



TAIS REGINA TAFFAREL

**OSMOLALIDADE E COMPOSIÇÃO DO MEIO
IMOBILIZADOR DURANTE O RESFRIAMENTO
DO SÊMEN DE *Prochilodus lineatus***

LAVRAS – MG

2013

TAIS REGINA TAFFAREL

**OSMOLALIDADE E COMPOSIÇÃO DO MEIO IMOBILIZADOR
DURANTE O RESFRIAMENTO DO SÊMEN DE *Prochilodus lineatus***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Dra. Ana Tereza de Mendonça Viveiros

Coorientadora

Dra. Flávia Maria Borges Saad

LAVRAS – MG

2013

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Taffarel, Tais Regina.

Osmolalidade e composição dos meios de imobilização durante o resfriamento do sêmen de *Prochilodus lineatus* / Tais Regina

Taffarel. – Lavras : UFLA, 2013.

58 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Ana Tereza de Mendonça Viveiros.

Bibliografia.

1. Água de coco. 2. Análise computadorizada. 3. Characiformes.
4. Curimba - Qualidade do sêmen. 5. BTS[®]. I. Universidade Federal
de Lavras. II. Título.

CDD – 639.37520416

TAIS REGINA TAFFAREL

**OSMOLALIDADE E COMPOSIÇÃO DO MEIO IMOBILIZADOR
DURANTE O RESFRIAMENTO DO SÊMEN DE *Prochilodus lineatus***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 04 de outubro de 2013.

Dr. José Camisão de Souza	DZO/UFLA
Dr. João Bosco Barreto Filho	DMV/UFLA
Dra. Ziara Aparecida Isau	IFSULDEMINAS/Inconfidentes

Dra. Ana Tereza de Mendonça Viveiros
Orientadora

LAVRAS – MG

2013

À Deus e aos bons espíritos,
que sempre me iluminaram durante toda a minha vida.
Aos meus pais, Dirceu e Mônica,
por sempre acreditarem em mim; por muitas vezes abdicarem de sua
vida para se dedicarem a minha.
À minha irmã, Andressa,
que, mesmo sem entender o que eu tentava lhe dizer, na maioria das
vezes, sempre me ouviu, sorriu e me consolou nos momentos de incertezas.
Ao meu maior companheiro, amigo e amor, Antonio Henrique,
pelo seu dom de ouvir, respeitar e simplesmente me abraçar nos
momentos em que eu mais senti medo e pensei que tudo daria errado.
À todos os meus amigos,
que sempre estiveram ao meu lado (fisicamente ou não), me apoiando
incondicionalmente, principalmente o Antônio Carlos Gonçalves, Eloiza
Lanferdini e Ylana Cláudia Medeiros. Que Deus lhes conceda muitas bênçãos e
sabedorias, pelo tempo que me foi dedicado;
Aos animais, pela compreensão e doação.

*“Hoje eu sinto que tudo acontece em seu devido momento, no Kairós
que assim nos é destinado. São nas dificuldades que descobrimos o quanto
somos fortes, e aprendemos o devido valor de nossas conquistas”*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus e aos bons espíritos, por me concederem a luz e a sabedoria quando estava perdida na escuridão;

Às orações que a mim foram dedicadas, e que hoje permitem mais um Kairós sobre mim;

À orientadora, Professora Ana Viveiros, pelos conselhos, ensinamentos e oportunidade de crescimento pessoal e profissional;

À Universidade Federal de Lavras e aos Professores e Funcionários do Departamento de Zootecnia, pela oportunidade de realizar o mestrado e me passar todo o conhecimento;

Aos professores João Bosco Barreto Filho, José Camisão de Souza e Ziara Aparecida Isaú, integrantes de minha banca de defesa, por todo auxílio e atenção que me foram dedicados; peço desculpas pelo contratempo que lhes foi atribuído. Que Deus lhes conceda em sabedoria, essa dedicação que me foi ofertada;

Aos professores Antonio Gilberto Bertechini, Carlos Eduardo Saad e Flávia Saad, por terem me acolhido também nesta Universidade, e por toda atenção, amizade e incentivo;

Aos pesquisadores e companheiros de experimento, Ariane Nascimento, Antônio Carlos Gonçalves, Isabel Galvis Lopez, Daniele Rossetto, Lays Pereira, Lidiane Lemes, Marina Cury, Marina Lemes, Marcelo Leal, Thales França e

Zafer Dogu por toda amizade, companheirismo e auxílio em campo e no laboratório;

Ao professor Pitágoras Piana, pelo auxílio estatístico;

Aos secretários da Pós-Graduação e do Departamento de Zootecnia, Carlos, Keila e Joelma, pela colaboração e amizade;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES), à Furnas Centrais Elétricas, pelo apoio financeiro;

Aos técnicos Gilson A. Azarias e Jailson M. Silva (CEMIG), pela amizade, prontidão e auxílio na realização dos experimentos na estação de piscicultura;

À estação de piscicultura da Companhia Energética de Minas Gerais (CEMIG), por permitirem e auxiliarem na execução dos experimentos;

À todos que participaram ou participam de minha vida, que contribuíram ou contribuem para meu crescimento pessoal e profissional;

Muito Obrigada!!!

“ Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas ”

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO GERAL

Objetivou-se, neste estudo, avaliar os efeitos de seis meios imobilizadores sobre a motilidade e velocidades espermáticas em sêmen de *Prochilodus lineatus*, após resfriamento. O experimento foi realizado na Estação de Piscicultura da Companhia Energética de Minas Gerais (CEMIG), durante o período reprodutivo de 2012/2013. O sêmen de 15 machos foi coletado após a indução hormonal com extrato de hipófise de carpa a 0,4 e 4 mg/kg, com intervalo de 12 horas. O sêmen foi diluído em dois meios (água de coco em pó = ACP® e Beltsville Thawing Solution = BTS®), cada um preparado em três osmolalidades diferentes (285, 325 e 365 mOsm/kg), na proporção 1:10 (sêmen:meio). O sêmen foi ativado em meio NaCl ~98 mOsm/kg. O pH de todos os meios foi ajustado em 7,6-7,7. Uma alíquota de sêmen fresco de cada macho foi mantida não diluída, como controle. Após diluição, as amostras de sêmen foram resfriadas a 4-8°C. O sêmen foi avaliado nos dias zero, dois, quatro e seis após o resfriamento. A taxa de motilidade e velocidades espermáticas (curvilínea = VCL; linear = VSL e média de percurso = VAP) foram avaliadas por meio do Sistema Computadorizado de Análise de Sêmen (CASA). A osmolalidade dos meios imobilizadores não afetou ($P > 0,05$), a qualidade do sêmen de *P. lineatus* após zero, dois, quatro e seis dias de resfriamento. A taxa de motilidade do sêmen diminuiu abruptamente ($P < 0,05$) do dia zero (ACP® = 85%; BTS® = 90% e controle = 75%) ao dia seis (ACP® = 8%; BTS® = 17% e controle = 33%) após o resfriamento. Nas amostras diluídas, as velocidades reduziram rapidamente ($P < 0,05$) do dia zero (ACP®: VCL = 194 $\mu\text{m/s}$, VSL = 94 $\mu\text{m/s}$ e VAP = 167 $\mu\text{m/s}$; BTS®: VCL = 236 $\mu\text{m/s}$, VSL = 110 $\mu\text{m/s}$ e VAP = 203 $\mu\text{m/s}$) para o dia seis (ACP®: VCL = 43 $\mu\text{m/s}$, VSL = 6 $\mu\text{m/s}$ e VAP = 15 $\mu\text{m/s}$; BTS®: VCL = 86 $\mu\text{m/s}$, VSL = 28 $\mu\text{m/s}$ e VAP = 53 $\mu\text{m/s}$) após o resfriamento. Diferentemente das amostras diluídas, o controle manteve velocidades espermáticas semelhantes ($P > 0,05$) do dia zero (VCL = 176 $\mu\text{m/s}$; VSL = 97 $\mu\text{m/s}$ e VAP = 144 $\mu\text{m/s}$) até o dia seis (VCL = 159 $\mu\text{m/s}$; VSL = 71 $\mu\text{m/s}$ e VAP = 134 $\mu\text{m/s}$) após o resfriamento. O sêmen de *P. lineatus* pode ser resfriado em um refrigerador sem diluição, por até seis dias, mantendo a qualidade dos gametas. Diferentes osmolalidades de ACP® e BTS® devem ser avaliadas, para verificar a influência na qualidade espermática.

Palavras-chave: Água de coco. Análise computadorizada. BTS®. Characiformes. Qualidade sêmen.

GENERAL ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effects of six immobilizing media over motility rate and the velocity of *Prochilodus lineatus* sperm after cooling. The experiment was performed at the Estação de Piscicultura da Companhia Energética de Minas Gerais (CEMIG) during the 2012/2013 spawning season. Semen from 15 males was collected after hormonal induction with carp pituitary extract at 0.4 and 4 mg/kg, with an interval of 12 hours. The semen was diluted in two media, Powdered Coconut Water (ACP™) and Beltsville Thawing Solution (BTS™), each prepared in three different osmolalities (285, 325 and 365 mOsm/kg) in the proportion of 1:10 (semen:medium). The semen was activated in a NaCl ~98 mOsm/kg medium. The pH of all media was adjusted to 7.6-7.7. One aliquot of fresh sperm from each male was maintained undiluted as control. After dilution the semen samples were cooled at 4-8 °C. The semen was evaluated at days zero, two, four and six after cooling. Sperm motility rate and velocities (VCL - curvilinear, VSL - straight line and VAP - average path) were evaluated by the Computer-Assisted Sperm Analyzer (CASA). The osmolalities of the immobilizing media did not affect ($P > 0.05$) the sperm quality of *P. lineatus* after zero, two, four and six days of cooling. Sperm motility rate dropped abruptly ($P < 0.05$) from day zero (ACP™ = 85%; BTS™ = 90% e control = 75%) to day six (ACP™ = 8%; BTS™ = 17% e control = 33%) after cooling. In the diluted samples, sperm velocities dropped quickly ($P < 0.05$) from day zero (ACP™: VCL = 194 $\mu\text{m/s}$, VSL = 94 $\mu\text{m/s}$ e VAP = 167 $\mu\text{m/s}$; BTS™: VCL = 236 $\mu\text{m/s}$, VSL = 110 $\mu\text{m/s}$ e VAP = 203 $\mu\text{m/s}$) from day six (ACP™: VCL = 43 $\mu\text{m/s}$, VSL = 6 $\mu\text{m/s}$ e VAP = 15 $\mu\text{m/s}$; BTS™: VCL = 86 $\mu\text{m/s}$, VSL = 28 $\mu\text{m/s}$ e VAP = 53 $\mu\text{m/s}$) after cooling. Differently from the diluted samples, the controls maintained similar sperm velocities ($P > 0.05$) from day zero (VCL = 176 $\mu\text{m/s}$; VSL = 97 $\mu\text{m/s}$ e VAP = 144 $\mu\text{m/s}$) to day six (VCL = 159 $\mu\text{m/s}$; VSL = 71 $\mu\text{m/s}$ e VAP = 134 $\mu\text{m/s}$) after cooling. *P. lineatus* sperm may be cooled without dilution for up to 6 days in a refrigerator, maintaining the quality of the gametes. Different ACP™ and BTS™ osmolalities should be evaluated in order to verify the influence on sperm quality.

Keywords: Coconut water. Computerized analysis. BTS™. Characiformes. Sperm quality.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Exemplar adulto de <i>Prochilodus lineatus</i>	16
Figura 2	Análise do sêmen de <i>Prochilodus lineatus</i> realizada através do CASA	23
Figura 3	Esquemática das velocidades espermáticas (VCL, VSL e VAP).....	24

SEGUNDA PARTE - ARTIGO

ARTIGO 1

Figura 1.	Taxa de motilidade (a) e velocidade curvilinear (VCL; b) do sêmen de <i>Prochilodus lineatus</i> (n = 15 machos), diluído em dois meios imobilizadores (ACP® e BTS®) e refrigerados entre 6 e 8°C, por seis dias. Sêmen não diluído foi usado como controle (triângulos fechados). Cada ponto e barra de erro são representados por médias ± DP de 15 machos. *Médias seguidas por asterisco são maiores que as outras (P < 0,05; teste de Tukey). ACP® - Água de Coco em Pó; BTS® - Beltsville Thawing Solution.....	43
Figura 2.	Velocidades linear (VSL; c) e média de percurso (VAP; d) do sêmen de <i>Prochilodus lineatus</i> (n = 15 machos), diluído em dois meios imobilizadores (ACP® e BTS®) e refrigerados entre 6 e 8°C, por seis dias. Sêmen não diluído foi usado como controle (triângulos fechados). Cada ponto e barra de erro são representados por médias ± DP de 15 machos. *Médias seguidas por asterisco são maiores que as outras (P < 0,05; teste de Tukey). ACP® - Água de Coco em Pó; BTS® - Beltsville Thawing Solution.....	44
Tabela 3.	Relatos da qualidade do sêmen de espécies de peixes Characiformes, submetidos à refrigeração. Somente tratamentos que apresentaram taxa de motilidade acima de 30% foram considerados.....	48

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Peso corporal e algumas características do sêmen fresco de *Prochilodus lineatus* (n = 15 machos; média ± DP; mínimo – máximo valores) ,após tratamento com extrato de hipófise de carpa.40
- Tabela 2.** Taxa de motilidade e velocidades espermáticas (média ± DP) do sêmen de *Prochilodus lineatus* (n = 15 machos) diluído em dois meios imobilizadores (ACP[®] e BTS[®]) e em três osmolalidades (285, 325 e 365 mOsm/Kg) ,refrigerados entre 6 e 8°C por seis dias.41
- Tabela 3.** Relatos da qualidade do sêmen de espécies de peixes Characiformes, submetidos à refrigeração. Somente tratamentos que apresentaram taxa de motilidade acima de 30% foram considerados.....48

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	
1	INTRODUÇÃO 13
2	REVISÃO DE LITERATURA 15
2.1	Espécie 15
2.2	Reprodução de peixes 16
2.3	Conservação de sêmen 17
2.3.1	Resfriamento de sêmen 18
2.3.2	Osmolalidade 19
2.3.3	Meios imobilizadores 20
2.3.3.1	Água de Coco em Pó – ACP[®] 21
2.3.3.2	Beltsville Thawing Solution – BTS[®] 22
2.3.4	Sistema Computadorizado de Análise de Sêmen - CASA 22
	REFERÊNCIAS 26
	SEGUNDA PARTE - ARTIGO 32
	ARTIGO 1 Osmolalidade e composição do meio imobilizador durante o resfriamento do sêmen de <i>Prochilodus lineatus</i> 32

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

O curimba *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) é um peixe originário da bacia do rio Paraná (BONETTO, 1994). É uma espécie que apresenta importância econômica e social para a pesca artesanal de subsistência. Como é uma espécie de peixe teleosteo, seu espermatozoide é imóvel no ducto seminal. Dessa forma, na natureza, a motilidade espermática ocorre somente quando os gametas entram em contato com a água (OLIVEIRA, 2012).

A diferença entre a osmolalidade da água ou do meio exposto, em relação ao plasma seminal, é essencial para o início ou supressão da motilidade espermática. Em meio hiposmótico, para espécies de peixes de água doce, é acionada a motilidade espermática, no entanto, a osmolalidade mínima para suprimir o início dessa motilidade varia de acordo com a espécie. Em Characiformes, existem alguns estudos que descrevem os efeitos da osmolalidade sobre a motilidade espermática para o sêmen de *Brycon insignis* (SHIMODA et al., 2007), de *Brycon opalinus* (ORFÃO et al., 2011), de *Brycon orbignyanus* (NASCIMENTO et al., 2012) e de *P. lineatus* (GONÇALVES et al., 2013; NASCIMENTO et al., 2012).

Nos peixes, embora bastante conhecida, a técnica de conservação de sêmen ainda é pouco utilizada, principalmente em espécies nativas. O método de resfriamento de sêmen é prático e simples para uso rotineiro na piscicultura, pois permite otimizar a utilização do sêmen de bons reprodutores, com a sua obtenção em tempos e locais diferentes (VIEIRA, 2010). Nesse sentido, grandes esforços são aplicados para desenvolver meios diluentes que se mantenham, por mais tempo, estáveis à composição do plasma seminal, para proporcionar

melhores condições de estocagem e sobrevivência dos espermatozoides (MARIA et al., 2004).

A avaliação da qualidade do sêmen é um importante instrumento para verificar a capacidade de fertilização dos espermatozoides. Dentre os parâmetros de qualidade espermática, o mais utilizado é a motilidade espermática (ALAVI et al., 2008; COSSON et al., 2008). Avaliações subjetivas vêm sendo substituídas por técnicas modernas, avaliadas de forma objetiva por meio de um sistema computadorizado, o qual possibilita avaliação acurada da motilidade, entre outras análises, como velocidades curvilínea, linear e média de percurso.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a eficiência dos meios imobilizadores (água de coco em pó - ACP[®]; Beltsville Thawing Solution - BTS[®]), em diferentes osmolalidades (285, 325 e 365 mOsm/kg), sobre a motilidade e velocidades espermáticas do sêmen de *Prochilodus lineatus*, durante seis dias de resfriamento.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Espécie

O curimba *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) pertence à classe Actinopterygii, ordem Characiformes, família Prochilodontidae. É um peixe de piracema nativo da bacia do rio Paraná e seus afluentes, atingindo até 70 cm de comprimento e peso superior a 6 kg (BONETTO, 1994); (Figura 1).

Esta espécie possui hábitos detritívoros, caracterizando-se como iliófago, pois se alimenta de substrato formado por lodo ou areia, no qual são encontrados os alimentos procurados (animal, vegetal ou detrito), sendo que essa espécie é de fácil adaptação à alimentação fornecida em sistemas de criação. Essa característica confere ao *P. lineatus* importante função na cadeia alimentar do ambiente aquático, uma vez que promove a limpeza do fundo dos rios. Encontra-se, geralmente, em ambiente com águas mais lentas, porém, na época de reprodução, realiza migrações em massa até as áreas de desova (COMPANHIA ENERGÉTICA DE MINAS GERAIS; FUNDAÇÃO CENTRO TECNOLÓGICO DE MINAS GERAIS - CEMIG; CETEC, 2000).

O *P. lineatus* é uma espécie de peixe de água doce que apresenta importância econômica e social para a pesca artesanal de subsistência, nos estados da região Nordeste do Brasil. As estações de piscicultura têm grande interesse no sucesso da sua reprodução, uma vez que as larvas de *P. lineatus* servem de alimento para espécies carnívoras de grande importância comercial, como, por exemplo, o dourado *Salminus brasiliensis* (CEMIG; CETEC, 2000) ou espécies passíveis de extinção, como a piracanjuba *Brycon orbignyianus* e o jaú *Zungaro jahu* (VIVEIROS et al., 2009). Essa espécie é também muito utilizada por usinas hidrelétricas em programas de repovoamento de reservatórios, além de servir como espécie-modelo no desenvolvimento de

pesquisas em biotecnologia reprodutiva, pela sua elevada prolificidade e facilidade de manejo (VIVEIROS et al., 2010b).



Figura 1 Exemplar adulto de *Prochilodus lineatus*

Fonte: Orfão (2006)

- Efeito de feedback para regulação de GnRH, LH e FSH.

2.2 Reprodução de peixes

Em geral, os peixes teleósteos possuem espermatozoides desprovidos de acrossoma e a penetração do ovócito é realizada pela micrópila, canal que liga o meio externo ao interno do ovócito (COSSON et al., 1999).

O espermatozoide é imóvel no ducto seminal. Dessa forma, a motilidade espermática inicia-se quando os gametas entram em contato com a água (MORISAWA; SUZUKI, 1980). Esse período de sobrevivência espermática após a ativação e no qual a micrópila permanece aberta após o contato com a água, ocorre por um intervalo de tempo muito curto, normalmente de um a dois minutos (COSSON et al., 1999). A intensidade e o movimento do espermatozoide, varia durante as fases da motilidade. Essas alterações ocorrem

devido ao alto requerimento oxidativo para produzir energia durante a locomoção que, com o passar do tempo, torna-se insuficiente para sustentar o armazenamento de ATP (COSSON et al., 1999).

Na fecundação externa, os gametas são liberados no ambiente, e a habilidade fertilizante é influenciada pela duração da motilidade e pelo número de espermatozoides presentes no sêmen. A longevidade do espermatozoide após a ativação vai depender do meio osmótico a que for exposto, pois é um componente importante para a determinação da dinâmica de ativação (HOLT; LOOK, 2004).

2.3 Conservação de sêmen

Técnicas que buscam a conservação espermática em peixes vêm se tornando cada vez mais usuais no processo de fertilização artificial, assumindo papel relevante na aquicultura e na conservação de recursos genéticos. Assim, busca-se melhorar os procedimentos que permitam prolongar a vida útil dos gametas em peixes (MURGAS et al., 2004).

A conservação de sêmen é uma forma de resolver problemas tanto de ordem econômica como de ordem ecológica, face à possibilidade de extinção de determinadas espécies, ocasionadas por ações antrópicas prejudiciais ao meio ambiente (MURGAS et al., 2004), além de atender ao mercado consumidor, que busca alimentos cada vez mais saudáveis.

Dentre as técnicas de conservação, destacam-se o resfriamento e a criopreservação dos espermatozoides. Essas metodologias são ferramentas importantes na solução de problemas, tais como a facilitação do manejo de reprodutores, por dispensar a presença do macho no momento da fertilização. Promovem ainda a troca de material genético e auxiliam nos programas de preservação de espécies ameaçadas de extinção. O resfriamento mantém a

viabilidade espermática, reduz a atividade metabólica e a ativação espontânea do espermatozoide, por um determinado período de tempo (BILLARD et al., 2004), frequentemente, até três ou quatro dias para a maioria das espécies de Characiformes.

2.3.1 Resfriamento de sêmen

A técnica do resfriamento de sêmen em refrigerador, também conhecida como preservação de sêmen a curto prazo, consiste em manter a viabilidade dos espermatozoides por um período de horas ou dias, em temperaturas de refrigeração, para serem utilizados posteriormente na fertilização (VIVEIROS; ORFÃO; LEAL, 2014). Essa técnica de preservação tem apresentado resultados satisfatórios em espécies de peixes de piracema, pois permite que o sêmen permaneça disponível durante um intervalo de tempo maior para a fertilização de ovócitos, o que assegura maior produtividade no processo reprodutivo.

O resfriamento de sêmen pode ser utilizado na reprodução dos peixes. No entanto, é importante a elaboração de um protocolo de resfriamento, principalmente de espécies nativas. Pois, tanto a duração do período de estocagem quanto os diluentes utilizados são específicos para cada espécie (AMARAL, 2009).

Em alguns estudos com espécies nativas, foi possível prolongar a qualidade dos espermatozoides e manter taxas de motilidade acima de 30%, quando o sêmen foi diluído e resfriado. O sêmen de *B. orbignyanus* foi resfriado por sete dias e manteve motilidade espermática próxima de 40%, quando diluído em NaCl 1,2% ou NaCl - Tris (MARIA et al., 2006b). O sêmen de pirapitinga *Brycon nattereri*, resfriado por sete dias, apresentou motilidade espermática de 48%, quando diluído em BTS® (OLIVEIRA et al., 2007) e o sêmen de *P. lineatus* resfriado por 4 dias apresentou motilidade espermática de 53%, quando

diluído em Androstar[®] (ORFÃO et al., 2010). Em *Brycon insignis*, entretanto, a motilidade do sêmen cai rapidamente durante os dois primeiros dias de resfriamento, independente se o sêmen foi previamente diluído ou não, mantendo taxa de motilidade espermática de 67%, quando diluído em Androstar e quando não diluído de 44%, por dois dias (AMARAL, 2009).

Segundo Stoss e Donaldson (1982), os fatores determinantes do sucesso do resfriamento são: redução da temperatura, fornecimento e troca de gases, prevenção do desenvolvimento bacteriano e dessecação. Outros fatores que podem ser associados à diminuição da viabilidade espermática são a taxa de diluição e o diluente utilizado. Os resultados, porém, variam de espécie para espécie (SANCHES; CERQUEIRA, 2011).

2.3.2 Osmolalidade

Peixes teleósteos de água doce possuem espermatozoides imóveis no plasma seminal ou quando suspensos em meio isosmótico ao plasma seminal (MORISAWA; SUZUKI, 1980). No entanto, quando em meio hiposmótico, iniciam a motilidade espermática. A alta osmolalidade e composição do plasma seminal previnem a motilidade espermática nos ductos espermáticos de peixes (BILLARD, 1986). O plasma seminal de peixes é constituído, em grande parte, por compostos minerais (Na^+ , K^+ , Ca^+). Esses compostos (íons) estão envolvidos na regulação da osmolalidade (HE; KEERAN-JENKINS; WOODS, 2004). Por conseguinte, a motilidade é induzida após liberação e contato dos espermatozoides com o meio aquoso, durante a reprodução natural ou com o meio hiposmótico, durante a propagação artificial (COSSON, 2010).

Osmolalidade é definida como a concentração de solutos totais numa solução, com a propriedade de exercer pressão no interior da referida solução. Essa propriedade do soluto é conhecida como pressão osmótica, que está

envolvida na regulação do fluxo de água por meio de uma membrana, fenômeno chamado de osmose. Assim, quando a concentração de soluto (mOsm/kg de água) é mais baixa no meio onde se encontra imersa uma célula, do que a concentração do próprio citosol (hiposmótica), essa tende a aumentar seu volume, introduzindo água do meio ambiente; mas, quando a célula é imersa numa solução mais concentrada (hiperosmótica), sofre a redução do tamanho e saída de água da membrana (BOLSOVER et al., 2004). Além da osmolalidade, vários parâmetros como temperatura, pH, íons (incluindo Na⁺, K⁺) e taxa de diluição influenciam a motilidade espermática, em qualquer solução de ativação ou de imobilização (ALAVI; COSSON, 2005, 2006).

2.3.3 Meios imobilizadores

Além de aumentar o volume total do sêmen, os diluentes facilitam a sua divisão em doses inseminantes e proporcionam um meio favorável à sobrevivência dos espermatozoides *in vitro* (DERIVAUX, 1980). A diferença que existe entre os diluentes está na composição empregada (HOPKINS; EVANS, 1991).

A adição de um diluente reduz a concorrência dos espermatozoides por oxigênio e espaço (CAROLSFELD; HARVEY, 1999) e ajuda a controlar o crescimento bacteriano, quando contém antibióticos em sua composição. O uso de diluentes isosmóticos pode estabilizar as condições físico-químicas durante a estocagem do sêmen, prolongando o tempo que esses espermatozoides permanecem aptos a fecundar um ovócito. A diluição do sêmen, em uma solução com composição semelhante a do plasma seminal, permite melhor aproveitamento da sua capacidade fecundante, principalmente quando se leva em consideração que a quantidade de sêmen, utilizada em procedimentos

rotineiros de desova induzida, é maior do que a necessária (TAN-FERMIN et al., 1999).

2.3.3.1 Água de Coco em Pó – ACP®

A água de coco *Cocos nucifera* L. é um meio natural e estéril composto por sais, proteínas, açúcares, vitaminas e gorduras neutras, além de indutores da divisão celular e diversos eletrólitos, que fornecem os nutrientes necessários para a conservação de células espermáticas (BLUME; MARQUES JÚNIOR, 1994). O uso da água de coco *in natura* apresenta limitações, como a inabilidade de estocar a água por longos períodos, e a utilização dos frutos, que é limitada a regiões onde ele é encontrado. Além disso, há a dificuldade de encontrar frutos com características ideais, ou seja com seis meses de maturação (CARVALHO et al., 2006). Trabalhos realizados por diversos pesquisadores demonstram a viabilidade da água de coco como diluente para refrigeração e criopreservação do sêmen de diversos mamíferos (BARROS; TONIOLLI, 2011) e de peixes (CARVALHO; NUNES; GONDIN, 2002; FARIAS et al., 1999).

A Água de Coco em Pó - ACP® (ACP Biotecnologia, Fortaleza, Brasil) foi desenvolvida com o intuito de simplificar a utilização da água de coco como diluente e que, após a sua ressuspensão, ela apresente características bioquímicas similares àquelas da água de coco *in natura*. Dessa forma, a ACP® pode ser facilmente armazenada e enviada para regiões onde o fruto não é encontrado. Inicialmente, ela foi utilizada como diluente de sêmen de caprino (SALGUEIRO et al., 2002), e mais recentemente foi adaptada para a preservação de sêmen de peixes. A ACP® já foi testada no resfriamento do sêmen do peixe tambaqui *Collossoma macropomum* (OLIVEIRA, 2012).

2.3.3.2 Beltsville Thawing Solution – BTS[®]

O Beltsville Thawing Solution (BTS[®] - MINITUB[®]) é um meio diluente comercial produzido para a preservação de sêmen suíno, porém vem sendo utilizado em experimentos, em algumas espécies de peixes. Sua fórmula é composta por glicose, citrato de sódio, ácido etilenodiamina tetra-acético (EDTA), bicarbonato de sódio, cloreto de potássio e sulfato de gentamicina. O BTS[®] é o meio diluente mais utilizado para suínos, devido à facilidade e ao baixo custo de produção, além do baixo preço de comercialização (LEVIS, 2000).

O BTS[®] tem sido utilizado como diluidor de sêmen submetido ao resfriamento em diversas pesquisas com espécies de peixes nativas, como piracanjuba *B. orbignyanus* (MARIA et al., 2006a, 2006b; MURGAS et al., 2004; VIVEIROS et al., 2010a), pirapitinga *B. nattereri* (OLIVEIRA et al., 2007), piabanha *B. insignis* (AMARAL, 2009), e curimba *P. lineatus* (FELIZARDO et al., 2011; GONÇALVES et al., 2013; ORFÃO et al., 2010; VIVEIROS et al., 2009), dentre outros. Desta forma, o BTS[®] melhora a qualidade do sêmen, durante o período de resfriamento, e prolonga a capacidade de fertilização do espermatozoide, facilitando a reprodução artificial.

2.3.4 Sistema Computadorizado de Análise de Sêmen - CASA

O sistema computadorizado de análise de sêmen, conhecido pela sigla em inglês CASA (Computer-Assisted Sperm Analyzer), foi inicialmente desenvolvido para visualizar, digitalizar e analisar imagens sucessivas, fornecendo informações acuradas, precisas e significativas do movimento de cada célula, bem como de subpopulações de células espermáticas (AMANN; KATZ, 2004); (Figura 2).

As primeiras avaliações objetivas foram realizadas na década de 40 em sêmen humano e, posteriormente, em cães e outros mamíferos. Os primeiros trabalhos com peixes foram reportados por Cosson et al. (1985), que utilizaram iluminação estroboscópica e câmera de vídeo na análise da motilidade de espermatozoides de truta arco-íris *Oncorhynchus myki*. A diferença na biologia espermática entre peixes e mamíferos foi um dos fatores que refletiram o atraso da adequação das ferramentas para análise de motilidade espermática (MATOS et al., 2008).

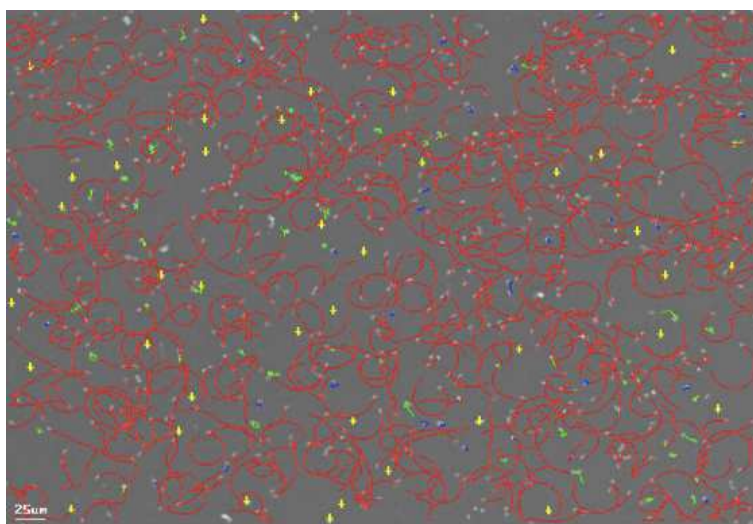


Figura 2 Análise do sêmen de *Prochilodus lineatus* realizada através do CASA

Nota: Linhas em azul representam espermatozoides com movimento não progressivo; em verde, movimento progressivo lento; em vermelho, movimento progressivo rápido e pontos em amarelo, espermatozoide imóvel.

O sistema CASA realiza quantificação da qualidade do sêmen da forma mais objetiva e abrangente disponível atualmente (WILSON-LEEDY; INGERMANN, 2007). As definições para aplicação do CASA são baseadas em características como tamanho, forma e trajetória de natação do espermatozoide

(YANG; TIERSCH, 2011). A motilidade espermática é o parâmetro mais utilizado para a avaliação da qualidade dos espermatozoides (ALAVI et al., 2008; COSSON et al., 2008) e apresenta, durante o seu progresso natatório para a fertilização, variações de movimento, sendo descrito como movimento não progressivo (azul), progressivo lento (verde), progressivo rápido (vermelho) e imóvel (amarelo), sendo todos relacionados com o processo de capacitação e fertilização (VERSTEGEN; IGUER-OUADA; ONCLIN, 2002). O resultado é expresso em porcentagem de espermatozoides móveis, na escala de 0 a 100%, em relação ao total de espermatozoides analisados (DONALD; HICKMAN; HOSKINS, 1988). Além das análises de motilidade, têm sido analisadas, com o CASA, as velocidades curvilínea (VCL), linear (VSL) e média de percurso (VAP), que são expressas em micrômetros por segundo ($\mu\text{m/s}$; Figura 3). O VCL é a velocidade da trajetória real do espermatozoide, por unidade de tempo; o VSL é a velocidade média em função da linha reta estabelecida entre o primeiro e o último ponto da trajetória do espermatozoide, por unidade de tempo; e o VAP é a velocidade da trajetória média do espermatozoide, por unidade de tempo (VERSTEGEN; IGUER-OUADA; ONCLIN, 2002).

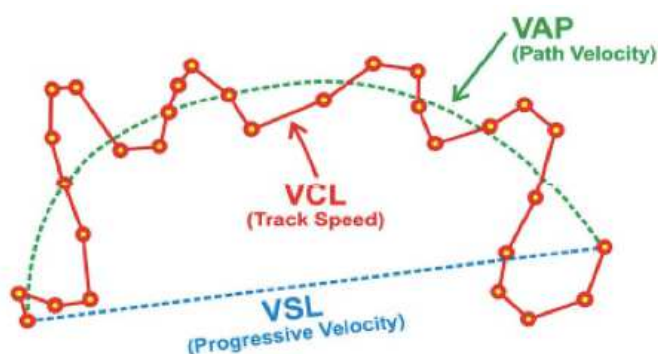


Figura 3 Esquematização das velocidades espermáticas (VCL, VSL e VAP)

Alguns trabalhos, avaliando sêmen de espécies de peixes nativas utilizando o CASA já foram relatados em *P. brachypomus* (NASCIMENTO et al., 2010), *P. lineatus* (VIVEIROS et al., 2010b), *B. insignis* (VIVEIROS et al., 2012) e *C. macropomum* (OLIVEIRA, 2012).

REFERÊNCIAS

- ALAVI, S. M. H.; COSSON, J. Sperm motility in fishes: I., effects of temperature and pH: a review. **Cell Biology International**, London, v. 29, n. 2, p. 101-110, Feb. 2005.
- ALAVI, S. M. H.; COSSON, J. Sperm motility in fishes: II., effects of ions and osmolality: a review. **Cell Biology International**, London, v. 30, n. 1, p. 1-14, Jan. 2006.
- ALAVI, S. M. H. et al. Morphology and fine structure of *Barbus barbuis* (Teleostei: Cyprinidae) spermatozoa. **Journal of Applied Ichthyology**, Berlin, v. 24, n. 4, p. 378-381, Aug. 2008.
- AMANN, R. P.; KATZ, D. F. Reflections on CASA after 25 years. **Journal of Andrology**, New York, v. 25, n. 3, p. 317-325, 2004.
- AMARAL, T. B. **Resfriamento e criopreservação de sêmen de peixe teleósteo piabanha (*Brycon insignis*)**. 2009. 51 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.
- BARROS, T. B.; TONIOLLI, R. Uso potencial da água de coco na tecnologia de sêmen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 35, n. 4, p. 400-407, 2011.
- BILLARD, R. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. **Reproduction and Nutritional Development**, Les Ulis, v. 2, n. 4, p. 877-920, 1986.
- BILLARD, R. et al. Cryopreservation and short-term storage of sturgeon sperm, a review. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 236, n. 1/4, p. 1-9, June 2004.
- BLUME, H.; MARQUES JÚNIOR, A. P. Avaliação da água de coco no cultivo e criopreservação de embriões murúdeos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 18, n. 3, p. 97-104, jul./set. 1994.
- BOLSOVER, R. S. et al. **Cell biology**. 2nd ed. New York: J. Wiley, 2004. 552 p.
- BONETTO, A. A. Austral rivers of South America. In: MARGALEF, R. (Ed.). **Limnology now: a paradigm of planetary problems**. New York: Elsevier Science, 1994. p. 425-728.

- CAROLSFELD, J.; HARVEY, B. **Conservação de recursos genéticos de peixes: teoria e prática**. Victoria: World Fisheries Trust, 1999. 47 p.
- CARVALHO, J. M. C. et al. Água de coco: propriedades nutricionais, funcionais e processamento. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 27, n. 3, p. 437-452, set. 2006.
- 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**, Belo Horizonte, v. 5, n. 2, p. 184-186, abr./jun. 2002.
- COMPANHIA ENERGÉTICA DE MINAS GERAIS. FUNDAÇÃO CENTRO TECNOLÓGICO DE MINAS GERAIS. **Guia ilustrado de peixes da bacia do rio Grande**. Belo Horizonte, 2000. 144 p.
- COSSON, J. Frenetic activation of fish spermatozoa flagella entails short-term motility, portending their precocious decadence. **Journal of Fish Biology**, London, v. 76, n. 1, p. 240-279, 2010.
- COSSON, J. et al. Ionic factors regulating the motility of fish sperm. In: GAGNON, C. (Ed.). **The male gamete: from basic science to clinical applications**. Vienna: Cache River, 1999. p. 162-186.
- COSSON, J. et al. Studying sperm motility in marine fish: an overview on the state of the art. **Journal of Applied Ichthyology**, Berlin, v. 24, n. 4, p. 460-486, Aug. 2008.
- COSSON, M. P. et al. Rapid and quantitative assessment of trout spermatozoa motility using stroboscopy. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 46, p. 71-75, 1985.
- DERIVAUX, J. **Reprodução dos animais domésticos**. Zaragoza: Acribia, 1980. 446 p.
- DONALD, T. S.; HICKMAN, R.; HOSKINS, D. D. Description, validation and performance characteristic of a new computer-automated sperm motility analysis system. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 38, p. 577-586, 1988.

FARIAS, J. O. et al. Avaliação “in vitro” e “in vivo” do sêmen do tambaqui (*Colossoma macropomum*) conservado a temperatura ambiente e criopreservado em água de coco. **Revista Científica de Produção Animal**, Belo Horizonte, v. 1, n. 1, p. 44-58, 1999.

FELIZARDO, V. O. et al. Osmolaridade e taxa de diluição na ativação do sêmen criopreservado de *Prochilodus lineatus*. **Archivos de Zootecnia**, Cordoba, v. 60, n. 232, p. 1255-1262, 2011.

GONÇALVES, A. C. S. et al. Initiation and suppression of sperm motility is osmolality-dependent in two South American fish species: streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) and piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). **Animal Reproduction**, Amsterdam, v. 10, n. 1, p. 62-70, 2013.

HE, S.; KEERAN-JENKINS, K.; WOODS, C. Activation of sperm motility in striped bass via a cAMP-independent pathway. **Theriogenology**, Stoneham, v. 61, n. 1/8, p. 1487-1498, May 2004.

HOLT, W. V.; LOOK, K. J. W. van. Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory tests of semen quality. **Reproduction**, Cambridge, v. 127, n. 5, p. 527-535, May 2004.

HOPKINS, S. M.; EVANS, L. E. Diluição do sêmem. In: MCDONALD, E. (Ed.). **Endocrinologia veterinária e reprodução**. 4. ed. México: Interamericana, 1991. p. 466-551.

LEVIS, D. Liquid boar semen production. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BOAR SEMEN PRESERVATION, 4., 2000, Beltsville. **Proceedings...** Beltsville: CBSP, 2000. p. 121.

MARIA, A. N. et al. Effects of cooling and freezing on sperm motility of the endangered fish piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Characiformes, Characidae). **Animal Reproduction**, Amsterdam, v. 3, n. 1, p. 55-60, 2006a.

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

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

MATOS, D. L. et al. Análise computarizada de espermatozoides: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 32, n. 4, p. 225-232, 2008.

MORISAWA, M.; SUZUKI, K. Osmolality and potassium ions: their roles in initiation of sperm motility in teleosts. **Science**, New York, v. 210, p. 114-115, 1980.

MURGAS, L. D. S. et al. Viabilidade espermática do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) resfriado a 4 °C. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 33, n. 6, p. 1361-1365, nov./dez. 2004.

NASCIMENTO, A. F. et al. Extender composition, osmolality, cryoprotectant and equilibration time effects on fresh sperm motility of two Characiformes fish: piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) and streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*). **Animal Reproduction**, Amsterdam, v. 9, n. 2, p. 103-110, Apr./June 2012.

NASCIMENTO, A. F. et al. The success of out-of-season sperm cryopreserved in different freezing media of the Amazonian freshwater fish pirapitinga (*Piaractus brachypomus*). **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 118, n. 2/4, p. 324-329, Apr. 2010.

OLIVEIRA, F. C. E. **Resfriamento do sêmen de *Colossoma macropomum* em água de coco em pó (ACP™-104) associada à crioprotetores: estudo de toxicidade.** 2012. 66 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2012.

OLIVEIRA, J. F. et al. Sucesso do resfriamento e congelamento de sêmen de pirapitinga *Brycon nattereri*. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 59, n. 6, p. 1509-1515, 2007.

ORFÃO, L. H. **Resfriamento e criopreservação de sêmen de curimba *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836).** 2006. 86 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

ORFÃO, L. H. et al. Extender composition, osmolality and cryoprotectant effects on the motility of sperm in the Brazilian endangered species *Brycon opalinus* (Characiformes). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 311, n. 1/4, p. 241-247, Feb. 2011.

ORFÃO, L. H. et al. Sperm fertility of the subtropical freshwater streaked prochilod *Prochilodus lineatus* (Characiformes) improved after dilution and cold storage. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 41, n. 10, p. 679-687, Sept. 2010.

SALGUEIRO, C. C. M. et al. Utilização de diluentes à base de água de coco *in natura* e em pó na inseminação artificial programada de cabras. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 5, p. 96-98, nov./dez. 2002. Suplemento.

SANCHES, E. G.; CERQUEIRA, V. R. Preservação de sêmen refrigerado de cioba com diluentes e atmosfera modificada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 12, p. 1673-1680, dez. 2011.

SHIMODA, E. et al. Efeito da osmolaridade sobre a motilidade espermática na piabanha *Brycon insignis*. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 54, n. 315, p. 430-433, set./out. 2007.

STOSS, J.; DONALDSON, E. M. Preservation of fish gametes. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF REPRODUCTION AND PHYSIOLOGY OF FISH, 1., 1982, Wageningen. **Proceedings...** Wageningen: ISRPF, 1982. p. 114-122.

TAN-FERMIN, J. D. et al. Seminal plasma composition, sperm motility, and milt dilution in the Asian catfish *Clarias macrocephalus* (Günther). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 171, n. 3/4, p. 323-338, Feb. 1999.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 57, n. 1, p. 149-179, Jan. 2002.

VIEIRA, M. J. A. F. **Caracterização do sêmen de tambaqui *Colossoma macropomum* (Curvier, 1818) e criopreservação em diluentes à base de água de coco em pó (ACP-104)**. 2010. 115 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2010.

VIVEIROS, A. T. M. et al. Gentamycin controls bacterial growth during refrigerated storage of piracanjuba, *Brycon orbignyanus*, semen. **World Aquaculture Society**, Baton Rouge, v. 41, n. 1, p. 57-65, 2010a.

VIVEIROS, A. T. M. et al. Motility and fertility of the subtropical freshwater fish streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) sperm cryopreserved in powdered coconut water. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 74, n. 4, p. 551-556, Sept. 2010b.

VIVEIROS, A. T. M. et al. A simple, inexpensive and successful freezing method for curimba *Prochilodus lineatus* (Characiformes) semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 112, n. 3/4, p. 293-300, June 2009.

VIVEIROS, A. T. M. et al. Sperm cryopreservation affects post thaw motility, but not embryogenesis or larval growth in the Brazilian fish *brycon insignis* (Characiformes). **Theriogenology**, Los Angeles, v. 78, n. 4, p. 803-810, Sept. 2012.

VIVEIROS, A. T. M.; ORFÃO, H. L.; LEAL, M. C. **Biologia e conservação dos espermatozoides**: biologia e fisiologia de peixes neotropicais de água doce. 2014. No prelo.

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**, Los Angeles, v. 67, n. 3, p. 661-672, 2007.

YANG, H.; TIERSCH, T. R. Application of computer-assisted sperm analysis (CASA) to aquatic species. In: TIERSCH, T. R.; GREEN, C. C. (Ed.). **Cryopreservation in aquatic species**. 2nd ed. Baton Rouge: The World Aquaculture Society, 2011. p. 240-254.

SEGUNDA PARTE - ARTIGO

ARTIGO 1 Osmolalidade e composição do meio imobilizador durante o resfriamento do sêmen de *Prochilodus lineatus*

Artigo normalizado segundo as normas do periódico *Aquaculture Research*

1 Introdução

O *Prochilodus lineatus* (Valenciennes 1836), pertencente à ordem Characiformes, é uma espécie de peixe migratório, nativo da bacia do rio Paraná e seus afluentes (Bonetto 1994). As larvas de *P. lineatus* são usadas como alimento vivo para espécies de peixes carnívoras ameaçadas, incluindo o *Brycon orbignyanus* e *Zungaro jahu*, enquanto os peixes adultos são utilizados para consumo humano, em alguns estados do Nordeste (Viveiros, Nascimento, Orfão & Isaú 2010). Devido aos métodos de reprodução artificial já bem estabelecidos, e à alta prolificidade, o *P. lineatus* tem sido usado como uma espécie modelo, para pesquisa em reprodução de peixes (Viveiros, Nascimento et al., 2010), além de amplamente utilizado em programas de repovoamento de companhias hidrelétricas brasileiras.

A preservação, a curto prazo, de espermatozoides por resfriamento (4 a 8°C) é uma técnica que facilita a reprodução artificial. O armazenamento de sêmen puro ou diluído, por alguns dias em um refrigerador, é um procedimento fácil e que pode ser adotado por qualquer piscicultura. Embora esse método tenha apresentado bons resultados de motilidade e prolongado a viabilidade espermática, ele é usado em poucos criatórios de peixes, principalmente devido ao período de armazenamento, geralmente equivalente a menos de uma semana, em Characiformes (Orfão, Maria, Nascimento, Isaú & Viveiros 2010).

Para aplicações práticas, após o resfriamento, é importante que as amostras de sêmen apresentem pelo menos 30% de taxa de motilidade espermática, a fim de garantir uma fertilização satisfatória (Marques & Godinho 2004). A motilidade espermática do sêmen puro de seis espécies de peixes Characiformes foi avaliada, onde foi possível manter 30% de taxa de motilidade, por apenas oito horas, em *Leporinus friderici* e *Leporinus elongatus*, e de 40% de taxa de motilidade, por apenas 19-20 horas, em *Piaractus mesopotamicus* e

P. lineatus (Marques & Godinho 2004).

A adição de meios imobilizadores pode auxiliar na manutenção das condições dos espermatozoides, durante a armazenagem. Assim, o tempo de vida dos espermatozoides pode ser prolongado (Stoss 1983). O sêmen de *P. lineatus*, diluído em MIII[®] (367 mOsm/kg) e BTS[®] (332 mOsm/kg), manteve 71 e 81%, respectivamente, de taxa de motilidade espermática, por quatro dias (Orfão et al., 2010); o sêmen de *B. orbignyana*, diluído em NaCl 200 mM (404 mOsm/kg) e NaCl - Tris (429 mOsm/kg) manteve 37 e 40% de taxa de motilidade por sete dias, respectivamente (Maria, Viveiros, Freitas & Oliveira 2006), em relação ao sêmen controle não diluído.

Como na maioria dos teleósteos (Morisawa & Suzuki 1980), os espermatozoides de *P. lineatus* são imóveis no trato genital, e a motilidade é ativada, quando o sêmen é liberado na água (Viveiros, Orfão, Maria & Allaman 2009). Os valores de osmolalidade, pH, temperatura e concentração iônica afetam a motilidade espermática do sêmen (Morisawa & Suzuki 1980; Alavi & Cosson 2006). Em 2006, Alavi & Cosson publicaram uma revisão bibliográfica, abordando os efeitos da osmolalidade sobre a motilidade espermática em peixes, com foco em espécies de três ordens (Salmoniformes, Cypriniformes e Acipenseriformes). Até aquele momento, nenhum estudo semelhante sobre espécies Characiformes havia sido realizado, avaliando os efeitos da osmolalidade na motilidade espermática do sêmen fresco (Gonçalves, Nascimento, Costa, Leal & Viveiros 2013). No entanto, é possível já encontrar alguns estudos com peixes Characiformes onde, meios diluentes à base de NaCl e glicose suprimiram a motilidade espermática de 196 mOsm/kg (Melo & Godinho 2006) até 620 mOsm/kg (Martinez, Garcia & Carrasco 2011).

Os meios simples ou complexos vêm sendo utilizados durante o resfriamento do sêmen de peixe, uma vez que diminuem a competição dos espermatozoides por oxigênio e espaço (Carolsfeld & Harvey 1999). O diluente

comercial Beltsville Thawing Solution (BTS[®]), originalmente desenvolvido para o sêmen de suínos, foi utilizado no resfriamento do sêmen de Characiformes, como em *Brycon nattereri* (Oliveira, Viveiros, Maria, Freitas & Isaú 2007), *B. orbignyianus* (Murgas, Miliorini et al., 2004; Maria et al., 2006); *P. mesopotamicus* (Miliorini, Murgas, Viveiros, Franciscatto, Silva & Maria 2002) e *P. lineatus* (Franciscatto, Murgas, Miliorini, Silva & Logato 2002), e apresentou taxas de motilidade superiores a 30% na maioria dos estudos, após dois dias de resfriamento.

A Água de Coko em Pó (ACP[®]), desenvolvida pela Universidade Estadual do Ceará (UECE), no Brasil, também foi utilizada como diluidor, durante o resfriamento do sêmen de *Colossoma macropomum* com 31% de taxa de motilidade, após dois dias de resfriamento, avaliados através do CASA (Oliveira 2012).

Objetivou-se, neste estudo, avaliar os efeitos de meios imobilizadores em diferentes osmolalidades sobre a qualidade espermática do sêmen de *Prochilodus lineatus*, resfriado por seis dias. Os meios imobilizadores foram preparados por comutação da osmolalidade (285, 325 e 365 mOsm/kg) e composições (ACP[®] e BTS[®]).

2 Material e Métodos

2.1 Manipulação dos peixes e coleta do sêmen

Todos os peixes foram manipulados de acordo com as diretrizes para a experimentação animal, descrito por Van Zutphen, Baumans & Beynen (2001). Os machos de *P. lineatus* foram selecionados na Estação de Piscicultura da Companhia Energética de Minas Gerais (CEMIG), na cidade de Itutinga

(21°17'36'' S; 44°37'02'' W), Estado de Minas Gerais, Brasil, durante o período de piracema (dezembro de 2012 a janeiro de 2013). Os machos (n=15) que apresentaram sêmen detectável após suave pressão abdominal receberam duas doses intramusculares de extrato de hipófise de carpa (EHC; Argent Chemical Laboratories, Redmond, Washington, EUA) de 0,4 e 4 mg/kg de peso corporal, com um intervalo de 12 horas. Os machos foram retirados dos tanques após 7,5-8 horas, entre 27 e 28°C, de acordo com o método de rotina da estação de piscicultura. A papila urogenital foi seca cuidadosamente e, aproximadamente, 2 mL do sêmen de cada macho foi coletado diretamente em tubos de vidro. A coleta do sêmen foi realizada à temperatura ambiente (~24°C). Imediatamente após a coleta, os tubos contendo sêmen foram mantidos em caixa de isopor (9-11°C), com gelo artificial (Polar Technics CRI Ltd., São Paulo, Brasil). A contaminação do sêmen com água, sangue, fezes ou urina foi evitada.

2.2 Determinação das características do sêmen fresco

Após a coleta, cada amostra de sêmen foi transferida para um microtubo de 2 mL, e posteriormente dividida em duas alíquotas de aproximadamente 1 mL. Uma alíquota do sêmen de cada macho foi colocada em uma caixa de isopor (9-11°C), transportada de carro, por aproximadamente 50 km, para o Laboratório de Tecnologia de Sêmen da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Minas Gerais, Brasil, para posterior avaliação. A concentração espermática (hemacitômetro/câmara de Neubauer, BOECO, Hamburgo, Alemanha) foi determinada. Após a centrifugação do sêmen a 2.000 x g por 10 min (MiniStar, Shanghai, China), a osmolalidade (Semi-Micro Osmometer K-7400, Knauer, Berlin, Alemanha) e pH (Digimed DM-22-V1.0, São Paulo, Brasil) do plasma seminal foram mensurados. As características do sêmen foram

avaliadas à temperatura ambiente (~25°C). A outra alíquota foi utilizada para o resfriamento (ver item abaixo)

2.3 Composição do meio imobilizador e osmolalidade

Seis meios imobilizadores (diluentes), compreendendo combinações de Água de Coco em Pó (ACP®; ACP Biotecnologia, Fortaleza, Ceará, Brasil) ou Beltsville Thawing Solution (BTS®, Minitub®, Hauptstrasse/Tiefenbach, Alemanha) foram preparados de acordo com a osmolalidade da fórmula padrão e, por meio de uma regra de três simples foram estipulados e ajustados (mediante tentativa e erro) os meios, através da adição de água destilada, até a obtenção das osmolalidades desejadas (285, 325 e 365 mOsm/kg). Cada 100 g de ACP® contém 76 g de carboidratos, 4 g de gorduras totais e 0,88 g de minerais, vitaminas e aminoácidos. Cada 100 g de BTS® contém 79,9 g de glicose, 12,7 g citrato de sódio, 2,65 g de EDTA, 2,65 g de NaHCO₃, 1,59 g de KCl e 0,5 g de sulfato de gentamicina. Os valores do pH situaram-se entre 7,6 e 7,7. Todos os meios imobilizadores foram armazenados em refrigerador, entre 6 e 8°C, e usados dentro de 48 horas. O sêmen de cada macho foi diluído 1:10 (100 µL sêmen: 900 µL meio) em cada um dos seis meios, diretamente em microtubos de 2 mL. Após a diluição, o restante do sêmen fresco, aproximadamente 1 mL, foi mantido não diluído e serviu como controle. Em seguida, todas as amostras de sêmen foram transportadas da CEMIG para a UFLA como descrito para o sêmen fresco, e armazenado em um refrigerador entre 6 e 8°C por seis dias.

2.4 Avaliação da qualidade do sêmen após o resfriamento

A qualidade espermática foi avaliada aos dias zero, dois, quatro e seis de resfriamento, utilizando-se o software Sistema Computadorizado de Análise de Sêmen (CASA 2010, Microptics, Versão 5.1 SL, Barcelona, Espanha). Aproximadamente 30 minutos antes do início das análises, as amostras de sêmen foram retiradas do refrigerador e mantidas à temperatura ambiente. É importante restabelecer a temperatura antes da análise do sêmen, pois, a baixa temperatura reduz a taxa metabólica do espermatozoide, e dessa forma a motilidade e velocidades são subestimadas após a ativação (dados não publicados). Pela mesma razão, o meio ativador foi mantido em banho de água a 26-29°C, durante as análises.

A motilidade foi ativada em meio de NaCl a , aproximadamente, 98 mOsm/kg diretamente em uma câmara de contagem Makler[®] (Sefi-Medical Instruments Ltd, Haifa, Israel), colocada sob um microscópio de contraste de fase (Nikon Eclipse E200[®], Tóquio, Japão), em 100 x de ampliação com um filtro verde e posição pH 1. O microscópio foi conectado a uma câmera de vídeo (Basler Vision Technologies[®] A602FC, Ahrensburg, Alemanha), gerando 100 imagens/s; a gravação do vídeo começou após 10 segundos da ativação. Cada imagem foi analisada, utilizando as configurações do CASA[®], padrão para peixes, adaptada de acordo com o método de rotina do laboratório, para avaliar a qualidade do sêmen de *P. lineatus* (Viveiros, Nascimento et al., 2010). Embora o CASA avalie simultaneamente mais de 15 parâmetros espermáticos, por brevidade, apenas taxa de motilidade e velocidades curvilínea (VCL), linear (VSL) e média de percurso (VAP) foram mensurados. Para se determinar esses parâmetros, cada espermatozoide (~838 espermatozoides/campo) foi seguido, individualmente, ao longo das imagens e a sua trajetória, calculada. Foram considerados os seguintes valores mínimos de qualidade do sêmen, para

aplicações práticas, após o resfriamento: 30% de taxa motilidade espermática (Marques & Godinho 2004) e VCL de 50 $\mu\text{m/s}$.

2.4 Análises Estatísticas

Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão (DP). As análises estatísticas foram realizadas ,utilizando-se o programa computacional Statistica 7.1[®] (Statsoft 2003). A motilidade e velocidades espermáticas foram testadas para a distribuição normal, utilizando-se o procedimento multivariado. A significância estatística foi testada por análise de variância ANOVA, seguido do teste de Tukey. O nível de significância, para todos os testes estatísticos foi de 5% ($P < 0,05$).

3 Resultados

3.1 Características do sêmen fresco

O sêmen fresco dos 15 machos, utilizados neste estudo, possuía uma média de $24,7 \times 10^9$ espermatozoides/mL; o plasma seminal apresentou uma osmolalidade de 235 mOsm/kg ,com um pH de 8,50 (Tabela 1).

Tabela 1. Peso corporal e algumas características do sêmen fresco de *Prochilodus lineatus* (n = 15 machos; média \pm DP; mínimo – máximo valores) ,após tratamento com extrato de hipófise de carpa.

Parâmetros	Média \pm DP	Min – Máx
Peso corporal (kg)	1,4 \pm 0,5	0,7 – 2,8
Concentração (espermatozoides x 10 ⁹ /mL)	24,7 \pm 3,7	20,1 – 30,2
Osmolalidade do plasma seminal (mOsm/kg)	235 \pm 15	220 – 252
pH do plasma seminal	8,50 \pm 0,12	8,22 – 8,77
Taxa de motilidade espermática (%)	75 \pm 12	62 – 95
Velocidade curvilinear (VCL; μ m/s)	176 \pm 48	108 – 285
Velocidade linear (VSL; μ m/s)	97 \pm 37	49 – 151
Velocidade média de percurso (VAP; μ m/s)	144 \pm 51	77 – 245

3.2 Avaliação da qualidade espermática após o resfriamento

A qualidade do sêmen após zero, dois, quatro e seis dias de resfriamento foi influenciada ($P < 0,05$) pelo meio imobilizador, mas não pela osmolalidade. O sêmen armazenado em meios imobilizadores com osmolalidades, variando de 285 a 365 mOsm/kg, produziu resultados semelhantes (Tabela 2).

Tabela 2. Taxa de motilidade e velocidades espermáticas (média \pm DP) do sêmen de *Prochilodus lineatus* (n = 15 machos) diluído em dois meios imobilizadores (ACP[®] e BTS[®]) e em três osmolalidades (285, 325 e 365 mOsm/Kg), refrigerados entre 6 e 8°C por seis dias.

Meio imobilizador		Resfriamento (dias)			
Composição	Osmolalidade	0	2	4	6
		Taxa de motilidade (%)			
ACP [®]	285	91 \pm 6	20 \pm 7	11 \pm 2	9 \pm 4
	325	82 \pm 12	20 \pm 6	12 \pm 2	8 \pm 1
	365	83 \pm 8	19 \pm 5	12 \pm 2	8 \pm 3
BTS [®]	285	93 \pm 5	43 \pm 12	23 \pm 6	17 \pm 5
	325	90 \pm 7	42 \pm 12	25 \pm 8	18 \pm 4
	365	88 \pm 8	36 \pm 13	20 \pm 6	15 \pm 4
Controle		75 \pm 12	48 \pm 23	33 \pm 21	33 \pm 21
		Velocidade curvilinear (VCL; μ m/s)			
ACP [®]	285	221 \pm 34	96 \pm 21	72 \pm 11	44 \pm 13
	325	180 \pm 34	88 \pm 16	69 \pm 7	42 \pm 5
	365	180 \pm 28	88 \pm 10	70 \pm 9	44 \pm 14
BTS [®]	285	244 \pm 42	134 \pm 23	104 \pm 23	88 \pm 17
	325	239 \pm 36	138 \pm 30	103 \pm 18	92 \pm 15
	365	224 \pm 43	120 \pm 24	87 \pm 18	77 \pm 15
Controle		176 \pm 48	179 \pm 52	148 \pm 70	159 \pm 60
		Velocidade linear (VSL; μ m/s)			
ACP [®]	285	98 \pm 17	34 \pm 13	16 \pm 6	6 \pm 4
	325	91 \pm 22	30 \pm 11	16 \pm 7	7 \pm 4
	365	93 \pm 22	31 \pm 9	17 \pm 6	6 \pm 5
BTS [®]	285	107 \pm 17	55 \pm 11	40 \pm 12	30 \pm 11
	325	110 \pm 17	62 \pm 12	43 \pm 13	31 \pm 11
	365	112 \pm 19	55 \pm 18	33 \pm 15	24 \pm 13
Controle		97 \pm 37	77 \pm 24	67 \pm 37	71 \pm 26
		Velocidade média de percurso (VAP; μ m/s)			
ACP [®]	285	190 \pm 32	68 \pm 24	35 \pm 12	15 \pm 6
	325	159 \pm 40	56 \pm 19	33 \pm 8	16 \pm 5
	365	153 \pm 27	58 \pm 13	32 \pm 9	15 \pm 9
BTS [®]	285	207 \pm 37	107 \pm 23	76 \pm 26	57 \pm 21
	325	208 \pm 34	115 \pm 30	75 \pm 22	60 \pm 19
	365	193 \pm 42	95 \pm 26	56 \pm 22	43 \pm 18
Controle		144 \pm 51	151 \pm 53	120 \pm 74	134 \pm 61

Sêmen não diluído foi usado com controle. ACP[®]- Água de Coco em Pó; BTS[®] - Beltsville Thawing Solution[®].

A taxa de motilidade espermática foi menor ($P < 0,05$), no dia zero (ACP[®] = 85%; BTS[®] = 90% e controle = 75%), em relação ao dia seis (ACP[®] = 8%; BTS[®] = 17% e controle = 33%), após o resfriamento do sêmen. Nas amostras diluídas, a motilidade foi superior ($P < 0,05$; ACP[®] = 85% e BTS[®] = 90%) comparadas àquelas não diluídas (controle; 75%), no dia zero de resfriamento. Contudo, no dia dois pós-resfriamento, a taxa de motilidade das amostras diluídas em ACP[®] foi inferior ($P < 0,05$; 20%) a das amostras diluídas em BTS[®] (40%) e controle (48%). Nos dias quatro e seis, a taxa de motilidade espermática do sêmen controle (33%) foi superior ($P < 0,05$) às das amostras diluídas (ACP[®] = 8% e BTS[®] = 17%).

Nas amostras diluídas, as velocidades reduziram-se rapidamente ($P < 0,05$), do dia zero (ACP[®]: VCL = 194 $\mu\text{m/s}$, VSL = 94 $\mu\text{m/s}$ e VAP = 167 $\mu\text{m/s}$; BTS[®]: VCL = 236 $\mu\text{m/s}$, VSL = 110 $\mu\text{m/s}$ e VAP = 203 $\mu\text{m/s}$), para o dia seis (ACP[®]: VCL = 43 $\mu\text{m/s}$, VSL = 6 $\mu\text{m/s}$ e VAP = 15 $\mu\text{m/s}$; BTS[®]: VCL = 86 $\mu\text{m/s}$, VSL = 28 $\mu\text{m/s}$ e VAP = 53 $\mu\text{m/s}$), após o resfriamento do sêmen. Diferente das amostras diluídas, o sêmen controle manteve velocidades espermáticas semelhantes ($P > 0,05$; dia zero: VCL = 176 $\mu\text{m/s}$; VSL = 97 $\mu\text{m/s}$ e VAP = 144 $\mu\text{m/s}$; dia seis: VCL = 159 $\mu\text{m/s}$; VSL = 71 $\mu\text{m/s}$ e VAP = 134 $\mu\text{m/s}$), durante os seis dias do resfriamento (Figura 1).

Para facilitar a descrição e a discussão dos resultados, os dados relativos à osmolalidade foram reunidos por composição do meio e por dia de análise (Figura 1).

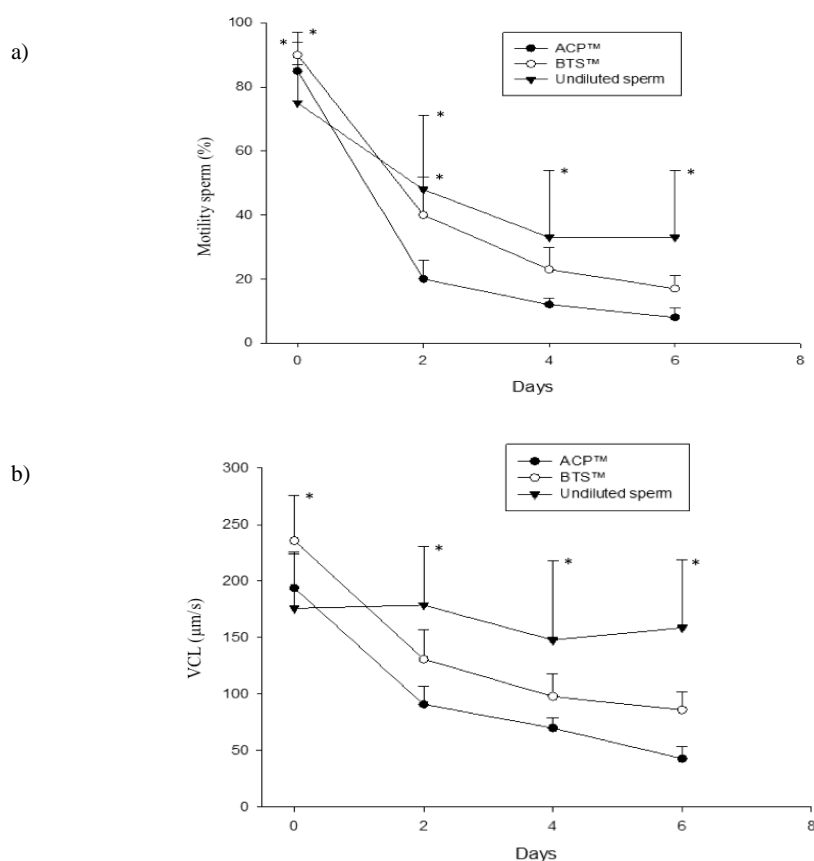


Figura 1. Taxa de motilidade (a) e velocidade curvilinear (VCL; b) do sêmen de *Prochilodus lineatus* (n = 15 machos), diluído em dois meios imobilizadores (ACP® e BTS®) e refrigerados entre 6 e 8°C, por seis dias. Sêmen não diluído foi usado como controle (triângulos fechados). Cada ponto e barra de erro são representados por médias \pm DP de 15 machos. *Médias seguidas por asterisco são maiores que as outras (P < 0,05; teste de Tukey). ACP® - Água de Coco em Pó; BTS® - Beltsville Thawing Solution.

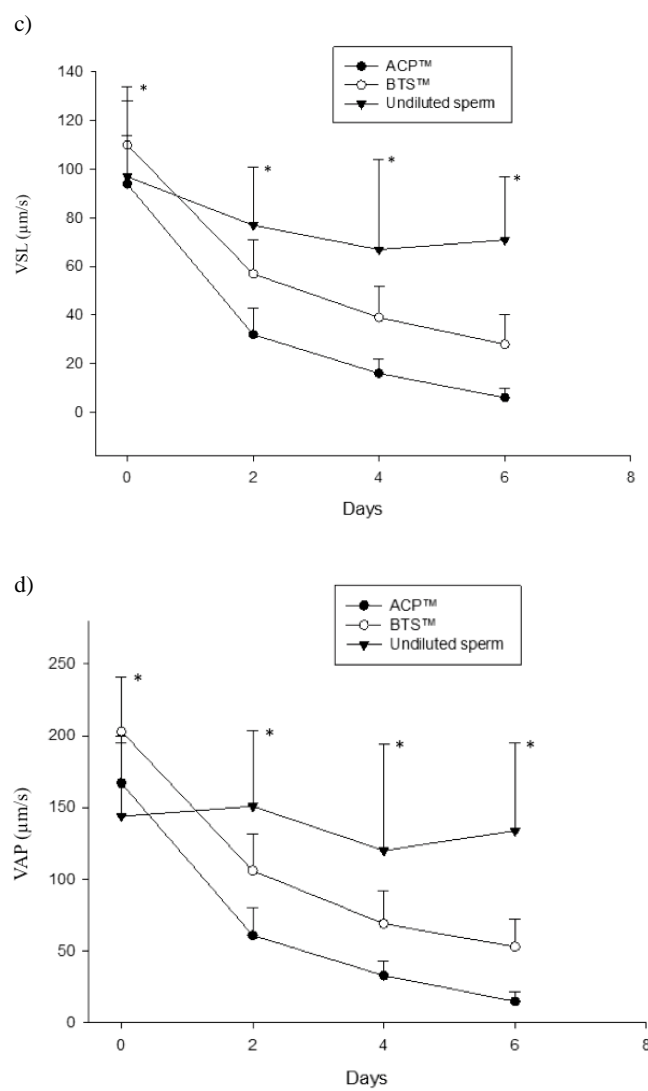


Figura 2. Velocidades linear (VSL; c) e média de percurso (VAP; d) do sêmen de *Prochilodus lineatus* (n = 15 machos), diluído em dois meios imobilizadores (ACP® e BTS®) e refrigerados entre 6 e 8°C, por seis dias. Sêmen não diluído foi usado como controle (triângulos fechados). Cada ponto e barra de erro são representados por médias \pm DP de 15 machos. *Médias seguidas por asterisco

são maiores que as outras ($P < 0,05$; teste de Tukey). ACP[®] - Água de Coco em Pó; BTS[®] - Beltsville Thawing Solution.

4 Discussão

No presente estudo, foram avaliadas a motilidade e velocidades espermáticas, analisadas por meio do CASA, sendo que os resultados variaram, de acordo com a composição dos meios imobilizadores e o tempo de duração do resfriamento do sêmen de *P. lineatus*.

Alguns estudos avaliaram os efeitos da osmolalidade do diluidor na supressão da motilidade espermática do sêmen. Em solução de NaCl, a motilidade espermática foi suprimida em osmolalidade entre 196-392 mOsm/kg em *Brycon orthotaenia* (Melo & Godinho 2006); entre 410-547 mOsm/kg em *Brycon insignis* (Shimoda, Andrade, Vidal Jr., Yasui, Silva, Godinho & Souza 2007), a 325 mOsm/kg em *Brycon opalinus* (Orfão, Nascimento, Corrêa, Cosson & Viveiros 2011) e a 450 mOsm/kg em *C. macropomum* (Carneiro, Azevedo, Santos & Maria 2012). Em solução de glicose, a motilidade espermática foi suprimida entre 410-620 mOsm/kg em *Prochilodus magdalenae* (Martinez, Garcia et al., 2011) e a 325 mOsm/kg em *Brycon opalinus* (Orfão et al., 2011). Em NaHCO₃, a motilidade espermática foi suprimida a 450 mOsm/kg em *C. macropomum* (Carneiro, Azevedo et al., 2012). Em solução de NaCl, glicose e BTS[®], a motilidade espermática foi suprimida entre 360-450 mOsm/kg em *P. lineatus*, e entre 270-450 mOsm/kg em *B. orbignyanus* (Gonçalves, Nascimento et al., 2013). Este é o primeiro estudo sobre o efeito da osmolalidade, utilizando ACP[®] e o BTS[®] como meios imobilizadores, de sêmen submetido ao resfriamento.

As osmolalidades dos meios imobilizadores avaliados neste estudo, não influenciaram ($P > 0,05$) a motilidade e velocidades espermáticas do sêmen de *P. lineatus*. Os valores da osmolalidade do plasma seminal desses animais (220 a 252 mOsm/kg) foram inferiores ao relatado na literatura de 306 mOsm/kg (Nascimento, Gonçalves, Reis, Neto, Leal e Viveiros 2012) e 276 a 346 mOsm/kg (Gonçalves, Nascimento et al. 2013). Ainda, a osmolalidade do

plasma seminal foi inferior à dos meios (285 a 365 mOsm/kg). Em estudo anterior, a motilidade espermática de *P. lineatus* foi suprimida ,quando em contato com soluções em osmolalidade, a partir de 360 mOsm/kg, independente do diluidor utilizado (NaCl, glicose e BTS[®]; (Gonçalves, Nascimento et al. 2013). Quando este estudo foi realizado, havia sido apenas publicado o trabalho de Nascimento et al. (2012), relatando valores de supressão espermática nessa espécie. Assim, foram estipulados valores de osmolalidade baseados no estudo de Nascimento et al. (2012), em que as faixas de osmolalidade foram próximas a 300 mOsm/kg, consideradas como valores supressores da motilidade espermática em peixes teleósteos de água doce (Morisawa & Suzuki 1980).

A taxa de motilidade (Viveiros, Nascimento et al., 2010) e velocidades espermáticas (VCL, VSL e VAP) têm sido associadas com boas taxas de fertilização em peixes (Rurangwa, Volckaert, Huyskens, Kime & Ollevier 2001). Neste estudo, as velocidades espermáticas do sêmen controle foram superiores ($P < 0,05$) para *P. lineatus*, no dia 2 (VCL: 179 $\mu\text{m/s}$; VSL: 77 $\mu\text{m/s}$ e VAP: 151 $\mu\text{m/s}$), em relação ao dia 6 (VCL: 159 $\mu\text{m/s}$; VSL: 71 $\mu\text{m/s}$ e VAP: 134 $\mu\text{m/s}$) do resfriamento. Houve diferenças ($P < 0,05$) nas velocidades espermáticas, de acordo com o meio imobilizador, assim como esses valores das análises variaram com o tempo. As velocidades espermáticas do sêmen controle de *P. lineatus* resfriado por quatro dias, neste estudo, foram superiores às velocidades do sêmen de *C. macropomum* diluído ou controle, após dois dias de resfriamento (Oliveira 2012; Tabela 3).

Tabela 3. Relatos da qualidade do sêmen de espécies de peixes Characiformes, submetidos à refrigeração. Somente tratamentos que apresentaram taxa de motilidade acima de 30% foram considerados.

Espécie	Meio imobilizador		Armazenagem (dias)	Motilidade (%)	Vigor (0 a 5)	Velocidades ($\mu\text{m/s}$)			Referência
	Composição	mOsm				VCL	VSL	VAP	
<i>Brycon nattereri</i>	NaCl	285	3	49 ± 15^s	-	-	-	-	Oliveira et al., 2007
	NaCl	404	3	48 ± 17^s	-	-	-	-	
	NaCl - Tris	429	3	39 ± 19^s	-	-	-	-	
	BTS [®]	318	7	48 ± 6^s	-	-	-	-	
	Controle	-	3	39 ± 20^s	-	-	-	-	
<i>Brycon insignis</i>	Androstar [®]	282 - 362	2	67 ± 11^s	$3,3 \pm 0,8$	-	-	-	Amaral, 2009
	Controle	348 - 395	2	44 ± 26^s	$2,3 \pm 1,1$	-	-	-	
<i>Brycon orbignyianus</i>	NaCl - Tris	428	4	34 ± 10^s	-	-	-	-	Viveiros et al., 2010
	Controle	-	2	68 ± 4^s	-	-	-	-	
	NaCl	404	7	37 ± 6^s	-	-	-	-	Maria et al., 2006
	NaCl - Tris	429	7	40 ± 10^s	-	-	-	-	
	BTS [®]	318	3	43 ± 6^s	-	-	-	-	
	M III [®]	348	3	47 ± 11^s	-	-	-	-	
<i>Colossoma macropomum</i>	ACP [®]	310	2	31 ± 1^c	-	43 ± 1	27 ± 1	$36 \pm 0,5$	Oliveira, 2012
	Controle	-	2	65 ± 2^c	-	71 ± 4	34 ± 2	51 ± 3	
<i>Prochilodus lineatus</i>	BTS [®]	285 - 365	2	40 ± 12^c	-	131 ± 26	57 ± 14	106 ± 26	Presente
	Controle	220 - 252*	4	33 ± 21^c	-	159 ± 60	71 ± 26	134 ± 61	estudo

NaCl	285	2	56 ± 2 ^c	-	-	-	-	Orfão et al., 2010
NaCl	404	2	44 ± 9 ^c	-	-	-	-	
Glicose	277	2	57 ± 11 ^c	-	-	-	-	
BTS [®]	332	4	81 ± 7 ^c	-	-	-	-	
M III [®]	367	4	71 ± 12 ^c	-	-	-	-	
Androstar [®]	311	4	75 ± 4 ^c	-	-	-	-	

ACP[®] - Água de Coco em Pó, ACP Biotecnologia (carboidratos, gordura total, minerais, vitaminas e aminoácidos);

BTS[®] - Beltsville Thawing Solution, Minitub[®] (glicose, citrato de sódio, EDTA, NaHCO₃, KCl e sulfato de gentamicina);

M III[®] - Merck III, Minitub[®] (glicose, citrato de sódio, EDTA, NaHCO₃ e sulfato de gentamicina);

Androstar[®] - Minitub[®] (glicose, citrato de sódio, EDTA, NaHCO₃, Tris e sulfato de gentamicina);

A taxa de motilidade foi avaliada subjetivamente em microscópio de luz, a menos quando seguido por ^C (Sistema Computadorizado de Análise de Sêmen - CASA);

A escala do vigor espermático foi atribuída através de um sistema de classificação arbitrário de zero (sem movimento), a cinco (espermatozoide nadando rapidamente);

* A osmolalidade do sêmen não diluído foi medida no plasma seminal obtido após centrifugação, e, nas demais amostras, foi regulada a osmolalidade dos diluidores

Neste estudo, a taxa de motilidade espermática no dia 0 do sêmen controle foi de 75% e, quando diluído, de 85% para ACP[®] e 90% para BTS[®]. A duração da qualidade espermática e habilidade de fertilização, considerando a motilidade espermática mínima de 30%, variou de dois a seis dias, em sêmen de *P. lineatus*.

O sêmen diluído em ACP[®] apresentou taxa de motilidade espermática superior ($P < 0,05$) a 30% no dia 0, embora diminuísse para 20% na avaliação seguinte. Esse resultado é inferior à taxa de motilidade espermática de 31% do sêmen de *C. macropomum* diluído em ACP[®] e resfriado por dois dias (Oliveira 2012). No entanto, superior à taxa de motilidade espermática de 8% do sêmen de *B. orbignyanus*, diluído em água de coco comercial e resfriado também por um dia (Maria, Viveiros et al., 2006). A ACP[®] foi desenvolvida a fim de facilitar a utilização da água de coco como diluente (Salgueiro, Nunes, Oliveira, Vieira, Gondim & Mateos-Rex 2002) e após a sua ressuspensão apresente características bioquímicas similares àquelas da água de coco *in natura*. Normalmente, durante o período do resfriamento, os parâmetros espermáticos são afetados, principalmente devido à presença de bactérias (Rurangwa, Kime, Ollevier & Nasha 2004) que produzem enzimas extracelulares e consomem o oxigênio (Jenkins & Tiersch 1997). O uso de antibióticos pode prolongar o tempo de armazenamento do sêmen, por reduzir o crescimento bacteriano. Porém, na composição da ACP[®] não há adição de antibióticos, isso pode favorecer um possível desenvolvimento de bactérias e, conseqüentemente, baixas taxas de motilidade e velocidades espermáticas, como verificadas neste experimento (Figura 1). Portanto, uma concentração adequada de antibacteriano deve ser utilizada, para prevenir o desenvolvimento de bactérias e assim, haver sucesso durante o resfriamento de sêmen.

O BTS[®] é um diluidor comercial desenvolvido para conservar sêmen suíno, e tem sido utilizado com sucesso em estudos, como meio imobilizador

espermático para o sêmen de algumas espécies de peixes nativas, durante o resfriamento. Em amostras de sêmen diluídas em BTS[®], a taxa de motilidade espermática foi mantida em 40%, após dois dias de resfriamento. Esse resultado foi inferior ao encontrado por Orfão, Maria et al., (2010), durante o resfriamento de sêmen em *P. lineatus*, onde a taxa de motilidade espermática foi de 81%, após quatro dias de resfriamento. Outros autores também reportaram-se a valores superiores de motilidade espermática no sêmen de outras espécies da ordem Characiformes, quando diluído em BTS[®] (Murgas, Miliorini et al., 2004; Maria, Viveiros et al., 2006 e Oliveira, Viveiros et al., 2007; Tabela 4). BTS[®] contém sulfato de gentamicina em sua fórmula; e foi demonstrado que 92% das populações bacterianas, em sêmen de *B. orbignyana*, são susceptíveis à gentamicina (Viveiros, Isaú, Figueiredo, Leite & Maria 2010).

A diminuição das taxas de motilidade espermática do sêmen diluído, observada neste estudo, pode ter sido influenciada pela proporção da diluição do plasma seminal nas amostras. A taxa de diluição, utilizada neste estudo (1 sêmen:10 meio) ,foi também utilizada em sêmen resfriado de *B. nattereri* (Oliveira, Viveiros et al., 2007), *B. insignis* (Amaral 2009), *B. orbignyana* (Viveiros, Isaú et al., 2010) e *P. lineatus* (Orfão, Maria et al., 2010), no entanto mantiveram-se taxas de motilidade espermática superior a 30%, por um maior tempo durante as avaliações. Oliveira (2006) avaliou o sêmen de *Salminus maxillosus* diluído em três diferentes proporções de diluição do sêmen (1:2, 1:5 e 1:10),e observou que, no dia um, o sêmen diluído em proporção de 1:2 e 1:5 apresentou melhores taxas de motilidade espermática (60 e 48%, respectivamente), e, para o dia dois, quando diluído em proporção de 1:2 apresentou 30% de motilidade espermática.

O plasma seminal tem papel importante na manutenção da viabilidade espermática durante a estocagem, uma vez que possui um sistema antioxidante, que previne os danos causados pelos radicais livres, sob condições fisiológicas

normais. No entanto, somente o sistema antioxidante celular não previne a peroxidação lipídica, particularmente durante a estocagem *in vitro*, pois a produção de radicais livres pode ser resultante de mudanças metabólicas (Sikka 2004). A excessiva diluição reduz a concentração de proteínas, antioxidante natural, além de outros componentes requeridos para a função normal e integridade da membrana plasmática, apresentando, dessa forma, um efeito negativo sobre a sobrevivência espermática *in vitro* (Balercia, Armeni, Mantero, Principato & Regoli 2005).

5 Conclusões

Os meios imobilizadores nas osmolalidades testadas neste estudo não mantiveram a qualidade espermática do sêmen, durante o resfriamento. Considerando os parâmetros mínimos de qualidade de sêmen estabelecidos de 30% de taxa de motilidade e VCL de 50 μ m/s, o sêmen de *Prochilodus lineatus* pode ser armazenado sob refrigeração, sem diluição, por seis dias. Diferentes osmolalidades de ACP[®] e BTS[®] superiores a 365 mOsm/kg devem ser avaliadas, para verificar a influência sobre a qualidade espermática. Outros meios imobilizadores e taxas de diluição devem ser testados em *P. lineatus* para o resfriamento de sêmen, buscando maiores tempos de armazenamento e a manutenção da capacidade fertilizante.

Referências

Alavi S.M.H. & Cosson J. (2006) Sperm motility in fishes. II. Effects of ions and osmolality. *Cell Biol Int* **30**, pp. 1-14.

Amaral, T.B. (2009) *Resfriamento e criopreservação de sêmen do peixe teleósteo piabanha Brycon Insignis*. Dissertação de Mestrado em Zootecnia. Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brazil, pp. 61. (in Portuguese, with English abstract).

Bonetto A.A. (1994) *Austral rivers of South America*. In: R. Margalef, editor. *Limnology now: a paradigm of planetary problems*. New York: Elsevier Science 425–72.

Carneiro P.C.F., Azevedo H.C., Santos J.P. & Maria A.N. (2012) Cryopreservation of tambaqui (*Colossoma macropomum*) semen: extenders, cryoprotectants, dilution ratios and freezing methods. *CryoLetters* **33**, 385-393.

Carolsfeld J. & Harvey B. (1999) Conservação de recursos genéticos de peixes: teoria e prática. In: CURSO de treinamento brasileiro. Victoria, Canadá: *World Fisheries Trust*, pp. 47.

Franciscatto R.T., Murgas L.S.D., Miliorini A.B., Silva M.O.B. & Logato P.V.R. (2002) Qualidade do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) e taxa de fertilidade após resfriamento a 4°C. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* **26**, 213–215.

Gonçalves A.C.S., Nascimento A.F., Costa A.C., Leal M.C. & Viveiros A.T.M. (2013) Initiation and suppression of sperm motility is osmolality-dependent in two South American fish species: streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) and piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). *Animal Reproduction* **10**, n.1, 62-70.

Jenkins J.A. & Tiersch T.R. (1997) A preliminary bacteriological study of refrigerated channel catfish sperm. *Journal World Aquaculture Society* **28**, 282–288.

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

Marques S. & Godinho H.P. (2004) Short-term cold storage of sperm from six neotropical Characiformes fishes. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **47**, 799-804.

Martínez G., García V.A. & Carrasco S.P. (2011) Effect of glucose concentration on sperm motility activation in bocachico *Prochilodus magdalenae* (Pisces, Characiformes). *Rev MVZ Cordoba* **16**, 2554-2563.

Melo F.C.S.A & Godinho H.P. (2006) A protocol for cryopreservation of spermatozoa of the fish *Brycon orthotaenia*. *Animal Reproduction* **33**, 380-385.

Miliorini A.B., Murgas L.D.S., Viveiros A.T.M., Franciscatto R.T., Silva M.O.B. & Maria A.N. (2002) Resfriamento do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) a 4°C, utilizando diferentes concentrações de dimetilsulfóxido. With English abstract. *Rev Bras Reprod Anim* **26**, 209–211.

Morisawa M. & Suzuki K. (1980) Osmolality and potassium ion: their roles in initiation of sperm motility in teleost. *Science* **210**, 1145-1147.

Murgas L.D.S., Miliorini A.B., Franciscatto R.T. & Maria A.N. (2004) Spermatic viability of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen cooled at 4°C. *Brazilian Journal Animal Science* **33**, 1361-1365.

Nascimento A.F, Gonçalves A.C.S., Reis Neto R.V., Leal M.C., Viveiros A.T.M. (2012) Extender composition, osmolality, cryoprotectant and equilibration time effects on fresh sperm motility of two Characiformes fish: piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) and streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*). *Animal Reproduction* **9**, 103-110.

Oliveira, A.V. (2006) *Resfriamento e criopreservação de sêmen de dourado *Salminus maxillosus* e de pirapitinga *Brycon nattereri**. Dissertação de Mestrado em Zootecnia. Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brazil, pp. 94. (in Portuguese, with English abstract).

Oliveira A.V., Viveiros A.T.M., Maria A.N., Freitas R.T.F. & Isaú Z.A. (2007) Sucesso do resfriamento e congelamento de sêmen de pirapitinga *Brycon nattereri*. With abstract in English. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia* **59**, 1509-1515.

Oliveira F.C.E. (2012) Resfriamento do sêmen de *Colossoma macropomum* em água de coco em pó (ACP-104) associada à crioprotetores - estudo de toxicidade. Dissertação de Mestrado em Zootecnia. Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brazil, 66 pp (in Portuguese, with English abstract).

Orfão L.H, Maria A.N, Nascimento A.F, Isaú Z.A. & Viveiros A.T.M. (2010) Sperm fertility of the subtropical freshwater streaked prochilod *Prochilodus lineatus* (Characiformes) improved after dilution and cold storage. *Aquaculture Research* **41**, 679-687.

Orfão L.H., Nascimento A.F., Corrêa F.M., Cosson J. & Viveiros A.T.M. (2011) Extender composition, osmolality and cryoprotectant effects on the motility of sperm in the Brazilian endangered species *Brycon opalinus* (Characiformes). *Aquaculture* **311**, 241-247.

Rurangwa E., Kime D.E, Ollevier F. & Nasha J.P. (2004) The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture* **234**, 1–28.

Rurangwa E., Volckaert F.A., 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 gariepinus*). *Theriogenology* **55**, 751–69.

Salgueiro C.C.M., Nunes J.F., Oliveira K.P.L., Vieira V.L., Gondim J.M. & Mateos-Rex E. (2002) Utilização de diluentes à base de água de coco *in natura* e em pó na inseminação artificial programada de cabras. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* **5**, p. 96-98.

Shimoda E., Andrade D.R., Vidal Jr. M.V., Yasui G.S., Silva J.F.S., Godinho H.P. & Souza G. (2007) Efeito da osmolaridade sobre a motilidade espermática na piabanha *Brycon insignis*. *Revista Ceres* **54**, 430-433.

Sikka S.C. (2004) Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. *Journal Andrology* **25**, 5-18.

Statsoft Inc. (2003) *Statistica: livro base (data analylis software system, version 7.1.)*. São Caetano do Sul, Brazil. Copyright Statsoft, pp. 142.

Stoss J. *Fish gamete preservation and spermatozoan physiology*. In: Hoar W.S., Randall D.J., Donaldson E.M. (Ed.). *Fish physiology*. Orlando: Academic, 1983. p. 305-350.

Van Zutphen L.F., Baumans V. & Beynen A.C. (2001) *Principles of Laboratory Animal Science*. Revised edition. Amsterdam: Elsevier, pp. 428.

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

Viveiros A.T.M., Isaú Z.A., Figueiredo H.C.P., Leite A.M.S. & Maria A.N. (2010) Gentamycin controls bacterial growth during refrigerated storage of piracanjuba, *Brycon orbignyanus*, semen. *Journal of the World Aquaculture Society* **41**, no. S1, 57-65.

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

(VERSÃO PRELIMINAR DO ARTIGO)