

**Caracterização e resfriamento do sêmen de curimatã, *Prochilodus brevis*
(Steindachner, 1874)**

Angelita Costa da Silva¹, José Agenor Soares Galvão², Erivânia Gomes Teixeira³,
Wladimir Ronald Lobo Farias⁴.

Abstract: The *Prochilodus genus* is present in South America, being quite found in Brazilian basins. The aim of this study was to characterize the cryopreserved sperm *P. brevis* through analysis of physical and chemical parameters of the seminal fluid, the time of sperm motility and the effect of cooling on the morphology of the sperm, and performs tests cooling seminal fluid. Adult organisms were used, weighing on average 295.5 ± 65.9 g and length of 29.0 ± 2.3 cm. The seminal volume collected had a mean of 1.55 ± 0.86 mL. For the average sperm concentration was $1.5 \pm 0.3 \times 10^7$ spz mL⁻¹, while the average pH was 7.9 ± 0.2 . The osmolarity of sperm was 287.9 ± 48.5 mOsm/kg and the rate of sperm motility of sperm average fish was 63 ± 1.6 s. The osmolarity of sperm was 287.9 ± 48.5 mOsm /kg and the average rate of sperm motility of fish was 63 ± 1.6 s. About the morphology of sperm, 86.7% didn't show anomalies. The anomalies were found (A) defect in the anterior region of the sperm (irregularity of the membrane) and the intermediate section with a change in shape with 2.5%; (B) intermediate piece shaped corkscrew 3.0%; (C) intermediate part and tail curled tightly around the head with 1.0% and D) intermediate piece retro-axial position with 6.7% to 13.2% of observed anomalies, occurring statistically significant difference ($p > 0.05$)

between the amounts of morphological abnormalities. Calcium ions, chloride and magnesium present mean concentrations of 10.11 ± 0.03 mg / dL, 99.93 ± 0.60 mg / dL and 1.99 ± 0.01 mg/ dL, respectively. Regarding thinners, Ringer's solution showed a significant result after 21 h of cooling ($50 \pm 23.0\%$), whereas glucose ($0 \pm 0\%$), Sucrose ($0 \pm 0\%$) and NaCl ($0 \pm 0\%$) were not efficient. In conclusion, Ringer's solution is indicated to preserve for longer activity of spermatozoa in the sperm of this species.

Keywords: Teleost fish, thinners, sperm, morphology, parameters.

Caracterização e resfriamento do sêmen de curimatã, *Prochilodus brevis* (Steindachner, 1874)

Resumo: O gênero *Prochilodus* está presente na América do Sul, sendo bastante encontrado nas bacias hidrográficas brasileiras. O objetivo desta pesquisa foi caracterizar o sêmen criopreservado de *P. brevis* por meio da análise de parâmetros físicos e químicos do líquido seminal, do tempo de motilidade espermática e do efeito da refrigeração sobre a morfologia dos espermatozoides, além de realizar testes de resfriamento do líquido seminal. Foram utilizados organismos adultos com média de peso $295,5 \pm 65,9$ g e comprimento de $29,0 \pm 2,3$ cm. O volume seminal coletado dos indivíduos apresentou uma média de $1,55 \pm 0,86$ mL. Para a concentração espermática a média foi de $1,5 \pm 0,3 \times 10^7$ spz mL⁻¹, enquanto o pH médio foi de $7,9 \pm 0,2$. A osmolaridade do sêmen foi de $287,9 \pm 48,5$ mOsm/kg e a média da taxa de motilidade espermática foi de $63 \pm 1,6$ s. Quanto à morfologia dos espermatozoides, 86,7% não apresentaram anomalias. As anomalias encontradas foram (A) defeito na região anterior do espermatozoide (irregularidade da membrana) e peça intermediária apresentando alteração na forma com 2,5%; (B) peça intermediária em forma de saca rolha com 3,0%; (C) peça intermediária e cauda fortemente enrolada ao redor da cabeça com 1,0% e (D) peça intermediária em posição retro-axial com 6,7%, totalizando 13,2% de anomalias

observadas, ocorrendo diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre as quantidades de anormalidades morfológicas. Os íons cálcio, cloreto e magnésio apresentaram concentrações de médias de $10,11 \pm 0,03 \mu\text{g/dL}$, $99,93 \pm 0,60 \mu\text{g/dL}$ e $1,99 \pm 0,01 \mu\text{g/dL}$, respectivamente. Com relação aos diluidores, a solução de Ringer apresentou resultado significativo após 21 h de refrigeração ($50 \pm 23,0\%$), enquanto Glicose ($0 \pm 0 \%$), Sacarose ($0 \pm 0 \%$) e NaCl ($0 \pm 0 \%$) não foram eficientes. Conclui-se portanto que a solução de Ringer é indicada para preservar por maior tempo de refrigeração a atividade dos espermatozóides do sêmen desta espécie.

Palavras-chave: Teleósteos, diluidores, sêmen, morfologia, parâmetros.

Introdução

O gênero *Prochilodus* está presente na América do Sul, sendo bastante encontradas nas bacias hidrográficas brasileiras (SILVA et al., 2005). A reprodução ocorre nas nascentes dos rios durante o período chuvoso (STREIT Jr, 2004). A pesca predatória, principalmente no período do defeso que antecede a desova, coloca em risco suas populações já que as fêmeas encontram-se sexualmente maduras (ARAÚJO; GURGEL; NASCIMENTO, 2003). A espécie é considerada uma das mais importantes

para a pesca comercial brasileira, seja para subsistência ou pesca esportiva, tendo uma maior amplitude na região Norte do país (SILVA et. al., 2005). São reofílicas e podem percorrer vários quilômetros até as áreas de reprodução, onde a desova acontece em águas abertas, durante as cheias no período chuvoso, que se estende de novembro a janeiro, sendo caracterizado pelas altas temperaturas e fotoperíodo bastante longo (RIZZO; GODINHO; SATO, 2003; SANTOS et al., 2008). Quando jovens se alimentam de plâncton e, na fase adulta, possuem um regime

alimentar iliófago ingerindo restos de animais e vegetais (DOURADO, 1981). *Prochilodus lineatus* tem apresentado resultados bastante satisfatórios na piscicultura destacando-se pelo seu baixo nível trófico, sendo aceita para o consumo e bem atrativa na pesca esportiva (CROUX, 1992). Segundo DOURADO (1981), os organismos desta espécie não possui nenhum cuidado parental em relação aos demais, não defendem território e preferencialmente são localizados nas áreas não marginais dos rios. No Nordeste, o rio São Francisco é uma das principais fontes desse pescado, principalmente para as comunidades ribeirinhas (BAZZOLI, 2003). Na região Norte, nas proximidades de Manaus, a espécie tem sido capturada em elevadas quantidades, resultando em um grande esforço de pesca “quantidade ou o tempo de operações das artes de pesca em uma determinada pescaria” (PETRERE Jr., 1978). Segundo o

Ministério da Pesca e Aquicultura (BRASIL, 2010), a produção de curimatã *Prochilodus brevis* oriunda da pesca continental em 2010 foi de 28.432 toneladas, sendo observado um acréscimo de 1.076 toneladas em relação ao balanço produtivo que foi realizado em 2009. Já na aquicultura continental, a produção em 2010 foi de 5.226 toneladas. Conforme SATO et. al. (2003), cerca de 80% das espécies desse gênero não conseguem se reproduzir naturalmente em cativeiro, sendo necessária a prática da indução hormonal, para as atividades de cultivo. Nos cultivos comerciais de *Prochilodus* são utilizados sistemas intensivos e semi-intensivos. O transporte é um dos fatores que causa maior mortalidade dos juvenis, portanto, é de extrema importância o melhoramento desta etapa para otimizar a cadeia produtiva (GOMES et al., 2003). Uma forma de contribuir para a conservação do curimatã é a preservação de células

reprodutivas o que oferece benefícios tanto ambientais quanto econômicos. Desta forma, as estratégias de recuperação da ictiofauna de corpos d'água que passaram por um processo de deterioração podem ser grandemente auxiliadas por sêmen coletado num período anterior e armazenado sob baixas temperaturas (RANA, 1995). As técnicas de refrigeração e a criopreservação do sêmen de peixes envolvem uma combinação de soluções diluidoras que inibem a motilidade espermática, prolongando a qualidade do sêmen (PEÑARANDA et. al., 2010). Esses métodos de preservação são aplicados em curto prazo e estão sendo utilizados para várias espécies de peixes, principalmente os de piracema, que necessitam de indução hormonal para sua reprodução (MENEZES et. al., 2008; SANCHES; CERQUEIRA, 2011). Além disso, esses métodos são menos estressantes e realmente podem prolongar a viabilidade dos

espermatozóides, garantindo a integridade do sêmen que vai ser utilizado na reprodução artificial (CARNEIRO, 1998-1999). A refrigeração do sêmen possibilita sua estocagem por mais de 10 dias para algumas espécies nativas de interesse comercial, facilitando os trabalhos de rotina dentro de um laboratório de reprodução induzida (CARNEIRO, 1998-1999). Atualmente, trata-se de uma técnica relativamente simples, de baixo custo, que não requer equipamentos sofisticados e pode levar benefícios técnicos e econômicos às estações de piscicultura (HARVEY; KELLEY, 1988). As características seminais são fundamentais para a fertilização artificial (MURGAS et. al., 2011), bem como para o estabelecimento de protocolo de conservação do sêmen. ROUTRAY (2007) confirma que a descrição do fluido espermático é realizada por propriedades físicas como volume,

motilidade e concentração, além das características morfológicas. As informações citadas anteriormente, juntamente com o tempo de motilidade e concentração espermática, são indicadores da qualidade do sêmen no momento da fertilização, para focar as diferentes técnicas de avaliação dos parâmetros reprodutivos (FELIZARDO et al., 2010).

Material e Métodos

Local do experimento e material biológico

O trabalho foi realizado no Centro de Pesquisa em Aquicultura do Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS), localizado em Pentecoste/Ceará, distante cerca de 100 km da capital Fortaleza, bem como, no Laboratório de Bioquímica Marinha (BIOMAR) da Universidade Federal do Ceará (UFC) e no Laboratório de biotecnologia da reprodução de peixes (LBRP) da Universidade Estadual do Ceará – UECE. Foram utilizados 100

exemplares de curimatã, *Prochilodus brevis*, adultos capturados no tanque escavado do DNOCS. Todos os animais utilizados nos experimentos foram submetidos à coleta de parâmetros biométricos, obtendo-se o peso total em balança analógica, precisão de 200 gramas e, o comprimento total, com ictiômetro, precisão de 1 metro, feito artesanalmente de madeira com uma fita métrica.

Indução hormonal

Para induzir a maturação final dos espécimes foi realizada a hipofisacção com extrato de pituitária de carpa de acordo com as seguintes etapas: 1- Os peixes foram capturados e estocados para descanso de seis horas em tanques, com circulação constante de água cuja temperatura média foi de 27 °C; 2- Depois de seis horas, os animais foram pesados e medidos, sendo essas informações essenciais para determinar a quantidade de hipófise usada para cada indivíduo.

As hipófises foram maceradas em um almofariz com pistilo de porcelana, logo depois desse procedimento, foi adicionada uma pequena quantidade de água destilada dentro do recipiente para a diluição da solução de hipófise. Utilizou-se uma seringa de 1 mL para aplicação do extrato hipofisário.

Após seis horas de descanso, os animais foram capturados com auxílio de puçá e colocados sobre bancadas protegidas por uma camada de espuma para evitar injúrias. Aplicou-se a primeira dosagem (10%) de solução de hipófise, na base da nadadeira peitoral. Logo depois do processo, foram colocados novamente no tanque, onde permanecem por 16 horas, quando foram retirados, e aplicada à segunda dose da hipófise. Os animais permaneceram dentro dos tanques até a coleta do sêmen, que ocorreu no dia seguinte no período da manhã.

Determinação dos parâmetros físico e químicos do sêmen

Para a coleta do sêmen, cada animal foi envolvido em toalha úmida e a região urogenital foi completamente enxuta com papel toalha para que a retirada do sêmen fosse realizado sem contaminação. Este procedimento foi realizado acompanhado de suaves compressões na região abdominal do peixe, no sentido anteroposterior, sendo o sêmen coletado com auxílio de uma micropipeta (25 μ L) e imediatamente depositado em tubos de microcentrífuga, os quais foram colocados em uma caixa isotérmica (~ 4 °C) e permaneceram durante todo o procedimento de coleta. O volume coletado de cada indivíduo foi registrado e oito *pools* de sêmen com até dez animais foram formados, resultando em um volume de 0,5 mL cada. Para cada *pool* foram determinados os seguintes parâmetros: osmolaridade, com auxílio de

osmômetro modelo Roebing automatic; pH, utilizando um medidor de pH (Hanna HI 7004L); e a concentração espermática. Para a determinação deste último, o material coletado foi fixado em formol salino 1% na proporção de 25 µL de sêmen para cada 1000 µL de solução e os espermatozóides foram posteriormente contados em câmara de Neubauer.

Determinação do tempo de motilidade espermática

Inicialmente, foi utilizada uma alíquota de 2 µL de sêmen de cada animal, obtida das amostras coletadas no experimento anterior, para a certificação da ausência de motilidade espermática, que foi realizada através da deposição do material sobre uma lâmina de vidro para observação em microscópio óptico previamente focalizado com um aumento de 400X. Para a determinação do tempo de motilidade espermática os espermatozóides imóveis (n = 20) foram

ativados mediante a adição de 25 µL da água do próprio cultivo (meio ativador) e o tempo de motilidade foi cronometrado do início da ativação até o momento em que todas as células se tornaram imóvel.

Efeito da refrigeração sobre a motilidade espermática

Para avaliar o efeito da refrigeração na motilidade espermática foram delineados dois tratamentos com cinco repetições cada. No primeiro tratamento, as amostras foram expostas a temperatura ambiente (27 °C) e no segundo tratamento, as amostras foram refrigeradas a uma temperatura de (6 °C). Os diluidores usados para os tratamentos foram: Ringer, Glicose (5%), Sacarose e NaCl (5%). A motilidade espermática foi estimada subjetivamente, por um único avaliador, registrando-se a porcentagem de células em movimento visualizadas no campo microscópico óptico (TIBA et al., 2009), mediante a adição de 25 µL de

meio ativador. As observações foram realizadas ao longo de um período de 21 horas.

Morfologia espermática de *Prochilodus brevis*

Para a verificação da morfologia dos espermatozoides, o sêmen foi diluído em uma solução de formol-salino tamponado a 1%, na proporção de 1:4000 (sêmen:diluidor). Em seguida, foi realizado um esfregaço em lâmina de vidro, utilizando uma alíquota de 25 µL de sêmen diluído e 10 µL dos corantes eosina-nigrosina (MURGAS et. al., 2003). Após a secagem da lâmina em corrente de ar durante cinco minutos, a mesma foi levada ao microscópio óptico para observação com um aumento de 400x. As anormalidades morfológicas observadas, de acordo com KAVAMOTO et. al., (1999), foram as seguintes: 1- defeito na região anterior do espermatozoide (irregularidade na membrana) e na peça intermediária; 2-

peça intermediária em forma de saca rolha; 3- peça intermediária e cauda fortemente enrolada ao redor da cabeça e 4- gameta contendo peça intermediária em posição retro-axial. A classificação dos espermatozoides, dentro das anormalidades, foi realizada em um total de 150 espermatozoides por lâmina.

Determinação dos íons inorgânicos

Para avaliar as concentrações de íons cloreto, magnésio e cálcio nos adultos de curimatã foram coletados amostras de sêmen, sendo utilizadas amostras de quatro peixes, em seguida, centrifugado a 12.000 x g por 5 minutos para obtenção do plasma. As concentrações para os níveis de cloreto, magnésio e cálcio foram utilizados kits específicos (Labtest ®).

Análises Estatísticas

Todos os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e comparação de médias

realizadas pelo software BIOESTAT versão 5.0, utilizando o teste de Tukey com 5% de significância.

Resultados e Discussão

Parâmetros de qualidade do sêmen de *Prochilodus brevis*

Os organismos foram submetidos a parâmetros biométricos

obtendo um peso médio de $295,5 \pm 65,9$ g e comprimento médio de $29,0 \pm 2,3$ cm para a realização deste experimento. A análise dos parâmetros de qualidade do sêmen, que apresentou aspecto fluído e cor branca leitosa, não revelou variações estatisticamente significativas ($p > 0,05$) entre os animais (Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros avaliados para a qualidade seminal.

Parâmetros	Média	Desvio padrão
Volume (μL)	154,5	85,5
Concentração espermática ($\times 10^7 \text{ spz mL}^{-1}$)	1,5	0,3
pH	7,9	1,6
Osmolaridade (mOsm/Kg)	287,9	48,5

Após um contato inicial de 30 segundos em água do tanque, os espermatozóides apresentavam uma motilidade moderada, com duração média de $63,0 \pm 1,6$. Segundo GODINHO (2000), a motilidade espermática é um dos principais requisitos a serem considerados na análise da qualidade do sêmen de peixes, e é influenciada por inúmeros

fatores como temperatura, estado nutricional, condições de análise, manejo e estresse dos doadores. STREIT JUNIOR et al. (2004) observaram para *Prochilodus lineatus* (curimatá), a liberação de 0,45 mL de sêmen com uma concentração de espermatozóides de $1,4 \times 10^{10} \text{ mL}^{-1}$. Apesar do menor volume obtido para esta espécie, a concentrações de

espermatozóides foi maior do que a encontrada no presente trabalho. Já para o *Salminus brasiliensis* (dourado), o volume seminal foi de $7,24 \pm 5,18$ mL e $12,32 \pm 1,90$ mL com concentrações de espermatozóides de $7,52$ e $7,58 \times 10^9$.mL⁻¹ (SANCHES et al. 2009). O jundiá (*Rhamdia quelen*) apresentou um volume seminal de $5,9 \pm 0,54$ mL, contendo $1,97 \times 10^{10}$ espermatozóides mL⁻¹ (Bombardelli et al. 2006). Segundo MATAVELLI et al., (2007), para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) foi obtido um volume de 0,4 mL com uma concentração de espermatozóides de $2,63 \times 10^9$.mL⁻¹. Por outro lado, BOMBARDELLI, et al., (2010) encontraram, para a mesma espécie, volumes variando de 0,19 a 0,47 mL com 3,08 a $8,19 \times 10^9$.espermatozóides mL⁻¹. O pH do sêmen para as espécies Piracanjuba (*Triurobrycon lundii*), Jundiá (*Rhamdia quelen*), Piraputanga (*Brycon microlepis*) e Picão-verde

(*Stizostedion vitreum*) apresentaram valores de 8,0; 8,5; 8,0 e 8,0, respectivamente (BERGERON et al., 2002), resultados semelhantes aos encontrados por SANABRIA (2002) em matrixã, *Brycon cephalus*, ($7,87 \pm 0,10$), por Dreanno et al. (1998) e por SUQUET et al. (1993) em turbot, *Psetta maxima*, $7,6 \pm 0,10$). No presente estudo, a média do pH foi de $7,9 \pm 0,10$, estando dentro das médias encontradas em outros estudos. O sêmen apto para criopreservação deve possuir uma osmolaridade acima de 320 mOsm/kg e um pH menor que 8.2 (LAHNSTEINER et al., 1995). OHTA & IZAWA, (1996) encontraram em sêmen de *Anguilla japonica* uma osmolaridade de 337,7 mOsm/kg, enquanto para o sêmen de truta (*Oncorhynchus mykiss*) a osmolaridade foi de 322,1 mOsm/kg (GLOGOWSKI et al., 2000). Contudo, LAHNSTEINER et al (1998) demonstraram que a mesma espécie de truta pode apresentar osmolaridade de

290,9 mOsm/kg. No presente trabalho a osmolaridade do sêmen de *Prochilodus brevis* foi de 287,9 mOsm/kg sendo menor do que o recomendado na literatura de 320 mOsm/Kg, mas muito próximo do encontrado para a truta (*Oncorhynchus mykiss*) por LAHNSTEINER et al (1998). Na realidade, a composição iônica varia entre as espécies e dentro das mesmas, devido a fatores como o meio ambiente ou à época de reprodução. Segundo BILLARD et al. (1995), muitos fatores influenciam a duração da motilidade espermática, tais como o protocolo utilizado; a espécie estudada; tipo, volume, pH e temperatura da solução ativadora, sendo que estes fatores variam de espécie para espécie. Segundo MURGAS et al. (2007), a duração do tempo de motilidade espermática do curimbatá (*Prochilodus lineatus*) foi de $85 \pm 11,18$ segundos. Já os valores encontrados por SILVA et al. (1998) para curimbatá (*P. lineatus*) foi

de 54 a 65 segundos, bem próximo do encontrado para *P. brevis* no presente trabalho (63 segundos). Os mesmos autores encontraram para a piapara (*Leporinus elongatus* e *Leporinus obtusidens*), após 6 e 18 horas de resfriamento, tempo de motilidades de, 49 e 0 para *L. elongatus* e de 155 e 76 segundos para *L. obtusidens*, respectivamente.

Morfologia dos espermatozóides

No presente estudo, houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) quanto às anormalidades mais frequentes nas amostras analisadas, sendo que a grande maioria dos espermatozóides não apresentou anomalias. Assim, 86,7% dos espermatozóides analisados estavam morfológicamente normais, 2,5% apresentavam defeito na região anterior do espermatozoide (irregularidade da membrana) e na peça intermediária com alteração da forma, 3,0% apresentaram peça intermediária em forma de saca

rolha, 1,0% apresentou peça intermediária e cauda fortemente enrolada ao redor da cabeça, e 6,7% apresentaram peça intermediária em posição retro-axial, totalizando 13,2% de anomalias. KAVAMOTO et al. (1998) determinaram as anomalias morfológicas dos espermatozoides da espécie (*Prochilodus scrofa*) conhecido como curimatá e, após reunir os defeitos obteve uma média de 9,54% de anomalias. Segundo os autores, as que ocorreram com mais frequência, foram caudas dobradas ou enroladas e ausência de cauda. As alterações morfológicas dos espermatozoides apresentam origem xenobiótica, genética ou devido ao envelhecimento e degradação que podem ser provocadas por manejos inadequados e protocolos de conservação inadequados (FAUVEL et al., 2010).

Segundo (KAVAMOTO et al., 1999) estudos sobre a morfologia das células espermáticas e a interferência na

capacidade de fertilização despertaram grande interesse após o desenvolvimento da inseminação artificial em mamíferos. Em peixes, as alterações morfológicas das células espermáticas podem interferir nos resultados da propagação artificial de espécies de piracema, no sucesso de programas de melhoramento genético e na qualidade de bancos de sêmen criopreservados. Apesar da realização de alguns estudos sobre a morfologia espermática em peixes (BOMBARDELLI et al., 2006; STREIT Jr. et al., 2006), ainda falta uma definição a cerca do índice de anormalidade aceitável para reprodutores em estações comerciais de cultivo. Em mamíferos, animais com índices de anormalidade espermática superiores a 30% são considerados inadequados para o uso em fertilização artificial ou monta natural (CBRA, 1998).

Concentração de íons inorgânicos no sêmen de curimatã

No presente trabalho, as concentrações dos íons cálcio, cloreto e magnésio apresentaram médias de 10,11 mg dL⁻¹; 99,93 mg dL⁻¹ e 1,99 mg dL⁻¹, respectivamente. O plasma seminal contém principalmente compostos minerais e baixas concentrações de substâncias orgânicas. Três íons predominam na sua composição: sódio, potássio e cloro. Suas concentrações podem variar entre 75 e 175 mM para o sódio, 32 e 86 mM para potássio, e 112 a 183 mM para o cloro (SUQUET et al., 1994). Outros íons que contribuem significativamente na composição iônica do plasma seminal são: cálcio, magnésio e cloreto, possuindo concentrações entre 1 a 2 mM (CIERESZKO et al., 2000). Os mesmos são importantes na regulação da motilidade espermática, assim como na osmolaridade do plasma seminal, além de seu efeito direto na ativação

espermática (BILLARD ; COSSON, 1992). Segundo CIERESZKO et al. (2000), o sêmen é composto pelos espermatozóides e o plasma seminal. Contudo, a concentração dos componentes do plasma seminal pode variar de indivíduo para indivíduo, dentro de uma espécie. Cabe destacar, que a função do plasma é prover um ótimo ambiente para o armazenamento dos espermatozóides dentro e fora dos testículos. O plasma seminal, é um produto sintetizado nos ductos espermáticos e testículos, na maioria dos peixes teleósteos (LAHNSTEINER et al., 1994), considerando que muitas espécies não apresentam glândulas acessórias. Alguns componentes do plasma seminal não são secretados, podendo ser originados de células espermáticas em decomposição (CIERESZKO et al., 2000).

Características dos diluidores utilizados na refrigeração do sêmen de curimatã

Os diluidores utilizados na refrigeração do sêmen de peixes, na maioria das vezes, são soluções de sais ou de carboidratos que possuem a principal função de manter a viabilidade das células espermáticas durante a redução da temperatura. As taxas de motilidade do sêmen durante o resfriamento, utilizando os diluidores Ringer, Glicose, Sacarose e NaCl apresentaram diferenças estatisticamente significativas. A solução de Ringer e Sacarose não apresentaram diferenças significativas até 4 h de refrigeração ($p > 0,05$), no entanto, a partir deste momento, apenas a solução de Ringer foi efetiva, permitindo a motilidade de 50% das células até 21 h de refrigeração. O NaCl mostrou latência nos espermatozóides durante o experimento, por causa disso, foi necessário aguardar cerca de três

minutos para o início da motilidade espermática. No entanto, os espermatozóides não resistiram a primeira hora de refrigeração. Também foi possível verificar que a solução de glicose foi a pior relação as outras soluções utilizadas, imobilizando completamente todos os espermatozóides da espécie *Prochilodus brevis*. Já para o sêmen de salmonídeos, uma simples solução de glicose 5% como veículo de crioprotetores propiciou resultados significativamente superiores resultados (HARVEY ; CAROLSFELD, 1993). Legendre e Billard (1980) observaram que as condições mínimas para um diluidor adequado são: 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 espermatozoides; e esterilidade. Segundo MILIORINI et al., 2005, nos estudos da diluição do sêmen de curimatã (*Prochilodus lineatus*) quando do uso do diluidor BTS (Beltsville Thawing Solution®) a melhor concentração encontrada foi de 4,5%. MILIORINI et al. (2004) utilizaram o mesmo diluidor na concentração de 5% para o sêmen deste mesmo peixe, também obtendo resultados expressivos. A sacarose, assim como a glicose, é um diluente testado na conservação de espermatozoides, principalmente na criopreservação combinada com crioprotetores. Estudos nesse sentido foram realizados para o sêmen de *Esox masquinongy* (CIERESZKO et al. 1999), de carpa comum (HORVÁTH; MISKOLCZI; URBÁNYI, 2003) e de *Paralichthys orbignyanus* (LANES, 2008). Outras espécies também tiveram o sêmen diluído com BTS, na mesma concentração, tais como pacu

(*Piaractus mesopotamicus*) (MILIORINI et al., 2002; MURGAS et al., 2004), piapara (*Leporinus obtusidens*) (MURGAS et al., 2003) e piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) (MURGAS et al., 2004). Estes trabalhos são pioneiros na adequação do diluidor BTS ao sêmen de espécies de peixes migradoras. Os resultados do presente trabalho sugerem que o diluidor Ringer pode ser usado como crioprotetor para o armazenamento de sêmen da espécie curimatã (*Prochilodus brevis*), não comprometendo a qualidade dos espermatozoides, o que, conseqüentemente, poderá influenciar na fertilização. As pesquisas sobre os efeitos dos diluidores são poucas, fazendo-se necessário a realização de estudos mais aprofundados para estes fins.

Conclusão

De acordo com a análise dos resultados obtidos neste estudo, conclui-se que as características seminais de *P.*

brevis seguem os padrões descritos na literatura para Characiformes de água doce. Além disso, o diluidor Ringer pode ser usado como diluidor para o armazenamento de sêmen de *P. brevis*, não comprometendo a qualidade dos espermatozoides, o que, conseqüentemente, poderá influenciar na fertilização. E por fim, o NaCl e, principalmente, a glicose não são recomendados como diluentes para o sêmen de *P. brevis*.

Referências Bibliográficas

- ARAÚJO, S. A; GURGEL, H. C. B; NASCIMENTO, R. S. S Indicadores do desenvolvimento gonadal e nutricional de *Prochilodus cearensis* (Steindachner, 1911) (*Characiformes, Prochilodontidae*) no açude Itans/Caicó, Rio Grande do Norte, Brasil. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, Maringá, v. 25, n. 2, p. 377-384, 2003.
- BAZZOLI, N. Parâmetros reprodutivos de peixes de interesse comercial na região de Pirapora, p. 291 – 306. In: H.P. Godinho & A.L. Godinho (org.). Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais. Belo Horizonte: PUC Minas, p. 468, 2003.
- BERGERON, A., VANDENBERG, G., PROULX, D., BAILEY, J. Comparison of extenders, dilution ratios and theophylline addition on the function of cryopreserved walleye semen. **Theriogenology**, v. 57, p. 1061-1071, 2002.
- BILLARD, R.; COSSON, M. P.; PERCHEC, G.; LINHART, O. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 129, p. 95-112, 1995.
- BILLARD, R. ; COSSON, M.P. Some problems related to the assesment of sperm motility in freshwater fishes. **Journal of Experimental Zoology**, v. 261, p. 122-131, 1992.
- BOMBARDELLI, R.A.; HAYASHI, C.; NATALI, M.R.M. et al. Níveis de energia digestível sobre desempenho reprodutivo e zootécnico e a deposição

- de lipídios nos hepatócitos de machos de tilápia-do-nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.5, p.941-949, 2010.
- BOMBARDELLI, R. A. et al. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá, *Rhamdia quelen* (QUOY e GAIMARDM, 1824). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 4, p. 1251-1257, 2006.
- BRASIL. Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura. Citado na página 12 – 6º parágrafo, 2010.
- CARNEIRO, M. H; FAGUNDES, L.; ÁVILA-DA-SILVA, A.O.; SERVO, G. J. M. Produção pesqueira marinha do Estado de São Paulo 1998-1999. Sér. Relat. Téc., São Paulo, 1: 1-11. Disponível em: <www.pesca.sp.gov.br/publicações.shtm> Acesso em: 14 maio 2007.
- CIERESZKO, A. et al. Effects of extenders and time of storage before freezing on motility and fertilization of cryopreserved muskellunge spermatozoa. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 128, p. 542-548, 1999.
- CIERESZKO, A., GLOGOWSKI, J., DABROWSKI, K. Biochemical characteristics of seminal plasma and spermatozoa of freshwater fishes. In: Cryopreservation in Aquatic Species. Tiersch, T.R. and Mazik, P.M., Editors. **World Aquaculture Society**, Baton Rouge, Louisiana. p 20-48, 2000.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL (CBRA). Manual para exames andrológicos e avaliação de sêmen animal. 2. ed., Belo Horizonte, 1998. p. 49.
- CROUX, M. J. P. Comportamiento y crecimiento de *Prochilodus lineatus* (Pisces, Curimatidae) en condiciones controladas. **Rev. Asoc. Cienc. Nat. Litoral, Santo Tomé**, v. 23, p. 9-20, 1992.
- DOURADO, O. F. Principais peixes e crustáceos dos açudes controlados pelo

- DNOCS. Fortaleza: SUDENE/DNOCS. 1981. 40 p.
- DREANNO, C., SUQUET, M., DESBRUYÈRES, E., COSSON, J., LE DELLIU, H., BILLARD, R. Effect of urine on semen quality in turbot (*Psetta maxima*). **Aquaculture**, Amsterdam, v.169, p. 247-262, 1998.
- FAUVEL, C.; SUQUET, M.; COSSON, J. Evaluation of fish sperm quality. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 26, p. 636–643, 2010.
- FELIZARDO, V. O. et al. Effect of cryopreservant combinations on the motility and morphology of curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 122, n. 3-4, p. 259-263, 2010.
- GLOGOWSKI, J., KWASNIK, M., PIROS, B., DABROWSKI, K., GORYCZKO, K., DOBOSZ, S., KUZMININSKI, H., CIERESZKO, A. Characterization of rainbow trout milt collected with a catheter: semen parameters and cryopreservation success. **Aquaculture Research**, v. 31, p. 289-296, 2000.
- GODINHO, H. P. Criopreservação de sêmen de peixes. Informe Agropecuário, v. 21, n. 203, p. 6-20, 2000.
- GOMES, L. C.; ARAUJO-LIMA, C. A. R. M.; URBINATI, E. C.; ROUBACH, R. Avaliação dos efeitos da adição de sal e da densidade no transporte de tambaqui. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.38 n.2, 2003.
- HARVEY, B.; CAROLSFELD, J. Preservation of sperm. In: HARVEY, B.; CAROLSFELD, J. (Ed.) Induced breeding in tropical fish culture. Ottawa, Ontario: International Development Research Centre, 1993. Chap. 7, p. 119-130.
- HARVEY, B. J.; KELLEY, R. N. Pratical methods for chilled and frozen storage of tilapia spermatozoa. In: 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**, v. 28, p. 191-194, 1988 .
- HORVÁTH, A.; MISKOLCZI, E.; URBÁNYI, B. Cryopreservation of common carp sperm. **Aquatic Living Resources**, v. 16, p. 457-460, 2003.
- KAVAMOTO, E. T.; BARNABE, V. H.; CAMPOS, B. E. S.; ANDRADE-TALMELLI, E. F. de Anormalidades morfológicas nos espermatozoides do curimatá, *Prochilodus lineatus* (Steindachner, 1881) (*Osteichthyes, Characiformes, Prochilodontidae*). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 25, p. 61-66, 1999.
- KAVAMOTO, E. T.; NARAHARA, M. Y.; ANDRADE-TALMELLI, E. F. Mudanças morfológicas dos testículos de curimatá *Prochilodus scrofa* (Steindachner) (*Teleostei, prochilodontidae*), submetido à indução hormonal. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 15, n. 1, p. 109 - 115, 1998.
- LAHNSTEINER, F., BERGER, B., WEISMANN, T., PATZNER, R.A. Determination of semen quality of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by sperm motility, seminal plasma parameters, and spermatozoal metabolism. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 163, p.163 – 181, 1998.
- LAHNSTEINER, F., BERGER, B., WEISMANN, T., PATZNER, R.A. Evaluation of semen fitness of the Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* for cryopreservation by physiological and biochemical parameters. in July Goetz, F.W. and Thomas, P. Eds. Proceedings of the Fish International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. University of Texas At Austin – Austin, Texas, 1995.
- LAHNSTEINER, F., PATZNER R., WEISMANN, T. The testicular main duct and the spermatic duct in some cyprinid fishes II. Composition of the

- seminal fluid. **Journal of Fish Biology**, v. 44, p. 459-467, 1994.
- LANES, C. F.C. Caracterização, criopreservação e manipulação genética do sêmen do linguado *Paralichthys orbignyanus* (Teleostei: Paralichthyidae). 2008. 98f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande, 2008.
- LEGENDRE, M.; BILLARD, R. Cryopreservation of rainbow trout sperm by deep-freezing. **Reproduction Nutrition Development**, Paris, v. 20, n. 6, p. 1859-1868, 1980.
- MATAVELLI, M.; MORAES, G.V.; STREIR JUNIOR, D.P. et al. Avaliação da qualidade do sêmen de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagem chitralada, suplementada com diferentes concentrações de vitamina C. **Boletim do instituto de Pesca**, v.33, n.1, p.1-7, 2007.
- MENEZES, J. T. B.; QUEIROZ, L. J.; DORIA, C. R. C.; MENEZES Jr, J. B. Avaliação espermática pós-congelamento em tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). **Acta Amazonica**, v. 38, p. 365-368, 2008.
- MILIORINI, A. B.; MURGAS, L. D. S.; PEREIRA, G. J. M. Taxas de fertilização do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) após congelamento. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16., 2005, Goiânia, Goiás. Resumos... Goiânia, Goiás: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2005.
- MILIORINI, A. B.; MURGAS, L. D. S.; VIVEIROS, A. T. M.; MARIA, A. N.; OLIVEIRA, A. V.; ORFÃO, L. H. The effects of cryoprotectants and activators on sperm motility of curimba (*Prochilodus lineatus*). In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION-ICAR, 15., 2004, Porto Seguro, Bahia, Brasil. Abstracts... Porto Seguro, Bahia,

- Brazil: Brazil College of Animal Reproduction/ ICAR, 2004. Abst. 523.
- MILIORINI, A. B.; MURGAS, L. D. S.; VIVEIROS, A. T. M.; FRANCISCATTO, R. T.; SILVA, M. O. B.; MARIA, A. N. Resfriamento do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) à 4°C, utilizando diferentes concentrações de dimetilsulfóxido. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 26, n. 3, p. 209-211, jul./set. 2002.
- MURGAS, L. D. S. et al. Importância da avaliação dos parâmetros reprodutivos em peixes nativos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 2, p. 186-191, 2011.
- MURGAS, L. D. S.; MILIORINI, A. B.; FREITAS, R. T. F.; PEREIRE, G. J. M. P. Criopreservação do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) mediante adição de diferentes diluidores, ativadores e crioprotetores. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.36, n.3, p.526-531, 2007.
- MURGAS, L. D. S.; MILIORINI, A. B.; FRANCISCATTO, R. T.; MARIA, A. N. Viabilidade espermática do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) resfriado a 4°C. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 33, n. 6, p. 1361-1365, dez. 2004.
- MURGAS, L. D. S.; FRANCISCATTO, R. T.; SANTOS, A. G. O. Avaliação Espermática Pós-Descongelamento em Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*, Valenciennes, 1849). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 6, p. 1810-1814, 2003. Suplemento 2.
- OHTA, H. & IZAWA, T. Diluent for cool storage of the Japanese eel (*Anguilla japonica*) spermatozoa. **Aquaculture**, Amsterdam, v.142, p. 107 – 118, 1996.
- PEÑARANDA, D.S.; MARCO-JIMÉNEZ, F.; PÉREZ, L.; GALLEGO, V.; MAZZEO, I.; VICENTE, J.S.; JOVER, M.; ASTURIANO, J.F. Evaluation of

- different diluents for short-term storage of European eel sperm under air-limited conditions. **Journal of Applied Ichthyology**, v.26, p.659-664, 2010.
- PETREIRE Jr., M. Pesca e esforço de pesca no Estado do Amazonas. II. Locais de pesca, aparelhos de captura e estatísticas de desembarque. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 8, supl. 2, p. 1-54, 1978.
- RANA K. Preservation of gametes. In: Bromage NR, Roberts, RJ (Ed.). Broodstock management and egg and larval quality. Cambridge: Cambridge University Press, 1995. p. 88-94.
- RIZZO, R.; GODINHO, H.P.; SATO, Y. Short – term storage of oocytes from the neotropical teleost fish *Prochilodus marggravii*. **Theriogenology**, v. 60, p. 1059 – 1070, 2003.
- ROUTRAY, P. Recent advances in carp seed production and milt cryopreservation. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 33, p. 413-427, 2007.
- SANABRIA, A.I. Efeito da restrição alimentar no desempenho reprodutivo de machos de matrinxã, *Brycon cephalus*. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) Universidade Estadual Paulista, Centro de Aqüicultura – Jaboticabal – SP, 2002.
- SANCHES, E. G.; CERQUEIRA, V. R. Preservação de sêmen refrigerado de cioba com diluentes e atmosfera modificada. **Pesq. Agropec. Bras**, v.46, p. 1673-1680, 2011.
- SANCHES, E.A.; BOMBARDELLI, R.A.; BAGGIO, D.M. et al. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de dourado. **Revista Brasileira de Zootecnia** v.38, n.11,p.2091-2098, 2009.
- SANTOS, H.B.; SATO, Y.; MORO, L.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E. Relationship among follicular apoptosis, integrin $\beta 1$ and collagen type IV during early ovarian regression in the teleost *Prochilodus argenteus* after induced

- spawning. **J. Cell and Tissue Research**, v. 332, p. 159 – 170, 2008.
- SATO, Y.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E.; BOSCHI, M.B.; MIRANDA, M.O.T., Impacto a jusante do reservatório de Três Marias sobre a reprodução do peixe reofílico curimatá-pacu (*Prochilodus argenteus*), p. 327 – 345. In: H.P. Godinho & A.L. Godinho (org.). Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais. Belo Horizonte: PUC Minas, p. 468, 2003.
- SILVA, F.C.P.; BRITO, M.F.G.; FARIAS, L.M.; NICOLI, J.R. Composition and antagonistic activity of the indigenous intestinal microbiota of *Prochilodus argenteus* Agassiz. **Journal of Fish Biology**, 67: 1686 – 1698 (2005).
- SILVA, M.O.B.; MURGAS L.D.S.; MELLO, C.B.M. et al. Avaliação do sêmen de “Curimba” (*Pochilodus lineatus*) e “Piaparas” (*Leporinus obtusidens* e *Leporinus elongatus*) após 6, 18 e 24 horas de resfriamento à temperatura de 4°C. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUACULTURA, 10., 1998, Recife. Resumos... Recife: 1998. p.294.
- SUQUET, M., BILLARD, R., COSSON, J., DORANGE, G., CHAUVAUD, L., MUGNIER, C., FAUVEL, C. Sperm features in turbot *Scophthalmus maximus*: A comparison with other freshwater and marine fish species. **Aquatic Living Resources**, v. 7, p. 283- 294, 1994.
- SUQUET, M., DORANGE, G., OMNES, M.H., NORMANT, Y., LE ROUX, A., FAUVEL, C. Composition of the seminal fluid and ultrastructure of the spermatozoon of turbot (*Scophthalmus maximus*). **Journal of Fish Biology**, v. 42, p. 509-516, 1993.
- STREIT Jr.; D. P.; MORAES, G. V.; RIBEIRO, R. P. et al. Comparação do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) induzido por extrato de hipófise de frango, coelho e carpa. **Brazilian Journal of Veterinary**

Research and Animal Science, São Paulo, v. 41, n. 3, p. 147-153, 2004.

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

TIBA, R. M.; OLIVEIRA, I. R. SERRALHEIRO, P. C. S.; OSTINI, S. Diluentes e proporções sêmen: diluente na crioconservação do sêmen de robalo-peva *Centropomus parallelus*. **B. Inst. Pesca**, Sao Paulo, v. 35, n. 1, p. 99-110, 2009.

Recebido em 03/07/2014

Aprovado em 20/09/2014