

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

MARCELO JOSÉ DA ASCENSÃO FEITOSA VIEIRA

CARACTERIZAÇÃO DO SÊMEN DE TAMBAQUI *Collossoma macropomum*
(Curvier, 1818) E CRIOPRESERVAÇÃO EM DILUENTES À BASE DE
ÁGUA DE COCO EM PÓ (ACP-104)

FORTALEZA
2010

MARCELO JOSÉ DA ASCENSÃO FEITOSA VIEIRA

CARACTERIZAÇÃO DO SÊMEN DE TAMBAQUI *Collossoma macropomum*
(Curvier, 1818) E CRIOPRESERVAÇÃO EM DILUENTES À BASE DE
ÁGUA DE COCO EM PÓ (ACP-104)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Linha de Pesquisa: Reprodução e Sanidade de Onívoros.

Orientador: Prof. Dr. José Ferreira Nunes

Co-Orientadores: Prof. Dra. Carminda Sandra Brito Salmito-Vanderley e Dra. Cristiane Clemente de Mello Salgueiro.

FORTALEZA
2010

V732c Vieira, Marcelo José da Ascensão Feitosa
Caracterização do sêmen de tambaqui *Colossoma macropomum*
(Curvier, 1818) e criopreservação em diluentes à base de água de
coco em pó (ACP-104)/ Marcelo José da Ascensão Feitosa Vieira.
- Fortaleza, 2010
115p;il.
Orientador: Prof.Dr. José Ferreira Nunes.
Tese de Doutorado em Ciências Veterinárias (Reprodução e
Sanidade de carnívoros onívoros e aves) - Universidade Estadual
do Ceará, Faculdade de Veterinária.
1. Peixe. 2. Tambaqui. 3. CASA. 4. Criopreservação. 5. Água
de coco. 6. sazonal. I. Universidade Estadual do Ceará, Faculdade
de Veterinária.

MARCELO JOSÉ DA ASCENSÃO FEITOSA VIEIRA

CARACTERIZAÇÃO DO SÊMEN DE TAMBAQUI *Colossoma macropomum*
(Curvier, 1818) E CRIOPRESERVAÇÃO EM DILUENTES À BASE DE
ÁGUA DE COCO EM PÓ (ACP-104)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Veterinárias.

Aprovada em: ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Ferreira Nunes
Orientador – UECE

Prof. Dr. Arlindo Alencar Araripe Moura
Examinador-UFC

Prof^ª. Dra. Carminda Sandra Brito Salmito-Vanderley
Examinadora-UECE (Co-Orientadora)

Prof. Dr. Manuel de Andrade Furtado Neto
Examinador-LABOMAR/UFC

Dra. Cristiane Clemente de Mello Salgueiro
Examinadora-ACP Biotecnologia(Co-orientadora)

Prof^ª. Dra Ana Cláudia Nascimento Campos
(Suplente-UFC)

A meus pais José do Patrocínio e Clarice
Conserva, a minha esposa Elisa Emília e as
minhas filhas Clarissa Maria e Camila Maria.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus fonte de tudo.

À Universidade Estadual do Ceará, pela oportunidade de realizar meu Curso de Doutorado em Ciências Veterinárias.

À FUNCAP, pela ajuda financeira que tornou possível a execução desta tese.

Ao Núcleo Integrado de Biotecnologia (NIB) pelo acolhimento e amizade e competência de todos.

À Faculdade de Veterinária (FAVET) da Universidade Estadual do Ceará (UECE).

Ao meu orientador Prof. Dr. José Ferreira Nunes, pela disponibilidade e ajuda em todas as ocasiões.

A minha co-orientadora Dra. Cristiane Clemente de Mello Salgueiro, pela permanente ajuda, orientação e paciência.

A minha co-orientadora Prof^ª. Dra. Carminda Sandra Brito Salmito-Vanderley, pela ajuda indispensável e pela competência e coleguismo.

Ao Prof. Dr. Arlindo Alencar Araripe Noronha Moura, pela grande ajuda na elaboração das análises estatísticas e elaboração dos artigos.

À Prof^ª. Dra. Ana Maria Tereza Mendonça Viveiros, pela grande ajuda e contribuição na execução dos trabalhos.

Ao Prof. Dr. Manuel Antonio de Andrade Furtado Neto, por ter gentilmente aceito o convite para participar da defesa desta tese.

A todos os professores do PPGCV, pelos ensinamentos e apóio prestados durante o curso de doutorado.

Aos secretários do PPGCV, Adriana Maria Sales Albuquerque, Ana Cristina Sabóia do Nascimento e Frederico Rocha Cavalcanti, pela gentileza e cortesia permanente, pelo amor, seriedade e respeito pelo ofício que dispensam a todos nós.

A todos os colegas do PPGCV pela convivência e carinho que sempre me dispensaram.

A todos os colegas do Laboratório de Tecnologia do Sêmen Caprino e Ovino, do Núcleo Integrado de Biotecnologia, de maneira especial à Maria Audália Marques de Carvalho, Rodrigo Vasconcelos de Oliveira, José Maurício Maciel Cavalcante, Valdemir Lemos da Silva, Márcia Helena Niza Ramalho Sobral, Nathalie Ommundsen Pessoa, aos

estudantes de iniciação científica Liliane Veras Leite, Francisco Renan Aragão Linhares, Fátima Cássia Evangelista de Oliveira e José Gonzaga da Silva Júnior.

RESUMO

A presente tese teve por objetivo avaliar as características espermáticas do sêmen de tambaqui, com (I) e sem indução (NI) hormonal, por um período de doze meses, elaborar a curva de concentração de espermatozóides de tambaqui através de câmara de Neubauer e espectrofotômetro, assim como analisar as características cinéticas de sêmen de Tambaqui, *C. macropomum* (Curvier, 1818), criopreservado em criosoluções a base de ACP 104[®] ou solução de Ringer, através da análise de sêmen auxiliado por computador (CASA). Foram utilizados 26 machos com idade média de três anos, pertencentes ao Centro de Pesquisas em Aqüicultura (CPAq) do Departamento Nacional de Obras Contra às Secas (DNOCS), devidamente identificados com chips magnéticos. A análise através do (CASA) foi usada para avaliar os efeitos da criopreservação na motilidade dos espermatozóides do tambaqui, diluído em água de coco em pó (ACP-104) e em Ringer modificado para peixes, com dois crioprotetores DMSO e Metilglicol, na concentração de 10%, em três diluições de sêmen (1:3, 1:4 e 1:5) para cada solução contendo diluidor e crioprotetor. Foram avaliados os percentuais de espermatozóides móveis e estáticos, bem como os parâmetros de motilidade espermática e velocidades curvilínea (VCL), velocidade em linha reta (VSL), velocidade média (VAP) e linearidade (LIN), nos diferentes meios e diluições, descongelados 15 dias após congelamento. Encontrou-se os seguintes dados seminais para o sêmen coletado do grupo I e NI, nessa ordem: volume médio de 5,05 mL e 0,55 mL ($p < 0,05$); pH médio de 8,21 e 8,09 ($p > 0,05$); osmolaridade média de 320,51 e 323 mOsm/Kg ($p > 0,05$) e concentração espermática média de $22,93 \times 10^9$ e $40,46 \times 10^9$ sptz/mL ($p < 0,05$). A produção espermática total foi de $115,79 \times 10^9$ sptz/mL no grupo I sendo de $22,25 \times 10^9$ sptz/mL no grupo NI. A concentração espermática individual variou de 11,40 a $71,13 \times 10^9$ espermatozóides/mL. A avaliação da concentração espermática, por espectrofotometria ($\lambda = 540\text{nm}$) mostrou variação de transmitância de 95% a 62,1%, além de uma forte correlação negativa, entre a concentração

espermática em câmara de Neubauer e a transmitância a 540 nm. A mensuração da concentração gerou equação $Y = 100,293 - 0,509X$; $R^2 = 0,966$, ($p < 0,0001$) SAS 2003, e se mostrou eficiente, podendo ser empregada em procedimentos de rotina em laboratório de reprodução artificial de peixes. Os resultados obtidos com o diluente à base de água de coco em pó (ACP-104) se mostraram superiores em relação ao meio Ringer em relação à quantidade de espermatozóides móveis, ($45,63\% \pm 3,58$ e $30,64\% \pm 2,67$, respectivamente, $p < 0,05$) e quando se comparou os dois diluidores com os crioprotetores DMSO (dimetilsulfóxido) e metilglicol, o ACP-104 também mostrou resultados superiores aos obtidos com a solução de Ringer ($56,18\% \pm 5,29$ e $34,52\% \pm 3,49$, respectivamente, ($p < 0,05$). Diante do exposto conclui-se que a indução hormonal se faz necessária para facilitar a manipulação seminal no tambaqui, não alterando as características do sêmen do mesmo. A determinação da concentração espermática através da espectrofotometria ($\lambda = 540\text{nm}$) nesta espécie é eficiente. Os resultados encontrados nesse estudo mostraram a superioridade do ACP-104[®] como meio diluente para criopreservação do sêmen do tambaqui, sendo, portanto, indicado para a criopreservação nesta espécie.

Palavras chaves: Peixe. Tambaqui. CASA. Criopreservação. Água de coco em pó. ACP.

ABSTRACT

The present thesis had the objective to evaluate the spermatic characteristics of tambaqui, *C. macropomum* (Curvier, 1818) semen with (I) and without (NI) hormonal induction, by a period of twelve months, formulate the concentration curve of tambaqui sperm by Neubauer chamber and spectrophotometer, as well as analyze the kinetic characteristics of tambaqui semen cryopreserved in extenders based on ACP 104® or Ringer solution, through the sperm analysis assisted by computer (CASA). In this work were utilized 26 males with an average age of three years, belonging to Research Center in Aquaculture (CPAq) of the National Department of Works Against the Droughts (DNOCS) and identified by magnetic chips. The CASA system analysis was used to evaluate the cryopreservation effects on sperm motility diluted in powder coconut water (ACP-104) solution and Ringer solution modified for fish, associated with two cryoprotectors Dimethyl sulfoxide (DMSO) and Methyl glycol, in concentrations of 10%, and three dilutions rates semen: extender (1:3, 1:4 and 1:5). The analysis evaluated the percentage of motile spermatozoa, as well as the velocity parameters as curvilinear velocity (VCL), straight line velocity (VSL), average path velocity (VAP) and linearity (LIN), in the different dilutions medium and thawed 15 days after storage. The results showed the following average seminal characteristics in the groups I and NI in that order: volume of 5.05 mL and 0.55 mL ($p < 0,05$); pH of 8,21 and 8,09 ($p > 0,05$); osmolarity of 320.51 and 323 mOsm/kg ($p > 0.05$) and spermatic concentration of 22.93×10^9 and 40.46×10^9 sptz/ml ($p < 0,05$). The total spermatic production was 115.79×10^9 sptz/ml in the I group and 22.25×10^9 sptz/mL in the group NI. The individual sperm concentration varied of 11.40 to $71,13 \times 10^9$ spermatozoa/ml. The sperm concentration analysis by spectrophotometer ($\lambda = 540\text{nm}$) showed transmittance in the range of 95% to 62,1%. A strong negative correlation was observed between the spermatic concentration in Neubauer chamber and transmittance in 540 nm. The measurement of sperm concentration generated the equation $Y = 100,293 -$

0,509X; $R^2 = 0.966$, ($p < 0,0001$) SAS 2003. The results obtained with extenders based on powdered coconut milk (ACP-104) were higher than Ringer solution in relation to motile spermatozoa quantity ($45,63\% \pm 3,58$ and $30,64\% \pm 2,67$), respectively, ($p < 0,05$) and when compared the two diluents with the cryoprotectors DMSO (dimetilsufóxido) and metilglicol, the ACP-104 also showed results higher than obtained with Ringer solution ($56,18\% \pm 5,29$ and $34,52\% \pm 3,49$, respectively, $p < 0,05$). This work concluded that the hormonal induction is necessary to facilitate the manipulation the tambaqui semen. Moreover, the hormonal induction didn't alter the seminal characteristics. The determination of spermatic concentration through spectrophotometer ($\lambda = 540\text{nm}$) is an efficient and rapid method being able to be employed in procedures of routine in laboratory of artificial reproduction of fish. The superiority of the ACP-104® as diluent for cryopreservation of tambaqui sperm in this study suggest the ACP104 can be routinely used in the cryopreservation semen of this specie.

Key Words: Fish. Tambaqui. CASA. Cryopreservation. Powder coconut water. ACP.

LISTA DE FIGURAS

7 CAPÍTULO 2

- Figura 1 - Curva de concentração de sêmen de tambaqui (*C. macropomum*), criado em cativeiro após indução hormonal (EPC: 2mg/kg de peso vivo, intra celomático), obtida mediante correlação entre ao percentual de transmitância em espectrofotômetro ($\lambda = 540\text{nm}$) e concentração espermática obtida em câmara de Neubauer ($\text{Nx}10^9\text{sptz/mL}$). Pentecoste, Ceará, Brasil 63

8 CAPÍTULO 3

- Figure 1 - Effects of Crioextenders ACP and Ringer on the percentage of motile sperm tambaqui *C. macropomum* (Cuvier, 1818) after thawing, analyzed with the aid of computer SCA-CASA. (P <0.05)..... 78
- Figure 2 - Figura 2. Effects of Crioextenders ACP and Ringer on the pattern of motility sperm tambaqui *C. macropomum* (Cuvier, 1818) after thawing, analyzed with the aid of computer SCA-CASA. (P <0.05)..... 78
- Figure 3.- Effects of Crioextenders ACP and Ringer on the parameters of velocity: curved line (VCL), Rectilinear (VSL), Average (VAP) and linearity (LIN) of spermatozoa of tambaqui *C. macropomum* (Cuvier, 1818) after thawing, analyzed with the aid of computer SCA-CASA. (P<0.05)..... 79
- Figure 4.- Effects of Cryoprotector DMSO e Metilglicol on the percentage of motile sperm tambaqui *C. macropomum* (Cuvier, 1818) after thawing, analyzed with the aid of computer SCA-CASA. (P <0.05)..... 79
- Figure 5 - Effects of Cryoprotector DMSO e Metilglicol on the pattern of motility sperm tambaqui *C. macropomum* (Cuvier, 1818) after thawing, analyzed with the aid of computer SCA-CASA. (P <0.05)..... 80
- Figura 6 - Effects of Cryoprotector DMSO e Metilglicol on the parameters of velocity: curved line (VCL), Rectilinear (VSL), Average (VAP) and linearity (LIN) of spermatozoa of tambaqui *C. macropomum* (Cuvier, 1818) after thawing, analyzed with the aid of computer SCA-CASA. (P <0.05). 80

Figura 7 - Figura 7. Effects of dilution rates in crioextenders ACP and Ringer on the percentage of motile sperm tambaqui *C. macropomum* (Cuvier, 1818) after thawing, analyzed with the aid of computer SCA-CASA. (P <0.05).....

81

LISTA DE TABELAS, GRÁFICOS E QUADROS

6 CAPÍTULO 1

Tabela 1 - *Média e desvio padrão dos parâmetros seminais do tambaqui C. macropomum nos grupos induzido (I) e não induzido (NI) hormonalmente com 2 mg/ECP/Kg/PV, Pentecoste, Ceará, Brasil.* [Mean and standard deviation of tambaqui C. macropomum seminal parameters into hormonally induced (I) and no-induced (NI) groups with 2 mg/ECP/Kg/AW, Pentecoste, Ceará, Brazil] 45

Gráfico 1 - *Parâmetros seminais do tambaqui C. macropomum nos grupos induzido (I) e não induzido (NI) hormonalmente com 2 mg/ECP/Kg/PV no período de abril de 2007 a abril de 2008, em Pentecoste, Ceará, Brasil quanto a: (A) Osmolaridade, (B) Concentração espermática, (C) Volume seminal e (D) pH.* [Tambaqui C. macropomum seminal parameters into hormonally induced (I) and no-induced (NI) groups with 2 mg/ECP/Kg/AW during the period between April 2007 to April 2008, at Pentecoste, Ceará, Brazil related to: (A) Osmolarity, (B) Spermatic concentration, (C) Seminal volume, and (D) pH] 46

7 CAPÍTULO 2

Tabela 1 - Percentual de transmitância (%T) obtido no espectrofotômetro ($\lambda = 540\text{nm}$) e a concentração espermática (sptz/mL em $\text{Nx}10^9$), obtida por contagem em câmara de Neubauer, de tambaqui em cativeiro, sob indução hormonal (EPC: 2 mg/kg). Pentecoste, Ceará, Brasil 61

Tabela 2 - Percentuais de transmitância em espectrofotômetro ($\lambda = 540\text{nm}$) e concentração espermática em câmara de Neubauer ($\text{Nx}10^9$ sptz/mL), mostrados individualmente por animal doador (*C. macropomum*) de sêmen, após indução hormonal (EPC: 2mg/kg). Pentecoste, Ceará, Brasil 62

8 CAPÍTULO 3

Tabela 1 - Percentage motility of tambaqui spermatozoa, *C. macropomum* (Cuvier, 1818) cryopreserved on media based on powder coconut water (PCW-104) and Ringer modified for fish, plus DMSO 10% or Metyl glycol 10% into three different dilution rates (1:3; 1:4 and 1:5) after thawing and by computed-assisted semen analysis (SCA, version 3.2., Microptic S.L., Spain) 82

9 CAPITULO 4

Quadro 1 - Utilização da Glicose como diluidor na criopreservação de sêmen de peixes caracídeos 90

Quadro 2 - Utilização do BTS (Beeltsville Thawing Solution-MINTUB) como diluidor na criopreservação do sêmen de peixes caracídeos 92

Quadro 3 - Utilização da Água de Coco como diluidor na criopreservação de sêmen de peixes caracídeos 93

Quadro 4 - Utilização de M III, Saad, Kurakura, Ringer como diluidor na criopreservação de sêmen de peixes caracídeos 94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACP-104	Água de Coco em Pó para teleosteos
CASA	Análise de Sêmen Auxiliada por Computador
CPAq	Centro de Pesquisas em Aqüicultura
DIPIS/P	Divisão de Piscicultura / Pesquisas
DNOCS	Departamento Nacional de Obras Contra às Secas
DMA	Dimetilacetaminda
DMSO	Dimetilsufóxido
EPC	Extrato de Pitiuitaria de Carpa
FUNCAP	Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico
LIN	Linearidade
NIB	Núcleo Integrado de Biotecnologia
VCL	Velocidade curvilinear
VSL	Velocidade em linha reta
VAP	Velocidade média

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 REPRODUÇÃO DE TAMBAQUI.....	18
2.2 CARACTERÍSTICAS ESPEMÁTICAS.....	19
2.2.1 Importância da concentração espermática.....	20
2.3 CRIOPRESERVAÇÃO SEMINAL.....	20
2.4 DILUIÇÃO SEMINAL.....	22
2.4.1 Diluentes à base de água de coco em pó.....	25
2.5 CRIOPROTETORES.....	27
2.6 DANOS PRODUZIDOS AO ESPERMATOZÓIDE PELA CRIOPRESERVAÇÃO.....	28
2.7 ANÁLISE SEMINAL.....	28
2.8 SISTEMA DE ANÁLISE DE SÊMEN AUXILIADA POR COMPUTADOR (CASA).....	30
3 JUSTIFICATIVA	33
4 HIPÓTESE CIENTÍFICA	34
5 OBJETIVOS	35
5.1 GERAL.....	35
5.2 ESPECÍFICOS	35
6 CAPITULO 1	36
7 CAPITULO 2	48
8 CAPITULO 3	64
9 CAPITULO 4	83
10 CONSIDERAÇÕES FINAIS	100
11 PERSRPECTIVAS	101
12 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102

1 INTRODUÇÃO

O tambaqui *Colossoma macropomum*, (Cuvier, 1818), é um peixe originário da bacia amazônica, nativo dos rios Solimões, Madeira e Orenoco e seus afluentes, com larga distribuição em seus rios, e em áreas próximas a Manaus. A desova desta espécie ocorre, principalmente, nos meses de dezembro a janeiro, coincidindo com as enchentes dos rios Negro e Amazonas. A introdução do Tambaqui no Nordeste do Brasil foi realizada pelo Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS) nos idos de 1972, quando 74 alevinos oriundos de Iquitos (Peru) foram introduzidos nos viveiros do Centro de Pesquisas Ictiológicas (DIPIS/P) do DNOCS localizado em Pentecoste, Ceará, Brasil, (Silva *et al.*, 1984).

A qualidade do sêmen é fundamental para o processo reprodutivo dos tambaqui, pois a contribuição do macho para a eficiência reprodutiva e da produção em cultivo é de grande importância. Isto porque, além do aporte genético, nos machos se pode aplicar uma pressão de seleção maior e mais rápida. Fatores como a concentração espermática, aspecto e volume do ejaculado, são de grande valia para o bom desempenho reprodutivo aliado às qualidades espermáticas e desempenho em relação a movimento massal, velocidade progressiva e percentual de células vivas (Salgueiro & Nunes, 1999).

A utilização de água de coco em pó na criopreservação de sêmen de peixes justifica-se pois, devido a não uniformidade de protocolos e a grande viabilidade os resultados encontrados na literatura necessita-se do desenvolvimento de novas tecnologias.

Os trabalhos de Nunes (1987) demonstraram a viabilidade da água de coco como diluente de refrigeração e congelamento do sêmen caprino, o que levou à elaboração de um meio de conservação, padronizado e estabilizado, à base de água de coco em pó (ACP). Estudos sobre a estabilização da água de coco em pó (ACP) e de suas características físico-químicas são importantes por: contribuir para o conhecimento das substâncias e fatores inerentes à água de coco que protegem os espermatozoides durante a criopreservação e disponibilizar água de coco em centros de pesquisa que não disponham da matéria-prima (coco).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 REPRODUÇÃO DO TAMBAQUI

A reprodução do Tambaqui (*Colossoma macropomum* Cuvier, 1818) ocorre de outubro a março, e a maior concentração de desovas por indução tem prevalência entre os meses de novembro a fevereiro (Kubitza, 2004).

Segundo Vazzoler (1996), nas espécies de desova total, os ovócitos maduros são eliminados durante o período reprodutivo de uma só vez, ao contrário daquelas de desova múltipla ou parcelada que eliminam seus óvulos mais de uma vez, em lotes.

Estudos realizados com tambaqui no baixo Amazonas, mostraram que a espécie possui desova anual e total que ocorrendo em um período determinado do ano (época das enchentes dos rios) (Vivier *et al.*, 1999). O comportamento da espécie é diferente no Nordeste, onde recebendo ração adequada pode desovar o ano inteiro mediante biópsia ovariana e indução hormonal de fêmeas e machos através de injeções de solução contendo hipófise de carpa desidratadas dissolvidas em solução fisiológica, (machos recebem 2 mg/kg/PV em uma só aplicação e fêmea recebe dose de 5 mg/kg/PV dividida em duas aplicações com intervalo de 14 a 18 horas entre cada uma, e a desova acontece 8 a 9 horas após a 2ª dose num período que varia de 240 a 270 horas graus centígrados (H°C) (Kovacs *et al.*, 1993). Os resultados demonstraram que o sêmen do tambaqui *C. macropomum*, Cuvier 1818 coloração leitosa textura acentuadamente viscosa e ma concentração espermática média em torno de 35×10^9 espermatozóides por mililitro (Menezes *et al.*, 2008)

Em espécies aquáticas, de fecundação externa, os espermatozóides são liberados num ambiente hostil quando são ativados, e têm sua sobrevivência por um período muito curto (1 a 2 minutos). No caso de peixes de água doce, por outro lado, o óvulo abre a micrópila por um período muito curto, para permitir a entrada do espermatozóide (menos de 2 minutos). O grande número de espermatozóides no ejaculado é uma grande ajuda nesse processo inicial. A longevidade do espermatozóide após a ativação também é influenciada pela habilidade fertilizante que depende do estresse osmótico que o espermatozóide for exposto: hipotônico para água doce e hipertônico para água do mar (Holt & Van Look, 2004).

Os espermatozóides da maior parte dos peixes teleósteos diferem dos espermatozóides dos mamíferos em quatro importantes aspectos: são imóveis no momento da ejaculação, a mobilidade é induzida no contato com a água, os espermatozóides tornam-se imóveis em menos de dois minutos e não possuem acrossoma (Kime *et al.*, 2001) por não

haver necessidade de romper a barreira celular pois, sua penetração no óvulo acontece através da micrópila, que após a hidratação permanece aberta por aproximadamente dois minutos (Kime *et al.*, 2001). Fenômeno que não acontece em teleósteos de fecundação interna.

2.2 CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS

Embora várias investigações tenham sido feitas sobre a qualidade espermática, a mobilidade sem dúvida é a mais importante, uma vez que espermatozóides com alto padrão de mobilidade constitui um pré-requisito para a fertilização, e apresentam correlação com as taxas de fertilização já estudadas (Rurangwa *et al.*, 2004).

Em muitos peixes teleósteos o espermatozóide é imóvel no trato genital masculino e é ativado depois de liberado na água doce. A estrutura do flagelo é rapidamente desorganizada na água doce e o espermatozóide pára de se movimentar depois de 30 segundos (Billard *et al.*, 1995).

Quando a diluição do sêmen ocorre em solução com osmolaridade de 50 mM de NaCl as trocas osmóticas são suficientes para iniciar a motilidade, porém, o flagelo não é desorganizado e o espermatozóide nada rápido por poucos minutos (Billard *et al.*, 1995).

Os espermatozóides de peixes teleósteos de água doce são quiescentes na osmolaridade do plasma seminal, referida como uma condição isotônica (aproximadamente 300mOsmol/kg). Eles começam a se mover quando suspensos em solução hipotônica (<300 mOsmol/kg) e exibem alta mobilidade (como % de espermatozóides móveis) em água doce (4 mOsmol/kg). De modo oposto os espermatozóides de teleósteos marinhos começam a se mover quando liberados em solução hipertônica (>300 mOsmol/kg), e exibem sua mais alta qualidade aproximadamente em 1000 mOsmol/kg, que é o equivalente ao encontrado na água do mar (Morisawa & Suzuki, 1980).

Farias *et al.* (1999) estudando o volume seminal de tambaquis *C. macropomum* induzidos com GnRH (100µg/Kg/PV) encontraram volumes de seminiais de $5,0 \pm 1,2$ mL, e concentração espermática de $6,00 \times 10^6$ em indivíduos com indução hormonal.

Em surivi (*Steindachneridion scripta*) o sêmen coletado de indivíduos com peso entre 1,8 e 4,7 kg rendeu volumes de 4 a 20 mL, com os espermatozóides apresentando motilidade (no tanque) entre 46 a 75 segundos, diminuindo para 37 a 56 segundos quando do uso da solução de bicarbonato a 1 %. Estes dados mostraram que quando se uso o bicarbonato a atividade espermática é comprometida e que a concentração espermática encontrada variou

de 19,5 a 120,1 milhões por mL (Luz *et al.*, 2001). Enquanto, em outras espécies com menor peso a concentração espermática pode variar numa faixa semelhante.

Ferreira *et al.* (2001), estudando o jundiá (*Randia quelen*) avaliaram indivíduos com peso entre 115 e 200 gramas ($174,67 \pm 40,3$ g), volume seminal entre 0,11 e 1,10 mL ($0,41 \pm 0,37$ mL), motilidade entre 60 e 85% (média 73%), concentração espermática entre 24 e 138 milhões de espermatozoides por mL ($69,9 \pm 37,7 \times 10^6$ spz/mL).

2.2.1 Importância da concentração espermática

A concentração espermática em peixes de diferentes espécies é bastante variada. O alibute do atlântico (*Hippoglossus hippoglossus*), por exemplo, tem seus valores variando de 17 a 20 bilhões de espermatozoides por mL no período de foto-período natural (Babiak *et al.*, 2006).

Kavamoto & Silveira (1986) encontraram concentração de sêmen de bagre (*Rhamdia hilarii*) que variaram de 59 a 67 milhões de espermatozoides por mL durante a estação reprodutiva que vai de setembro a dezembro no Estado de São Paulo.

Andrade-Talmelli *et al.* (2001), em pesquisas com sêmen de piabinha (*Brycon insignis*), encontraram concentrações espermáticas entre 24,43 e 25,10 milhões de espermatozoides por mL durante de exames direto e objetivo de animais induzidos com hormônio.

Navarro *et al.* (2004), obtiveram concentrações espermáticas médias na avaliação de sêmen de cachama branca (*Piaractus brachipomums*) de $17 \pm 1,8$ bilhões de espermatozoides por mL, obtidos 24 a 36 horas após a injeção hormonal mediante a massagem abdominal na direção crânio caudal.

O sêmen do tambaqui apresentou concentração espermática média em torno de 35×10^9 espermatozoides por mililitro (Menezes *et al.*, 2008)

Fatores externos às células espermáticas, tais como, alterações na composição, pH, temperatura e osmolaridade do meio que as circunda, podem provocar alterações irreversíveis em suas membranas limitando a função fertilizante dos espermatozoides (Watson, 2000).

2.3 CRIOPRESERVAÇÃO SEMINAL

Segundo Hunter (1982), a viabilidade de espermatozoides congelados está relacionada a fatores como: o diluente e a concentração de células; o agente crioprotetor adequado e sua concentração no meio, o tempo e a temperatura de equilíbrio, a natureza da curva de resfriamento, a natureza da curva de descongelação, a utilização de um meio de descongelação específico; o modo de eliminar o agente crioprotetor (diluição ou diálise).

Os diluentes permitem o aumento do volume total do ejaculado, facilitando sua divisão em doses inseminantes e, proporcionando um meio favorável para a sobrevivência dos espermatozoides *in vitro* (Derivaux, 1980). Eles diferem em sua composição dependendo da espécie animal de que proceda o sêmen e da tecnologia seminal empregada (Hopkins & Evans, 1991).

Segundo Hopkins & Evans (1991), a sensibilidade dos espermatozoides às mudanças de temperatura se deve a ação protetora do plasma seminal e a integridade da membrana espermática. Esta última relaciona tanto com sua composição lípido-protéica como de colesterol e fosfolípidios (Darin-Bennett & White, 1977).

Alguns diluentes mantêm a viabilidade do sêmen à temperatura ambiente, enquanto que outros se refrigeram entre 4 e 5°C para ajudar a controlar o crescimento bacteriano e reduzir a taxa metabólica das células espermáticas (Hopkins & Evans, 1991).

A maioria dos diluentes apresenta a gema de ovo como componente básico, já que a fosfatidilcolina (lecitina) e lipoproteínas da gema e a caseína do leite protegem os espermatozoides durante o resfriamento, contra o choque térmico (Mies Filho *et al.*, 1982; Das, 1995).

O congelamento do sêmen apresenta dificuldades como a formação de cristais de gelo intra e extracelulares e aumento da concentração de solutos (Mateos-Rex & Aguillar, 1996).

Foram observados diferenças com relação à “congelabilidade” e fertilidade do sêmen entre indivíduos e entre ejaculados de um mesmo indivíduo (Watson, 1981). A comparação entre os métodos e protocolos de congelação-descongelação do sêmen é difícil devido aos diferentes parâmetros envolvidos e à falta de uniformidade nas metodologias (Leboeuf *et al.*, 2000).

Várias atividades podem ser otimizadas com o uso de sêmen resfriado e congelado, incluindo sua obtenção em tempos e locais diferentes e utilização em programas de melhoramento genético. Não obstante os progressos obtidos na criopreservação de sêmen

de peixes, os resultados práticos obtidos ainda estão sujeitos a grandes variações, resultando na necessidade do desenvolvimento de tecnologias.

Para permitir que a criopreservação de sêmen de peixe se torne uma técnica eficiente, rotineira, há necessidade de informações muito mais detalhadas. Lahnsteiner *et al.* (2003) estudaram várias técnicas de fertilização e taxas de concentração espermática por dose fecundante do *Chalcalburnus chalcalburnus* obtiveram taxas de fertilização de 77-92% com proporções de ovo/espermatozóide de 1:1,3 a 2,5 milhões, sendo semelhante para outras espécies pesquisadas.

2.4 DILUIÇÃO SEMINAL

A composição do diluente é um dos fatores que afetam à proporção de espermatozóides vivos após a congelação-descongelação (Watson, 1995). Uma das grandes metas da biotecnologia da reprodução de peixes é a de encontrar um bom diluente para a criopreservação do sêmen.

Hafez (2004) sugere que um diluente deve ter as seguintes características: proporcionar nutrientes como fonte de energia; proteger os espermatozóides do efeito maléfico do frio; proporcionar um meio tampão; manter a pressão osmótica adequada; inibir o crescimento bacteriano; aumentar o volume do ejaculado; proteger as células espermáticas durante a congelação.

Os diluentes para congelação devem possuir: uma substância orgânica que atue como crioprotetor externo e que proteja as células contra o choque térmico que se produz ao resfriar o sêmen desde os 20°C aos 5°C: gema de ovo ou leite desnatado; uma fonte de energia: glicose ou frutose; um componente tampão: citrato de sódio ou tris-hidroximetilaminometano (TRIS); um crioprotetor interno que proteja aos espermatozóides durante a congelação: glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO), etilenoglicol; açúcares como a lactose e rafinose, um antibiótico para prevenir o crescimento bacteriano: penicilina, estreptomicina ou gentamicina.

Normalmente se utilizam dois tipos de diluentes, de refrigeração e de congelação. O diluente de refrigeração não contém crioprotetor já que este, à temperatura ambiente, é muito tóxico para os espermatozóides.

Viveiros *et al.* (2000) estudando a criopreservação de sêmen de bagre africano (*Clarias gariepinus*), usando 10% de metanol e 5% de DMSO testaram a melhor taxa de

diluição após o descongelamento nas proporções de 1:20, 1:200 e 1:2000 antes da fertilização. Os resultados mostraram que não houve diferença significativa em nível de 5% entre as médias de eclosão entre espermatozóides congelados e frescos. Taxas de eclosão mais altas foram registradas para espermatozóides congelados e com 10% de metanol e em resfriamento lentos de -2, -5 e -10°C/minuto para varias temperaturas numa faixa de -25 a -70°C antes de congelar rapidamente. O protocolo que ofereceu um resultado mais significativo foi quando os espermatozóides foram congelados nas condições de 10% de metanol com uma taxa de resfriamento de -5°C por minuto em 5 minutos até -40°C para depois ser transferido para nitrogênio líquido (NL) e descongelamento a 60°C por 8 segundos numa taxa de diluição de 1:200. Neste protocolo não houve nenhuma diferença significativa na taxa de eclosão quando comparado aos espermatozóide fresco.

Com o objetivo de desenvolver um método de criopreservação de sêmen de Turbot (*Scophthalmus maximus*) e comparar as características de motilidade espermática, estado metabólico e capacidade de fertilização descongelado e fresco, Dreanno *et al.* (1997) obtiveram os melhores resultados quando o sêmen foi diluído numa proporção de 1:2 em diluente de Mounib modificado complementado com 10% de BSA e 10% de DMSO. As amostras de sêmen diluídas foram envasados em palhetas distantes 6,5 cm da superfície do nitrogênio líquido (NL), sendo então armazenadas em NL. As palhetas foram descongeladas em banho-maria a 30°C durante 5 segundos. Uso deste método simples resultou em uma taxa de 60 a 80% de reativação do espermatozóide descongelado. O processo de criopreservação diminuiu significativamente o conteúdo de ATP intracelular. A taxa de fertilização de espermatozóide congelado-descongelado foi significativamente menor que do espermatozóide fresco, mas aumentou com a concentração do sêmen. Embora a porcentagem de espermatozóides móveis nas amostras de sêmen congelado-descongelado fossem significativamente menor que as do sêmen fresco, a velocidade do espermatozóide e a taxa respiratória permaneceram inalteradas.

Em estudo realizado por Babiak *et al.* (1999) foi avaliado o efeito de gema de ovo, lipoproteína de baixa densidade (LDL) e metilxantina (cafeína e teofilina) em diluentes para avaliar a eficiência da fertilização na criopreservação de sêmen de *Esox lucios*. O diluente consistia em 0,6 de sacarose acrescida de 15% de DMSO e gema de ovo ou LDL. Os resultados mais efetivos foram de 77,3% de eclosão de larvas contra 74,1% do grupo controle. A presença da cafeína na solução de descongelamento baixou a taxa de fertilização dos espermatozóides criopreservados significativamente, considerando que a teofilina não afetou

estes resultados de maneira significativa. A adição de gema de ovo não alterou estes resultados.

Em experimentos relativos à criopreservação de sêmen de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.), variedade Chitralada, com diferentes diluentes e soluções ativadoras pós-descongelamento, utilizando soluções crioprotetoras contendo DMSO e metanol nas concentrações de 5, 10 e 15% respectivamente, os diluentes preparados com combinações de DMSO, gema de ovo e metanol com leite em pó, associado à glicose e água destilada mostraram-se igualmente adequados para o congelamento de sêmen desta espécie. As proporções de diluente:sêmen satisfatórias foram 1:1; 1:4; 1:9 e podem ser utilizadas com igual sucesso na ativação da motilidade espermática do sêmen descongelado (Godinho *et al.*, 2003).

Babiak *et al.* (2001) estudaram os efeitos da composição de diluentes e tempo de equilíbrio para a habilidade de fertilização do espermatozóide criopreservado de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), observaram que o diluente Erdahl & Graham + 10% DMA (dimetil acetamida + 10% gema de ovo e 0,3 M de glicose) apresentou as mais altas taxas de fertilização pós-descongelamento, foram detectadas neste estudo interações entre os componentes do diluente e o equilíbrio do sêmen diluído, indicando o efeito multifatorial dos componentes dos diluentes com relação à resistência dos espermatozóides contra os criodanos, tanto para diluentes à base de DMA, como de DMSO (dimetil acetamida e dimetil sulfoxido) respectivamente. Cada fator foi testado separadamente, sendo comprovado que estes produzem efeitos cumulativos.

Criopreservando sêmen de peixe teleósteo da família gadidae, o Burbot (*Lota lota*) Lahnsteiner *et al.* (2002) obtiveram motilidades espermáticas médias de $46,6 \pm 8,0\%$, contra $86,5 \pm 8,2\%$ do sêmen fresco (controle). A fertilidade observada foi de $78,1 \pm 2,7\%$ no sêmen criopreservado e de $82,2 \pm 2,9\%$ em sêmen fresco, utilizando 10% de metanol, 1,5% de glicose e 7% de gema de ovo em palhetas de 0,5 mL a uma distância de 1 cm do nível do nitrogênio líquido (NL) e descongeladas em banho-maria a 25°C por 20 segundos. A proporção ovo:espermatozóide foi de 1:1,7 milhões. A fertilização com sêmen criopreservado não teve nenhuma influencia no desenvolvimento embrionário, bem como com os embriões que pararam seu desenvolvimento e em relação às más formações embrionárias que eram semelhantes ao sêmen fresco.

Métodos de criopreservação rápida e estocagem de sêmen foram utilizados no sêmen fresco de *Latris trumpeter* a 18°C. O percentual de espermatozóides móveis declinou

rapidamente de 80%, imediatamente após a ativação com água do mar, para menos de 2% em nove minutos depois da ativação. A motilidade após ativação do sêmen fresco não diluído estocado a 5°C foi mantida por dois dias e declinou marcadamente no oitavo dia, ficando imóvel após a ativação. A motilidade pós-descongelação foi alta para a diluição média de 1:5 (sêmen :diluente). Após a descongelação a motilidade espermática foi similar a outros padrões de congelação rápida usando o DMSO como crioprotetor e com a osmolaridade da água do mar em 300 mOsm/Kg (Ritar *et al.*, 2000).

2.4.1 Diluentes à base de água de coco

A água de coco (*Cocos nucifera* L.) é uma solução ácida, natural e estéril, composta de sais, proteínas, açúcares, vitaminas, gorduras neutras (Nunes & Combarous, 1995), além de indutores da divisão celular e eletrólitos diversos, que conferem densidade e pH compatíveis com o plasma sanguíneo, proporcionando, os nutrientes necessários para manter a sobrevivência e viabilidade de gametas masculinos e femininos criopreservados (Blume & Marques Jr., 1994).

A água de coco tem sido utilizada em biotecnologias da reprodução animal, tendo sido obtidos bons resultados com a utilização da água de coco na preservação do sêmen de animais domésticos como caprinos (Salles, 1989), ovinos (Araújo, 1990), suínos (Toniolli & Mesquita, 1990) e caninos (Montezuma Jr. *et al.*, 1994).

Nunes (1986, 1987), avaliando o sêmen caprino após duas horas de incubação a 37°C, observou que tanto a motilidade individual progressiva (MIP) como a porcentagem de espermatozoides móveis (PEM) eram superiores quando o sêmen se diluía em uma solução baseada em água de coco, que quando se diluía em leite desnatado. A motilidade individual progressiva dos espermatozoides diluídos em água de coco quando comparados aos diluídos em leite glicosado foi superior ao final de duas horas de incubação (Nunes & Salgueiro, 1999).

Resultados similares foram obtidos ao se utilizar ambos os diluentes na refrigeração de sêmen a 4°C e em seu uso para inseminação artificial em cabras nas que se haviam sincronizado o estro com tratamentos hormonais (Nunes, 1986). Com o uso da inseminação artificial com sêmen caprino diluído em água de coco e refrigerado a 4°C foram obtidas taxas de parição superiores a 60% (Nunes, 1986).

Freitas (1988) observou 55,6% de fêmeas contra 44,4% de machos nascidos de partos de cabras inseminadas com sêmen diluído em água de coco. Salles (1989) inseminou 78 cabras com sêmen resfriado a 4°C e diluído em água de coco na forma *in natura*, estabilizada e de gel, observando as respectivas taxas de partições: 63,15%, 87,50% e 92,59%. Com relação à proporção sexual, foram obtidos valores de 83,33%, 76,00% e 67,89% de fêmeas nascidas, segundo a forma da água de coco utilizada: *in natura*, estabilizada e de gel, respectivamente.

Tratando de determinar a fração da água de coco que atua sobre os espermatozoides, Nunes *et al.* (1994) isolaram uma molécula pertencente ao grupo das auxinas, o ácido 3-indol-acético (IAA), que ativa o metabolismo dos espermatozoides. A presença do IAA pode variar com o estágio de maturação e a espécie do fruto e influenciar nos resultados *in vitro* e *in vivo* em sêmen diluído em água de coco (Nunes & Salgueiro, 1999).

A introdução do IAA na composição dos diluentes convencionais do sêmen de diferentes espécies conferiu aos espermatozoides um aumento de motilidade, maior taxa de fertilidade, além de permitir sua conservação durante períodos mais prolongados (Nunes *et al.*, 1994).

Araújo & Nunes (1991) avaliando o sêmen caprino diluído e congelado em água de coco *in natura* com gema de ovo (10%) e sem gema, verificaram após a descongelação que a adição da gema de ovo conferiu uma maior sobrevivência espermática “*in vitro*”. Salgueiro *et al.* (2005) avaliando o sêmen caprino diluído e congelado com água de coco em pó com 2,5 % de gema de ovo e 7% de glicerol obtiveram média, após cinco minutos de descongelação, quanto a porcentagem de espermatozoides móveis e motilidade individual progressiva de 33% e 2,48, respectivamente.

A água de coco foi utilizada como diluente de sêmen de carpa (*Cyprinus carpio* L.) objetivando o prolongamento da motilidade espermática sendo comparada com a solução de Alsever modificada (cloreto de sódio 4,2g; citrato sódio 5%; ácido cítrico 0,5g; dextrose 20,50g; água destilada 1000 mL), ambos com a osmolaridade média de 150 mOsm/Kg, sendo observado melhores resultados quando do uso da água de coco (Carvalho *et al.*, 2002).

Farias *et al.* (1999) utilizaram a água de coco “*in natura*” em quatro diferentes osmolaridades (100, 125, 150 e 300 mOsm/Kg) como diluente de sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum* CUVIER, 1818) em temperatura ambiente, observando que as

osmolaridades de 125 e 150 mOsm/Kg aumentam a motilidade e sobrevivência espermática, em comparação com a água “in natura” (água do tanque).

2.5 CRIOPROTETORES

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

Fresneda *et al.* (2004), estudando a cachama branca (*Piaractus brachypomus*), utilizaram como crioprotetor DMSO a 5% e Metanol a 8% em protocolos de congelamento em peixes com e sem indução hormonal, não encontrando resultados significativos em relação à fecundação de óvulos, independentemente do tratamento. No entanto, os resultados diferiram quando foi comparada a fertilização e a eclosão de larvas dependendo da fêmea utilizada.

Medena-Robles *et al.* (2005), estudando a taxa de congelação-descongelação de sêmen de *Brycon amazonicum*, utilizando 10% de DMSO, acondicionado em palhetas de 0,25 ou 4,0 mL, e descongelado em banho-maria a 35°C, observaram maior motilidade e maiores taxas de fertilidade naquele sêmen que foi acondicionado em palhetas de 0,25 mL.

Navarro *et al.* (2004), utilizaram DMSO e Metanol nas concentrações de 5, 10 e 15% para criopreservação de sêmen de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), e observaram que os tratamentos que melhor preservaram os espermatozóides foram aqueles que utilizaram a concentração de 10% de crioprotetor (DMSO ou Metanol).

Fabbrocini *et al.* (2000) visando otimizar protocolos de congelação de espermatozóides de “sea bream” (*Sparus aurata*) testaram cinco crioprotetores: dimetil sulfóxido, etilenoglicol, propileno glicol, glicerol e metanol, em concentrações entre 5 e 15%, obtendo melhores resultados com o DMSO a 5% e com o propilenoglicol e o etileno glicol ambos a 10%.

Estudando a possibilidade de estocagem à longo prazo (criopreservação em nitrogênio líquido) do sêmen de “ocean pout” (*Macrozoarces americanus*), peixe marinho de fecundação interna, e as mudanças na motilidade, estrutura do espermatozóide e fertilidade após congelação-descongelação, Yao *et al.* (2000) utilizaram quatro crioprotetores, incluindo o DMSO, e três diluentes e concluíram que o DMSO a 10% resultou em 20 a 25% de

espermatozoides móveis com fertilidade em ovos frescos de 33% contra 48 a 58% para o sêmen fresco.

Maria *et al.* (2006) desenvolveram protocolos para armazenamento de sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) a fresco, a 4°C e criopreservados a -196°C e observaram que o metilglicol foi o crioprotetor mais efetivo quando comparado com o DMSO e o metanol com relação à motilidade espermática. Já com relação à porcentagem de espermatozoides vivos, não houve diferença significativa entre os crioprotetores utilizados.

2.6 DANOS PRODUZIDOS AO ESPERMATOZÓIDE PELA CRIOPRESERVAÇÃO

Durante os processos de congelação-descongelação os espermatozoides são submetidos a condições desfavoráveis como: desidratação, mudanças da fase de transição dos fosfolípidios da membrana, efeito solução e formação de gelo intracelular, (Parks & Graham, 1992).

A consequência imediata destes processos é a ruptura da membrana plasmática (Watson, 1995) devido aos estresses térmico, mecânico, químico e osmótico exercidos sobre a célula durante a congelação (Parks & Graham, 1992). O acrossoma também pode sofrer mudanças estruturais e degenerativas, como ruptura da membrana acrossomal (Hafez, 1995).

O resfriamento deve ser suficientemente lento para minimizar a formação de cristais de gelo intracelular e o suficientemente rápido para tornar mínimo o dano do “efeito solução” (Watson, 1995).

Os danos causados pela criopreservação de sêmen de peixe de água doce têm sido relatados em vários estudos. Estão relacionados com a fertilidade média de ovos, podendo estar relacionados com outros fatores ainda não determinados, como crio-injúrias sub-letais que poderiam afetar a funcionalidade e a viabilidade celular. A permeabilidade do espermatozóide a diferentes períodos depois da diluição em vários meios hiposmóticos foi estudada por Cabrita *et al.* (1998) que utilizaram três crioprotetores (DMSO, DMA e metanol) com adição de gema de ovo. A gema de ovo proporcionou uma significativa proteção à membrana e prolongou a sobrevivência e a média da fertilização. As amostras congeladas com DMSO apresentaram melhores resultados.

2.7 ANÁLISE SEMINAL

A agroindústria de peixes focaliza sua atividade na qualidade de ovo e larvas em vez de dar mais atenção ao sêmen, embora, a qualidade de ambos os gametas possa afetar o sucesso da fertilização e a sobrevivência das larvas, em algumas espécies a qualidade pobre do sêmen pode ser um fator limitante ao cultivo, porém até mesmo quando o sucesso da fertilização é alto, existem diferenças entre a qualidade de sêmen entre os machos. Pools de sêmen são utilizados para elevar os níveis de fecundação, no entanto, comprometem a integridade genética das futuras populações. O manejo dos reprodutores durante a coleta e armazenamento do sêmen antes da fertilização, ou os procedimentos de fertilização dependeram sempre de avaliações subjetivas que, obviamente, diferem de observador para observador, tornando a avaliação incorreta ou imprecisa. Para dirimir tais problemas, foram desenvolvidos sistemas computadorizados de análise de sêmen. Inicialmente utilizados em mamíferos, mas recentemente tem desempenhado um papel importante dentro da aqüicultura (Rurangwa *et al.*, 2004).

A avaliação da motilidade espermática e da morfologia são parâmetros essenciais dentro do exame andrológico, importantes para o estabelecimento da correlação entre a qualidade do sêmen e a fertilidade. Análises seminais computadorizadas (CASA) permitem uma avaliação objetiva de diferentes características da célula espermática, tais como movimento, velocidade e morfologia, embora alguns resultados interessantes já tenham sido obtidos, principalmente em humanos, muitas perguntas permanecem. O problema principal está relacionado à padronização e à otimização do equipamento e procedimentos. Os instrumentos de análise computadorizada de sêmen têm demonstrado níveis altos de precisão e confiança, avaliando o sêmen de diferentes espécies. A disponibilidade deles nos fornece uma grande ferramenta para estudo objetivo da motilidade e morfologia espermáticas, melhorando nosso conhecimento e habilidade em manipular o sêmen. Embora existam diferentes máquinas de análise computadorizada de sêmen, o sistema é baseado em ótica e software utilizados em conjunto para a identificação do espermatozóide e reconstrução de sua trajetória (Verstegen *et al.*, 2002).

Em estudos de criopreservação de sêmen de ciprinídeos através de análise espermática computadorizada (CASA), o uso de 10% de DMSO e de 0,5% de glicina, com um período de equilíbrio do diluente menor ou igual a cinco minutos, distante do nitrogênio líquido 4 a 5 cm e descongelado a 25°C por 15 a 45 segundos, resultou em 35 a 60% de motilidade espermática pós-descongelamento (Lahnsteiner *et al.*, 2000).

A avaliação da qualidade seminal é complementar ao exame clínico para estimar o potencial de um macho, como um reprodutor e normalmente julga o volume, aspecto, concentração, motilidade e morfologia espermática (Rodriguez-Martinez, 2005).

As injúrias causadas pela criopreservação são prejudiciais ao transporte e sobrevivência dos espermatozóides no trato reprodutivo feminino (Salamon & Maxwell, 1995). Segundo Bailey *et al.* (2000), a capacitação espermática induzida pela congelação poderia produzir uma população de espermatozóides após a descongelação com viabilidade curta e ineficiente.

Após o processo de preservação, as células espermáticas devem apresentar boa motilidade e manter a integridade das membranas espermáticas para poder levar a cabo a penetração do ovócito (Royere, 1996). Já qualquer falha inerente à fisiologia espermática poderia prejudicar sua capacidade de fertilização do oócito como também de suportar o desenvolvimento embrionário (Holt & Van Look, 2004).

2.8 SISTEMA DE ANÁLISE SEMINAL AUXILIADO POR COMPUTADOR (CASA)

O sistema de análise seminal auxiliado por computador (CASA) que inicialmente foi desenvolvido para analisar a qualidade espermática em mamíferos e pássaros, tem sido recentemente utilizado para sêmen de peixes. O CASA pode representar uma importante ferramenta na aquicultura de forma a quantificar rápida e objetivamente os efeitos das condições de criação e manipulação espermática acerca da motilidade dos espermatozóides, incrementando a capacidade fertilizante dos criatórios (Rurangwa *et al.*, 2004).

Os CASA são a evolução de múltiplas fotomicrografias e técnicas de vídeo-micrografia do caminho percorrido pelos espermatozóides, utilizando um computador equipado com um software de captura de imagens, e do método de processamento e análise dos mesmos (Boyer *et al.*, 1989 citado por Rurangwa *et al.*, 2004).

Embora o desenvolvimento das técnicas para avaliação da motilidade espermática tenham tido recentemente grande progresso, muitos avanços têm sido registrados em mamíferos, incluindo o homem, em comparação com peixes e outros organismos aquáticos. O sistema foi inicialmente desenvolvido para analisar a fertilidade masculina em laboratórios de andrologia clínica, e foram depois aplicados em outras espécies de mamíferos (Hirano *et al.*, 2001).

A mensuração objetiva da motilidade espermática de peixes foi primeiramente reportada por Cosson *et al.* (1985) que utilizaram iluminação estroboscópica e câmara de vídeo na análise da motilidade de espermatozóides de truta ativadas. Somente durante os últimos anos os sistemas modernos de CASA foram adaptados para o estudo do espermatozóide de peixes (Toth *et al.*, 1995, 1997; Christ *et al.*, 1996; Kime *et al.*, 1996, 2001; Ravinder *et al.*, 1997).

As diferenças na biologia dos espermatozóides entre peixes e mamíferos podem explicar o atraso na adequação das ferramentas para análise da motilidade espermática em peixes. A introdução do CASA no estudo da reprodução de peixes primeiro transpôs os problemas espermáticos particulares como o curto período em que os espermatozóides se mantêm móveis após a ativação e a alta frequência do batimento flagelar após a ativação (Billard & Cosson, 1992).

Com as análises subjetivas da motilidade de espermatozóides de peixes utilizadas até recentemente, os diferentes componentes da motilidade espermática e padrões gerais não podiam ser identificados e determinados. A digitalização computadorizada da cabeça do espermatozóide após a captura de imagem através de microscopia de contraste de fase permite uma mensuração acurada e confiável dos parâmetros físicos da motilidade espermática. A técnica tem permitido o estudo de componentes da motilidade de espermatozóides de carpa, através da qual três parâmetros distintos podem ser distinguidos (linear, circular e aleatório) (Ravinder *et al.*, 1997).

Os sistemas CASA quantificam diferentes parâmetros de motilidade espermática de interesse, incluindo aqueles que não são observados subjetivamente. A avaliação da motilidade espermática utilizando a metodologia do CASA, além de ser rápida, permite elaborar análises de componentes desta motilidade. Entretanto, temperatura, tamanho e concentração espermática, assim como a velocidade, podem também afetar a qualidade dos resultados e devem ser lavados em consideração no processo de calibração. O CASA tem grande repetibilidade e fornece estimativas mais discriminadas da motilidade espermática que os procedimentos visual/microscópico subjetivos (Rurangwa *et al.*, 2004).

Nos estudos da trajetória do espermatozóide pelo CASA os parâmetros mais importantes de velocidade são a velocidade curvilínea (VCL, a velocidade real ao longo da trajetória) e a velocidade em linha reta (VSL, a distância em linha reta entre o ponto de início e o final da trajetória dividida pelo tempo despendido na mesma) (Ciereszko *et al.*, 1996b; Kime *et al.*, 2001; Rurangwa *et al.*, 2001, 2002; Jobling *et al.*, 2002). Se a trajetória é uma

linha reta, a VCL e a VSL são idênticas. A velocidade do caminho angular (VAP, a velocidade ao longo de uma trajetória corrigida) é geralmente de pouca utilidade em peixes desde que, ao contrário dos espermatozoides de mamíferos, a trajetória é geralmente na forma de curvas suaves, então a VAP e a VCL são idênticas, podendo o espermatozoide se mover tri-direcionalmente no meio aquático (Kime *et al.*, 2001). Imediatamente após a ativação, os espermatozoides de teleosteos geralmente se movem em trajetória curvilínea tendendo a reta. A motilidade percentual (MOT) e a concentração de móveis (MOC) são bons indicadores do número de espermatozoides viáveis. A fertilidade dependerá então do número de espermatozoides móveis e de sua velocidade (Rurangwa *et al.*, 2004).

3 JUSTIFICATIVA

Diante da falta de dados sobre a biologia reprodutiva do macho do tambaqui criado em cativeiro no nordeste do Brasil especificamente quanto as característica seminais faz-se necessário o estudo dos parâmetros seminais para dar suporte a trabalhos de reprodução assistida (criopreservação e fertilização).

Uma vez que, a água de coco em pó tem sido usada com sucesso na conservação celular de várias espécies justifica-se a utilização da mesma na espécie tambaqui no processo de criopreservação do sêmen.

4 HIPÓTESE CIENTÍFICA

Os espermatozoides de tambaqui após o congelamento e descongelamento em meio contendo água de coco em pó mantém as qualidades seminais semelhantes ao sêmen fresco, sendo a água de coco em pó um meio de criopreservação de sêmen desta espécie em protocolos de congelamento, igual ou superior aos meios tradicionais.

5 OBJETIVOS

5.1 GERAL

Caracterizar o sêmen do tabaqui e criopreservá-lo em diluente a base de água de coco em pó comparado-o com diluentes tradicionais.

5.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar as características espermáticas do sêmen de tabaqui com e sem indução hormonal por um período de doze meses;
- Elaborar a curva de concentração de espermatozóides do sêmen do tabaqui *C. macropomum* CUVIER, 1818, com o uso de câmara de Neubauer e espectrofotômetro;
- Avaliar os parâmetros cinéticos do sêmen de tabaqui diluído em ACP-104 e Ringer modificado após 15 dias da congelação, comparando as taxa de diluição (1:3, 1:4, 1:5) e os crioprotetores (DMSO e Metilglicol), através de análise computadorizada (SCA).

6 CAPÍTULO 1

CARACTERÍSTICAS DO SÊMEN DE TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*) EM
LATITUDE EQUATORIAL

TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*) SEMEN CHARACTERISTICS
ON EQUATORIAL LATITUD

RESUMO

O tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) é uma espécie de teleósteo da bacia amazônica e abundante naquela região, de alto valor comercial e forte apelo culinário e esportivo sendo uma das principais espécies amazônicas com larga distribuição nos rios e nas áreas próximas a Manaus (Silva *et al.*, 1984) Este trabalho teve por objetivo avaliar as características espermáticas do sêmen de tambaqui com e sem indução hormonal por um período de doze meses. Utilizou-se 26 machos com idade média de três anos, pertencentes ao Centro de Pesquisas em Aqüicultura (CPAq) do Departamento Nacional de Obras Contra às Secas (DNOCS), devidamente identificados com chips magnéticos. Os animais foram divididos em dois grupos: induzidos (I) e não induzidos (NI). Os animais do grupo I receberam 2 mg de extrato de pituitária de carpa (EPC⁻¹) por Kg de peso vivo (PV), via intra celomática. O sêmen foi coletado após 14 horas através de massagem abdominal. Os parâmetros avaliados foram: volume, pH, osmolaridade e concentração espermática. Os peixes apresentaram peso médio de 5410 g, comprimento total de 68 cm e comprimento padrão de 59,17 cm. Para os grupos I e NI foram observados respectivamente: volume médio de 5,05 mL e 0,55 mL ($p < 0,05$); pH médio de 8,21 e 8,09; osmolaridade média de 320,51 e 323 mOsm/Kg e concentração espermática média de $22,93 \times 10^9$ e $40,46 \times 10^9$ sptz/mL ($p < 0,05$). A produção espermática total foi de $115,79 \times 10^9$ sptz/mL no grupo I sendo de $22,25 \times 10^9$ sptz/mL no grupo NI. Não houve diferença significativa entre os valores obtidos de osmolaridade e pH dos indivíduos induzidos e não induzidos. No entanto, a concentração espermática e o volume no grupo induzido apresentaram valores significativamente superiores ($p < 0,05$) comparado aos indivíduos não induzidos.

PALAVRAS-CHAVE ADICIONAIS: Reprodução. Sêmen. Peixes. Teleósteos. Nordeste do Brasil.

CARACTERÍSTICAS DO SÊMEN DE TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*) EM LATITUDE EQUATORIAL*

[TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*) SEMEN CHARACTERISTICS ON EQUATORIAL LATITUD]

Vieira, M.J.A.F.¹, Carvalho, M.A.M.², Salmito-Vanderley, C.S.B.², Salgueiro, C.C. de M.³, Linhares, F, R. A.², Viveiros, A.T.M.⁴, Moura, A.A.A.N.⁵, Nunes, J.F.²

¹Doutorando em Ciências Veterinárias (UECE). E-mail: ascensaof@bol.com.br

²Núcleo Integrado de Biotecnologia. Universidade Estadual do Ceará. Campus do Itaperi. CEP: 60.740-000, Fortaleza, Ceará, Brasil.

³Pesquisadora Colaboradora da Universidade Estadual do Ceará.

⁴Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil.

⁵Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil.

*Experimento de tese de Doutorado do primeiro autor junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Estadual do Ceará.

PALAVRAS-CHAVE ADICIONAIS: Reprodução. Sêmen. Peixes. Teleósteos. Nordeste do Brasil.

ADDITIONAL KEYWORDS: Reproduction. Semen. Fish. Teleostei. Northeast of Brazil.

RESUMO

O tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) é uma espécie de teleósteo da bacia amazônica e abundante naquela região, de alto valor comercial e forte apelo culinário e esportivo sendo uma das principais espécies amazônicas com larga distribuição nos rios e nas áreas próximas a Manaus (Silva *et al.*, 1984) Este trabalho teve por objetivo avaliar as características espermáticas do sêmen de tambaqui com e sem indução hormonal por um período de doze meses. Utilizou-se 26 machos com idade média de três anos, pertencentes ao Centro de Pesquisas em Aqüicultura (CPAq) do Departamento Nacional de Obras Contra às Secas (DNOCS), devidamente identificados com chips magnéticos. Os animais foram divididos em dois grupos: induzidos (I) e não induzidos (NI). Os animais do grupo I receberam 2 mg de extrato de pituitária de carpa (EPC⁻¹) por Kg de peso vivo (PV), via intra celomática. O sêmen foi coletado após 14 horas através de massagem abdominal. Os parâmetros avaliados foram: volume, pH, osmolaridade e concentração espermática. Os peixes apresentaram peso médio de 5410 g, comprimento total de 68 cm e comprimento padrão de 59,17 cm. Para os grupos I e NI foram observados respectivamente: volume médio de 5,05 mL e 0,55 mL ($p < 0,05$); pH médio de 8,21 e 8,09; osmolaridade média de 320,51 e 323 mOsm/Kg e concentração espermática média de $22,93 \times 10^9$ e $40,46 \times 10^9$ sptz/mL ($p < 0,05$). A produção espermática total foi de $115,79 \times 10^9$ sptz/mL no grupo I sendo de $22,25 \times 10^9$ sptz/mL no grupo NI. Não houve diferença significativa entre os valores obtidos de osmolaridade e pH dos indivíduos induzidos e não induzidos. No entanto, a concentração espermática e o volume no grupo induzido apresentaram valores significativamente superiores ($p < 0,05$) comparado aos indivíduos não induzidos.

SUMMARY

The Amazonian fish known as tambaqui (*Colossoma macropomum* Cuvier, 1818) is a type of teleosteo and has high commercial value because of its meat quality and for recreational fishing. Tambaqui is one of the major species in the Amazon basin and found in most rivers and surroundings of Manaus city (Silva *et al.*, 1984). The present study was carried out to

evaluate sperm parameters from tambaqui, subjected or not to hormone treatment for a period of 12 months. We used 26 males with three years of age, raised at the Aquaculture Research Center of the National Department for Drought Control (DNOCS). Animals were identified with magnetic chips and divided into two groups: controls (C NI) and hormone-treated (I), which received 2 mg of carp pituitary extract (CPE⁻¹)/Kg of body weight (via intra celomic). Semen was collected 14 hours after hormonal induction and the following parameters evaluated: volume, pH, osmolarity and sperm concentration. Fishes had body weight of 5410 g, with total length and standard length of 68 cm and 59.17 cm, respectively. In the case of hormone-treated and control animals, we found the following criteria, respectively: semen volume of 5.05 mL and 0.55 mL ($p < 0.05$); pH of 8.21 and 8.09; osmolarity of 320.51 and 323 mOsm/Kg; sperm concentration of 22.93×10^9 and 40.46×10^9 spz/mL ($p < 0.05$). Total sperm productions were quantified as 115.79×10^9 sperm/mL in treated fishes and 22.25×10^9 sperm/mL in the controls. We conclude that treatment of adult tambaqui with carp pituitary extract increase semen volume but reduces sperm concentration while had no effect on sperm osmolarity and pH.

INTRODUÇÃO

O tambaqui *Colossoma macropomum*, Cuvier (1818) - *Characidae Characiforme*, originário da bacia amazônica, encontra-se amplamente distribuído por seus rios e afluentes e em áreas próximas à Manaus. Em 1972, o Departamento Nacional de Obras Contra às Secas (DNOCS) introduziu no Nordeste do Brasil 74 alevinos oriundos de Iquitos, Peru, que deram início à colossomicultura no Ceará (Silva *et al.*, 1984). A obtenção da primeira desova artificial foi em 1977, sendo então os alevinos distribuídos para todo o Nordeste. O período reprodutivo desta espécie em ambiente nativo vai de setembro a fevereiro com desovas ocorrendo entre os meses de setembro/outubro até janeiro/fevereiro (Villacorta-Correa & Saint-Paul, 1999). Durante este período alimenta-se de frutos e sementes como fonte de energia para o desenvolvimento e a maturação gonadal, (Silva *et al.*, 1999). Em cativeiro, sob estresse de confinamento, o tambaqui perde a capacidade de se reproduzir naturalmente, sendo necessária a indução à desova através da aplicação de hormônios gonadotróficos exógenos. Diversos estudos têm avaliado o efeito de indutores hormonais sobre a capacidade reprodutiva desta espécie (Silva *et al.*, 1981; Ponzi Junior, 2003; Muniz, 2006).

Aspectos seminais têm sido divulgados para algumas espécies de peixes, no entanto, quando se faz referência a efeitos da sazonalidade nas espécies reofílicas de águas tropicais sobre a qualidade espermática estes dados são bastante escassos (Kavamoto *et al.*, 1986; Shimoda *et al.*, 1999; Andrade-Talmelli *et al.*, 2001; Shimoda, 2004; Cruz-Casallas *et al.*, 2005) não tendo evidencia de estudos que avaliem a qualidade seminal do tambaqui em cativeiro e sua variação anual.

A qualidade do sêmen é fundamental para o processo reprodutivo, pois a contribuição do macho para a eficiência reprodutiva e produtiva é de grande importância, uma vez que além do aporte genético, neles pode se aplicar uma maior e mais rápida pressão na seleção. Fatores como a concentração espermática, aspecto, e volume do ejaculado, são de grande importância para o bom desempenho reprodutivo aliado às qualidades espermáticas como velocidade progressiva e percentual de células vivas (Salgueiro & Nunes, 1999). Portanto, este trabalho teve por objetivo avaliar as características espermáticas do sêmen do tambaqui com e sem indução hormonal por um período de doze meses.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Centro de Pesquisas em Aquicultura (CPAq) do DNOCS, no município de Pentecoste, Ceará, situando-se a 3°45'00" de latitude sul e 39°10'24" de longitude oeste, distante 82 Km da Capital Fortaleza, e no Núcleo Integrado de

Biotecnologia (NIB) da Universidade Estadual do Ceará (UECE) em Fortaleza, Ceará, Brasil, no período entre 2007 e 2008. Os animais foram mantidos em viveiros de terra de 350m² abastecidos pela água do açude Pereira de Miranda. A temperatura ambiental média foi de 26,8°C, com máxima de 34°C e mínima de 20,6°C. O período de chuvas estendeu-se de janeiro a junho e a pluviosidade média anual foi de 860 mm (FUNCEME, 2008).

Foram utilizados 26 machos da espécie Tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier, 1818), devidamente identificados através de chips, para evitar perdas dos dados, e agrupados em pares (n = 13) e ímpares (n = 13), de acordo com o número do chip. Os animais aptos à reprodução com idade média superior a três anos foram selecionados, sendo em seguida pesados (g) e medidos (cm). Receberam ração comercial contendo 32% de proteína bruta com base em 5% do peso vivo (PV) dividida em duas refeições diárias, as oito e às 16 horas.

Os animais selecionados receberam dose única em cada aplicação de extrato pituitário de carpa comum (EPC) (*Cyprinus carpio*, 2mg/Kg PV), por via intra celomática, na base da nadadeira peitoral. Os animais foram submetidos a um regime de rodízio de maneira que em cada mês um grupo tinha o sêmen coletado após indução com EPC (I) enquanto que o outro grupo tinha o sêmen coletado sem indução (NI). Deste modo, todos os animais recebiam EPC a cada 60 dias. Os animais ímpares foram induzidos nos meses de abril, junho, agosto, outubro e dezembro de 2007 e fevereiro e abril de 2008, já os animais pares foram induzidos nos meses de maio, julho, setembro e novembro de 2007 e janeiro e março de 2008. Os dados médios do grupo I são referentes aos animais com numeração par e ímpar, da mesma forma que o grupo NI.

Durante a coleta os animais foram submetidos à anestesia com solução a base de óleo de cravo (União Vegetal Suplementos Nutricionais Ltda), usado como se segue: 1 mL do óleo de cravo diluído em 10 mL de álcool absoluto e 1 mL desta solução mãe foi diluída em 1000 mL de água obtendo uma diluição final 1:10.000. Cada animal foi individualmente mergulhado no tanque para anestesia com capacidade de 70 litros, contendo a solução anestésica por aproximadamente 2 minutos, até que fosse detectado o sintoma principal da perda de equilíbrio (ventre voltado para cima). Atingindo este estado, o peixe era imediatamente retirado do tanque e submetido à coleta de sêmen, mensuração do comprimento e pesagem. Após estes procedimentos o mesmo era devolvido ao tanque de manuseio para se recuperar totalmente da anestesia.

As coletas de sêmen foram realizadas após 14 horas da indução hormonal. Cada animal foi contido em decúbito dorsal e envolto em pano úmido sobre os olhos para facilitar contenção. O orifício genital foi enxuto com papel toalha, e uma pressão abdominal foi realizada no sentido antero-posterior conforme método adotado rotineiramente pelo DNOCS. O sêmen liberado em alíquotas foi coletado em tubos de polipropileno de 1,5 mL graduados. Logo após, foi aferido o volume (mL) e o pH (0-14; mediante uso de fitas reagentes). Alíquotas de 1 µL foram retiradas e diluídas em 4000 µL de solução salina formolizada a 1% para contagem de espermatozóides em Câmara de Neubauer e 100 µL para leitura da osmolaridade (mOsm/Kg) (Osmometer Automatic, Roebling, Alemanha). Para avaliar o percentual de espermatozóides móveis, uma alíquota de sêmen de 2 µL foi diluída em 50 µL de água do açude e uma estimativa subjetiva da motilidade foi realizada em microscópio ótico em aumento de 100 x, considerando-se como 0 (zero) nenhum espermatozóide móvel e 100 (cem) todos espermatozóides móveis. As amostras foram identificadas e conservadas em isopor com gelo em escamas a uma temperatura de ± 5°C para o transporte até o Laboratório do Núcleo Integrado de Biotecnologia da UECE.

Os dados foram apresentados como média ± desvio padrão. As médias apresentadas com intervalo de confiança de 95% foram testadas através de análise de variância em duas vias para verificar a diferença entre os animais dos grupos induzido e não induzido. O teste de Tukey foi utilizado para comparar as médias entre os tratamentos (p>0,05).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios para os parâmetros de volume, pH, concentração espermática e osmolaridade dos grupos induzidos (I) e não induzidos (NI) encontram-se na Tabela I. Para melhor compreensão dos dados, os animais quando induzidos com EPC foram referenciados como grupo (I) enquanto que, os animais quando não sofreram indução foram referenciados (NI) Os animais do grupo I apresentaram um peso médio de 5.410 ± 289 g, comprimento total de $68 \pm 1,8$ cm e comprimento padrão de $59,17 \pm 1,80$ cm, enquanto no grupo NI apresentaram peso médio de $5.452,00 \pm 339$ g, comprimento total de $68,00 \pm 2,39$ cm e comprimento padrão de $59,00 \pm 2,03$ cm. Foi observada concentração espermática média de $22,66 \pm 9,7 \times 10^9$ spz/mL para o grupo I e $40,46 \pm 18,13$ spz/mL para o grupo NI, como mostra a Tabela I. A menor concentração espermática registrada para o grupo I foi de $9,12 \times 10^9$ spz/mL no mês de janeiro de 2008, enquanto a maior foi $44,04 \times 10^9$ spz/mL no mês de maio de 2007 (Gráfico 1B). O grupo NI diferiu significativamente ($p < 0,05$) do grupo I apresentando concentração média de $40,46 \pm 18,13 \times 10^9$ spz/mL em relação à variação mensal A concentração espermática mínima observada ocorreu em novembro de 2007 ($18,12 \times 10^9$ spz/mL) e a máxima em dezembro de 2007 ($73,42 \times 10^9$ spz/mL) ($p < 0,5$), coincidindo com baixo volume seminal. A produção total de espermatozoides do grupo I foi de $115,79 \times 10^9$ spz/individuo e do grupo NI foi de $22,25 \times 10^9$ spz/individuo.

O volume seminal médio foi de $5,05 \pm 2,08$ mL no grupo I e $0,55 \pm 0,52$ mL no grupo NI. O maior volume de sêmen observado para o grupo I ocorreu em novembro de 2007, assim como a menor concentração espermática; entretanto, foi também observada no mês de janeiro de 2008, mostrando uma grande variação no volume seminal neste grupo durante aos meses do ano. Viveiros & Godinho (2009) mencionam o volume seminal como um fator importante no processo reprodutivo e que tanto em espécies migratórias na época de reprodução quanto em animais induzidos com hormônio é bastante variável, e a concentração espermática varia de $10,9$ a $69,9 \times 10^9$ spz/mL, (*L. obtusidens* e *R. quelen*), respectivamente. Os valores médios de pH foram de $8,17 \pm 0,38$ para o grupo I e $8,06 \pm 0,22$ para o grupo NI; e osmolaridade de 319 ± 13 a 313 ± 20 mOsm/Kg para nos grupos I e NI, respectivamente.

Os resultados deste trabalho mostram que houve variação entre os meses do ano durante o estudo, no entanto, tal fato não inviabiliza a utilização do sêmen desta espécie durante todo o ano, especialmente sob indução hormonal. Esta variação foi especialmente observada no parâmetro volume seminal, tendo reflexo direto sobre a concentração espermática.

Segundo Taitson & Godinho (2003) há uma grande variação nos dados de concentração espermática em peixes em geral, parecendo ser uma influência espécie-específica, havendo também grandes diferenças individuais, acarretando informações diferenciadas dentro da mesma espécie. Observa-se, para peixes de água doce, uma variação de 1,33 mL (com *Leporinus elongatus*; Taitson & Godinho, 2003) e 1,0 mL (Viveiros & Godinho, 2009) a 14,5 mL em *Brycon orbignyanus*, (Viveiros & Godinho, 2009) no volume seminal coletado inclusive com indução hormonal (Ciereszko & Dabrowskib, 1993; Andrade-Talmelli *et al.*, 2001; Taitson & Godinho, 2003; Ákos *et al.*, 2003; Fresneda *et al.*, 2004; Bombardelli *et al.*, 2006; Viveiros *et al.*, 2008). Menezes *et al.* (2008) obtiveram concentrações espermáticas de tambaqui *C. macropomum* de 35×10^9 spz/mL após indução com 1 mg/kg de solução com hipófise de carpa *C. carpio*.

Farias *et al.* (1999) estudando o volume seminal de tambaqui *C. macropomum*, induzidos com GnRH (100 µg/Kg/PV), encontraram volume seminal de $5,0 \pm 1,2$ mL, resultado semelhante ao do presente estudo no grupo I de tambaqui utilizando 2 mg/ECP/kg/PV que obteve média de $5,05 \pm 2,00$ mL. Entretanto, os resultados destes autores, quando se compara os dados em peixes não induzidos hormonalmente, observam-se valores médios superiores de volume seminal ($2,0 \pm 0,8$ mL versus $0,55 \pm 0,5$ mL).

Variação da concentração espermática também é observada entre as espécies, encontrando-se relatos de concentração mínima, em peixe de água doce, de $1,97 \times 10^9$ spz/mL (*Rhamdia quelen*; Bombardelli *et al.*, 2006) e máxima de $41,58 \times 10^9$ spz/mL (*Perca Jlavescens*; Ciereszko & Dabrowskib, 1993). Farias *et al.* (1999) e Menezes *et al.* (2008) obtiveram com tambaqui concentrações espermáticas da ordem de 35×10^9 spz/mL e Folgli da Silveira *et al.* (1990) citado por Viveiros & Godinho (2009) obtiveram concentrações de $23,3 \times 10^9$ spz/mL em *P. mesopotamicus*. No presente trabalho, encontrou-se variação média mensal de 9,12 a $73,42 \times 10^9$ spz/mL, demonstrando que há diferenças significativas na concentração não só entre espécies, mas também individuais, dentro da mesma espécie. Observou-se ainda que com a indução hormonal ocorre diminuição da concentração espermática ($22,93 \times 10^9$ vs. $40,46 \times 10^9$ spz/mL nos grupos I e NI, respectivamente), porém há um aumento significativo no volume seminal coletado (5,05 vs. 0,55 mL nos grupos I e NI, respectivamente) o que contribui positivamente para o manuseio do sêmen em reprodução assistida. Vale ressaltar que os valores encontrados neste estudo são inferiores aos de Menezes (2003) que também trabalharam com tambaqui (induzido com ECP 1 mg/Kg/PV) onde encontram concentração espermática média de 35×10^9 spz/mL e volume variando de 6 a 12 mL.

O pH do sêmen de peixes água doce varia de 6,5 a 8,5, segundo Tabares *et al.* (2005), portanto, os dados encontrados para tambaqui ($8,21 \pm 0,3$ e $8,09 \pm 0,26$ nos grupos I e NI, respectivamente) estão de acordo com esta assertiva.

De acordo com Morisawa & Susuki (1980) a osmolaridade do sêmen de peixes apresenta-se em torno de 300 mOsm/Kg, corroborando com os dados encontrados neste estudo para tambaqui (276 a 342 mOsm/Kg). A variabilidade apresentada neste parâmetro parece ter relação com características individual e espécie-específicas, pois as mesmas também foram encontradas em trabalhos com ciprinídeos (254 a 346 mOsm/Kg; Alavi & Cosson, 2006) e salmonídeos (232 a 322 mOsm/Kg; Alavi & Casson, 2006). No presente estudo foi observada osmolaridade média para tambaqui induzido hormonalmente (2 mg/ECP/Kg/PV) de 320,51 mOsm/Kg, superior ao encontrado por Farias *et al.* (1999) com tambaqui (induzido com GnRH: 100 µg/Kg/PV) que foi de 274 mOsm/Kg.

O conhecimento da osmolaridade média do sêmen de peixe teleósteos, como no caso o tambaqui, é de extrema importância na reprodução assistida, uma vez que seus espermatozóides permanecem quiescentes na osmolaridade do plasma seminal, fator crítico aos espermatozóides que, após a ativação, tem uma viabilidade média de aproximadamente 2 minutos. Dentre os fatores que ocasionam a ativação da motilidade espermática está o choque osmótico que os mesmos sofrem ao encontrarem na água doce (meio hipotônico; 4 mOsm/Kg) ou salgada (meio hipertônico, 1.000 mOsm/Kg), no caso de teleósteos marinhos (Alavi & Cosson, 2006).

CONCLUSÕES

A indução hormonal é necessária para garantir a quantidade de parâmetros seminais para o processo de reprodução do tambaqui *C. macropomum* Cuvier, 1818. A concentração espermática entre os animais induzidos é menor que as dos não induzidos, porém, a diferença não compromete o processo reprodutivo, pois o volume compensa a diferença de concentração. Foi comprovado que o intervalo de dois meses é suficiente para permitir o repouso necessário entre as induções hormonais. Osmolaridade e pH nos dois grupos, induzidos e não induzidos, mantêm-se nos limites aceitáveis para as espécies de água doce em condições edafoclimáticas equatoriais de Pentecoste-Ceará durante todo o ano.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará; ao Centro de Pesquisas em Aqüicultura do DNOCS em Pentecoste-CE em nome do Msc. Pedro Eymard Pinto Mesquita e da Diretora Geral Dra. Renata Pollari Telles Borrigueiro, pelo apoio na execução do trabalho experimental e à FUNCAP pela bolsa de doutorado concedida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

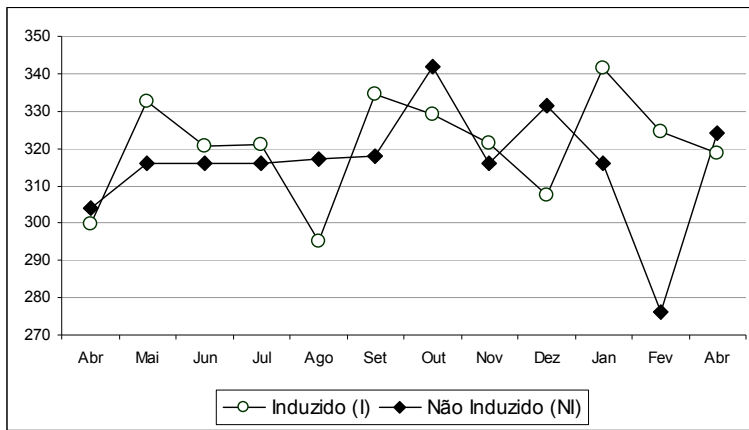
- Alavi, S.M.H., e Cosson, J. 2006. Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: A review. *Cell Biology International*, 30 (1): 1-14.
- Ákos, H., Edit, M. e Béla, U. 2003. Cryopreservation of common carp sperm. *Aquat. Living Res.*, 16, 457-460.
- Andrade-Talmelli, E. F., Kavamoto, E.T., Fenerich-Verani, N. 2001. Características seminais da piabinha, *Brycon insignis* (Steindachner, 1876), após estimulação hormonal. *B. Inst. Pesca*, São Paulo, 27 (2):149-154.
- Bombardelli, R.A., Mörschbacher, E.F., Campagnolo, R., Sanches, E.A. e Syperreck, M.A. 2006. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá cinza, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimardm, 1824), *Rev. Bras. Zootec.*, 35 (4).
- Ciereszko, A. e Dabrowski, K. 1993. Estimation of sperm concentration of rainbow trout, whitefish and yellow perch using a spectrophotometric technique. *Aquaculture*, 109: 367-373.
- Cruz-Casallas, P.E., Lombo-Rodríguez, D.A. e Velasco-Santamaría, Y.M. 2005. Milt quality and spermatozoa morphology of captive *Brycon siebenthalae* (Eigenmann) broodstock. *Aquaculture Research*, 36 (7): 682-686.
- Farias, J.O., Nunes, J.F., Carvalho, M.A.M. e Salgueiro, C.C.M. 1999. Avaliação “in vitro” e “in vivo” do sêmen de Tambaqui (*Colossoma macropomum*) conservado a temperatura ambiente e criopreservado em água de coco. *Rev. Cient. Prod. Animal.*, 1 (1): 44-58.
- Fresneda, A., Lenis, G., Agudelo, E. e Angel, M.O. 2004. Espermiación inducida y crioconservación de semen de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), *Rev. Col. Cienc. Pec.*, 17 (supp).
- FUNCEME: Relatório de Pluviometria por faixa de anos - Estado do Ceara, 1974 – 2008, anos 2007 e 2008, Município: Pentecoste, Posto: Pentecoste, Micro-região: 11, Código: 115, Resumo de chuvas nos dados fornecidos pela FUNCEME.
- Kavamoto, E.T. e Fogli da Silveira, W. 1986. Características físicas, químicas e microscópicas do sêmen de bagre (*Rhamdia hilarii valenciennes*, 1840) em condições de campo, *B. Inst. Pesca*, 13 (1): 95-100.
- Menezes, J.T.B. 2003. Programa banco de sêmen de tambaqui silvestre *Colossoma macropomum*, Cuvier 1818. *Revista Panorama da Aqüicultura*, 3 (76).
- Menezes, J.T.B., Queiroz, L.J., Costa, D.C.R. e Menezes, J.R.J.B. 2008. Avaliação espermiática pós-descongelamento em tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), 38 (2): 365-368.
- Morisawa, M. e Suzuki, K. 1980. Osmolality and potassium ion: their roles in initiation of sperm motility in teleosts. *Science*, 210 (4474): 1145-1147.
- Muniz, J.A.S.M. 2006. *Influência do LHRH comum na ovulação induzida do Tambaqui Colossoma macropomum (Cuvier) (Characiforme, Characidae), em diferentes fotoperíodos*. Recife: Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aqüicultura, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 48pp. Dissertação de Mestrado.

- Ponzi Junior, M. 2003. *Otimização da taxa de fertilização e eclosão de larvas de tambaqui, Colossoma macropomum (Cuvier, 1816) sem instrumentos*. Recife: Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aqüicultura, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 23pp. Dissertação de Mestrado.
- Salgueiro, C.C.M. e Nunes, J.F. 1999. Estudo de características testiculares e espermáticas de caprinos e ovinos. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 23 (3).
- Shimoda, E., Andrade, D.R., Cruz, G.M., Silva, J.F.S. e Godinho, H.P. 1999. Caracterização química do plasma seminal do pacu (*Piaractus mesopotâmicos*; Holmberg, 1887) hipofisado. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 23 (3): 151-478.
- Shimoda, E. 2004. *Análise e criopreservação do sêmen da Piabanha, Brycon insignis (Steindachner, 1877) (Pisces, Characidae)*. Campos dos Goytacazes: Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Tese de Doutorado.
- Silva, A., Carneiro, S. e Melo, F.R. 1981. Desova induzida de tambaqui, *Colossoma macropomum*, Cuvier, 1818, com de hipófise de curimatã comum, *Prochilodus cearensis* Steindachner. In: DNOCS. COLETÂNEA DE TRABALHOS TÉCNICOS. Fortaleza (CE): DNOCS.
- Silva, J.W.B., Nobre, M.I.S., Pinheiro, F.A. e Sobrinho, A.C. 1984. Resultado de um experimento de policultivo de Tambaqui *Colossoma macropomum*, Cuvier, 1818, híbrido de tilápia, (*Oreochromis hornorum* TREW x *O. niloticus* L., 1766) e carpa espelho *Cyprinus carpio* L., 1758 vs *Speculares*. *Bol. Téc. do DNOCS*, Fortaleza, 42 (1): 63-89.
- Silva, J.A.M., Pereira-Filho e Oliveira-Pereira, M. I. 1999. Digestibility of seeds consumed by tambaqui (*Colossoma macropomum* Cuvier, 1818): an experimental approach. *Biology of Tropical Fishes*. Edited by Val, A.L. and Almeida V.M.F. (11): 137-148, INPA, Manaus.
- Tabares, J., Tarazona, A. e Oliveira, M. 2005. Fisiología de la activación del espermatozoide en peces de agua dulce. *Rev. Coml. Cienc. Pec.*, 18 (2): 149-160.
- Taitson, P.F. e Godinho, H.P. 2003. Evaluation of fish sperm concentration using two counting chambers. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 55 (2).
- Villacorta-Correa, M.A. and Saint-Paul, U. 1999. Structural indexes and sexual maturity of tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) (Characiformes: Characidae) in Central Amazon, Brazil. *Rev. Bras. Biol.*, 59 (4): 637-652.
- Viveiros, A.T.M., Orfão, L.H., Maria, A.N. e Allaman I.B. 2008. A simple, inexpensive and successful freezing method for curimba *Prochilodus lineatus* (Characiformes) semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 112 (2009): 293-300.
- Viveiros, A.T.M. e Godinho, H.P. 2009. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. *Fish Physiol. Biochem.*, 35: 137-150.

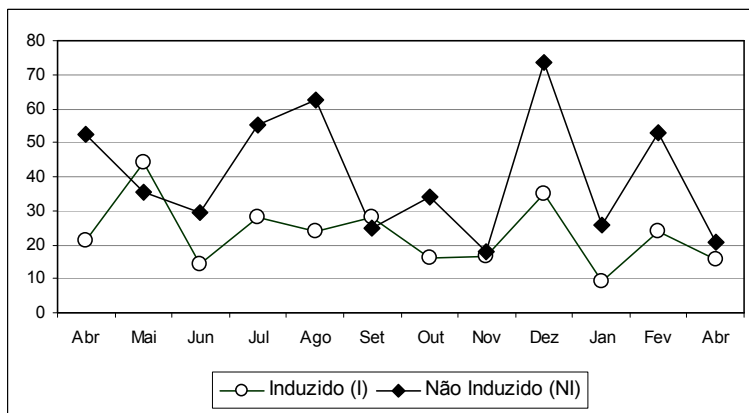
Tabela I. Média e desvio padrão dos parâmetros seminais do tambaqui *C. macropomum* nos grupos induzido (I) e não induzido (NI) hormonalmente com 2 mg/ECP/Kg/PV, Pentecoste, Ceará, Brasil. [Mean and standard deviation of tambaqui *C. macropomum* seminal parameters into hormonally induced (I) and no-induced (NI) groups with 2 mg/ECP/Kg/AW, Pentecoste, Ceará, Brazil]

Parâmetros	Induzidos	Não induzidos
Volume (mL)	5,05 ± 2,00 ^a	0,55 ± 0,50 ^b
pH (0-14)	8,21 ± 0,39 ^a	8,09 ± 0,26 ^a
Osmolaridade (mOsm/Kg)	320,51 ± 14,58 ^a	313,40 ± 27,20 ^a
Concentração (x10 ⁹ spz/mL)	22,93 ± 9,79 ^b	40,46 ± 18,31 ^a
Concentração total spz/mês (x10 ⁹ spz/mL)	115,79 x 10 ^{9a}	22,25 x 10 ^{9b}

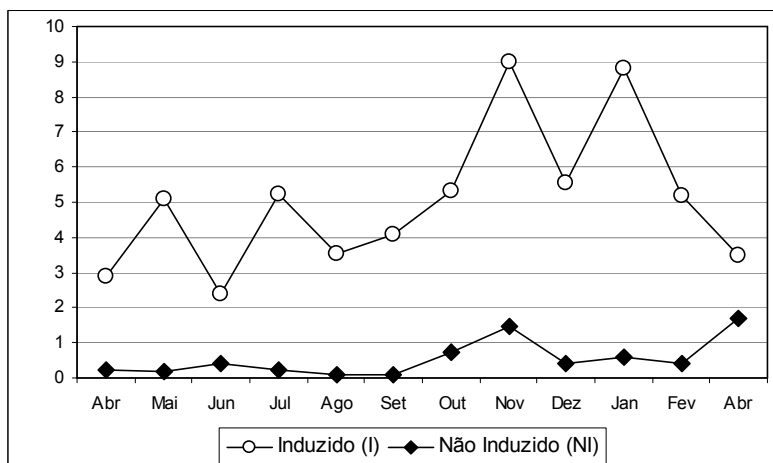
Letras diferentes entre colunas (p<0,05)



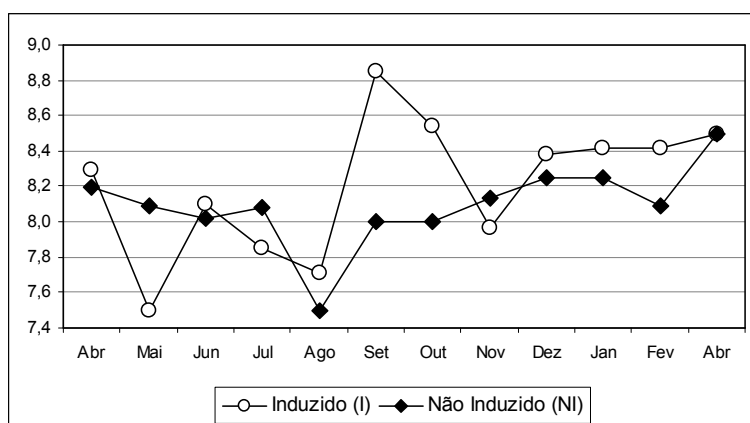
(A) Osmolaridade (mOsm/Kg); $p > 0,05$



(B) Concentração espermática ($\times 10^9$ spz/mL); $p < 0,05$



(C) Volume seminal (mL) ; $p < 0,05$



(D) pH (0-14) ; $p > 0,05$

Gráfico 1. Parâmetros seminais do tabaqui *C. macropomum* nos grupos induzido (I) e não induzido (NI) hormonalmente com 2 mg/ECP/Kg/PV no período de abril de 2007 a abril de 2008, em Pentecoste, Ceará, Brasil quanto a: (A) Osmolaridade, (B) Concentração espermática, (C) Volume seminal e (D) pH. [Tabaqui *C. macropomum* seminal parameters into hormonally induced (I) and no-induced (NI) groups with 2 mg/ECP/Kg/AW during the period between April 2007 to April 2008, at Pentecoste, Ceará, Brazil related to: (A) Osmolarity, (B) Spermatic concentration, (C) Seminal volume, and (D) pH].

7 CAPITULO 2

CURVA DE CONCENTRAÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES DE TAMBAQUI

SPERM CONCENTRATION CURVE OF TAMBAQUI

Curva de concentração de espermatozóides de Tambaqui

Sperm concentration curve of Tambaqui

Marcelo José da A. Feitosa Viera¹, Carminda Sandra Brito Salmito-Vanderley¹, Maria Audália Marques de Carvalho¹, Liliane Veras Leite¹, Cristiane Clemente de Mello Salgueiro¹, Felipe Silva Maciel¹, Arlindo de Alencar Araripe Moura², José Ferreira Nunes¹

RESUMO

A elaboração de uma curva de concentração de espermatozóides teve como finalidade auxiliar no manejo produtivo de machos de tambaqui durante a fertilização artificial. Foram utilizados vinte e seis (26) exemplares com idade média de três anos pertencentes ao plantel do Centro de Pesquisas em Aqüicultura – CPAq. do Departamento Nacional de Obras Contra as Secas – DNOCS no Estado do Ceará-Brasil. Os animais receberam dose única de extrato pituitário de carpa (EPC; 2mg/kg de peso vivo, intra celomático). O sêmen foi coletado 14 horas após a indução hormonal. A concentração de espermatozóides foi determinada em câmara de Neubauer e em espectrofotômetro (540nm) em amostras individuais numa diluição prévia de 1:4000 (sêmen: diluente). A concentração variou de 11,40 a 67,20x10⁹sptz/mL. O grau de transmitância variou de 95% a 63% para as menores e maiores concentrações respectivamente. A curva de concentração espermática do tambaqui ao longo do ano revelou que os animais podem ser induzidos a cada dois meses sem prejuízos na produção de sêmen (5,05±2,0mL). A diluição seminal por efeito da indução

¹ Universidade Estadual do Ceará, Núcleo Integrado de Biotecnologia – NIB, Av Paranjana, 1700-Campus do Itaperi, CEP: 60.740-000, Fortaleza-CE, Brasil. E-mail: ascensaof@bol.com.br

² Universidade Federal do Ceará, Av Humberto Monte, 2977, Campus do PICI-UFC

hormonal ainda apresenta elevada concentração espermática podendo ser distribuído em doses inseminantes e melhor aproveitado durante os procedimentos de fertilização artificial. Deste modo, estudos utilizando a curva de concentração de espermatozoides para facilitar e agilizar a definição das doses inseminantes com sêmen diluído a fresco ou criopreservado deverão ser realizados.

Palavras-chave: *Colossoma macropomum*, reprodução, sêmen, espectrofotometria.

ABSTRACT

The sperm concentration curve had the purpose to help the productive management of tambaqui males during artificial fertilization. Twenty-six (26) mature males with three years old were used. The animals were kept on facilities of Research Center of Aquaculture belonged to National Department of Works Against the Droughts - DNOCS a public company in the Ceará State-Brazil. A single dose of carp pituitary extract (CPE; 2mg/kg of body weight, intra celomic cavity) was administrated to animals. The sperm was collected 14 hours after hormonal induction. The spermatozoa concentration) in individual samples was determined in Neubauer chamber and in spectrophotometer (540nm) prior a dilution of 1:4000 (semen: extender). The sperm concentration varied of 11.40 to 67.20×10^9 sptz/mL. The transmittance range varied of 95% to 63% for the lower and bigger concentrations respectively. The concentration curve analysis of tambaqui sperm during one year of study revealed that the animals can be hormonal induced each two months without damages in the output of semen ($5,05 \pm 2,0$ mL). The sperm dilution by effect of the hormonal induction still presents elevated sperm concentration, and in this way it should be better exploit during of procedures of artificial fertilization. In this way, studies utilizing the sperm concentration

curve for facile and quick definition of the sperm:egg ratio with fresh or cryopreserved sperm should be carried out.

Key Words: *Colossoma macropomum*, reproduction, semen, spectrophotometry.

INTRODUÇÃO

A concentração de espermatozoides, o volume e a motilidade têm sido utilizados como critérios de qualidade do sêmen e bons indicadores da capacidade fertilizante. Neste sentido estudos sobre a qualidade seminal em diversas espécies de águas tropicais têm sido realizados especialmente pós indução hormonal (CRUZ-CASALLAS et al., 2005; ANDRADE-TALMELLI, et al., 2001; SHIMODA et al., 1999). Porém na literatura não foram localizados trabalhos que caracterizem e avaliem a qualidade seminal do tambaqui em cativeiro após indução hormonal, notadamente em relação à concentração espermática.

A concentração espermática tem sido um dos parâmetros mais avaliados e pode ser estimada através de três métodos: 1) contagem em câmara hematimétrica, entretanto mesmo sendo um método mais preciso é mais demorado e menos prático para uso no momento da criopreservação e fertilização artificial exigindo um manejo rápido entre a coleta e a manipulação do sêmen (CRUZ-CASALLAS et al., 2007; DONG et al., 2005); 2) Leitura do espermatócrito que embora muito rápido e prático algumas vezes não apresenta correlações lineares com a concentração espermática obtida em câmara hematimétrica ou com a densidade ótica (SHIMODA et., 2007; CRUZ-CASALLAS et al., 2006) e 3) através da densidade ótica medida por espectrofotometria, o qual necessita de uma calibração inicial com a leitura em câmara hematimétrica. Este método vem sendo amplamente utilizado na criopreservação de sêmen de animais de produção já que facilita a determinação rápida das

concentrações a serem estabelecidas por palheta (CIERESZKO & DABROWSKI, 1993; SUQUET et al., 1992; BILLARD et al., 1971).

A concentração espermática pode ser utilizada para determinar o volume operativo de sêmen, principalmente com sêmen congelado e descongelado a fim de identificar sua possível variação em relação às doses utilizadas (DUMONT, 2002). Pode ainda identificar variações entre machos quanto à produção espermática em relação ao período reprodutivo (MYLONAS et al., 2003; KAVAMOTO et al., 1997) ou em relação a animais selvagens e aqueles mantidos em cativeiro ou recondicionados (FERREIRA et al., 2001; POOLE & DILLIANE, 1998). Além disso, o exame anual da concentração espermática pode avaliar o número e o intervalo de vezes que um mesmo macho sob indução hormonal poderá ser utilizado (KAVAMOTO et al., 1997).

Deste modo, o objetivo deste trabalho foi elaborar a curva de concentração espermática do Tambaqui através das leituras em espectrofotômetro correlacionando-os com as concentrações determinadas pela contagem em câmara de Neubauer.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Centro de Pesquisas em Aqüicultura (CPAq) do DNOCS em Pentecoste, Ceará, Brasil, nos anos de 2007 a 2008. O Centro situa-se a 3°45'00" de latitude sul e 39°10'24" de longitude oeste e localiza-se a 82km de Fortaleza. A temperatura média ambiental foi de 26,8°C com máxima de 34°C e mínima de 20,6°C. O período de chuvas estendeu-se de janeiro a junho e a pluviosidade média anual foi de 860mm (FUNCEME, 2008).

Vinte e seis (n=26) machos com idade média superior a três anos (peso médio 5431,00±29,70g; comprimento médio: 68,00±0,00cm) foram selecionados pela emissão de

sêmen. Os animais identificados com chips eletrônicos formando dois grupos (Grupo I= animais induzidos, Grupo NI animais não induzidos) foram mantidos em dois viveiros de terra de 350m². Diariamente recebiam ração comercial contendo 32% de proteína bruta fornecida numa taxa de 5% do peso vivo, dividida em duas refeições diárias, conforme procedimento rotineiro de manejo no centro.

Mensalmente um grupo foi induzido hormonalmente (Grupo I) enquanto o outro permaneceu sem indução hormonal (grupo NI). Desta maneira, cada grupo induzido recebeu dose única de extrato pituitário de carpa comum (*Cyprinus carpio*) (EPC 2mg/Kg de peso vivo), por via intra celomática, na base da nadadeira peitoral em intervalo de 60 dias. Cada grupo foi induzido seis vezes, sendo realizadas doze coletas no total.

A coleta de sêmen foi realizada após 14 horas da indução hormonal. Antes da coleta cada animal foi submetido individualmente à sedação com solução a base de óleo de cravo puro (União Vegetal Suplementos Nutricionais LTDA), usado da seguinte maneira: 1mL do óleo de cravo foi diluído em 10mL de álcool absoluto e 1mL desta solução mãe foi diluída em 1000mL de água. Cada animal foi individualmente mergulhado no tanque por aproximadamente 2 minutos quando detectava-se o sintoma principal da perda de equilíbrio (ventre voltado para cima). Atingindo este estado de sedação era imediatamente retirado do tanque e submetido à coleta de sêmen, medidos, pesados e devolvidos ao tanque de manuseio vindo a se recuperar totalmente da anestesia após 15 minutos (ROUBACH et al. .2005).

Durante a coleta cada animal mantido em decúbito dorsal sobre esponja densidade D-33 e envolto em pano úmido sobre os olhos e na região caudal para facilitar sua contenção e evitar perda de escamas. Papel toalha foi utilizado para limpeza do orifício genital a fim de eliminar água, sangue, fezes ou urina. Uma pressão abdominal foi realizada no sentido antero-posterior conforme método adotado rotineiramente pelo DNOCS (FONTENELE, 1981). O sêmen liberado em alíquotas foi coletado em tubos de polietileno graduados para aferição do

volume, conservadas sobre gelo em escamas, e transportadas em isopor a uma temperatura de $\pm 5^{\circ}\text{C}$ até o Laboratório de Tecnologia do Sêmen Caprino e Ovino (LTSCO), em Fortaleza, tendo a viagem a duração média de uma hora.

Para a contagem dos espermatozóides o sêmen foi diluído em solução salina fisiológica formolizada a 1% na proporção de 1:4000 (1 μl sêmen: 4ml do diluente). Desta diluição 20 μl foram depositados em câmara de Neubauer sob microscópio com contraste de fase em objetiva de 40x. As contagens foram realizadas em cinco quadrados nos dois retículos após 15 minutos de sedimentação da amostra, sendo realizadas três repetições por amostra. Os valores que diferiam de 10% foram descartados e uma nova leitura realizada. As médias do número de células contadas nos dois retículos foram multiplicadas pelo fator 200×10^6 .

Após homogeneização da mistura sêmen:diluente, na mesma proporção anterior, uma alíquota de 4mL da amostra foi colocada em cubeta de cristal e colocada no espectrofotômetro. De cada amostra três leituras foram realizadas em transmitância (T) com um comprimento de onda de $\lambda=540\text{nm}$. O equipamento foi calibrado com a solução formol-salina a 1% para 100% de transmitância. Os dados foram agrupados como média \pm erro padrão, submetidos à análise estatística e usados para a elaboração da curva. Os dados de transmitância foram transformados (2-log) e então submetidos à análise de correlação linear de Pearson com probabilidade de erro de 5%, juntamente com os dados de concentração espermática obtidos pela contagem na câmara de Neubauer.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os animais apresentaram um peso médio de $5.431,00 \pm 29,70\text{g}$, comprimento total de $68,00 \pm 0,00\text{cm}$ e comprimento padrão de $59,00 \pm 0,00\text{cm}$. O volume seminal e a concentração espermática ao longo de um ano de estudo foi $5,05 \pm 2,08\text{mL}$ e $22,66 \pm 9,7 \times 10^9\text{sptz/mL}$

respectivamente para o grupo I, enquanto no grupo NI o volume seminal foi $0,55 \pm 0,52$ mL e a concentração foi $40,46 \pm 18,13 \times 10^9$ spztz/mL respectivamente. Verificou-se assim um aumento no volume seminal e uma redução na concentração espermática quando se utilizou a indução hormonal com extrato hipofisário aumentando a disponibilidade de sêmen. Este dados coincidem com os resultados de STREIT JUNIOR et al., (2008) que ao induzirem o dourado *Salminus maxillosus* com extrato hipofisário de carpa verificaram um aumento no volume do sêmen com conseqüente redução da concentração espermática devido à diluição seminal. Esta diluição seminal em espécies de elevada concentração espermática como o tambaqui favorece a divisão do sêmen em doses inseminantes. Entretanto no caso do presente experimento a redução na concentração foi de quase 50%, necessitando ser avaliada em relação ao potencial fertilizante das doses a serem utilizadas.

Os resultados aqui encontrados foram semelhante aos de FARIAS et al. (1999) quando trabalharam com o tambaqui ($22,9 \pm 9,8 \times 10^9$ e $22,9 \pm 9,7 \times 10^9$ spztz/mL, respectivamente), oriundos do mesmo Centro de Pesquisas e aos dados de FRESNEDA et al., (2004) (30×10^9 spztz/mL) para o caracídeo *Piaractus brachipomus* cultivado na Colômbia, parental do tambaqui. Entretanto foi inferior aos $43,7 \times 10^9$ spztz/mL obtidos por (VELÁSQUEZ-MEDINA, 2008) e $55,5 \times 1,4$ spztz/mL (NASCIMENTO, 2008) para a Pirapitinga (*P. brachipomus*) cultivada em Pentecoste-Ceará e induzidas com EPC na mesma dose utilizada para o tambaqui. Estas variações nas concentrações dentro de um mesmo gênero ou espécie podem estar relacionadas à época do ano (ARAL et al., 2007; WANG & CRIM, 1997), peso do animal (OLIVEIRA et al., 2007; SHIMODA et al., 2007) e aspecto nutricional (SALARO et al., 1999). Além disso, a qualidade de água também influencia na produção espermática, se esta apresentar elevada contaminação por metais pesados (KIME et al., 1996) ou disruptores endócrinos como octilfenol (RASMUSSEN & KORSGAARD, 2004; KIME & NASH 1999).

Foi observada uma correlação linear e inversa entre a concentração espermática em câmara de Neubauer e a transmitância em 540nm (Figura1) com um coeficiente de determinação $R^2=0,9656$, altamente significativo, obedecendo assim à lei de Lambert-Beer. Através dessa lei, intensidades da radiação incidente e emergente podem ser relacionadas com as concentrações de material presente na solução (ARAÚJO, 2007; SKOOG et al., 2002). A relação linear entre densidade ótica e densidade espermática oferece um método rápido para estimativa do número de espermatozóides no sêmen (CIERESZKO & DABROSWKI, 1993) e de acordo com estes mesmos autores a linearidades das correlações entre densidade ótica e densidade espermática oferece um bom coeficiente de correlação ($r=1$) em comprimentos de onda entre 400 a 700nm, entretanto a acurácia das determinações sofre influência de fatores como tipo de câmara hematimétrica utilizada (CHRISTENSEN et al., 2005), e da experiência do observador (BJÖRNDAHL et al., 2004) .

CONCLUSÃO

A curva de concentração obtida a partir de animais induzidos a cada dois meses demonstra que a qualidade e a quantidade sêmen produzida é suficiente para permitir a divisão em doses inseminantes, o que favorece o melhor uso dos reprodutores devendo por isso ser aplicada nos trabalhos de fertilização assistida.

A diluição de 1:4000 para leitura em espectrofotômetro permite a determinação da concentração mesmo em animais de elevada concentração de espermatozóides por mL. Estudos para a definição da melhor proporção espermatozóides:ovo com sêmen a fresco ou criopreservado deverão ser realizados utilizando esta curva como suporte aos trabalhos de fertilização assistida do tambaqui em cativeiro.

A utilização desta curva e de seus dados em tabela introduz informações de ordem prática necessárias para um manejo mais eficiente do sêmen seja fresco ou congelado durante trabalhos de fertilização artificial.

REFERÊNCIAS

ANDRADE-TALMELLI, E.F. et al. Características seminais de piabinha, *Brycon insignis* (Steindachner, 1876), após estimulação hormonal. **Boletim do Instituto da Pesca**, v. 27, n.2, p. 149-154, 2001.

ARAL, F. et al. A Study on the Milt Quality of *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1972) and *Carasobarbus luteus* (Heckel, 1843) in Atatürk Dam Lake, Southeastern Turkey. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v.7, p.41-44, 2007.

ARAUJO, A.M. **Monitoramento de processos em tempo real via espectrofotometria no infravermelho próximo**. 2007. 89f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) – Universidade Tiradentes.

BILLARD, R. et al. La production spermatogenetique chez la truite. **Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.** v. 11, p. 190-212, 1971.

BJÖRNDAHL, L. et al. Raising Standards in Andrology Semen Analysis: Professional and Personal Responsibility. **Journal of Andrology**, v. 25, n. 6, nov./dec. 2004.

CHRISTENSEN, P. et al. Discrepancies in the determination of sperm concentration using Bürker-Türk, Thoma and Makler counting chambers. **Theriogenology**, v. 63, p. 992-1003, 2005.

CIERESZKO, A.; DABROWSKI, K. Estimation of sperm concentration of rainbow trout, whitefish and yellow perch using a spectrophotometric technique. **Aquaculture**, v. 109 p. 367-373, 1993.

CRUZ-CASALLAS, P.E. et al. Milt quality and spermatozoa morphology of captive *Brycon siebenthalae* (Eigenmann) broodstock. **Aquaculture**, v. 36, n. 7, p. 682-686, 2005.

CRUZ-CASALLAS, P.E. et al. Determinación del espermocrito y efecto del volumen de la dosis semillante sobre la fertilidad en yamú (*Brycon amazonicus*)/Determination of spermocrit and effect of volume of insemination dose on fertility in yamú (*Brycon amazonicus*). **Rev. Colomb. Cienc. Pecu**, v.19, n. 2, p. 140-145, jun. 2006.

CRUZ-CASALLAS, P.E. et al. Seasonal Variation of Sperm Quality and the Relationship between Spermocrit and Sperm Concentration in Yamu *Brycon amazonicus*. **North American Journal Of Aquaculture**, v.69 p. 159-165, 2007.

DONG, Q. et al. Standardization of photometric measurement of sperm concentration from diploid and tetraploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). **Aquaculture Research**, v. 36, p. 86-93, 2005

DUMONT, P. et al. Adujusting the number of spermatozoa in mini straw by determination of the operative volume of bovine semen. **Theriogenology**, v. 57, p. 1743-1754, 2002.

FARIAS, J.O. et al. Avaliação “in vitro” e “in vivo” do sêmen de Tambaqui (*Colossoma Macropomum*) conservado a temperatura ambiente e criopreservado em água de coco. **Rev. Cient. Prod. Animal**, v.1, n.1, p. 44-58, 1999.

FERREIRA, A.A. et al. Avaliação qualitativa e quantitativa do sêmen de jundiá, *Rhamdia quelen*. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 27, n. 1, p. 57-60, 2001.

FONTENELE, O. **Método de hipofiseação de peixes adotado pelo DNOCS**. Fortaleza, DNOCS, 1981. 33p.

FRESNEDA A. et al. **Espermiación inducida y crioconservación de semen de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*)**. **Rev. Colomb. Cienc. Pecu**, v. 17 p. 46–52, 2004.

FUNCEME: Relatório de Pluviometria por faixa de anos - Estado do Ceara, 1974 – 2008, anos 2007 e 2008, Município: Pentecoste, Posto: Pentecoste, Micro-região: 11, Código: 115, Resumo de chuvas nos dados fornecidos pela **FUNCEME**. < <http://www.funceme.br/rams/>>

KAVAMOTO, E.T. et al. Produção espermática do curimatá, *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881. **Boletim do Instituto da Pesca**, v. 24 (único), p. 73-78, 1997.

KIME, D.E. et al. Use of computer assisted sperm analysis (casa) for monitoring the effects of pollution on sperm quality of fish; application to the effects of heavy metals. **Aquatic Toxicology**, v. 36 p. 223-237, 1996.

KIME, D.E.; NASH, J.P. Gamete viability as an indicator of reproductive endocrine disruption in fish. **The Science of the Total Environment**, v. 233 p. 123-129, 1999.

MYLONAS, C. et al. Seasonal changes in sperm production and quality in the red porgy *Pagrus pagrus* (L.). **Aquaculture Research**, v. 34, p. 1161-1170, 2003.

NASCIMENTO, A.F. **Motilidade espermática de sêmen de peixes criopreservado em diferentes meios e avaliada por métodos subjetivo e computadorizado**. 2008. 54f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). – Univerisidade Federal de Lavras.

OLIVEIRA, A.V. et al. Sucesso do resfriamento e congelamento de sêmen de pirapitinga *Brycon nattereri*. [*Sucess of cooling and freezing of pirapitinga (Brycon nattereri) semen*]. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, v. 59, n. 6, p. 1509-1515, 2007.

POOLE, W.R.; DILLIANE, M.G. Estimation of sperm concentration of wild and reconditioned brown trout, *Salmo trout*. **Aquaculture Research**, v. 29, p. 439-445, 1998.

RASMUSSEN, H.T.; KORSGAARD, B. Estrogenic octylphenol affects seminal fluid production and its biochemical composition of eelpout (*Zoarces viviparus*). **Comp. Biochem. and Physiol Part C**, v. 139 p. 1-10, 2004.

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

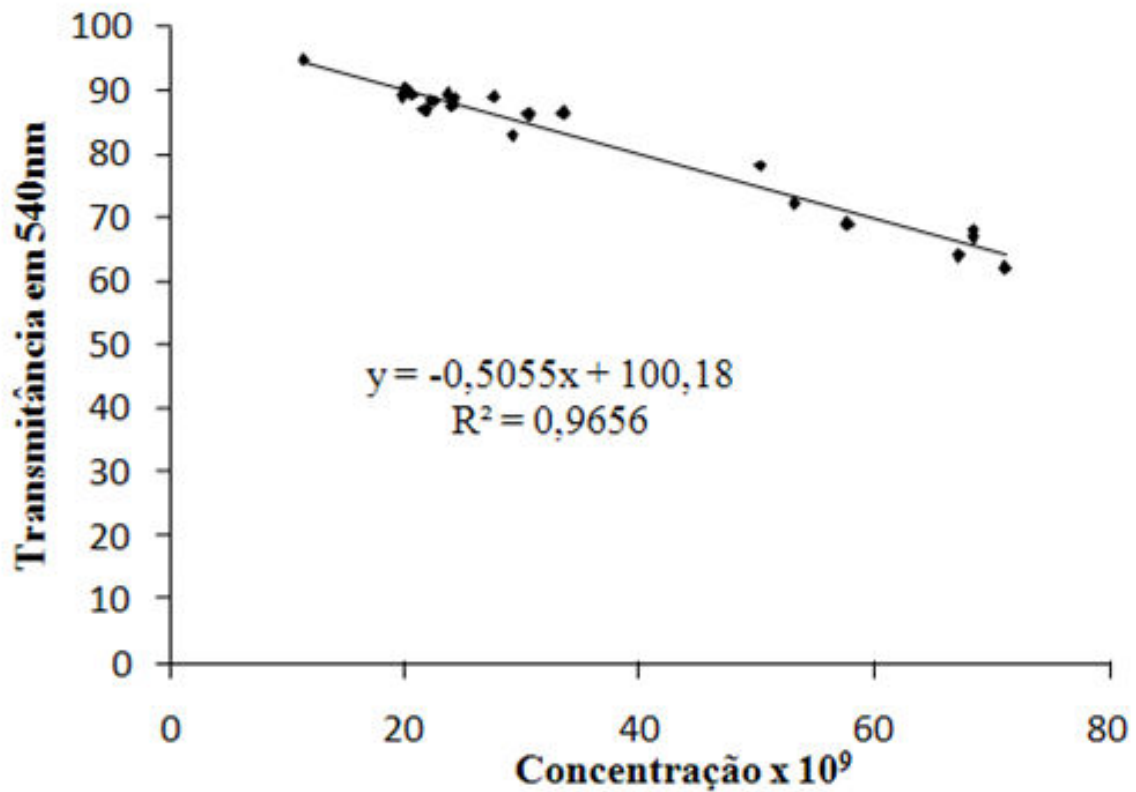
- SALARO, A.L. et al. Desempenho e espermatogênese de alevinos de tilápia alimentados com farelo ou farinha de semente de algodão. **Pesq. Agropec. Brás**, v. 34, n. 3, p. 449-457, mar. 1999.
- SHIMODA, E. et al. Caracterização química do plasma seminal do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) Holmberg, 1887 hipofisado. **Rev. Brás. Reprod. Anim**, v. 23, n. 3, p. 151-478. 1999.
- SHIMODA, E. et al. Utilização do espermátócrito para estimar a concentração espermática no sêmen da piabanha (*Brycon insignis*). **Braz. J. vet. Res. anim. Sci**, p. 19-24, 2007.
- SKOOG, D.A. et al. **Princípios de Análise Instrumental**. Porto Alegre: Editora Bookman-SBQ, 2002.
- SUQUET, M. et al. Assessment of sperm concentration and motility in turbot (*Scophthalmus muximus*). **Aquaculture**, v. 101 p. 177-185, 1992.
- STREIT JÚNIOR, D.P. et al. Parâmetros qualitativos do sêmen de dourado (*Salminus maxillosus*) em cativeiro. **Boletim do Instituto da Pesca**, v. 34, n. 3, p. 337-344, 2008.
- VELÁSQUEZ-MEDINA, S. **Criopresevação do sêmen de pirapitinga, Piaractus brachipomus, Pisces Characidae**. 2008. 96f. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) - Universidade Federal do Ceará, Instituto de Ciências do Mar.
- WANG, Z.; CRIM, L.W. Seasonal changes in the biochemistry of seminal plasma and sperm motility in the ocean pout, *Macrozoarces americanus*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 16, n. I, p. 77-83, 1997.

Tabela 1 - Percentual de transmitância (%T) obtido no espectrofotômetro ($\lambda = 540\text{nm}$) e a concentração espermática (sptz/mL em $\text{Nx}10^9$), obtida por contagem em câmara de Neubauer, de tambaqui em cativeiro, sob indução hormonal de EPC:(2 mg/kg).

% T	sptz/mL	% T	sptz/mL	% T	sptz/mL	% T	sptz/mL	% T	sptz/mL
0	198,18	20	158,62	40	119,05	60	79,49	80	39,92
1	196,20	21	156,64	41	117,07	61	77,51	81	37,94
2	194,22	22	154,66	42	115,09	62	75,53	82	35,96
3	192,25	23	152,8668	43	113,12	63	73,55	83	33,99
4	190,27	24	150,70	44	111,14	64	71,57	84	32,01
5	188,29	25	148,72	45	109,16	65	69,59	85	30,03
6	186,31	26	146,75	46	107,18	66	67,62	86	28,05
7	184,33	27	144,77	47	105,20	67	65,64	87	26,07
8	182,35	28	142,79	48	103,22	68	63,66	88	24,09
9	180,38	29	140,81	49	101,25	69	61,68	89	22,12
10	178,40	30	138,83	50	99,27	70	59,70	90	20,14
11	176,42	31	136,85	51	97,29	71	57,73	91	18,16
12	174,44	32	134,88	52	95,31	72	55,75	92	16,18
13	172,46	33	132,90	53	93,33	73	53,77	93	14,20
14	170,48	34	130,92	54	91,36	74	51,79	94	12,23
15	168,51	35	128,94	55	89,38	75	49,81	95	10,25
16	166,53	36	126,96	56	87,40	76	47,83	96	8,27
17	164,55	37	124,99	57	85,42	77	45,86	97	6,29
18	162,57	38	123,01	58	83,44	78	43,88	98	4,31
19	160,59	39	121,03	59	81,46	79	41,90	99	2,33

Tabela 2 - Valores percentuais de transmitância em espectrofotômetro ($\lambda = 540\text{nm}$) e concentração espermática em câmara de Neubauer ($\text{N} \times 10^9 \text{sptz/mL}$), mostrados individualmente por animal doador (*C. macropomum*) de sêmen, após indução hormonal (EPC: 2mg/kg de peso vivo, intra celomático). Pentecoste Ceará, Brasil.

Animal	% de Trasnmitância	Concentração espermática x 10^9sptz/mL
1	95,0	11,40
2	89,0	19,86
3	89,5	20,60
4	87,0	21,73
5	87,0	21,86
6	88,5	22,26
7	88,3	22,50
8	89,3	23,66
9	87,8	24,00
10	88,8	24,26
11	89,2	27,53
12	90,0	20,00
13	83,0	29,20
14	86,0	30,60
15	86,4	33,60
16	78,2	50,20
17	72,2	53,26
18	69,0	57,86
19	68,1	68,40
20	66,8	68,43
21	62,1	71,13
22	63,9	67,20



Legenda

Figura 1 - Curva de concentração de sêmen de tambaqui (*C. macropomum*), criado em cativeiro após indução hormonal (EPC: 2mg/kg de peso vivo, intra celomático), obtida mediante correlação entre ao percentual de transmitância em espectrofotômetro ($\lambda = 540\text{nm}$) e concentração espermática obtida em câmara de Neubauer. Pentecoste, Ceará, Brasil.

8 CAPITULO 3

COMPUTER-ASSISTED ANALYSIS OF TAMBAQUI (COLOSSOMA
MACROPOMUM, CUVIER, 1818) SEMEN CRYOPRESERVED IN MEDIA
BASED ON POWDER COCONUT WATER (PCW-104) AND RINGER
SOLUTION.

Computer-assisted analysis of tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier, 1818) semen cryopreserved in media based on powder coconut water (PCW-104) and Ringer solution

Marcelo José da Ascensão Feitosa Viera^a, Carminda Sandra Brito Salmito-Vanderley^a, Maria Audália Marques de Carvalho^a, Cristiane Clemente de Mello Salgueiro^a, Liliane Veras Leite^a, Ana Tereza de Mendonça Viveiros^b, Arlindo Alencar Araripe Noronha Moura^c, José Ferreira Nunes^{a,*}

^aBiotechnology Integrated Nucleus, Veterinary Department, Ceará State University, Av. Dedé Brasil, 1700, Campus do Itaperi, Parangaba, Fortaleza-CE, 60740-903, Brazil

^b Zootechnics Department, Lavras Federal University, CP 3037, Lavras-MG, 37200-000, Brazil

^c Zootechnics Department, Ceará Federal University, Av. Mister Hull, s/n, Fortaleza-CE, 60021-970, Brazil

*Corresponding author. Tel.: +55 85 31019851; Fax: +55 85 31019840. *E-mail address:* ferreiranunes@hotmail.com

ABSTRACT

The computer-assisted analysis (CASA) of semen was used to evaluate the effects of the cryopreservation in the sperm motility of tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), diluted in media based on powder coconut water (PCW-104) and Ringer Solution modified for fish, with two cryoprotectants, DMSO and methyl glycol at 10%, into three dilutions rates (1:3, 1:4, and 1:5) of semen for each cryosolution. The percentage of mobile and static spermatozoa were evaluated, as well as, the kinetic parameters of curvilinear velocity (VCL), straight line velocity (VSL), average velocity (VAP) and linearity (LIN) into cryosolutions and dilutions rates, thawed 15, 30 and 45 days after freezing. The media based on powder coconut water (PCW-104) showed superior results comparing to Ringer Solution ($45.63 \pm 3.58\%$ and $30.64 \pm 2.67\%$, respectively) related to percentage of mobile spermatozoa. At the same way, when the extenders were compared with the cryoprotectants DMSO (dimetilsulfoxide) and methyl glycol, the PCW-104 also showed superior results compared with those obtained with Ringer Solution ($56.18 \pm 5.29\%$ and $34.52 \pm 3.49\%$, respectively). The results showed that the media based on powder coconut water showed better performance on cryopreservation of tambaqui spermatozoa ($P < 0.05$).

Keywords: Fish, Tambaqui, CASA, cryopreservation, powder coconut water

1. Introduction

The tambaqui *Colossoma macropomum*, CUVIER, 1818, is a fish originated from the Amazon basin with large distribution in its rivers. The reproductive season occurs from December to January, mainly, coinciding with the flood of the Negro and Amazon rivers (Vieira et al., 1999). The introduction of tambaqui in the Northeast of Brazil is due to the National Department of Work Against the Drought – DNOCS, in 1972, when 74 fingerlings from Iquitos (Peru) were introduced in the vivarium of the Ichthyological Search Center (DIPIS/P) from DNOCS situated in Pentecoste, Ceará, Brazil (Bezerra et al., 1984; Albuquerque et al., 1994). Tambaqui is one of freshwater species reared in captivity which has a great commercial importance in the northeast of Brazil. However, this specie, when kept in vivarium, needs stimulation of its reproduction, needing of induction of spermiation and synchronized ovulation, once in this specie, it is short the period in which the microplicae remains open, as well as, the maintenance of sperm viability. Cryopreservation has been used to preserve semen of fish as much as to the production in aquiculture as to preservation of genetic material in conservation programs (Cabrita et al., 2008). But, what is observed in the literature is that the preservation of the sperm of fish isn't efficient and is often based on works of other species. One of the extenders in preservation of sperm of fish is the Ringer associated to cryoprotectants, detaching the Dimethylsulfoxide (DMSO); however, data are very controversial. Extenders that seem to be promising are those for sperm cooling and freezing based on “in nature” coconut water (Carvalho et al., 1999) and powdered coconut water (PCW; Nunes and Salgueiro, 2007), that have been used successfully in biotechnology of sperm of goats, sheep and dogs.

In the fish creation, stands out as predominant, the quality of the eggs or larvae rather than semen, however, both gametes qualities have important role in fertilization success and embryo survival (Rurangwa et al., 2004). Therefore, the quality of semen is essential to the reproductive process, 'cause it is very important the male contribution for reproductive and productive efficiency of the cattle, once beyond the genetic contribution, they can apply for a larger and faster selection pressure. Factors, such as the sperm concentration, aspect and volume of ejaculated, are very important to a good reproductive performance, together with sperm qualities, such as, mass motility, progressive velocity and percentage of living cells (Salgueiro and Nunes, 1999).

The spermatozoa motility evaluation and the morphology are essential in the exam of sperm quality, and establishing the correlation between the quality of sperm and fertility. Computer-assisted semen analysis (CASA) allows an objective evaluation of different characteristics, such as: movement, velocity and morphology. Though, some interesting results have been already obtained, mainly in human beings. A great number of questions remain without answers which must be answered to allow further development of technology in animal breeding and production. The main problem to this development is related to standardization, optimization of equipment procedure (Verstegen et al., 2002).

Different systems of computer-assisted semen analysis have shown high levels of accuracy and confidence (Kime et al., 2001; Rurangwa et al., 2004). The computer-assisted semen analysis (CASA), is an automated system to view, scan and analyze successive images of spermatozoa providing accurate information of the individual movement of each sperm and also statistical summaries of the sperm population (Amann and Katz, 2004). Was developed to analyze the sperm quality in human beings, later in other mammals (Asturiano et al., 2004) and fish (Toth et al., 1995). The CASA can represents an important tool in aquiculture, in order to quantify fast and objectively the effects of the breeding conditions and sperm manipulation about spermatozoa motility, increasing the fertilizer capacity of the animals from the vivarium (Rurangwa et al., 2004).

The differences in biology of the spermatozoa between fish and mammals can explain the difficulty in adequacy of the tools for the sperm motility analysis in fish. The introduction of CASA in the study of the fish reproduction, firstly overcame the sperm particular problems, such as: the short period in which the spermatozoa remain mobile after the activation and the high frequency of beating lash after activation (Billard and Cosson, 1992; Ciereszko et al., 1996; Kime et al., 2001; Rurangwa et al., 2001).

Studies on tambaqui seminal characteristics, especially on the motility parameters of frozen and thawed spermatozoa do not exist in literature, mainly preserved in cryosolutions based on powder coconut water (PCW) and evaluated by CASA. Thus, this study aimed to perform a computer-assisted semen analysis of the kinetic characteristics of the tambaqui *C. macropomum*, (Cuvier, 1888) frozen and thawed in cryosolutions based on powder coconut water (PCW-104) and in Ringer solution modified for fish.

2. Material and Methods

2.1. Experimental design and animals

The experiment was conducted at the Center of Agriculture Search (CPAq) from DNOCS, in Pentecoste, CE, Brazil, and at the Biotechnology Integrated Nucleus (NIB) from Ceará State University (UECE), in Fortaleza, Ceará, Brazil, started in April, 2007 and ended in April, 2008. CNAq is located to 3°45'00'' south latitude and 39°10'24'' west longitude and 82 Km from Fortaleza.

The animals were kept in land vivarium of 350 meter squares supplied by Pereira de Miranda. The average environmental temperature was 26.8°C with maximum of 34°C and minimum of 20.6°C. The period of rainfall extended from January to June and the average annual rainfall was 860 mm (FUNCEME, 2008).

Twenty-six (26) males of the specie tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1888) were used. They were previously selected by semen emission and properly identified through electronic microchips implanted subcutaneously at the base of the dorsal fin. The samples by approximately three years old were subsequently weighted (g) and measured (cm). During the experimental period, the fish received commercial ration containing 32% of crude protein consisting of 5% of alive weigh (AW) provided twice a day.

2.2. Hormonal treatment

For purposes of distribution of hormonal treatment behavior during the period of 12 months, the animals were divided into two equal batches (13 fish each), one with odd numbers and another with pair numbers (microchips). Each 30 days, in an alternate way, each batch was treated with a single dose of common carp pituitary extract (CPE; *Cyprinus carpio*, 2 mg/Kg AW) by intra abdominal way, at the Baden pectoral fin. On this way, the animals were 60 days resting between hormonal successive inductions.

2.3. Animals anesthetic, collection and sperm transportation

Before semen collection, the experimental animals were subjected to anesthetic though solution based on carnation oil (Eugenol; Union Plant Nutritional Supplements Ltda). It was diluted 1 mL of carnation oil into 10 mL of absolute alcohol, and then 1 mL of stock solution was re-diluted into 1000 mL of tank water (adapted from Vidal et al., 2007). Each fish was

kept immersed into the tank with anesthetic solution for approximately 2 minutes (till it was detected the main symptom of the loss equilibrium; womb upwards), being immediately subjected to sperm collection and next refunded to the handling tank.

Semen was collected after an interval of 14 hours after hormonal induction. Each animal was held in lateral decubitus and covered in humid cloth over the eyes to facilitate its contention. The genital orifice was dried with paper towel and an abdominal pressure was done in anteroposterior direction as the method adopted routinely by DNOCS (Fontenele, 1981). The semen was kept into Eppendorf tubes of 1.5 mL, identified and preserved in polystyrene under ice scales an average temperature of 5°C. The samples preserved like that were taken during an hour to NIB in Fortaleza.

2.4. Subjective motility analysis

To assess the quality of fresh semen 2 μ L a rate of 100 mL was diluted in water tanks and subjectively assessed under a light microscope with 200x increase, and we used a subjective scale of motility as Chambeyronia and Zohar (1990). Only samples with subjective motility than 80% were used to form the pool of semen for freezing.

2.5. Extenders and cryoprotectants

The pool of semen was initially divided into two aliquots and diluted in the following extenders: PCW-104: 2 g/50 mL of distilled water; pH 7.8 and 300 mOsm/Kg; (ACP Biotecnologia), and Ringer modified to fish (NaCl 6.5 g/L; KCl 3.0 g/L; NaHCO₃ 0.2 g/L; CaCl₂.6H₂O 0.3 g/L); pH 7.8 and 300 mOsm/Kg (Rana et al., 1995).

Were used as cryoprotectants dimethylsulfoxide (DMSO) and ethylene glycol methyl ether (methyl glycol), at 10% of concentration, respectively, in each treatment.

2.6. Semen Freezing

After collection the semen was kept in a polystyrene box with ice at 5°C, then diluted in a medium containing thinner (PCW-104 or Ringer modified for fish), plus 10% of the cryoprotectant (DMSO or methyl glycol) . These cryosolutions were also at 5°C. The samples were diluted in the proportions 1:3, 1:4 and 1:5 (semen : extender + cryoprotectant) and packed in straws of 0.5 mL, kept for five minutes (equilibrium time) at the same temperature. Then, the straws were exposed to liquid nitrogen vapor for 5 minutes, ramp freezing at a height of 3 cm from the surface level of liquid nitrogen, with initial temperature of -150°C,

and immersed in liquid nitrogen at -196°C . After this procedure, the samples were taken to the NIB, for subsequent thawing at 15, 30 and 45 days. The protocol followed that established by Viveiros et al. (2000) and Viveiros (2005).

2.7. Evaluation of post thawed semen characteristics using CASA system

The straws were removed from liquid nitrogen and immersed in a water bath at 40°C for 20 seconds. Then diluted in the activating solution 50 mM NaCl at a ratio of 1:25, placed in a Makler chamber and analyzed in SCA-CASA, adjusted for fish species, choice of speed VCL (curvilinear velocity) with speed range defined for 10, 20 and $40\ \mu\text{m/s}$ (microns per second), respectively, for sperm slow, medium and rapid progression over 80% of STR (straightness), run with 50% of LIN (linearity), to capture 25 images per second, eye lenses of 10x and 20x objective lens with yellow filter.

This study evaluates the percentage of motile sperm (fast, medium and slow) and static, in fresh and cryopreserved sperm after thawing. Besides the evaluation of kinetic parameters, also obtained from the CASA system, VCL, VSL (straight/line velocity), VAP (average path velocity) and LIN.

2.8. Statistical analysis

The differences between extenders, cryoprotectants and dilution rates, associated with seminal parameters, were evaluated through analysis of variance and DUNCAN statistical test (SAS, 2003).

3. Results

The percentage of motile sperm in fresh semen ($82.5 \pm 24.7\%$) was significantly higher ($P < 0.05$) when compared to semen cryopreserved with PCW-104 and Ringer after thawing (Figure 1). There was also a significant difference when comparing the data of general motility into PCW-104 and Ringer regardless dilution and cryoprotectant used, the PCW-104 showed superior (45.6 ± 3.5 vs. 30.6 ± 2.6 , respectively; $P < 0.05$; Figure 2). When confronting the data motility total PCW-104+DMSO 10% with the PCW-104+Met.Gli 10% (56.1 ± 5.2 vs. $35.0 \pm 3.4\%$, respectively), whereas the second one is lower ($P < 0.05$; Figure 2). But with respect to this same parameter, but thinner Ringer+DMSO 10% ($34.5 \pm 3.4\%$) and Ringer+Met.Gli 10% ($26.8 \pm 3.9\%$) there was no significant difference ($P > 0.05$; Figure 2).

The assessment of the percentage of motile sperm, fast, medium, slow and static moving in different dilutions and different extenders and cryoprotectants tested in this experiment are described in Table 1, where one can observe the superiority of PCW-104+DMSO 10% at a dilution of 1:3 ($65.2 \pm 7.6\%$ of motility, $P < 0.05$).

In Figure 3 we can observe the kinetic parameters of tambaqui *C. macropomum*, where there are significant differences between all data (VCL, VSL, VAP and LIN) only when compared PCW-104 to Ringer (the lower, $P < 0.05$) in general, in other words, regardless dilution and cryoprotectant (Figure 3).

4. Discussion

The quality of semen is essential for the reproductive process. Factors such as sperm concentration, appearance, and ejaculate volume are of great value for good reproductive performance allied to the sperm quality, and the motility of sperm one of the most relevant in the examination of semen quality, and establishing the correlation between semen quality, both fresh and cryopreserved, with the fertility (Lahnsteiner et al., 1996; Rurangwa et al., 2004). This study showed a significant difference between the percentage of motile sperm in fresh semen and after thawing, which was also observed in other studies, such as Velazquez-Medina (2008) that, working with semen of *Piaractus brachipomus* diluted in PCW-104, glucose 5% and Ringer with 10% of methyl glycol or DMSO, observed decrease in motility in all cryosolutions into 1:7 dilution rate. Toxic effects of cryoprotectants on the sperm of fish have been observed especially when used at high concentrations. For this reason it was used in this work the concentration of 10% cryoprotectant, the most commonly used in cryopreservation. The cryosolution PCW-104+DMSO 10% into 1:3 dilution rate was the one closest to the control group (65.2 vs. 97.1% of total motility, respectively), although the treatments of the PCW-104+DMSO 10% have shown significantly higher, even as the percentage of sperm fast and medium, they were significantly lower than that of fresh semen.

Studies by Navarro et al. (2004), obtained 40% of sperm motility from cachama blanca (*Piaractus brachipomus*) using DMSO 10%; also Liu et al. (2007) when analyzed by CASA the semen cryopreserved from Porgy marine red (*Pagrus major*), using DMSO 9%, found values of 40.3% sperm motility, lower levels of those obtained with *C. macropomum* in this work using PCW-104+DMSO 10%, into three dilutions rates, 1:3, 1:4 and 1:5 which was 65.2%, 47.8 and 55.5%, respectively. The result with the dilution rate of 1:3 was similar to those found by Rurangwa et al. (2001), when used DMSO plus 10% egg yolk and, after

thawing, obtained through the evaluation of CASA, sperm motility greater than 64% with sperm of African catfish (*Clarias geriepinus*).

However, Orfão and Viveiros (2005) obtained sperm motility of golden (*Salminus maxillosus*) above 68% using DMSO 10%, superior results to those found in this study and suggests the feasibility of the use of DMSO for cryopreservation sperm of teleosts. Viveiros (2005) and Murgas et al. (2007) reported that DMSO is one of the best cryoprotectant for semen of fish, both freshwater (Bedore, 1999) and saltwater (Ritar, 1999), showing the highest rates of post-thaw motility, supported by the affirmative findings of this study with tambaqui (*C. macropomum*), where one can observe that both thinner using PCW-104 as the Ringer, the best results were obtained when these were associated with DMSO compared to methyl glycol (PCW-104+DMSO 10%: 56.1% vs. PCW-104+Met.Gli. 10%: 35.0%; Ringer+DMSO 10%: 34.5% vs. Ringer +Met.Gli. 10%: 26.8%).

The fresh semen is virtually impossible to be frozen, requiring both the addition of cryoprotectants such as media extenders. In most studies, the combination of these two agents (cryoprotectants and extenders) is different and very difficult to know which factor is ideal for all species, since they act differently (Maisse et al., 1998).

Extenders are solutions of salts or carbohydrates, which added to the semen, maintain the viability of sperm cells during the reduction of temperature. The minimum requirements for a suitable extender are isotonicity, so there is no prior activation of sperm motility, stability, since their physical and chemical characteristics should not be changed during contact with semen, high thermal conductivity, allowing the rapid transfer of temperature of the external environment for the sperm, sterility, or not be linked to potentially harmful micro-sperm cells, and finally, serve as a carrier of cryoprotectants. It is important for sperm motility is not activated before or during freezing and thawing, because it can deplete the energy reserves necessary for fertilization (Legendre and Billard, 1980). Therefore, given this definition of thinner and the results obtained in this work with the species of fish *C. Macropomum* observed that the PCW-104 can be used as an extender. Also worth pointing out that, according to Melo and Godinho (2006), the effect of cryoprotectants on the viability of the sperm should be evaluated when it intends to use them in species which have not previously been tested.

A few studies in fish using the CASA program to record the movement of sperm after cryopreservation process were done, one of these is Liu et al. (2007), which assessed the motility and velocity of the fresh and thawed semen of *Pagrus major* 10 seconds after

activation. Among others, also used the CASA analysis of fish sperm Ciereszko et al. (1996; lake sturgeon, *Acipenser fulvencens*) Lahnsteiner et al. (2002; marine eel *Lota lota*), Rurangwa et al. (2001; African catfish, *Clarias geriepinus*) Asturian et al. (2004; European eel, *Anguilla anguilla* L.), Babiak et al. (2006; sole Atlantic, *Hippoglossus hippoglossus*).

Some studies are based on the CASA program to observe the characteristics of semen in their natural state or to test other factors that influence the speed and movement of semen. Dietrich et al. (2005), investigated the effects of sequential semen collected post mortem and after anesthesia of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), realizing a decrease in motility parameters, speed and trajectory. Wilson and Ingerman (2007) obtained in zebra fish (*Danio rerio*) 83% motility, VCL of 104 $\mu\text{m/s}$, VAP of 77 $\mu\text{m/s}$, VSL of 77 $\mu\text{m/s}$ and LIN of 84 $\mu\text{m/s}$ activated with tap water.

Kime and Nash (1999), argue that the CASA is a good tool to monitor the effects of endocrine disturbances in sperm motility and morphology of sperm. Kime et al. (2001) show four differences between the sperm of teleosts in relation to the sperm of mammals, are the first properties in the ejaculate, gain motility on contact with water, have a short lifetime (two minutes) and have no acrosoma, and the CASA allows the evaluation of sperm quality fast and objective in a short life span of sperm of teleosts. Verstegen et al. (2002) argue that the computer analysis (CASA) has different equipment and are machines that use optical and software for sperm identification and recovery of his career and this system the User can select the area to be examined, and the instrument CASA has demonstrated high levels of accuracy in spermatozoa of various species, and that the main problem is reported in the standardization and optimization of equipment and procedures.

5. Conclusions

Facing the best results obtained with the media based on powder coconut water (PCW-104), which produced a higher percentage of motile sperm surviving fast, medium and slow, and higher speeds, VCL, VSL, VAP and LIN when compared to Ringer modified to fish, it is concluded that this new extender for semen fish is promising to use in cryopreservation of tambaqui, *Colossoma macropomum*, and is indicated in assisted reproductive association with DMSO 10% and a dilution rate of 1:3, as obtained by the highest percentage of motile sperm.

Studies on the stabilization of the PCW-104 and its physical and chemical characteristics are important: contribute to the knowledge of substances and factors inherent

in the coconut water, which protect spermatozoa during cryopreservation and coconut water available in research centers that haven't the raw material (coconut).

Data from this study indicate that the CASA can be used as a powerful tool for precise and accurate objective analysis of sperm quality of tambaqui, both fresh and after thawing. However, further studies should be performed to verify the application of this system of analysis and research on sperm correlation with fertilizing capacity of semen of this species and other species of fish.

6. Acknowledgement

This research was supported by grants from the Cearense Foundation to Scientific and Technological Support (FUNCAP), National Council for Scientific and Technological Research (CNPq) and Coordination of Improvement of Higher Education (CAPES). Dr. Pedro Eymard, to the Aquaculture Research Center (CPAq) of the National Department of Works Against the Droughts (DNOCS), is thanked for make available the animals and the physical and laboratorial structures.

7. References

- Albuquerque, M.O., Bezerra, E.S., Kováks, J.W.G., 1994. Sobre o desenvolvimento do ovo e embrião do tambaqui *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818. B. Téc. DNOCS. 52, 79-100.
- Amann, R.P., Katz, D.F., 2004. Reflections on CASA after 25 years. *Journal of Andrology*. 25(3), 317-325.
- Asturiano, J.F., Pérez, L., Garzón, D.L., Marco-Jiménez, F., Peñaranda D.S., Vicente J.S., Jover, M., 2004. Physio-chemical characteristics of seminal plasma and development of media and methods for the cryopreservation of European eel sperm. *Fish Physiology and Biochemistry*. 30, 283-293.
- Babiak, I., Ottesen, O., Rudolfson, G., Johnsen, S., 2006. Chilled storage of semen from Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L.I. Optimizing the protocol. *Theriogenology*. 66(9), 2025-2035.
- Bedore, A.G., 1999. Característica e conservação do sêmen de Pacu-Caranha (*Piaractus mesopotamicus*) e de Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). Dissertação, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil, 53f.

- Bezerra E Silva, J.W., Nobre, M.I.S., Pinheiro, F.A., Sobrinho, A.C., 1984. Resultado de um experimento de policultivo de tambaqui *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818, híbrido de tilápia (*Oreochromis hornorum* Trew vs. *O. niloticus* L., 1766) e a carpa espelho *Cyprinus carpio* L., 1758 vs. *Specularis*. B. Téc. DNOCS. 42(1), 63-89.
- Billard, R., Cosson, J., 1992. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. J. Exp. Zool. 261, 122-131.
- Cabrita, E., Robles, V., Herráez, M.P., 2008. Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species. Taylor and Francis. 549.
- Farias, J.O., Carvalho, M.A.M., Nunes, J.F., Salgueiro, C.C.M., 1999. Avaliação “in vitro” e “in vivo” do sêmen de Tambaqui, *Colossoma Macropomum*, conservado em água de coco. Rev. Ciên. Prod. Anim. 1, 44-58.
- Chambeyron, F., Zohar, Y., 1990. A diluent for sperm cryopreservation of gilthead seabream, *Sparus aurata*. Aquaculture. 90, 345-352.
- Cierszko, A., Toth, G.P., Christ, S.A., Dabrowskila, K., 1996. Effect of cryopreservation and theophylline on motility characteristics of lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*) spermatozoa. Theriogenology. 45, 665-672.
- Dietrich, G., Kowalski, R., Wojtczak, M., Dobosz, S., Goryczko, K., Ciereszko. A., 2005. Motility parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa in relation to sequential collection of milt, time of post-mortem storage and anesthesia. Fish Phys. Bioch. 31, 1-9.
- Fontenele, O., 1981. Método de hipofisação de peixes adotado pelo DNOCS. DNOCS, Fortaleza, Brasil.
- Kime, D.E., Nash, J.P., 1999. Gamete viability as an indicator of reproductive endocrine disruption in fish. The Scienc. Total Env. 233, 123-129.
- Kime, D.E., Van Look, K.J.W., McAllister, B.G., Huyskens, G., Rurangwa, E., Ollevier, F., 2001. Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. Comparative Biochemistry and Physiology. 130(4), 425-433.
- Lahnsteiner F., Weismann T., Patzner, R.A., 1996. Cryopreservation of semen of the grayling (*Thymallus thymallus*) and the Danube salmon (*Hucho hucho*). Aquaculture. 144, 265-274.
- Lahnsteiner F., Mansour N., Weismann T., 2002. The cryopreservation of spermatozoa of a teleost fish, the burbot, *Lota lota* (Gadidae, Teleostei). Cryobiology. 45(3), 195-203.
- Legendre, M., Billard, R., 1980. Cryopreservation of rainbow trout sperm by deep-freezing. Reprod. Nut. Dev. 20(6), 1859-1868.

- Liu, Q.H., Li, J., Xiao, Z.Z., Ding, F.H., Yu, D.D., Xu, X.Z., 2007. Use of computer-assisted sperm analysis (CASA) to evaluate the quality of cryopreserved sperm in red seabream (*Pagrus major*). *Aquaculture*. 263, 20-25.
- Maisse, G., Labbe, C., Ogier De Baulny, B., Leveroni, S., Haffray, P., 1998. Cryoconservation de sperme et des embryons de poissons. *INRA. Prod. Anim.* 11(1), 57-65.
- Melo, F., Godinho, H., 2006. A protocol for cryopreservation of spermatozoa of the fish *Brycon orthotaenia*. *Anim. Reprod.* 3(3), 380-385.
- Murgas L.D.S., Miliorini, A.B., Fonseca, F.R.T., Pereira, G.J.M., 2007. Criopreservação do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) mediante adição de diferentes diluidores, ativadores e crioprotetores. *R. Bras. Zootec.* 36(3), 526-531.
- Navarro, O.J., Yohana, M., Velasco, S., Pablo, E., Cruz, C., 2004. Evaluación de cinco protectores para la crioconservación de semen de Cachama blanca (*Piaractus brachyomus*). *Rev. Col. Cienc. Pec.* 17, Suplemento.
- Nunes, J.F., Salgueiro, C.C.M. 2007. Utilização da água de coco em pó em processos biotecnológicos. In: FRUTAL – 14ª Semana Internacional da Fruticultura, Floricultura e Agroindústria, Fortaleza.
- Orfão, L.H., Viveiros, A.T.M., 2005. Efeito de diluidores na motilidade espermática do dourado (Pisces, *Salminus maxillosus*) durante o resfriamento, In: XXVIII Congresso de Iniciação Científica da UFLA- CICESAL, UFLA, Lavras, p.333.
- Rana, K. 1995. Cryopreservation of aquatic gametes and embryos: recent advances and applications. In: *Proceedings on the Reproductive Physiology of Fish*. Goetz, F.W. and Thomas, P.), p. 85-89. Austin, Texas, USA: Fish Symposium.
- Ritar, A.J., 1999. Artificial insemination with cryopreserved semen from striped trumpeter (*Latris lineate*). *Aquac. Res.* 180(1-2), 177-187.
- Rurangwa, E., Volckaert, F.A.M., Huyskens, G., Kime, D.E., Ollevier, F., 2001. Quality control of refrigerated and cryopreserved semen using computer assisted sperm analysis (CASA), viable staining and standardized fertilization in African catfish (*Clarias geriepinus*). *Theriogenology*. 55(3), 751-769.
- Rurangwa, E., Kime, D.E., Ollevier, F., Nash, J.P., 2004. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture*. 234, 1-28.
- Salgueiro, C.C.M., Nunes, J.F., 1999. Estudo de características testiculares e espermáticas de caprinos e ovinos. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 23(3), 231-232.

- Toth, G.P., Christ, S.A., McCarthy, H.W., Tarsella, J.A., Smith, M.K., 1995. Computer-assisted motion analysis of semen from the common carp. *J. Fish Biol.* 47, 986-1003.
- Velásquez-Medina, S., 2008. Criopreservação do sêmen de pirapitinga, *Piaratus brachypomus* (Pisces, Characidae). Dissertação, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil, 96p.
- Verstegen, J., Iguer-Ouada, M., Onclin, K., 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*. 57(1), 149–179.
- Vidal, L.V.O., Furuya, W.M., Graciano, T.S., Schamber, C.R., Silva, L.C.R., Sanatos, L.D., Souza, S.R., 2007. Eugenol como anestésico para juvenis de matrinxã (*Brycon cephalus*). *Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.* 8(4), 335-342.
- Vieira, E.F., Isaac, V.J., Fabre, N.N., 1999. Biologia Reprodutiva do Tambaqui, *Colossoma macropomum*, Cuvier, 1818 (teleostei, *Serras lamidae*), no Baixo Amazonas, Brasil. *Acta Amazônica*. 29, 625-638.
- Viveiros, A.T.M., SO, N., Komen, J., 2000. Sperm cryopreservation of African catfish *Clarias gariepinus* cryoprotectants, freezing rates and sperm: egg dilution ratio. *Theriogenology*. 54(9), 1395-1408.
- Viveiros, A.T.M., 2005. Semen cryopreservation in catfish species, with particular emphasis on the African catfish. *Animal Breeding Abstracts*. 73(3), 1-9.
- Wilson-Leedy, J.G., Ingermann, R.L., 2007. Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. *Theriogenology*. 67, 661-672.

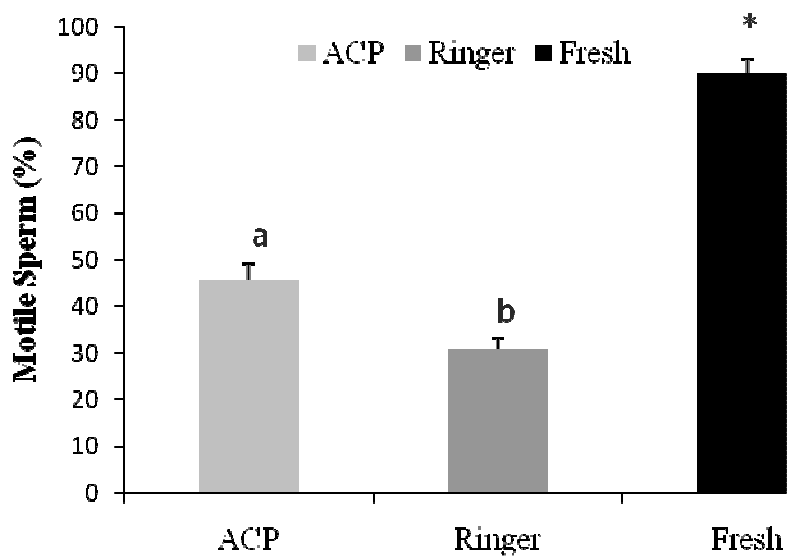


Figure 1. Effects of Crioextenders ACP and Ringer on the percentage of motile sperm tambaqui *C. macropomum* (Cuvier, 1818) after thawing, analyzed with the aid of computer SCA-CASA. (P <0.05).

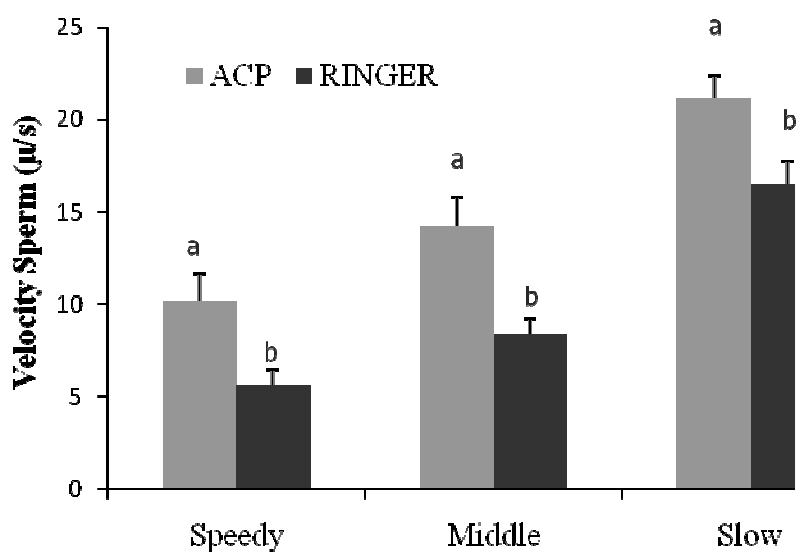


Figure 2. Effects of Crioextenders ACP and Ringer on the pattern of motility sperm tambaqui *C. macropomum* (Cuvier, 1818) after thawing, analyzed with the aid of computer SCA-CASA. (P <0.05).

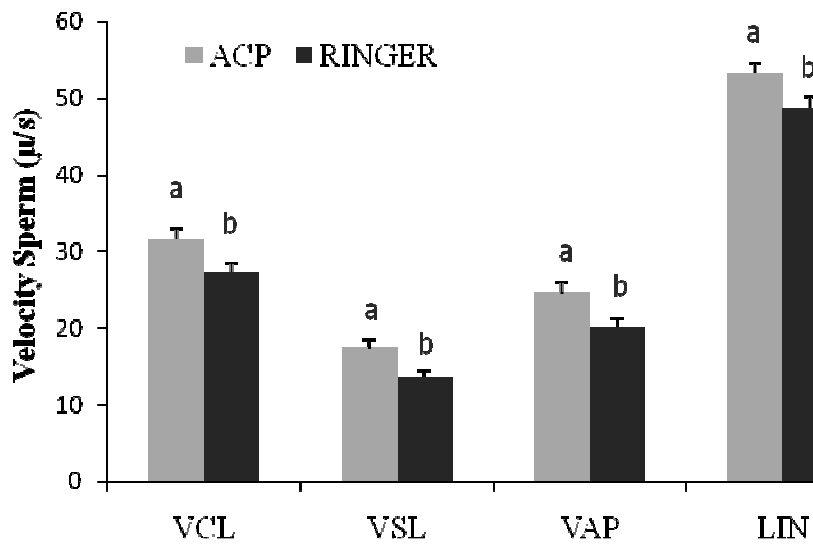


Figure 3. Effects of Crioprotectors ACP and Ringer on the parameters of velocity: curved line (VCL), Rectilinear (VSL), Average (VAP) and linearity (LIN) of spermatozoa of tambaqui *C. macropomum* (Cuvier, 1818) after thawing, analyzed with the aid of computer SCA-CASA. (P <0.05).

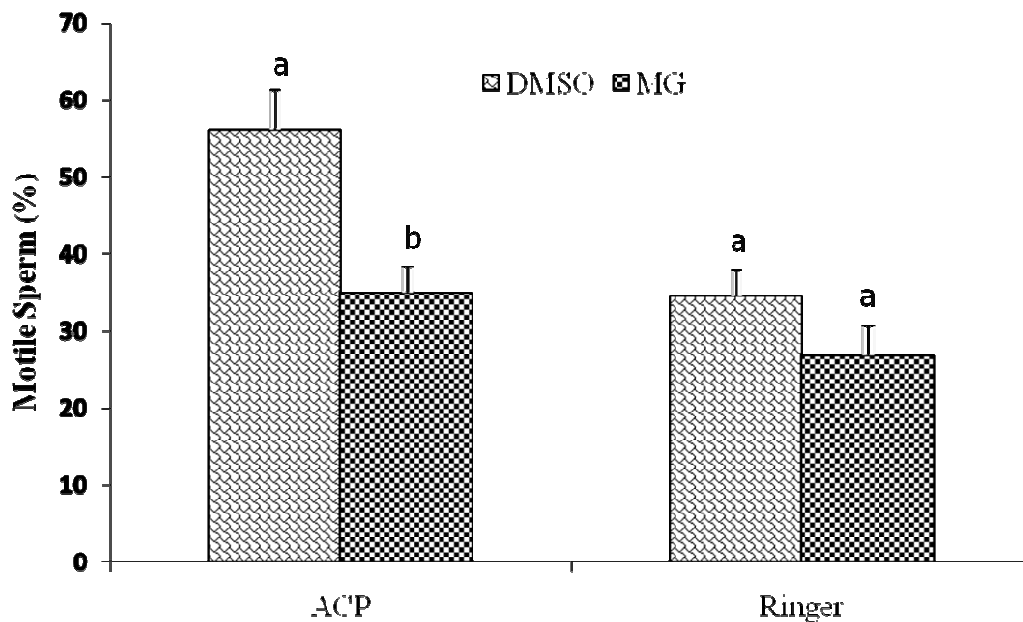


Figure 4. Effects of Cryoprotector DMSO e Metilglicol on the percentage of motile sperm tambaqui *C. macropomum* (Cuvier, 1818) after thawing, analyzed with the aid of computer SCA-CASA. (P <0.05).

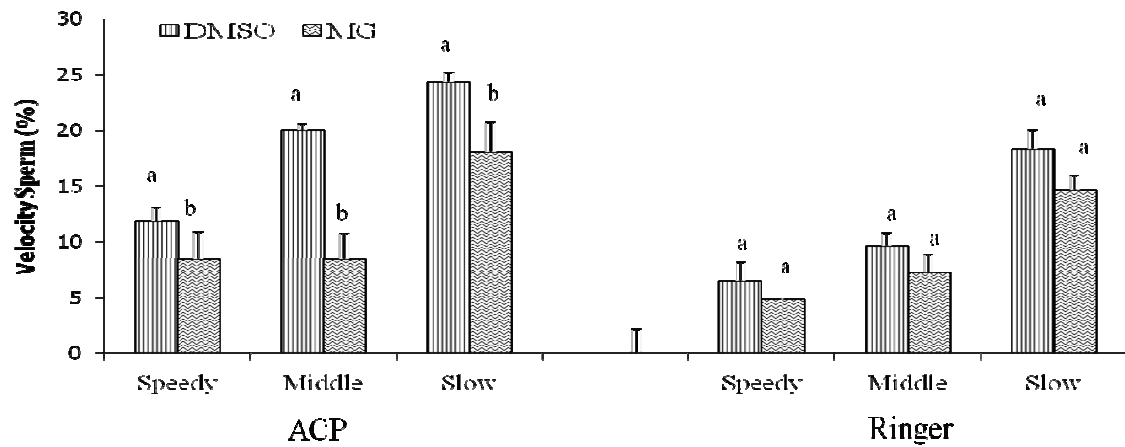


Figure 5. Effects of Cryoprotector DMSO e Metilglicol on the pattern of motility sperm tambaqui *C. macropomum* (Cuvier, 1818) after thawing, analyzed with the aid of computer SCA-CASA. (P <0.05).

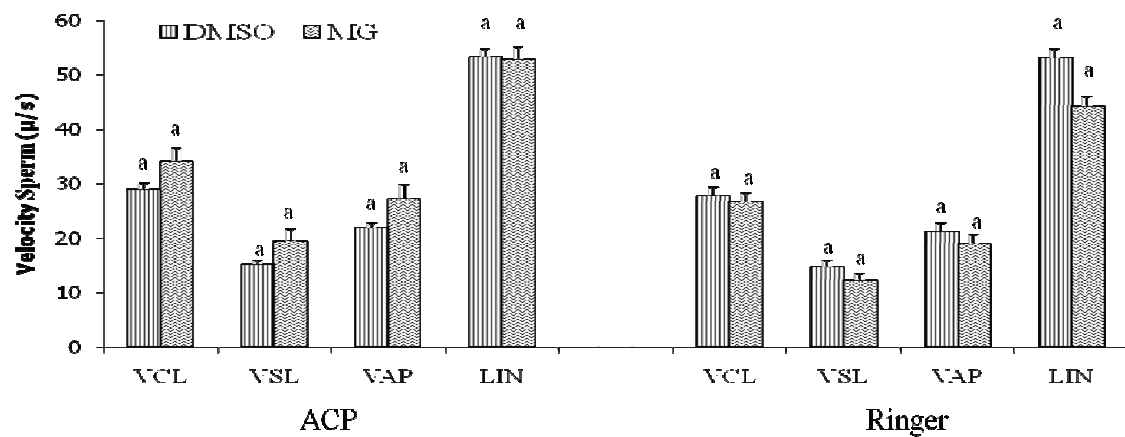


Figure 6. Effects of Cryoprotector DMSO e Metilglicol on the parameters of velocity: curved line (VCL), Rectilinear (VSL), Average (VAP) and linearity (LIN) of spermatozoa of tambaqui *C. macropomum* (Cuvier, 1818) after thawing, analyzed with the aid of computer SCA-CASA. (P <0.05).

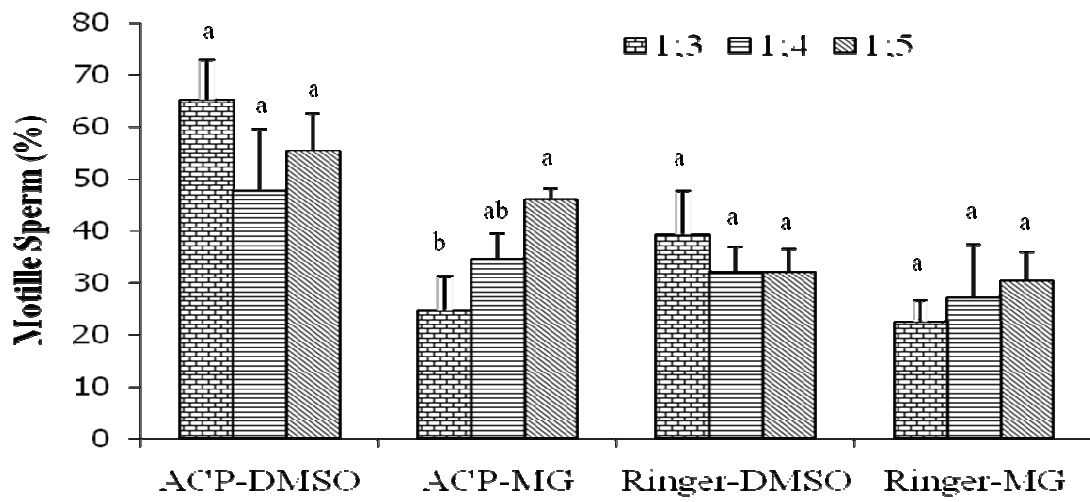


Figure 7. Effects of dilution rates in crioextenders ACP and Ringer on the percentage of motile sperm tambaqui *C. macropomum* (Cuvier, 1818) after thawing, analyzed with the aid of computer SCA-CASA. (P < 0.05).

Tab. 1. Percentage motility of tambaqui spermatozoa, *C. macropomum* (Cuvier, 1818) cryopreserved on media based on powder coconut water (PCW-104) and Ringer modified for fish, plus DMSO 10% or Metyl glycol 10% into three different dilution rates (1:3; 1:4 and 1:5) after thawing and by computed-assisted semen analysis (SCA, version 3.2., Microptic S.L., Spain).

Cryosolutions	Dilution Rate	Mobile sptz	Fast sptz	Medium sptz	Slow sptz	Static sptz
PCW-104+DMSO 10%	1:3	65.2±7.6 ^A	14.9±3.3 ^A	23.8±4.1 ^A	26.4±1.0 ^A	34.7±7.6 ^A
	1:4	47.8±12.0 ^A	10.6±3.3 ^A	18.6±6.2 ^A	18.5±2.7 ^B	52.3±12.0 ^A
	1:5	55.5±7.1 ^A	10.0±2.4 ^A	17.6±2.8 ^A	27.9±3.2 ^A	44.5±7.1 ^A
PCW-104+Met.gli. 10%	1:3	24.6±6.7 ^B	5.9±2.6 ^A	6.35±2.1 ^B	12.3±2.9 ^B	75.4±6.7 ^A
	1:4	34.5±5.0 ^{AB}	8.5±2.7 ^A	7.83±1.0 ^{AB}	18.1±2.2 ^{AB}	67.1±6.2 ^{AB}
	1:5	46.1±2.1 ^A	11.2±1.8 ^A	11.3±1.0 ^A	23.6±1.1 ^A	53.8±2.1 ^B
Ringer+DMSO 10%	1:3	39.2±8.5 ^A	6.5±5.6 ^A	11.4±3.2 ^A	21.1±3.6 ^A	60.7±8.5 ^A
	1:4	32.2±4.9 ^A	7.1±2.2 ^A	8.6±1.7 ^A	16.4±2.5 ^A	67.8±4.9 ^A
	1:5	32.1±4.4 ^A	5.8±1.5 ^A	8.8±1.7 ^A	17.4±1.6 ^A	67.8±4.5 ^A
Ringer+Met.gli. 10%	1:3	22.5±4.1 ^A	2.9±0.6 ^A	5.7±1.2 ^A	13.9±2.8 ^A	77.4±4.1 ^A
	1:4	27.3±10.2 ^A	6.0±3.7 ^A	6.9±2.1 ^A	14.3±4.5 ^A	72.6±10.2 ^A
	1:5	30.4±5.4 ^A	5.3±1.2 ^A	8.9±1.9 ^A	16.1±3.4 ^A	69.5±5.4 ^A

For each treatment, different letters in the same column differ statistically (P<0.05).

9 CAPITULO 4

Artigo de revisão

TITULO

CRIOPRESERVAÇÃO E ANÁLISE DE SÊMEM DE PEIXE

CRYOPRESERVATION AND ANALYSIS OF SÊMEM OF FISH

**MEIOS DILUENTES PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE PEIXES DA FAMÍLIA
CHARACIDAE: REVISÃO
(EXTENDERS FOR FISHES SPERM CRYOPRESERVATION OF CHARACIDAE FAMILY:
REVIEW)**

Marcelo José da Ascensão Feitosa VIEIRA^{1,2}, Liliane Veras LEITE², Fátima de Cássia Evangelista de OLIVEIRA², José Ferreira NUNES^{3,2}; Cristiane Clemente de Mello SALGUEIRO^{4,2}, Carminda Sandra Brito SALMITO-VANDERLEY^{4,2}

RESUMO

A família dos peixes caracídeos possui grande diversidade de espécies, uma enorme importância ecológica sendo também considerada de significativo valor comercial. A criopreservação de sêmen é uma técnica utilizada para contribuir na operacionalização e flexibilização dos programas de reprodução de espécies cultivadas ou em vias de extinção. Para garantir a sobrevivências dos espermatozóides durante a criopreservação é necessário adicionar soluções diluidoras e crioprotetoras, que reagem com o sêmen de forma peculiar dependendo da espécie animal. E para avaliar o sucesso da criopreservação é de grande importância analisar a motilidade desses espermatozóides após o descongelamento. Diante disso, o objetivo dessa revisão foi buscar identificar meios de congelamento adotados pela técnica de criopreservação de sêmen de peixes caracídeos, e os métodos de análise da motilidade do sêmen pós-descongelamento. Os experimentos de criopreservação de sêmen de peixes caracídeos e observados nesta revisão relatam que os criodiluidores mais utilizados são glicose, BTS e Água de coco (ACP) associados a glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO), etilenoglicol, metilglicol, dimetilacetamida, propilenoglicol ou metanol. A análise da motilidade do sêmen pós-descongelamento que garante níveis mais altos de precisão na avaliação do sêmen é o método objetivo computadorizado (Computer-Assisted Semen Analyses - CASA). Diante da grande variedade de protocolos, conclui-se que é de muita importância incentivar o estudo sobre as particularidades do sêmen dos peixes caracídeos, o que permitirá a padronização da técnica de criopreservação, definindo com isso os componentes dos crioprotetores e meios diluidores, bem como os procedimentos adequados para o congelamento e descongelamento de sêmen desse grupo peixes.

Palavras-chave: criopreservação, sêmen, diluentes, Characidae, CASA.

ABSTRACT

The Characidae fish has a great diversity of species, an enormous ecological importance and was considered of significant commercial value. The sperm cryopreservation is a technique used to help operations and flexibility of breeding programs for cultivated or endangered species. To ensure the sperm survival during cryopreservation is necessary to add extenders, which react with the sperm of peculiar way depending on species. To evaluate the success of cryopreservation it is important to

analyze the sperm motility after thawing. Thus, the objective of this review was identify extenders adopted by the cryopreservation technique for characid fishes, and analysis methods for sperm motility after thawing. The cryopreservation experiments in characid fishes observed in this review reported that the most extenders commonly used were glucose, (BTS) and coconut water (ACP) associated with glycerol, dimethyl sulfoxide (DMSO), ethylene glycol, methyl glycol, dimethylacetamide, propylene glycol or methanol. The objective analysis of sperm motility after thawing through (Computer-Assisted Semen Analysis – CASA) systems guarantees the highest accuracy in the evaluation of semen than subjective method. Given the wide range of protocols, it appears that it is very important to encourage the study of the characteristics of semen of characid fish, allowing the standardization of cryopreservation, thereby defining the components of cryoprotectors and diluents, as well as appropriate procedures for freezing and thawing of semen that particular group fish. Though, the great variability of protocols used encourage more researches about peculiarities in sperm characteristics in order to standard protocols for characid species.

Key words: cryopreservation, semen, extender, Characidae, CASA.

1. INTRODUÇÃO

Os peixes Characiformes estão presentes em, praticamente, todos os ambientes de água doce, distribuídos pelo continente americano, desde a fronteira México - Estados Unidos até o sul da Argentina (LUCENA, 1993). A ordem apresenta dez famílias com 237 gêneros e, pelo menos, 1343 espécies (NELSON, 1994). A família Characidae é considerada a maior e a mais complexa, pois é composta de peixes com hábitos alimentares muito diversificados (herbívoros, onívoros e carnívoros) que exploram grande variedade de habitats.

A família Characidae possui grande diversidade, uma enorme importância ecológica sendo considerada de significativo valor comercial. A maioria dessas espécies habita pequenos corpos de água como os riachos e cabeceiras, ambientes estes que possuem graus relativamente elevados de riqueza, endemidade, porém estes ambientes demonstram fragilidade as suas ictiofaunas frente a ações antrópicas deletérias. Espécies dos gêneros *Colossoma* tais como o tambaqui, *C. macropomum* (Cuvier, 1818), e *Piaractus* como a pirapitinga, *P. brachypomus* (Cuvier, 1818); e o pacu caranha, *P. mesopotamicus* (Holmberg, 1887), dentre outras são importantíssimas, tanto do ponto de vista da exploração pesqueira como da criação em viveiros.

A criopreservação de sêmen tem sido utilizada para aperfeiçoar várias atividades em cultivo de peixes, como a obtenção de sêmen em tempos e locais diferentes e a sua utilização em programas de melhoramento genético (VERSTEGEN et al., 2002). O primeiro trabalho sobre congelamento de sêmen de peixe foi realizado a mais de 50 anos por BLAXTER (1953) para viabilizar o cruzamento de dois “tipos” de arenque em épocas diferentes do ano.

O desenvolvimento de um bom método de congelação de sêmen de peixes é imprescindível não só para promover um bom programa de seleção e melhoramento da raça como também para poder

suprir a atual demanda de sêmen e reprodutores de alta produção. Para garantir o sucesso da criopreservação do sêmen nas diversas espécies peixes, é necessário adquirir conhecimentos sobre as características seminais desses animais, pois a qualidade do sêmen é fundamental para o processo reprodutivo.

A contribuição do macho para a eficiência reprodutiva e produtiva do cultivo é de grande importância, uma vez que além do aporte genético, neles pode se aplicar uma pressão de seleção maior e mais rápida. Fatores como a concentração espermática, aspecto e volume seminal, são de grande valia para o bom desempenho reprodutivo, aliado às qualidades espermáticas e desempenho em relação a movimento massal, velocidade progressiva e percentual de células vivas (SALGUEIRO e NUNES, 1999).

Uma das finalidades da biotecnologia reprodutiva de peixes é encontrar um bom diluente para a criopreservação do sêmen (WATSON, 1995). Esta técnica tornou-se uma ferramenta de auxílio à aqüicultura comercial, pois houve a possibilidades de selecionar reprodutores, o desenvolvimento de plantéis em programas de melhoramento genético (VERSTEGEN et al., 2002) e no aperfeiçoamento de várias atividades como a obtenção de sêmen em tempos e locais diferentes. Embora a criopreservação tenha beneficiado a produção de pescado, estudos ainda buscam diminuir e eliminar os fatores que reduzem a viabilidade e a fertilidade do espermatozóide após descongelamento (MEDEIROS, 2002)

Nos últimos anos, vários pesquisadores têm tentado utilizar soluções criodiluidoras adicionadas ao sêmen com a finalidade de manter a viabilidade espermática pós-descongelado. Entre estes diluidores a água de coco vem se tornando uma solução inovadora, pois esta tem demonstrado grande viabilidade deste meio diluidor no processo de refrigeração e congelação do sêmen (NUNES, 1987).

Análises de sêmen, tanto fresco quanto criopreservado, têm sido realizadas, principalmente, por métodos computadorizados (CASA), pois este permite uma avaliação objetiva de diferentes características de célula, tais como movimento, velocidade e morfologia. Embora alguns resultados interessantes já tenham sido obtidos, muitas perguntas permanecem, as quais devem ser respondidas para permitir o desenvolvimento adicional desta tecnologia.

Muitos estudos sobre qualidade seminal pós criopreservação têm sido realizados utilizando diferentes protocolos de congelação. Além disso, diferença nas diversas etapas do processo utilizada em cada protocolo tem levado a diferentes resultados o que sugere uma revisão de literatura para detecção de lacunas existentes com relação à perda da motilidade dos espermatozóides criopreservados em programas de inseminação artificial em algumas espécies.

Objetivou-se com essa revisão, identificar os meios de congelamento habitualmente adotados na técnica de criopreservação de sêmen de peixes da família caracídea mais cultivados para alimentação humana, e avaliados pelos métodos de análise da motilidade dos espermatozóides após o descongelamento.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Reprodução de peixes

Os espermatozoides da maior parte dos teleosteos diferem dos espermatozoides dos mamíferos em importantes aspectos: sua fecundação é externa, são imóveis no momento da ejaculação, a motilidade espermática é induzida em contato com a água e o tempo de motilidade é muito curto (aproximadamente 2 minutos). A ativação do espermatozoide é, portanto, influenciada pelo estresse osmótico ao qual é exposto: hipotônico para peixes de água doce e hipertônico para peixes de água salgada (HOLT and VAN LOOK, 2004). Além disso, os espermatozoides de peixes, de fecundação externa, não possuem acrossoma por não haver necessidade de romper a barreira celular, pois sua penetração no ovócito acontece através de um orifício especializada denominado micrópila (KIME et al., 2001).

No caso de peixes de água doce o ovócito permanece com a micrópila aberta por um período muito curto (menos de 2 minutos). Após o fechamento deste orifício os espermatozoides são impedidos de penetrar o ovócito. Diante disso, quanto mais elevada a concentração de espermatozoides e quanto mais longa for sua motilidade e longevidade, maiores as chances de ocorrerem fecundações bem sucedidas. Deste modo, esses parâmetros seminais são de ampla importância nessa fase inicial da reprodução de peixes (RURANGWA et al., 1998).

Nas condições naturais, muitos peixes migram rio acima no período reprodutivo recebendo estímulos do meio que modificam a sua fisiologia preparando-o para a desova. Os peixes que praticam a estratégia reprodutiva da migração são denominados peixes de piracema. A grande maioria dos peixes de valor para pesca sendo, portanto, muito importantes para a cultura e economia são peixes de piracema. Os indivíduos em cativeiro não conseguem reproduzir-se naturalmente porque, nessas condições, não encontram estímulos físico-químicos necessários para completar seu ciclo de reprodução (MURGAS, 2003).

Com o intuito de colaborar para a reprodução de peixes a fim de restaurar os estoques selvagens ameaçados e/ou em vias de extinção, como também para atender a demanda do mercado consumidor, diversos estudos sobre a criopreservação de gametas vêm sendo realizados (SUQUET et al., 2000).

2.2. Congelação seminal (Criopreservação)

A criopreservação de sêmen é uma boa alternativa para a melhoria da reprodução de peixes em cativeiro, tendo em vista que seus benefícios são variados, dentre eles: sincronização na disponibilidade de sêmen, facilita o transporte e evita envelhecimento dos gametas. Além disso, conserva da variabilidade genética, e elimina os custos com a manutenção dos machos. (SUQUET et al., 2000).

Porém muitos fatores influenciam no sucesso da criopreservação. Segundo HUNTER (1982), fatores como: composição do diluente; concentração de células ou taxa de diluição;

composição do agente crioprotetor e sua concentração no meio; tempo e temperatura de equilíbrio; natureza da curva de resfriamento; natureza da curva de descongelamento; composição do meio de descongelamento específico, dentre outros são estresses em que os espermatozóides são submetidos durante o congelamento que comprometem sua viabilidade pós-descogelamento.

Uma das maiores dificuldades na congelação do sêmen é evitar a formação de cristais de gelo intra e extracelulares, e aumento da concentração de solutos (MATEOS-REX y AGUILLAR, 1996). Para minimizar esses efeitos, durante o processo de criopreservação do sêmen, são adicionados diluentes que devem ter como uma de suas funções proteger os espermatozóides contra o choque térmico.

Tendo em vista que os espermatozóides no sêmen fresco, sem contaminação são imóveis, amostras seminais que apresentarem motilidade antes da ativação devem ser descartadas dos testes de criopreservação. Também devem ser descartadas dos testes amostras que obtiverem baixa taxa de motilidade após a ativação (VELÁSQUEZ, 2008).

A etapa de congelação inicia-se com a adição do criodiluidor ao sêmen, em seguida o envasamento em palhetas ou criotubos, submetidos à diminuição de temperatura, que pode ser feita por diferentes métodos, até serem finalmente mergulhados e armazenado em nitrogênio líquido. Esta visão geral, desde a coleta até a congelação propriamente dita, do protocolo de criopreservação de sêmen de peixe é uma reunião dos mais diversos protocolos comumente utilizados, mas a comparação entre eles é muito difícil devido à diversidade de parâmetros envolvidos (CABRITA et al, 2008; VIVEIROS et al., 2005; VIVEIROS et al., 2000).

2.3. Meios de congelação (Criodiluidores)

O sêmen puro é praticamente impossível de ser congelado sem causar danos à maioria dos espermatozóides, necessitando, portanto, da adição de crioprotetores e de soluções diluidoras. Essa solução adicionada ao sêmen que mantém a viabilidade das células espermáticas durante a redução da temperatura, composta de crioprotetor e diluidor é comumente chamado de criodiluidor (PICKETT et al., 1987).

Condições mínimas são requeridas para um diluente ser adequado tais como: isotonicidade, para que não haja ativação prévia da motilidade espermática; estabilidade, pois suas características físico-químicas não devem ser alteradas durante o contato com o sêmen; condutividade térmica elevada, permitindo a rápida transferência de temperatura do meio externo para os espermatozóides; esterilidade, ou seja, não devem vincular microrganismos potencialmente nocivos às células espermáticas; e, finalmente, servir de carreador de crioprotetores. É importante que a motilidade dos espermatozóides não seja ativada antes do congelamento e nem durante o descongelamento, pois a mesma pode exaurir a reserva energética necessária à fertilização (LEGENDRE E BILLARD, 1980).

O diluente deve proporcionar, ainda, nutrientes como fontes de energia; manter a pressão osmótica adequada; aumentar o volume do sêmen. Porém a sua composição é um dos fatores que afeta

à proporção de espermatozóides vivos após a congelação-descongelação, pois cada grupo de animais possui especificidade própria (WATSON, 1995). Desta forma, é de vital importância para a criopreservação do sêmen que a composição do diluidor seja ajustada para cada espécie em particular, a cada tecnologia seminal empregada (HOPKINS AND EVANS, 1991).

Para proteger os espermatozóides dos efeitos maléficos do congelamento, crioprotetores internos devem ser acrescentados á solução diluidora. Também podem ser utilizados agentes que atuem como crioprotetor externo, protegendo ainda mais as células contra o choque térmico. Estes funcionam recobrando a superfície celular e estabilizando a membrana, ajudando, portanto, a minimizar os possíveis danos celulares causados pelo processo de congelamento. São bastante utilizados a gema de ovo de galinha e leite desnatado, já que a fosfatidilcolina (lecitina) e lipoproteínas da gema, e a caseína do leite tem essa propriedade protetora (NAVARRO, 2004).

Toda essa proteção ao espermatozóide é essencial, pois durante os processos de congelação-descongelação os espermatozóides são submetidos a condições desfavoráveis como: a desidratação, as mudanças da fase de transição dos fosfolipídios da membrana, o efeito solução e a formação de cristais de gelo (PARKS e GRAHAM, 1992). A consequência imediata destes processos é a ruptura da membrana plasmática (WATSON, 1995) devido aos estresses térmico, mecânico, químico e osmótico exercidos sobre a célula durante a congelação (PARKS and GRAHAM, 1992).

Muitos autores testaram a eficiência da glicose como diluidor de sêmen de peixe, associados a vários crioprotetores (Quadro 1). Em trabalhos com sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), curimba (*Prochilodus lineatus*) e piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) os tratamentos que obtiveram resultados mais expressivos para o congelamento de sêmen foram os adicionados do crioprotetor dimetilsulfoxido (DMSO), quando comparadas aos outros crioprotetores (MURGAS et al., 2007; MILIORINI., 2006; MILIORINI et al., 2004).

Quadro 1: Utilização da Glicose como diluidor na criopreservação de sêmen de peixes caracídeos.

VELASCO-SANTAMARIA (2006) relata que o diluente mais eficiente para a criopreservação de sêmen de yamú (*Brycon amazonicus*) é a glicose 5% acrescida de 10% de DMSO e 12% de gema de ovo. Resultados satisfatórios também foram relatados por CAROLSFELD (2003) na criopreservação de várias espécies de caracídeos (*Brycon orbignyanus*, *Prochilodus lineatus*, *Piaractus mesopotamicus*, *Salminus maxillosus* e *Leporinus elongatus*) utilizando diluente constituído de 5% de glicose, 10% de DMSO e 10% de gema de ovo.

Quadro 1: Utilização da Glicose como diluidor na criopreservação de sêmen de peixes caracídeos.

Autor (Ano)	Espécie	Criodiluidor		% aproximada de motilidade pós-descongelamento
MURGAS (2003)	Piracanjuba (<i>Brycon orbinyanus</i>)	Glicose 5%	DMSO	51-74
FRESNEDA (2004)	Pirapitinga (<i>Piaractus brachypomu</i>)	Glicose +NaCl, gema de ovo	DMSO	80
ÓRFÃO (2006)	Curimba (<i>Prochilodus lineatus</i>)	Glicose 5%	DMSO	50
			Metilglicol	95
STREIT JR. (2006)	Pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>)	Gema de ovo + Glicose	DMSO	16
VELÁSQUEZ (2008)	Pirapitinga (<i>Piaractus brachypomus</i>)	Glicose 5%	DMSO 10%	51
			MetilGlicol 10%	61
MENEZES (2008)	Tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>)	Glicose 5%	DMA	< 5
			DMSO	5-10
			Metanol	20-25
			PropilenoGlicol	20-25
			EtilenoGlicol	<5
			Metanol	30

Aparentemente, determinados crioprotetores agem melhor em determinadas espécies do que em outras. A seleção do criodiluidor mais adequado a ser utilizado pela primeira vez em uma espécie deve ser feita em testes de tentativa e erro (BEDORE, 1999). NAVARRO et al. (2004), estudando a cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) utilizaram Glicose + NaCl associados á DMSO ou Metanol nas concentrações de 5, 10 e 15% adicionados de gema de ovo ou leite em pó diluído em água destilada, para criopreservação, observaram que os tratamentos que melhor preservaram os espermatozóides foram aqueles que utilizaram a concentração de 10% de crioprotetor interno. No tratamento com DMSO 10% os melhores resultados encontrados foram quando este crioprotetor interno estava associado ao crioprotetor externo gema de ovo (7 ml de gema de ovo + DMSO 10%/100ml). Porém, o criopreservado que utilizou o Metanol 10%, os melhores resultados encontraram-se na associação deste com leite em pó (15 ml de leite em pó + Metanol 10%/100ml).

FRESNEDA et al. (2004), trabalhando com esta mesma espécie utilizaram diluente composto por glicose acrescido de NaCl e DMSO e gema de ovo encontrando 80% de espermatozóides móveis após o descongelamento.

MARIA et al. (2006) trabalhando com o sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) desenvolveram protocolos para armazenamento a fresco, a 4°C e criopreservados a -196°C. A

metodologia aplicada utilizou várias associações entre crioprotetores e diluidores. Neste procedimento foi observado que o metilglicol foi o crioprotetor mais efetivo quando comparado ao DMSO e ao metanol em relação à motilidade espermática.

Outro diluidor bastante utilizado é o BTS (Beeltsville Thawing Solution-MINTUB), composto de Glicose, Citrato de Sódio, EDTA, Bicarbonato de Sódio, Cloreto de Potássio e Sulfato de Neomicina. Esse meio foi produzido, inicialmente, para a criopreservação de sêmen de suíno, mas já foram relatados bons resultados dessa solução para a criopreservação de sêmen de Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*), Pirapitinga (*Brycon nattereri*), Curimba (*Prochilodus lineatus*) (MARIA 2005; MURGAS et al. 2002; OLIVEIRA et al. 2007; ORFÃO et al. 2006). Porém STRET et al. (2006) relatou que BTS associado ao glicerol não foi eficaz na manutenção das características espermática de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). (Quadro 2).

Uma das inovações mais recentes da biotecnologia do sêmen de peixe é a utilização de água de coco como diluidor de sêmen para criopreservação, sendo este um meio natural e estéril composto por sais, proteínas, açúcares, vitaminas, gorduras neutras, além de indutores da divisão celular e diversos eletrólitos, podendo exercer uma ação benéfica sobre a conservação celular. Trabalhos realizados por NUNES (1987) demonstraram a viabilidade da água de coco como diluente de refrigeração e congelação do sêmen caprino, o que levou à elaboração de um meio comercial de conservação, padronizado e estabilizado, à base de água de coco em pó (ACP). Tornando-se, desta forma, mais uma alternativa mercadológica para a área de reprodução animal, uma vez que este apresenta relação custo/benefício equiparável aos diluentes tradicionais.

Vários pesquisadores já estudaram os efeitos da água de coco como diluidor para criopreservação do sêmen de peixes (Quadro 3). Um dos primeiros trabalhos utilizando a água de coco “in natura” na criopreservação de sêmen de peixes foi realizado por FARIAS et al. (1999). Este trabalho realizou a diluição em quatro diferentes osmolaridades (100, 125, 150 e 300 mOsm/Kg) adicionado ao crioprotetor glicerol 5% no sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*, Curvier, 1818) em temperatura ambiente. Foi observado que as osmolaridades de 125 e 150 mOsm/Kg havia aumentado a motilidade e sobrevivência espermática quando comparado com a água “in natura” (água do tanque).

MURGAS (2003) avaliou o efeito de dois diluidores (glicose 5% e água coco) em sêmen de peixes Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) após o congelamento. Como crioprotetor, foi utilizado DMSO 10%. Os melhores resultados de motilidade espermática foram encontrados no tratamento com água de coco, tendo 60% de espermatozóides móveis após o congelamento em nitrogênio líquido. VELÁSQUEZ (2008) ao congelar o sêmen de pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) em água de coco em pó (ACP) associados a 10% de DMSO ou Metil Glicol observou após o descongelamento 70-80% e 56-79% de espermatozóides progressivos, respectivamente.

Também são utilizados outros diluidores como Ringer (NaCl, KCl, CaCl₂, NaHCO₃); MIII (glicose, citrato de sódio, sulfato de gentamicina, EDTA, NaHCO₃); Kurakura (NaCl, KCl, CaCl₂,

MgCl₂ e NaHCO₃) e Saad (NaCl e TRIS). (MARIA et al. 2005; ORFÃO et al. 2006; VELÁSQUEZ 2008) (Quadro 4).

A maioria dos trabalhos, a combinação dos dois agentes (crioprotetores e diluentes) é bastante variável tornando muito difícil a tarefa de distinguir qual é o fator ideal para cada espécie, já que eles atuam de forma distinta.

Quadro 2 Utilização do BTS como diluidor na criopreservação de sêmen de peixes caracídeos.

Autor (Ano)	Espécie	Criodiluidor		% Móveis pós-descongelamento
Maria (2005)	Piracanjuba (Brycon orbignyanus)	BTS	DMSO	0
			Metanol	21
			Metil Glicol	70
			DMSO + Gema de ovo	11
			KCl	76
			2 KCl	74
			Citrato	77
ORFÃO (2006)	Curimba (Prochilodus lineatus)	BTS	DMSO	88
			Metilglicol	95
STREIT JR. (2006)	PACU (Piaractus mesopotamicus)	BTS	DMSO	0,23
OLIVEIRA (2007)	Pirapitinga (Brycon nattereri)	BST	MetilGlicol	72
MURGAS (2007)	Curimba (Prochilodus lineatus)	BTS	DMSO	80
			Metanol	90
			KCl	85
			DMSO + KCl	81
			KI	78
			DMSO + KI	84

Quadro 3: Utilização da Água de Coco como diluidor na criopreservação de sêmen de peixes caracídeos.

Autor (Ano)	Espécie	Criodiluidor		% média de motilidade pós-descongelamento
FARIAS (1999)	Tambaqui (Colossoma macropomum)	Água de coco	Glicerol	5
MURGAS (2003)	Piracanjuba (Brycon orbinyanus)	Água de Coco	DMSO + Gema de ovo	56-66
MARIA (2005)		Água de coco	DMSO + Gema de ovo	10
NASCIMENTO (2007)		ACP	MetilGlicol	60
VELÁSQUEZ (2008)	Pirapitinga (Piaractus brachypomus)	ACP	DMSO	70-80
			MetilGlicol	56-79
VIEIRA (dados ainda não publicados)	Tambaqui (Colossoma macropomum)	ACP	DMSO	55-65
			MetilGlicol	24-46

2.5. Análise seminal

A agroindústria de peixes focaliza sua atividade na qualidade de ovo e larvas em vez de dar mais atenção ao sêmen, embora, a qualidade de ambos os gametas possa afetar o sucesso da fertilização e a sobrevivência das larvas, em algumas espécies a qualidade pobre do sêmen pode ser um fator limitante ao cultivo, porém até mesmo quando o sucesso da fertilização é alto, existem diferenças entre a qualidade de sêmen entre os machos (MELLINGER, 2002).

A análise da motilidade seminal e de outros parâmetros importantes para avaliar o sucesso da criopreservação dependeram sempre de métodos subjetivos através da mensuração ao microscópio óptico. Nesse tipo método, o pesquisador visualiza o sêmen ao microscópio e estima uma porcentagem de espermatozoides móveis (VELÁSQUEZ, 2008; RURANGWA et al., 2004).

Quadro 4: Utilização de M III , Saad, Kurakura, Ringer como diluidor na criopreservação de sêmen de peixes caracídeos.

Autor (Ano)	Espécie	Criodiluidor		% média de motilidade pós-descongelamento
Maria (2005)	Piracanjuba	M III	DMSO	0
			Metanol	4
			Metil Glicol	10
			DMSO + Gema de ovo	23
			Metanol + Gema de ovo	34
			Metil Glicol + Gema de ovo	60
		Saad	DMSO + Gema de ovo	33
			Metanol + Gema de ovo	4
Kurakura	DMSO + Gema de ovo	5		
Orfão (2006)	Curimba (Prochilodus lineatus)	M III 6%	DMSO	89
			Metilglico	91
Velásquez (2008)	Pirapitinga (Piaractus brachypomus)	Ringer	DMSO	58-77
			MetilGlicol	53-65
Vieira (dados ainda não publicados)	Tambaqui (Colossoma macropomum)	Ringer	DMSO	32-39
			MetilGlicol	22-30

Obviamente nesses métodos subjetivos de análise da motilidade seminal, os resultados diferem de observador para observador, tornando a avaliação incorreta ou imprecisa. Para diminuir tais problemas, a análise objetiva de sêmen através de sistemas computadorizados foram desenvolvidos e, inicialmente utilizados em mamíferos, mas na atualidade tem desempenhado um papel importante dentro da aqüicultura (RURANGWA et al., 2004).

A análise seminal auxiliada por computador (CASA) permite uma avaliação objetiva não só da motilidade, mas também de diferentes características da célula espermática, tais como a velocidade e morfologia. Esse método de análise tem grande repetibilidade e fornece estimativas mais discriminadas que os procedimentos visual/microscópico subjetivos (RURANGWA et al., 2004).

A mensuração objetiva da motilidade espermática de peixes foi primeiramente reportada por COSSON et al. (1985) utilizando iluminação estromboscópica e câmara de vídeo na análise da motilidade de espermatozoides de truta ativados. Mas, somente durante os últimos anos os sistemas modernos de CASA foram adaptados mais especificamente para o estudo do espermatozoide de

peixes. Esse sistema é automatizado para visualizar, digitalizar e analisar imagens sucessivas dos espermatozoides, fornecendo informação acurada do movimento individual de cada espermatozoide, e também resumos estatísticos da população espermática (AMANN e KATZ, 2004).

O CASA pode representar uma importante ferramenta na aquicultura de forma a quantificar rápida e objetivamente os efeitos das condições de criação e manipulação espermática acerca da motilidade dos espermatozoides, incrementando a capacidade fertilizante dos animais de criatórios (RURANGWA et al., 2004).

As diferenças na biologia dos espermatozoides entre peixes e mamíferos podem explicar a dificuldade na adequação das ferramentas para análise da motilidade espermática em peixes. A introdução do CASA no estudo da reprodução de peixes primeiro transpôs os problemas espermáticos particulares como o curto período em que os espermatozoides se mantêm móveis após a ativação, e a alta frequência do batimento flagelar após a ativação (RURANGWA et al., 2001).

Além da motilidade espermática, o sistema pode avaliar a trajetória dos espermatozoides, na qual os parâmetros mais importantes de velocidade são a velocidade curvilínea (VCL) e a velocidade em linha reta (VSL). Se a trajetória é uma linha reta, a VCL e a VSL são idênticas. A velocidade do caminho angular (VAP) é geralmente de pouca utilidade em peixes uma vez que, ao contrário dos espermatozoides de mamíferos, a trajetória é geralmente na forma de curvas suaves, então a VAP e a VCL são idênticas, podendo o espermatozoide se mover tri-direcionalmente no meio aquático (KIME et al., 2001). Imediatamente após a ativação, os espermatozoides de teleósteos geralmente se movem em trajetória curvilínea tendendo a reta. A motilidade percentual (MOT) e a concentração de móveis (MOC) são bons indicadores do número de espermatozoides viáveis. A fertilidade dependerá então do número de espermatozoides móveis e de sua velocidade (RURANGWA et al., 2004).

Os instrumentos de análise computadorizada de sêmen têm demonstrado níveis altos de precisão e confiança, avaliando o sêmen de diferentes espécies. Embora existam diferentes máquinas de análise computadorizada de sêmen, o sistema é baseado em óptica e software utilizados em conjunto para a identificação do espermatozoide e reconstrução de sua trajetória (VERSTEGEN et al., 2002). A disponibilidade desses instrumentos fornece uma grande ferramenta para estudo objetivo da motilidade e morfologia espermática, melhorando o conhecimento e habilidade em manipular o sêmen.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A criopreservação seminal em peixes vem avançando desde a década de 50 abordando sua importância como ferramenta para a contribuição na operacionalização e flexibilização dos programas de reprodução. Porém não há uma padronização nos protocolos de criopreservação. Dessa forma, pode-se encontrar na literatura uma grande variação inclusive nos protocolos de criopreservação de sêmen de um mesmo grupo de animais, tornando essa técnica muito inconsistente e de difícil difusão.

No caso dos peixes da família Characidea mais cultivados para alimentação humana, os criodiluidores frequentemente utilizados são glicose, BTS e Água de coco (ACP) associados à glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO), etilenoglicol, metilglicol, dimetilacetamida, propilenoglicol ou metanol. Porém, os resultados mais satisfatórios são encontrados nos tratamento que utilizam o DMSO como crioprotetor.

Para a avaliação da motilidade como parâmetro essencial na avaliação da qualidade seminal após o descongelamento, grande atenção tem sido dada aos métodos objetivos, dentre eles a Análise de Sêmen Auxiliado por Computador (Computer-Assisted Semen Analyses - CASA) em que seu poder de análise é dado pela avaliação precisa e acurada dos espermatozóides com alto grau de objetividade, aperfeiçoando o processo de avaliação do sêmen.

É importante ressaltar que, além dos meios diluentes e do método de análise do sêmen, outros fatores também exercem influência sobre a qualidade do sêmen criopreservado, como a taxa de resfriamento, concentração espermática, tempo e método de adição dos crioprotetores, métodos de envase, condições de congelação, tempo de descongelação, dentre outros. Além disso, cada um desses fatores responde de forma diferente dependendo da espécie animal da qual provem o sêmen.

Nesse sentido, conclui-se que é de muita importância incentivar o estudo sobre as particularidades do sêmen dos peixes caracídeos buscando a padronização da técnica de criopreservação, definindo com isso os componentes dos crioprotetores e meios diluidores, bem como os procedimentos mais adequados para o congelamento e descongelamento de sêmen desse grupamento de peixes.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMANN, R.P.; KATZ, D.F. 2004 Reflections on CASA after 25 years. *Journal of andrology*, 25: 317-325.
- BEDORE, A.G. 1999 Características criopreservação do sêmen de pacu-caranha (*Piaractus mesopotamicus*) e de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). Belo Horizonte. 53p. (Dissertação de Mestrado em Biologia Celular, UFMG).
- BLAXTER, J.H.S. 1953 Sperm storage and cross fertilization of spring and autumn spawning herring. *Nature*, 172: 1189-1190.
- CABRITA, E., ROBLES, V., HERRÁEZ, M.P., 2008. *Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species*. Taylor and Francis, 549.
- CAROLSFELD, J.; GODINHO, H.P.; ZANIBONI FILHO, E.; HARVEY B.J. 2003 Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. *Belo Horizonte*, 63(2): 447-489.
- COSSON, M.P.; BILLARD, R.; GATTI, J.L.; CHRISTEN, R. 1985 rapid and qualitative assesment of trout sperm motility using stroboscope. *Aquaculture*, 46: 71-75.

- FARIAS, J.O.; NUNES, J.F.; CARVALHO, M.A.M.; SALGUEIRO, C.C.M. 1999 Avaliação “in vitro” e “in vivo” do sêmen do Tambaqui (*Colossoma macropomum*) conservado a temperatura ambiente e criopreservada em água de côco. Revista Científica de Produção animal. 1(1): 44-58.
- FRESNEDA, A.; LENIS, G.; AGUDELO, E.; OLIVERA-ANGEL, M. 2004 Espermiación inducida y crioconservación de semen de Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*). Rev. Col. Cienc. Pec. (17): 46-52.
- HOLT, W.V.; VAN LOOK, K.J.W. 2004 Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory tests of semen quality. Reproduction, 127: 527-535.
- HOPKINS, S.M.; EVANS, L.E. 1991 In: McDonald, E. Endocrinologia Veterinária e Reprodução. 4. ed. Interamericana. São Paulo.
- HUNTER, R.H.F. 1982 Fisiologia e Tecnologia da Reprodução da Fêmea dos animais domésticos. Ed. Acribia. Zaragoza.
- KIME, D.E.; VAN LOOK, K.J.W.; MCALLISTER, B.G.; HUYSKENS, G.; RURANGWA, E.; OLLEVIER, F. 2001 Computer-assisted sperm analysis CASA as a tool for monitoring sperm quality in fish. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C, 130: 425-433.
- LEGENDRE, M.; BILLARD, R., 1980 Cryopreservation of rainbow trout sperm by deep freezing. Reproduction, Nutrition, and Development, 20: 1859-1868.
- MARIA, A.N. 2005 Diluidores e crioprotetores no resfriamento e congelamento do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)./Alexandre Nizio Maria - Lavras : UFLA, Dissertação (Mestrado) – UFLA. 71p.
- MARIA, A.N.; VIVEIROS, A.T.M.; FREITAS, R.T.F.; OLIVEIRA, A.V. 2006 Extenders and cryoprotectants for cooling piracanjuba (*Brycon obrignyanus*) semen, an endangered brazilian teleost fish. Aquaculture, The Netherlands.
- MATEOS-REX, E.; AGUILLAR, C.G.C. 1996 Técnicas de control de la reproducción en ganado caprino. In: Nuevas técnicas de reproducción asistida aplicadas a la producción animal. Cuenca: Universidad de Castilla la Mancha. p.183-202.
- MEDEIROS, C.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A.; RODRIGUES, J. 2002 Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? Theriogenology, 57: 327-344.
- MELLINGER, J. 2002 Sexualité et Reproduction des Poissons. CNRS Éditions. Paris.
- MENEZES, J.T.B.; QUEIROZ L.J.; DORIA C.R.C.; MENEZES JR J.B. 2008 Avaliação espermática pós-descongelamento em tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). Acta Amazônica. 38(2): 365 – 368.
- MILIORINI, A. 2006 Ativadores e concentrações de metanol e dimetilsulfóxido na qualidade do sêmen criopreservado de curimba (*prochilodus lineatus*). 2006. 99f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Minas Gerais (Universidade Federal de Lavras).

MILIORINI, A.B.; MURGAS, L.D.S.; VIVEIROS, A.T.M.; MARIA, A.N.; OLIVEIRA, A.V.; ORFÃO, L.H. 2004 The effects of cryoprotectants and activators sperm motility of curimba (*Prochilodus lineatus*). In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION-ICAR, 15. Porto Seguro, Bahia, Brasil Abstracts. Porto Seguro, Bahia, Brazil: Brazil College of Animal Reproduction/ ICAR, Abst. 523.

MURGAS, L.; GUALHANONE, A.; SILVA, M.; MELLO, C.; FREITAS, R.; ZANGERONIMO, M. 2001 Calidad seminal del pez piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) post- descongelación. An. Vet., Murcia, 17:3-10.

MURGAS, L. D. S. 2003 Avaliação espermática pós -descongelamento em piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). Bras.Zootec. Viçosa Nov./Dec. 32(6):2

MURGAS, L.; MILIORINI, A.; FREITAS, R.; PEREIRA, J. 2007 Criopreservação de sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) mediante adição de diferentes diluidores, ativadores e crioprotetores. Rev. Bras. Zoot., 36(3): 526-531.

NASCIMENTO, A.F.; ISAU, Z.A.; VIVEIROS A.T.M.; CARVALHO, M.A.M.; SALGUEIRO, C.C.M. 2007. Fertilidade do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) criopreservado em água de coco em pó e em BTS. In: 1º Congresso Brasileiro de Produção de Peixes Nativos. 1º Encontro de Piscicultores de Mato Grosso do Sul, 2007, Dourados-MS. 1º Congresso Brasileiro de Produção de Peixes Nativos. Dourados-MS.

NAVARRO, O.J.; SANTAMARÍA, Y.M.V.; CASALLAS, P.E.C. 2004 Evaluación de cinco protectores para la crioconservación de semen de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). Rev. Col. Cienc. Pec., 17: Suplemento.

NUNES, J.F. 1987 Coconut water as diluent for goat semen. In: CONFERÊNCIA INTERNACIONAL SOBRE CAPRINOS. Brasília. Anais.

OLIVEIRA, A.V. 2007 Sucesso do resfriamento e congelamento de sêmen de pirapitinga (*Brycon nattereri*). Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 59(6): 1509-1515.

ORFÃO, L.H. 2006 Resfriamento e criopreservação de sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) (VALENCIENNES, 1836) Dissertação Universidade Federal de Lavras.

PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. 1992 Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. Theriogenology, 32: 209-222.

PICKETT, B.W.; SQUIRES, E.L.; MACKINNON, A.O. 1987 Procedures for collection, evaluation and utilization of stallion semen for artificial insemination. Fort Collins,CO: Colorado State University, Animal Reproduction Laboratory.

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

RURANGWA, E.; ROCLANTS, I.; HUYSKENS, G. 1998 The minimum effective spermatozoa: egg ratio for artificial insemination and the effects of mercury on sperm motility and fertilization ability in (*Clarias gariepinus*). Journal of Fish Biology 53: 402-413

- RURANGWA, E.; VOLCKAERT, F.A.M.; HUYSKENS, G.; KIME, D.E.; OLLIVIER, F. 2001 Quality control of refrigerated and cryopreserved semen using computer-assisted sperm analysis (CASA), viable staining and standardized fertilization in African catfish (*Clarias gariepinus*). *Theriogenology*, 55: 751-769.
- SALGUEIRO, C.C.M.; NUNES, J.F. 1999 Estudo de características testiculares e espermáticas de caprinos e ovinos. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 23(3).
- STREIT JR, D. P. 2006 Sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) criopreservado com diluentes utilizados para sêmen de suínos. *Ciência Animal Brasileira*, 7(3): 289-297.
- SUQUET, M.; DREANNO, C.; FAUVEL, C.; COSSON, J.; BILLARD, R. 2000 Cryopreservation of sperm in marine fish. *Aquac. Res.*, (31): 231
- VELASCO-SANTAMARÍA, Y.; MEDINA-ROBLES, V.; CRUZ-CASALLAS, P. 2006 Cryopreservation of yamú (*Brycon amazonicus*) sperm for large scale fertilization. *Aquaculture*, 256: 264-271.
- VELÁSQUEZ, M.S. 2008 Criopreservação do sêmen de pirapitinga, *Piaractus brachypomus* (Pisces, Characidae) Fortaleza (Dissertação de Mestrado. UFC, Instituto de Ciências do Mar). 96p
- VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. 2002 Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, 57: 149-179.
- VIVEIROS, A.T.M., SO, N., KOMEN, J., 2000. Sperm cryopreservation of African catfish *Clarias gariepinus* cryoprotectants, freezing rates and sperm: egg dilution ratio. *Theriogenology* 54: 9, 1395-1408.
- VIVEIROS, A.T.M., 2005. Semen cryopreservation in catfish species, with particular emphasis on the African catfish. *Animal Breeding Abstracts* 73: 3, 1-9.
- WATSON, P.F. 1995 Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and assessment of their post-thawing function. *Reproduction Fertility and Development*, 7: 871-891.

10 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O tambaqui em cativeiro necessita de indução hormonal com Extrato de Pituitária de Carpa para liberar quantidades suficiente de sêmen para os processos reprodutivos, e essa indução não interfere nas características seminais.

A espectrofotometria $\lambda=540\text{nm}$ é um método rápido e confiável na avaliação da concentração espermática de tambaqui

O ACP-104 associado ao DMSO (10%) diluído de 1:3, é uma excelente alternativa para a criopreservação de sêmen de tambaqui.

11 PERSPECTIVAS

Com o conhecimento dos dados sobre as características seminais do tambaqui *C. macropomum*, (CUVIER, 1818), e com êxito, nos testes “in vitro”, do diluidor ACP-104 na criopreservação de espermatozóides surge a necessidade de testá-lo in vivo na mesma espécie assim como testá-lo “in vitro” e “in vivo” em outras espécies de peixes

12 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ÁKOS, H., EDIT, M. E BÉLA, U. Cryopreservation of common carp sperm. *Aquat. Living Res.*, 16, 457-460, 2003.
- ALAVI, S.M.H., E COSSON, J. Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: A review. *Cell Biology International*, 30 (1): 1-14, 2006
- ALBUQUERQUE, M.O., BEZERRA, E.S., KOVÁKS, J.W.G., Sobre o desenvolvimento do ovo e embrião do tambaqui *Colosoma macropomum* Cuvier 1818. B. Téc. DNOCS. Fortaleza, 52, 79-100, 1994.
- ALEXANDRE NÍZIO MARIA; LUIS DAVIDE SOLIS MURGAS; MÁRCIA OLIVEIRA BARBOSA SILVA; ALÉCIO B. MILIORINE; RENAN T. FRANSCISCATO; PRICILA VIEIRAA ROSA LOGATO. Influência da Adição de iodeto de potássio e citrato de sódio na qualidade de sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Ciênc. Agrotec.*, Larvas, v.28, n.1, p. 191-194, jan./fev., 2004.
- AMANN, R.P., KATZ, D.F. Reflections on CASA after 25 years. *Journal of Andrology* 3, 25, 317-325, 2004.
- ANDRADE-TALMELLI, E. F., KAVAMOTO, E.T., FENERICH-VERANI, N. Características seminais da piabinha, *Brycon insignis* (Steindachner, 1876), após estimulação hormonal. *B. Inst. Pesca*, São Paulo, 27 (2):149-154, 2001.
- ARAÚJO, I.S. Utilização da água de coco e do leite glicosado como diluidor do sêmen ovino. Fortaleza, 1990. 35p. Monografia (Especialização em Produção e Reprodução de Pequenos Ruminantes da Universidade Estadual do Ceará - UECE, 1990).
- ARAÚJO, A. A.; NUNES, J.F. Utilização da água de coco “in natura” adicionada de gema de ovo como diluente do sêmen caprino. *Ciência Animal*, Fortaleza, v.1, p.39-49, 1991.
- ARTHUR AUGUSTO FERREIRA; ALEX PIRES DE OLIVEIRA NUÑER; RONALD KENNEDY LUZ; DAVID AUGUSTO REYNALTETATAJE; JUAN RAMON ESQUIVEL; JOSE BARRIOS RESTREPO. Avaliação qualitativa e quantitativa do sêmen de jundiá, *Rhamdia quelen*, BOLETIM DO INSTITUTO DE PESCA, São Paulo, 27 (1):57-60, 2001.
- ASTURIANO, J.F., PÉREZ, L., GARZÓN, D.L., MARCO-JIMÉNEZ, F., PEÑARANDA D.S., VICENTE J.S., JOVER, M. Physio-chemical characteristics of seminal plasma and development of media and methods for the cryopreservation of European eel sperm. *Fish Physiology and Biochemistry* 30, 283–293. 2004.

- BABIAK, I.; GLOGOWSKI, J.; LUCZYNSKI, M.J.; LUCZYNSKI, M.; DEMIANOWICZ, W. The effect of egg yolk, low density lipoproteins, methylxanthines and fertilization diluent on cryopreservation efficiency of northern pike (*Esox lucius*) spermatozoa. *Theriogenology*, v.52, n.3, p.473-479, 1999.
- BABIAK, I.; GLOGOWSKI, J.; GORYCZKO, K.; DOBOSZ, S.; KUZMINSKI, H.; STRZEZEK, J.; DEMIANOWICZ, W. Effect of extender composition and equilibration time on fertilization ability and enzymatic activity of rainbow trout cryopreserved spermatozoa. *Theriogenology*, v.56, n.1, p.177-192, 2001.
- BABIAK, IGOR ; OTTESEN, ODDVAR ; RUDOLFSSEN, GEIR ; JOHNSEN, STEINAR. Quantitative characteristics of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L., semen throughout the reproductive season. *Theriogenology* 65, 1587–1604, 2006.
- BABIAK, I., OTTESEN, O., RUDOLFSSEN, G., JOHNSEN, S. Chilled storage of semen from Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L.I. Optimizing the protocol. *Theriogenology* 9, 66, 2025 – 2035. 2006.
- BEDORE, A.G. Característica e conservação do sêmen de Pacu-Caranha (*Piaractus mesopotamicus*) e de Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 53f. 1999.
- BEZERRA E SILVA, J. W., NOBRE, M. I. DA S., PINHEIRO, F. A., SOBRINHO, A. C. Resultado de um experimento de policultivo de tambaqui *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818, híbrido de tilápia (*Oreochromis hornorum* Trew.x *O. niloticus* LÇ., 1766) e a carpa espelho *Cyprinus carpio* L., 1758 VR. *Specularis. B. Téc. DNOCS, Fortaleza*, 42, 1, 63-89. 1984.
- BILLARD, R., COSSON, J. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. *J. Exp. Zool* 261, 122-131. 1992.
- BILLARD, R.; COSSON, J.; PERCHEC, G.; LINHART, O. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. *Aquaculture*, v.129, n.1-4, p.95-112,1995.
- BLUME, H.; MARQUES JR., A.P.V. Avaliação da água de coco no cultivo e criopreservação de embriões murídeos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.18, p.97-104, 1994.
- BOMBARDELLI, R.A., MÖRSCHBÄCHER, E.F., CAMPAGNOLO, R., SANCHES, E.A. E SYPPERRECK, M.A. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá cinza, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimardm, 1824), *Rev. Bras. Zootec.*, 35 (4). 2006.

CABRITA, E.; ALVAREZ, R.; ANEL, L.; RANA, K. J.; HERRAEZ, M. P. Sublethal damage during cryopreservation of rainbow trout sperm. *Cryobiology*, v.37, n.3, p.245-253, 1998.

CABRITA, E., ROBLES, V., HERRÁEZ, M.P. *Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species*. Taylor and Francis, 549. 2008.

CARVALHO, M.A.M., NUNES, J. F., SALGUEIRO, C.C.M. Avaliação in vitro e in vivo do sêmen de Tambaqui, *Colossoma Macropomum*, conservado em água de coco. *Rev. Cien. Reprod. Anim.* 1, 44-58. 1999.

CARVALHO, M.A.M.; NUNES, J.F.; GONDIN, J.M. Prolongamento da motilidade espermática de carpa comum, *Cyprinus carpio* L., pelo uso de água de coco (*Cocos nucifera* L.) como diluidor de sêmen. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, n.5, 2002.

CHAMBEYRON, F., ZOHAR, Y. A diluent for sperm cryopreservation of gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Aquaculture* 90, 345-352. 1990.

CHRIST, S.A.; TOTH, G.P.; McCARTHY, H.W.; TORSSELLA, J.A.; SMITH, M.K. Monthly variation in sperm motility in common carp assessed using computer-assisted sperm analysis (CASA). *J. Fish Biol.* v.48, p.1210-1222, 1996.

CIERESZKO, A. E DABROWSKI, K. Estimation of sperm concentration of rainbow trout, whitefish and yellow perch using a spectrophotometric technique. *Aquaculture*, 109: 367-373. 1993.

CIERSZKO, A., TOTH, G.P., CHRIST, S.A., DABROWSKILA, K. Effect of cryopreservation and theophylline on motility characteristics of lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*) spermatozoa. *Theriogenology* 45, 665-672. 1996.

COSSON, M.P.; BILLARD, R.; GATTI, J.L.; CHRISTEN, R. Rapid and qualitative assesment of trout sperm motility using stroboscope. *Aquaculture*, v.46, p.71-75, 1985.

CRUZ-CASALLAS, P.E., LOMBO-RODRÍGUEZ, D.A. E VELASCO-SANTAMARÍA, Y.M. Milt quality and spermatozoa morphology of captive *Brycon siebenthalae* (Eigenmann) broodstock. *Aquaculture Research*, 36 (7): 682-686. 2005.

EDUARDO SHIMODA; DALCIO RICARDO DE ANDRADE; MANUEL VAZQUEZ VIDAL JUNIOR; GEORGE SHIGUEKI YASUI; HUGO PEREIRA GODINHO; JOSÉ FREDERICO STRAGGIOTTI SILVA; GUILHERME SOUSA. Utilização do espermátocrito para estimar aconcentração espermática no sêmen da piabanha (*Brycon insignis*) *Braz. J. vet. Res. anim. Sci.*, São Paulo, suplemento, p. 19-24, 2007.

DARIN-BENNETT, A.; WHITE, I. G. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology*, v.14, p.466-470, 1977.

DAS, K.K.; RAJKONWAR, C.K. Effect on the motility of buck semen during freezing with lactose egg yolk glycerol extender. *International Journal of Animal Science*, v.10, p.127-128, 1995.

DERIVAUX, J. Reprodução dos Animais Domésticos. Zaragoza, Editora Acribia, 1980.

DIETRICH, G., KOWALSKI, R., WOJTCZAK, M., DOBOSZ, S., GORYCZKO, K., CIERESZKO, A. Motility parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa in relation to sequential collection of milt, time of post-mortem storage and anesthesia. *Fish Phys. Bioch.* 31, 1-9. 2005.

DREANNO, C.; SUQUET, M.; QUEMENER, L.; COSSON, J.; FIERVILLE, F.; NORMANT, Y.; BILLARD, R. Cryopreservation of turbot *Scophthalmus maximus* spermatozoa *Theriogenology*, v.48, n.4, p.589-603, set., 1997.

FABBROCINI, A.; LAVADERA, S.L.; RISPOLI, S.; SANSONE, G. Cryopreservation of sea bream (*Sparus aurata*) spermatozoa, *Cryobiology*, v.40, n.1, p.46-53, 2000.

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. *Rev. Cient. Prod. Animal*, 1 (1): 44-58, 1999.

FERREIRA, A.A.; NUÑEZ, A.P.O.; LUZ, R.K.; TATAJE, D.A.R.; ESQUIVEL, J.R.; RESTREPO, J.B. Avaliação qualitativa e quantitativa do sêmen de jundiá (*Ramdia quelen*). *Boletim do Instituto da Pesca*, v.27, n.1, São Paulo, p.57-60, 2001.

FONTENELE, O. Método de hipofiseção de peixes adotado pelo DNOCS. Fortaleza, DNOCS, p. 33. 1981.

FREITAS, V.J.F. Sincronização do ciclo estral e fertilidade de cabras submetidas a dois níveis de gonadotrofina corionica (HCG), inseminadas artificialmente. Fortaleza, 1988. Monografia (Especialização em Produção e Reprodução de Pequenos Ruminantes da Universidade Estadual do Ceará – UECE, 1988).

FRESNEDA, A., LENIS, G., AGUDELO, E. E ANGEL, M.O. Espermiación inducida y crioconservación de semen de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), *Rev. Col. Cienc. Pec.*, 17, PP 46-52. (supp), 2004.

FUNCEME: Relatório de Pluviometria por faixa de anos - Estado do Ceará, anos 2007 e 2008, Município: Pentecoste, Posto: Pentecoste, Micro-região: 11, Código: 115, Resumo de chuvas nos dados fornecidos pela FUNCEME. 1974-2008.

GODINHO, H.P.; AMORIM, V.M.C.; PEIXOTO, M.T.D. Criopreservação do sêmen de Tilápia nilótica *Oreochromis niloticus*, var. chitralada: crioprotetores, soluções ativadoras e refrigerador criogênico. Rev. Bras. Zootec. v.32, n.6, p.1537-1543, supl.1, 2003.

GOULDING, M. The fruit – and seed – eating large characins. In: The Fish and the Forest. California: California Press, Cap.4, p.55-100, 1980.

HAFEZ, E. S. E. Reproducción Animal. 6. Ed. Manole. Brasil. 582p., 1995.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. Reprodução Animal. 7.ed., Barueri-SP: Manole, 2004, 513p.

HIRANO, Y.; SHIBAHARA, H.; OBARA, H.; SUZUKI, T.; TAKAMIKAWA, S.; YAMAGUCHI, C.; TSUNODA, H.; SATO, I. Relationships between sperm motility characteristics assessed by computer-aided sperm analysis (CASA) and fertilisation rates in vitro. Jour. Assist. Reprod. Genet., v.18, p.213-218, 2001.

HOLT, W.V.; VAN LOOK, K.J.W. Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory tests of semen quality. Reproduction, v.127, p.527-535, 2004.

HOPKINS, S.M.; EVANS, L.E. IN: MCDONALD, E. Endocrinologia Veterinária e Reprodução. 4. Ed. Interamericana. México. 1991.

HUNTER, R.H.F. Fisiologia e Tecnologia da Reprodução da Fêmea dos animais domésticos. Ed. Acribia. Zaragoza, 1982.

JOBLING, S.; COEY, S.; WHITMORE, J.G.; KIME, D.E.; VAN LOOK, K.J.W.; McALLISTER, B.G.; BERESFORD, N.; HENSHAW, A.C.; BRIGHTY, G.; TYLER, C.R.; SUMPTER, J.P. Wild intersex roach (*Rutilus rutilus*) have reduced fertility. Biol. Reprod. v.67, p.515-524, 2002.

KAVAMOTO, E.T.; SILVEIRA, W.F. & GODINHO, H.M. (1986). Características seminais do curimatá, *Prochilodus scrofa*, Steindachner 1881. **Bol. Inst. Pesca**, São Paulo, 13(2): 45-50.

KAVAMOTO, E.T. E FOGLI DA SILVEIRA, W. Características físicas, químicas e microscópicas do sêmen de bagre (*Rhamdia hilarii valenciennes*, 1840) em condições de campo, *B. Inst. Pesca*, 13 (1): 95-100. 1986.

KIME, D.E.; EBRAHIMI, M.; NYSTER, K.; ROELANTS, I.; RURANGWA, E.; MOORE, H.D.M.; OLLEVIER, F. Use of computer assisted sperm analysis (CASA) for monitoring the

effects of pollution on sperm quality of fish; application to effects of heavy metals. *Aquat. Toxicol.* v.36, p.223-237, 1996.

KIME, D.E., NASH, J.P. Gamete viability as an indicator of reproductive endocrine disruption in fish. *The Scienc. Total Env.* 233, 123-129, 1999.

KIME, D.E., VAN LOOK, K.J.W., MCALLISTER, B.G., HUYSKENS, G., RURANGWA, E., OLLEVIER, F. Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology* 130, 4, 425-433, 2001.

KOVÁCS, G; MESQUITA, P.E.C.; VIEIRA, M.J.A.F. Estudo do ovário e ovócitos de tambaqui, *Colossoma macropomum* CUVIER, 1818, através de sondagem, para melhorar a eficácia da propagação artificial. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE ICTIOLOGIA, 10., 1993, São Paulo. Anais... São Paulo: USP, 1993. p.9-13.

KUBITZA, F. Coletânea de informações aplicadas ao cultivo do tambaqui, do pacu e outros peixes redondos. *Revista Panorama da Aqüicultura*, março-abril, 2004.

Lahnsteiner F., Weismann T., Patzner, R.A. Cryopreservation of semen of the grayling (*Thymallus thymallus*) and the Danube salmon (*Hucho hucho*). *Aquaculture* 144, 265-274, 1996.

LAHNSTEINER, F.; BERGER, B.; HORVATH, A.; URBANY, B.; WEISMANN, T. Cryopreservation of spermatozoa in cyprinid fishes. *Theriogenology*, v.54, n.9, dez, p.1477-1498. 2000.

LAHNSTEINER, F.; BERGER, B.; WEISMANN, T. Effects of media, fertilization technique, extender, straw volume, and sperm to egg ratio on hatchability of cyprinid embryos, using cryopreserved semen. *Theriogenology*, v.60, n.5, set, p.829-841, 2003.

Lahnsteiner F., Mansour N., Weismann T. The cryopreservation of spermatozoa of a teleost fish, the burbot, *Lota lota* (Gadidae, Teleostei). *Cryobiology* 45, 3, 195-203, 2002.

LANES, C. F. C. ; OKAMOTO, M.; CAVALCANTI, P. V. ; COLLARES, T.; CAMPOS, V. F.; DESCHAMPS, J. C.; ROBALDO, R. B.; MARINS, L. F.; SAMPAIO, L. A. Cryopreservation of Brazilian flounder (*Paralichthys orbignyanus*) sperm. *Aquaculture* 275, 361–365, 2008.

LEBOEUF, B.; RESTALL, B.; SALAMON, S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science*, v.62, p.113-141, 2000.

LEGENDRE, M., BILLARD, R. Cryopreservation of rainbow trout sperm by deep-freezing. *Reprod. Nut. Dev.* 20, 6, 1859-1868, 1980.

LIU, Q.H.; LI, J. ; XIAO, Z.Z.; DING, F.H.; YU, D.D.; XU, X.Z. Use of computer – assisted sperm analysis (CASA) to evaluate the quality of cryopreserved sperm in red seabream (*Pagrus major*). *Aquaculture* 263, 20-25, 2007.

LUZ, R.K.; FERREIRA, A.A.; REYNALTE-TATAJE, D.A.; ZANIBONI FILHO, E. Avaliação qualitativa e quantitativa do sêmen de suruvi *Steindachneridion scripta pimelodidae*, Boletim do Instituto da Pesca, v.27, n.1, p. 39-42, São Paulo, 2001.

MAISSE, G., LABBE, C., OGIER DE BAULNY, B., LEVERONI, S., HAFFRAY, P. Cryoconservation de sperme et des embryons de poissons. *INRA. Prod. Anim.* 11, 1, 57-65, 1998.

MARCO-JIMÉNEZ, F., PÉREZ, L., VIUDES DE CASTRO, M.P., GARZÓN, D.L., PEÑARANDA, D.S., VICENTE, J.S., JOVER, M., ASTURIANO, J.F. Morphometry characterisation of European eel spermatozoa with computer-assisted spermatozoa analysis and scanning electron microscopy. *Theriogenology* 65, 1302–1310, 2006.

MARIA, A. N.; A. T. M. VIVEIROS, L. H. ÓRFÃO, OLIVEIRA, G. F. MORAES. Effects of cooling and freezing on sperm motility of the endangered fish piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Characiformes, Characidae) *Anim. Reprod.* v.3, n.1, p.55-60, Jan./Mar., 2006

MARIA, A.N.; VIVEIROS, A.T.M.; FREITAS, R.T.F.; Oliveira, A.V. Extenders and cryoprotectants for cooling piracanjuba (*Brycon obrignyanus*) semen, an endangered brazilian teleost fish. *Aquaculture*, The Netherlands, 2006.

MATEOS-REX, E.; AGUILLAR, C.G.C. Técnicas de control de la reproducción en ganado caprino. In: Nuevas técnicas de reproducción asistida aplicadas a la producción animal. Colección Estudios. Ed. S. Pub. U. Castilla la Mancha. Cuenca. v.32, cap.9, p.183-202, 1996.

MELO, F., GODINHO, H. A protocol for cryopreservation of spermatozoa of the fish *Brycon orthotaenia*. *Anim. Reprod.* 3, 3, 380-385, 2006.

MENEZES, J.T.B. Programa banco de sêmen de tambaqui silvestre *Colossoma macropomum*, Cuvier 1818. *Revista Panorama da Aqüicultura*, 3 (76), 2003.

MENEZES, J.T.B., QUEIROZ, L.J., COSTA, D.C.R. E MENEZES, J.R.J.B. Avaliação espermiática pós-descongelamento em tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), 38 (2): 365-368, 2008.

MEDENA-ROBLES, V.M.; VELASCO-SANTAMARIA, Y.M.; CRUZ-CASALLAS, P.E. Tasa de congelación-descongelación de semen de yamú (*Brycon amazonicum*) empacada en pajillas de diferentes volúmenes y su efecto sobre la calidad espermiática post-descongelación. *Rev. Col. Cienc. Pec.* v.18, n.4, 2005.

MIES FILHO, A.; DUTRA, J.; GIRÃO, R.N. Congelação do sêmen ovino na primavera. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.5, p.27-57, 1982.

MENEZES, JANNER TAVARES BEZERRA; QUEIROZ, LUIS JARDIM DE; CAROLINA; DÓRIA, RODRIGUES DA COSTA; MENEZES JR, JAIRE BEZERRA. Avaliação espermática pós descongelamento em tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) *ACTA AMAZONICA*, VOL 38(2) 365-368, NOVA, 2008.

MONTEZUMA JR, P.; VIANA NETO, C.; NUNES, J.F. Água de coco como diluidor de sêmen de cães In: ENCONTRO DE PESQUISADORES DA UECE, Anais... 1994.

MORISAWA, M. E SUZUKI, K. Osmolality and potassium ion: their roles in initiation of sperm motility in teleosts. *Science*, 210 (4474): 1145-1147, 1980.

MUNIZ, J.A.S.M. *Influência do LHRH comum na ovulação induzida do Tambaqui Colossoma macropomum (Cuvier) (Characiforme, Characidae), em diferentes fotoperíodos*. Recife: Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aqüicultura, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 48pp. Dissertação de Mestrado, 2006.

MURGAS, L. D. S.; FRANCISCATTO, R. T. SANTOS, A. G. O. Avaliação espermática pós-descongelamento em piracanjuba (*Brycon orbignyanus*, Valenciennes, 1849). *Rev. Bras. Zootec.* Vol. 32 no.6 Viçosa Nov/dec., 2003.

MURGAS L.D.S., MILIORINI, A.B., FONSECA, F.R.T., PEREIRA, G.J.M. Criopreservação do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) mediante adição de diferentes diluidores, ativadores e crioprotetores. *R. Bras. Zootec.* 36, 3, 526-531. 2007.

NAVARRO, O.J., YOHANA, M., VELASCO, S., PABLO, E., CRUZ, C. Evaluación de cinco protectores para la crioconservación de sêmen de Cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). *Ver. Col. Cienc. Pec.* 17, Suplemento, 2004.

NUNES, J.F. Coconut water as diluent for goat semen. In: Conferencia Internacional Sobre Caprinos, Brasília, 1987.

NUNES, J.F.; COMBARNOUS, Y.; PRISCILA, L. Utilisation d'une substance ativa "JYP" presents dans l'eau de coco pour la conservation "in vitro" et la fertilité des spermatozoides de mammifères. S.N., 1994.

NUNES, J.F.; COMBARNOUS, Y. Utilização da água de coco e suas frações ativas como diluente do sêmen de mamíferos domésticos. In: SIMPOSIO NACIONAL DE BIOTECNOLOGIA DA REPRODUÇÃO DE MAMÍFEROS DOMÉSTICOS, 1995, Fortaleza. Anais... Fortaleza.

- NUNES, J. F. A inseminação artificial como método alternativo para o melhoramento da caprinocultura leiteira. In: SIMPÓSIO DA CAPRINOCULTURA DO ESTADO DO RIO, 1996, Niterói. Anais... Niterói, 1996.
- NUNES, J.F.; SALGUEIRO, C.C.M. Utilização da água de coco como diluente do sêmen de caprinos e ovinos. *Rev. Cient. Prod. Anim.* v.1, p.17-46, 1999.
- ORFÃO, L.H., VIVEIROS, A.T.M., Efeito de diluidores na motilidade espermática do dourado (Pisces, *Salminus maxillosus*) durante o resfriamento, In: XXVIII Congresso de Iniciação Científica da UFLA- CICESAL, UFLA, Lavras, p.333, 2005.
- PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology.* v. 32, p.209-222, 1992.
- PONZI JUNIOR, M. *Otimização da taxa de fertilização e eclosão de larvas de tambaqui, Colossoma macropomum (Cuvier, 1816) sem instrumentos.* Recife: Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aqüicultura, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 23pp. Dissertação de Mestrado, 2003.
- SALGUEIRO, C.C.M. E NUNES, J.F. Estudo de características testiculares e espermáticas de caprinos e ovinos. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 23 (3), 1999.
- RAVINDER, K.; NASARUDDIN, K.; MAJUMBAR, K.C.; SHIVAJI, S. Computerized analysis of motility, motility patterns and motility parameters of spermatozoa of carp following short-term storage of semen. *J. Fish Biol.* v.50, p.1309-1328, 1997.
- RITAR, A.J. Artificial insemination with cryopreserved semen from striped trumpeter (*Latris lineate*). *Aquac. Res.* 180, 1-2, 177-187, 1999.
- RITAR, A.J.; CAMPET, M. Sperm survival during short-term storage and after cryopreservation of semen from striped trumpeter (*Latris lineate*). *Theriogenology*, v.54, n.3 , ago, p.467-480, 2000.
- ROBIE ALLAN BOMBARDELLI; EDER FELIPE MÖRSCHBÄCHER; RODRIGO CAMPAGNOLO; EDUARDO ANTÔNIO SANCHES; MIRNA ADRIANE SYPERRECK. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá cinza, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimardm, 1824) *R. Bras. Zootec.* Vol.35 no.4 Viçosa July/Aug., 2006.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Methods for sperm evaluation and their relationship to fertility. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16, Goiânia. Anais: Palestras, 2005.
- ROYERE, D.; BARTHELEMY, C.; HAMAMAH, S. Cryopreservation of spermatozoa: a review. *Human Reproduction Update*, v.2, p.553-559, 1996.

RURANGWA, E., VOLCKAERT, F.A.M., HUYSKENS, G., KIME, D.E., OLLEVIER, F. Quality control of refrigerated and cryopreserved semen using computer assisted sperm analysis (CASA), viable staining and standardized fertilization in African catfish (*Clarias gariepinus*). *Theriogenology* 55, 3, 751-769, 2001.

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

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Animal Reproduction Science*, v.38, p.1-36, 1995.

SALGUEIRO, C.C.M., NUNES, J.F. Estudo de características testiculares e espermáticas de caprinos e ovinos. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 23, 3, 1999.

SALLES, M.G.F. Água de coco (*Cocos nucifera* L.) “in natura” e na forma de gel e estabilizada como diluente de sêmen caprino. Dissertação. Mestrado em Medicina Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRS, 1989.

SHIMODA, E., ANDRADE, D.R., CRUZ, G.M., SILVA, J.F.S. E GODINHO, H.P. Caracterização química do plasma seminal do pacu (*Piaractus mesopotâmicos*; Holmberg, 1887) hipofisado. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 23 (3): 151-478, 1999.

SHIMODA, E. *Análise e criopreservação do sêmen da Piabanha, Brycon insignis (Steindachner, 1877) (Pisces, Characidae)*. Campos dos Goytacazes: Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Tese de Doutorado, 2004.

SILVA, A. B.; FERNANDES, J. A.; LOVSHIN, L. L. Testes preliminares em viveiros com tambaqui *Colossoma bidens*. Recife, SUDENE, 10p., 1974.

SILVA, A.; CARNEIRO, S. E MELO, F.R. Desova induzida de tambaqui, *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818, com de hipófise de curimatã comum, *Prochilodus cearensis* Steindachner. In: DNOCS. *Coletânea de trabalhos técnicos*. Fortaleza (CE): DNOCS, 1981

SILVA, J.W.B.; ALENCAR, P.F.; FARIAS, J.O.; NOBRE, M.I.S. Resultados de um ensaio sobre policultivo de carpa espelho, *Cyprinus carpio* L., 1758 vr. *Specularis*, e tambaqui, *Colossoma macropomum*, Cuvier 1818. Boletim Técnico - DNOCS, Fortaleza, v.42, n.2, p.117-228, 1984.

SILVA, J.W.B., NOBRE, M.I.S., PINHEIRO, F.A. E SOBRINHO, A.C. Resultado de um experimento de policultivo de Tambaqui *Colossoma macropomum*, Cuvier, 1818, híbrido de tilápia, (*Oreochromis hornorum* TREW x *O. niloticus* L., 1766) e carpa espelho *Cyprinus carpio* L., 1758 vs *Speculares*. *Bol. Téc. do DNOCS*, Fortaleza, 42 (1): 63-89, 1984.

- SILVA, J.A.M., PEREIRA-FILHO E OLIVEIRA-PEREIRA, M. I. Digestibility of seeds consumed by tambaqui (*Colossoma macropomum* Cuvier, 1818): an experimental approach. *Biology of Tropical Fishes*. Edited by Val, A.L. and Almeida V.M.F. (11): 137-148, INPA, Manaus, 1999.
- SUQUET, M.; OMNES, M. H.; NORMANT, Y.; FAUVEL, C. Assessment of sperm concentration and motility in turbot (*Scophalmus maximus*) *Aquaculture*, vol. 101, Nº1-2, pp. 177-185 (1/2 p.), 1992.
- TABARES, J., TARAZONA, A. E OLIVEIRA, M. Fisiología de la activación del espermatozoide en peces de agua dulce. *Rev. Coml. Cienc. Pec.*, 18 (2): 149-160, 2005.
- TAITSON, P.F. E GODINHO, H.P. Evaluation of fish sperm concentration using two counting chambers. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 55 (2), 2003.
- TONIOLLI, R.; MESQUITA, S.M. Fertilidade de porcas inseminadas com sêmen diluído em água de coco estabilizada e com BTS. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.14, p.249-254, 1990.
- TOTH, G.P., CHRIST, S.A., MCCARTHY, H.W., TARSELLA, J.A., SMITH, M.K. Computer-assisted motion analysis of semen from the common carp. *J. Fish Biol.* 47, 986-1003, 1995.
- TOTH, G.P.; CIERESKO, A.; CHRIST, S.A.; DABROWSKI, K. Objective analysis of sperm motility in the lake sturgeon, *Acipenser fulvescens*> activation and inhibition conditions. *Aquaculture*, v.154, p.337-348, 1997.
- VAZZOLER, A.E.A.M. *Biologia da Reprodução de Peixes Teleósteos: Teoria e Prática*. Maringá: EDUEN, p.169, 1996.
- VELÁSQUEZ-MEDINA, S. Criopreservação do sêmen de pirapitinga, *Piaratus brachypomus* (Pisces, Characidae). Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais). Instituto de Ciências do Mar – UFC, Fortaleza – Ceará, f 96, 2008.
- VELASCO-SANTAMARÍA, Y. M.; MEDINA-ROBLES, V. M.; CRUZ-CASALLAS, P. E. Cryopreservation of yamú (*Brycon amazonicus*) sperm for large scale fertilization *Aquaculture* 256, p. 264–271, 2006.
- VERSTEGEN, J., IGUER-OUADA, M., ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 57, 1, 149–179, 2002.
- VIDAL, L.V.O., FURUYA, W.M., GRACIANO, T.S., SCHAMBER, C.R., SILVA, L.C.R., SANATOS, L.D., SOUZA, S.R. Eugenol como anestésico para juvenis de matrinxã (*Brycon cephalus*). *Rev. Bras. Saúde Prod. An.* 8, 4, 335-342, 2007.

- VIEIRA, E.F., ISAAC, V.J., FABRE, N.N. Biologia Reprodutiva do Tambaqui, *Colossoma macropomum*, Cuvier, 1818 (teleostei, serraslamidae), no Baixo Amazonas, Brasil. *Acta Amazonica* 29, 625-638, 1999.
- VILLACORTA-CORREA, M.A. AND SAINT-PAUL, U. Structural indexes and sexual maturity of tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) (Characiformes: Characidae) in Central Amazon, Brazil. *Rev. Bras. Biol.*, 59 (4): 637-652, 1999.
- VIVEIROS, A.T.M., SO, N., KOMEN, J. Sperm cryopreservation of African catfish *Clarias gariepinus* cryoprotectants, freezing rates and sperm: egg dilution ratio. *Theriogenology* 54, 9, 1395-1408, 2000.
- VIVEIROS, A.T.M. Semen cryopreservation in catfish species, with particular emphasis on the African catfish. *Animal Breeding Abstracts* 73, 3, 1-9, 2005.
- VIVEIROS, A.T.M.; ORFÃO, L.H. ; MARIA, A.N.; ALLAMAN I.B. A simple, inexpensive and successful freezing method for curimba *Prochilodus lineatus* (Characiformes) semen. *Anim. Reprod. Sci.* (2008), doi:10.1016/j.anim reprosci.2008.04.025 xxx (2008) xxx-xxx
- VIVEIROS, A.T.M., ORFÃO, L.H., MARIA, A.N. E ALLAMAN I.B. A simple, inexpensive and successful freezing method for curimba *Prochilodus lineatus* (Characiformes) semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 112 (2009): 293-300, 2008.
- VIVEIROS, A.T.M. E GODINHO, H.P. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. *Fish Physiol. Biochem.*, 35: 137-150, 2009.
- VIVIER, E.F.; ISSAC, V.J.; FABRÉ, N.N. Biologia reprodutiva do tambaqui, *Colossoma macropomum* CUVIER, 1818 (TELEOSTEI, SERRASALMIDAE), no baixo Amazonas, Brasil, *Acta Amazônica*, v.29, n.4, p.625-638, 1999.
- WAGNER LOESCH VIANNA; DANIEL GONÇALVES BRUNO; ANDRÉ NAMINDOME; ALINE CAMPOS ROSSETO; PAULO HENRIQUE MAZZA RODRIGUES; MARCOS EDUARDO PINESE; ANÍBAL DESANT'ANNA MORETTI. Estudo Comparativo da Eficiência de Diferentes Técnicas de Mensuração da Concentração Espermática em Suínos. *R. Bras. Zootec.* v.33, n.6, p.2054-2059, (Supl. 2), 2004.
- WATSON, P.F. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5°C by egg yolk lipoprotein. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.62, p.483-492, 1981.
- WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and assessment of their post-thawing function. *Reproduction Fertility and Development*, v.7., p.871-891, 1995.

- WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.*, v.60-61, p.481-92, 2000.
- WILSON-LEEDY, J.G., INGERMANN, R.L. Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters *Theriogenology* 67, 661–672, 2007.
- WINEMILLER, K.O. Patterns of variation in life history among South American fishes in seasonal environments. *Oecologia* 81: 225-241, 1989.
- WOJTCZAK, MARIOLA; DIETRICH, GRZEGORZ, J.; SŁOWIŃSK, MARIOLA; DOBOSZ, STEFAN; HENRYK KUŹMIŃSKI; CIERESZKO, ANDRZEJ. Ovarian fluid pH enhances motility parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Aquaculture* 270, 259–264, 2007.
- YAO, Z.; CRIM, W.L.; RICHARDSON, G.F.; EMERSON, C.J. Motility, fertility and ultra structural changes of ocean pout (*Macrozoarces americanus* L.) sperm after cryopreservation. *Aquaculture*, v.181, n.3-4, p.361-375, 2000.