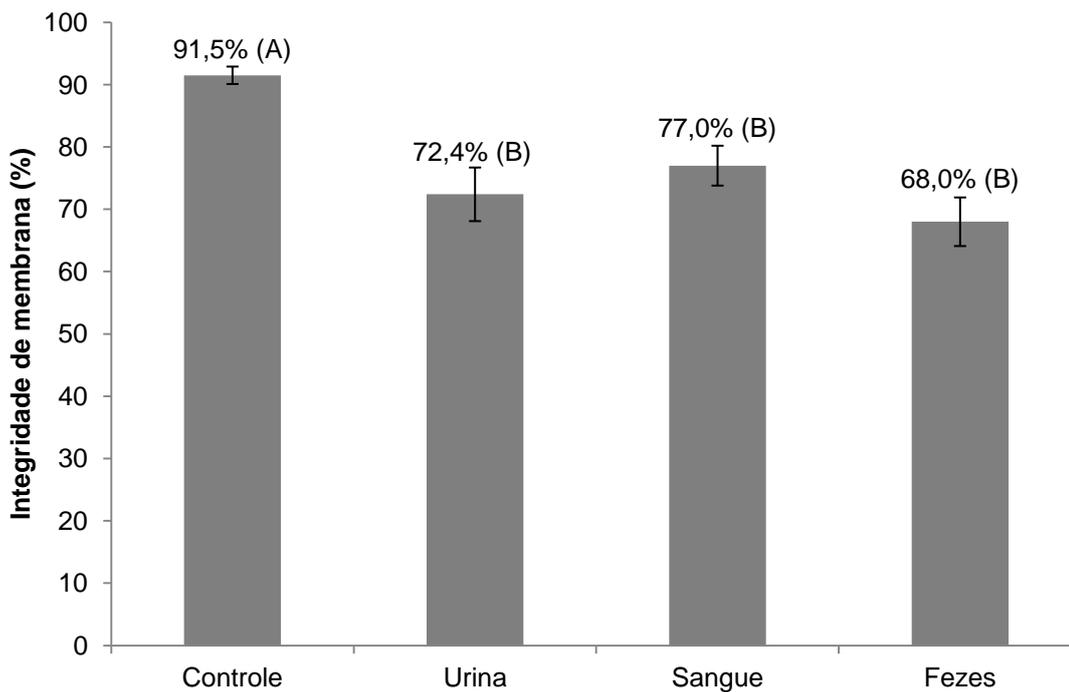
### 3. RESULTADOS

A motilidade espermática observada no sêmen fresco foi superior ( $P < 0,05$ ) no controle em relação às amostras contaminadas com urina, sangue ou fezes. Por outro lado, não ocorreu diferença no sêmen congelado ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos e o controle (FIGURA 1).



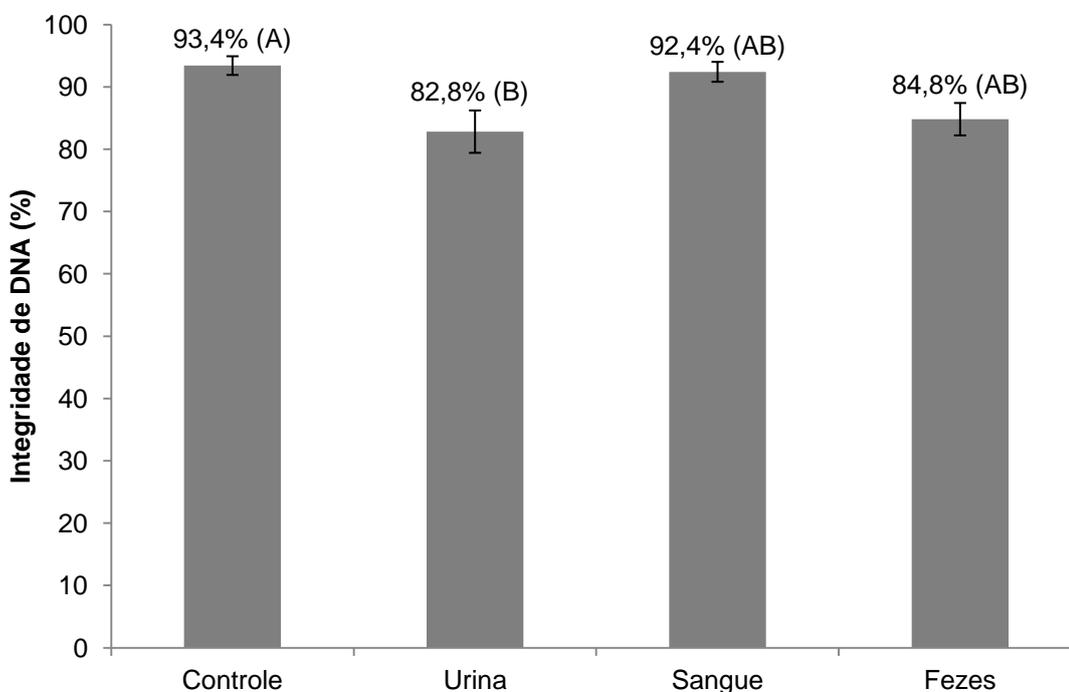
**FIGURA 1.** Taxa de motilidade (média e desvio padrão) do sêmen fresco e do sêmen congelado, de *C. macropomum*, submetido a quatro tratamentos (controle, contaminado com urina, sangue ou fezes). \*Valores com diferença estatística ( $P < 0,05$ ) estão representados por diferentes letras (sêmen fresco – A ou B). Comparação entre médias pelo teste de Kruskal-Wallis.

Quanto à integridade da membrana dos espermatozoides, foi verificado um menor percentual ( $P < 0,05$ ) em relação ao controle, independentemente da origem do contaminante (FIGURA 2). A contaminação das amostras de sêmen com urina resultou em um menor percentual ( $P < 0,05$ ) de espermatozoides com DNA íntegro e com mitocôndrias funcionais, no sêmen congelado, do que as amostras controle (FIGURAS 3 e 4).



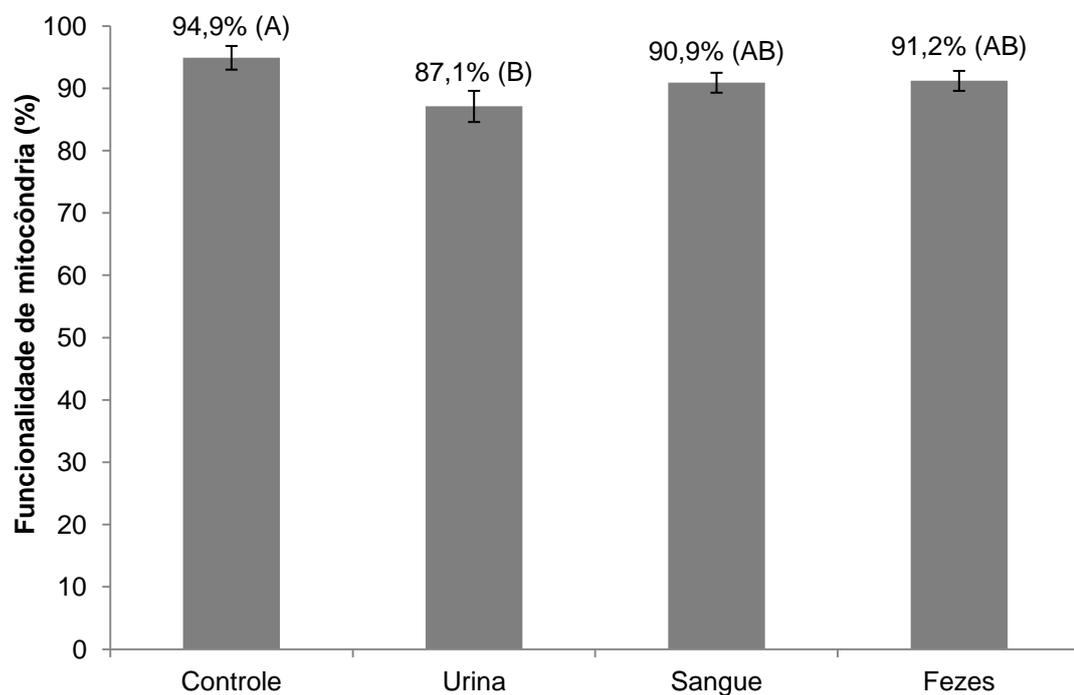
**FIGURA 2.** Integridade de membrana (média e desvio padrão) do sêmen congelado, de *C. macropomum*, submetido a quatro tratamentos (controle, contaminado com urina, sangue ou fezes). Avaliação pelo método de coloração com diacetato de carboxifluoresceína e iodeto de propídio e visualização em microscópio de epifluorescência (400X).

\* Valores com diferença estatística ( $P < 0,05$ ) estão representados por diferentes letras (A ou B). Comparação entre médias pelo teste de Kruskal-Wallis.



**FIGURA 3.** Integridade de DNA (média e desvio padrão) do sêmen congelado, de *C. macropomum*, submetido a quatro tratamentos (controle, contaminado com urina, sangue ou fezes). Avaliação pelo método de coloração com laranja de acridina e visualização em microscópio de epifluorescência (400X).

\*Valores com diferença estatística ( $P < 0,05$ ) estão representados por diferentes letras (A ou B). Comparação entre médias pelo teste de Kruskal-Wallis.



**FIGURA 4.** Funcionalidade de mitocôndria (média e desvio padrão) do sêmen congelado, de *C. macropomum*, submetido a quatro tratamentos (controle, contaminado com urina, sangue ou fezes). Avaliação pelo método de coloração com rhodamina 123 e visualização em microscópio de epifluorescência (400X).

\*Valores com diferença estatística ( $P < 0,05$ ) estão representados por diferentes letras (A ou B). Comparação entre médias pelo teste de Kruskal-Wallis.

#### 4. DISCUSSÃO

Sistematicamente, tem sido verificada, em atividades práticas de criopreservação do sêmen, a contaminação com urina, fezes ou sangue nas rotinas com espécies nativas. Neste estudo, foi observada sensível perda de qualidade seminal do *C. macropomum*, a partir da exposição aos contaminantes, independentemente de sua origem (sangue, urina ou fezes), no sêmen fresco.

Uma hipótese factível para explicar o efeito da urina, foi sugerida por Poupard *et al.* (1998) que relacionam a sua baixa osmolaridade com uma ativação precoce dos espermatozoides no trato urinário, o que induz uma redução inicial do armazenamento de ATP intracelular. Para Billard *et al.* (1995) a motilidade depende das reservas de ATP endógeno, e cessa quando 50-80% deste ATP é consumido por hidrólise. Este fato foi observado por Dreanno *et al.* (1998) no sêmen de *P. maxima*, com a redução do ATP intracelular, o que pode ter sido causado por uma disfunção celular ou por um bloqueio na síntese de ATP. A ativação espontânea dos espermatozoides de tenca (*Tinca tinca*), no sêmen contaminado com urina, foi de até 100% (LINHART *et al.*, 2003). A contaminação do sêmen de trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) a partir de 0 a 30% de urina, levou à redução da osmolaridade do plasma seminal, de 301 para 203 mOsm/kg, respectivamente (NYNCA *et al.*, 2012). De todo modo, os fatores que interferem na motilidade são diversos: pH (DREANNO *et al.*, 1998), concentração de íons ( $K^+$ ,  $Na^+$ , e  $Ca^{2+}$ ), temperatura e diluição (ALAVI & COSSON, 2005).

O sangue como contaminante do sêmen fresco não tem sido caracterizado como determinante para a perda da motilidade. Por outro lado, quando o sangue permanece em contato maior com o sêmen (criopreservado ou resfriado), há maior probabilidade de perda de qualidade. No presente estudo foi possível observar no sêmen pós-criopreservação contaminado com sangue, aproximadamente metade (1,97 vezes menor) do tempo da motilidade em relação ao controle. A redução da motilidade espermática não foi observada por Ciereszko *et al.* (2004), no sêmen de *O. mykiss* contaminado com 0,02% de sangue, após 5 dias de refrigeração.

A redução da motilidade após o descongelamento do sêmen contaminado com sangue, talvez esteja relacionada com a presença de células vermelhas do sangue (RIJSSELAERE *et al.*, 2004). Após a dissociação do grupo heme da meta-hemoglobina, o heme pode catalisar a oxidação de lipoproteínas presentes na membrana celular. Assim, acredita-se que os produtos das reações entre o heme, o ferro liberado após a hemólise da hemoglobina e a lipoproteína são citotóxicos e poderiam causar dano endotelial (JENEY *et al.*, 2002), ampliando a toxicidade das espécies reativas de oxigênio (ROS) após a criopreservação (RIJSSELAERE *et al.*, 2004). Da mesma forma que todas as células vivas em condições aeróbicas, os espermatozoides produzem ROS como um resultado da atividade metabólica normal (LAMIRANDE *et al.*, 1997). A reação de ROS com os ácidos graxos poliinsaturados, presentes nas membranas celulares e nas lipoproteínas, inicia um processo em cadeia conhecido como peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LIMA & ABDALLA, 2001). Os espermatozoides são

particularmente susceptíveis a danos peroxidativos por possuírem, em suas membranas, grandes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados (ALVAREZ & STOREY, 1995).

A redução da motilidade na presença de 10% de fezes somente no sêmen fresco é, possivelmente, explicada pela inibição do crescimento bacteriano pelo antimicrobiano (gentamicina) presente no diluidor usado no sêmen criopreservado. A gentamicina, mesmo em baixa concentração (0,01 mg/mL), inibiu o crescimento bacteriano no sêmen refrigerado (4-6 °C), por 4 dias, de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). Em uma concentração igual ou superior a 0,1 mg/mL, o crescimento bacteriano no sêmen refrigerado foi inibido por um período de 8 dias (VIVEIROS *et al.*, 2010). Porém, não existem estudos sobre o efeito da gentamicina no sêmen congelado de peixes. Fezes podem ser consideradas contaminantes severas para o sêmen fresco ou mesmo refrigerado. Por exemplo, Satterfield & Flickinger (1995) observaram redução de 9,1 vezes do tempo de motilidade de sêmen de *S. vitreum* refrigerado (3-4°C) e contaminado com 10% de fezes. O efeito deletério das fezes sobre o sêmen também foi observado em outras espécies, como, por exemplo, espermatozoides de galos (BOONE & HUGHES, 1970). A explicação para tal fato, segundo os autores, está relacionada a altas quantidades de micro-organismos saprófitos, presentes nas fezes desta espécie, tais como coliformes, enterobacteriaceae, e Enterococos que podem competir com os espermatozoides pelos nutrientes presentes no plasma seminal ou nos diluidores, ou ambos, reduzindo a qualidade do sêmen e, conseqüentemente, a taxa de fertilidade.

A significativa redução dos percentuais de espermatozoides com a membrana íntegra nas amostras contaminadas com urina, sangue ou fezes (72,4; 77,0 e 68,0%) em relação às amostras sem contaminante (91,5%), possibilita fazer uma inferência quanto à qualidade seminal do *C. macropomum*, especialmente em relação à motilidade. A partir do momento que um espermatozide está estruturalmente danificado, a sua motilidade poderá estar alterada. No presente estudo, somente a contaminação com sangue diminuiu o tempo de motilidade no sêmen criopreservado. HONEYFIELD & KRISSE (2000) afirmam que a motilidade do sêmen de peixes é um dos parâmetros fundamentais se não o principal indicador qualitativo do sêmen. A integridade da membrana, de acordo com Gatti *et al.* (1990), pode ter um efeito negativo no desencadeamento e na duração da motilidade espermática, levando à perda da capacidade de despolarização da membrana em função da perda de íons. Os resultados do presente estudo indicam que a perda de integridade de membrana pode ter contribuído para a redução de motilidade, mas não foi o único fator, pois, mesmo com um elevado percentual de espermatozoides com a membrana íntegra ( $\geq 68\%$ ), a motilidade foi de aproximadamente 40% no controle e de 10-35% nas amostras contaminadas.

A urina foi o contaminante que mais produziu alterações, seja na integridade das mitocôndrias ou no DNA. Assegurar a fonte geradora de energia para o deslocamento do espermatozoide, assim como o tempo que o mesmo terá para mover-se, é fundamental para a fecundação do oócito. Quando ocorre o processo de descongelamento dos espermatozoides, a redução da qualidade espermática pós-descongelamento pode ser devida ao

aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, com a formação de peróxidos lipídicos e aldeídos citotóxicos (AITKEN, 1995), causando mudanças na integridade e fluidez da membrana, enfraquecimento das interações lipídio-proteína e alterações do DNA e proteínas (HALLIWELL & CHIROCO, 1993). Sabe-se, ainda, que a redução de mitocôndrias funcionais pode levar a uma queda do ATP intracelular, que só é produzido quando a mitocôndria está intacta. Os baixos níveis de ATP podem, então, causar um mau funcionamento das bombas iônicas e uma desestabilização da membrana plasmática (BAULNY *et al.*, 1997).

## 5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo indicam que a qualidade do sêmen de *C. macropomum* é prejudicada com a inclusão dos contaminantes testados (fezes, urina ou sangue), em concentração de 10%, para a maioria dos parâmetros avaliados, quando em contato por 10 minutos. Apesar de não comprometer a utilização do sêmen fresco, o uso de sêmen contaminado não é indicado para a criopreservação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIMORAD, E. G.; CARNEIRO, D. J. Métodos de coleta de fezes e determinação dos coeficientes de digestibilidade da fração protéica e da energia de alimentos para o pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.33, n.5, p.1101-1109, 2004.
- ALAVI, S. M. H.; COSSON, J. Sperm motility in fishes. I. Effects of temperature and pH: a review. **Cell Biology International**, London, v. 29, p. 101–110, 2005.
- ALVAREZ, J. G.; STOREY, B. T. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 42, p. 334–346, 1995.
- AITKEN R.J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction, Fertility and Development**, East Melbourne, v. 7, p. 659–668, 1995.
- BAULNY B. O. *et al.* Flow cytometric evaluation of mitochondrial activity and membrane integrity in fresh and cryopreserved rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. **Cryobiology**, San Diego, v. 34, p. 141–149, 1997.
- BENCHARIF, D. *et al.* The advantages of combining low-density lipoproteins with glutamine for cryopreservation of canine semen. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 45, p. 189 –200, 2010.
- BILLARD, R. *et al.* Biology of sperm and artificial reproduction in carp. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 129, p. 95– 112, 1995.
- BOONE, M. A.,; HUGHES, B. L. Contamination of semen and its effect on avian fertility. **Poultry Science Association**, Menasha, v.49:p.402–404, 1970.
- CABRITA, E. *et al.* Cryopreservation of rainbow trout sperm in large volume straws: application to large scale fertilisation. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 201, p. 301–314, 2001.
- CAROLSFELD, J. *et al.* J. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. **Journal of Fish Biology**, London, v. 63, p.472–489, 2003.
- CARNEIRO, P. C. F. Tecnologias de produção e armazenamento de sêmen de peixes. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.31, n.3, p.361-366, jul./set. 2007.
- CIERESZKO, A. *et al.* Blood cells in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* semen: relation to semen collection method and sampling period. **Theriogenology**, Stoneham, v. 62, p. 1353–1364, 2004.

DIEMER, T., et al. Influence of *Escherichia coli* on motility parameters of human spermatozoa in vitro. **Int. J. Androl.**, v. 19, p. 271–277, 1996.

DREANNO, C. *et al.* Effect of urine on semen quality in pregado (*Psetta maxima*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 169, p. 247–262, 1998.

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

GRIGGERS, S. *et al.* The effects of pH, osmolarity and urine contamination on equine spermatozoal motility. **Theriogenology**, Stoneham. v.56, p.613-622, 2001.

HALLIWELL B.; CHIROCO S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 57, p.715–725, 1993.

HARRISON, R. A. P.; VICKERS, S. E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, Philadelphia, v. 88, p. 343–352, 1990.

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

HONEYFIELD, D.C.; KRISSE, W.F. Measurement of milt quality and factors affecting viability. In: TIERSCH, T.R. e MAZIK, P.M. Cryopreservation in aquatic species. Baton Rouge: **Journal of World Aquaculture Society**, Baton Rouge, p.49-58, 2000.

ISHIKAWA, M. M. *et al.* **Procedimentos Básicos para Colheita de Sangue em Peixes**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2010. 8 p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Circular técnica, 17).

JENEY, V. *et al.* Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme. **Journal of the American Society of Hematology**, New York, v. 100, p. 879-887, 2002.

KURPISZ, M., ALEXANDER, N.J. Carbohydrate moieties on sperm surface: physiological relevance. **Fertil. Steril.**, v. 63, p. 158–165, 1995.

LAMIRANDE, E. *et al.* Reactive oxygen species and sperm physiology. **Reviews of Reproduction**, Cambridge, v. 2, p. 48-54, 1997.

LIMA, E.S., ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 37, p. 293-303, 2001.

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

MARIA, A. N.; AZEVEDO, H. C.; SANTOS, J. P. Hormonal induction and semen characteristics of tambaqui *Colossoma macropomum*. **Zygote**, Cambridge, p.1-5, 2011b.

MURGAS, L. *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.

NYNCA, J. *et al.* Motility activation of rainbow trout spermatozoa at pH 6.5 is directly related to contamination of milt with urine. **Aquaculture**, Amsterdam v. 300-333, p. 185-188, 2012.

POUPARD, G. P. *et al.* Initiation of carp spermatozoa motility and early ATP reduction after semen contamination by urine. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 160, p. 317–328, 1998.

RIJSSELAERE, T. *et al.* Effect of blood admixture on in vitro survival of chilled and frozen–thawed canine spermatozoa. **Theriogenology**, Stoneham, v.61, p.1589–1602, 2004.

ROUBACH, R. *et al.* Eugenol as an efficacious anaesthetic for tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier). **Aquaculture Research**, Oxford, v. 36, p. 1056-1061, 2005.

SADRZADEH, S.M.H., EATON, J.W. Hemoglobin-mediated oxidant damage to the central nervous system requires endogenous ascorbate. **The Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 82, p. 1510-1515, 1988.

SATTERFIELD JR, J.R.; FLICKINGER, S. A. Factors influencing storage potential of preserved walleye semen. **The Progressive Fish-Culturist**, Bethesda, v. 57, p. 175-181. 1995.

TREVES-BROWN, K.M. Aquaculture Series 3: Applied Fish Pharmacology. In:\_\_\_\_. **Anaesthetics**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. Cap. 16, p. 206-219.

VARELA JR., A. S.; CORCINI, C. D.; GHELLER, S. M. M.; JARDIM, R. D.; LUCIA JR., T.; STREIT JR., D. P.; FIGUEIREDO, M. R. C. Use of amides as

cryoprotectants in extenders for frozen sperm of tambaqui, *Colossoma macropomum*. **Theriogenology**, Stoneham, v. 78, p. 244–251, 2012.

VIEIRA, M. J. da A. F. **Caracterização do sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*) (CURVIER, 1818) e criopreservação em diluentes a base de água de coco em pó (ACP-104)**. 2010. 114 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2010.

## **CAPÍTULO 3**

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O sêmen criopreservado de espécies nativas tem sido extensamente estudado, a fim de ser utilizado seja como banco de germoplasma para reconstrução de uma população ou em produção zootécnica. De todo modo, a preocupação com contaminantes é relevada a um aspecto secundário fresco. Há poucos estudos sobre a contaminação do sêmen quando o mesmo é utilizado fresco e, também, quando criopreservado. Conforme os resultados obtidos no experimento realizado, não é sugerido utilizar sêmen de *C. macropomum* contaminado com 10% de urina, sangue ou fezes, pois a qualidade seminal foi prejudicada.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, D. R.; YASUI, G. S. O manejo da reprodução natural e artificial e sua importância na produção de peixes no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.27, n.2, p.166-172, 2003.
- BILLARD, R. *et al.* Biology of sperm and artificial reproduction in carp. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 129, p. 95– 112, 1995.
- BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. Brasília, 2011. **Espécies Cultivadas**. Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br/index.php/aquiculturampa/informacoes/especies-cultivadas>> Acesso em: 19/07/2012.
- BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. Brasília, 2012. **Boletim da Pesca e Aquicultura Brasil 2010**. 128 p.
- BOONE, M. A.,; HUGHES, B. L. Contamination of semen and its effect on avian fertility. **Poultry Science Association**, Menasha, v.49:p.402–404, 1970.
- CABRITA, E. *et al.* Cryopreservation of rainbow trout sperm in large volume straws: application to large scale fertilisation. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 201, p. 301–314, 2001.
- CAFFEY, R.H.; TIERSCH, T.R. Cost analysis for integrating cryopreservation into an existing fish hatchery. **Journal of World Aquaculture Society**, Baton Rouge, v.331, p. 51– 58, 2000.
- CARNEIRO, P. C. F. Tecnologias de produção e armazenamento de sêmen de peixes. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.31, n.3, p.361-366, jul./set. 2007.
- CIERESZKO, A. *et al.* Blood cells in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* semen: relation to semen collection method and sampling period. **Theriogenology**, Stoneham, v. 62, p. 1353–1364, 2004.
- DREANNO, C. *et al.* Effect of urine on semen quality in pregado (*Psetta maxima*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 169, p. 247–262, 1998.
- IHERING, R. V.; WRIGHT, S. Fisheries investigations in northeast Brazil. **Transactions of the American Fisheries Society**, Bethesda, v.65,p. 267-271, 1935.
- LINHART, O *et al.* Urinary bladder, ionic composition of seminal fluid and urine with characterization of sperm motility in tench (*Tinca tinca L.*). **Journal of Applied Ichthyology**, Berlin, v. 19, p. 177–181, 2003.

LINHART, O. *et al.* Effects of osmolarity and ions on the motility of stripped and testicular sperm of freshwater- and seawater-acclimated tilapia, *Oreochromis mossambicus*. **Journal of Fish Biology**, London, v. 55, p. 1344–1358, 1999.

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

MARIA, A. N.; AZEVEDO, H. C.; SANTOS, J. P. Hormonal induction and semen characteristics of tambaqui *Colossoma macropomum*. **Zygote**, Cambridge, p.1-5, 2011b.

MURGAS, L. *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.

NINHAUS-SILVEIRA, A.; FORESTI, F.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R.; SENHORINI, J. A. Seminal Analysis, Cryogenic Preservation, and Fertility in Matrinxã Fish, *Brycon cephalus* (Günther, 1869) . **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 49, n. 4, p. 651-659. 2006.

NYNCA, J. *et al.* Motility activation of rainbow trout spermatozoa at pH 6.5 is directly related to contamination of milt with urine. **Aquaculture**, Amsterdam v. 300, n. 333, p. 185-188, 2012.

POUPARD, G. P. *et al.* Initiation of carp spermatozoa motility and early ATP reduction after semen contamination by urine. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 160, p. 317–328, 1998.

QUEIROZ J.F.; LOURENÇO, J. N. P.; KITAMURA, P. C. **A Embrapa e a Aqüicultura Demandas e Prioridades de Pesquisa**. Brasília: Embrapa informação tecnológica, 2002. 40p. (Embrapa Informação Tecnológica. Texto para Discussão, 11).

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 – SP. v. 25, p. 77-83, 1998/1999.

RIJSSELAERE, T. *et al.* Effect of blood admixture on in vitro survival of chilled and frozen–thawed canine spermatozoa. **Theriogenology**, Stoneham, v.61, p.1589–1602, 2004.

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

SATTERFIELD JR, J.R.; FLICKINGER, S. A. Factors influencing storage potential of preserved walleye semen. **The Progressive Fish-Culturist**, Bethesda, v. 57, p. 175-181. 1995.

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.

VIEIRA, Marcelo J. da A. F. **Caracterização do sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*) (CURVIER, 1818) e criopreservação em diluentes a base de água de coco em pó (ACP-104)**. 2010. 114 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2010.

VILLELA, L. C. V.; PAIVA, S. R.; FACÓ, O. **Conservação *in situ* de recursos genéticos animais no Brasil: espécies de pequeno porte**. Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos, 2009. 41 p. (Embrapa Caprinos e Ovinos. Série Documentos, 94).

ZANIBONI-FILHO, E.; NUÑER, A. P. O. Fisiologia da reprodução e propagação artificial em peixes. In: GYRINO, J. E. P. Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. **Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática**. Jaboticabal – São Paulo. 2004. Cap. 4, p. 45-71.

ZEMOR, J. C. **Anormalidades morfológicas no sêmen *in natura* e pós criopreservação de tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) (Characidae) em diferentes combinações de diluidores e crioprotetores**. 2011, 39p. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Ciências Biológicas). Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS. Imbé – Rio Grande do Sul, 2011.

## VITA

Luis Fernando Guerrero Gracia, filho de Themis Pereira de Abreu e Luis Guerrero Gracia, brasileiro, nascido em Pelotas-RS, em 31 de março de 1986. Concluiu o ensino médio na Escola Nossa Senhora da Glória em 2002. Em 2003 iniciou o curso de Engenharia Mecânica na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), o qual não finalizou. Em 2005, ingressou no curso de Medicina Veterinária, na UFRGS. Durante a graduação, foi bolsista (Pfizer) do Setor de Suínos da UFRGS de 2006 a 2009. Em 2010, iniciou estágio no Grupo de Pesquisa Conservação e Produção de Organismos Aquáticos -AQUAM, onde estagiou até a conclusão da graduação em julho de 2011. Em março de 2012 foi aprovado no processo seletivo do Programa de Pós-graduação em Zootecnia da UFRGS, onde iniciou o curso de mestrado, como bolsista da CAPES.