



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE AQUICULTURA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA**

**CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN DO DOURADO *Salminus  
brasiliensis* (Cuvier, 1816, CHARACIDAE)**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Aquicultura.

Orientador: Prof. Evoy Zaniboni Filho, Dr.

**Ana Carolina Volpato Zanandrea**

Florianópolis  
2013

Catálogo na fonte elaborada pela Biblioteca Universitária da  
Universidade Federal de Santa Catarina

Zanandrea, Ana Carolina Volpato  
CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN DO DOURADO *Salminus  
brasiliensis* (Cuvier, 1816, CHARACIDAE) [dissertação] /  
Ana Carolina Volpato Zanandrea ; orientador, Evoy  
Zaniboni Filho - Florianópolis, SC, 2013.  
56 p. ; 21cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-  
Graduação em Aquicultura.

Inclui referências

1. Aquicultura. 2. motilidade espermática . 3.  
fertilização. 4. solução crioprotetora. 5. ACP®. I. Zaniboni  
Filho, Evoy . II. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. III. Título.

**Criopreservação do sêmen do dourado *Salminus brasiliensis*  
(Cuvier, 1816, characidae)**

Por

ANA CAROLINA VOLPATO ZANANDREA

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

**MESTRE EM AQUICULTURA**

e aprovada em sua forma final pelo Programa de  
Pós-Graduação em Aqüicultura.

---

Prof. Alex Pires de Oliveira Nuñez, Dr.  
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

---

Dr. Evoy Zaniboni Filho – *Orientador*

---

Dr. Felipe do Nascimento Vieira

---

Dr. Hilton Amaral Júnior

---

Dr. Marcos Weingartner



## **AGRADECIMENTOS**

A meus pais, Elvira e Renato, por acreditarem nas minhas escolhas e me oferecerem todo o suporte necessário para atingir meus objetivos. Obrigada por sempre me incentivarem e proporcionarem oportunidades, tanto para o meu estudo quanto para o meu crescimento pessoal, e ainda serem sempre meu porto seguro! Amo vocês!

Ao Prof. Evoy Zaniboni Filho, pela orientação e pelas gratificantes conversas intercaladas com períodos de tensões e questionamentos, mas que com maestria, soube me acalmar e indicar o caminho a ser seguido, proporcionando descontraídas trocas de histórias dos mares: seja nadando ou velejando!

Ao Dr. Marcos Weingartner, pelo apoio incondicional desde a concepção à realização deste estudo, compartilhando suas experiências, ensinando-me e ajudando-me na condução dos experimentos. Que esta dissertação sirva de presente em retribuição à gratidão e carinho que tenho por você.

Ao Carlito Aloisio Klunk, por auxiliar nas questões burocráticas do programa de pós-graduação e ainda, responder às inúmeras dúvidas sobre assuntos acadêmicos.

Ao Maurício Machado, pela força e cuidado com os peixes durante o experimento, além de compartilhar seu sorriso e bom humor!

Às estagiárias Mariana Roza de Abreu e Taida Juliana Adorian pela ajuda na condução dos experimentos com muita delicadeza e paciência. Obrigada pelo tempo dedicado na preparação de cada passo e na contagem de muitos ovos!

À “galera do bloco B”, muito obrigada por me acompanharem durante os experimentos, com certeza foi mais tranquilo contar com a ajuda de vocês! Obrigada por compartilharem madrugadas no laboratório, pelo auxílio com o transporte dos peixes e com os ajustes das estruturas físicas do laboratório.

Aos colegas do LAPAD, por tornarem os dias mais alegres com boas risadas, dividindo angústias e conselhos, pelas distrações com

discussões sobre futebol e por dividirem bons momentos na cozinha e pelos corredores!

Aos colegas, professores e servidores do Programa de Pós-graduação em Aquicultura da UFSC, por contribuírem na minha formação.

Ao apoio financeiro da Capes, programa REUNI, CNPq, FAPESC e Tractebel Energia, pelas bolsas concedidas e recursos disponibilizados para a realização dos experimentos.

A meus familiares e amigos, pelas palavras de incentivo e por procurarem compreender minha ausência em alguns momentos. Em especial, ao Rodrigo Lobo, pelo apoio, cuidado e carinho na fase de escrever esta dissertação, sendo um aconchegante refúgio em meio aos “resultados e discussões”.

À querida amiga Miriam Gualdezi, por dividir sua casa, seu tempo e seu ombro comigo. Suas palavras e carinho me fizeram encarar os desafios de forma mais suave, ajudando-me a crescer e viver a vida com mais alegria!

Enfim, agradeço imensamente a todas as mãos que me ajudaram manipulando gametas e soluções durante o meu experimento, toda a família LAPAD e a todos que acompanharam e me auxiliaram a percorrer esta etapa do meu caminho!

*“Você vive com os talentos que têm e não com os talentos que lhe faltam.”*

“O guerreiro da luz nem sempre tem fé.  
Há momentos em que não crê em  
absolutamente nada. E pergunta ao seu  
coração: será que vale a pena tanto  
esforço? Mas o coração continua calado.  
E o guerreiro tem que decidir por si  
mesmo.”

(Paulo Coelho)





## RESUMO

O dourado *Salminus brasiliensis* é um peixe migrador que desperta interesse para piscicultura. Os procedimentos para a reprodução induzida são dominados, contudo, o uso de sêmen criopreservado continua apresentando uso restrito. Apesar da criopreservação ser eficiente para manter a motilidade espermática, as taxas de fertilização obtidas com sêmen criopreservado são inferiores às do sêmen fresco. Este trabalho visa contribuir para o conhecimento no uso de sêmen criopreservado na reprodução induzida do dourado. Os gametas foram obtidos da primeira geração de dourados provenientes do cruzamento de reprodutores selvagens. Foram realizados experimentos de descongelamento (ambiente x água), soluções ativadoras (água destilada, NaCl 0,45% ou NaHCO<sub>3</sub> 1%), motilidade espermática e fertilização com sêmen criopreservado de dourado comparando a solução crioprotetora ACP<sup>®</sup>-104 350 mOsm e metilglicol com a solução comumente utilizada para dourado, que consiste na mistura de dimetilsulfóxido, glicose, gema de ovo e água destilada. Para ambas as soluções foi avaliada a diluição do sêmen, sendo testadas diferentes proporções de sêmen:solução crioprotetora. O maior tempo de motilidade foi obtido com NaCl 0,45% e o descongelamento com água possibilitou maiores taxas de fertilização, sendo que a solução crioprotetora à base de glicose propiciou os melhores resultados. A motilidade e a taxa de fertilização do sêmen criopreservado com a solução à base de glicose não foram alteradas pela diluição sêmen:crioprotetor, porém, com o uso do ACP<sup>®</sup>-104 a motilidade espermática e a fertilização foram maiores com o aumento da diluição.

**Palavras Chaves:** crioconservação, motilidade espermática, fertilização, solução crioprotetora, ACP<sup>®</sup>



## ABSTRACT

The dourado, *Salminus brasiliensis*, is a migratory fish that arouses interest for aquaculture. The procedures for induced spawning are dominated; however, the use of cryopreserved semen is still restricted. Although cryopreservation is efficient to maintain sperm motility, fertilization rates obtained using cryopreserved semen are inferior than using fresh semen. The aim of this study is to contribute for the knowledge in the use of cryopreserved semen for the induced reproduction of dourado. The gametes were obtained from the first generation of dourados from the cross breeding of wild ones. Different experiments were conducted related to: thawing (room temperature x warm water); activating solutions (distilled water, 0.45% NaCl or 1% NaHCO<sub>3</sub>); sperm motility; and fertilization of cryopreserved semen comparing the cryoprotectant solution ACP<sup>®</sup>-104 350 mOsm and methylglycol with the standard cryoprotectant used to dourado, which consists of a mixture of dimethylsulfoxide, glucose, egg yolk and distilled water. For both solutions, it was evaluated different semen dilutions, being tested different ratios of semen:cryoprotectant solution. In general, motility was longest with 0.45% NaCl, the best fertilization rates were obtained by thawing in warm water and the standard cryoprotectant solution reach the best results. The motility and fertilization rate of cryopreserved semen with standard solution not changed by diluting semen in the cryoprotectant, however, with the use of ACP<sup>®</sup>-104 the sperm motility and the fertilization presented the highest values with the dilution increasing.

**KEYWORDS:** cryopreservation, sperm motility, fertilization, cryoprotectant solution, ACP<sup>®</sup>



## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo I

Figura 1. Tempo de motilidade (A) e vigor espermático (B) do sêmen criopreservado do *Salminus brasiliensis* em diferentes diluições nas soluções crioprotetoras padrão (CP) e ACP<sup>®</sup> (CA) expresso pelo valor médio obtido por distintos ativadores para uma determinada diluição considerando machos induzidos e não-induzidos ..... 30

### Capítulo II

Figura 1. Taxa de fertilização (%) usando sêmen criopreservado do *Salminus brasiliensis* em diferentes diluições utilizando duas soluções crioprotetoras: ACP<sup>®</sup>-104 350 mOs (CA) e a padrão para espécie (CP) ..... 44



## LISTA DE TABELAS

### Capítulo I

Tabela 1. Tempo de motilidade e vigor espermático do sêmen criopreservado do dourado *Salminus brasiliensis* proveniente de machos hormonalmente induzidos e não-induzidos..... 29

Tabela 2. Tempo de motilidade e vigor espermático do sêmen do dourado *Salminus brasiliensis* criopreservado com distintas soluções crioprotetoras e ativado com diferentes soluções ativadoras..... 31

### Capítulo II

Tabela 1. Taxa de fertilização (%) com duas formas de descongelamento utilizando sêmen criopreservado do dourado *Salminus brasiliensis* em diferentes diluições..... 43

Tabela 2. Taxa de fertilização (%) utilizando sêmen criopreservado do dourado *Salminus brasiliensis* em diferentes diluições nas soluções crioprotetoras ACP<sup>®</sup>-104 350 mOsm e padrão para espécie .. 44





## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	19
<b>Criopreservação</b> .....	21
<b>Crioprotetores</b> .....	22
<b>Água de Coco em Pó (ACP®)</b> .....	22
<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	24
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	24
Capítulo I - Uso de ACP®-104 em diferentes diluições para a criopreservação do sêmen do dourado <i>Salminus brasiliensis</i> .....	25
Resumo.....	25
Introdução .....	26
Materiais e Métodos .....	27
Seleção dos Machos e Obtenção do Sêmen .....	27
Comparação das Soluções Crioprotetoras em Diferentes Diluições .....	28
Descongelamento e Análise da Motilidade do Sêmen Criopreservado .....	28
Análise Estatística .....	29
Resultados .....	29
Discussão.....	31
Literatura Citada.....	33
Capítulo II - Uso do sêmen criopreservado na reprodução induzida do dourado <i>Salminus brasiliensis</i> .....	37
Resumo.....	37
<b>1. Introdução</b> .....	38
<b>2. Materiais e Métodos</b> .....	39
2.1 Seleção dos Reprodutores e Obtenção dos Gametas .....	39
2.2 Criopreservação.....	40
2.3 Experimento I – Descongelamento .....	41
2.4 Experimento II - Comparação das Soluções Crioprotetoras em Diferentes Diluições .....	42
2.5 Análise Estatística .....	42
<b>3. Resultados</b> .....	43
<b>4. Discussão</b> .....	45
<b>5. Conclusão</b> .....	47
<b>6. Referências</b> .....	48
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	52
<b>REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	53



## INTRODUÇÃO GERAL

O dourado *Salminus brasiliensis* é um peixe muito apreciado pelos pescadores esportivos e artesanais, é também um atrativo para estabelecimentos de pesque-pague e possui elevado preço de mercado em função da excelente qualidade de sua carne. As duas principais razões que têm despertado o interesse pela realização de estudos com o dourado são o seu potencial para piscicultura e a preocupação com a conservação da espécie, que se encontra com estoque reduzido ou ameaçado de extinção em várias bacias hidrográficas (WEINGARTNER E ZANIBONI FILHO, 2010).

A revisão feita por Lima e Britski (2007) incluiu uma nova espécie para o gênero *Salminus* no Brasil: o *S. franciscanus*, que apresenta distribuição restrita à bacia do rio São Francisco. Existem ainda o *S. hilarii*, que é originário das bacias do Alto Rio Paraná, São Francisco, Tocantins e Alto Amazonas; e o *S. brasiliensis* com ampla distribuição geográfica. Esta espécie é encontrada nas bacias dos rios Paraná, Paraguai, Uruguai, Alto rio Chaparé e Mamoré, ambos na Bolívia, e nas bacias ligadas ao sistema lagunar da Lagoa dos Patos (WEINGARTNER, 2010).

Dentre as espécies do gênero, *S. brasiliensis* é a que atinge o maior tamanho e possui maior número de trabalhos relacionados ao cultivo, sendo considerada por isso a que possui o maior potencial para a piscicultura (WEINGARTNER e ZANIBONI FILHO, 2010).

Esta espécie foi incluída pelo Ministério da Pesca e Aquicultura como uma das espécies prioritárias ao desenvolvimento de tecnologia de cultivo para a região Sul do Brasil, além disso, está na Lista Estadual de Espécies Ameaçadas de Extinção do Estado do Rio Grande do Sul. As agressões que os ambientes aquáticos vêm sofrendo afetam diretamente as populações de espécies nativas de peixes. O declínio dos estoques pesqueiros está ocorrendo por diversos motivos, dentre os quais, destacam-se: a sobrepesca, a poluição, o uso conflitante da água, a construção de barragens e reservatórios, o extrativismo, a introdução indiscriminada de espécies exóticas e as mudanças climáticas (CARNEIRO, 2007). No estado do Rio Grande do Sul, como *S. brasiliensis* está na lista das espécies ameaçadas de extinção, é proibida a sua pesca, inclusive na bacia do rio Uruguai. Desta forma, existe uma grande mobilização no sentido de garantir a preservação do dourado na região da bacia do rio Uruguai, sendo necessário gerar informações que promovam com segurança sua reprodução e cultivo.

A reprodução do dourado em cativeiro é dominada, seguindo o protocolo de indução hormonal para peixes migradores e as indicações feitas nos estudos específicos para a espécie possibilitaram atingir altas taxas de fertilização (WEINGARTNER e ZANIBONI FILHO, 2010). Weingartner (2010), estudando diversos aspectos da reprodução induzida de *S. brasiliensis*, verificou que a taxa de fertilização é afetada pela relação entre a quantidade de ovócitos, de sêmen e do volume da solução ativadora, recomendando a manutenção de uma razão 1:10 (ovócitos:água de ativação) e a adição de aproximadamente 5 mL de sêmen para cada quilo de ovócitos para obtenção da máxima taxa de fertilização.

Outra possibilidade para a fertilização induzida é a utilização de sêmen criopreservado, que permite a conservação de sêmen por longos períodos. Seu armazenamento é uma ferramenta que possui diferentes aplicabilidades: seja a conservação de recursos genéticos das espécies, seja na aquicultura. Bancos de gametas vêm sendo criados com o objetivo de proteger espécies ameaçadas de extinção e auxiliar nos programas relacionados com preservação da biodiversidade (KOPEIKA et al., 2007; PANIAGUA-CHÁVEZ, 2011).

Na aquicultura, a manutenção de amostras representativas de uma população em um banco de germoplasma, possibilita a redução do número de indivíduos machos no plantel de reprodutores *in vivo* e facilita os trabalhos de rotina dentro de um laboratório de reprodução induzida, pois disponibiliza prontamente o sêmen de vários machos para reproduções, favorecendo, inclusive, a concentração dos esforços de manejo somente com exemplares fêmeas (CARNEIRO, 2007).

No entanto, Tiersch et al. (2007), apontam algumas barreiras à maior aplicação de sêmen criopreservado para espécies aquáticas, dentre as quais se destaca: problemas técnicos, volumes pequenos de esperma, resultados variáveis, uma falta generalizada de acesso à tecnologia e, o mais importante, falta de padronização nas práticas e relatórios.

Alguns resultados satisfatórios de motilidade espermática na criopreservação do sêmen de peixes foram obtidos; porém, as taxas de fertilização esperadas com o uso de sêmen criopreservado para espécies brasileiras variam de 31 a 100% em relação às obtidas com sêmen fresco (Viveiros e Godinho, 2009). Para a espécie *S. brasiliensis*, o assunto foi tratado inicialmente por Coser et al. (1984), sendo retomado somente 19 anos depois por Carolsfeld et al. (2003), após seis anos por Viveiros et al. (2009) e recentemente por Weingartner (2010).

## **Criopreservação**

A criopreservação é uma ciência ou técnica que trata da conservação da vida em baixas temperaturas. A suspensão da atividade celular durante tempo indefinido e a possibilidade de proceder posteriormente sua reanimação, consiste numa ferramenta útil e importante para a ciência em geral e, em particular, para a biologia da reprodução (HERRÁEZ, 2009; SILVA e GUERRA, 2011).

A conservação de bancos de germoplasma é uma técnica ou ferramenta com diversas utilidades, tais como: conservação da biodiversidade, proteção de espécies em extinção, aplicação no manejo reprodutivo e manutenção de variedades com especial valor. Desta forma, Herráez (2009) destaca a importância dessas na aquicultura, tendo em conta o desenvolvimento de programas de melhoramento genético, no gerenciamento de situações de risco de determinadas espécies devido a problemas ambientais e a existência de variedades com interesse biotecnológico.

A criopreservação na aquicultura pode ser utilizada com a finalidade de preservar genes que apresentam interesses zootécnicos, de reduzir custos na manutenção de bancos de reprodutores, de facilitar o transporte de sêmen e para aumentar a variabilidade genética de uma determinada população, reduzindo, por exemplo, problemas de consanguinidade (CARNEIRO, 2007; MARIA et al., 2009).

No Brasil, a criopreservação recebeu um significativo incentivo quando um projeto desenvolvido pela organização não governamental canadense “World Fisheries Trust”, em parceria com universidades brasileiras, buscou desenvolver um protocolo prático e viável para a criopreservação do sêmen de espécies migradoras sul americanas (WEINGARTNER et al., 2012).

Segundo Maria et al. (2009), um dos entraves para a maior utilização e comercialização do sêmen de peixes nativos no Brasil é a necessidade de determinação de protocolos eficazes de manipulação e processamento desse material. Os mesmos autores sugerem que para consolidar o processo de desenvolvimento desses protocolos deve-se enfatizar a padronização das etapas e parâmetros que se seguem: coleta e diluição do sêmen, determinação dos diluentes e crioprotetores, tempo de equilíbrio, taxas de resfriamento e descongelamento; e proporção espermatozóides:ovo nos testes de fertilização.

## **Crioprotetores**

O sêmen puro de peixes não apresenta bons resultados para uso após congelamento, sendo esta técnica viabilizada apenas quando se mistura o sêmen com soluções crioprotetoras. Estas soluções são compostas por um crioprotetor extracelular e outro intracelular com a função de prevenir as crioinjúrias dos espermatozoides durante o procedimento de congelamento e de descongelamento (VIVEIROS et al., 2009) e, adicionalmente, devem possuir baixa toxicidade para as células e alta solubilidade em água (MELO, 2010).

Nos últimos anos, vários estudos vêm sendo realizados visando testar diferentes combinações de crioprotetores para a criopreservação de sêmen de peixes nativos sul americanos. Alguns destes trabalhos têm registrado resultados satisfatórios da motilidade espermática pós-descongelamento do sêmen criopreservado de Characiformes (CRUZ-CASALLAS et al., 2004; MELO e GODINHO, 2006; OLIVEIRA et al., 2007; TAITSON et al., 2008; VIVEIROS et al., 2010b; FELIZARDO et al., 2010); inclusive para o dourado (COSER et al., 1984; CAROLSFELD et al., 2003; VIVEIROS et al., 2009).

Os crioprotetores extracelulares são mais diversificados, sendo necessário que consigam carrear o crioprotetor intracelular e possuir osmolaridade similar a do sêmen, de modo que mantenham os espermatozoides inativos depois da mistura. Carolsfeld et al. (2003) propuseram um protocolo para criopreservação de sêmen de peixes migradores brasileiros, comumente utilizado, e que consiste na mistura de glicose com uma gema de ovo de galinha, dimetilsulfóxido e água.

Esta solução padrão de glicose e gema de ovo diluídos em água é bastante utilizada, porém, recentemente, testes com novas soluções crioprotetoras buscando melhorar a capacidade do sêmen criopreservado tem sido realizados. Nesta linha, a forma estável e padronizada da água de coco, nomeada de água de coco em pó tendo a sigla ACP<sup>®</sup>, está sendo experimentada como uma alternativa para a criopreservação de sêmen de peixes.

## **Água de Coco em Pó (ACP<sup>®</sup>)**

A água de coco no seu estado natural apresenta características indicadas para ser usada como crioprotetor extracelular, uma vez que é rica em nutrientes, é capaz de manter a isotonicidade, osmolaridade e o pH do esperma sem comprometer a membrana dos espermatozoides e mantendo-os inativos, condições fundamentais para o sucesso na reprodução artificial (RONDON et al., 2008; MELO, 2010).

Estudos realizados utilizando a água de coco líquida para criopreservação de sêmen de peixes nativos obtiveram resultados satisfatórios para *Colossoma macropomum* (FARIAS et al., 1999) e para *Prochilodus lineatus* (MURGAS et al., 2003). Porém, mesmo com avanços no processamento da água de coco na forma líquida, esta solução depois de acondicionada e armazenada, ainda apresenta alterações na sua propriedade.

Um grupo de pesquisadores desenvolveu um produto específico para criopreservação: a água de coco em pó (ACP<sup>®</sup>- Biotecnologia Brasil) proveniente da espécie de coco *Cocos nucifera*, possuindo a vantagem de que uma vez processada, não modifica sua composição até a sua utilização, garantindo um padrão constante e confiável no que diz respeito à estabilidade de suas propriedades.

O uso da ACP<sup>®</sup> nas soluções crioprotetoras com a função de crioprotetor extracelular tem sido testado para algumas espécies de aves (RONDON et al., 2008), de mamíferos (MOTA FILHO et al., 2011; SILVA et al., 2012) e de peixes (VIVEIROS et al., 2008; VIVEIROS et al., 2010a).

Um produto destinado para peixes teleósteos foi desenvolvido e registrado como ACP<sup>®</sup>-104 (VIVEIROS et al., 2008). A avaliação da motilidade espermática pós-descongelamento de sêmen criopreservado utilizando ACP<sup>®</sup>-104 para *Prochilodus lineatus*, *Leporinus obtusidens* e *Brycon orbignyanus* apresentou resultado similar ao controle (VIVEIROS et al., 2008), porém o ACP<sup>®</sup>-104 ainda não foi testado para o dourado.

Em estudos recentes com *Prochilodus lineatus*, Viveiros et al. (2010a) verificaram que o sêmen criopreservado em ACP<sup>®</sup>-104 apresentou maior motilidade de espermatozoides do que aqueles criopreservados em mistura com glicose. No entanto, esses autores observaram que a velocidade dos espermatozoides e a taxa de fertilização não diferiram entre os dois diluidores, concluindo que tanto a glicose como a ACP<sup>®</sup> combinadas com metilglicol são substâncias apropriadas para a criopreservação do sêmen de curimba.

## **OBJETIVO GERAL**

Contribuir para o conhecimento e na otimização do uso de sêmen criopreservado na fertilização de ovócitos durante a reprodução induzida do dourado *Salminus brasiliensis*.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Verificar a eficácia do uso do ACP<sup>®</sup> como crioprotetor extracelular de sêmen do dourado;
- Testar diferentes diluições de soluções crioprotetoras para criopreservação do sêmen do dourado;
- Testar diferentes soluções ativadoras na motilidade do sêmen criopreservado do dourado;
- Comparar dois métodos de descongelamento do sêmen criopreservado do dourado para uso na fertilização induzida.

O artigo apresentado no capítulo I foi submetido para publicação na revista *Journal of the World Aquaculture Society*. O artigo apresentado no capítulo II será submetido para publicação na revista *Aquaculture*.



## Capítulo I

### Avaliação do ACP<sup>®</sup>-104 em diferentes diluições para a criopreservação do sêmen do dourado *Salminus brasiliensis*

Ana Carolina V. Zanandrea, Marcos Weingartner e Evoy Zaniboni Filho

#### Resumo

O estudo teve como objetivo comparar o efeito de duas soluções crioprotetoras utilizadas em distintas proporções de sêmen:solução crioprotetora sobre o tempo e o vigor da motilidade espermática do sêmen criopreservado do dourado *Salminus brasiliensis*, tendo avaliado o efeito de três soluções ativadoras distintas. O sêmen foi obtido da primeira geração de dourados nascida em cativeiro proveniente do cruzamento de selvagens capturados no rio Uruguai-Brasil. Foram tratadas separadamente as amostras de animais submetidos e não submetidos à indução hormonal para maturação gonadal. A solução crioprotetora ACP<sup>®</sup>-104 350 mOsm, foi comparada com a solução comumente utilizada para dourado, que consiste na mistura de dimetilsulfóxido, glicose, gema de ovo e água destilada. O sêmen coletado foi misturado às soluções crioprotetoras em diferentes diluições, sendo testadas: 1:3, 1:9, 1:15, 1:21 e 1:27. Para análise, as amostras criopreservadas foram descongeladas a 25 C e ativadas com água destilada, NaCl 0,45% ou NaHCO<sub>3</sub> 1%. A indução hormonal não alterou a motilidade espermática ( $p \geq 0,05$ ). A motilidade do sêmen criopreservado com a solução à base de glicose não foi alterada pela diluição sêmen:crioprotetor, porém, com o uso do ACP<sup>®</sup>-104 a motilidade e o vigor foi maior com o aumento da diluição. As distintas soluções ativadoras proporcionaram o mesmo vigor espermático para ambas as soluções crioprotetoras, porém o tempo de motilidade foi maior ( $p < 0,05$ ) quando utilizado NaCl 0,45% ( $42,82 \pm 22,55$  s). Nas condições testadas, indica-se para a criopreservação do sêmen do dourado o uso da solução crioprotetora padrão por necessitar de menor quantidade de solução crioprotetora e de espaço para o armazenamento de um mesmo volume de sêmen.

Palavras-chaves: crioprotetores, motilidade espermática, dimetilsulfóxido, peixe, rio Uruguai.

## Introdução

O dourado, *Salminus brasiliensis*, é representante da família Characidae que habita importantes bacias hidrográficas da América do Sul. As duas principais razões que têm despertado o interesse pela realização de estudos com o dourado, de acordo com Weingartner e Zaniboni Filho (2010), são o seu potencial para piscicultura e a preocupação com a conservação da espécie, que se encontra com estoque reduzido ou ameaçado de extinção em várias bacias hidrográficas.

A técnica de criopreservação é uma alternativa para manter bancos de germoplasma e reduzir custos de produção na aquicultura. A viabilidade da criopreservação depende da utilização de soluções crioprotetoras capazes de prevenir as crioinjúrias causadas aos espermatozoides durante os procedimentos de congelamento e de descongelamento (Viveiros et al. 2009).

Apesar da viabilidade dos resultados obtidos na criopreservação do sêmen de peixes, segundo Viveiros e Godinho (2009), as taxas de fertilização esperadas com o uso de sêmen criopreservado para espécies brasileiras variam de 31 a 100% em relação às obtidas com sêmen fresco. Para o dourado, Viveiros et al. (2009) observaram significativa redução da taxa de eclosão obtida com o uso do sêmen criopreservado (17-23%) em relação ao sêmen fresco (60%). Alternativas de produtos e processos devem ser testadas para melhorar a viabilidade do sêmen após a criopreservação.

O uso da ACP<sup>®</sup> (água de coco em pó) nas soluções crioprotetoras com a função de crioprotetor extracelular tem sido utilizada para espécies de aves (Rondon et al. 2008), mamíferos (Mota Filho et al. 2011; Silva et al. 2012) e peixes (Viveiros et al., 2008; Viveiros et al., 2010a). Um produto específico foi desenvolvido para peixes teleósteos, sendo registrado como ACP<sup>®</sup>-104 (Viveiros et al., 2008).

A análise da motilidade espermática tem sido largamente utilizada como indicadora da qualidade espermática (Viveiros e Godinho 2009; Bobe e Labbé 2010; Fauvel et al. 2010). Diversos trabalhos têm registrado resultados satisfatórios da motilidade espermática após o descongelamento do sêmen criopreservado de Characiformes sul americanos (Cruz-Casallas et al. 2004; Melo e Godinho 2006; Oliveira et al. 2007; Taitson et al. 2008; Viveiros et al. 2010b; Felizardo et al. 2010); inclusive para o dourado (Cosser et al. 1984; Carolsfeld et al. 2003; Viveiros et al. 2009).

A avaliação da motilidade espermática pós-descongelamento de sêmen criopreservado utilizando ACP<sup>®</sup>-104 para *Prochilodus lineatus*, *Leporinus obtusidens* e *Brycon orbignyianus* apresentou resultado similar ao controle (Viveiros et al. 2008), porém o ACP<sup>®</sup>-104 ainda não foi testado para o dourado.

Na análise pós-descongelamento, o meio externo utilizado para ativar o sêmen pode afetar as características espermáticas (Yasui et al. 2012), influenciando na motilidade espermática. Viveiros e Godinho (2009) relatam que as soluções mais indicadas para induzir a motilidade espermática são água destilada, NaCl 0,3% e NaHCO<sub>3</sub> 1%.

Neste estudo foram realizados diferentes testes buscando os melhores resultados de motilidade para o sêmen criopreservado do dourado, utilizando animais induzidos e não-induzidos. A solução crioprotetora à base de ACP<sup>®</sup>-104 foi comparada em relação à solução crioprotetora comumente utilizada para a espécie, sendo ambas avaliadas em distintas proporções de sêmen:solução crioprotetora, e testando para a ativação espermática três soluções ativadoras distintas.

## Material e Métodos

### Seleção dos Machos e Obtenção do Sêmen

Foram utilizados machos de dourado *Salminus brasiliensis* da primeira geração nascida em cativeiro e descendentes de peixes selvagens capturados no alto rio Uruguai (Brasil). Os animais tinham cinco anos de idade e foram mantidos em viveiros de terra, sendo alimentados diariamente com ração comercial contendo 40% de proteína bruta.

Foram selecionados nos viveiros seis machos que liberaram sêmen com leve pressão abdominal, sendo estes levados para o laboratório e mantidos em tanques circulares de 1000 L abastecidos com água corrente e taxa de renovação de 17 vezes ao dia, temperatura de 26°C e concentração de oxigênio dissolvido em média de 7,0 mg/L.

Os machos selecionados tinham em média 1024±97,13 g e 460±11,08 mm e foram separados em dois grupos de três animais cada: induzidos e não-induzidos. As amostras de sêmen de indivíduos submetidos e não submetidos à indução hormonal foram tratadas separadamente. A indução hormonal foi realizada com duas injeções intramusculares de extrato bruto de pituitária de carpa (CPE), contendo o equivalente a 0,4 e 4 mg CPE/kg, mantendo um intervalo de 12 horas entre as aplicações (WEINGARTNER e ZANIBONI FILHO, 2010).

Para a coleta do sêmen, os machos foram retirados dos tanques e a região urogenital foi seca com papel toalha. O sêmen foi retirado através de leve pressão abdominal com movimentos no sentido encéfalo-caudal, evitando a contaminação do sêmen por fezes e urina. O sêmen foi coletado em tubo de Falcon e a qualidade seminal foi posteriormente avaliada. Foi selecionado o sêmen de um único macho induzido e um não-induzido, sendo que o mesmo deveria apresentar as seguintes características: consistência leitosa, coloração esbranquiçada, tempo de motilidade superior a 40 segundos e vigor superior a 80%. Dentre os peixes induzidos, o sêmen do macho selecionado apresentou tempo de motilidade de 51 segundos, vigor espermático de 90% e concentração espermática  $1,27 \times 10^{10}$  espermatozoides/mL. O sêmen do macho não-induzido apresentou motilidade de 42 segundos, 90% de vigor e concentração de  $1,32 \times 10^{10}$  espermatozoides/mL.

#### Comparação das Soluções Crioprotetoras em Diferentes Diluições

Foi avaliada a relação sêmen:solução crioprotetora de duas soluções crioprotetoras para o sêmen do dourado. Uma das soluções crioprotetoras utilizadas foi a fórmula genérica desenvolvida para peixes migradores sul americanos (Carolsfeld et al. 2003), que consiste na mistura de 10% (15 mL) de DMSO (dimetilsulfóxido), 5% (7,5 g) de glicose e uma gema de ovo de galinha, acrescidos a 135 mL de água destilada, definida neste estudo como a solução crioprotetora padrão - CP. A outra solução testada foi a ACP<sup>®</sup>-104 350 mOsmol, que consiste na mistura de água de coco em pó (3,74 g) e metilglicol (10% v:v) diluídos em água destilada com volume final de 50 mL, definida como - CA.

O sêmen coletado foi misturado às soluções CA e CP em diferentes diluições, sendo testadas as proporções: 1:3, 1:9, 1:15, 1:21 e 1:27 de sêmen:solução crioprotetora. Posteriormente, estas foram envasadas em palhetas de 0,5 mL e acondicionadas diretamente em botijão de vapor de nitrogênio (Dry shipper Taylor-Wharton, CP model 300, Harsco Corp., Theodore, AL, U.S.A.).

#### Descongelamento e Análise da Motilidade do Sêmen Criopreservado

As amostras foram analisadas num intervalo entre sete e vinte dias após o congelamento. O descongelamento das palhetas foi realizado em temperatura ambiente de 25°C e cada tratamento foi avaliado ativando as amostras com três diferentes soluções. As soluções ativadoras testadas foram água destilada, NaCl 0,45% e NaHCO<sub>3</sub> 1%,

sendo cada análise realizada em triplicata para cada combinação de tratamentos.

Para avaliação do efeito dos diferentes tratamentos foram considerados o tempo de motilidade espermática e o vigor espermático no pós-descongelamento, conforme descrito por Carolsfeld et al. (2003).

### Análise Estatística

Para a análise estatística, os dados em porcentagem do vigor espermático sofreram transformação angular ( $\arcsin \sqrt{y/100}$ ). As análises foram realizadas com o auxílio do software Statistica e, após constatada a normalidade dos dados, foi utilizada ANOVA Fatorial para verificar a existência de diferenças entre os tratamentos. Se verificada diferença aplicou-se o teste de Tukey para separação de médias ( $p < 0,05$ ). Todos os dados estão apresentados pela média  $\pm$  desvio padrão. Para avaliação do efeito das diferentes diluições nas soluções crioprotetoras foi utilizada a análise de regressão linear.

## Resultados

A qualidade do sêmen criopreservado, considerando as soluções crioprotetoras, as diluições e os ativadores utilizados, apresentou distintos resultados entre o sêmen obtido de machos submetidos à indução hormonal ou não tratados com hormônio indutor (Tabela 1). Não foi verificada diferença significativa ( $p=0,07$ ) para o tempo de motilidade, enquanto que para o vigor espermático os machos induzidos alcançaram maiores porcentagens ( $p=0,02$ ).

Tabela 1. Tempo de motilidade e vigor espermático do sêmen criopreservado do dourado *Salminus brasiliensis* proveniente de machos hormonalmente induzidos e não-induzidos.

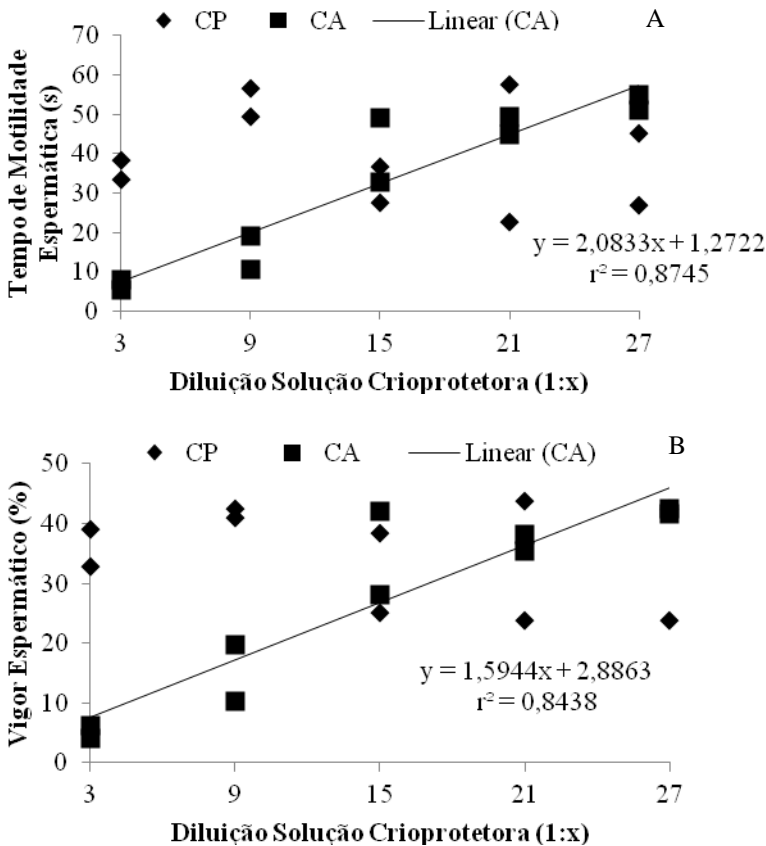
<b>Machos</b>	<b>Tempo de Motilidade (s)</b>	<b>Vigor Espermático (%)</b>
Induzidos	37,80 $\pm$ 24,07	32,67 $\pm$ 21,56*
Não-induzidos	34,49 $\pm$ 22,47	29,11 $\pm$ 21,29

\* Diferença significativa pela ANOVA Fatorial ( $p < 0,05$ ).

O aumento da diluição do sêmen na solução crioprotetora à base de água de coco aumentou o vigor e o tempo da motilidade espermática, porém, não ocorreu relação significativa destes parâmetros para a

solução padrão. O valor do coeficiente de determinação não foi significativo para a solução padrão, tanto para tempo de motilidade como para vigor espermático,  $r^2=0,0216$  e  $r^2=0,0623$ , respectivamente. A regressão linear conseguiu explicar significativa relação entre a diluição e solução crioprotetora para as amostras com ACP<sup>®</sup> (Fig. 1).

Figura 1. Tempo de motilidade (A) e vigor espermático (B) do sêmen criopreservado do *Salminus brasiliensis* em diferentes diluições nas soluções crioprotetoras padrão (CP) e ACP<sup>®</sup> (CA) expresso pelo valor médio obtido por distintos ativadores para uma determinada diluição considerando machos induzidos e não-induzidos.



As soluções ativadoras testadas ativaram o sêmen criopreservado com as soluções crioprotetoras e nas diferentes diluições testadas, exceto para as amostras à base de ACP<sup>®</sup> diluídas em 1:3 e ativadas com água destilada ou NaHCO<sub>3</sub> 1%, tanto para os machos induzidos como para os não induzidos. Os resultados estatísticos apontaram diferença significativa na relação dos distintos ativadores com as soluções crioprotetoras (Tabela 2).

Avaliando o tempo de motilidade espermática, a solução de cloreto de sódio ativando amostras com o crioprotetor padrão proporcionou maior tempo de motilidade, enquanto que quando ativada com água destilada apresentou o menor tempo. Considerando o vigor espermático, exceto pelas amostras de solução crioprotetora com ACP<sup>®</sup> ativadas com cloreto de sódio e bicarbonato de sódio, não houve diferença entre as demais combinações testadas.

Tabela 2. Tempo de motilidade e vigor espermático do sêmen do dourado *Salminus brasiliensis* criopreservado com distintas soluções crioprotetoras e ativado com diferentes soluções ativadoras.

<b>Soluções Ativadoras</b>	<b>Solução Crioprotetora</b>	<b>Tempo de Motilidade (s)</b>	<b>Vigor Espermático (%)</b>
NaCl 0,45%	Padrão	51,70±18,25 <sup>a</sup>	36,67±13,22 <sup>ab</sup>
	ACP <sup>®</sup>	33,93±23,2 <sup>bc</sup>	24,67±17,17 <sup>bc</sup>
NaHCO <sub>3</sub> 1%	Padrão	42,70±16,62 <sup>ab</sup>	41,33±13,58 <sup>a</sup>
	ACP <sup>®</sup>	26,89±23,80 <sup>bc</sup>	13,00±12,08 <sup>c</sup>
Água Destilada	Padrão	24,90±15,66 <sup>c</sup>	28,00±18,83 <sup>ab</sup>
	ACP <sup>®</sup>	36,77±29,4 <sup>abc</sup>	41,67±32,17 <sup>ab</sup>

Letras diferentes na coluna indicam diferença significativa pelo teste Tukey de separação de médias ( $p < 0,05$ ).

### Discussão

De acordo com Bobe e Labbé (2010) os indutores de desova são muito eficientes no aumento do volume espermático e na redução da densidade do sêmen, sugerindo que os indutores mantêm ou aumentam a motilidade espermática nas espécies testadas, justificando que a estimulação hormonal é favorável para a maturação de esperma nos testículos e nos ductos espermáticos. Neste trabalho, foi observado que o uso da indução hormonal possibilitou maior fluidez do sêmen para o

dourado, facilitando o manuseio para a criopreservação, porém, não houve diferença no tempo de motilidade.

Resultados semelhantes foram observados com *Brycon amazonicus*, onde machos induzidos com extrato pituitário de carpa apresentaram maior volume de sêmen e diminuição da concentração espermática, sem alteração da motilidade (Pardo-Carrasco et al. 2006).

Neste estudo foi verificado maior vigor espermático no sêmen criopreservado proveniente do macho induzido. Variações na qualidade e quantidade de sêmen podem ocorrer de acordo com o momento do período reprodutivo da espécie; assim, as análises espermáticas podem ser utilizadas para auxiliar na determinação do ponto ótimo para a coleta do sêmen (Rurangwa et al. 2004).

A indução hormonal em peixes doadores de sêmen para criopreservação garante o aumento do volume produzido, porém, o manejo necessário para aplicação de hormônios nos peixes acaba restringindo essa prática a condições de laboratório. A manutenção da qualidade do sêmen criopreservado do dourado foi semelhante com ou sem a indução hormonal prévia, permitindo a coleta do sêmen de peixes selvagens diretamente do ambiente natural durante o período reprodutivo, favorecendo a realização dos trabalhos de criopreservação para fins de preservação da variabilidade genética.

O uso de ACP<sup>®</sup>-104 combinado com metilglicol e diluído numa proporção de até 1:9 (sêmen:solução) proporcionou resultados inferiores na motilidade e vigor espermático de *S. brasiliensis* quando comparada a solução padrão a base de DMSO e glicose. Somente quando a solução de ACP<sup>®</sup>-104 foi utilizada numa diluição maior ou igual a 1:15 é que os resultados de motilidade e vigor espermático atingiram os valores semelhantes aos obtidos pela solução padrão.

A comparação do ACP<sup>®</sup>-104 300 mOsmol com uma solução crioprotetora controle a base de glicose e metilglicol foi testada por Viveiros et al. (2010a) para a criopreservação do sêmen de outro characiforme sul americano, *Prochilodus lineatus*, revelando maior motilidade com o uso de ACP<sup>®</sup> diluído na proporção de 1:9, porém, sem diferença na velocidade dos espermatozoides e na taxa de fertilização, concluindo que o ACP<sup>®</sup>-104 é apropriado para a criopreservação do sêmen da espécie.

A diluição recomendada entre o sêmen e a solução crioprotetora varia entre autores e espécies estudadas, sendo indicada por Carolsfeld et al. (2003) uma diluição entre 1:3 e 1:5 para o sêmen dos peixes sul americanos. Apesar da diferença da qualidade do sêmen verificada para as diferentes diluições com o uso da solução com ACP<sup>®</sup>, o vigor e o



tempo de motilidade espermática não foram alterados pela variação da diluição com a solução padrão. No entanto, Viveiros et al. (2009) registraram para a mesma espécie melhor resultado de motilidade utilizando combinações de soluções crioprotetoras com DMSO em diluições de 1:5 quando comparado com a diluição de 1:10.

A composição da solução ativadora do sêmen criopreservado pode alterar a avaliação da motilidade espermática. A água destilada apresentou resultados inferiores de vigor e motilidade espermática para o sêmen de *P. lineatus* (Murgas et al. 2007) e de motilidade para o sêmen de dourado (Carolsfeld et al. 2003) quando comparada com a ativação feita com solução de bicarbonato de sódio. Neste estudo, também foi observado que o tempo de motilidade com a solução de bicarbonato de sódio, assim como a de cloreto de sódio, foi superior ao obtido com água destilada para amostras criopreservadas com solução padrão. Porém, para esta mesma solução crioprotetora, o vigor espermático foi semelhante para todos os ativadores testados. É interessante ressaltar que testes de fertilização são recomendados para avaliar o efeito dessas soluções sobre a interação ovócito/espermatozoide.

Com este estudo pode-se concluir que não foi verificado efeito da indução hormonal no tempo de motilidade, mas esta afetou o vigor; bem como que o uso da ACP<sup>®</sup>-104 é indicado para a criopreservação de sêmen de dourado somente quando em diluições sêmen:solução crioprotetora maiores ou iguais a 1:15. As diferentes soluções ativadoras afetaram o tempo de motilidade e o vigor espermático do sêmen criopreservado do dourado para ambas os crioprotetores testados.

Com base nos resultados obtidos, indica-se para a criopreservação do sêmen do dourado o uso da solução crioprotetora padrão desenvolvida por Carolsfeld et al.(2003), que além de produzir resultados iguais ou superiores de motilidade espermática em relação ao ACP<sup>®</sup>-104, não foi afetada pela diluição sêmen:solução crioprotetora, o que reduz os custos da criopreservação do sêmen por necessitar de menor quantidade de solução crioprotetora e de espaço para o armazenamento de um mesmo volume de sêmen.

#### Literatura Citada

Bobe, J. and C. Labbé. 2010. Egg and sperm quality in fish. *General and Comparative Endocrinology* 165:535–548.

Carolsfeld, J., H. P. Godinho, E. Zaniboni Filho and B. J. Harvey. 2003. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. *Journal of Fish Biology* 63:472-489.

Coser, A. M., H. Godinho and D. Ribeiro. 1984. Cryogenic preservation of spermatozoa from *Prochilodus scrofa* and *Salminus maxillosus*. *Aquaculture* 37:387-390.

Cruz-Casallas, P. E., S. C. Pardo-Carrasco, J. A. Arias-Castellanos, P. E. Lombo-Castellanos, D. A. Lombo-Rodríguez and J. E. Pardo-Mariño. 2004. Cryopreservation of Yamú *Brycon siebenthalae* Milt. *Journal of the World Aquaculture Society* 35:529-535.

Fauvel, C., M. Suquet and J. Cosson. 2010. Evaluation of fish sperm quality. *Journal of Applied Ichthyology* 26:636-643.

Felizardo, V. O., R. A. Mello, L. D. S. Murgas, E. S. Andrade, M. M. Drumond and P. V. Rosa. 2010. Effect of cryopreservant combinations on the motility and morphology of curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm. *Animal Reproduction Science* 122:259-263.

Melo, F. C. S. A. and H. P. Godinho. 2006. A protocol for cryopreservation of spermatozoa of the fish *Brycon orthotaenia*. *Animal Reproduction Science* 3:380-385.

Mota Filho, A.C., C. H. A. Teles, R. P. Jucá, J. F. S. Cardoso, D. C. Uchoa, C. C. Campello, A. R. Silva and L. D. M. Silva. 2011. Dimethylformamide as a cryoprotectant for canine semen diluted and frozen in ACP-106C. *Theriogenology* 76:1367-1372.

Murgas, L. D. S., A. B. Miliorini, R. T. F. Freitas and G. J. M. Pereira. 2007. Criopreservação do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) mediante adição de diferentes diluidores, ativadores e crioprotetores. *Revista Brasileira de Zootecnia* 36:526-531.

Oliveira, A. V., A. T. M. Viveiros, A. N. Maria, R. T. F. Freitas and Z. A. Izaú. 2007. Success of cooling and freezing of pirapitinga (*Brycon nattereri*) semen. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 59:1509-1515.

Pardo-Carrasco, S. C., E. Zaniboni Filho, J. A. Arias-Castellanos, H. Suárez-Mahecha, V. J. Atencio-Garcia and P. Cruz-Casallas. 2006. Evaluation of milt quality of the yamú *Brycon amazonicus* under hormonal induction. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 19:134-139.

Rondon, R. M. M., F. C. M. Rondon, J. F. Nunes, A. A. Alencar, F. M. Sousa and M. A. M. Carvalho. 2008. Uso da água de coco em pó (ACP®) em diferentes temperaturas como diluente de espermatozoides de capote (*Numida meleagris*). *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal* 9:848-854.

Rurangwa, E., D. E. Kimeb, F. Olleviera and J.P. Nash. 2004. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture* 234:1-28.

Silva, M. A., G. C. X. Peixoto, G. L. Lima, J. A. B. Bezerra, L. B. Campos, A. L. C. Paiva, V. V. Paula and A. R. Silva. 2012. Cryopreservation of collared peccaries (*Tayassu tajacu*) semen using a powdered coconut water (ACP-116c) based extender plus various concentrations of egg yolk and glycerol. *Theriogenology* 78:605–611.

Taitson, P.F., E. Chami and H. P. Godinho. 2008. Gene banking of the neotropical fish *Leporinus obtusidens* (Valenciennes, 1836): A protocol to freeze its sperm in the field. *Animal Reproduction Science* 105:283–291.

Viveiros, A. T. M., A. N. Maria, L. H. Orfão, M. A. Carvalho and J. F. Nunes. 2008. Powder coconut water (ACP-104) as extender for semen cryopreservation of Brazilian migratory fish species. *Cybio* 32:215.

Viveiros, A. T. M., A. V. Oliveira, A. N. Maria, L. H. Orfão and J. C. Souza. 2009. Sensibilidade dos espermatozóides de dourado (*Salminus brasiliensis*) a diferentes soluções crioprotetora. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 61:883-889.

Viveiros, A. T. M. and H. P. Godinho. 2009. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. *Fish Physiology and Biochemistry* 35:137–150.

Viveiros, A. T. M., A. F. Nascimento, L. H. Orfão and Z. A. Isaú. 2010a. Motility and fertility of the subtropical freshwater fish streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) sperm cryopreserved in powdered coconut water. *Theriogenology* 74: 551–556.

Viveiros, A. T. M., T. B. Amaral, L. H. Orfã, Z. A. Isaú, D. Caneppele and M. C. Leal. 2010b. Sperm cryopreservation of tiete tetra *Brycon insignis* (Characiformes): effects of cryoprotectants extenders, thawing temperatures and activating agents on motility features. *Aquaculture Research* 42:858-865.

Weingartner, M. and E. Zaniboni Filho. 2010. Biologia e cultivo do Dourado. Pages 245-281 in B. Baldisserotto and L.C. Gomes, org. *Espécies Nativas para Piscicultura no Brasil*. Editora UFMS, Santa Maria, Brasil.

Yasui, G. S., T. Fujimoto, L. Arias-Rodriguez, Y. Takagi and K. Arai. 2012. The effect of ions and cryoprotectants upon sperm motility and fertilization success in the loach *Misgurnus anguillicaudatus*. *Aquaculture* 344-349:147–152.

## Capítulo II

### Uso do sêmen criopreservado na reprodução induzida do dourado *Salminus brasiliensis*

Ana Carolina V. Zanandrea, Marcos Weingartner e Evoy Zaniboni Filho

#### Resumo

Os procedimentos para a reprodução de peixes migradores são dominados para várias espécies, contudo, a utilização de sêmen criopreservado continua com uso restrito. Apesar da criopreservação do sêmen ser eficiente para manter a motilidade espermática, as taxas de fertilização obtidas com sêmen criopreservado ainda são inferiores às obtidas com sêmen fresco. Neste trabalho foram realizados dois experimentos visando melhorar a taxa de fertilização com a utilização de sêmen criopreservado do *Salminus brasiliensis*. No experimento I foram avaliados dois procedimentos de descongelamento do sêmen criopreservado do dourado, sendo um exposto ao ar em temperatura ambiente - RT e outro imerso em água aquecida - WW. Para tal, foi utilizada a solução crioprotetora considerada padrão para a espécie - CP, que consiste na mistura de glicose, água destilada, gema de ovo e DMSO. No experimento II, utilizando o melhor processo de descongelamento obtido no experimento I, foram testadas duas soluções crioprotetoras em diferentes diluições de sêmen:solução crioprotetora, sendo: 1:5, 1:15, 1:25 e 1:50. A solução padrão foi comparada com a solução ACP<sup>®</sup>-104 350 mOsm, composta por água de coco em pó diluída em água destilada e metilglicol - CA. Os gametas foram obtidos da primeira geração do cruzamento de reprodutores selvagens coletados no rio Uruguai, sendo machos e fêmeas hormonalmente induzidos. O sêmen foi coletado três horas antes da fertilização e misturado às diferentes soluções crioprotetoras nas suas devidas proporções, envasado em palhetas de 0,5 mL e acondicionadas em botijão de vapor de nitrogênio. Para o descongelamento as palhetas foram imersas em água a temperatura de 60°C por oito segundos ou descongeladas expostas ao ar em temperatura ambiente de 26°C, sendo em seguida misturado a amostras de 10 g de ovócitos, mantendo a proporção de 5 mL de sêmen por kg de ovócito. Após a fertilização os ovos foram mantidos em incubadoras com fluxo constante de água. No experimento I, verificou-se diferença nas taxas de fertilização quanto ao modo de descongelamento, sendo WW (36,54±17,15%) superior ao RT (17,44±9,36%). No experimento II, a diferença de diluições foi significativa apenas para a solução CA. Os resultados apontam que a

solução padrão é a mais indicada para a criopreservação de sêmen do dourado e que a variação da diluição do sêmen não alterou a taxa de fertilização. No entanto, a solução com ACP<sup>®</sup> apresenta melhores resultados de fertilização quando utilizada em maiores diluições, iguais ou superiores a 1:25.

Palavras-chave: criopreservação, ACP<sup>®</sup>-104, fertilização, crioprotetor, rio Uruguai

## 1. Introdução

O armazenamento do sêmen criopreservado de peixes é uma ferramenta com diferentes aplicabilidades, tanto na conservação de recursos genéticos das espécies como na aquicultura. Bancos de gametas vêm sendo criados com o objetivo de proteger espécies ameaçadas de extinção e auxiliar nos programas relacionados com preservação da biodiversidade e de melhoramento genético (Kopeika et al., 2007; Paniagua-Chávez, 2011). Na aquicultura, mantendo-se amostras representativas de uma população em um banco de germoplasma, permite reduzir o número de indivíduos machos no plantel de reprodutores *in vivo* e facilita os trabalhos de rotina dentro de um laboratório de reprodução induzida, pois disponibiliza prontamente o sêmen de vários machos para reproduções, favorecendo a concentração dos esforços de manejo somente com exemplares fêmeas (Carneiro, 2007).

A espécie *Salminus brasiliensis*, o dourado, é um peixe apreciado no sul do Brasil, por possuir características indicadas para a pesca esportiva e apreciado pelos pescadores artesanais devido à qualidade de sua carne. Devido, principalmente, a ações antrópicas, a espécie se encontra com estoques reduzidos ou ameaçados de extinção em várias bacias hidrográficas; sendo, dentre as espécies do gênero, esta a que atinge o maior tamanho e possui o maior número de trabalhos relacionados ao cultivo, sendo considerada a que possui o maior potencial para a piscicultura (Weingartner e Zaniboni Filho, 2010).

O uso do sêmen criopreservado para o dourado foi tratado inicialmente por Coser et al. (1984), sendo retomado anos depois por Carolsfeld et al. (2003) e por Viveiros et al. (2009b). Na maior parte dos estudos, a motilidade espermática se destaca como o parâmetro mais comumente utilizado para avaliar a qualidade espermática, porém a capacidade de fertilização do sêmen criopreservado continua a ser o

mais conclusivo para análise da sua qualidade (Coward et al., 2002). Segundo Bobe e Labbé (2010), o sucesso da fertilização é, provavelmente, uma das primeiras avaliações que pode ser registrada para estimar com precisão a qualidade do ovo e avaliar a qualidade espermática.

Nos últimos anos, vários estudos vêm sendo realizados visando testar diferentes combinações de crioprotetores e protocolos para a criopreservação do sêmen dos peixes Characiformes sul americanos, buscando as melhores combinações para aumentar as taxas de fertilização com o uso do sêmen criopreservado (Cruz-Casallas et al., 2004; Maria et al., 2006; Ninhaus-Silveira et al., 2006; Taitson et al., 2008; Velasco-Santamaria et al., 2006; Viveiros et al., 2009a e Viveiros et al., 2012).

Um produto especificamente destinado para o sêmen de peixes teleósteos foi desenvolvido, sendo registrado como ACP<sup>®</sup>-104 (Viveiros et al., 2008). Este produto consiste na forma estável e padronizada da água de coco que possui características de um ótimo crioprotetor extracelular (Rondon et al., 2008 e Silva et al., 2012), sendo interessante experimentá-lo como uma alternativa para a criopreservação de sêmen do dourado. A avaliação da motilidade espermática pós-descongelamento de sêmen criopreservado utilizando ACP<sup>®</sup>-104 para *Prochilodus lineatus*, *Leporinus obtusidens* e *Brycon orbignyanus* apresentou resultado similar ao controle (Viveiros et al., 2008), porém o ACP<sup>®</sup>-104 ainda não foi testado para o dourado.

As taxas de fertilização obtidas com sêmen criopreservado ainda são inferiores às obtidas com sêmen fresco para a maioria das espécies. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar a taxa de fertilização na reprodução induzida do dourado *Salminus brasiliensis* utilizando sêmen criopreservado testando dois métodos de descongelamento e comparando o uso da solução crioprotetora à base de ACP<sup>®</sup>-104 em relação à solução crioprotetora comumente utilizada para a espécie, sendo ambas empregadas em distintas proporções de sêmen:solução crioprotetora.

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1 Seleção dos Reprodutores e Obtenção dos Gametas**

Foram utilizados exemplares do dourado *Salminus brasiliensis* da primeira geração nascida em cativado de descendentes de peixes selvagens capturados no alto rio Uruguai (Brasil). Os animais tinham

cinco anos de idade e foram mantidos em viveiros de terra, sendo alimentados diariamente com ração comercial extrusada com 40% de proteína bruta.

Para os experimentos foram selecionados machos que liberaram sêmen com leve pressão abdominal e fêmeas com o ventre abaulado, sendo estes animais levados para o laboratório e mantidos em tanques circulares de 1000 L abastecidos com água corrente e taxa de renovação de 17 vezes ao dia, temperatura média de 26°C e concentração média de oxigênio dissolvido em 7,0 mg/L.

A obtenção dos gametas foi realizada através de indução hormonal para maturação final com duas injeções intramusculares de extrato bruto de pituitária de carpa (CPE), contendo o equivalente a 0,4 e 4 mg CPE/kg para machos e 0,5 e 5 mg CPE/kg para fêmeas, mantendo um intervalo de 12 horas entre as aplicações (Weingartner e Zaniboni Filho, 2010).

Para a coleta do sêmen, os machos foram retirados dos tanques e a região urogenital foi seca com papel toalha. O sêmen foi retirado através de leve pressão abdominal com movimentos no sentido encéfalo-caudal, evitando a contaminação do sêmen por fezes e urina. O sêmen foi coletado em tubo de Falcon e a qualidade seminal do sêmen fresco foi avaliada, sendo selecionado o sêmen de um único macho para cada experimento. O sêmen fresco utilizado nos experimentos apresentou as seguintes características: consistência leitosa, coloração esbranquiçada, tempo de motilidade superior a 40 segundos e vigor espermático superior a 80% (Coward et al., 2002 e Viveiros et al., 2009b).

Os gametas femininos foram obtidos através de extrusão dos ovócitos das fêmeas por massagem ventral. O procedimento de reprodução ocorreu pelo método de fertilização a seco, sendo utilizada a mesma água do sistema de recirculação que abastece os tanques dos reprodutores para promover a ativação dos gametas.

## 2.2 Criopreservação

A solução crioprotetora comumente utilizada para o dourado é a fórmula genérica desenvolvida para peixes migradores sul americanos (Carolsfeld et al. 2003), que consiste na mistura de 10% (15 mL) de DMSO (dimetilsulfóxido), 5% (7,5 g) de glicose e uma gema de ovo de galinha, acrescidos a 135 mL de água destilada, definida neste estudo como a solução crioprotetora padrão - CP.



Para a realização dos experimentos, o sêmen foi coletado três horas antes da fertilização e amostras do sêmen fresco foram acondicionadas em recipiente com gelo para uso como tratamento controle. Para a criopreservação, o sêmen fresco foi misturado às soluções crioprotetoras nas suas devidas proporções, envasado em palhetas de 0,5 mL e acondicionadas diretamente em botijão de vapor de nitrogênio (Dry shipper Taylor-Wharton, CP model 300, Harsco Corp., Theodore, AL, U.S.A.).

### 2.3 Experimento I - Descongelamento

No experimento I foram avaliados dois procedimentos de descongelamento do sêmen criopreservado do dourado: exposto ao ar em temperatura ambiente - RT e imerso em água aquecida a 60°C - WW. Para tal, foi utilizado sêmen criopreservado na solução crioprotetora considerada padrão para a espécie em três diluições sêmen:solução crioprotetora: 1:5, 1:15 e 1:25.

Para o descongelamento em água, as palhetas foram imersas em água a temperatura de 60°C por oito segundos. O descongelamento em temperatura ambiente foi realizado pela exposição ao ar em temperatura de 26°C, até o sêmen atingir um estado entre pastoso e líquido. Em seguida, o sêmen criopreservado foi misturado a amostras de 10 g de ovócitos mantendo a proporção de 5 mL de sêmen por kg de ovócito. Simultaneamente igual quantidade de sêmen fresco foi utilizado para fertilizar a mesma quantia de ovócitos, consistindo o tratamento controle. Os testes foram realizados em triplicata e os ovócitos foram provenientes de uma única fêmea para evitar variação nos resultados de fertilização pela diferença na qualidade dos ovócitos entre diferentes fêmeas.

Os ovos foram mantidos em incubadoras cilíndrico-cônicas com fluxo constante de água e a avaliação dos tratamentos foi realizada através da taxa de fertilização. A taxa de fertilização foi realizada na fase de fechamento do blastóporo. Para tal, foram amostrados no mínimo 260 ovos de cada incubadora e avaliados sob esteromicroscópio (40x), sendo a taxa de fertilização calculada pela fórmula:

$$\text{Taxa fertilização (\%)} = \frac{\text{Número de ovos normais em fase de fechamento do blastóporo} \times 100}{\text{Número total de ovos observados}}$$

## 2.4 Experimento II - Comparação das Soluções Crioprotetoras em Diferentes Diluições

No experimento II foram testadas duas soluções crioprotetoras em diferentes diluições de sêmen:solução crioprotetora. A solução padrão para a espécie foi comparada com a solução ACP<sup>®</sup>-104 350 mOsm, que consiste na mistura de água de coco em pó (3,74 g) e metilglicol (10% v:v) diluídos em água destilada com volume final de 50 mL, definida neste estudo como - CA.

O sêmen fresco foi misturado às diferentes soluções crioprotetoras nas suas devidas diluições, sendo testadas as proporções: 1:5, 1:15, 1:25 e 1:50 de sêmen:solução crioprotetora.

Amostras do sêmen fresco foram mantidas em recipiente com gelo para utilização no tratamento controle, sendo cada teste realizado em triplicata. Para o sêmen criopreservado o descongelamento foi realizado através da imersão das palhetas em água morna a 60°C por oito segundos. Os demais passos da fertilização ocorreram conforme descrito para o experimento I.

## 2.5 Análise Estatística

Para anular o efeito da qualidade dos ovócitos sobre os resultados obtidos, foi realizado o cálculo de ajuste das taxas de fertilização conforme descrito por Carolsfeld et al. (2003). Esse ajuste consiste em estimar a taxa de fertilização relativa de cada tratamento em relação ao tratamento controle, sendo este considerado 100%. Os valores da taxa de fertilização dos tratamentos serão apresentados corrigidos em relação à taxa de fertilização obtida pelo respectivo tratamento controle, sendo expresso pela média  $\pm$  desvio padrão.

Em ambos os experimentos os dados em porcentagem sofreram transformação angular ( $\arcsin \sqrt{y/100}$ ). Foi utilizada ANOVA Factorial, com as premissas de normalidade e homocedasticidade, nos experimentos I e II para verificar a existência de diferenças entre os tratamentos e as diluições testadas, sendo verificada diferença aplicou-se o teste de Tukey para separação de médias ( $p < 0,05$ ). No experimento II o efeito das diferentes diluições nas distintas soluções crioprotetoras também foi avaliado pela análise de regressão linear.

### 3. Resultados

No experimento I não houve efeito das diluições sobre a taxa de fertilização ( $p=0,85$ ), no entanto, verificou-se diferença na taxa de fertilização quanto ao modo de descongelamento, sendo a imersão em água (taxa de fertilização= $36,54\pm 17,15\%$ ) superior ao descongelamento em temperatura ambiente (taxa de fertilização= $17,44\pm 9,36\%$ ).

Considerando a interação entre os tratamentos de descongelamento e as diluições, a diluição 1:25 descongelada em temperatura ambiente obteve resultado inferior aos demais (Tabela 1).

Tabela 1. Taxa de fertilização (%) com duas formas de descongelamento utilizando sêmen criopreservado do dourado *Salminus brasiliensis* em diferentes diluições.

Descongelamento	Diluições (sêmen:solução crioprotetora) <sup>1</sup>		
	1:5	1:15	1:25
Água Morna (WW)	31,17±15,35 <sup>ab</sup>	26,21±10,97 <sup>ab</sup>	52,25±15,73 <sup>a</sup>
Temperatura Ambiente (RT)	22,90±11,14 <sup>ab</sup>	19,83±4,84 <sup>ab</sup>	9,58±7,53 <sup>c</sup>

1- Tratamento Controle com Sêmen Fresco: 41,90±21,89%

Valores corrigidos de acordo com Carolsfeld et al. 2003

ANOVA Fatorial – Tukey,  $p<0,05$ . Letras diferentes indicam diferença estatística

No experimento II foi verificada diferença entre a interação das diluições com as soluções crioprotetoras (Tabela 2). A regressão linear explica parcialmente as taxas de fertilização obtidas com o aumento da diluição para a solução à base de água de coco em pó (Figura 1), porém, não foi verificada esta relação para a solução padrão ( $B=0$ ), gerando um coeficiente de determinação muito baixo ( $r^2=0,0008$ ).

Tabela 2. Taxa de fertilização (%) utilizando sêmen criopreservado do dourado *Salminus brasiliensis* em diferentes diluições nas soluções crioprotetoras ACP®-104 350 mOsm e padrão para espécie.

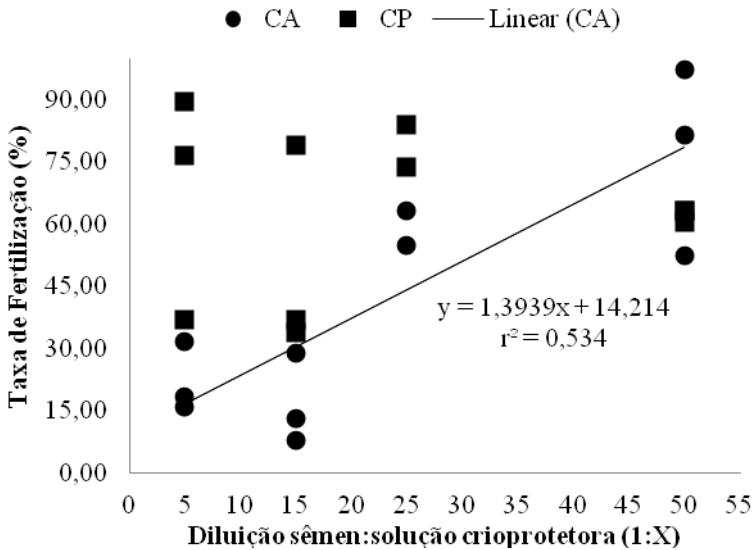
Diluições (sêmen:solução crioprotetora) <sup>1</sup>	Soluções Crioprotetoras	
	ACP®	Padrão
<b>1:5</b>	21,93±8,46 <sup>bc</sup>	67,64±27,43 <sup>ab</sup>
<b>1:15</b>	16,68±10,96 <sup>c</sup>	49,83±25,27 <sup>abc</sup>
<b>1:25</b>	73,56±25,52 <sup>a</sup>	88,49±17,56 <sup>a</sup>
<b>1:50</b>	77,13±22,80 <sup>a</sup>	62,28±1,52 <sup>ab</sup>

1-Tratamento Controle com Sêmen Fresco: 14,62±7,49%

Valores corrigidos de acordo com Carolsfeld et al. 2003

ANOVA Fatorial – Tukey,  $p < 0,05$ . Letras diferentes indicam diferença estatística.

Figura 1. Taxa de fertilização (%) usando sêmen criopreservado do *Salminus brasiliensis* em diferentes diluições utilizando duas soluções crioprotetoras: ACP®-104 350 mOs (CA) e a padrão para espécie (CP).



#### 4. Discussão

Os principais problemas de controle da qualidade do sêmen criopreservado estão associados ao descongelamento e a composição dos crioprotetores, sendo a capacidade de fertilização um dos testes indicados para avaliar esta qualidade (Rurangwa et al., 2004). O descongelamento em água morna mostrou-se mais eficiente, independente da diluição utilizada, possibilitando as maiores taxa de fertilização. Viveiros e Godinho (2009) relatam que, em geral, o sêmen criopreservado de peixes migratórios brasileiros deve ser descongelado de forma rápida em água morna (banho-maria), com a temperatura variando de 30 a 60°C e com duração de 8 a 60 segundos.

Conforme verificado neste estudo, o descongelamento feito em água morna é mais eficaz, mesmo quando a temperatura do ar é elevada e possa ser considerada favorável. Testes de descongelamento realizados por Carolsfeld et al. (2003) com sêmen criopreservado não verificaram diferença entre o descongelamento realizado em banho de água a temperatura ambiente (28-35°C) ou em água quente (40-48°C) para a espécie *Piaractus mesopotamicus*, concluindo que o descongelamento do sêmen na água em ambientes tropicais é rápido e fácil, sem requisito extra de equipamentos para o aquecimento da água. Desta forma, a imersão em água mostra-se cogente para o protocolo de descongelamento, variando a necessidade de controle de temperatura da água de acordo com a temperatura do ambiente onde se realiza a reprodução.

O aumento da diluição apresentou diferente efeito na taxa de fertilização das soluções crioprotetoras testadas, enquanto a solução à base de ACP<sup>®</sup> alcançou maiores taxas de fertilização quando mais diluído o sêmen ( $\geq 1:25$ ), a solução padrão proporcionou em média taxas de fertilização semelhantes independente da diluição testada. Yasui et al. (2012) em estudo com *Misgurnus anguillicaudatus* verificaram que as taxas de fertilização foram reduzidas com adição de cálcio, potássio e magnésio, tendo concluído que, em especial, altas concentrações de potássio devem ser evitadas na preparação de crioprotetores.

A ACP<sup>®</sup> é proveniente da água de coco que é composta por muitos sais minerais, tendo em maior concentração o potássio (175 mg/100mL) e o cálcio (17,5 mg/100 mL), além de outros minerais que aparecerem em menores quantidades (Kwiatkowski et al., 2008; Viveiros et al., 2010). A concentração do íon potássio ( $K^+$ ) varia entre o plasma seminal e os espermatozoides, por exemplo, para ciprinídeos o

conteúdo iônico do  $K^+$  pode estar entre 20 a 87 mMol/L (Alavi e Cosson, 2006).

Em espécies de água doce, o sêmen maduro precisa de um choque hiposmótico para desencadear o início da motilidade dos espermatozoides e, além disso, há outros fatores que afetam na motilidade, como pH, temperatura, concentração de íons e osmolaridade (Islam e Akhter, 2011). Entre estes fatores, a concentração de  $K^+$  é um fator essencial, que em combinação com a pressão osmótica, realiza o controle da motilidade espermática em muitas espécies, sendo que o influxo de  $Ca^{2+}$  e o efluxo de  $K^+$  ou  $Na^+$  através de canais iônicos específicos alteram o potencial de membrana, o que constitui o sinal de início para a motilidade (Alavi e Cosson, 2006). Estudos com diferentes grupos de peixes apontam diferenças nessa interação, podendo concentrações de íon  $K^+$  promover ou inibir a motilidade espermática, como visto para salmonídeos (Morisawa et al., 1983a), ciprinídeos (Morisawa et al., 1983a; Krasznai et al., 1995) e esturjões (Toth et al., 1997; Li et al., 2012). Estudos com uma espécie mais próxima ao dourado, o characiforme sul americano *Brycon henni*, demonstrou que a motilidade foi reduzida drasticamente em concentrações maiores do que 140 mM na ativação induzida com solução de potássio (Tabares et al., 2007).

Os crioprotetores são utilizados para reduzir as injúrias causadas à célula durante o congelamento e descongelamento, sendo divididos em duas categorias: os intracelulares e os extracelulares (Silva e Guerra, 2011). A combinação destes crioprotetores para a formação da solução crioprotetora, assim como a diluição desta solução crioprotetora em relação ao sêmen podem influenciar nas taxas de fertilização, sugerindo que a preparação da solução crioprotetora é provavelmente espécie-específica (Yasui et al., 2012).

A maior concentração de minerais presentes na ACP<sup>®</sup>, quando comparado com a solução padrão, pode estar influenciando na eficácia da solução crioprotetora com ACP<sup>®</sup>, conseqüentemente, nas taxas de fertilização. Assim, parece que somente com o aumento da diluição do sêmen na solução crioprotetora é que os sais contidos no líquido seminal atingem a concentração que favorece o máximo desempenho dos espermatozoides, influenciando positivamente na taxa de fertilização. Aparentemente, esse máximo desempenho dos espermatozoides já é obtido na menor diluição testada com a solução padrão.

Estudos com ACP<sup>®</sup>-104 na diluição de 1:9 (sêmen:solução crioprotetora) para *Prochilodus lineatus* verificaram que o sêmen criopreservado apresentou maior motilidade dos espermatozoides do que

aqueles criopreservados em mistura com glicose, no entanto, a velocidade dos espermatozoides e a taxa de fertilização foi semelhante entre os dois diluidores, concluindo que ambas as substâncias são apropriadas para a criopreservação do sêmen de *P. lineatus* (Viveiros et al., 2010).

Para o *S. brasiliensis* avaliações da qualidade espermática do sêmen criopreservado em solução padrão mostraram maiores valores de motilidade em amostras de sêmen diluídas em solução crioprotetora na proporção de 1:5 do que às amostras diluídas em 1:10 (Viveiros et al., 2009b), e Carolsfeld et al. (2003) recomendam uma diluição entre 1:3 e 1:5 para o sêmen dos peixes sul americanos. Nos experimentos de fertilização para dourado utilizando distintas diluições de solução à base de glicose, gema de ovo e DMSO, quando comparada aos valores obtidos com sêmen fresco, não foi verificada diferença significativa entre as diluições, indicando que a diluição 1:5 é suficiente para obter resultados satisfatórios de fertilização após a criopreservação do sêmen.

Neste trabalho foram obtidas elevadas taxas de fertilização com sêmen criopreservado na solução à base de glicose, chegando em média a valores que variaram entre 49 e 88% dos valores obtidos com o sêmen fresco. O sêmen de dourado criopreservado em solução padrão apresentou valores da taxa de fertilização semelhante ou superior aquelas taxas observadas para outras espécies de characiformes sul americanos, como o *Prochilodus lineatus*, entre 68 e 77% (Carolsfeld et al., 2003) e o *Brycon opalinus*, com valor de 69, 4% (Viveiros et al., 2012).

## 5. Conclusão

O descongelamento do sêmen do dourado *S. brasiliensis* nas condições de realização deste trabalho é mais vantajoso quando feito através da imersão das palhetas em água morna, independentemente da diluição sêmen:solução crioprotetora utilizada.

A solução à base de água de coco em pó (ACP<sup>®</sup>-104) apresentou taxas de fertilização semelhante as obtidas com a solução padrão a base de glicose, gema de ovo e DMSO apenas quando utilizada numa diluição igual ou superior a 1:25 (sêmen:solução crioprotetora). Desta forma, a solução padrão mostra-se mais indicada para a criopreservação de sêmen do dourado, por necessitar de menor quantidade de solução crioprotetora e de espaço para o armazenamento de um mesmo volume de sêmen do dourado, o que reduz os custos na criopreservação e otimiza o espaço disponível.

## 6. Referências

- Alavi, S.M.H., Cosson, J., 2006. Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: A review. *Cell Biology International*. 30, 1-14.
- Bobe, J., C. Labbé, 2010. Egg and sperm quality in fish. *General and Comparative Endocrinology*. 165, 535–548.
- Carneiro, P.C.F., 2007. Tecnologias de produção e armazenamento de sêmen de peixes. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 31,361-366.
- Carolsfeld, J., Godinho, H.P., Zaniboni-filho, E., Harvey, B.J., 2003. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. *Journal of Fish Biology*. 63, 472-489.
- Coser, A.M., Godinho, H., Ribeiro, D., 1984. Cryogenic preservation of spermatozoa from *Prochilodus scrofa* and *Salminus maxillosus*. *Aquaculture*. 37, 387-390.
- Coward, K., Bromage, N.R., Hibbitt, O., Parrington, J., 2002. Gamete physiology, fertilization and egg activation in teleost fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 12, 33–58.
- Cruz-casallas, P.E., Pardo-Carrasco, S.C., Arias-Castellanos, J.A., Lombo-Castellanos, P.E., Lombo-Rodríguez, D.A., Pardo-Mariño, J.E., 2004. Cryopreservation of yamú *Brycon siebenthalae* milt. *Journal of the World Aquaculture Society*. 35, 529-535.
- Islam, M.S., Akhter, T., 2011. Tale of Fish Sperm and Factors Affecting Sperm Motility: A Review. *Advances in Life Sciences*. 1, 11-19.
- Kopeika, E., Kopeika, J., Zhang, T., 2007. Cryopreservation of Fish Sperm, in: Day, J.G., Stacey, G.N. (Eds.), *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*. Series: *Methods in Molecular Biology*, v.368, pp. 203-217.
- Krasznai, Z., Márián, T., Balkay, L., Gáspár Jr., R., Trón, L., 1995. Potassium channels regulate hypo-osmotic shock-induced motility of common carp (*Cyprinus carpio*) sperm. *Aquaculture*. 129, 123-128.



Kwiatkowski, A., Clemente, E., Scarcelli, A., Vida, J.B., 2008. Quality of coconut water “in natura” belonging to Green Dwarf fruit variety in different stages of development, in plantation on the northwest area of Paraná, Brazil. *Journal of Food, Agriculture & Environment*. 6,102-105.

Li, P., Li, Z., Hulak, M., Rodina, M., Linhart, O., 2012. Regulation of spermatozoa motility in response to cations in Russian sturgeon *Acipenser gueldenstaedtii*. *Theriogenology*. 78, 102–109.

Maria, A.N., Viveiros, A.T.M., Freitas R.T.F., Oliveira A.V., 2006. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. *Aquaculture*. 260, 298–306.

Morisawa, M., Suzuki, K., Morisawa, S., 1983a. Effects of potassium and osmolality on spermatozoan motility of salmonid fishes. *Journal of Experimental Biology*. 107, 105-113.

Morisawa, M., Suzuki, K., Shimizu, H., Morisawa, S., Yasuda, K., 1983b. Effects of osmolality and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes. *Journal of Experimental Biology*. 107, 95-103.

Ninhaus-Silveira, A., Foresti, F., Veríssimo-Silveira, R., Senhorini, J.A., 2006. Seminal analysis, cryogenic preservation, and fertility in matrinxã fish, *Brycon cephalus* (Günther, 1869). *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 49, 651-659.

Paniagua-Chávez, C.G., Ortiz-Gallarza, S.M., Aguilar-Juárez, M., 2011. Subsistema Nacional de Recursos Genéticos Acuáticos: uso de la criopreservación para la conservación de los recursos genéticos acuáticos en México. *Hidrobiológica*. 21, 415-429.

Rondon, R.M.M., Rondon, F.C.M., Nunes, J.F., Alencar, A.A., Sousa, F.M., Carvalho, M.A.M., 2008. Uso da água de coco em pó (ACP<sup>®</sup>) em diferentes temperaturas como diluente de espermatozóides de capote (*Numida meleagris*). *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*. 9, 848-854.

Rurangwa, E., Kimeb, D. E., Olleviera, F., Nash, J.P., 2004. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture*. 234, 1-28.

Silva, M.A., Peixoto, G.C.X., Lima, G.L., Bezerra, J.A.B., Campos, L.B., Paiva, A.L.C., Paula, V.V., Silva, A.R., 2012. Cryopreservation of collared peccaries (*Tayassu tajacu*) semen using a powdered coconut water (ACP-116c) based extender plus various concentrations of egg yolk and glycerol. *Theriogenology*. 78, 605–611.

Silva, S.V., Guerra, M.M.P. 2011. Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 35, 370-384.

Tabares, J., Rufz, T., Arboleda, L., Olivera, M., 2007. Effect of some ions on sperm activation in *Brycon henni* (Eigenmann 1913). *Acta Biológica Colombiana*. 12, 87 – 98.

Taitson, P.F., Chami, E., Godinho, H.P., 2008. Gene banking of the neotropical fish *Leporinus obtusidens* (Valenciennes, 1836): A protocol to freeze its sperm in the field. *Animal Reproduction Science*. 105, 283–291.

Toth, G.P., Ciereszko, A., Christ, S.A., Dabrowski, K., 1997. Objective analysis of sperm motility in the lake sturgeon, *Acipenser fulvescens*: activation and inhibition conditions. *Aquaculture*. 154, 337-348.

Velasco-Santamaría, Y.M., Medina-Robles, V.M., Cruz-Casallas, P.E., 2006. Cryopreservation of yamú (*Brycon amazonicus*) sperm for large scale fertilization. *Aquaculture*. 256, 264–271.

Viveiros, A.T.M., Maria, A.N., Orfão, L.H., Carvalho, M.A., Nunes, J.F., 2008. Powder coconut water (ACP-104) as extender for semen cryopreservation of Brazilian migratory fish species. *Cybium*. 32, suppl. 215.

Viveiros, A.T.M., Godinho, H.P., 2009. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. *Fish Physiology and Biochemistry*. 35, 137–150.

Viveiros, A.T.M., Orfão, L.H., Maria, A.N., Allaman, I.B., 2009a. A simple, inexpensive and successful freezing method for curimba *Prochilodus lineatus* (Characiformes) semen. *Animal Reproduction Science*. 112, 293–300.

Viveiros, A.T.M., Oliveira, A.V., Maria, A.N., Orfão, L.H., Souza, J.C., 2009b. Sensibilidade dos espermatozoides de dourado (*Salminus brasiliensis*) a diferentes soluções crioprotetora. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 61, 883-889.

Viveiros, A.T.M., Nascimento, A.F., Orfão, L.H., Isaú, Z.A., 2010. Motility and fertility of the subtropical freshwater fish streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) sperm cryopreserved in powdered coconut water. *Theriogenology*. 74, 551–556.

Viveiros, A.T.M., Orfão, L.H., Nascimento, A.F., Corrêa, F.M., Caneppele, D., 2012. Effects of extenders, cryoprotectants and freezing methods on sperm quality of the threatened Brazilian freshwater fish pirapitinga-do-sul *Brycon opalinus* (Characiformes). *Theriogenology*. 78, 361–368.

Weingartner, M., Zaniboni-Filho, E., 2010. Biologia e cultivo do Dourado, in: Baldisserotto, B., Gomes, L.C. (Orgs), *Espécies Nativas para Piscicultura no Brasil*. Editora UFSM, Santa Maria, pp. 245-281.

Yasui, G. S., Fujimoto, T., Arias-Rodriguez, L., Takagi, Y., Arai, K., 2012. The effect of ions and cryoprotectants upon sperm motility and fertilization success in the loach *Misgurnus anguillicaudatus*. *Aquaculture*. 344-349, 147–152.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com a realização deste estudo foi possível avaliar distintos detalhes no método de criopreservação do sêmen de peixes, buscando aperfeiçoar esta técnica para a espécie *S. brasiliensis*, o dourado.

Foi observado que o uso da indução hormonal possibilitou maior fluidez do sêmen para o dourado, facilitando o manuseio para a criopreservação, não afetando a motilidade e vigor espermático quando comparado ao sêmen obtido de machos não-induzidos.

O vigor espermático do sêmen criopreservado do dourado não foi afetada pelo uso de diferentes ativadores (água destilada, NaHCO<sub>3</sub> 1% ou NaCl 0,45%), mas o tempo de motilidade foi superior com a solução de NaCl 0,45%. No entanto, testes de fertilização são recomendados para avaliar o efeito dessas soluções sobre a interação ovócito/espermatozoide.

No descongelamento, a imersão em água quente apresentou melhores resultados do que somente descongelar em exposição com o ar em temperatura ambiente. A diluição do sêmen fresco do dourado em relação às soluções crioprotetoras apresentou diferentes efeitos, uma vez que a solução à base de água de coco em pó (ACP<sup>®</sup>-104) alcançou maior motilidade espermática e melhores taxas de fertilização com o aumento da diluição, enquanto que a solução padrão à base de glicose, gema de ovo e DMSO apresentou resultado semelhante independente da variação da diluição.

Assim, indica-se para a criopreservação do sêmen do dourado o uso da solução crioprotetora padrão, que além de produzir resultados iguais ou superiores de motilidade espermática e de taxa de fertilização em relação ao ACP<sup>®</sup>-104, não foi afetada pela diluição sêmen:solução crioprotetora, o que reduz os custos da criopreservação do sêmen por necessitar de menor quantidade de solução crioprotetora e de espaço para o armazenamento de um mesmo volume de sêmen do dourado.

Estudos futuros são importantes para garantir taxas de fertilização na reprodução induzida com sêmen criopreservado similares àquelas obtidas com sêmen fresco. Assim, além dos resultados alcançados neste trabalho, recomenda-se a continuidade dos estudos testando protocolos de descongelamento, como diferentes temperaturas da água e tempos de imersão. Outro ponto interessante para ser acompanhado é em relação ao armazenamento, verificando tempo máximo de permanência em botijões de vapor de nitrogênio (dry shipper) e a qualidade do sêmen criopreservado ao longo do tempo após ser guardado em botijões de nitrogênio líquido.

## REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

CARNEIRO, P.C.F. Tecnologias de produção e armazenamento de sêmen de peixes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 3, p. 361-366. 2007.

CAROLSFELD, J., GODINHO, H.P., ZANIBONI-FILHO, E. e HARVEY, B.J. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. **Journal of Fish Biology**, v. 63, n. 2, p. 472-489. 2003.

COSER, A.M., GODINHO, H. e RIBEIRO, D.. Cryogenic preservation of spermatozoa from *Prochilodus scrofa* and *Salminus maxillosus*. **Aquaculture**, v. 37, p. 387-390. 1984.

CRUZ-CASALLAS, P.E., PARDO-CARRASCO, S.C., ARIAS-CASTELLANOS, J.A., LOMBO-CASTELLANOS, P.E., LOMBO-RODRÍGUEZ, D.A. e PARDO-MARIÑO, J.E.. Cryopreservation of yamú *Brycon siebenthalae* milt. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 35, n. 4, p. 529-535. 2004.

FARIAS, J.O., NUNES, J.F., CARVALHO, M.A.M. e SALGUEIRO, C.C.M. 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**, v.1, n.1, p. 44-58. 1999.

FELIZARDO, V.O., MELLO, R.A., MURGAS, L.D.S., ANDRADE, E.S., DRUMOND, M.M. e ROSA, P.V.. Effect of cryopreservant combinations on the motility and morphology of curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm. **Animal Reproduction Science**, v.122, p. 259–263. 2010.

HERRÁEZ, M.P. Criopreservación de Gametos y Embriones. In: CARRILLO, M. (Coord.). **La reproducción de los peces: aspectos básicos y sus aplicaciones en acuicultura**. Madrid: Fundación Observatorio Español de Acuicultura Consejo Superior de Investigaciones Científicas. p. 475-530. 2009.

KOPEIKA, E., KOPEIKA, J. e ZHANG, T. Cryopreservation of Fish Sperm. In: DAY, J.G. e STACEY, G.N. (Ed.). **Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols**. Series: Methods in Molecular Biology, v.368, p. 203-217. 2007.

LIMA, F.C.T. e BRITSKI, H.A. *Salminus franciscanus*, a new species from the rio São Francisco basin, Brazil (Ostariophysi: Characiformes: Characidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 5, n. 3, p.237-244. 2007.

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

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

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

MOTA FILHO, A.C., TELES, C.H.A., JUCÁ, R.P., CARDOSO, J.F.S., UCHOA, D.C., CAMPELLO, C.C., SILVA, A.R. e SILVA, L.D.M.. Dimethylformamide as a cryoprotectant for canine semen diluted and frozen in ACP-106c. **Theriogenology**, v. 76, p.1367–1372. 2011.

MURGAS, L.D.S., FRANCISCATTO, R.T. e SANTOS, A.G.O. Avaliação espermática pós-descongelamento em piracanjuba (*Brycon orbignyanus*, Valenciennes, 1849). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 6, supl. 2, p.1810-1814. 2003.

OLIVEIRA, A.V., VIVEIROS, A.T.M., MARIA, A.N., FREITAS, R.T.F. e IZAÚ, Z.A.. Success of cooling and freezing of pirapitinga (*Brycon nattereri*) semen. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 6, p. 1509-1515. 2007.

- PANIAGUA-CHÁVEZ, C.G., ORTIZ-GALLARZA, S.M. e AGUILAR-JUÁREZ, M. Subsistema Nacional de Recursos Genéticos Acuáticos: uso de la criopreservación para la conservación de los recursos genéticos acuáticos en México. **Hidrobiológica**, v. 21, n. 3, p.415-429. 2011.
- RONDON, R.M.M., RONDON, F.C.M., NUNES, J.F., ALENCAR, A.A., SOUSA, F.M. e CARVALHO, M.A.M. Uso da água de coco em pó (ACP®) em diferentes temperaturas como diluente de espermatozoides de capote (*Numida meleagris*). **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 9, n. 4, p. 848-854. 2008.
- SILVA, M.A., PEIXOTO, G.C.X., LIMA, G.L., BEZERRA, J.A.B., CAMPOS, L.B., PAIVA, A.L.C., PAULA, V.V. e SILVA, A.R.. Cryopreservation of collared peccaries (*Tayassu tajacu*) semen using a powdered coconut water (ACP-116c) based extender plus various concentrations of egg yolk and glycerol. **Theriogenology**, v. 78, p. 605–611. 2012.
- SILVA, S.V. e GUERRA, M.M.P. Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 4, p.370-384. 2011.
- TAITSON, P.F., CHAMI, E. 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**, v. 105, p. 283–291. 2008.
- TIERSCH, T.R., YANG, H., JENKINS, J.A. E DONG, Q. Sperm cryopreservation in fish and shellfish. **Society of Reproduction and Fertility**, suppl. 65, p. 493-508. 2007.
- VIVEIROS, A.T.M, MARIA, A.N., ORFÃO, L.H., CARVALHO, M.A. e NUNES, J.F. Powder coconut water (ACP-104) as extender for semen cryopreservation of Brazilian migratory fish species. **Cybium**, v. 32, n. 2, suppl. 215. 2008.

VIVEIROS, A.T.M., OLIVEIRA, A.V., MARIA, A.N., ORFÃO, L.H. e SOUZA, J.C. Sensibilidade dos espermatozoides de dourado (*Salminus brasiliensis*) a diferentes soluções crioprotetora. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 4, p. 883-889. 2009.

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

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

VIVEIROS, A.T.M., AMARAL, T.B., ORFÃO, L.H., ISAÚ, Z.A., CANEPPELE, D. e LEAL, M.C.. Sperm cryopreservation of tiete tetra *Brycon insignis* (Characiformes): effects of cryoprotectants extenders, thawing temperatures and activating agents on motility features. **Aquaculture Research**, v. 42, p. 858-865. 2010b.

WEINGARTNER, M. **Aperfeiçoamento das técnicas de fertilização de ovócitos de dourado, *Salminus brasiliensis* Cuvier, 1816 (Characiformes: Characidae), utilizando sêmen fresco e congelado durante o processo de reprodução induzida.** 2010. 81 f. Tese (Doutorado em Aquicultura) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

WEINGARTNER, M. e ZANIBONI FILHO, E.. Biologia e cultivo do Dourado. In: BALDISSEROTTO, B. e GOMES, L.C. (Org). **Espécies Nativas para Piscicultura no Brasil**. Santa Maria: Editora UFSM. p. 245-281. 2010.

WEINGARTNER, M., FRACALOSSO, D.M., NUÑER, A.P.O. e ZANIBONI FILHO, E.. Conservação Genética. In: NUÑER, A.P.O. e ZANIBONI FILHO, E. (Org). **Reservatório de Machadinho: peixes, e tecnologia de criação**. Florianópolis: Editora da UFSC. p.241-255. 2012.