

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

Qualidade seminal de reprodutores *Brycon insignis* e *Colossoma macropomum*

RAYCON ROBERTO FREITAS GARCIA
Zootecnista/UNEMAT
Mestre em Zootecnia/UFRGS

Tese apresentada como um dos
quesitos à obtenção do grau de Doutor
em Zootecnia. Área de concentração
Produção Animal.

Porto Alegre – RS, Brasil
Março, 2017

CIP - Catalogação na Publicação

Garcia, Raycon Roberto Freitas Qualidade seminal
de reprodutores Brycon insignis e Colossoma
macropomum / Raycon Roberto Freitas Garcia. --
2017.

84 f.

Orientador: Danilo Pedro Streit Jr.

Coorientadora: Elsa Cabrita.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de Pós-
Graduação em Zootecnia, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. piabanha. 2. tambaqui. 3. sêmen. 4.
espermatozoide. 5. CASA. I. Streit Jr., Danilo
Pedro, orient. II. Cabrita, Elsa, coorient. III.
Título.

RAYCON ROBERTO FREITAS GARCIA
Zootecnista e Mestre em Zootecnia

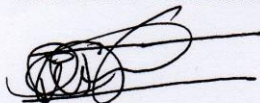
TESE

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

DOUTOR EM ZOOTECNIA

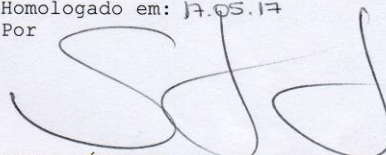
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovada em: 22.03.2017
Pela Banca Examinadora



DANILO PEDRO STREIT JÚNIOR
PPG Zootecnia/UFRGS
Orientador

Homologado em: 17.05.17
Por



PAULO CÉSAR DE FACCIO CARVALHO
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia

Carolina Bremm
CAROLINA BREMM
PPG Zootecnia/UFRGS

Luis Andre Sampaio
LUIS ANDRE SAMPAIO
FURG

Júlia Giora
JÚLIA GIORA
UFRGS

Rodolfo Nardes Sirol
RODOLFO NARDES SIROL
CPFL

Carlos Alberto Bissani
CARLOS ALBERTO BISSANI
Diretor da Faculdade de Agronomia

*Dedico este título a Eunice B. Freitas Garcia, minha mãe,
Carlos R. Garcia, meu pai,
Raysa C. F. Garcia Guimarães,
Sebastiana Firmina de Freitas (in memoria), minha avó.*

AGRADECIMENTOS

Gostaria inicialmente de agradecer a Deus pelo dom da vida.

A Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia pela oportunidade de alcançar o tão árduo título de doutor.

Ao meu tutor Prof. Dr. Danilo P. Streit Jr, que ao longo de seis anos, nunca desistiu de mim, mesmo sobre grande pressão, sempre acreditou – mesmo que não tendo outra alternativa, que eu pudesse chegar até aqui, e nunca mediu esforço para que eu pudesse alcançar meus sonhos, a ti serei eternamente grato.

A Profa. Dra. Elsa Cabrita, que com sua co-orientação pode me proporcionar uma das melhores experiências profissionais que eu poderia ter, e com muita calma pode me ensinar um novo jeito de se fazer pesquisa e lecionar, certamente foi e será sempre um belo exemplo para mim.

Aos meus colegas do Grupo AQUAM, principalmente os que amigos se tornaram Ana Carina, Daniel Rotili, Everton Zardo, Marcelo Bernardi e Paula Lassen, e também aos meus amigos que colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho, Beatriz Andrade, Maiza de Oliveira, Phelipe Noronha e Renan Lenzi.

Aos meus amigos mentores que sempre me ajudaram em minha cavalgada científica, com conselhos, apoio e incentivo, e muito, mas muito puxão de orelha Fernanda Melo, Leandro Godoy e Ligia Uribe.

Aos amigos que hoje posso chamar de irmãos que a pós-graduação me proporcionou, sem vocês essa jornada não teria tido a mesma graça, Pedro Henrique, Diego de Oliveira, Luis Ricardo e Robson Ueno.

A todos os meus amigos que conheci e foram essenciais para meu crescimento pessoal e profissional em Porto Alegre, em especial Alexandre Tadashi, Renata Mior, Andrews Bianchi, Larissa Barboza e Vinicius Suzuki. Aos amigos família que formei no meu intercambio, principalmente a Daniel Duarte, Rita Monteiro, Lourenço RP, Emmanoel Rosário e Rahif Fares. Sem esquecer do meu primo Alexander Vargas por ter sido um grande pai.

Ao senhor Megume “Pedrinho” e Simone Yokoyama, e ao corpo de funcionários da Piscicultura Boa Esperança por todo apoio, ensinamento e paciência que tiveram comigo ao longo de seis anos. Assim como senhor Tônico e família por toda a ajuda que sempre de bom coração me deu.

Por ultimo e não menos importante, Carlos Garcia e Eunice Freitas, meus pais, minha irmã Raysa, minha família, a personificação do amor que vocês são para mim, o que eu tenho de mais sagrado e verdadeiro, vocês são minha base.

Qualidade seminal de reprodutores *Brycon insignis* e *Colossoma macropomum**

Autor: Raycon Roberto Freitas Garcia

Orientador: Danilo Pedro Streit Jr.

Resumo – O primeiro experimento, teve o objetivo de comparar os efeitos da indução hormonal na qualidade espermática de *Brycon insignis*. Foram utilizados 12 reprodutores que tiveram uma alíquota do sêmen coletado e avaliado antes da indução hormonal (Ctrl) e em seguida foram divididos em tratamentos de acordo com o hormônio e dosagem recebida, Extrato de Hipófise de Carpa – EHC (T1 – 2,5 mg/kg⁻¹ de peso vivo), análogos de GnRH sendo aplicado em duas dosagens diferentes (T2 – 0,7 mg/kg⁻¹ de peso vivo e T3 – 1,4 mg/kg⁻¹ de peso vivo). Dentre as análises utilizadas para comparar o efeito da indução e dos hormônios utilizados foram; taxa de motilidade – Ctrl (95%), T1 (100%), T2 (100%) e T3 (98%), onde foi observado um ligeiro aumento e concentração espermática – Ctrl (11,52 x10⁹), T1 (4,37 x10⁹), T2 (4,34 x10⁹) e T3 (4,01 x10⁹), que pode ser observado uma redução na concentração após a indução hormonal. No entanto a utilização de indutores hormonais não altera negativamente as características seminais de piabanha. No segundo experimento, o objetivo foi de avaliar a qualidade do sêmen diluído com três diluidores e resfriado a temperatura de 6 °C durante um período de 120 horas. Foram utilizados 32 machos, o líquido seminal era dividido em quatro tratamentos; sem diluição, diluído com BTS[®], HBSS e ACP[®], na proporção de 1:4 (sêmen:diluidor), as avaliações eram realizadas para; motilidade espermática, tempo de motilidade, morfologia espermática e vigor, no momento da diluição (tempo 0) e nos tempos seguintes de 24, 48, 72, 96 e 120 horas após a diluição. A taxa de fertilização e eclosão foi coletada apenas no momento da diluição do sêmen. Os resultados apontam que a diluição é eficaz para conservação do sêmen de *C. macropomum*, porém ainda por um curto período de tempo. A recomendação é que esse procedimento seja realizado com o diluidor BTS[®] por até 72 horas. No terceiro experimento, o objetivo foi classificar por meio de análise de clusters os reprodutores *C. macropomum* após a criopreservação seminal como sendo de baixo ou alto potencial de congelabilidade e correlacionar com as características do sêmen fresco e fenotípicas. Foram utilizados 25 machos, o sêmen de cada animal foi submetido ao mesmo protocolo de criopreservação que era composto de BTS[®]+DMF (90:10), e o sêmen diluído na proporção de 1:4. Os resultados demonstram que mesmo sobre as mesmas condições o líquido seminal apresenta diferentes variações, e através da análise de clusters foi possível diferenciar a formação de três grupos de reprodutores (G1, G2, G3). O G1 foi classificado como sendo de alta qualidade espermática após a criopreservação, porém as correlações demonstram que os animais com menor tamanho de cabeça apresentam FR melhores após a criopreservação, e possivelmente a MT pode ser utilizada como pré indicador de congelabilidade para reprodutores *C. macropomum*.

* Tese de Doutorado em Zootecnia – Produção Animal, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, Brasil. (84p.) Março 2017.

Seminal quality of the *Brycon insignis* and *Colossoma macropomum* broodstock[†]

Author: Raycon Roberto Freitas Garcia
Advisor: Danilo Pedro Streit Jr.

Abstract - The first experiment aimed to compare the effects of hormonal induction on the spermatic quality of *Brycon insignis*. 12 broodstocks that had an aliquot of the semen collected and evaluated before to hormonal induction (Ctrl) were used and then divided into treatments according to the hormone and dosage received, Carpal Hypophysis Extract - EHC (T1 - 2.5 mg/Kg⁻¹ live weight), GnRH analogs being administered in two different dosages (T2 - 0.7 mg/kg⁻¹ live weight and T3 - 1.4 mg/kg⁻¹ live weight). Among the analyzes used to compare the effect of induction and hormones used were: motility rate, that showed a slight increase, Ctrl (95%), T1 (100%), T2 (100%) and T3 (98%) and sperm concentration wich may be observed a reduction, Ctrl (11.52 x10⁹), T1 (4.37 x10⁹), T2 (4.34 x10⁹) and T3 (4.01 x10⁹). However, the use of hormone inducers does not negatively affect the seminal characteristics of piabanha. In the second experiment, the objective was to evaluate the quality of semen of the *Colossoma macropomum* diluted with three extenders and cooled to 6 °C for a period of 120 hours. 32 males were used, the seminal fluid was divided into four treatments; Without dilution, diluted with BTS™, HBSS and ACP™, at the ratio of 1:4 (semen:extender), evaluations were performed for; Sperm motility, sperm motility and vigor, at the time of dilution (time 0) and at the following times of 24, 48, 72, 96 and 120 hours after dilution. The rate of fertilization and hatching was collected only at the time of the semen dilution. The results indicate that the dilution is effective for the conservation of semen of *C. macropomum*, but still for a short period of time. The recommendation is that this procedure be performed with the BTS™ thinner for up to 72 hours. In the third experiment, the objective was to classify by means of clusters analysis the *C. macropomum* broodstock after seminal cryopreservation as being of low or high freeze potential and to correlate with the characteristics phenotypic and fresh semen. 25 males were used, the semen from each animal was submitted to the same cryopreservation protocol that was composed of BTS™+DMF (90:10), and the semen diluted in the 1:4 ratio. The results show that even on the same conditions, the seminal fluid presents different variations, and through the analysis of clusters it was possible to differentiate the formation of three broodstock groups (G1, G2, G3). G1 was classified as being of high spermatic quality after cryopreservation, but correlations show that animals with smaller head sizes have better fertilization rate after cryopreservation, and possibly motility time can be used as a pre-freeze indicator for *C. macropomum*.

[†] Doctoral Thesis in Animal Science – Animal Production, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, Brazil. (84p.) March 2017.

SUMÁRIO

RELAÇÃO DE TABELAS	10
RELAÇÃO DE FIGURAS	11
RELAÇÃO DE ABREVIATURAS	12
CAPÍTULO I	13
INTRODUÇÃO	14
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
Espécies em Estudo	16
Piabanha – <i>Brycon insignis</i>	16
Tambaqui – <i>Colossoma macropomum</i>	17
Indução Hormonal	18
Características Seminais de Peixes	19
Métodos para Conservação do Sêmen de Peixes.....	20
Resfriamento do sêmen de peixes neotropicais.....	20
Criopreservação do sêmen de peixes neotropicais.....	21
Solução diluidora.....	22
Agentes crioprotetores	23
Avaliação do Sêmen de Peixes	24
Outras Abordagens para Aferir a Qualidade Reprodutiva.....	26
Clusters como ferramenta para análise seminal.....	26
Correlações seminais	26
HIPÓTESES	28
OBJETIVOS.....	28
Geral;.....	28
Específicos;	28
CAPÍTULO II	29
Seminal characteristics of piabanha before and after induction with different hormones	30
Introduction	31
Material and methods	32
Results and discussion	34
Conclusion	38
References	38

CAPÍTULO III	42
Different extenders solutions for tambaqui semen cooling.....	43
Agradecimentos	49
References.....	49
CAPÍTULO IV	53
Análise de clusters para diferenciação de grupos de reprodutores <i>Colossoma macropomum</i> a partir do sêmen criopreservado.....	54
Introdução	54
Material e Métodos.....	55
Resultados	58
Discussão	60
Conclusão	63
Agradecimentos	64
Referência.....	64
CAPÍTULO V	70
CONSIDERAÇÕES FINAIS	71
REFERÊNCIAS.....	72
VITA.....	84

RELAÇÃO DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Table 1. Qualitative and quantitative parameters of the semen of <i>B. insignis</i> before and after induction, with different hormones and dosages.	35
Table 2. Assessment of sperm morphology before and after hormone induction, with different dosages and hormones in <i>B. insignis</i>	37
Table 3. Percentage distribution of damages on semen before and after induction, with different hormones and dosages.	37

CAPÍTULO 4

Tabela 1 – Resultados das características fenotípicas e avaliações seminais dos reprodutores <i>C. macropomum</i> (n=25) utilizados no estudo.	59
Tabela 2 – Resultados apresentados pelas médias das análises realizadas no sêmen criopreservado de <i>C. macropomum</i> (n=25) pela formação dos grupos a partir da análise de clusters e erro padrão da média.	60
Tabela 3 – Correlações significativas das variáveis avaliadas no sêmen criopreservado do Grupo 1 com a característica fenotípica e do sêmen fresco dos indivíduos.	60

RELAÇÃO DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. Piabanha, da ordem Characiformes, espécie utilizada para desenvolvimento de um dos experimentos (Acervo pessoal). 16

Figura 2. Tambaqui, da ordem Characiformes, espécie utilizada para realização dos experimentos. 17

CAPÍTULO 3

Figure 1 – Percentage of sperm motility (A), spermatic vigor (B), motility time (C) and percentage of normal cells (D) in the *C. macropomum* over us treatment in the 120 hours of cooling at 6 °C. 52

Figure 2 – Fertilization and hatching rates in the *C. macropomum* using cold semen at 6°C diluted with BTS, HBSS and ACP. 52

CAPÍTULO 4

Figura 1 – Dendrograma com distância Euclidiana, a partir das variáveis analisadas do sêmen criopreservado de *C. macropomum*. 59

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS

- ACP – Água de Coco em Pó
- BTS – Beltsville Trawning Solution
- CASA – Computer Assisted Semen Analysis
- CTR – Controle
- DMF – Dimetilformamida
- DNAi – Integridade do DNA Espermático
- EHC – Extrato de Hipófise de Carpa.
- FR – Taxa de Fertilização
- HBSS – Hanks Balanced Salt Solution
- M – Motilidade
- Mf – Funcionalidade Mitocondrial
- Mi – Integridade da Membrana Espermática
- MT – Tempo de Motilidade
- PM – Motilidade Progressiva
- SC – Concentração Espermática
- SM – Morfologia Espermática
- SP1 – Sub-população 1
- SP2 – Sub-população 2
- SP3 – Sub-população 3
- TM – Motilidade Total
- VAP – Velocidade a Parte Média
- VCL – Velocidade Curvilínear
- VSL – Velocidade em Linha Reta

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

A aquacultura brasileira vem apresentando um constante crescimento nos últimos anos, devido forte investimento no setor e também em pesquisas que são aplicadas na melhoria e consolidação da cadeia no país. Um bom exemplo pode ser identificado na produção de espécies nativas, onde os somatórios da produção de peixes redondos alcançaram patamares de produção semelhante ao da tilápia, que até então era a espécie mais produzida. E dentre as espécies nativas brasileiras, a que tem maior destaque é o *Colossoma macropomum* (Pedroza-Filho *et al.*, 2016). Porém em outro âmbito temos a espécie *Brycon insignis* que já foi uma das espécies mais capturadas na década de 50, tem alto valor comercial e hoje sofre com o risco eminente de extinção (Machado e Abreu, 1952; Shimoda *et al.*, 2007; Hilsdorf *et al.*, 2008)

O domínio na produção de alevinos é fundamental para que uma espécie seja considerada zootecnicamente relevante e também para auxiliar em programas de repovoamento. Logo, os estudos relacionados a reprodução auxiliam na estruturação e consolidação da produção, e tem grande importância para o setor. Manter a qualidade do plantel e monitorar os índices reprodutivos são alguns fatores que devem ser levados em conta (Murgas *et al.*, 2011; Streit Jr. *et al.*, 2012). Nos últimos anos, os estudos com indução hormonal e seus efeitos nas células espermáticas além das aplicações das técnicas de conservação seminal vem sendo utilizada como uma excelente ferramenta para auxiliar no setor reprodutivo. Para tanto, o cuidado com a escolha dos indutores pode influenciar a qualidade dos gametas (Mylonas *et al.*, 2010) assim como o emprego de técnicas como resfriamento e principalmente, a criopreservação, pode gerar inúmeros benefícios como: maximizar a utilização do sêmen coletado, redução dos estoques de reprodutores, mitigação da assincronia reprodutiva entre machos e fêmeas, facilitação na troca de material genético entre pisciculturas e a formação de bancos de germoplasma para conservação ou programas de melhoramento genético (Cabrita *et al.*, 2010).

Os estudos em torno da indução hormonal com diferentes doses e mesmo hormônios para aferir a influencia destes na qualidade espermática já foi descrita para algumas espécies nativas brasileiras (Pardo-Carrasco *et al.*, 2006; Streit Jr. *et al.*, 2006; Maria *et al.*, 2011; Garcia *et al.*, 2015), porém observa-se que os efeitos são adversos, entretanto em sua grande maioria não são prejudiciais quando utiliza-se extrato de hipófise de carpa ou análogos de GnRH.

A aplicação de técnica de resfriamento é considerada simples e acessível, e pode auxiliar na conservação do sêmen por um prazo de horas ou dias (Zaniboni Filho e Nuñez, 2004). Já o emprego da técnica de criobiologia, necessita de um empenho maior no quesito tecnologia. Estudos são realizados para observar a ação dos crioprotetores e assim definir quais podem ser aplicados sem menores danos às células espermáticas (Menezes *et al.*, 2008; Varela Junior *et al.*, 2012), soluções diluidoras para compor a solução crioprotetora e diluir o sêmen (Garcia *et al.*, 2015; Melo-Maciel *et al.*, 2015), soluções para ativação do sêmen criopreservado (Carneiro *et al.*, 2012), e a aplicação dos diversos métodos de congelamento e descongelamento do sêmen (Varela Junior *et al.*, 2015), além de recipientes de armazenamento (Maria *et al.*, 2015) que podem auxiliar a aplicação da técnica em larga escala.

Sabidamente os efeitos danosos da aplicação da técnica de criopreservação seminal (Pegg, 2007), são comumente os responsáveis por

causarem as baixas taxas de fertilização (Cabrita *et al.*, 2009). Diante disto, os desenvolvimentos de pesquisas de criobiologia seminal estão cada vez mais empenhadas em apontar a real qualidade dos gametas que foram criopreservados, e claro, descrever os efeitos causados pela aplicação da técnica e onde esses fatores podem influenciar, e como podem ser melhorados para mitigar os efeitos da técnica (Cabrita *et al.*, 2009; Cabrita *et al.*, 2010; Cabrita *et al.*, 2014; Asturiano *et al.*, 2016; Robles *et al.*, 2016).

Ferramentas estatísticas estão sendo utilizadas para auxiliar uma melhor compreensão da qualidade espermática entre reprodutores (Martínez-Pastor *et al.*, 2008; Beirão *et al.*, 2011; Kanuga *et al.*, 2012; Güllü *et al.*, 2015), e suas abordagens geram resultados promissores para um melhor entendimento. Com o *C. macropomum* não é diferente, recentemente a aplicação dos clusters foi utilizada para observar a correlação das velocidades cinéticas dos espermatozoides e sua influência da taxa de fertilização (Gallego *et al.*, 2017). Cabe ressaltar que a utilização da ferramenta estatística de correlação, tem sua aplicabilidade em peixes principalmente para avaliar a influência de fatores sobre a qualidade espermática (Aramli *et al.*, 2013; Aramli *et al.*, 2015; Fallah Shamsi e Khara, 2015; Gerber *et al.*, 2016; Khodadadi *et al.*, 2016). No entanto, em mamíferos a utilização desta ferramenta é gerada em outras escalas, onde é possível realizar estimativas sobre qualidade reprodutiva e espermática dos reprodutores (Barrozo *et al.*, 2012; Ahmed *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2016; Reis *et al.*, 2016), porém, em peixes ainda não foi relatado com esse fim.

O presente estudo teve o objetivo de avaliar a qualidade espermática de reprodutores *B. insignis* antes e após a indução hormonal, com diferentes homônios e posologias e em reprodutores *C. macropomum*, avaliar a qualidade seminal inicialmente sob o efeito de diferentes diluidores utilizados para diluir o sêmen a seu armazenado por meio de resfriamento, e em outro momento, classificar os reprodutores quanto a qualidade do sêmen criopreservado por meio de clusters e correlacionar com as características fenotípicas e do sêmen fresco.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O crescimento da piscicultura no Brasil é constante há uma década, e as perspectivas são positivas para os próximos anos. Para garantir o constante crescimento da produção são necessários juvenis em quantidade e qualidade, e para tanto é indispensável o aperfeiçoamento da técnica de reprodução, qualificando a eficiência reprodutiva das unidades produtoras de alevinos. Dentre as possibilidades para melhorar a eficiência reprodutiva, administração hormonal correta e manutenção do sêmen em baixas temperaturas (resfriamento e criopreservação) podem ser consideradas como alternativas úteis.

Em sua grande maioria, para espécies nativas brasileiras, faz-se necessário indução hormonal para obtenção dos gametas na reprodução artificial ou semi-artificial, contudo desde o estabelecimento do método de indução hormonal utilizado ainda atualmente, o surgimento de outras técnicas ou mesmo as variações das metodologias vem causando dúvidas ou mesmo incertezas sobre a qualidade dos gametas e até mesmo a qualidade reprodutiva causada pela indução hormonal.

Em um cenário semelhante, a aplicação das técnicas de conservação seminal das espécies nativas enfrenta inúmeros problemas. Diante disso, o estudo da qualidade seminal após o resfriamento e a criopreservação é de extrema importância para serem desenvolvidos como técnica e a partir daí, definir padrões de qualidade. O surgimento de novas tecnologias vem funcionando com uma excelente ferramenta para estabelecer qual é a real qualidade das células espermáticas criopreservadas ou mesmo o potencial das soluções diluidoras para conservar a qualidade das células em curto prazo.

Espécies em Estudo

Piabanha – *Brycon insignis*

Ordem: Characiformes.

Família: Characidae.

Sub-família: Bryconidae.

Gênero: *Brycon*.

Espécie: *Brycon insignis* (Steindachner, 1877).

Nome popular: Piabanha (Figura 1).



Figura 1. Piabanha, da ordem Characiformes, espécie utilizada para desenvolvimento de um dos experimentos (Acervo pessoal).

Em geral as espécies do gênero *Brycon*, quanto a sua morfologia possuem corpo alongado, com ventre arredondado, o que torna o corpo fusiforme, é coberto por escamas, maxila e mandíbula do mesmo comprimento com a posição da boca projetada para frente (Ceccarelli *et al.*, 2013). A espécie *B. insignis*, pode ser considerada de grande porte, podendo atingir até 60 cm (Nomura, 1984), possui um hábito alimentar carnívoro na fase inicial da vida, porém na fase adulta pode ser considerada onívora (Girardi *et al.*, 1993, Lima, 2001)

O *B. insignis* tem sua origem endêmica principalmente nos rios da bacia Paraíba do Sul, porém já foram relatados registros que esta espécie fora encontrada também na bacia do rio Grande (Hilsdorf *et al.*, 2008). Já esteve entre uma das espécies mais capturadas no Brasil (Machado e Abreu, 1952), contudo, atualmente é uma espécie que corre risco de extinção (Hilsdorf *et al.*, 2008).

É considerada uma espécie reofílica, sua reprodução acontece comumente no período chuvoso, entre dezembro a fevereiro, os machos começam a se reproduzir a partir do segundo ano de vida (com aproximadamente 20 cm) e as fêmeas a partir do terceiro ano de vida (com aproximadamente 25 cm) (Salgado *et al.*, 1997).

Apesar da piabanha ter sua carne muito apreciada pelo sabor e ter um alto valor de mercado, a exploração desta espécie é quase inexistente para fins comerciais, e nas estações produtoras de alevinos o foco da reprodução é principalmente com a finalidade conservacionista para repovoamento (Shimoda *et al.*, 2007).

Tambaqui – *Colossoma macropomum*

Ordem: Characiformes.

Família: Characidae.

Sub-família: Serrasalminae.

Gênero: *Colossoma*.

Espécie: *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818).

Nome popular: Tambaqui (Figura 2).



Figura 2. Tambaqui, da ordem Characiformes, espécie utilizada para realização dos experimentos (Acervo pessoal).

A espécie *C. macropomum*, quanto a morfologia possui escamas sobre o corpo considerado romboidal, nadadeira adiposa curta com raios nas extremidades, boca prognata pequena e fortes lábios grossos, sua coloração é

parda na metade superior e preta na metade inferior do corpo, podendo ainda variar para mais clara ou escura dependendo da cor da água (Queiroz *et al.*, 2013). É considerado o único peixe de grande porte da Amazônia que possui longos rastros braquiais e dentes molariformes (Dos Santos, 2006).

Considerado onívoro, quando adulto consome basicamente frutos e sementes em seu habitat natural e o zooplâncton como alimentação complementar, aceitando bem alimentação exógena (Furuya, 2001; Dos Santos, 2006).

Historicamente a espécie foi introduzida na piscicultura brasileira a partir da década de 70, porém, com restrições aos locais de criação, pois seu crescimento passa a ser reduzido em temperaturas abaixo de 22 °C (Ranzani-Paiva *et al.*, 1999). Tem sua origem endêmica nas bacias do rio Amazonas e do rio Orinoco (Gomes *et al.*, 2013).

A reprodução do tambaqui comumente pode começar a partir do segundo ano de vida, medindo cerca de 60 cm de comprimento padrão, e tem seu período reprodutivo entre os meses de setembro a março (Streit Jr. *et al.*, 2012). Sua desova é total e por ser uma espécie de piracema, dentro de viveiros os estímulos ambientais são insuficientes para que a reprodução aconteça de forma natural, sendo necessária a indução hormonal (Streit Jr. *et al.*, 2012). O Índice Gonadossomático do tambaqui pode variar entre 2 e 8% do peso corporal em massa de oócitos, podendo chegar a 10% dependendo de características alimentares e corporais (Dos Santos, 2006; Streit Jr. *et al.*, 2012). É considerada uma espécie fácil de reproduzir em cativeiro, e tem sua reprodução dominada (Streit Jr. *et al.*, 2012).

Considerado uma espécie rústica, com alto potencial de crescimento e excelente conversão alimentar, o tambaqui tornou-se um atrativo para os produtores interessados em investir na piscicultura. A produção vem crescendo há quase 10 anos, e atualmente é a espécie nativa mais produzida no país, superando a marca de 139 mil toneladas ano (Pedroza-Filho *et al.*, 2016).

Indução Hormonal

Apesar dos estudos com indução hormonal no Brasil ter tido início em meados de 1930, com os trabalhos de Rodolpho Von Ihering (Rizzo e Bazzoli, 2014), o grande marco da reprodução induzida no Brasil aconteceu após a publicação do primeiro manual de propagação artificial de peixes de águas tropicais, que aconteceu no início da década de 80 (Woynarovich e Horváth, 1983), e a técnica de indução hormonal recomendada era de hipofiseação, que ainda atualmente é a técnica mais utilizada nas estações produtoras de alivinos do Brasil (Rizzo e Bazzoli, 2014). Contudo desde o início dos anos 90, estudos com outros hormônios, principalmente sintéticos, já vem sendo testados em espécies migradoras (Zaniboni-Filho e Barbosa, 1996).

Dentre os hormônios já utilizados nas espécies migradoras, os que apresentaram os melhores resultados foram o extrato de hipófise de carpa (EHC) e hCG (Gonadotrofinas coriônica humana) – naturais e/ou análogos do hormônio bloqueador de gonadotrofinas (GnRH ou LH-RH) e de antagonistas do hormônio bloqueador de gonadotrofinas (dopamina) – sintéticos (Zaniboni-Filho e Nuñez, 2004; Gomes *et al.*, 2013; Galo *et al.*, 2015). A importância na escolha e na qualidade do hormônio que será utilizado para realizar a indução hormonal, já foi descrito, pois é um fator que pode limitar a qualidade dos gametas obtidos após a indução (Andrade e Yasui, 2003; Mylonas *et al.*, 2010).

A qualidade do sêmen de *Piaractus mesopotamicus* foi avaliado após a indução com EHC, e os autores concluíram que a indução não causou alterações significativas nos parâmetros qualitativos avaliados de motilidade progressiva, vigor espermático, tempo de motilidade e morfologia (Streit Jr. *et al.*, 2006), porém a utilização do mesmo hormônio para indução seminal em *C. macropomum*, apontou que os efeitos podem ser eficientes e positivos quando os animais são tratados hormonalmente (Maria *et al.*, 2011).

Para verificar a influência da indução hormonal em *B. insignis*, Garcia *et al.* (2015), testaram a dosagem padrão para peixes migradores com EHC, e as variações das dosagens de análogos de GnRH (Ovopel), e observaram que houve principalmente uma diminuição na concentração espermática de $11,52 \times 10^9$ no tratamento controle (sem indução hormonal) para médias de $4,24 \times 10^9$ quando os animais foram induzidos (EHC ou análogos de GnRH). Contudo para fêmeas de *Brycon amazonicus*, Pardo-Carrasco *et al.* (2006), observaram que com a indução através de análogos de GnRH de mamíferos, as fêmeas da espécie não desovaram, enquanto quando a indução fora realizada com EHC, a desova aconteceu normalmente, porém nos machos de *B. amazonicus* a indução por análogos de GnRH de mamíferos não causou influências qualitativas no sêmen, como apresentou os machos que foram induzidos com EHC (Pardo-Carrasco *et al.*, 2006b).

Características Seminais de Peixes

As principais características seminais da maioria dos peixes teleósteos são a ausência de acrossoma e imotilidade espermática no plasma seminal. Para a ausência de acrossoma, existe a presença da micrópila no oócito, que é um orifício que permite a entrada do espermatozoide sem que o mesmo tenha que perfurar a membrana do oócito (Rizzo e Bazzoli, 2014). Para que os espermatozoides não tenham motilidade espermática, os altos níveis osmóticos do plasma seminal em relação a água mantém os espermatozoides inativos, ou seja, ao entrar em contato com um meio hiposmótico (ex. água), a pressão osmótica interna da célula é alterada e isso provoca os batimentos flagelares, movimentando assim o espermatozoide (Cosson, 2004). Cabe ressaltar que existem outras características de suma importância para a compreensão da qualidade seminal, como por exemplo, os parâmetros bioquímicos seminais básicos (Alavi *et al.*, 2004). De uma forma geral, os principais íons presentes no sêmen de peixes são os Na^+ , Cl^- e K^+ (Cosson, 2004), porém, inúmeros fatores influenciam na composição bioquímica seminal, seja na presença, ausência e concentração de algum nutriente (Bobe e Labbé, 2010).

As informações reportadas no parágrafo anterior podem ser observadas na espécie *Barbus barbuis* L. que apresentou uma correlação com a alteração da osmolaridade seminal nos grupos suplementados com diferentes rações em diferentes épocas do ano (Alavi *et al.*, 2009). Em *Rhamdia quelen* a composição bioquímica do plasma seminal variou nas diferentes estações do ano (Borges *et al.*, 2005). Já para *Macrozoarces americanus* a alteração bioquímica no plasma seminal pode ser observada até mesmo no período reprodutivo, aonde as concentração de Na^+ e Cl^- foram negativamente afetadas no decorrer do período (Wang e Crim, 1997). As características seminais variam até mesmo com a origem dos reprodutores. Por exemplo em *Gadus morhua* L. a concentração lipídica, osmótica e a motilidade foram superiores para os reprodutores selvagens quando comparados com reprodutores provenientes de cativeiro (Butts *et al.*, 2011).

As correlações das características seminais com a qualidade seminal constituem uma ferramenta de extrema importância para analisar os índices reprodutivos, pois a partir do momento que se tem conhecimento de como melhorar a qualidade do gameta, e até mesmo em que época os coletar, haverá um aperfeiçoamento e aprimoramento elevando assim a qualidade reprodutiva dos laboratórios de produção de juvenis.

Métodos para Conservação do Sêmen de Peixes

A conservação de células espermáticas pode ser realizada principalmente por meio de dois métodos diferentes: a preservação a curto prazo, também conhecida como resfriamento e a preservação por meio de criopreservação, sem tempo definido (Carneiro, 2007). A aplicação destas técnicas também se diferem quanto a praticidade de aplicabilidade, por exemplo: no caso do resfriamento, mais simples, apenas a utilização de uma solução diluidora, podendo usar ou não um crioprotetor (depende do protocolo) e uma geladeira comum. A criopreservação, necessita de solução crioprotetora e equipamentos específicos, *dry-shipper*, ultrafreezer e botijão de nitrogênio para armazenamento de amostras.

Resfriamento do sêmen de peixes neotropicais

Resfriar o sêmen de peixes tem como objetivo manter a viabilidade da célula espermática por horas ou até mesmo dias em uma temperatura em torno de 8 °C (Zaniboni Filho e Nuñez, 2004; Carneiro *et al.*, 2006). Porém cuidados para conservação dos espermatozoides devem ser levados em conta, e o principal deles é a diluição do sêmen em uma solução diluidora capaz de preservar as características das células, mantendo assim sua viabilidade (Viveiros *et al.*, 2014a). Sendo a aplicação desta técnica considerada fácil e barata, é uma técnica que pode ser empregada para auxiliar a mitigar os efeitos de assincronia reprodutiva em estações de piscicultura ou até mesmo a troca de material entre piscicultura (Marques e Godinho, 2004; Garcia *et al.*, 2016b). Pesquisas com espécies nativas para o desenvolvimento desta técnica tem seus primeiros registros com *Leporinus obtusidens* (Murgas *et al.*, 2002), *P. mesopotamicus* (Miliorini *et al.*, 2002) e *Prochilodus lineatus* (Franciscatto *et al.*, 2002), e em ambos os trabalhos, o diluidor base para suínos BTS® foi utilizado com sucesso por mais de 4 dias de armazenamento do sêmen das espécies, e as taxas de motilidade variaram entre 58, 42 e 58%, respectivamente.

Ao longo das últimas décadas outras espécies nativas neotropicais como: *Brycon nattereri*, onde após sete dias de resfriamento com BTS® (Beltsville Thawing Solution – Minutub) a taxa de motilidade era de 48% (Oliveira *et al.*, 2007). Ao utilizar uma solução com base de NaCl (1,1%) enriquecida com Tris, Maria *et al.* (2006), conservaram o sêmen de *Brycon orbignyanus* com 40% de motilidade por sete dias. A solução diluidora nesta técnica é de extrema importância, pois a mesma deve fornecer um meio adequado para conservação da célula (Zaniboni Filho e Nuñez, 2004).

Em *C. macropomum*, os testes entre as soluções diluidoras ACP®, HBSS e BTS®, causaram diferentes efeitos na conservação das células espermáticas ao longo de cinco dias, e os autores recomendam que o sêmen seja conservado por até 72 horas com BTS que preservou a motilidade espermática em torno de 50% (Garcia *et al.*, 2016b). Fato semelhante aconteceu com o resfriamento do sêmen a 5 °C de *P. mesopotamicus* com quatro diferentes meios diluidores ao

longo de 120 horas, e os autores observaram que o BTS pode ser utilizado até 72 horas de armazenamento sob resfriamento (Streit Jr *et al.*, 2007).

Criopreservação do sêmen de peixes neotropicais

A técnica de criopreservação consiste em conservar com vida em baixas temperaturas as células espermáticas visando sua utilização posteriormente (Holt, 2000; Mazur, 2004; Pegg, 2007). Essa técnica funciona utilizando uma solução crioprotetora capaz de desidratar e reidratar a célula através de um fluxo de íons, com o objetivo de impedir a formação de cristais de gelo, que podem danificar a célula (Holt, 2000; Mazur, 2004). Os benefícios desta técnica incluem; minimização dos efeitos de assincronia reprodutiva entre machos e fêmeas, melhor aproveitamento seminal, simplificação do estoque de reprodutores, facilitação na troca de material genético entre estações produtoras de alevinos e a formação de um banco de germoplasma para programas de melhoramento genético e conservação (Cabrita *et al.*, 2010).

A criopreservação pode ser dividida principalmente em dois tipos de congelamento: lento e o ultrarrápido – também chamada de vitrificação (Magnotti *et al.*, 2016). Exemplificando, o congelamento lento é obtido por curvas de congelamento lentas e graduais, através do vapor do nitrogênio. Já vitrificação, é a imersão direta da amostra no nitrogênio líquido (que está a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$). No Brasil a técnica mais comum utilizada para as espécies nativas brasileiras de água doce é a criopreservação através de congelamento lento (Viveiros *et al.*, 2014a).

Os estudos com a criopreservação seminal de peixes neotropicais começaram no Brasil em meados da década de 80, em algumas espécies nativas (Coser *et al.*, 1984; Coser *et al.*, 1987; Kavamoto *et al.*, 1989). Já no início da década seguinte mais alguns trabalhos vieram a ser publicados também com espécies nativas (Carolsfeld *et al.*, 1990; Fogli Da Silveira *et al.*, 1990). Porém uma lacuna de quase dez anos sem pesquisas deixou os estudos com criopreservação seminal de peixes um tanto quanto esquecidos no Brasil. No final da década de 90, quando então é publicado novamente um trabalho que tratou sobre a técnica com a espécie *C. macropomum* (Farias *et al.*, 1999), os estudos foram retomados com maior ênfase no início dos anos 2000, por meio de um estudo conduzido por Carolsfeld *et al.* (2003), que serve de marco para a pesquisa com criobiologia de espécies nativas, neste estudo os autores apresentavam protocolos para criopreservação de seis espécies nativas. Atualmente mais de 15 espécies nativas tem pelo menos um protocolo que pode ser utilizado no congelamento de sêmen (Viveiros *et al.*, 2014a). Todavia algumas delas detêm maior foco nas pesquisas tendo assim mais informação sobre o assunto.

Quando se trata dos métodos de congelamento das amostras de sêmen de peixes no Brasil, alguns autores já consideram um avanço a escolha da utilização do *dry-shipper* no emprego da técnica, pois melhora a comparação e replicação de estudos (Garcia *et al.*, 2016a), além de ser considerado um método de congelamento prático e seguro (Varela Junior *et al.*, 2015). Cabe ressaltar, que os *dry-shippers* comumente comercializados no país e utilizados nos trabalhos possuem variações muito pequenas de temperaturas, e quando bem manejados e alojados em lugares adequados sua taxa de congelamento pode ser de $27,5 - 40\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, até sua estabilização em torno de $-160\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Taitson *et al.*, 2008; Carneiro *et al.*, 2012; Maria *et al.*, 2015).

Tecnicamente a ultima parte do processo de criopreservação é o descongelamento das amostras, e para isso escolhe-se uma temperatura e um tempo em que essas amostras serão descongeladas, porém, deve-se levar em conta, o recipiente utilizado na criopreservação, pois este pode influenciar na qualidade do sêmen devido as variações sofridas nas temperaturas (Cabrita *et al.*, 2001). Outro fator que deve ser relacionado são as altas temperaturas no momento do descongelamento que também podem afetar a qualidade, devido a desnaturação de enzimas e proteínas (Lahnsteiner *et al.*, 1997). Contudo, observa-se que existem variações utilizadas em um mesmo recipiente e para a mesma espécie nos diferentes protocolos encontrados na literatura. Contudo, nota-se uma grande variação em espécies onde foram utilizados palhetes de 0,5 mL para criopreservação seminal, como em *B. orbignyianus*, que as taxas de descongelamento variaram entre 40-48°C/3-4 segundos (Carolsfeld *et al.*, 2003) ou 60°C/8 segundos (Viveiros *et al.*, 2015). Por outro lado, em *L. obtusidens* podem ir de 35-37°C/10 segundos (Taitson *et al.*, 2008) ou 60°C/8 segundos (Viveiros *et al.*, 2008), assim como em *C. macropomum*, onde podem variar de 37°C/30 segundos (Leite *et al.*, 2011) ou 60°C/8 segundos (Carneiro *et al.*, 2012).

Cabe ressaltar, que outros estudos com tamanhos do recipiente e curvas de descongelamento mais adequadas para tal, vêm sendo analisadas para melhorar e aperfeiçoar o emprego da criopreservação seminal com aplicação em qualidade e quantidade (Velasco-Santamaría *et al.*, 2006; Maria *et al.*, 2015). Isso porque os cuidados na escolha os recipientes e nas curvas de congelamento e descongelamento devem ser devidos, pois a aplicação inadequada pode acarretar em formações de cristais de gelos, favorecendo assim a aparição de crioinjúrias (Pegg, 2007).

Solução diluidora

Existe uma importância muito grande em conhecer os efeitos da solução diluidora que será utilizada na aplicação das técnicas de conservação. Esta não só dilui o líquido seminal, mas fornece um meio adequado para a sobrevivência da célula durante o processo de resfriamento e antes e após a criopreservação (Garcia *et al.*, 2016a). Pode-se levar em consideração que uma solução diluidora deve manter a viabilidade celular após a diluição, fornecer suporte metabólico através de lipídios, carboidratos e proteínas, prevenir ou controlar o crescimento bacteriano danoso, além de controlar o pH e a osmolaridade do meio (Lahnsteiner e Radner, 2010).

Os primeiros estudos que utilizaram e recomendaram o emprego de soluções diluidoras com espécies nativas brasileiras foram em meados dos anos 2000, porém essa aplicação se restringia a utilização para o resfriamento do sêmen (Franciscatto *et al.*, 2002; Miliorini *et al.*, 2002; Murgas *et al.*, 2002). Porém, a importância da utilização do diluidor pode ser evidenciada com a publicação dos protocolos para criopreservação seminal de espécies nativas proposto por Carolsfeld *et al.* (2003), que adicionaram a gema de ovo (galinha) ou leite em pó para auxiliar na criopreservação. Compostos como a gema de ovo (galinha), contem lipoproteínas de baixa densidade, e isso pode auxiliar na estabilização da membrana espermática, redução de injúrias e estresse térmico causado pelo processo de criopreservação (Watson, 1981). O possível benefício causado pela adição da gema de ovo aos protocolos utilizados para criopreservação seminal pode ser observado em *C. macropomum*, onde a adição do composto acarretou um aumento percentual de espermatozoides

móveis e da viabilidade espermática (Carneiro *et al.*, 2012). O pressuposto ocorreu também em *P. lineatus*, onde pode ser observado um aumento da motilidade espermática com a substituição do leite em pó pela gema de ovo (Vasconcelos *et al.*, 2015).

Mesmo com resultados positivos, ainda assim o uso da gema de ovo traz algumas dúvidas sobre seu real efeito (Leite *et al.*, 2011). Para tanto, o emprego de um diluidor originalmente criado e utilizado para resfriamento do sêmen de suínos, vem apresentando bons resultados como solução diluidora para o sêmen de peixes nativos (Viveiros *et al.*, 2014a), o Belstville Thawing Solution ou simplesmente BTS® já foi testado em *B. insignis* (Viveiros *et al.*, 2012a); *B. nattereri* (Oliveira *et al.*, 2007; Viveiros *et al.*, 2012b); *B. orbignyanus* (Andrade *et al.*, 2014; Viveiros *et al.*, 2015); *C. macropomum* (Varela Junior *et al.*, 2012; Garcia *et al.*, 2015; Varela Junior *et al.*, 2015); *Leporinus obtusidens* (Viveiros *et al.*, 2008) e *P. mesopotamicus* (Streit Jr *et al.*, 2006), com resultados satisfatórios e superiores muitas vezes a outros meios diluidores. No entanto, vem sendo testado um possível meio diluidor, que manipulado de sua forma original pode ser empregado como meio diluidor de sêmen para espécies de peixes nativos brasileiros. Conhecido como ACP® - Água de Coco em Pó/ACP Biotecnologia (Viveiros *et al.*, 2010), o meio já fora testado em trabalhos com espécies como; *B. orbignyanus* (Viveiros *et al.*, 2008); *C. macropomum* (Garcia *et al.*, 2015; Melo-Maciel *et al.*, 2015); *L. obtusidens* (Viveiros *et al.*, 2008); *P. lineatus* (Viveiros *et al.*, 2008; Viveiros *et al.*, 2010; Viveiros *et al.*, 2014b) e *Salminus brasiliensis* (Zanandrea *et al.*, 2014). Porém ainda existem recomendações de mais testes (Zanandrea *et al.*, 2014).

Agentes crioprotetores

Os agentes crioprotetores sejam eles internos – permeáveis ou externos – impermeáveis, são fundamentais para o sucesso da criopreservação (Mazur, 2004). As condições químicas para a escolha de um agente crioprotetor é que este deva ter baixa toxidez e alta solubilidade em água, ser capaz de penetrar a membrana espermática facilmente, se ligar com moléculas de água (Chao e Liao, 2001). A toxicidade dos agentes crioprotetores é dependente do tipo de crioprotetor utilizado e sua concentração, do tempo de equilíbrio entre crioprotetor e célula e a temperatura/taxa de congelamento e descongelamento utilizados na aplicação da técnica (Chao e Liao, 2001).

Podemos considerar como agentes crioprotetores externos os açúcares, leite em pó, gema de ovo e água de coco (Murgas *et al.*, 2014; Viveiros *et al.*, 2014a), esses são comumente utilizados em conjunto com as soluções diluidoras e essencialmente necessitam da presença de uma agente crioprotetor interno para compor a solução crioprotetora.

Os agentes crioprotetores internos ou permeáveis, comumente encontrados na literatura para espécies nativas brasileira de água doce são; Dimetilsulfóxido – DMSO, Dimetilformamida – DMF, Etilenoglicol – EG, Metilglicol – MG e o Metanol – MET (Viveiros *et al.*, 2014a). Nas espécies brasileiras estudadas, em sua grande maioria, foram testados mais de um crioprotetor, e mesmo atualmente podem ser encontrados trabalhos com bons resultados com os diferentes agentes crioprotetores em espécies iguais. A diversificação no uso de diferentes crioprotetores permeáveis para as espécies de peixes existentes pode ser atribuído a efeitos mesmo biológicos e

morfológicos de cada espécie (Asturiano *et al.*, 2016), ou mesmo da qualidade dos gametas dentro de cada espécie (Bobe e Labbé, 2010).

Os resultados obtidos com as pesquisas realizadas na área para as espécies nativas brasileiras de água doce apontam resultados satisfatórios com os diferentes agentes crioprotetores. Em *B. orbignyanus*, foi avaliada a eficiência de soluções crioprotetoras compostas com DMSO, MET ou MG, e Viveiros *et al.* (2015) observaram que a motilidade espermática com MG fora de 63%, considerado resultados satisfatórios e superiores aos demais crioprotetores. No entanto Galo *et al.* (2011), realizaram a criopreservação seminal da mesma espécie utilizando DMSO, e observar que as anormalidades espermáticas sofridas após a criopreservação não são superiores ao sêmen fresco. Contudo, Andrade *et al.* (2014) demonstram que as células espermáticas criopreservadas com DMSO não apresentavam motilidade espermática, recomendando assim a utilização do MET ou EG. Outra espécie nativa com inúmeros estudos é *P. lineatus*, que por sua vez teve a recomendação da utilização do DMSO ao invés de MET como agente crioprotetor (Carolsfeld *et al.*, 2003). Entretanto, Vasconcelos *et al.* (2015) observam que a solução crioprotetora contendo MET como agente crioprotetor, pode apresentar taxa de motilidade superiores aos DMSO. Por outro lado, recentemente Viveiros *et al.* (2015) avaliaram os crioprotetores DMSO, MET ou MG na solução crioprotetora e observaram que as melhores taxas de motilidade são alcançadas com a solução que continha MG.

As variações são encontradas na utilização e escolha dos agentes crioprotetores também sobre a espécie nativa mais produzida no Brasil, o *C. macropomum*, um dos protocolos considerados pioneiros para a espécie recomenda a utilização de EG como agente crioprotetor (Maria *et al.*, 2011). Porém, ao avaliar a ação de diferentes crioprotetores em células espermáticas criopreservadas, Varela Junior *et al.* (2012) apresentam como alternativa o DMF. Todavia Garcia *et al.* (2015), utilizando o DMSO como base para testes de soluções diluidoras, observam que a solução crioprotetora pode manter a integridade do DNA espermático quase que em sua totalidade utilizando o DMSO. Cabe ressaltar que possivelmente a escolha final do crioprotetor caberá ao técnico responsável por executar a criopreservação, que através de avaliação dos efeitos do agente nas células da espécie em interesse, custos e benefícios optará pela solução mais adequada (Garcia *et al.*, 2016a).

Avaliação do Sêmen de Peixes

As avaliações seminais podem ser realizadas desde a forma mais simples e objetiva por meio de microscopia óptica (indiretamente) ou mesmo por meio de sistemas computadorizados de avaliação seminal (CASA – Image J), que analisam diferentes dados dos parâmetros espermáticos (Cabrita *et al.*, 2010).

Atualmente analisar com precisão a verdadeira qualidade do sêmen é um fator decisivo para a sua avaliação, isto porque, comumente avaliações mais simples ou básicas não fornecem informações seguras para garantir que realmente as células espermáticas terão capacidade física e/ou biológica de fertilizar o oócito. Ainda com a evolução dos campos das pesquisas e tecnologias, aferir informações com mais precisas sobre o sêmen criopreservado tem se tornado recorrente (Cabrita *et al.*, 2010; Cabrita *et al.*, 2014; Asturiano *et al.*, 2016; Robles *et al.*, 2016).

Dentre as informações sobre as características seminais, a motilidade espermática ainda é a mais utilizada para aferir a qualidade do sêmen (Asturiano

et al., 2016), e essa informação pode ser considerada padrão de qualidade (Cosson *et al.*, 2008). Porém acredita-se que a combinação de mais fatores pode aferir melhor a real qualidade do sêmen principalmente após a criopreservação (Garcia *et al.*, 2016a).

A avaliação da motilidade espermática em sua grande maioria nas espécies nativas brasileiras é realizada de forma subjetiva, porém observa-se que a utilização de sistemas computadorizados vem crescendo no campo da pesquisa para aferir esta variável com uma maior segurança (Garcia *et al.*, 2016a), porém, as avaliações realizadas subjetivamente através de um técnico treinado podem produzir resultados semelhantes ao de um sistema computadorizado de avaliação seminal (Nascimento *et al.*, 2010; Viveiros *et al.*, 2010). Contudo apesar da dificuldade a comparação de resultados entre taxas de motilidade, por virtude da metodologia utilizada em cada experimento, Viveiros *et al.* (2015) observaram que após a criopreservação, a motilidade espermática avaliada através do CASA de *P. lineatus* foi 26%. Por outro lado, Andrade *et al.* (2014) observaram através de análise subjetiva 74,6% de espermatozoides móveis. Cabe ressaltar que ambos autores utilizaram soluções crioprotetores semelhantes (DMSO+BTS®), contudo houve uma ampla variação nos resultados. Já em *C. macropomum*, Garcia *et al.* (2015) utilizaram avaliação subjetiva para analisar a qualidade seminal após a criopreservação, observaram motilidade espermática de 18,5%, este resultado foi próximo do encontrado por Melo-Maciel *et al.* (2015), quando avaliaram através do CASA e observaram motilidade de 20,8%. Ambos os autores também utilizaram soluções crioprotetoras semelhantes (DMSO+ACP-104®).

A motilidade espermática pode ser considerada a primeira avaliação utilizada para aferir a qualidade seminal (Nascimento *et al.*, 2010), principalmente por estar associada ao sucesso reprodutivo na fertilização (Kime *et al.*, 2001), visto que considera-se uma célula espermática de qualidade aquela que é capaz de fertilizar o oócito (Rurangwa *et al.*, 2004). Contudo a avaliação da taxa de fertilização não só depende da motilidade apesar de estar correlacionada, mas também de outros fatores (Rurangwa *et al.*, 2004; Cabrita *et al.*, 2010; Cabrita *et al.*, 2014; Asturiano *et al.*, 2016).

Exemplificando, a qualidade do sêmen criopreservado de *P. lineatus* foi mensurada através da taxa de fertilização, com uma média geral de 74% de embriões viáveis (Viveiros *et al.*, 2009). Todavia, o potencial de diferentes agentes crioprotetores e suas concentrações foram utilizados para criopreservação de sêmen de *C. macropomum* onde também foi avaliado a fertilização e as maiores médias obtidas 91,6% com DMF – 8% e 83,0% com MF – 8% (Varela Junior *et al.*, 2012). A maneira que o sêmen criopreservado é ativado pode influenciar também na taxa de fertilização, pois ao ativar com alguma solução osmoticamente balanceada, evita-se o choque osmótico, melhorando a capacidade de motilidade do espermatozoide, conseqüentemente a fertilização. Este fato pode ser observado em *R. quelen* que ao ativar o sêmen criopreservado com água destilada a taxa de fertilização ficou em torno de 30%, e ao utilizar uma solução balanceada com frutose, a fertilização ficou ao redor de 60% (Adames *et al.*, 2015).

O surgimento de novos estudos e técnicas a serem aplicadas para avaliar a qualidade seminal já é uma realidade, como por exemplo, a aplicação de corante e fluorescência para observar a integridade e permeabilidade da membrana espermática após o descongelamento, bem como a morfologia e

ultraestrutura com microscopias de varredura e transmissão, a um nível organoléptico da célula, onde é avaliado o efeito da criopreservação nas mitocôndrias, alcançando por final a escala molecular, onde são observados os efeitos da técnica nas proteínas, RNAs e DNAs das células (Cabrita *et al.*, 2010; Cabrita *et al.*, 2014; Asturiano *et al.*, 2016; Robles *et al.*, 2016).

Outras Abordagens para Aferir a Qualidade Reprodutiva

Com o objetivo de melhorar a compreensão sobre a qualidade reprodutiva, ferramentas estatísticas estão sendo aplicadas para avaliar a qualidade espermática ou mesmo correlacionar as características reprodutivas com fenotípicas, essas informações podem definir possíveis reprodutores que apresentaram características reprodutivas superiores quando comparado a outros reprodutores.

Clusters como ferramenta para análise seminal

Inúmeras pesquisas já foram realizadas utilizando a ferramenta estatística multivariada através de análise de clusters para avaliar a qualidade seminal (Martínez-Pastor *et al.*, 2008; Beirão *et al.*, 2009; Beirão *et al.*, 2011; Kanuga *et al.*, 2012; Güllü *et al.*, 2015). Essa ferramenta auxilia a maximizar a utilização dos dados, dando uma nova abordagem para descrever as características seminais, Martínez-Pastor *et al.* (2008) descreveram que esta ferramenta estatística é útil para observar subpopulações espermáticas em *Solea senegalensis*, e que mesmo os reprodutores estando nas mesmas condições podem apresentar diferenças espermáticas. Segundo Beirão *et al.* (2009), que aplicaram a ferramenta de análise de clusters na mesma espécie descrita acima, foi possível encontrar subpopulações espermáticas nos reprodutores utilizados, e que é possível selecionar reprodutores pelas características seminais.

Ao avaliarem as características plasmáticas seminais (concentração de proteína, uréia, triglicerídeos, glicose, Ca⁺, Na⁺, K⁺, Mg²⁺, pH, osmolaridade, volume e densidade) de *Bradus grypus*, os autores puderam observar através de análise de clusters que existe a formação de grupos que apresentam diferentes taxas de motilidade (porcentagem e duração) entre os reprodutores (Güllü *et al.*, 2015). Já em *Oncorhynchus mykiss*, foi relatado a formação de grupos durante a utilização de meios para ativação da motilidade espermática (Kanuga *et al.*, 2012).

Quando o efeito da criopreservação realizada com diferentes crioprotetores foi avaliada em *Sparus aurata*, os autores puderam concluir que as motilidades espermáticas formam subpopulações dentre os reprodutores quando os crioprotetores são diferentes, e mesmo o processo de congelamento pode interferir na formação de grupos juntamente com a combinação dos crioprotetores (Beirão *et al.*, 2011).

Recentemente as abordagens sobre subpopulações foi verificada no sêmen de reprodutores *C. macropomum*, e antes da criopreservação os autores observaram a formação de três subpopulações segundo as motilidades espermáticas (VCL, VAP, VSL), e após o descongelamento do sêmen, as motilidades apresentaram a formação de duas subpopulações (Gallego *et al.*, 2017).

Correlações seminais

As correlações são muito utilizadas em mamíferos para realizar predições reprodutivas e genéticas (Barrozo *et al.*, 2012; Ahmed *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2016; Reis *et al.*, 2016). Em peixes, essa ferramenta estatística é apresentada

principalmente entre as variáveis espermáticas avaliadas, Varela Junior *et al.* (2012) apontaram que a taxa de fertilização tem correlação positiva ($r = 0,42$) com a motilidade espermática em *C. macropomum* após a criopreservação. Semelhante caso acontece em *P. lineatus* (Viveiros *et al.*, 2010), quando após a criopreservação, a taxa de fertilização apresentou correlação com as motilidades VCL ($r = 0.80$), VSL ($r = 0.56$) e VAP ($r = 0.72$). E no estudo com diferentes crioprotetores para criopreservação seminal de *B. orbignyianus* e *P. lineatus* (Viveiros *et al.*, 2015), a motilidade espermática apresentou correlação com a integridade da membrana ($r = 0.92$) e funcionalidade da mitocôndria ($r = 0.71$) após a criopreservação.

Entre outras espécies a ferramenta de correlação é usada para apontar inúmeros fatores, como por exemplo, em *Acipenser persicus*, foi observado que existe uma estreita correlação ($r = 0.53$) entre os níveis de concentração iônica e espermática com a função reguladora para composição iônica (principalmente o íon de K^+) durante a espermição (Aramli *et al.*, 2013). E em *Danio rerio* foi descrito a correlação de agentes causadores de toxicidade na qualidade seminal (Gerber *et al.*, 2016). Em *Brabus grypus*, foi observado que a concentração de glicose e nível do pH estão correlacionado com a motilidade espermática (Khodadadi *et al.*, 2016). Dentre os fatores avaliados, a correlação negativa do Ca^+ pode influenciar na duração da motilidade espermática em *Rutilus frisii* (Fallah Shamsi e Khara, 2015). Já a fertilização tem alta correlação com o pH e concentração espermática em *Huso huso* (Aramli *et al.*, 2015)

HIPÓTESES

As características seminais do *B. insignis* quanto a motilidade, tempo de motilidade, concentração e alterações morfológicas podem ser afetadas pela indução hormonal.

O sêmen de reprodutores *C. macropomum* pode ser conservado com viabilidade sob resfriamento por um período de 120 horas se for diluído em soluções diluidoras.

O sêmen dos reprodutores *C. macropomum* possuem variações quali-quantitativas após a criopreservação mesmo quando a técnica é aplicada sobre os animais nas mesmas condições.

As características seminais após a criopreservação, estão correlacionadas com as características fenotípicas e do sêmen fresco dos reprodutores *C. macropomum*.

OBJETIVOS

Geral;

Em reprodutores *B. insignis* avaliar os efeitos da indução hormonal nas características seminal, e em reprodutores *C. macropomum* avaliar a qualidade seminal após a diluição e o resfriamento e após a criopreservação avaliar a qualidade do sêmen criopreservado e correlacionar com possíveis indicadores de qualidade seminal.

Específicos;

Avaliar os efeitos da indução hormonal realizada por meio de diferentes hormônios e níveis de posologia quanto a influência nas características do sêmen de *B. insignis*, através de microscopia optica analisando parâmetros de motilidade, tempo de motilidade, morfologia espermática e concentração espermática.

Avaliar por meio de microscopia optica os parâmetros de motilidade, tempo de motilidade, vigor e morfologia espermática, quanto a qualidade do sêmen diluído e resfriado a temperatura de 6 °C dos reprodutores *C. macropomum* ao longo de 120 horas.

Verificar a qualidade do sêmen criopreservado dos reprodutores *C. macropomum* por meio microscopia optica, computadorizada e citometria de fluxo analisando parametros de motilidades espermáticas, morfologia espermática e integridades celulares dos reprodutores criados e mantidos sobre o mesmo sistema de criação.

Determinar por meio das características seminais a existência de diferentes grupos de reprodutores *C. macropomum* que apresentem melhores resultados quanto a qualidade seminal após a criopreservação seminal.

Correlacionar as características seminais após a criopreservação com as características fenotípicas de peso, comprimento total, padrão e altura dos reprodutores *C. macropomum*.

Correlacionar as características seminais após a criopreservação de reprodutores *C. macropomum* com as características do sêmen fresco de motilidade, tempo de motilidade, concentração e morfologia espermática.

CAPÍTULO II[‡]

[‡] Artigo publicado na Revista Acta Scientiarum – Biological Sciences em outubro de 2015.

Seminal characteristics of piabanha before and after induction with different hormones

Raycon Roberto Freitas Garcia^{1*}, Ana Carina Nogueira Vasconcelos¹, Jayme Aparecido Povh², Janessa Sampaio de Abreu Ribeiro³, Lidiane Raquel Eloy¹ and Danilo Pedro Streit Junior¹

¹Departamento de Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 7712, 91540-000, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. ²Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. ³Departamento de Zootecnia e Extensão Rural, Faculdade de Agronomia, Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá, Mato Grosso, Brazil. *Author for correspondence. E-mail: raycongarcia@live.com

ABSTRACT. The migratory species piabanha does not reproduce in lentic environments since it requires environmental stimuli for the maturation and extrusion of gametes, and therefore hormonal induction is mandatory. Current study compares the seminal characteristics of *Brycon insignis* without any hormonal induction (Control - Ctrl) and with two types of hormonal inductors, or rather, carp pituitary extract (T1 - 2.5 mg kg⁻¹ body weight) and GnRH analogues, the latter applied in two different concentrations (T2 - 0.7 mg kg⁻¹ body weight and T3 - 1.4 mg kg⁻¹ body weight). Post-induction analyses showed that the hormones increased the motility rate - Ctrl (95%), T1 (100%), T2 (100%) and T3 (98%), although sperm concentration - Ctrl (11.52 x 10⁹); T1 (4.37 x 10⁹); T2 (4.34 x 10⁹); T3 (4.01 x 10⁹) decreased. Assessments for sperm vigor, motility time and spermatid morphology did not vary with hormonal induction. Hormonal inducer does not alter negatively the seminal characteristics of the piabanha, and the choice for the proper hormone depends on the preference of the dispenser.

Keywords: *Brycon insignis*, carp pituitary extract, GnRH analogues, sperm.

Características seminais de piabanha antes e após a indução com diferentes hormônios

RESUMO. A espécie migradora piabanha não possui a capacidade de reproduzir em ambientes lênticos devido à necessidade de estímulos ambientais para a maturação e extrusão dos gametas, por isso a necessidade da indução hormonal. No presente estudo, as características seminais do *Brycon insignis* foram comparadas sem indução hormonal (Ctrl) e utilizando dois tipos de indutores hormonais - Extrato de Hipófise de Carpa (T1 - 2,5 mg kg⁻¹ de peso vivo) e Análogos de GnRH, sendo este último aplicado em duas concentrações distintas (T2 - 0,7 mg kg⁻¹ de peso vivo e T3 - 1,4 mg kg⁻¹ de peso vivo). As análises realizadas após a indução mostraram que os hormônios utilizados produziram um aumento da taxa de motilidade - Ctrl (95%), T1 (100%), T2 (100%) e T3 (98%), porém houve uma diminuição na concentração espermática - Ctrl (11,52 x 10⁹), T1 (4,37 x 10⁹), T2 (4,34 x 10⁹) e T3 (4,01 x 10⁹). Os restantes das avaliações, vigor espermático, tempo de motilidade e morfologia espermática não apresentaram variações com a indução hormonal. Portanto, a utilização do indutor hormonal não altera negativamente as características seminais de piabanha, e a escolha do mesmo se deve à preferência do manipulador.

Palavras-chave: *Brycon insignis*, extrato de hipófise de carpa, análogos de GnRH, sêmen.

Introduction

The species *Brycon insignis*, popularly known as piabanha in Brazil (FOWLER, 1951), is one of the most fished species in the country, mainly in the Paraíba do Sul region (MACHADO; ABREU, 1952). Although highly appreciated for its meat and high market value, the *B. insignis* is scantily exploited for commercial purposes and is rather found in fish farms for restocking and conservation purposes (SHIMODA et al., 2007). Precisely for such purposes, studies on the seminal characteristics of this Brazilian native species

are of great importance, especially for the acquisition and improvement of its several reproductive traits, in captivity (VIVEIROS; GODINHO, 2009).

Like all rheophilic fish species, the piabanha needs hormone treatment to trigger and increase the release of gametes in captivity. Although hypophysation is one of the most costly methods of hormonal induction, it is the most used method in Brazil (WOYNAROVICH; HORVÁTH, 1983). Synthetic hormone compounds, such as mammalian GnRH analogues, have been successfully tested to induce fish reproduction (DAS, 2000; 2004; ULIKOWSKI, 2004; KRÓL et al., 2009; TARGOŃSKA; KUCHARCZYK, 2011), and have proved to be easy-to-use and low-cost products when compared to pituitary hormones.

Current assay compares the seminal quality of *B. insignis* before and after induction with hypophysation and GnRH analogues.

Material and methods

Place and animals

The seminal collection and evaluation of the animals were performed at a commercial fish farm in Nova Mutum, Mato Grosso State, Brazil (13°49'44"S and 56°04'56"W). During the reproductive period twelve *B. insignis* males were selected and underwent mild abdominal massage in the craniocaudal direction to release the semen.

Hormonal induction

Before the hormonal treatment, the animals were fasted for 24 hours. Breeding fish were weighed separately and subdivided into three groups according to hormones and doses: T1 – Carp Pituitary Extract (CPE - 2.5 mg kg⁻¹ body weight); T2 - GnRH analogues (0.7 mg kg⁻¹ body weight) and T3 - GnRH analogues (1.4 mg kg⁻¹ body weight). The hormone was administered near the base of the dorsal fin, with an interval of 7 hours between the application and the seminal collection.

The qualitative and quantitative seminal characteristics of each animal were evaluated before and after the administration of hormones, and the control group (Ctrl) was composed of the semen samples taken before hormonal induction.

Collection and evaluation of semen quality

Prior to the collection of the milt, the urogenital papilla was cleaned with paper towels to prevent contamination by feces or urine, and the premature activation of sperm cells. The semen was then collected by lightly massaging the coelomic wall in a craniocaudal direction and the samples were placed in sterile test tubes and kept at room temperature (23°C).

After collecting the semen, the samples, with and without hormonal induction, were analyzed by a single examiner, respecting the following protocols:

- Motility rate and sperm vigor: a 2 μL aliquot of the collected semen was diluted in 100 μL of distilled water. Subsequently, 20 μL of this dilution were placed between a slide and coverslip, and rates from 0 to 100% were assigned to the motility rate, depending on the percentage of motile sperm; and point rates from 1 to 5 were assigned to the vigor of the spermatic movement. The variables were analyzed with the 40X objective of an optical microscope.
- Motility time: when diluting the semen with distilled water in the previous analysis, a stopwatch was started and only stopped when the sperm's flagellar beats ceased. Motility rates were calculated in seconds.
- Concentration and sperm morphology: a 2 μL aliquot of semen was diluted in 2000 μL of saline-buffered formalin. Sperm concentration was obtained from this dilution by a Neubauer chamber under a 100X objective, counting the number of sperms present on the slide. In the case of sperm morphology, a sample of the initial dilution (100 μL) was placed on a histological slide and stained with Rose Bengal, following Streit Junior et al.

(2004). Sperm morphology was evaluated according to Miliorini et al. (2011), sorting the sperm into the categories 'normal' and 'abnormal'.

Experimental design

The design was completely randomized, with control and three treatments (Ctrl - without induction; T1: CPE - 2.5 mg kg⁻¹ body weight; T2: GnRH analogues 0.7 mg kg⁻¹ body weight; T3: GnRH analogues 1.4 mg kg⁻¹ body weight). A normal analysis for all dependent variables was performed with Shapiro-Wilk test. The sperm motility and vigor were converted into a rannor function and the variable "sperm concentration" was converted into a logarithm. Collected data were submitted to an F test for analysis of variance; when differences between the means were detected, Tukey's test was performed at a significance level of 5%. Analyses were performed with the General Linear Model (GLM) by Statistical Analysis System, version 9.4 (SAS, 2013).

Results and discussion

Motility rate was higher ($p < 0.05$) in treatments T1 and T2 when compared to control group, but sperm concentration was significantly reduced ($p < 0.05$) by hormonal induction in all treatments. The variables sperm vigor and motility time showed no difference between treatments (Table 1).

Hormone inducement in reproduction increases plasma, sperm production and motility rates (CLEARWATER; CRIM, 1998). Improvement in sperm quality in current study may probably be justified by the composition of hormones chosen. In fact, carp pituitary extract is composed of 11-ketotestosterone, testosterone, 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one or 17.20 β ,21-trihydroxy-4-pregnen-3-one (SCHULZ; MIURA, 2002), whereas GnRH analogues comprise D-Ala₆, Pro₉Net-mGnRH, metoclopramide and dopamine (DAS, 2004).

Table 1. Qualitative and quantitative parameters of the semen of *B. insignis* before and after induction, with different hormones and dosages.

Variable	Ctrl	T1	T2	T3	P*
MR (%) ⁽¹⁾	95.83 ± 6.10b	100.00 ± 0.00a	100.00 ± 0.00a	98.75 ± 2.50ab	0.0283
SC (x10 ⁹) ⁽²⁾	11.42 ± 6.69 ^a	4.37 ± 1.69 ^b	4.34 ± 2.41 ^b	4.01 ± 0.53 ^b	0.0012
SV (1-5) ⁽³⁾	1.92 ± 0.90	3.00 ± 0.82	2.75 ± 0.96	3.00 ± 0.92	0.4179
MT (seg.) ⁽⁴⁾	58.33 ± 8.07	63.25 ± 4.99	64.50 ± 10.63	65.50 ± 12.12	0.4197

Statistical differences for dependent variables are represented by letters on the same line. Ctrl - Control (without hormonal induction); T1 - Carp Pituitary Extract (CPE - 2.5 mg kg⁻¹ body weight); T2 - GnRH analogues (0.7 mg kg⁻¹ body weight) and T3 - GnRH analogues (1.4 mg kg⁻¹ body weight). (1) - MR (Motility Rate); (2) - SC (Sperm Concentration); (3) - SV (Sperm Vigor); (4) - MT (Motility Time).

Previous studies on hormonal administration show lower motility rates than those found in current analysis. Andrade-Talmelli et al. (2001) employed hCG and obtained a 90% rate in their evaluation of *B. insignis* semen, while Pardo-Carrasco et al. (2006) reported motility rates between 49 and 86% in the semen of *Brycon amazonicus* subjected to different hormonal inducers, respectively, CPE and GnRH-a. In a study on *Brycon nattereri* (OLIVEIRA et al., 2007) motility was evaluated at around 100% after hormonal induction with CPE, corroborating result in current assay.

Despite increased motility rate after induction, the spermatic vigor did not change. Response pattern in *B. insignis* was similar to that observed by Streit Junior et al. (2008b) in the species *Salminus maxillosus*, where they failed to report any difference before and after induction with CPE. Hormonal induction with CPE altered the sperm vigor in another rheophilic species, *Leporinus elongatus*, reducing it from 2.93 to 2.37 (STREIT JUNIOR et al., 2008a).

The duration of sperm motility generally coincides with the time the micropyle oocyte remains open (COSSON, 2004). In current study, sperm motility lasted about 65 seconds in hormone-induced animals. This time was considered sufficient for fertilization of oocytes in artificial reproduction since the micropyle closed minutes after hydration of

the structure by water (NAKATANI, 2001). In another *Brycon* species, the reported average motility time was lower than that in current study, with approximately 34 seconds in *B. amazonicus* induced with GnRH-a (PARDO-CARRASCO et al., 2006), and with approximately 39 seconds in *B. orthotaenia* induced with CPE (MELO; GODINHO, 2006). Motility times are also quite variable in other South American neotropical fish species, and rates between 128 and 164 seconds have been reported for *Prochilodus lineatus* induced with GnRH-a (PAULA et al., 2012) and 486 seconds for *Piaractus mesopotamicus* induced with CPE (MARIA et al., 2004).

In the case of sperm concentration, a great variation exists among species of teleosts (VIVEIROS; GODINHO, 2009) and even within the same species. Semen of *B. insignis* induced with CPE (CPE 0.5 mg kg⁻¹ body weight) was more concentrated than that in current study, or rather, 24.38 x 10⁹ (SHIMODA et al., 2007).

When compared to that reported prior to hormonal induction in the control group (11,4 x 10⁹), reduction in sperm concentration after induction in all treatments (average of 4.29 x 10⁹) may be due to testicular hydration caused by hormonal induction (SCHULZ; MIURA, 2002; VIVEIROS et al., 2002;. MARIA et al., 2011). According to Maria and Carneiro (2012), testicular hydration increased seminal volume in assisted reproduction and a better handling of gametes. The importance of sperm concentration in determining the correct sperm:oocyte ratio is worth mentioning since it enhances a better fertilization rate (BOMBARDELLI et al., 2006; SANCHEZ et al., 2009; LEITE et al., 2013).

The morphological analysis of semen showed no significant difference between control and treatments ($p>0.05$) (Tables 2 and 3).

Table 2. Assessment of sperm morphology before and after hormone induction, with different dosages and hormones in *B. insignis*.

Variable	Ctrl	T1	T2	T3	P*
NS (%) ⁽¹⁾	39.99 ± 5.00	41.14 ± 4.80	28.35 ± 14.63	31.21 ± 13.61	0.2854
PC (%) ⁽²⁾	2.64 ± 2.29	1.50 ± 0.93	2.12 ± 1.34	2.29 ± 1.44	0.2685
SC (%) ⁽³⁾	57.36 ± 5.55	57.37 ± 4.28	69.53 ± 13.57	66.50 ± 13.23	0.3611

Ctrl - Control (without hormonal induction); T1 – Carp Pituitary Extract (CPE - 2.5 mg kg⁻¹ body weight); T2 - GnRH analogues (0.7 mg kg⁻¹ body weight) and T3 - GnRH analogues (1.4 mg kg⁻¹ body weight). (1) - NS (Normal Sperm); (2) - PC (Primary Change); (3) - SC (Secondary Change).

Table 3. Percentage distribution of damages on semen before and after induction, with different hormones and dosages.

Variables ⁽¹⁾	Ctrl	T1	T2	T3	P*
Macro	0.25 ± 0.47	0.00 ± 0.00	0.25 ± 0.44	0.30 ± 0.52	0.0835
Micro	0.34 ± 0.66	0.51 ± 0.44	0.81 ± 0.84	0.99 ± 0.86	0.1601
PCD	0.24 ± 0.68	0.21 ± 0.37	0.25 ± 0.44	0.00 ± 0.00	0.1385
DCD	1.82 ± 2.40	0.78 ± 0.83	0.79 ± 0.84	1.00 ± 1.16	0.9922
IH	5.01 ± 2.37	2.55 ± 0.90	1.71 ± 1.57	2.07 ± 2.95	0.4873
DH	0.81 ± 0.97	1.20 ± 1.42	1.82 ± 0.61	2.80 ± 1.97	0.1239
MD	0.55 ± 0.66	0.44 ± 0.38	0.28 ± 0.49	0.98 ± 1.10	0.1601
FT	33.36 ± 6.29	35.31 ± 5.22	45.30 ± 10.46	37.94 ± 10.63	0.2116
BT	6.69 ± 4.19	8.68 ± 4.66	8.43 ± 5.94	6.63 ± 4.60	0.6919
CT	2.24 ± 1.50	3.16 ± 2.08	6.03 ± 6.11	5.22 ± 3.96	0.6689
DT	8.70 ± 6.51	6.01 ± 1.75	5.96 ± 2.16	10.85 ± 4.18	0.3716

Ctrl - Control (without hormonal induction); T1 – Carp Pituitary Extract (CPE - 2.5 mg kg⁻¹ body weight); T2 - GnRH analogues (0.7 mg kg⁻¹ body weight) and T3 - GnRH analogues (1.4 mg kg⁻¹ body weight). (1) - Variables: Macro (Macrocephaly); Micro (microcephaly); PCD (Proximal Cytoplasmic Droplet) and DCD (Distal Cytoplasmic Droplet); IH (Isolated Head); DH (Degenerated Head); MD (Midpiece Degenerated); FT (Folded Tail); BT (Broken Tail); CT (Coiled Tail); DT (Degenerate Tail).

Cell morphology in current assay was not altered by hormonal inductors. Result was similar to assay on *Cyprinus carpio* (MORAES et al., 2004), *Prochilodus lineatus*

(MORAES et al., 2004) and *P. mesopotamicus* (STREIT JUNIOR et al., 2006). However, the CPE induction reduced the occurrence with abnormal sperm of *C. macropomum* from 25 to 15% after hormone administration (MARIA et al., 2011). According to Streit Junior et al. (2008b), sperm morphology is an important parameter for assessment and is related to the low rate of fertilization and motility.

Although varying among species, morphology may also be changed within the same species, according to treatment. The use of different hormones in *Leporinus macrocephalus* showed different rates for the number of normal sperm, namely, 51% with CPE and 31.2% with rabbit pituitary extract (MORAES et al., 2004).

Although a classification standard exists for sperm pathologies in mammalian semen (CBRA, 2013), there is still no standard of acceptable conditions in fish (MILIORINI et al., 2011) and the great variation in the neotropical species of South America makes it difficult to conduct comparative studies.

Conclusion

Hormone induction in *Brycon insignis* with carp pituitary extract and GnRH analogues enhanced a greater seminal motility rate when compared to that of specimens with no additional hormones. Contrastingly, induction caused an increase in seminal plasma, the effects of which could be observed in the low concentration of sperm cells in the semen of hormone-induced animals.

References

ANDRADE-TALMELLI, E.; KAVAMOTO, E. T.; FENERICH-VERANI, N. Características seminais da piabanha, *Brycon insignis* (Steindachner, 1876), após estimulação hormonal. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 27, n. 2, p. 149-154, 2001.

CBRA-Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3. ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013.

BOMBARDELLI, R. A.; MÖRSCHBÄCHER, E. F.; CAMPAGNOLO, R.; SANCHES, E. A.; SYPPERRECK, M. A. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá cinza, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimardm, 1824). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 4, p. 1251-1257, 2006.

CLEARWATER, S.; CRIM, L. Gonadotropin releasing hormone-analogue treatment increases sperm motility, seminal plasma pH and sperm production in yellowtail flounder *Pleuronectes ferrugineus*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 19, p. 349-357, 1998.

COSSON, J. The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa. **Aquaculture International**, v. 12, p. 69-85, 2004.

DAS, S. Evaluation of a new spawning agent, Ovopel in induced breeding of Indian carps. **Asian Fisheries Science**, v. 17, p. 313-322, 2004.

DAS, S. Ovopel enters — major carps and magur breeding success in Assam with Hungarian Ovopel. **Fish Chimes**, v. 20, p. 10-11, 2000.

FOWLER, H. W. **Os peixes de água doce do Brasil**. São Paulo: Departamento de Zoologia da Secretaria da Agricultura, 1951.

KRÓL, J.; KOWALSKI, R.; HLIWA, P.; DIETRICH, G.; STABIŃSKI, R.; CIERESZKO, A. The effects of commercial preparations containing two different GnRH analogues and dopamine antagonists on spermiation and sperm characteristics in the European smelt *Osmerus eperlanus* (L.). **Aquaculture**, v. 286, p. 328-331, 2009.

LEITE, L.; MELO, M.; OLIVEIRA, F.; PINHEIRO, J.; CAMPELLO, C.; NUNES, J.; SALMITO-VANDERLEY, C. Determination of insemination dose and embryonic development in the artificial fertilization of tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 2, p. 421-429, 2013.

MACHADO, C.; ABREU, H. Notas preliminares sobre a caça e a pesca no Estado de São Paulo - I. A Pesca no Vale do Paraíba. **Boletim de Indústria Animal**, v. 13, p. 145-160, 1952.

MARIA, A. N.; CARNEIRO, P. C. F.; Criopreservação de sêmen de peixe no Brasil: estado da arte e perspectivas futuras. **Ciência Animal**, v. 22, n. 1, p. 124-131, 2012.

MARIA, A. N.; AZEVEDO, H. C.; SANTOS, J. P.; CARNEIRO, P. C. F. Hormonal induction and semen characteristics of tambaqui *Colossoma macropomum*. **Zygote**, v. 20, p. 39-43, 2011.

MARIA, A. N.; MURGAS, L. D. S.; SILVA, M. O. B.; MILIORINI, A. B.; FRANCISCATTO, R. T.; LOGATO, P. V. R. 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, n. 1, p. 191-194, 2004.

- MELO, F.; GODINHO, H. A protocol for cryopreservation of spermatozoa of the fish *Brycon orthotaenia*. **Animal Reproduction**, v. 3, n. 3, p. 380-385, 2006.
- MILIORINI, A. B.; MURGAS, L. D. S.; ROSA, P. V.; OBERLENDER, G.; PEREIRA, G. J. M.; COSTA, D. V. A morphological classification proposal for curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm damages after cryopreservation. **Aquaculture Research**, v. 42, p. 177-187, 2011.
- MORAES, G. V.; STREIT JUNIOR, D. P.; RIBEIRO, R. P.; SAKAGUTI, E. S.; SOUZA, E.; POVH, J. A. Ação de diferentes indutores reprodutivos hormonais no aparecimento de anormalidades morfológicas em espermatozoides de piavuçu (*Leporinus macrocephalus*), curimatá (*Prochilodus lineatus*) e carpa comum (*Cyprinus carpio*). **Boletim do Instituto da Pesca**, v. 30, n. 2, p. 109-116, 2004.
- NAKATANI, K. 2001. Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e manual de identificação. Maringá: EDUEM. 2001.
- OLIVEIRA, A.; VIVEIROS, A. T. M.; MARIA, A. N.; FREITAS, R.; IZAÚ Z. Sucesso do resfriamento e congelamento de sêmen de pirapitinga *Brycon nattereri*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 6, p. 1509-1515, 2007.
- PARDO-CARRASCO, S. C.; ZANIBONI-FILHO, E.; ARIAS-CASTELLANOS, J. A.; SUÁREZ-MAHECHA, H.; ATENCIO-GARCÍA, V. J.; CRUZ-CASALLAS, P. E. Evaluation of milt quality of the yamú *Brycon amazonicus* under hormonal induction. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v. 19, n. 2, p. 134-139, 2006.
- PAULA, D. A.; ANDRADE, E. S.; MURGAS, L. D.; FELIZARDO, V. O.; WINKALER, E. U.; ZEVIANI, W.; FREITAS, R. T. Vitamin E and reduced glutathione in *Prochilodus lineatus* (curimba) semen cryopreservation (Characiformes: Prochilodontidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 10, n. 3, p. 661-665, 2012.
- SANCHES, E. A.; BOMBARDELLI, R. A.; BAGGIO, D. M.; SOUZA, B. E. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de dourado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n.11, p. 2091-2098, 2009.
- SAS - Statistical Analysis System. **User's Guide**. Version 9.4. Cary: SAS Institute Inc. 2013.
- SCHULZ, R. W.; MIURA, T. Spermatogenesis and its endocrine regulation. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 26, p. 43-56, 2002.
- SHIMODA, E.; ANDRADE, D. R.; VIDAL JUNIOR, M. V.; YASUI, G. S.; GODINHO, H. P.; SILVA, J. F. S.; SOUSA, G. Utilização do espermátocrito para estimar a concentração espermática no sêmen da piabanha (*Brycon insignis*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 44, suppl, p. 19-24, 2007.
- STREIT JUNIOR, D. P.; BENITES, C.; MORAES, G. V.; RIBEIRO, R. P.; SAKAGUTI, E. S.; CALDIERI, R. F. Sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) criopreservado com

diluentes utilizados para sêmen de suínos. **Ciência Animal Brasileira**, v. 7, n. 3, p. 289-297, 2006.

STREIT JUNIOR, D. P.; MORAES, G.; RIBEIRO, R. P.; POVH, J. A.; SOUZA, E.; OLIVEIRA, C. Avaliação de diferentes técnicas para coloração de sêmen de peixes. **Arquivos de Ciência Veterinária e Zoologia**, v. 7, n. 2, p. 157-162, 2004.

STREIT JUNIOR, D. P.; SIROL, R. N.; RIBEIRO, R. P.; MORAES, G. V.; MENDEZ, L. D. V.; WATANABE, A. L. Qualitative parameters of the piapara semen (*Leporinus elongatus* Valenciennes, 1850). **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, n. 2, p. 373-377, 2008a.

STREIT JUNIOR, D. P.; SIROL, R. N.; RIBEIRO, R. P.; MORAES, G.; GALO, J. M.; DIGMYER, M. Parâmetros qualitativos do sêmen de dourado (*Salminus maxillosus*) em cativeiro. **Boletim do Instituto da Pesca**, v. 34, n. 3, p. 337-344, 2008b.

TARGOŃSKA, K.; KUCHARCZYK, D. The application of hCG, CPH and Ovopel in successful artificial reproduction of Goldfish (*Carassius auratus auratus*) under controlled conditions. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, p. 651-655, 2011.

ULIKOWSKI, D. European catfish (*Silurus glanis l.*) Reproduction outside of the spawning season. **Archives of Polish Fisheries**, v. 12, n. 2, p. 121-131, 2004.

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

VIVEIROS, A. T. M.; FESSEHAYE, Y.; TER VELD, M.; SCHULZ, R.; KOMEN, J. Hand-stripping of semen and semen quality after maturational hormone treatments, in African catfish *Clarias gariepinus*. **Aquaculture**, v. 213, p. 373-386, 2002.

WOYNAROVICH, E.; HORVÁTH, L. **A propagação artificial de peixes de águas tropicais**. Brasília: FAO/CODEVASF/CNPQ, 1983.

CAPÍTULO III[§]

[§]Artigo publicado na Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira em Junho 2016.

Notas Científicas

Different extenders solutions for tambaqui semen cooling

Raycon Roberto Freitas Garcia⁽¹⁾, Ana Carina Nogueira Vasconcelos⁽¹⁾, Jayme Aparecido Povh⁽²⁾, Ender Rosana Oberst⁽¹⁾, Lidiane Raquel Eloy⁽¹⁾ and Danilo Pedro Streit Junior⁽¹⁾

⁽¹⁾Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Departamento de Zootecnia, Rua Bento Gonçalves, no 7712, CEP 91540-000 Porto Alegre, RS, Brazil. E-mail: raycongarcia@live.com, anacarina.vasconcelos@hotmail.com, oberst@ufrgs.br, lidianeloy@hotmail.com, danilo.streit@ufrgs.br. ⁽²⁾Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Avenida Senador Filinto Muller, no 2443, Vila Ipiranga, CEP 79074-460 Campo Grande, MS, Brazil. E-mail: jayme.peixegen@gmail.com.

Abstract – The objective of this work was to evaluate the efficiency of extenders solutions in tambaqui (*Colossoma macropomum*) semen cooling at 6°C. The treatments consisted of semen dilutions with three extenders – BTS, HBSS, and ACP-104 –, and a control with undiluted semen. Cooled semen was evaluated by 24, 48, 72, 96, and 120 hours. There were differences for the duration of motility and fertilization rates among the semen dilutions. Motility duration proved a highly variable evaluation after 72 hours. Dilution testing can be performed by the three products, and cooling storage for 72 hours is most effective with BTS extender.

Index terms: *Colossoma macropomum*, ACP, BTS, HBSS, motility, sperm.

Diferentes soluções diluidoras para o resfriamento do sêmen de tambaqui

Resumo – O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de soluções diluidoras no resfriamento do sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*) a 6°C. Os tratamentos consistiram de diluições de amostras de sêmen com três soluções – BTS, HBSS e ACP-104, e de um controle com sêmen não diluído. O sêmen resfriado foi avaliado por 24, 48, 72, 96 e 120 horas. Houve diferenças quanto à duração da motilidade e taxa de fertilização entre as diluições do sêmen. A duração da motilidade mostrou-se altamente variável depois de 72 horas. Os testes de diluição podem ser realizados pelos três diluidores, e seu armazenamento por 72 horas é mais eficaz com o diluidor BTS.

Termos para indexação: *Colossoma macropomum*, ACP, BTS, HBSS, motilidade, espermatozoide.

Popularly known as tambaqui, *Colossoma macropomum* is a Brazilian fish species widely accepted in the consumer market, and it stands out currently as the most produced fish in the country (Pedroza Filho et al., 2016). However, some difficulties are encountered in the production of fingerlings, and a viable alternative to control reproduction is the storage of semen through cooling, preserving the most of their fertilizing capacity (Zaniboni-Filho & Nuñez, 2004).

The use of the extender BTS – Beltsville thawing solution (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Germany) –, which was developed for pigs, has shown satisfactory results for fish semen (Murgas et al., 2004; Viveiros et al., 2014a), and the same success can be observed with HBSS (Hank's balanced salt solution) (Wayman et al., 1998). The extender solution powdered coconut water ACP (ACP Biotecnologia, Fortaleza, CE, Brazil), was developed for several freshwater species; this solution has recently been adapted for semen fish, received the name ACP-104 (Viveiros et al., 2010), and was tested in *Prochilodus lineatus* (Viveiros et al., 2014b).

The use of cooled semen has been addressed as a solution for the problems of reproductive asynchrony between males and females, as it can be used for some hours or even days (Zaniboni-Filho & Nuñez, 2004; Carneiro et al., 2006). Besides being cheap and practical, this technique application can ensure the productivity of fingerling producing stations, and it can utilize semen in several females which may come spawning at different times (Marques & Godinho, 2004; Zaniboni-Filho & Nuñez, 2004).

The objective of this work was to evaluate the efficiency of extenders solutions to maintain the quality of tambaqui semen cooling.

The study was carried out in the Farm Buriti, in Nova Mutum, MT, and in the Aquaculture Laboratory of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

For this experiment, 32 tambaqui males were used. Breeders were induced hormonally with 2.5 mg kg^{-1} of carp pituitary extract and, after 12 hours, 2 mL semen were collected from each animal, in disposable syringes, by means of a mild massage in the cranio-caudal direction. The motility of sperm cells was evaluated to ensure that there was no early activation from water or urine. After collecting the semen samples, the material was activated in distilled water at 1:50 ratio, then placed between a slide and a cover slip for observations under an optical microscope with a 40X objective. For this evaluation, there were assigned values between 0 and 100% for motility rate. According to the intensity of cellular movement, there were assigned values from 1 to 5 for the spermatic force. At the time of semen dilutions, a chronometer was started, and the time was count in seconds to stop the sperm flagellar beating.

The semen samples were diluted and fixed at 1:1000 saline buffered formaldehyde, and subsequently homogenized and analyzed. Slide preparations were performed by the staining method Rose Bengal (Streit Jr. et al., 2004), and sperm morphology was observed following the recommendations of Miliorini et al. (2011). Cells were placed on a blade, coupled with a dye drop, and a light smeared was performed. Slides were dried at room temperature, the morphological evaluation was performed by counting 300 cells per slide, and the average percentage of normal cells was assigned. For concentration, sperm per milliliter of collected semen of the sample was analyzed by using a Neubauer chamber.

After the seminal analysis, the sample of each animal was equally divided into four subsamples, and the treatments were applied separately on each one, at 1:4

(semen:extender), in 50 mL Falcon tubes. Four treatments were tested: semen diluted in Beltsville thawing solution (BTS); semen diluted in Hank's balanced salt solution (HBSS); semen diluted in powdered coconut water (ACP104); and a control of semen in natura without dilution.

Cooling temperature was set and maintained at $6\pm 2^{\circ}\text{C}$, and monitored with an analogue thermometer. Upon dilution, the extender media average temperature was $20\pm 2^{\circ}\text{C}$; and six hours after dilution, the cooling temperature was reached. For cooling, the treatments were placed in a cooler, in racks, which were in the interior of a container with water to avoid large variations of temperature. The seminal evaluations were performed over 120 hours (0, 24, 48, 72, 96, and 120 hours).

Six *C. macropomum* females were used to evaluate the efficiency of the diluted semen in the extenders, in comparison to in natura semen as for the oocyte fertilizations. After extrusion, 1 mL oocyte aliquot containing 980 ± 30 cells on average was used for each animal per treatment, and fertilized with 50 μL of each animal semen per treatment. The fertilized oocytes were taken to the experimental incubators and, after eight hours, a sample of each incubator was collected, in order to measure the fertilization rate by counting the viable and nonviable eggs. A hundred of considered viable eggs were again incubated and, after 18 hours, the hatching rates were evaluated.

The experimental design was completely randomized with repeated measurements over time, which were considered in four treatments (BTS, HBSS, ACP, and control), six assessment times (time 1, the hour of collection; time 2, cold for 24 hours; time 3, cold for 48 hours; time 4, cold for 72 hours; time 5, cold for 96 hours; and time 6, cold for 120 hours), and 32 replicates represented by each animal. Not normal variables, even after transformations and were analyzed by Kruskal-Wallis test, at a

maximum 5% probability. To perform these analyses, we used the SAS statistical software, version 9.4.

Average sperm concentration in the animals was $14.4 \pm 10.3 \times 10^9$. Extender positive actions were observed after 24 hours of cooling, since the motility of the control group decreased by more than 50%, in comparison to the various treatments of diluted semen. Diluted semen viability was maintained after 120 hours, and BTS had higher values than ACP (Figure 1 A).

Sperm motility over 120 hours of cooling constantly declined, and can be explained by the reduction of cell activity caused by dilution and semen cooling (Zaniboni-Filho & Nuñez, 2004). Due to the high correlation of this variable with the sperm vigor (Galo et al., 2011), the fall of both occurs concurrently, and losses on the quality of sperm cells range according to native species (Marques & Godinho, 2004). In the present study, sperm motility treatments cooled with BTS, HBSS, and ACP showed a better motility (50%) after 48 hours of exposure. However, only BTS and ACP extenders maintained motility higher than 30%, after 72 hours of cooling, and HBSS showed no difference.

As an extender of cooling technique, for semen cryopreservation of Neotropical species, BTS is associated with its ability to keep sperm with good motility capacity. Studies with *Brycon orbignyanus* showed 65% motility until the sixth day (Murgas et al., 2004). This work is a pioneer in testing HBSS for semen cooling of Neotropical fish, with no comparisons in the literature until present.

When compared to the control group, treatments with BTS, HBSS, and ACP showed differences only in the assessments carried out after 24 and 48 hours of cooling. Up to 120 hours under cooling effects, only BTS and ACP showed samples with apparent vigor level (Figure 1 B). The motility reduction rate may be related to gas exchange means

between the extender and sperm cells during the days of conservation (Viveiros et al., 2014a).

In general, semen dilution used in the treatments enabled a greater duration of motility over 120 hours (Figure 1 C). Although the energy resources of fish sperm cells are limited, the chemical composition of the extender means may interfere with the motility over time (Alavi & Cosson, 2005). This fact can be observed in the present study, since at the time of dilution, sperm in control group showed a motility time of 157 s, while the term in the treatments of semen diluted with the extenders BTS, HBSS, and ACP was 323, 267, and 190 s respectively. Even after cooling for 72 hours, sperm in the treatments with BTS, HBSS, and ACP moved on average 104, 85, and 62 s respectively, while in control group, motility was only 10 s. These values were similar to those found in seminal cooling of *P. lineatus* with BTS, in which motility found after 72 hours of cooling was 79.1 s (Franciscatto et al., 2002).

Figure 1.

The increased number of morphological changes during cooling can be observed with a reduction in the percentage of normal cells (Figure 1 D). Before cooling, normal sperm was over 50% in all treatments and, after 72 hours, normal sperm cells in the BTS, HBSS, and ACP treatments were of 42, 26, and 35%, respectively. In control, only 4% of normal cells were recorded.

Although there is a pattern of morphological changes to mammals (Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2013), the accepted rates for cellular abnormalities in fish have not yet been defined, making it difficult to compare seminal assessments (Miliorini et al., 2011). The morphological changes can occur due to the reduction of cellular functions, caused by temperature variations of the medium for sperm preservation

(Alavi & Cosson, 2005), and these changes are associated with the reduced motility and fertilization capacity (Galo et al., 2011).

The fertilization rate was not different between treatments and the control group at the time of semen dilution (Figure 2). There is probably a higher motility than 50 s, after 120 hours of cooling, and the treatments BTS, HBSS, and ACP were sufficient to fertilize the oocyte. Even when the fertilization rate was low, in the present experiment, it showed no difference between treatments; therefore, this drop can be related to the oocyte quality. This parameter is influenced by preovulatory chronic stress and by the period of spawning and extrusion of oocytes (Donaldson et al., 2000), and may result in lower fertilization rates. Also, the hatching rates did not differ between treatments, and resulted in near 70% hatching of fertilized eggs.

Figure 2.

The use of extenders for the semen cooling of *C. macropomum* may be the alternative for semen dilution and seminal storage in the short term. The tested thinners, mainly the BTS, kept the *C. macropomum* sperm in good conditions under cooling at 6°C for up to 72 hours.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (Fapergs, processo 23298), pelo apoio financeiro; e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pelas bolsas concedidas.

References

ALAVI, S. M. H. & J. COSSON. Sperm motility in fishes. I. Effects of temperature and pH: a review. **Cell biology international**, v. 29, n. 2, p. 101-110, 2005.

CARNEIRO, P. C. F., M. S., SEGUI, C. R., IÓRIS-FILHO & J. D. MIKOS. Semen viability of jundiá, *Rhamdia quelen*, storage under refrigeration. **Revista Acadêmica**, v. 4, n. 3, p. 11-16, 2006.

CBRA, C. B. D. R. A. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3rd Eds. Belo Horizonte: CBRA: 2013. 84p.

DONALDSON, E., I. SOLAR & B. HARVEY. Induced ovulation and spermiation, and factors influencing gamete quality of fishes. Pag. 13-19. In: Tiersch, T. R. & P. M. Mazik. Eds, 2000. **Cryopreservation in aquatic species**. Baton Rouge: The World Aquaculture Society. 2000.

FRANCISCATTO, R. T., L. D. S. MURGAS, A. B. MILIORINI, M. O. B. SILVA & P. V. R. LOGATO. Qualidade do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) e taxa de fertilidade após resfriamento a 4°C. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, n. 3, p. 213-215, 2002.

GALO, J. M., D. P. STREIT JR., R. N. SIROL, R. P. RIBEIRO, M. DIGMAYER, V. X. L. ANDRADE & A. R. EBERT. Spermatic abnormalities of piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849) after cryopreservation. **Brazilian Journal of Biology**, v. 71, n. 3, p. 693-699, 2011.

MARQUES, S. & H. P. GODINHO. Short-term cold storage of sperm from six neotropical characiformes fishes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, n. 5, p. 799-804, 2004.

MILIORINI, A. B., L. D. S. MURGAS, P. V. ROSA, G. OBERLENDER, G. J. M. PEREIRA & D. V. COSTA. A morphological classification proposal for curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm damages after cryopreservation. **Aquaculture Research**, v. 42, n. 2, p. 177-187, 2011.

MURGAS, L. D. S., A. B. MILIORINI, R. T. FRANCISCATTO & A. N. MARIA. Spermatic viability of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen cooled at 4° C. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 6, p. 1361-1365, 2004.

PEDROZA-FILHO, M. X., A. P. O., RODRIGUES & F. P., REZENDE. **Dinâmica da produção de tabaqui e depois peixes redondos no Brasil**. Nota Técnica de 2016. Brasília: CNA Brasil – Ativos Aquicultura, year 2, edition 7, 2006, 5p. Available in: <http://www.canaldoprodutor.com.br/biblioteca/publicacoes>>. Acess: 2016/04/19

STREIT JR, D. P., G. MORAES, R. P. RIBEIRO, J. A. POVH, E. SOUZA & C. OLIVEIRA. Avaliação de diferentes técnicas para coloração de sêmen de peixes. **Arquivos de Ciência Veterinária e Zoologia**, UNIPAR, v. 7, n. 2, p. 157-162, 2004.

VIVEIROS, A. T. M., A. F. NASCIMENTO, L. H. ORFÃO AND Z. A. ISAÚ. Motility and fertility of the subtropical freshwater fish streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) sperm cryopreserved in powdered coconut water. **Theriogenology**, v. 74, n. 4, p. 551-556, 2010.

VIVEIROS, A. T. M., L. H. ORFÃO & M. C. LEAL. Biologia e Conservação de Espermatozoides. Cap. 15, Pag. 307-327. In: Baldisserotto, B. J. E. P. Cyrino & E. C. Urbinati. Eds. **Biologia e fisiologia de peixes neotropicais de água doce**. Jaboticabal : FUNEP;UNESP. 2014a.

VIVEIROS, A. T. M., T. R. TAFFAREL & M. C. LEAL. Osmolality and composition of the extender during the cold storage of *Prochilodus lineatus* (Characiformes: Prochilodontidae) sperm. **Neotropical Ichthyology**, v. 12, n. 3, p. 643-648, 2014b.

WAYMAN, W. R., T. R. TIERSCH & R. G. THOMAS. Refrigerated storage and cryopreservation of sperm of red drum, *Sciaenops ocellatus* L. **Aquaculture Research**, v. 29, n. 4, p. 267-273, 1998.

ZANIBONI-FILHO, E. & A. NUÑER. Fisiologia da reprodução e propagação artificial dos peixes. Cap. 4, Pag. 45-73. In.: Cyrino, J. E. P., E. C. Urbinati, D. M. Fracalossi & N. Castagnolli. Eds. **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. Sociedade Brasileira de Aqüicultura e Biologia Aquática: Jaboticabal. 2004.

FIGURES

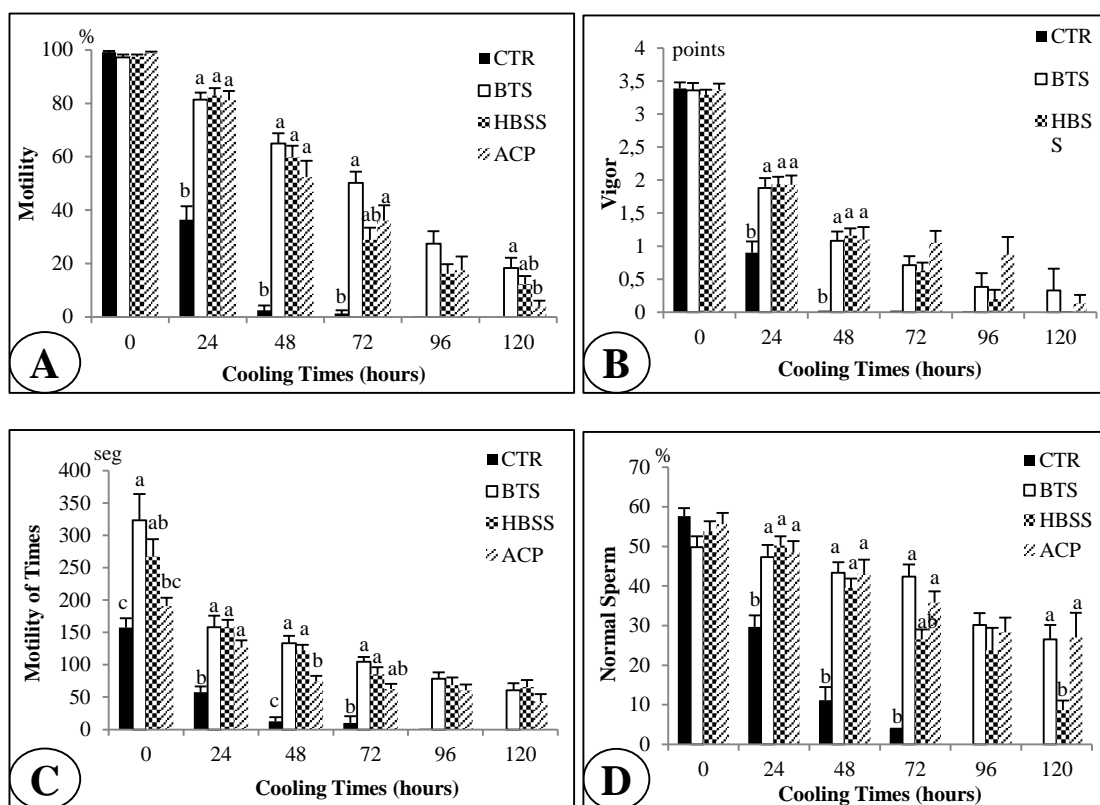


Figure 1 – Percentage of sperm motility (A), spermatic vigor (B), motility time (C) and percentage of normal cells (D) in the *C. macropomum* over us treatment in the 120 hours of cooling at 6 °C.

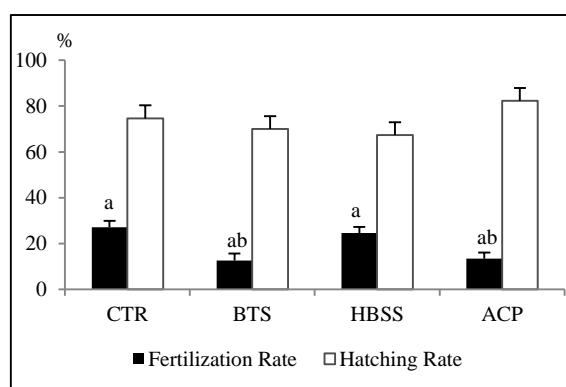


Figure 2 – Fertilization and hatching rates in the *C. macropomum* using cold semen at 6°C diluted with BTS, HBSS and ACP.

CAPÍTULO IV**

** Artigo apresentado nas normas da Revista Theriogenology

Análise de clusters para diferenciação de grupos de reprodutores *Collossoma macropomum* a partir do sêmen criopreservado

Raycon Roberto Freitas Garcia¹, Carine Corcini Dahl², Elsa Cabrita³, Pedro Henrique Salomão¹, Antônio Sergio Varela Junior⁴ e Danilo Pedro Streit Jr¹.

¹ – Programa de Pós Graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre –RS, Brasil. pedro.salomao@ufrgs.br; danilo.streit@ufrgs.br. ² – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas – RS, Brasil. corcinicd@gmail.com. ³ – Centro de Ciência do Mar, Universidade do Algarve, Campus Gambelas – Faro, Portugal. ecabrita@ualg.pt. ⁴ – Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande – RS, Brasil. varelajras@gmail.com. *Autor Correspondente: raycongarcia@gmail.com.

Abstract – O *Collossoma macropomum* é a espécie nativa brasileira mais produzida no país e os estudos acerca desta espécie vem auxiliando na consolidação da sua cadeia de produção. Este estudo teve o objetivo de agrupar reprodutores através de análise multivariada levando em conta as características seminais após a criopreservação e correlacionar com as características fenotípicas e do sêmen fresco. Os indicativos fenotípicos observados nos reprodutores foram; peso (kg), comprimento padrão (cm) e total (cm), cabeça (cm) e altura (cm), além das características do sêmen fresco quanto à; motilidade (M), tempo de motilidade (MT), morfologia (SM) e concentração espermática (SC). Após a criopreservação foi utilizado o CASA para as avaliações de; motilidade total (TM), motilidade progressiva (PM), velocidade em linha reta (VSL), velocidade curvilínea (VCL) e velocidade a parte média (VAP) e citometro de fluxo para; integridade da membrana (Mi), integridade do DNA (DNAi) e funcionalidade mitocondrial (Mf), e observada a taxa de fertilização (FR), tempo de motilidade (MTc) e morfologia espermática (SMc). Após a avaliação por cluster três grupos (G1, G2 e G3) foram identificados, o G1 foi o grupo considerado superior ($P < 0,05$) nas variáveis; TM (71%), PM (56%), VCL (56 $\mu\text{m/s}$), VAP (48 $\mu\text{m/s}$) e FR (52%). Para MTc (s), VSL ($\mu\text{m/s}$) e SMc (%) o G1 e G2 foram semelhantes, sendo superiores ao G3. Na variável Mi o G1 foi semelhante a G2, porém para as características de DNAi e Mf não houveram diferenças significativas entre os grupos. A variável FR apresentou correlação negativa ($P < 0,03$) para a característica fenotípica comprimento de cabeça. Já as características do sêmen fresco, apenas o MT foi significativo ($P < 0,05$) para FR. Com este estudo é possível estimar que animais que apresentem tamanho de cabeça menor poderão apresentar melhor qualidade seminal após a criopreservação, assim como o MT pode ser um indicador pré congelamento, da qualidade pós criopreservação com relação a taxa de fertilização.

Keywords; análise multivariada, qualidade espermática, tambaqui, correlação

Introdução

Atualmente as pesquisas com criopreservação seminal, em sua grande maioria buscam definir a qualidade e a eficiência da célula espermática após o descongelamento e deste

modo melhorar os índices reprodutivos e consolidar ainda mais a técnica (Cabrita *et al.*, 2010; Asturiano *et al.*, 2016). Esse cenário é similar para a espécie nativa brasileira mais produzida, o *Colossoma macropomum* (Pedroza-Filho *et al.*, 2016), onde é possível observar estudos com diferentes crioprotetores (Menezes *et al.*, 2008; Varela Junior *et al.*, 2012), soluções diluidoras (Garcia *et al.*, 2015; Melo-Maciel *et al.*, 2015), solução para ativação seminal (Carneiro *et al.*, 2012), métodos de congelamento e descongelamento (Varela Junior *et al.*, 2015) e recipientes de armazenamento (Maria *et al.*, 2015).

Os benefícios do emprego da técnica de criopreservação podem ser: mitigar a assincronia reprodutiva entre machos e fêmeas, maximizar da utilização do sêmen, simplificar o estoque de reprodutores, facilitar a troca de material genético entre pisciculturas e a formação de bancos de germoplasma para conservação ou programas de melhoramento (Cabrita *et al.*, 2010). Todavia, o emprego da técnica de criopreservação seminal é passível de redução da qualidade espermática, pois a aplicação da mesma causa inúmeros fatores de estresse celular que podem reduzir a qualidade dos espermatozoides (Pegg, 2007). No entanto, essas alterações podem ser de intensidade diferente em cada espécie ou mesmo dentro da espécie (Cabrita *et al.*, 2009; Cabrita *et al.*, 2014), por isso se faz necessário conhecer a qualidade do reprodutor utilizado em estações produtoras de alevinos para melhorar índices reprodutivos (Murgas *et al.*, 2011; Streit Jr. *et al.*, 2012).

Para aferir a qualidade espermática, a utilização de análises que avaliam o estado das células espermáticas quali-quantitativamente é de fundamental importância (Cabrita *et al.*, 2010; Cabrita *et al.*, 2014; Asturiano *et al.*, 2016; Robles *et al.*, 2016), e por consequência a análise através da ferramenta estatística multivariada para validação dos dados observados estão sendo empregadas através de clusters para melhorar a compreensão dos resultados obtidos (Martínez-Pastor *et al.*, 2008; Beirão *et al.*, 2011; Kanuga *et al.*, 2012; Güllü *et al.*, 2015). No entanto, não há registros em peixes da correlação entre características seminais com as características fenotípicas dos reprodutores. Por outro lado, esta avaliação é uma prática recorrente para seleção de reprodutores mamíferos para seleção de reprodutores de melhor qualidade (Barrozo *et al.*, 2012; Ahmed *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2016; Reis *et al.*, 2016).

O presente estudo teve como objetivo diferenciar possíveis grupos com características superiores/inferiores quanto a qualidade seminal após a criopreservação através de análise de clusters e posteriormente correlacionar o grupo de melhor qualidade com as características fenotípicas e do sêmen fresco.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido em duas etapas; a campo na piscicultura localizada no município de Pimenta Bueno – RO, e nos laboratórios ReproPel em Pelotas – RS na UFPel e AQUAM em Porto Alegre – RS na UFRGS.

Animais

Foram utilizados 25 reprodutores *C. macropomum* que eram mantidos em viveiros escavados, foram selecionados quando apresentavam liberação espermática através de uma massagem craniocaudal, eram então identificados e levados ao laboratório de reprodução. Posteriormente, as avaliações biométricas eram aferidas para cada reprodutor; peso (kg), comprimento total (cm) e padrão (cm), comprimento da cabeça (cm) e altura (cm). Em seguida os animais foram estocados em tanques de 5.000 litros, com a água em temperatura média de $27,5 \pm 1,0$ °C.

Para obtenção do sêmen os animais foram induzidos com extrato de hipófise de carpa, (0,5 mg/kg de peso corporal) em dosagem única. Sete horas após o manejo de indução, o sêmen foi coletado. Inicialmente secou-se o orifício urogenital com papel-toalha, e após massagem abdominal, coletou-se o sêmen em seringas descartáveis de 10 mL. Ao ser observado contaminação do sêmen com urina, sangue ou fezes o mesmo foi descartado.

Avaliação seminal a fresco

Após a coleta seminal, a amostra foi dividida em duas alíquotas, uma para as avaliações seminais a fresco e a outra utilizada para a criopreservação. As avaliações do sêmen fresco foram realizadas através de microscopia óptica, por meio de um único avaliador treinado. As análises realizadas foram;

- A motilidade espermática foi definida através de duas variáveis: tempo de motilidade e porcentagem de espermatozoides móveis. Em uma lâmina, foi colocada uma alíquota de 2 µl de sêmen, homogeneizados com 100 µl de água destilada. Imediatamente sobre esta amostra foi colocada uma lamínula e então levadas ao microscópio óptico pré-ajustados em 40X. Assim que ocorria a homogeneização do sêmen com a água, um cronômetro era disparado, e ao cessar dos batimentos flagelares dos espermatozoides presentes no campo de visão, o tempo de motilidade (MT) foi expresso em segundos. A porcentagem de espermatozoides móveis (M) foi mensurada em escala arbitrária segundo Fabbrocini *et al.* (2000).

- Concentração (SC) e morfologia espermática (SM); foram avaliadas em microscópio óptico com objetiva de 100X. Em *ependorf*, uma alíquota de 2 µl de sêmen foi homogeneizado com 2 mL de formol salina tamponado. Posteriormente uma alíquota desta amostra foi utilizada para a contagem espermática em uma câmera de Neubauer, calculando-se posteriormente o número de espermatozóides por mL. Em seguida corou-se as amostras na lâmina com Rosa de Bengala (Streit Jr *et al.*, 2004), e posterior contou-se e qualificou-se 300 espermatozoides por lâmina obtendo a porcentagem de espermatozóides morfologia espermática alterada de acordo com Miliorini *et al.* (2011), adaptada por Garcia *et al.* (2015).

Criopreservação

Para o congelamento uma amostra de sêmen de cada animal foi diluída em proporção de 1:4 (sêmen:solução), com a solução crioprotetora de 90% de BTS® (Beltsville Thawing

Solution – Minitub[®]) + 10% de DMF (Dimetilformamida – Sigma Aldrich), previamente preparada e armazenada em refrigerador (T = 8 °C). Após a homogeneização da amostra, o sêmen foi envasado em palhetas de 0,25 mL e mantidas em equilíbrio por dois minutos e então alojadas em botijão de *dry-shipper* por 12 horas até seu armazenamento em nitrogênio líquido (Varela Junior *et al.*, 2012). O descongelamento das amostras foi realizado mediante a metodologia descrita para espécie (Garcia *et al.*, 2015), imergindo as palhetas em banho Maria a 40 °C por 8 segundos.

Análise do sêmen criopreservado

O sêmen criopreservado foi avaliado utilizando as variáveis tempo de motilidade (MTc) e morfologia espermática (SMc) tal como foram descritas para o sêmen fresco. Para os demais parâmetros de motilidade espermática o sistema *Computer Assisted Semen Analysis – CASA*, contendo o software *Sperm Class Analyser – SCA* foi utilizado para recolher os parâmetros de: motilidade total (TM), motilidade progressiva (PM), velocidade em linha reta (VSL), velocidade curvilínea (VCL) e velocidade a parte média (VAP). Uma alíquota da amostra descongelada e homogeneizada com água destilada foi colocada no microscópio em uma câmera do tipo LEJA de contagem. Um total de 1000 células foram analisadas por indivíduo.

A citometria de fluxo foi realizada no citômetro *AttuneTM Acoustic Focusing Cytometer* (Applied Biosystems). Inicialmente a detecção da população espermática foi determinada pela eliminação de eventos não espermáticos através de gráficos de dispersão SSC x FSC, identificando-se claramente a população correspondente aos espermatozoides (Petrunkina *et al.*, 2005; Piehler *et al.*, 2006). Foram selecionados 20.000 eventos espermáticos por amostra com um fluxo de 200 células/segundo, e os resultados obtidos foram analisados através do programa *Attune Cytometric Software v.2.1*.

Para verificação da integridade de membrana espermática (Mi), 5 µL da amostra de sêmen foram adicionados em um *ependorf* contendo 500 µL de BTS[®] e 20.0 µM de diacetato de carboxifluoresceína (DCF - emite fluorescência verde) e 7.3 µM de iodeto de propídeo (IP - emite fluorescência vermelha) (Sigma-Aldrich – Saint Louis, MO, EUA). A classificação espermática aconteceu com não lesados (DCF+/IP-) e lesados (DCF+/IP+) (Gillan *et al.*, 2005; Fernández-Gago *et al.*, 2013). Os resultados são expressos em porcentagem de espermatozoides com integridade de membrana (IP).

A integridade do DNA espermático (DNAi) foi mensurado por meio de ensaio de estrutura de cromatina espermática (SCSA). Para esta avaliação foi utilizado 10 µL de amostra de sêmen diluída em 500 µL de BTS[®] homogeneizadas com 5 µL de TNE (0.01 M de Tris-HCl; 0.15 M NaCl; 0.001 M EDTA; pH 7.2). Após 30 segundos adicionou-se 10 µL de Triton (Triton X-100 0,1%) (v/v) e, ao final de 30 segundos, 5 µL de laranja de acridina (Sigma-Aldrich – Saint Louis, MO, EUA) foi adicionado a amostra. Os resultados foram expressos em percentual de espermatozoides sem danos ao DNA (Evenson *et al.*, 1994).

A funcionalidade mitocondrial (Mf) foi verificada com os corantes fluorescentes Rhodamina 123 (13.0 M) que possuem fluorescência verde e IP (7.3 M). Apenas as células espermáticas integras (IP-) foram classificadas com alta funcionalidade (alta fluorescência) e baixa funcionalidade (baixa fluorescência) (Gillan *et al.*, 2005). Os resultados são expressos em porcentagem de espermatozoides com a mitocôndria funcional.

Taxas de fertilização

As desovas de cinco fêmeas foram utilizadas para verificar o potencial de fertilização das células espermáticas criopreservadas. A desova de cada fêmea foi separada em alíquotas de 1 g de oócitos/fêmea em triplicata, e cada alíquota recebeu o sêmen criopreservado de cada reprodutor. A concentração espermática utilizada para a fertilização foi de 100.000 espermatozoides/oócito (Leite *et al.*, 2013). Após a homogeneização dos oócitos com o sêmen criopreservado, adicionou-se água filtrada para ativação dos gametas. Após 60 segundos, os embriões foram transferidos para incubadoras experimentais de 300 mL com fluxo de água contínuo e temperatura média de 26.5 ± 1.0 °C. Decorrentes oito horas de incubação (fechamento do blastoporo), foi contabilizada a taxa de fertilização (FR), através da contagem do número total de ovos viáveis em função do número de ovos incubados (Leite *et al.*, 2013). O resultado foi expresso em porcentagem de embriões viáveis (em desenvolvimento) do valor médio das triplicatas.

Análise estatística

Cada reprodutor foi utilizado como unidade experimental para todas as variáveis avaliadas, e cada variável foi analisada em triplicata, obtendo-se assim a média de cada reprodutor que foram utilizadas para a análise estatística. Os dados do sêmen fresco são apresentados por média geral e erro padrão da média. Posteriormente utilizando as análises realizadas para aferir a qualidade do sêmen criopreservado (MTc, SMc, TM, PM, VSL, VCL, VAP, Mi, DNAi, Mf e FR) uma análise de clusters por meio de distância Euclidiana foi realizada através da metodologia estatística multivariada para determinar a formação de possíveis grupos após a criopreservação, em seguida por meio da metodologia de agrupamento de ligação média pode ser observado os grupos formados, os resultados foram expressos pela média geral e erro padrão da média dos grupos. A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilks. Para as variáveis consideradas paramétricas, uma análise de variância foi aplicada seguida por um teste de Tukey para verificar as diferenças significativas entre os grupos. E para as variáveis não paramétricas o teste de Kruskal-Wallis foi utilizado. O nível de significância utilizado foi $P < 0,05$. Correlação pelo método de Pearson foi gerada para as variáveis fenotípicas e características seminais para o grupo de animais considerados superiores.

Resultados

O peso médio corporal dos reprodutores *C. macropomum* foi de 7,26 kg e comprimento total de 72,36 cm. Dentre as características seminais a fresco, a taxa de motilidade média

foi de 98%, tempo de motilidade abaixo de 70 segundos e mais de 40% dos espermatozoides possuíam alguma alteração morfológica (Tabela 1).

Tabela 1 – Resultados das características fenotípicas e avaliações seminais dos reprodutores *C. macropomum* (n=25) utilizados no estudo.

Características Fenotípicas	Médias	EPM*
Peso (kg)	7,26	0,26
Comprimento Total (cm)	72,36	0,91
Comprimento Padrão (cm)	63,68	0,77
Cabeça (cm)	20,12	0,38
Altura (cm)	28,20	0,37
Características Seminais		
Taxa de Motilidade (%)	98,00	0,75
Tempo Motilidade (s)	69,56	3,12
Concentração Espermática (sptz/mL)	21,8x10 ⁹	2,59x10 ⁹
Morfologia Espermática (%)	42,00	1,98

*Erro Padrão da Média

A análise multivariada através de clusters (Figura 1) das características seminais após a criopreservação apontou a formação de três grupos; Grupo 1 (G1 - animais 9, 10, 15, 21, 23 e 25), Grupo 2 (G2 - animais 2, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 22 e 24) e Grupo 3 (G3 - animais 1 e 3). Os resultados médios das avaliações do sêmen criopreservado dos grupos para as variáveis utilizadas na avaliação de clusters estão apresentadas na Tabela 2.

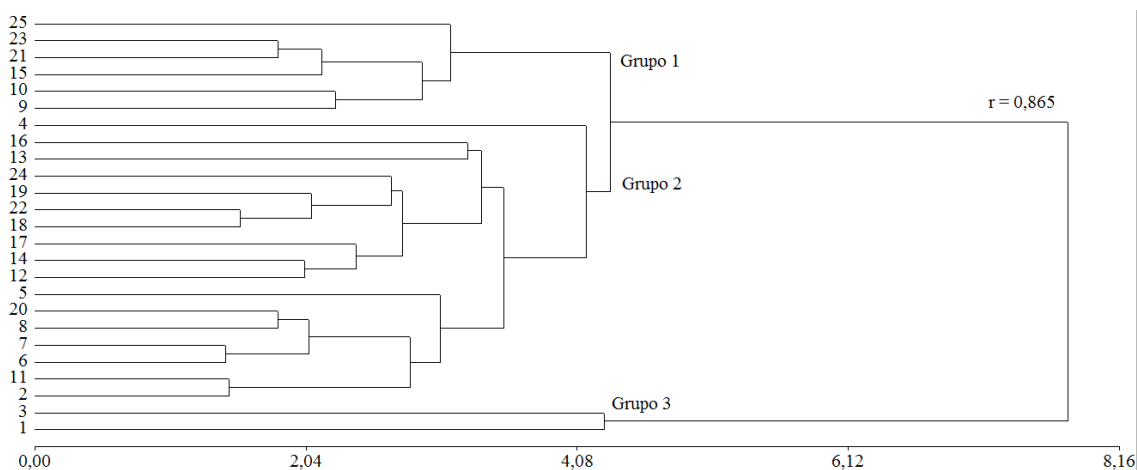


Figura 1 – Dendrograma com distância Euclidiana, a partir das variáveis analisadas do sêmen criopreservado de *C. macropomum*.

Para as variáveis TM, PM, VCL e VAP as médias foram sempre superiores ($P < 0,05$) no G1 do que nos demais grupos. Por outro lado, MTc e VSL não houve diferença entre os grupos G1 e G2, sendo superiores ($P < 0,05$) a G3. A média da SMc foi sensivelmente mais elevada ($P < 0,05$) no grupo G3 do que nos demais grupos.

Na análise de Mi, o valor encontrado no G1, foi maior ($P < 0,05$) que no G3 e quanto a FR observada no G1, apresentou a maior ($P < 0,05$) média. Para as demais variáveis: DNAi e Mf, não foi observado diferenças ($P > 0,05$) entre os grupos.

Tabela 2 – Resultados apresentados pelas médias das análises realizadas no sêmen criopreservado de *C. macropomum* (n=25) pela formação dos grupos a partir da análise de clusters e erro padrão da média.

Variáveis	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
MTc (s) ^{1*}	36,83 ± 1,08a	35,35 ± 1,97a	18,50 ± 6,50b
SMc (%) ^{2*}	49,17 ± 3,59a	58,82 ± 2,85a	83,00 ± 13,00b
TM (%) ^{3*}	71,42 ± 3,57a	40,31 ± 2,84b	0,00 ± 0,00c
PM (%) ^{4*}	56,73 ± 4,09a	27,76 ± 2,85b	0,00 ± 0,00c
VSL (µm/sec) ^{5#}	37,43 ± 1,15a	31,54 ± 1,13a	0,00 ± 0,00b
VCL (µm/sec) ^{6#}	56,46 ± 1,33a	44,05 ± 0,86b	0,00 ± 0,00c
VAP (µm/sec) ^{7#}	48,07 ± 0,79a	38,54 ± 1,14b	0,00 ± 0,00c
Mi (%) ^{8#}	61,43 ± 4,36a	45,79 ± 3,76ab	34,75 ± 13,05b
DNAi (%) ⁹	98,18 ± 0,37	97,80 ± 0,37	97,55 ± 1,75
Mf (%) ¹⁰	42,21 ± 7,07	40,61 ± 6,53	27,78 ± 13,80
FR (%) ^{11#}	52,88 ± 9,03a	15,03 ± 2,07b	18,60 ± 10,83b

¹ – MTc – Tempo de Motilidade; ² – SMc – Morfologia Espermática; ³ – TM – Taxa de Motilidade; ⁴ – PM – Motilidade Progressiva; ⁵ – VSL – Velocidade em Linha Retas; ⁶ – VCL – Velocidade Curvilínea; ⁷ – VAP; Velocidade Média; ⁸ – Mi – Integridade da Membrana; ⁹ – DNAi – Integridade do DNA; ¹⁰ – Mf – Funcionalidade da Mitocondrial; ¹¹ – FR – Taxa de Fertilização. * - Variáveis significativamente diferentes ($P < 0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis. # - Variáveis significativamente diferentes ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

O resultado da análise das correlações significativas entre o G1 e as variáveis são apresentadas na Tabela 3. A característica fenotípica de comprimento da cabeça ($P < 0,03$) teve correlação negativa com a FR, no entanto a MT ($P < 0,01$) apresentou correlação positiva com a FR.

Tabela 3 – Correlações significativas das variáveis avaliadas no sêmen criopreservado do Grupo 1 com a característica fenotípica e do sêmen fresco dos indivíduos.

Variável	Característica Fenotípica	Característica do Sêmen Fresco
	HL ²	MT ³
FR (%) ¹	-0,86*	0,93**

¹ – FR – Taxa de Fertilização; ² – HL – Comprimento da Cabeça; ³ – MT – Tempo de Motilidade. * - correlação significante a nível de $P < 0,03$, ** - correlação significante a nível de $P < 0,01$.

Discussão

O conceito de que os efeitos danosos sofridos pelas células espermáticas durante o processo de criopreservação podem ser diferentes entre os reprodutores, torna-se mais plausível com os resultados obtidos no presente estudo. A análise estatística multivariada através de clusters permitiu por meio de uma avaliação conjunta dos diferentes parâmetros que são utilizados para aferir a qualidade espermática, formar grupos (G1, G2, G3) de reprodutores.

O monitoramento da qualidade dos gametas dos reprodutores utilizados nas fertilizações em estações produtoras de alevinos pode ser decisivo para o sucesso da reprodução (Bobe e Labbé, 2010), principalmente se os gametas foram criopreservados (Cabrita *et al.*, 2010), pois já são conhecidos os efeitos danosos da criopreservação nas células espermáticas (Pegg, 2007). E quando se trata de qualidade seminal, cabe ressaltar que quanto maior o número de avaliações utilizadas para verificar a qualidade espermática, os resultados se tornam mais confiáveis (Cabrita *et al.*, 2010; Asturiano *et al.*, 2016).

A aplicação da análise multivariada através de clusters para analisar os dados seminais vem sendo utilizado para interpretar da melhor forma possível os resultados obtidos nos experimentos relacionados com a qualidade espermática e entre reprodutores de peixes sobre inúmeros fatores (Martínez-Pastor *et al.*, 2008; Beirão *et al.*, 2009; Beirão *et al.*, 2011; Kanuga *et al.*, 2012; Güllü *et al.*, 2015). Em *Solea senegalensis*, a aplicação de clusters diferenciou a sub-população por meio da motilidade, e os autores descrevem que algumas sub-populações podem ser menos resistentes ao choque osmótico quando a célula é liberada na água-salgada, isso devido a estrutura da membrana celular e do DNA espermático (Beirão *et al.*, 2009). A aplicação de cluster permitiu a classificação de sub-populações espermáticas com diferentes qualidades espermáticas em *C. macropomum*, antes e após a criopreservação, porém, reforçando que os efeitos sofridos pelos espermatozoides na aplicação da técnica, são passíveis de alteração na movimentação e nas taxas de fertilização (Gallego *et al.*, 2017).

Tendo em vista que o principal objetivo de célula espermática é fecundar o oócito (Rurangwa *et al.*, 2004), o G1, pode ser classificado como tendo alto potencial para criopreservação, pois obteve a melhor qualidade espermática após o descongelamento, apresentando FR de 52%. Segundo alguns autores, a fertilização do sêmen criopreservado de *C. macropomum* pode variar principalmente quando avaliado com diferentes crioprotetores e suas concentrações ou/e métodos de congelamento do sêmen (Varela Junior *et al.*, 2012; Varela Junior *et al.*, 2015).

De acordo com Kime *et al.* (2001), a taxa de fertilização está correlacionada positivamente com os índices de motilidade espermática, sendo que este pode ser considerado um parâmetro de qualidade (Cosson *et al.*, 2008). Este relato foi reforçado quando observada que a PM (56%) e TM (71%) foram superiores no G1 aos demais grupos. No entanto, é de conhecimento que a motilidade espermática é passível de ser influenciada pelas características seminais individuais, como osmolaridade, concentração proteica e níveis de Na⁺ e K⁺ (Cosson, 2004; Alavi e Cosson, 2006; Güllü *et al.*, 2015). Estes parâmetros podem ser expressos de forma diferentes entre os reprodutores (Bobe e Labbé, 2010), podendo estar relacionado a variabilidade entre reprodutores da mesma espécie, que foi observado no estudo de Martínez-Pastor *et al.* (2008), em *S. senegalensis*, por exemplo. Do mesmo modo que a PM, a velocidade espermática também tem associação com a fertilização (Gage *et al.*, 2004; Tuset *et al.*, 2008; Gallego *et al.*, 2017), e neste caso no G1 em sua totalidade foi também superior aos demais grupos nas variáveis; MTc de 36 seg., VSL de 37 µm/seg, VCL de 56 µm/seg e VAP de 48 µm/seg.

Alterações morfológicas nos espermatozoides de espécies nativas brasileiras podem acontecer após a criopreservação (Streit Jr *et al.*, 2006). Novamente a análise de cluster dos animais do G1 foi identificado como sendo o que menos sofreu (49%) com alterações morfológicas das células espermáticas. De acordo com Miliorini *et al.* (2011) os valores acima de 50% de anormalidades espermáticas em peixes pode se tornar crítico e influenciar na fertilização. Fato este que corrobora com a premissa do nosso estudo, onde as alterações morfológicas acima de 50% (G2 e G3) apresentaram taxas de fertilização mais baixas que no G1. As anormalidades espermáticas podem ser consideradas como uma avaliação mais simples. Entretanto, utilizando uma técnica mais refinada, o resultado da Mi confirmou as observações descritas com as anormalidades espermáticas, pois o G1, também foi superior, muito embora só em relação ao G3. O dano provocado pelo processo agressivo de criopreservação, em geral está relacionado com a motilidade do espermatozoide, porém, é determinante que tenham células espermáticas com a membrana íntegra, pois é fundamental para a funcionalidade ideal dos espermatozoides, sem que estes percam a função primordial de fertilização (Cabrita *et al.*, 2010).

Acredita-se que o estresse osmótico causado pela criopreservação pode ter influenciado nas baixas taxas de Mf obtidas no presente experimento (<42%), fator que pode explicar o baixo MTc (36, 35 e 18 s, respectivamente entre os G1, G2 e G3) conseqüentemente. A mitocôndria fornece energia através de ATP para a movimentação do espermatozoide (Cabrita *et al.*, 2014), quando há danos mitocondriais, conseqüentemente ocorrerá a redução da motilidade ou até mesmo imotilidade espermática. Cabe ressaltar, que a funcionalidade da mitocôndria está correlacionado com a integridade do DNA espermático (Figuerola *et al.*, 2015). Autores salientam a importância de se avaliar os danos causados ao DNA da célula espermática (Cabrita *et al.*, 2014; Robles *et al.*, 2016). De Mello *et al.* (2016) relatam que a célula espermática criopreservada de *C. macropomum* com diferentes agentes crioprotetores podem sofrer metilação do DNA, afetando a viabilidade da prole. Porém no presente experimento a DNAi não apresentou diferença entre os Grupos, e foi observado mais 97% de integridade, valor muito semelhante ao encontrado por Garcia *et al.* (2015) e Varela Junior *et al.* (2015) na mesma espécie. O resultado nos leva a interpretar que o DNA espermático da espécie, pode ser bem protegido, e esse efeito pode estar relacionado com o tipo de compactação da cromatina, no entanto mais estudos devem ser realizados para comprovar essa afirmação.

Conhecer o potencial dos reprodutores utilizados nos laboratórios de produção de alevinos é de fundamental importância para maximização de sua utilização, seja em fertilização com sêmen fresco ou criopreservado (Murgas *et al.*, 2011; Streit Jr. *et al.*, 2012). Contudo, as dificuldades encontradas em realizar análises a campo podem atrapalhar o estabelecimento real dos parâmetros avaliados (Garcia *et al.*, 2016), principalmente tendo em vista a similaridade das características seminais obtida de forma subjetiva em *C. macropomum* (Maria *et al.*, 2010; Maria *et al.*, 2011). Para tanto, a correlação das variáveis após a criopreservação do G1, com as características fenotípicas e do sêmen fresco, foi realizada a fim de encontrar possíveis parâmetros de diagnóstico que auxiliem na seleção de reprodutores para melhor utilização e potencialidade do

sêmen. No presente estudo o comprimento da cabeça (HL) apresentou correlação negativa com a FR ($r = - 0,86$), ou seja, acredita-se que aqueles animais que apresentarem HL menor podem apresentar melhores FR quando seu sêmen for criopreservado. Cabe ressaltar, que foi observado em mamíferos por Reis *et al.* (2016), uma possível perda de qualidade seminal quando os animais são mais jovens, porém, esta análise abre uma perspectiva importante para determinar uma alternativa quanto ao tamanho ideal para utilização dos reprodutores migradores, como o *C. macropomum*, em estações produtoras de alevinos.

Quanto a informação obtida das características do sêmen pós criopreservação, correlacionadas com as características seminais antes da criopreservação, a MT ($r = 0,93$) do G1 apresentou uma alta correlação ($p < 0,01$) com a FR. Esse resultado pode ser valioso, pois selecionando os animais a partir do tempo de motilidade espermática, possivelmente as FR serão maiores quando for utilizado o sêmen criopreservado destes indivíduos. Esta informação amplia a observação de Varela Junior *et al.* (2012), de que a espécie em estudo apresenta correlação positiva entre a taxa de fertilização e a motilidade no sêmen criopreservado. Logo, não só é importante que os espermatozoides tenham motilidade espermática antes da criopreservação, mas também que apresentem tempo de motilidade elevado no sêmen fresco. De todo modo, a valiosa informação obtida para os reprodutores *C. macropomum*, em relação a pré-disposição fenotípica positiva para criopreservação seminal, reforça as observações citadas por Silveira *et al.* (2010), Siqueira *et al.* (2013) e Kumar *et al.* (2016) em mamíferos com relação a pré-disposição para qualidade seminal.

Novas abordagens para verificar a qualidade dos gametas e potencializar a utilização dos reprodutores em piscicultura vêm sendo discutida recentemente (Migaud *et al.*, 2013). Mesmo porque há conhecimento dos inúmeros fatores que afetam a qualidade do sêmen de peixes, e possíveis alternativas para melhorá-lo (Bobe e Labbé, 2010; Mylonas *et al.*, 2010; Migaud *et al.*, 2013; Valdebenito *et al.*, 2013). Já combinações entre observações por meio de microscópio ocular, avaliação por meio de CASA e citometria de fluxo, promovem um alto nível de informações para pré-dizer a qualidade reprodutiva de algumas espécies como cavalos (Battut *et al.*, 2016). Certamente a combinação destas metodologias para avaliações espermáticas em peixes produziu com maior intensidade resultados mais fiáveis sobre a qualidade espermática após a criopreservação. No entanto, com outra espécie de mamíferos, Utt (2016) descreve que para previsões da fertilização em touros, requer conhecimento prático entre a biologia reprodutiva e estatístico. Deste modo, acredita-se que a utilização das características fenotípicas combinadas com as informações geradas sobre a qualidade dos gametas possa estimar a qualidade reprodutiva dos reprodutores *C. macropomum* em um futuro próximo. Logo, estes fatores poderão auxiliar na escolha dos melhores reprodutores para serem utilizados na criopreservação de células reprodutivas, buscando melhores índices reprodutivos.

Conclusão

Os reprodutores *C. macropomum* podem ser classificados quanto a sua qualidade espermática após a criopreservação. As maiores taxas de fertilização do sêmen

criopreservado dos reprodutores desta espécie poderão ser encontradas naqueles que apresentarem menor tamanho de cabeça e maior tempo de motilidade espermática do sêmen fresco.

Agradecimentos

Agradecemos ao grupo de pesquisa AQUAM (UFRGS/Porto Alegre – RS) e ReproPel (UFPel/Pelotas – RS) pelos laboratórios para análises, em especial a Stela Gheller e Karine Goullart, assim como a toda equipe da Piscicultura Boa Esperança, em nome do proprietários Megume Yokoyama e Simone Yokoyama, pelo espaço e material de pesquisa a campo. E ao CNPq pelo apoio financeiro ao projeto.

Referência

AHMED, H.; ANDRABI, S. M. H.; JAHAN, S. Semen quality parameters as fertility predictors of water buffalo bull spermatozoa during low breeding season. **Theriogenology**, v. 86, p. 1516-1522, 2016.

ALAVI, S. M. H.; COSSON, J. Sperm motility in fishes.(II) Effects of ions and osmolality: a review. **Cell biology international**, v. 30, n. 1, p. 1-14, 2006.

ASTURIANO, J. F.; CABRITA, E.; HORVÁTH, Á. Progress, challenges and perspectives on fish gamete cryopreservation: A mini-review. **General and Comparative Endocrinology**, v. *In press*, 2016.

BARROZO, D. *et al.* Genetic parameters and environmental effects on temperament score and reproductive traits of Nellore cattle. **Animal**, v. 6, n. 1, p. 36-40, 2012.

BATTUT, I. B. *et al.* Development of a new fertility prediction model for stallion semen, including flow cytometry. **Theriogenology**, v. 86, n. 4, p. 1111-1131, 2016.

BEIRÃO, J. *et al.* Effect of cryopreservation on fish sperm subpopulations. **Cryobiology**, v. 62, n. 1, p. 22-31, 2011.

BEIRÃO, J. *et al.* Sperm quality evaluation in *Solea senegalensis* during the reproductive season at cellular level. **Theriogenology**, v. 72, n. 9, p. 1251-1261, 2009.

BOBE, J.; LABBÉ, C. Egg and sperm quality in fish. **General and Comparative Endocrinology**, v. 165, n. 3, p. 535-548, 2010.

CABRITA, E. *et al.* Factors enhancing fish sperm quality and emerging tools for sperm analysis. **Aquaculture**, v. 432, p. 389-401, 2014.

CABRITA, E.; ROBLES, V.; HERRÁEZ, P. **Methods in reproductive aquaculture: marine and freshwater species**. Boca Raton/London/New York: CRC Press, 574p. 2009.

CABRITA, E. *et al.* Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 26, n. 5, p. 623-635, 2010.

CARNEIRO, P. C. *et al.* Cryopreservation of tambaqui (*Colossoma macropomum*) semen: extenders, cryoprotectants, dilution ratios and freezing methods. **CryoLetters**, v. 33, n. 5, p. 385-393, 2012.

COSSON, J. The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa. **Aquaculture International**, v. 12, n. 1, p. 69-85, 2004.

COSSON, J. *et al.* Studying sperm motility in marine fish: an overview on the state of the art. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 24, n. 4, p. 460-486, 2008.

DE MELLO, F. *et al.* The effect of cryoprotectant agents on DNA methylation patterns and progeny development in the spermatozoa of *Colossoma macropomum*. **General and Comparative Endocrinology**, v. *In Press*, 2016.

EVENSON, D.; THOMPSON, L.; JOST, L. Flow cytometric evaluation of boar semen by the sperm chromatin structure assay as related to cryopreservation and fertility. **Theriogenology**, v. 41, n. 3, p. 637-651, 1994.

FABBROCINI, A. *et al.* Cryopreservation of seabream (*Sparus aurata*) spermatozoa. **Cryobiology**, v. 40, n. 1, p. 46-53, 2000.

FERNÁNDEZ-GAGO, R.; DOMÍNGUEZ, J. C.; MARTÍNEZ-PASTOR, F. Seminal plasma applied post-thawing affects boar sperm physiology: A flow cytometry study. **Theriogenology**, v. 80, n. 4, p. 400-410, 2013.

FIGUEROA, E. *et al.* Effects of cryopreservation on mitochondria of fish spermatozoa. **Reviews in Aquaculture**, 2015.

GAGE, M. J. *et al.* Spermatozoal traits and sperm competition in Atlantic salmon: relative sperm velocity is the primary determinant of fertilization success. **Current biology**, v. 14, n. 1, p. 44-47, 2004.

GALLEGO, V. *et al.* Fish sperm subpopulations: Changes after cryopreservation process and relationship with fertilization success in tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Theriogenology**, v. 87, p. 16-24, 2017.

GARCIA, R. *et al.* Semen Cryopreservation in Brazilian Freshwater Fish: Advances and Main Challenges. In: MARCO-JIMÉNEZ, F. e AKDEMIR, H. (Ed.). **Cryopreservation in Eukaryotes**: InTech, 2016. cap. 4, on-line.

GARCIA, R. R. F. *et al.* Functional integrity of *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816) sperm cryopreserved with enriched extender solutions. **Neotropical Ichthyology**, v. 13, n. 3, p. 599-606, 2015.

GILLAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, W. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. **Theriogenology**, v. 63, n. 2, p. 445-457, 2005.

GÜLLÜ, K. *et al.* Effects of seminal plasma properties on percentage and duration of shabut (*Barbus grypus* Heckel, 1843) sperm motility. **The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh**, 2015.

KANUGA, M. *et al.* Subpopulation distribution of motile sperm relative to activation medium in steelhead (*Oncorhynchus mykiss*). **Theriogenology**, v. 77, n. 5, p. 916-925, 2012.

KIME, D. *et al.* Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 130, n. 4, p. 425-433, 2001.

KUMAR, P. *et al.* Quantification of leptin in seminal plasma of buffalo bulls and its correlation with antioxidant status, conventional and computer-assisted sperm analysis (CASA) semen variables. **Animal Reproduction Science**, v. 166, p. 122-127, 2016.

LEITE, L. *et al.* Determination of insemination dose and embryonic development in the artificial fertilization of tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 2, p. 421-429, 2013.

MARIA, A. *et al.* Semen characterization and sperm structure of the Amazon tambaqui *Colossoma macropomum*. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 26, n. 5, p. 779-783, 2010.

MARIA, A. N. *et al.* Hormonal induction and semen characteristics of tambaqui *Colossoma macropomum*. **Zygote**, v. 20, n. 01, p. 39-43, 2011.

MARIA, A. N. *et al.* Use of cryotubes for the cryopreservation of tambaqui fish semen (*Colossoma macropomum*). **Cryobiology**, v. 70, n. 2, p. 109-114, 2015.

MARTÍNEZ-PASTOR, F. *et al.* Multivariate cluster analysis to study motility activation of *Solea senegalensis* spermatozoa: a model for marine teleosts. **Reproduction**, v. 135, n. 4, p. 449-459, 2008.

MELO-MACIEL, M. *et al.* Aloe vera in the cryopreservation of tambaqui (*Colossoma macropomum*) sperm. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, n. 3, p. 945-949, 2015.

MENEZES, J. T. B. *et al.* Sperm evaluation of tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), after thawing. **Acta Amazonica**, v. 38, n. 2, p. 365-368, 2008.

MIGAUD, H. *et al.* Broodstock management and gamete quality in temperate fish. **Reviews in Aquaculture**, v. 5, n. 1, p. S194-S223, 2013.

MILIORINI, A. B. *et al.* A morphological classification proposal for curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm damages after cryopreservation. **Aquaculture Research**, v. 42, n. 2, p. 177-187, 2011.

MURGAS, L. *et al.* Importance of evaluation of reproductive parameters in native fish. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** v. 35, n. 2, p. 186-191, 2011.

MYLONAS, C. C.; FOSTIER, A.; ZANUY, S. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. **General and Comparative Endocrinology**, v. 165, n. 3, p. 516-534, 2010.

PEDROZA-FILHO, M. X.; RODRIGUES, A. P. O.; REZENDE, F. B. Dinâmica da produção de tambaqui e demais peixes redondos no Brasil. **Ativos Aquicultura**, v. 7, n. 2, p. 5, 2016.

PEGG, D. E. Principles of cryopreservation. In: DAY, J. e STACEY, G. (Ed.). **Cryopreservation and freeze-drying protocols**. 2nd. 2007. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., cap. 3, p.39-57, 2007.

PETRUNKINA, A. M. *et al.* Detection of cooling-induced membrane changes in the response of boar sperm to capacitating conditions. **Theriogenology**, v. 63, n. 8, p. 2278-2299, 2005.

PIEHLER, E. *et al.* Dynamic quantification of the tyrosine phosphorylation of the sperm surface proteins during capacitation. **Cytometry (Part A)**, v. 69, n. 10, p. 1062-1070, 2006.

REIS, L. *et al.* Integrity of the plasma membrane, the acrosomal membrane, and the mitochondrial membrane potential of sperm in Nelore bulls from puberty to sexual maturity. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 3, p. 620-628, 2016.

ROBLES, V. *et al.* Molecular basis of spermatogenesis and sperm quality. **General and comparative endocrinology**, v. *In Press*, 2016.

RURANGWA, E. *et al.* The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. **Aquaculture**, v. 234, n. 1, p. 1-28, 2004.

SILVEIRA, T. D. S. *et al.* Sexual maturity and reproductive parameters of Nelore bulls, raised under pasture conditions. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 3, p. 503-511, 2010.

SIQUEIRA, J.; GUIMARAES, J.; PINHO, R. Relationship between scrotal circumference and productive and reproductive traits in beef cattle: a review. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 37, n. 1, p. 3-13, 2013.

STREIT JR, D. P. *et al.* Different techniques evaluate to stain fish semen. **Arquivo de Ciência Veterinária e Zoologia**, v. 7, n. 2, p. 157-162, 2004.

STREIT JR, D. P. *et al.* Semen of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) criopreserved used diluent for swine semen. **Ciência Animal Brasileira**, v. 7, n. 3, p. 289-297, 2006.

STREIT JR., D. P. *et al.* Recomendações técnicas para a reprodução do tambaqui. **Embrapa Meio Norte: Teresina**, v. 212, p. 29, 2012.

TUSET, V. *et al.* Relationships between morphology, motility and fertilization capacity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 24, n. 4, p. 393-397, 2008.

UTT, M. D. Prediction of bull fertility. **Animal reproduction science**, v. 169, p. 37-44, 2016.

VALDEBENITO, I. I.; GALLEGOS, P. C.; EFFER, B. R. Gamete quality in fish: evaluation parameters and determining factors. **Zygote**, v. 23, p. 1-21, 2013.

VARELA JUNIOR, A. *et al.* Use of amides as cryoprotectants in extenders for frozen sperm of tambaqui, *Colossoma macropomum*. **Theriogenology**, v. 78, n. 2, p. 244-251, 2012.

VARELA JUNIOR, A. *et al.* Methods of cryopreservation of Tambaqui semen, *Colossoma macropomum*. **Animal Reproduction Science**, v. 157, p. 71-77, 2015.

CAPÍTULO V

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A influência da indução hormonal em reprodutores *Brycon insignis* não é capaz de alterar significativamente a qualidade espermática a ponto de diminuir a qualidade. A recomendação sobre qual hormônio indutor utilizar pode ser feita com base na disponibilidade ou preço do produto no mercado.

A utilização de soluções diluidoras para resfriar e preservar o sêmen de reprodutores *Colossoma macropomum* é uma alternativa para minimizar alguns efeitos que possam surgir durante o período reprodutivo. O diluidor BTS® pode ser empregado nesta função, porém acreditamos que se faça necessário a buscar por um meio diluidor para o sêmen das espécies nativas. A conservação a curto prazo do sêmen deve ser realizada com cautela, e procurar não exceder as 72 horas de armazenamento.

A qualidade do sêmen criopreservado, pode variar mesmo que os reprodutores possam estar nas mesmas condições, e foram submetidos aos mesmos tratamentos. A classificação dos reprodutores para utilização em piscicultura auxilia no aumento da produção e melhoramento do manejo. Os reprodutores que apresentem tamanho de cabeça menor, podem apresentar melhores taxas de fertilização quando o sêmen dos animais for criopreservado. A avaliação simples de tempo de motilidade pode ser considerada como um indicador de qualidade seminal pré congelamento, onde os animais que apresentarem as melhores taxas poderão apresentar taxas de fertilização melhores quando o sêmen for criopreservado.

A utilização de diferentes análises para aferir a qualidade seminal é capaz de gerar resultados mais fidedignos sobre a real qualidade das células espermáticas ou mesmo o impacto da aplicação da técnica de criopreservação. A utilização da ferramenta estatística multivariada através de clusters, auxiliou a interpretação dos resultados quando agrupou os animais utilizando diversas variáveis, e esse fator pode gerar dados extremamente informativos para a classificação de reprodutores.

REFERÊNCIAS

- ADAMES, M. S. et al. Optimization of the sperm: oocyte ratio and sperm economy in the artificial reproduction of *Rhamdia quelen* using fructose as a sperm motility modulator. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 161, p. 119-128, 2015.
- AHMED, H.; ANDRABI, S. M. H.; JAHAN, S. Semen quality parameters as fertility predictors of water buffalo bull spermatozoa during low breeding season. **Theriogenology**, Stoneham, v. 86, n. 6, p. 1516-1522, 2016.
- ALAVI, S. M. H. et al. Chemical composition and osmolality of seminal fluid of *Acipenser persicus*; their physiological relationship with sperm motility. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 35, n. 13, p. 1238-1243, 2004.
- ALAVI, S. M. H. et al. Sperm quality in male *Barbus barbus* L. fed different diets during the spawning season. **Fish physiology and biochemistry**, Dordrecht, v. 35, n. 4, p. 683-693, 2009.
- 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, 2006.
- ANDRADE, D. R.; YASUI, G. S. Natural and artificial breeding management and its importance in fish production in Brazil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 27, n. 2, p. 166-172, 2003.
- ANDRADE, E. D. S. et al. Milt cryopreservation for rheophilic fish threatened by extinction in the Rio Grande, Brazil. **Cryo Letters**, London, v. 35, n. 1, p. 8-14, 2014.
- ARAMLI, M. et al. Relationships between selected sperm characteristics and fertilisation success in the beluga sturgeon, *Huso huso* (Linnaeus, 1758). **Veterinarni Medicina**, Praha, v. 60, n. 9, p. 509-514, 2015.
- ARAMLI, M.; KALBASSI, M.; NAZARI, R. Study of sperm concentration, seminal plasma composition and their physiological correlation in the Persian sturgeon, *Acipenser persicus*. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 48, n. 6, p. 1013-1018, 2013.
- ASTURIANO, J. F.; CABRITA, E.; HORVÁTH, Á. Progress, challenges and perspectives on fish gamete cryopreservation: A mini-review. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 245, p. 69-76, 2016.
- BARROZO, D. et al. Genetic parameters and environmental effects on temperament score and reproductive traits of Nellore cattle. **Animal**, Cambridge, v. 6, n. 1, p. 36-40, 2012.

- BATTUT, I. B. et al. Development of a new fertility prediction model for stallion semen, including flow cytometry. **Theriogenology**, Stoneham, v. 86, n. 4, p. 1111-1131, 2016.
- BEIRÃO, J. et al. Effect of cryopreservation on fish sperm subpopulations. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 62, n. 1, p. 22-31, 2011.
- BEIRÃO, J. et al. Sperm quality evaluation in *Solea senegalensis* during the reproductive season at cellular level. **Theriogenology**, Stoneham, v. 72, n. 9, p. 1251-1261, 2009.
- BOBE, J.; LABBÉ, C. Egg and sperm quality in fish. *General and Comparative Endocrinology*, New York, v. 165, n. 3, p. 535-548, 2010.
- BORGES, A. et al. Biochemical composition of seminal plasma and annual variations in semen characteristics of jundia *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, Pimelodidae). **Fish Physiology and Biochemistry**, Dordrecht, v. 31, n. 1, p. 45-53, 2005.
- BUTTS, I. A. E. et al. Seminal plasma biochemistry and spermatozoa characteristics of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) of wild and cultivated origin. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, New York, v. 159, n. 1, p. 16-24, 2011.
- CABRITA, E. et al. Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. **Journal of Applied Ichthyology**, Berlin, v. 26, n. 5, p. 623-635, 2010.
- CABRITA, E. et al. Cryopreservation of rainbow trout sperm in large volume straws: application to large scale fertilization. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 201, n. 3-4, p. 301-314, 2001.
- CABRITA, E. et al. Factors enhancing fish sperm quality and emerging tools for sperm analysis. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 432, p. 389-401, 2014.
- CABRITA, E.; ROBLES, V.; HERRÁEZ, P. (Ed.). **Methods in reproductive aquaculture**: marine and freshwater species. Boca Raton: CRC Press, 2009.
- CARNEIRO, P. C. et al. Cryopreservation of tambaqui (*Colossoma macropomum*) semen: extenders, cryoprotectants, dilution ratios and freezing methods. **Cryo Letters**, London, v. 33, n. 5, p. 385-393, 2012.
- CARNEIRO, P. C. F. et al. Viabilidade do sêmen do jundiá, *Rhamdia quelen*, armazenado sob refrigeração. **Revista Acadêmica: Ciência Animal**, Curitiba, v. 4, n. 3, p. 11-16, 2006.

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

CAROLSFELD, J. et al. Criopreservação do semen de pacu, *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1987. **Boletim Técnico CEPTA**, Pirassununga, v. 3, p. 1-4, 1990.

CAROLSFELD, J. et al. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. **Journal of Fish Biology**, London, v. 63, n. 2, p. 472-489, 2003.

CECCARELLI, P. S. et al. Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*, Valenciennes, 1849). In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. (Ed.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: Editora UFSM, 2013. cap. 5, p. 117-148.

CHAO, N.-H.; LIAO, I. C. Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 197, n. 1, p. 161-189, 2001.

COSER, A. M.; GODINHO, H.; RIBEIRO, D. Cryogenic preservation of spermatozoa from *Prochilodus scrofa* and *Salminus maxillosus*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 37, n. 4, p. 387-390, 1984.

COSER, A.; GODINHO, H.; TORQUATO, V. Criopreservação do sêmen do peixe piau *Leporinus silvestrii* (Boulanger, 1902). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 39, n. 1, p. 37-42, 1987.

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, 2008.

COSSON, J. The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa. **Aquaculture International**, London, v. 12, n. 1, p. 69-85, 2004.

DE MELLO, F. et al. The effect of cryoprotectant agents on DNA methylation patterns and progeny development in the spermatozoa of *Colossoma macropomum*. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 245, p. 94-101, 2016.

DOS SANTOS, G. M. **Peixes comerciais de Manaus**. Manaus: Ibama, ProVárzea, 2006. 144p.

EVENSON, D.; THOMPSON, L.; JOST, L. Flow cytometric evaluation of boar semen by the sperm chromatin structure assay as related to cryopreservation and fertility. **Theriogenology**, Stoneham, v. 41, n. 3, p. 637-651, 1994.

FABBROCINI, A. et al. Cryopreservation of seabream (*Sparus aurata*) spermatozoa. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 40, n. 1, p. 46-53, 2000.

FALLAH SHAMSI, S.; KHARA, H. Influence of broodstock age on sperm quality traits in *Rutilus frisii* and its effect on fertilization success. **Iranian Journal of Fisheries Sciences**, Tehran, v. 14, n. 4, p. 985-996, 2015.

FARIAS, J. O. et al. Avaliação "In Vitro" e "In Vivo" do Sêmen de Tambaqui (*Colossoma macropomum*) Conservado a Temperatura Ambiente e Criopreservado em Água de Coco. **Revista Científica de Produção Animal**, Teresina, v. 1, n. 1, p. 44-58, 1999.

FERNÁNDEZ-GAGO, R.; DOMÍNGUEZ, J. C.; MARTÍNEZ-PASTOR, F. Seminal plasma applied post-thawing affects boar sperm physiology: A flow cytometry study. **Theriogenology**, Stoneham, v. 80, n. 4, p. 400-410, 2013.

FIGUEROA, E. et al. Effects of cryopreservation on mitochondria of fish spermatozoa. **Reviews in Aquaculture**, Malden, v. 9, n. 1, p. 76-87, 2015.

FOGLI DA SILVEIRA, W. et al. Avaliação espermática, preservação criogênica e fertilidade do sêmen do pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), proveniente de reprodução induzida. **Boleim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 17, p. 1-3, 1990.

FRANCISCATTO, R. et al. Qualidade do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) e taxa de fertilidade após resfriamento a 4°C. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 26, n. 3, p. 213-215, 2002.

FURUYA, W. Espécies nativas. In: MOREIRA, H. (Ed.). **Fundamentos da Moderna Aqüicultura**. Canoas: ULBRA, 2001. cap. 10, p. 83-90.

GAGE, M. J. et al. Spermatozoal traits and sperm competition in Atlantic salmon: relative sperm velocity is the primary determinant of fertilization success. **Current biology**, Cambridge, v. 14, n. 1, p. 44-47, 2004.

GALLEGO, V. et al. Fish sperm subpopulations: Changes after cryopreservation process and relationship with fertilization success in tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Theriogenology**, Stoneham, v. 87, p. 16-24, 2017.

GALO, J. et al. Oocyte quality of tambaqui (*Colossoma macropomum*) during the reproductive season. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 75, n. 2, p. 279-284, 2015.

GALO, J. M. et al. Spermatic abnormalities of piraicanjuba *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849) after cryopreservation. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 71, n. 3, p. 693-699, 2011.

GARCIA, R. et al. Semen Cryopreservation in Brazilian Freshwater Fish: Advances and Main Challenges. In: MARCO-JIMÉNEZ, F.; AKDEMIR, H. (Ed.). **Cryopreservation in Eukaryotes**. [on-line]. Rijeka: InTech, 2016a. cap. 4.

GARCIA, R. R. F. et al. Different extenders solutions for tambaqui semen cooling. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 51, n. 6, p. 780-784, 2016b.

GARCIA, R. R. F. et al. Functional integrity of *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816) sperm cryopreserved with enriched extender solutions. **Neotropical Ichthyology**, Maringá, v. 13, n. 3, p. 599-606, 2015.

GARCIA, R. R. F. et al. Seminal characteristics of piabanha before and after induction with different hormones. **Acta Scientiarum - Biological Sciences**, Maringá, v. 37, n. 4, p. 399-403, 2015.

GERBER, M. D. et al. Toxicity evaluation of parboiled rice effluent using sperm quality of zebrafish as bioindicator. **Ecological Indicators**, New York, v. 61, p. 214-218, 2016.

GILLAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, W. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. **Theriogenology**, Stoneham, v. 63, n. 2, p. 445-457, 2005.

GIRARDI, L.; FARIA, C.A.; SANTOS, P.P. Reprodução induzida, larvicultura e alevinagem de piabanha (*Brycon insignis*) na Estação de Aquicultura de Paraibuna DESP/SP. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE ICTIOLOGIA, 10., 1993, São Paulo. **Resumos...** São Paulo, 1993. p. 92.

GOMES, L. C.; SIMÕES, L. N.; ARAUJO-LIMA, C. A. R. M. Tambaqui (*Colossoma macropomum*). In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. (Ed.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria/RS, 2013. cap. 7, p. 175-204. v. 2.

GÜLLÜ, K. et al. Effects of seminal plasma properties on percentage and duration of shabut (*Barbus grypus* Heckel, 1843) sperm motility. **The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh**, Jerusalem, v. 67, 2015.

HILSDORF, A. W. S.; LIMA, F.C.T.; MATSUMOTO, C.K. *Brycon insignis* Steindachner (1877). MACHADO, A.B.M.; DRUMMOND, G.M.; PAGLIA, A.P. (Ed.). **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**. Brasília: MMA, 2008. p. 48–50.

HOLT, W. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal reproduction science**, Amsterdam, v. 62, n. 1-3, p. 3-22, 2000.

KANUGA, M. et al. Subpopulation distribution of motile sperm relative to activation medium in steelhead (*Oncorhynchus mykiss*). **Theriogenology**, Stoneham, v. 77, n. 5, p. 916-925, 2012.

KAVAMOTO, E. et al. Fertilização em *Prochilodus scrofa* Steindachner 1881, com sêmen criopreservado em nitrogênio líquido. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 16, n. 1, p. 29-36, 1989.

KHODADADI, M.; ARAB, A.; JAFERIAN, A. A Preliminary Study on Sperm Morphology, Motility and Composition of Seminal Plasma of Shirbot, *Barbus grypus*. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, Lund, v. 16, n. 4, p. 947-951, 2016.

KIME, D. et al. Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, New York, v. 130, n. 4, p. 425-433, 2001.

KUMAR, P. et al. Quantification of leptin in seminal plasma of buffalo bulls and its correlation with antioxidant status, conventional and computer-assisted sperm analysis (CASA) semen variables. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 166, p. 122-127, 2016.

LAHNSTEINER, F.; RADNER, M. Lysozyme activities and immunoglobulin concentrations in seminal plasma and spermatozoa of different teleost species and indications on its significance for sperm function. **Theriogenology**, Stoneham, v. 74, n. 2, p. 246-254, 2010.

LAHNSTEINER, F.; WEISMANN, T.; PATZNER, R. Methanol as cryoprotectant and the suitability of 1.2 ml and 5 ml straws for cryopreservation of semen from salmonid fishes. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 28, n. 6, p. 471-479, 1997.

LEITE, L. et al. Determination of insemination dose and embryonic development in the artificial fertilization of tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 65, n. 2, p. 421-429, 2013.

LEITE, L. V. et al. Criopreservação de sêmen de tambaqui com ACP® adicionado de gema de ovo. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, São Luís, v. 6, n. 2, p. 23-29, 2011.

LIMA, F.C.T. **Revisão taxonômica do gênero Brycon (Müller & Troschel, 1844), dos rios da América do Sul cisandina (Pisces, Ostariophysi, Characiformes, Characidae)**. 2001. 312 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, São Paulo, 2001.

MACHADO C, A. H. Notas preliminares sobre a caça e a pesca no Estado de São Paulo - I. A Pesca no Vale do Paraíba. **Boletim de Indústria Animal**, São Paulo, v. 13, p. 145-160, 1952.

MAGNOTTI, C. et al. Cryopreservation and vitrification of fish semen: a review with special emphasis on marine species. **Reviews in Aquaculture**, Malden, v. 0, p. 1-11, 2016.

MARIA, A. 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, 2006.

MARIA, A. et al. Semen characterization and sperm structure of the Amazon tambaqui *Colossoma macropomum*. **Journal of Applied Ichthyology**, Berlin, v. 26, n. 5, p. 779-783, 2010.

MARIA, A. N. et al. Hormonal induction and semen characteristics of tambaqui *Colossoma macropomum*. **Zygote**, Cambridge, v. 20, n. 1, p. 39-43, 2011a.

MARIA, A. N. et al. Use of cryotubes for the cryopreservation of tambaqui fish semen (*Colossoma macropomum*). **Cryobiology**, Amsterdam, v. 70, n. 2, p. 109-114, 2015.

MARIA, A.; AZEVEDO, H.; CARNEIRO, P. **Protocolo para criopreservação do sêmen de Tambaqui (*Colossoma macropomum*)**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2011b.

MARQUES, S.; GODINHO, H. P. Short-term cold storage of sperm from six neotropical characiformes fishes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 47, n. 5, p. 799-804, 2004.

MARTÍNEZ-PASTOR, F. et al. Multivariate cluster analysis to study motility activation of *Solea senegalensis* spermatozoa: a model for marine teleosts. **Reproduction**, Bristol, v. 135, n. 4, p. 449-459, 2008.

MAZUR, P. Principles of Cryobiology. In: FULLER, B.J.; LANE, N.; BENSON, E.E. (Ed.). **Life in the frozen state**. Boca Raton: CRC Press, 2004. p. 3-65.

MELO-MACIEL, M. et al. Aloe vera in the cryopreservation of tambaqui (*Colossoma macropomum*) sperm. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 67, n. 3, p. 945-949, 2015.

MENEZES, J. T. B. et al. Sperm evaluation of tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), after thawing. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 38, n. 2, p. 365-368, 2008.

MIGAUD, H. et al. Broodstock management and gamete quality in temperate fish. **Reviews in Aquaculture**, Malden, v. 5, n. 1, p. S194-S223, 2013.

MILIORINI, A. et al. 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, 2002.

MILIORINI, A. B. et al. A morphological classification proposal for curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm damages after cryopreservation. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 42, n. 2, p. 177-187, 2011.

MURGAS, L. et al. Importance of evaluation of reproductive parameters in native fish. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 35, n. 2, p. 186-191, 2011.

MURGAS, L. et al. Viabilidade seminal de piapara (*Leporinus obtusidens*), empregando-se diferentes diluentes, no resfriamento do sêmen à 4 C. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 26, n. 3, p. 211-213, 2002.

MURGAS, L. D. S. et al. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory freshwater fish. In: YAMASHIRO, H. **Recent Advances in Cryopreservation**. Rijeka: InTech, 2014. p. 59-71.

MYLONAS, C. C.; FOSTIER, A.; ZANUY, S. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 165, n. 3, p. 516-534, 2010.

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

NOMURA, H. **Dicionário dos peixes no Brasil**. Brasília: Editerr. 1984. 482 p.

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

PARDO-CARRASCO, S. C. et al. Evaluation of milt quality of the yamú *Brycon amazonicus* under hormonal induction. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, Medellín, v. 19, n. 2, p. 134-139, 2006b.

PARDO-CARRASCO, S. C.; et al. Induction to maturation and ovulation of yamú *Brycon amazonicus* with CPE and mGnRH α . **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, Medellín, v. 19, n. 2, p. 160-166, 2006a.

PEDROZA-FILHO, M. X.; RODRIGUES, A. P. O.; REZENDE, F. B. **Dinâmica da produção de tambaqui e demais peixes redondos no Brasil**. Brasília: CNA, 2016. (Ativos Aquicultura, 7)

PEGG, D. E. Principles of cryopreservation. In: DAY, J.; STACEY, G. (Ed.). **Cryopreservation and freeze-drying protocols**. 2nd ed. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., 2007. cap. 3, p. 39-57.

PETRUNKINA, A. M. et al. Detection of cooling-induced membrane changes in the response of boar sperm to capacitating conditions. **Theriogenology**, Stoneham, v. 63, n. 8, p. 2278-2299, 2005.

PIEHLER, E. et al. Dynamic quantification of the tyrosine phosphorylation of the sperm surface proteins during capacitation. **Cytometry (Part A)**, Hoboken, N.J., v. 69, n. 10, p. 1062-1070, 2006.

QUEIROZ, L. J. et al. **Peixes do Rio Madeira São Paulo: Brasil, 2013. V. 2, 354 p.**

RANZANI-PAIVA, M. J. T. et al. Análises hematológicas de curimbatá (*Prochilodus scrofa*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*) das estações de piscicultura do instituto de pesca, estado de São Paulo. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 25, p. 77-83, 1999.

REIS, L. et al. Integrity of the plasma membrane, the acrosomal membrane, and the mitochondrial membrane potential of sperm in Nelore bulls from puberty to sexual maturity. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 68, n. 3, p. 620-628, 2016.

RIZZO, E.; BAZZOLI, N. Reprodução e Embriogênese. In: BALDISSEROTTO, B. et al. (Ed.). **Biologia e Fisiologia de Peixes Neotropicais de Água Doce**. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 2014. cap. 13, p. 265-284.

ROBLES, V. et al. Molecular basis of spermatogenesis and sperm quality. **General and comparative endocrinology**. 2016. (In press)

RURANGWA, E. et al. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 234, n. 1, p. 1-28, 2004.

SALGADO, A.F.G. et al. **A conservação da piabanha (*Brycon insignis*) na Bacia do Rio Paraíba do Sul**. São Paulo: [CESP], 1997. 28 p. (Relatório Técnico-CESP).

SHIMODA E, et al. Utilização do espermatócrito para estimar a concentração espermática no sêmen da piabanha (*Brycon insignis*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 44, p. 19-24, 2007.

SILVEIRA, T. D. S. et al. Sexual maturity and reproductive parameters of Nelore bulls, raised under pasture conditions. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 39, n. 3, p. 503-511, 2010.

- SIQUEIRA, J.; GUIMARAES, J.; PINHO, R. Relationship between scrotal circumference and productive and reproductive traits in beef cattle: a review. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 37, n. 1, p. 3-13, 2013.
- STREIT JR, D. et al. Different techniques evaluate to stain fish semen. **Arquivo de Ciências Veterinária e Zoologia**, Umuarama, v. 7, n. 2, p. 157-162, 2004.
- STREIT JR, D. P. et al. Semen of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) cryopreserved used diluent for swine semen. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 7, n. 3, p. 289-297, 2006a.
- STREIT JR., D. et al. **Recomendações técnicas para a reprodução do tambaqui**. Embrapa Meio Norte: Teresina, 2012. V. 212. 29 p.
- STREIT JR., D. P. et al. Características qualitativas do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) após indução hormonal. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 22, n. 3, p. 119-125, 2006b.
- STREIT-JR, D. et al. Sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) submetido ao resfriamento ao longo do tempo com diferentes meios diluidores. **Revista Biociências**, Taubaté, v. 13, p. 178-187, 2007.
- TAITSON, P.; CHAMI, E.; GODINHO, H. Gene banking of the neotropical fish *Leporinus obtusidens* (Valenciennes, 1836): a protocol to freeze its sperm in the field. **Animal reproduction science**, Amsterdam, v. 105, n. 3, p. 283-291, 2008.
- TUSET, V. et al. Relationships between morphology, motility and fertilization capacity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. **Journal of Applied Ichthyology**, Berlin, v. 24, n. 4, p. 393-397, 2008.
- UTT, M. D. Prediction of bull fertility. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 169, p. 37-44, 2016.
- VALDEBENITO, I. I.; GALLEGOS, P. C.; EFFER, B. R. Gamete quality in fish: evaluation parameters and determining factors. **Zygote**, Cambridge, v. 23, n. 2, p. 1-21, 2013.
- VARELA JUNIOR, A. et al. Methods of cryopreservation of Tambaqui semen, *Colossoma macropomum*. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 157, p. 71-77, 2015.
- VARELA JUNIOR, A. et al. Use of amides as cryoprotectants in extenders for frozen sperm of tambaqui, *Colossoma macropomum*. **Theriogenology**, Stoneham, v. 78, n. 2, p. 244-251, 2012.

VASCONCELOS, A. C. N. et al. Cryopreservation of *Prochilodus lineatus* semen: Effect of cryoprotectants Combination. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 41, n. esp., p. 817-824, 2015.

VELASCO-SANTAMARÍA, Y. M.; MEDINA-ROBLES, V. M.; CRUZ-CASALLAS, P. E. Cryopreservation of yamú (*Brycon amazonicus*) sperm for large scale fertilization. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 256, n. 1, p. 264-271, 2006.

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

VIVEIROS, A. et al. Effects of extenders, cryoprotectants and freezing methods on sperm quality of the threatened Brazilian freshwater fish pirapitinga-do-sul *Brycon opalinus* (Characiformes). **Theriogenology**, Stoneham, v. 78, n. 2, p. 361-368, 2012b.

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

VIVEIROS, A. et al. Spermatozoon ultrastructure and sperm cryopreservation of the Brazilian dry season spawner fish pirapitinga, *Brycon nattereri*. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 43, n. 4, p. 546-555, 2012b.

VIVEIROS, A. T. et al. Methyl glycol, methanol and DMSO effects on post-thaw motility, velocities, membrane integrity and mitochondrial function of *Brycon orbignyanus* and *Prochilodus lineatus* (Characiformes) sperm. **Fish physiology and biochemistry**, Dordrecht, v. 41, n. 1, p. 193-201, 2015.

VIVEIROS, A. T. et al. Powder coconut water (ACP®) as extender for semen cryopreservation of Brazilian migratory fish species. **Cybium-International Journal of Ichthyology**, Paris, v. 32, p. 215, 2008.

VIVEIROS, A.; ORFÃO, L.; LEAL, M. Biologia e Conservação de Espermatozoides. In: BALDISSEROTTO, B.; CYRINO, J. E. P. et al. (Ed.). **Biologia e Fisiologia de Peixes Neotropicais de Água Doce**. Joticabal: FUNEP/UNESP, 2014a. cap. 15, p. 307-327.

VIVEIROS, A.; TAFFAREL, T. R.; LEAL, M. C. Osmolality and composition of the extender during the cold storage of *Prochilodus lineatus* (Characiformes: Prochilodontidae) sperm. **Neotropical Ichthyology**, Maringá, v. 12, n. 3, p. 643-648, 2014b.

WANG, Z.; CRIM, L. Seasonal changes in the biochemistry of seminal plasma and sperm motility in the ocean pout, *Macrozoarces americanus*. **Fish Physiology and Biochemistry**, Dordrecht, v. 16, n. 1, p. 77-83, 1997.

WATSON, P. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 C by egg-yolk lipoprotein. **Journal of Reproduction and Fertility**, Colchester, v. 62, n. 2, p. 483-492, 1981.

WOYNAROVICH, E.; HORVÁTH, L. **A propagação artificial de peixes de águas tropicais**. Brasília: FAO/CODEVASF/CNPQ, 1983.

ZANANDREA, C. V.; WEINGARTNER, M.; ZANIBONI-FILHO, E. Use of ACP-104 at Different Dilutions for Sperm Cryopreservation of Dourado, *Salminus brasiliensis*. **Journal of the World Aquaculture Society**, Baton Rouge, v. 45, n. 1, p. 82-87, 2014.

ZANIBONI-FILHO, E.; BARBOSA, N. D. C. Priming hormone administration to induce spawning of some Brazilian migratory fish. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 56, n. 4, p. 655-659, 1996.

ZANIBONI FILHO, E.; NUÑER, A. Fisiologia da reprodução e propagação artificial dos peixes. In: CYRINO, J. E. P. et al. (Ed.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt: Sociedade Brasileira de Aqüicultura e Biologia Aquática, 2004. cap. 4, p. 45-73.

VITA

Raycon Roberto Freitas Garcia, nasceu em Rolim de Moura – RO no dia 15 de março de 1987. Filho de Carlos R. Garcia e Eunice B. F. Garcia, estudo o ensino fundamental e médio na Escola Estadual Cel. Aluizio Pinheiro Ferreira, e em 2006 ingresso no curso de Zootecnia na Universidade Estadual do Mato Grosso, onde foi bolsista de iniciação científica e monitor do laboratório de Nutrição Animal sob supervisão do Prof. Dr. Luis Juliano Valério Geron, e concluiu o curso em 2010. Em 2011 foi aceito no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob orientação do Prof. Dr. Danilo Pedro Streit Jr. e começou seu mestrado com ênfase em Reprodução de Peixes, onde trabalhou com temas de Técnicas de Conservação Seminal, Qualidade Seminal e Reprodutiva, neste período foi bolsista da CAPES. Defendeu a dissertação em 2013, mesmo ano que ingresso no doutorado na mesma universidade, programa e orientação, com bolsa do CNPq. No período de doutoramento trabalhou com Qualidade Reprodutiva, Criobiologia, Técnicas de Avaliação Seminal e Proteomica. Entre abril de 2016 a janeiro de 2017 realizou o doutorado modalidade sanduíche pelo CNPq na Universidade do Algarve, sob supervisão da Profa. Dra. Elsa Cabrita, em setembro de 2016 participou do 7º Aquagamete Training School – Proteomic in Fish Reproduction, no Instituto de Pesquisa em Reprodução e Nutrição Animal da Academia Polonesa de Ciência em Olsztyn. Em março de 2017 submeteu a Tese a banca examinadora na Universidade Federal do Rio Grande do Sul em Porto Alegre – RS.