

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL – UFRGS  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO RIO GRANDE DO SUL – UERGS

JULIO CESAR ZEMOR

ANORMALIDADES MORFOLÓGICAS NO SÊMEN *IN NATURA* E PÓS  
CRIOPRESERVAÇÃO DE TAMBQUI *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818)  
(CHARACIDAE) EM DIFERENTES COMBINAÇÕES DE DILUIDORES E  
CRIOPROTETORES

IMBÉ

2011

JULIO CESAR ZEMOR

ANORMALIDADES MORFOLÓGICAS NO SÊMEN *IN NATURA* E PÓS  
CRIOPRESERVAÇÃO DE TAMBAQUI *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818)  
(CHARACIDAE) EM DIFERENTES COMBINAÇÕES DE DILUIDORES E  
CRIOPROTETORES

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
como requisito parcial para obtenção do título de  
bacharel no Curso de Ciências Biológicas ênfase  
Gestão Ambiental Marinha e Costeira da  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul e  
Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Ênio Lupchinski Jr.

Coorientador: Prof. Dr. Danilo P. Streit Jr.

IMBÉ

2011

Aos examinadores,

Este trabalho está formatado segundo as normas de GRANDI, Cleci *et al.* **Orientações para elaboração e apresentação de trabalhos e relatórios acadêmicos.** Porto Alegre: UERGS, 2010. 95 p. O qual segue as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT.

Z53a Zemor, Julio Cesar

Anormalidades morfológicas no sêmen *in natura* e pós-criopreservação de Tambaqui *Colossoma macropomun* (CUVIER, 1818) (Characidae) em diferentes combinações de diluidores e crioprotetores / Julio Cesar Zemor. – 2011.

38 f.

Orientador: Ênio Lupchinski Júnior

Coorientador: Danilo Pedro Streit Junior

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências e Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Curso de Ciências Biológicas com ênfase em Gestão Ambiental Marinha e Costeira, Imbé/Cidreira, BR-RS, 2011.

1. Tambaqui. 2. Morfologia espermática. 3. Sêmen. 4. Peixe. 5. Criopreservação. I. Lupchinski Júnior, Ênio, orient. II. Streit Junior, Danilo Pedro, coorient. III. Título.

JULIO CESAR ZEMOR

ANORMALIDADES MORFOLÓGICAS NO SÊMEN *IN NATURA* E PÓS  
CRIOPRESERVAÇÃO DE TAMBQUI *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818)  
(CHARACIDAE) EM DIFERENTES COMBINAÇÕES DE DILUIDORES E  
CRIOPROTETORES

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
como requisito parcial para obtenção do título de  
bacharel no Curso de Ciências Biológicas ênfase  
Gestão Ambiental Marinha e Costeira da  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul e  
Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.

Aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA:

---

Doutorando Darci Carlos Fornari

---

Doutoranda Juliana Minardi Galo

Coordenador da Atividade TCC II

---

Prof. Dr. Eduardo Guimarães Barboza

*Dedico está monografia aos meus familiares.*

## RESUMO

A criopreservação de sêmen pode ser uma técnica valiosa, tanto para programas de melhoramento genético de espécies de peixe com aplicação na piscicultura, quanto na formação de bancos de sêmen, o que possibilita o uso em atividades conservacionistas, visando a preservação de populações nativas e a recuperação de ambientes degradados. Neste contexto, a morfologia espermática das células é um fator relevante na avaliação da qualidade do sêmen, bem como a avaliação dos diluidores e crioprotetores utilizados nestes processos a fim de evitar as crioinjúrias causadas no momento da congelação/descongelação do sêmen. Para verificar o grau de anormalidades morfológicas nos espermatozóides de Tambaqui (*Colossoma macropomum*) *in natura* e pós congelação, foram coletados amostras de sêmen de três animais, com três meios diluidores contendo dois diferentes crioprotetores, mais a controle *in natura*. Para os crioprotetores foram significativas ( $p < 0,05$ ) em cauda quebra na parte inicial, cauda curta e cauda solta. A combinação BTS/DMSO foi a que apresentou a maior redução na anormalidade cabeça solta na análise estatística. A solução Hanks, apresentou redução para algumas patologias como macrocefalia, microcefalia e cauda quebrada na parte final, principalmente em relação a solução gema de ovo, porém igualmente ao BTS em macrocefalia e microcefalia. Entre os crioprotetores, o DMF (dimetilformamida) causou maior número de anormalidades de cauda quebrada na parte inicial cauda curta e cauda solta do que o DMSO (dimetilsulfóxido). O maior número de significância entre os tratamentos foi função da ação dos diluidores e não dos crioprotetores.

**Palavras-chave:** Tambaqui. Morfologia espermática. Sêmen. Peixe. Criopreservação.

## RESUMEN

La criopreservación de semen puede ser una técnica valiosa, tanto para programas de mejoramiento genético de especies de peces, con aplicación en la piscicultura, como para la formación de bancos de semen, lo que posibilita su uso en actividades conservacionistas, con fines de preservación de poblaciones nativas y la recuperación de ambientes degradados. En este contexto, la morfología de las células espermáticas es un factor relevante en la evaluación de la calidad del semen, así como la evaluación de los diluyentes y crioprotectores utilizados en estos procesos a fin de evitar las crio-heridas causadas en el momento del congelamiento/descongelamiento del semen. Para verificar el grado de anomalías morfológicas de los espermatozoides de Tambaqui (*Colossoma macropomum*) *in natura* tras el congelamiento, fueron colectadas muestras de semen de tres animales, en tres medios diluyentes conteniendo dos diferentes crioprotectores y uno como control *in natura*. Para los crioprotectores fueron significativos ( $p < 0,05$ ) en cola quebrada en la parte inicial, cola corta y cola suelta. La combinación BTS/DMSO fue la que presentó la mayor reducción de la anomalía cabeza suelta en los análisis estadísticos. La solución Hanks presentó reducción para algunas patologías como macrocefalia, microcefalia y cola quebrada en la parte final, principalmente en relación a la solución yema de huevo, pero igualmente los BTS en macrocefalia y microcefalia. Entre los crioprotectores, el DMF (dimetilformamida) causó mayor número de anomalías de cola quebrada en la parte inicial, cola corta y cola suelta que el DMSO (dimetilsulfóxido). El mayor número de significancia entre los tratamientos fue en función de la acción de los diluyentes y no de los crioprotectores.

**Palabras clave:** Tambaqui. Morfología espermática. Semen. Pez. Criopreservación

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>8</b>
1.1 CRIOPRESERVAÇÃO .....	8
1.2 TAMBAQUI ( <i>Colossoma macropomum</i> ).....	9
1.3 AMBIENTE COSTEIRO .....	10
1.4 JUSTIFICATIVA .....	12
1.5 OBJETIVO GERAL.....	12
1.6 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	12
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>13</b>
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>17</b>
<b>4 CONCLUSÃO .....</b>	<b>32</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>34</b>



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 CRIOPRESERVAÇÃO

A diversidade de espécies que ocupam os habitats de água doce é desproporcionalmente elevada em comparação com outros ecossistemas, levando-se em conta que os habitats de água doce, cobrem menos de 1% da superfície do planeta. Ainda assim, estes habitats fornecem abrigo a mais de 25% de todos os vertebrados descritos, mais de 126 mil espécies animais conhecidas, e aproximadamente 2.600 plantas macrófitas (IUCN, 2008).

Um estudo inédito no Brasil identificou 819 espécies de peixes raros de água doce ameaçados de extinção e 222 bacias hidrográficas em estado crítico de conservação, que passam por um processo acelerado de degradação ambiental e que abrigam ainda 344 espécies endêmicas de peixes (NOGUEIRA *et al.*, 2010).

As agressões sofridas pelo ambiente, principalmente os aquáticos, justificam a importância da utilização de técnicas de conservação de sêmen, em virtude das populações de peixes nativos serem afetadas diretamente (RANA, 1995). Além das questões ecológicas, questões econômicas têm se mostrado, de fato, decisivas na busca pelo desenvolvimento de métodos de criopreservação (MARIA, 2005; STREIT JR. *et al.*, 2009).

Segundo Carneiro (2007), é possível a formação de bancos de sêmen, os quais possibilitam ações conservacionistas na implantação de programas de repovoamento dos estoques nativos, ou em programas de melhoramento genético de espécies com potencial econômico e utilização na cadeia produtiva da piscicultura. As técnicas responsáveis pelo processamento e armazenamento de sêmen de peixes, permitem a estocagem e manutenção permanente de material genético (MURGAS, 2007).

Porém, o sucesso da criopreservação depende de soluções crioprotetoras que são substâncias adicionadas a um meio diluidor do sêmen, com o objetivo de proteger os espermatozóides das crioinjúrias, causadas no momento da

congelamento/descongelamento do sêmen. Estes crioprotetores evitam as criolesões e são responsáveis por evitar a formação de microcristais de gelo internamente, atuando também externamente, na reparação e na estabilidade da membrana celular dos espermatozoides. (MARIA, 2005).

A utilização de crioprotetores nestes processos é tão importante para a preservação criogênica do sêmen de peixes, quanto à adição de soluções diluidoras. Estas soluções são fundamentais para promover um meio osmótico e nutricional adequado aos espermatozoides durante o processo criogênico (MURGAS *et al.*, 2007).

Neste contexto, a morfologia das células espermáticas é um fator relevante na avaliação da qualidade do sêmen, sendo que o aumento das patologias espermáticas provoca a diminuição na capacidade de fertilização (LAHNSTEINER *et al.*, 1998). Estas patologias ocorrem naturalmente, contudo agravam-se devido aos processos de congelamento (STREIT JR., 2009), em que o espermatozoide sofre mudanças estruturais nas membranas e resultando na perda da capacidade de fertilização.

Herman *et al.*, (1994) classificaram as patologias do sêmen como primárias, àquelas que são fruto do processo de espermatogênese em decorrência de estresse, enfermidades, consanguinidade, entre outras causas, às quais os reprodutores são acometidos. As secundárias são atribuídas ao manejo durante o processo de coleta do sêmen e a preparação das lâminas usadas na avaliação das patologias. Já as normais, são aquelas que não apresentam anormalidades morfológicas.

## 1.2 TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*)

A espécie utilizada neste estudo, o tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), ocorre nas bacias do Rio Amazonas e Rio Orinoco. É uma espécie nativa brasileira que pertence à classe Actinopterygii, ordem Characiforme e família Characidae (ARAÚJO-LIMA; GOMES, 2005). Muito apreciada pelas comunidades

tradicionais de Amazônia, e muito explorada desde o século XIX, tem mostrado sinais de sobre-exploração em virtude do enorme esforço de pesca investido, há algum tempo, pela produção comercial (BATISTA; PETRERE JR., 2003)

Contudo, devido a inúmeros investimentos, no ano de 2009, o tambaqui foi a terceira espécie mais representativa na aquicultura continental brasileira de peixes de água doce, com uma produção de mais de 46 mil toneladas. Ficou somente atrás da Tilápia-do-Nilo e das Carpas, que juntas representaram 64% da produção aquícola continental, de acordo com os dados do Ministério da Pesca e Aquicultura (BOLETIM 2009).

Por ser um peixe migrador, a reprodução desta espécie em laboratório depende de indução hormonal na qual os machos geralmente recebem uma dose única de hormônio (ARAÚJO-LIMA; GOMES, 2005), o que também é realizado para coleta do sêmen na criopreservação.

### 1.3 AMBIENTE COSTEIRO

A Zona Costeira brasileira possui mais de oito mil quilômetros de extensão, sendo possível observar uma grande diversidade de ecossistemas e habitats associados, tais como dunas, estuários, manguezais, lagoas e lagunas costeiras (KNOPPERS *et al.*, 2009).

No Rio Grande do Sul, a planície costeira ocupa uma estreita, mas diversificada faixa ambiental, compreendida entre 29°20'34" de latitude sul, longitude de 49°42'41" oeste, na barra do Rio Mampituba, e 33°45'09" de latitude sul, longitude de 53°23'22" oeste, no arroio Chuí, apresentando ambientes lagunar-lacustres, restingas, planícies de emersão, dentre outros (VIEIRA; RANGEL, 1988)

A faixa litorânea é considerada uma das áreas sob maior estresse ambiental em nível mundial, estando fortemente sujeita a pressões intensas e diversificadas quanto ao uso do solo e de seus recursos naturais (GRUBER *et al.*, 2003).

Conforme Reis *et al.*, (2003), atualmente a degradação ambiental é dada como a principal ameaça à conservação, devido à destruição destes habitats,

afetando as espécies de peixes de água doce. Fato decorrente da poluição causada por produtos químicos provenientes da agricultura (defensivos e fertilizantes), esgotos domésticos, drenagem para a atividade agrícola, pecuária e urbanização, remoção de mata ciliar e introdução de espécies exóticas.

Estudos de Schifino *et al.* (2004), em uma lagoa da Planície Costeira do Rio Grande do Sul (Lagoa da Fortaleza) revelou a ordem Characiforme como a mais representativa, com índice de 45% de frequência de ocorrência, considerando-se o número de espécies.

Contudo, no estado do Rio Grande do Sul, conforme o livro vermelho da fauna ameaçada de extinção, seis espécies de Characideos estão, de alguma forma, ameaçadas, das 23 espécies de água doce que constam na lista (REIS *et al.*, 2003).

No âmbito da pesca, as atividades têm extraído em escala global, uma grande quantidade de biomassa dos ecossistemas estuarinos, costeiros e marinhos (MYERS; WORM, 2003; NORTHRIDGE, 2002; PANDOLFI *et al.*, 2003). A sobre-exploração dos recursos pesqueiros é hoje um fenômeno com sérias consequências ambientais e socioeconômicas em todo o mundo (HILBORN *et al.*, 2003; PAULY *et al.*, 2002; THE STATE, 2004).

Consoante Jackson *et al.*, (2001), a combinação da sobrepesca aliada à degradação ambiental, tem levado muitos ecossistemas costeiros ao limite da sustentabilidade. No final do século XX, mais de dois terços dos estoques de pescado, em todo o planeta, foram classificados como completamente explorados, sobre-explotados ou depletados (BOTSFORD *et al.*, 1997).

Desta forma, o estudo de técnicas de conservação de gametas, com a finalidade de realizar fertilização artificial, mostra-se valioso para programas que envolvam a produção, o repovoamento de ambientes aquáticos em projetos conservacionistas, ou mesmo na preservação de material genético de espécies em risco de extinção e na formação de bancos de genes (NINHAUS-SILVEIRA, 2007).

O estudo da morfologia espermática do tambaqui (*C. macropomun*) torna-se importante na busca por técnicas de conservação de peixes nativos da planície costeira, em especial a família Characidae.

#### 1.4 JUSTIFICATIVA

As iniciativas que envolvam estudos em criopreservação justificam-se no sentido do desenvolvimento de bancos de germoplasma para diversas espécies nativas do ambiente costeiro. São fundamentais para o repovoamento recuperação de ambientes degradados, desenvolvimento da piscicultura regional e, no sentido de aliviar as pressões de pesca exercidas nas lagoas costeiras de água doce.

#### 1.5 OBJETIVO GERAL

Este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar as anormalidades morfológicas espermáticas, a partir de amostras *in natura* e pós descongelação em diferentes soluções criopreservadoras, utilizando-se o tambaqui (*C. macropomun*) como modelo experimental de peixe de água doce, cujo conhecimento gerado poderá colaborar para a aplicação da metodologia em peixes nativos da planície costeira do Rio Grande do Sul, sobretudo espécies da família Characidae.

#### 1.6 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a ação das diferentes soluções crioprotetoras sobre a morfologia dos espermatozoides pós congelação;
- Comparar as alterações morfológicas no sêmen do Tambaqui *in natura* e pós congelação;
- Avaliar a combinação diluidor/crioprotetor que apresenta melhor eficiência no processo de criopreservação.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### ***Local***

O trabalho foi desenvolvido na Piscicultura Delicious Fish, em Sorriso (MT), juntamente com os Grupos de Pesquisa PeixeGen da Universidade Estadual de Maringá (UEM) e *Aquam* da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Posteriormente, as análises laboratoriais foram desenvolvidas no Setor de Aquacultura, (Departamento de Zootecnia da UFRGS) (Porto Alegre) e no Centro de Estudos Costeiros Limnológicos e Marinho (CECLIMAR), em Imbé (RS).

### ***Seleção dos reprodutores e indução hormonal***

Três machos de tambaqui (*Colossoma macropomum*), apresentando características reprodutivas adequadas para peixes migradores, foram selecionados do plantel de reprodutores do Projeto Aquabrazil (Coordenado pela Embrapa). Após a seleção, os reprodutores foram estocados em laboratório, pesados e marcados com “transponders” para a identificação dos mesmos. Utilizou-se extrato de hipófise de carpa para a indução hormonal, como recomendado por Wonayrovich e Horváth (1983) para espécies neotropicais, ou seja, 2,5 mg de extrato de hipófise/ Kg de peso vivo. O peso médio dos reprodutores era de 3,5 Kg, com aproximadamente dois anos de idade.

### ***Colheita e Análise de Sêmen***

Para a colheita e análise do sêmen, os peixes foram envoltos em uma toalha úmida para reduzir o estresse e, em seguida, com a aplicação de uma massagem ântero-posterior, o sêmen foi liberado e colhido em seringas de 5 mL (BILLARD *et al*; 1995). Após a colheita do sêmen, foi avaliado o parâmetro seminal descrito a seguir, conforme Sorensen Jr. (1979), adaptada para a análise do sêmen de peixes neotropicais migradores.

*Morfologia espermática:* Para esta análise foi produzido uma lâmina com o sêmen diluído em solução formol-salina tamponada, na razão de 1:500 (sêmen/solução diluente). As lâminas foram coradas pelo método de Rosa de Bengala recomendado para peixes por Streit Jr. *et al.* (2004), e depois de secar, levadas ao microscópio óptico com objetiva de 40X, contou-se 100 espermatozóides por lâmina de cada animal. Os espermatozóides analisados foram classificados segundo as anormalidades consideradas primárias: cauda quebrada, enrolada, curta, corrugada, degenerada; macrocefalia e microcefalia. As anormalidades secundárias: cauda dobrada, cauda e cabeça solta, gota citoplasmática proximal e distal. Os que não apresentaram tais anormalidades foram classificados como normais.

### **Criopreservação**

Após a avaliação dos parâmetros seminais foi realizado o processo de criopreservação. O sêmen dos três animais foi criopreservado com três meios diluidores contendo dois diferentes crioprotetores. Totalizando 3 x 2, ou seja, 18 combinações. As soluções diluidoras foram:

1º - Beltsville Thawing Solution (BTS): meio diluidor utilizado para sêmen de suínos;

2º - Gema de ovo + Glicose + água destilada;

3º - Solução de Hanks;

Os crioprotetores utilizados foram: DMSO (dimetilsulfóxido) e DMF (dimetilformamida). Segue abaixo o esquema das combinações, segundo a Figura 1:

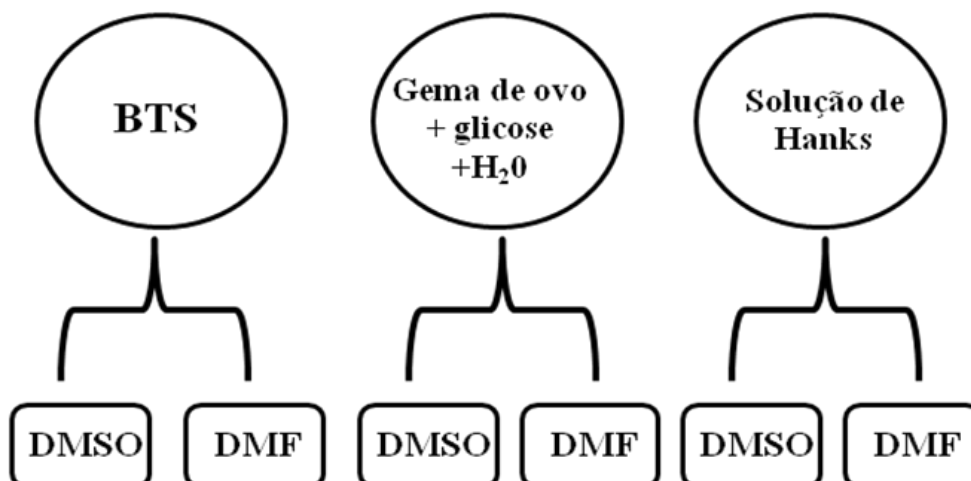


Figura 1. Combinação de diferentes diluidores com crioprotetores. Fonte: O autor, 2011.

O sêmen e a solução crioprotetora foram misturados, na proporção de 1:3 (sêmen/ solução crioprotetora). Após a homogeneização do sêmen com a solução crioprotetora respectiva, o material diluído foi envasado em “paillettes” de 0,25 mL, esterilizados e devidamente identificados. Os “paillettes” foram submetidos ao vapor de nitrogênio em um botijão do tipo “dry shipper” (modelo DOUBLE 20<sup>®</sup>). Decorridas 24 horas, os “paillettes” foram transferidos do botijão “dry shipper” para o de estoque, com apenas nitrogênio líquido à  $-196^{\circ}\text{C}$ .

Decorridos 30 dias, o sêmen foi descongelado em banho-maria em uma temperatura de  $45^{\circ}\text{C}$ , durante seis segundos. Em seguida o sêmen foi fixado em solução formol-salina tamponada, na razão de 1:500 (sêmen/ solução) para a avaliação da morfologia espermática do sêmen descongelado.

### **Análise Estatística**

O experimento foi realizado segundo delineamento completamente casualizado com efeito de dois crioprotetores (DMSO e DMF) aninhados dentro de três diluidores de sêmen (BTS, Hanks, Gema de ovo+glicose), formando os tratamentos descritos previamente. Os dados foram submetidos à análise de variância e comparação de médias pelo teste ‘t’ a 5% utilizando o pacote estatístico SAS 9.0<sup>®</sup> (SAS Institute, 2001). Os dados foram transformados para atender os



critérios de distribuição normal:  $y_i + 0,375$ , o ajuste na transformação foi obtido por meio do pacote estatístico R.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados podem ser observados inicialmente nos histogramas (Figuras 2, 3 e 4), onde estão as análises descritivas de frequência em função da variável (patologia), demonstrando não seguirem uma distribuição normal.

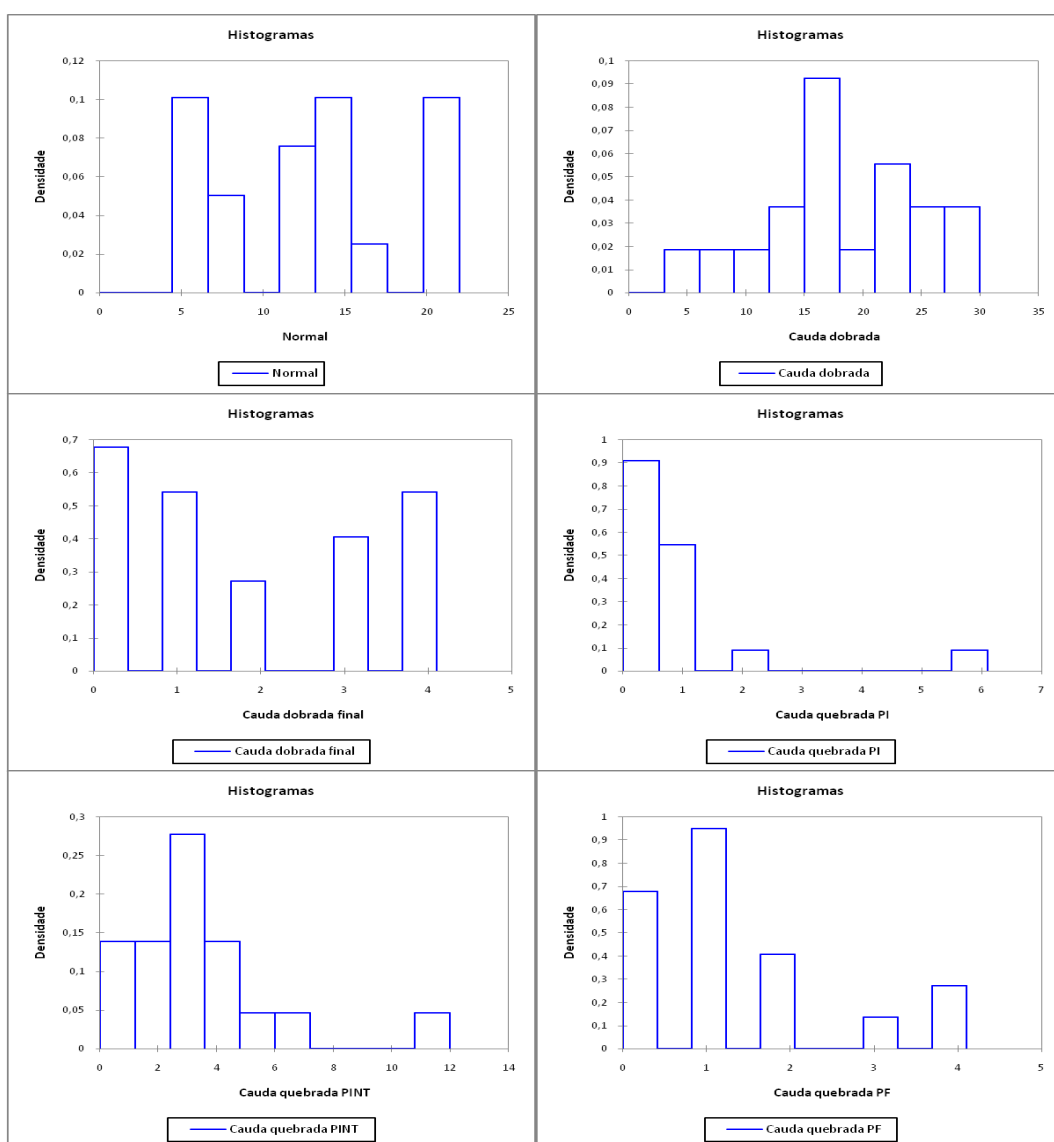


Figura 2. Conjunto de histogramas (eixo y, o percentual de indivíduos e eixo x, o valor de ocorrência).

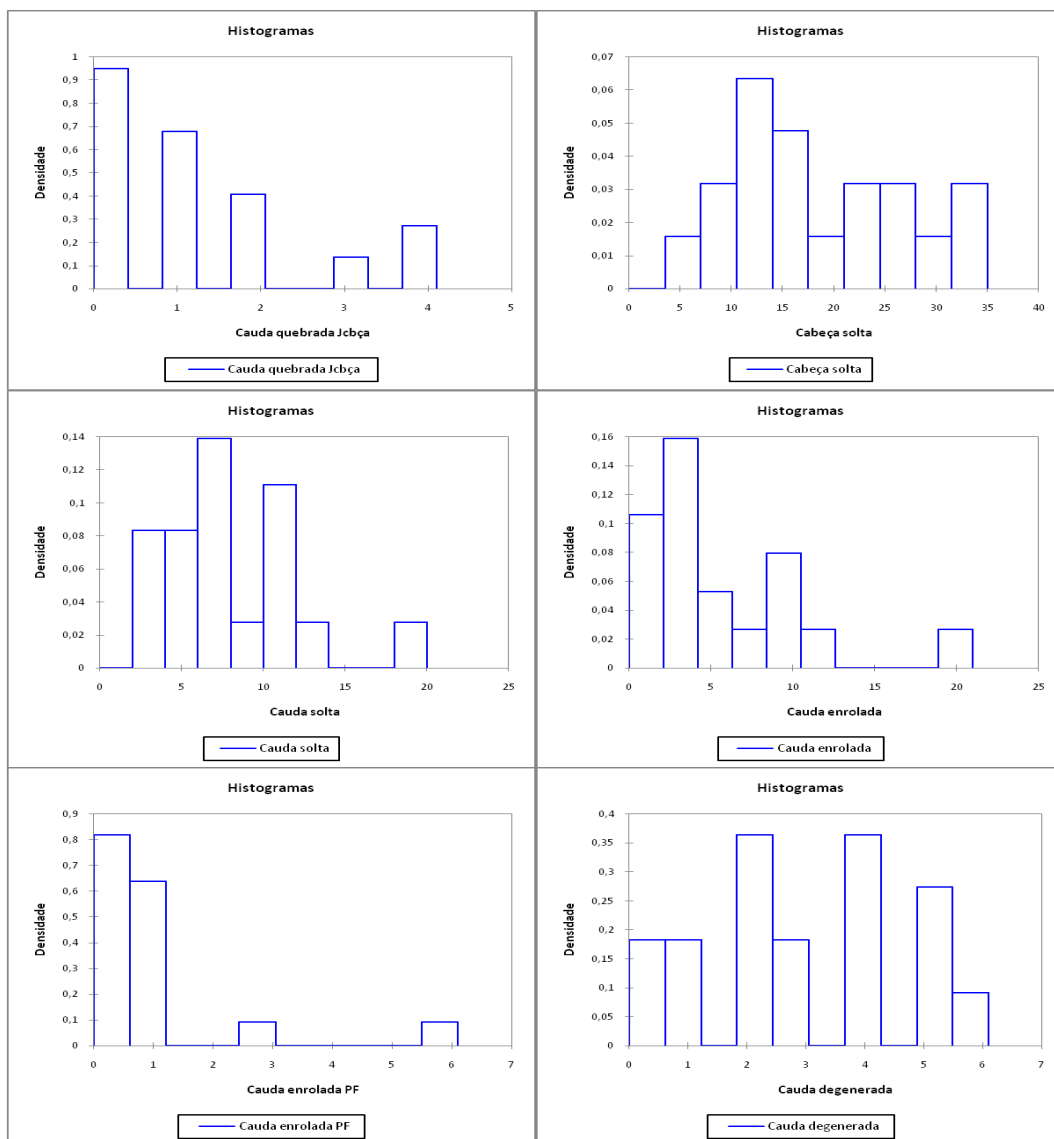
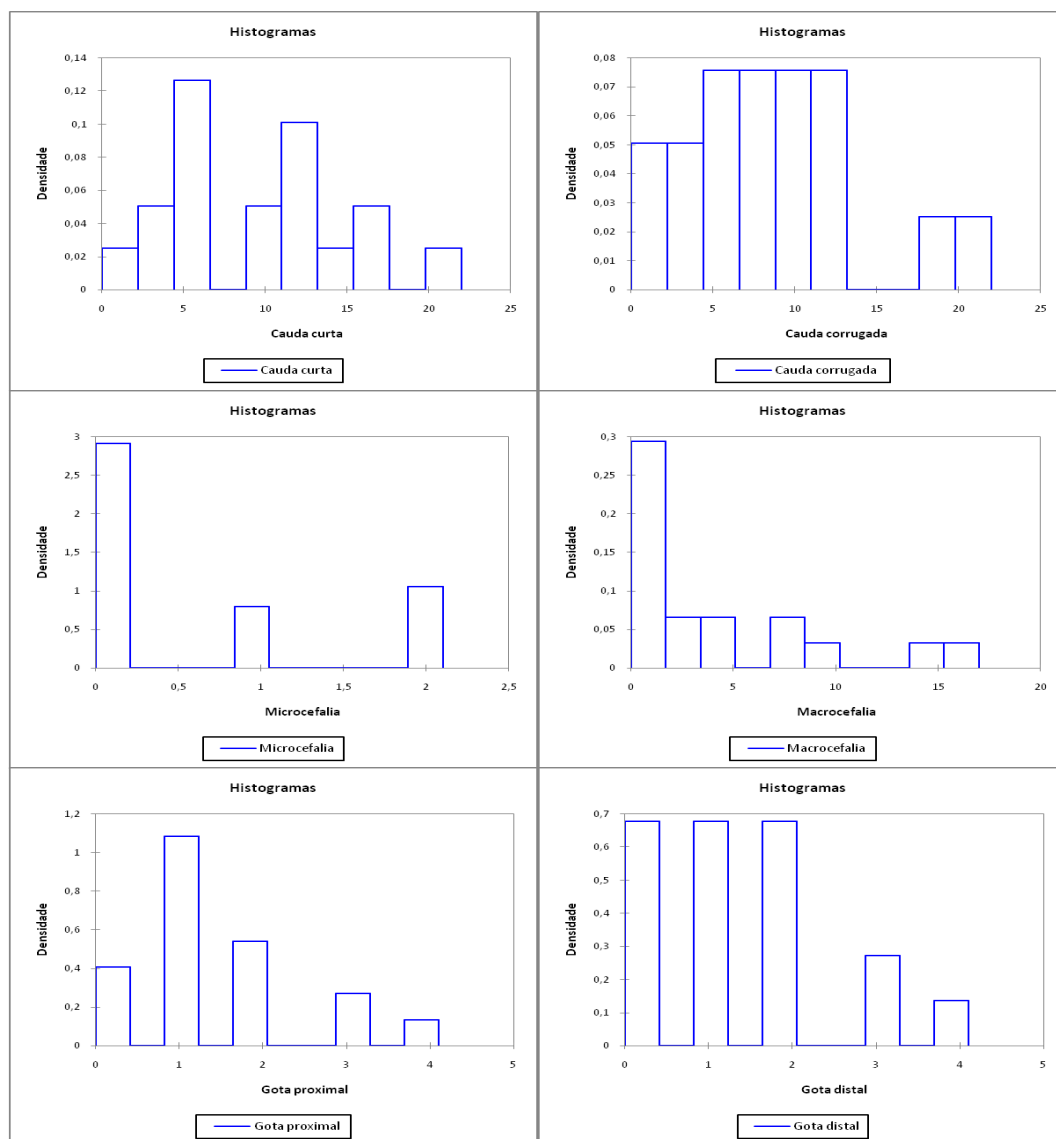


Figura 3. Conjunto de histogramas (eixo y, o percentual de indivíduos e eixo x, o valor de ocorrência).



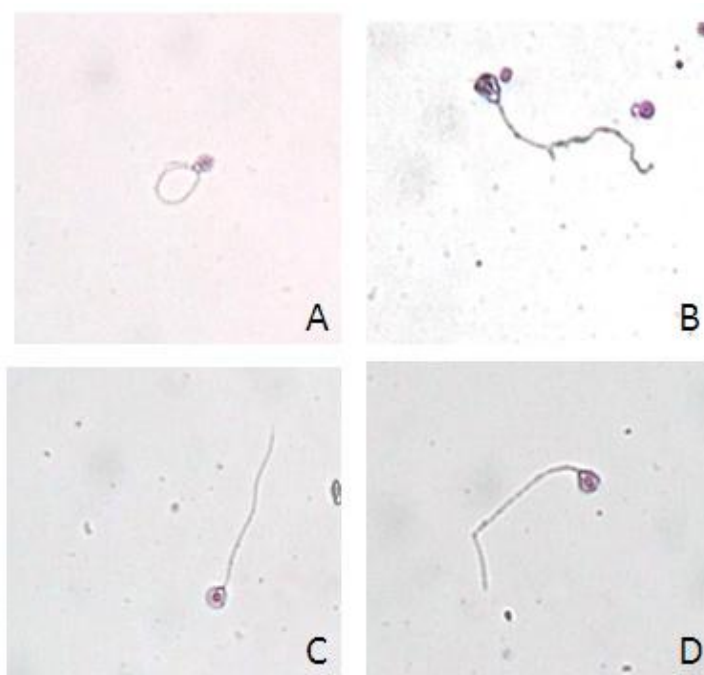
**Figura 4. . Conjunto de histogramas (eixo y, o percentual de indivíduos e eixo x, o valor de ocorrência.**

O tratamento estatístico a partir dos dados transformados não revelou significância na análise dos diluidores/crioprotetores conjuntamente, para a maioria das anormalidades morfológicas analisadas como cauda quebrada, enrolada, curta, corrugada, degenerada, macrocefalia, microcefalia, cauda dobrada, cauda solta, gota citoplasmática proximal e distal pós criopreservação, salvo a patologia “cabeça solta” ( $p < 0,05$ ).

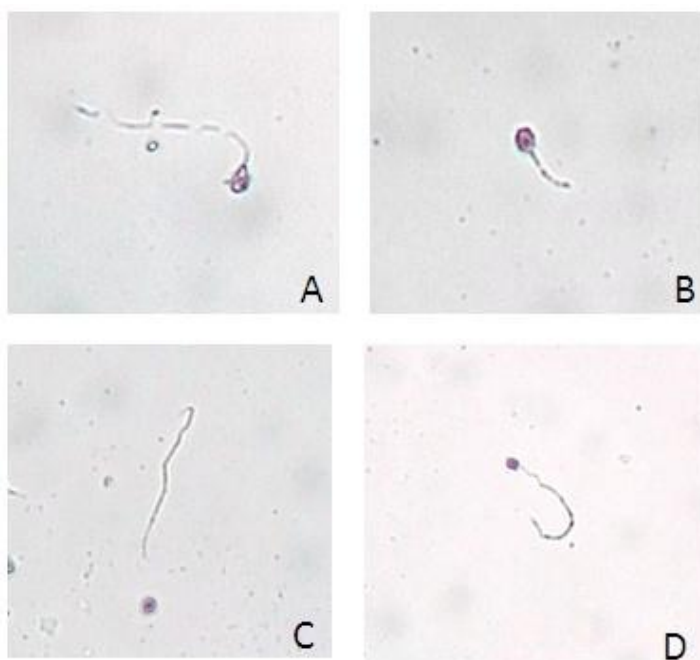
Os diluidores e crioprotetores quando considerados isoladamente, apresentaram resultados significativos ( $p < 0,05$ ) para algumas das anormalidades morfológicas analisadas. Somente nos diluidores foram encontrados valores

significativos para cauda quebrada na parte intermediária e final, cauda curta, macrocefalia, microcefalia, e cabeça solta (Figuras 8, 9, 10,11, 12 e 13).

Para os crioprotetores os resultados observados com valores de significância ( $p < 0,05$ ) ocorreram para cauda solta, cauda quebra na parte inicial e cauda curta (Figuras 14, 15 e 16). Nas demais patologias para os crioprotetores, não houve significância ( $p > 0,05$ ) estatística. Algumas das anormalidades podem ser observadas nas figuras 5 e 6.



**Figura 5. Ilustrações de morfologias observadas no sêmen de *C. macropomum* pós congelamento. (A) espermatozóide com a cauda enrolada; (B) espermatozóide com a cauda corrugada; (C) espermatozóide normal; (D) espermatozóide com a cauda quebrada. Microscopia óptica com objetiva de 40x. Fonte: O autor, 2011.**

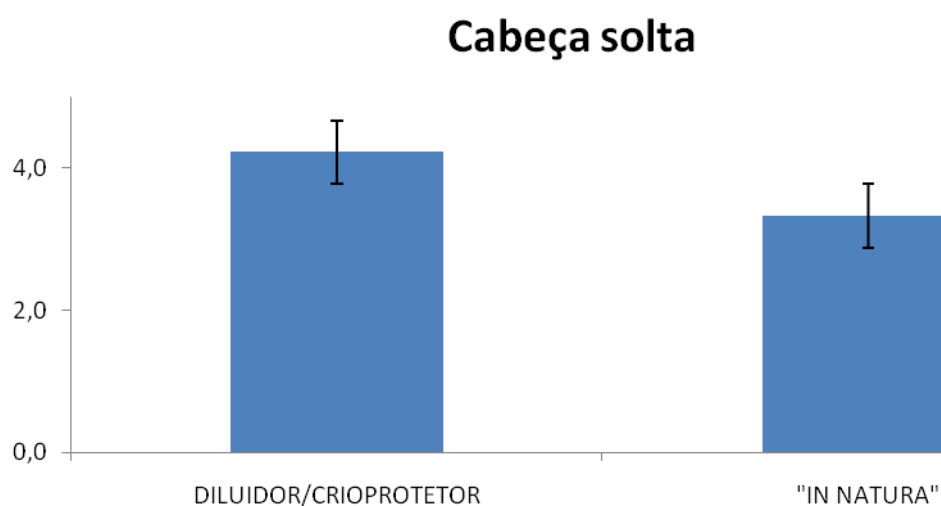


**Figura 6. Ilustrações de morfologias observadas no sêmen de *C. macropomum* pós congelamento. (A) espermatozóide com a cauda degenerada; (B) espermatozóide com a cauda curta; (C) espermatozóide com cauda e cabeça solta; (D) espermatozóide com a cauda dobrada. Microscopia óptica com objetiva de 40x. Fonte: O autor, 2011**

Conforme Carneiro (2007), a velocidade do metabolismo celular é considerada nula a  $-196^{\circ}\text{C}$ , e, o tempo de armazenamento do sêmen pode ser indefinido em condições ideais de estocagem, desde que feita a manutenção adequada do nível do nitrogênio líquido do botijão. Porém, alguns detalhes importantes devem ser observados para o sucesso no armazenamento do sêmen por longos períodos, que vai desde o uso do conjunto da solução protetora adequada, o correto resfriamento e congelamento, e por fim seu descongelamento e utilização levando-se em conta suas características particulares. A eficiência crioprotetora segundo Godinho *et al.*, (2003) aumenta quando os constituintes criopreservantes apresentam uma combinação de ação interna e externa à célula espermática.

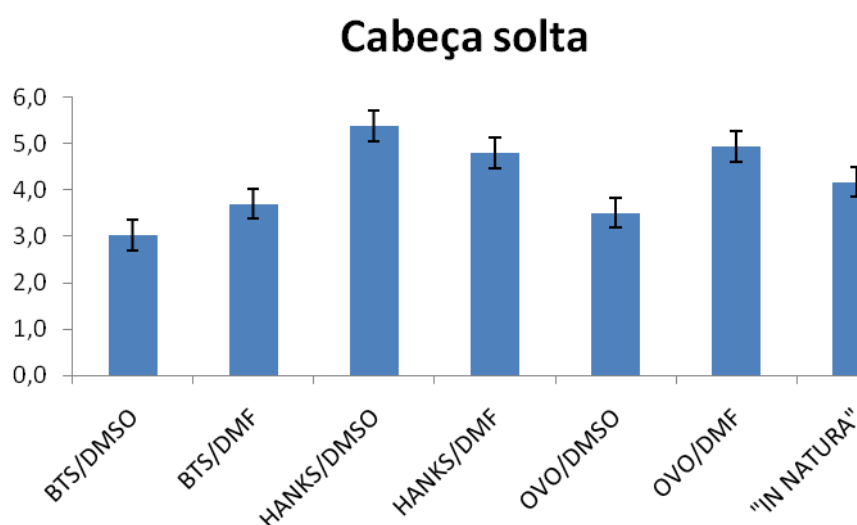
De acordo com os resultados observados, a anormalidade “cabeça solta”(patologia secundária) foi significativa na análise da interação diluidor/crioprotetor. Além desta interação, ela também foi significativa somente entre os diluidores neste estudo.

No gráfico (figura 7) é possível observar o aumento da incidência desta patologia pós congelamento na média total em comparação ao sêmen in natura.



**Figura 7. Médias de ocorrência e desvio padrão da anormalidade morfológica cabeça solta que apresentou significância na combinação dos diluidores com os crioprotetores entre todos os tratamentos, mais a *in natura* (valores transformados a partir de  $x = y + 0,375$  raiz).**

No gráfico seguinte é possível observar os resultados para a anormalidade “cabeça solta”, em cada combinação diluidor/crioprotetor. A combinação diluidor BTS com o crioprotetor DMSO, (Dimetilsulfóxido) apresentaram no gráfico da figura 8 a menor ocorrência para esta patologia, inclusive abaixo do valor registrado para amostra *in natura*.



**Figura 8. Médias de ocorrência e desvio padrão da anormalidade morfológica cabeça solta, que apresentou significância, destacando-se no gráfico cada combinação diluidor e crioprotetor dentre todos os tratamentos, mais a *in natura* (valores transformados a partir de  $x = y + 0,375$  raiz).**

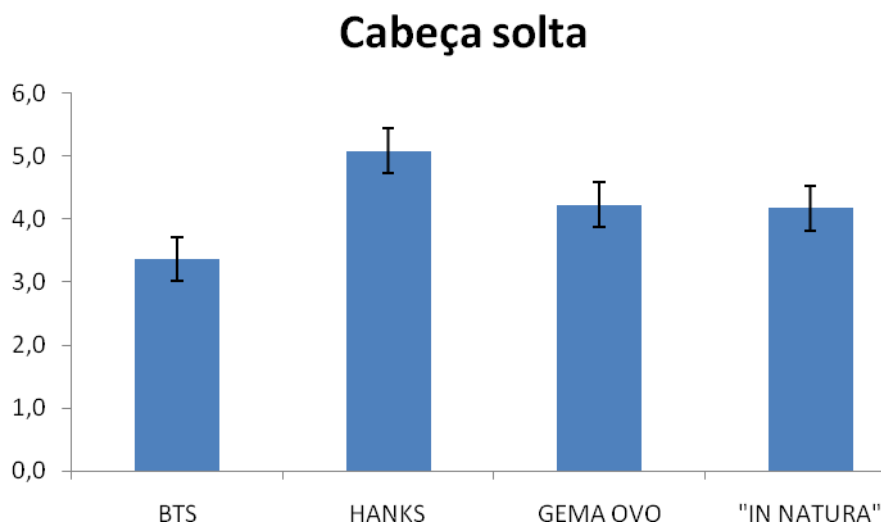
Streit Jr *et al.*, (2009) afirmaram que injúrias de cabeça e cauda podem depender da vulnerabilidade particular que cada espécie pode apresentar nos processos de criopreservação. Esta anormalidade pode ser atribuída segundo Herman *et al.*, (1994), ao manejo durante o processo de coleta do sêmen e na preparação das lâminas usadas na avaliação das patologias.

Pesquisas com sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) criopreservado, Streit jr *et al.*, (2006) identificaram a patologia cabeça solta como uma das que apresentaram maior incidência. Ainda assim, o autor e seus colaboradores ressaltam que não existem citações sobre análises de patologias de sêmen de peixes, efetuados após a descongelação através do método de preparação de esfregaços.

É possível observar as médias da anormalidade cabeça solta que ocorreram somente em função dos diluidores (figura 9), onde a solução Hanks apresentou a maior média da anormalidade entre as demais soluções, inclusive comparada ao sêmen *in natura*. O Hanks é uma mistura de sais enriquecida com aminoácidos, vitaminas e outros componentes utilizados geralmente para o crescimento de



células, o que neste experimento pode ter sido responsável pela ineficiência em manter a integridade dos espermatozóides.



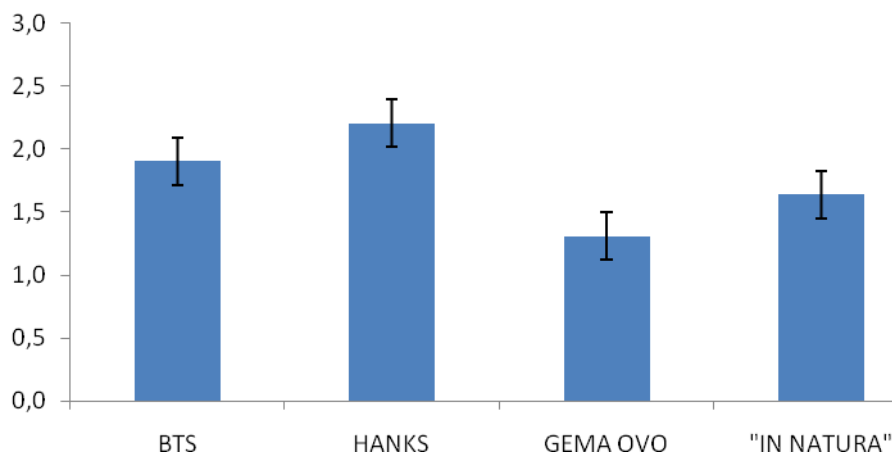
**Figura 9. Médias de ocorrência e desvio padrão da anormalidade morfológica que apresentou significância entre as diferentes soluções diluidoras, mais a *in natura* (valores transformados a partir de  $x = y + 0,375$  raiz).**

Nas análises feitas, considerando-se individualmente os diluidores, além da cabeça solta, (patologia secundária) já citada anteriormente, revelou-se significância ( $p < 0,05$ ) para outras cinco patologias, neste caso todas primárias. As patologias foram cauda quebrada na parte intermediária e final, cauda curta, macrocefalia e microcefalia.

No gráfico (figura 10), se observa que o diluidor a base de gema de ovo proporcionou uma redução no número das patologias de cauda quebrada na parte intermediária, em relação aos demais tratamentos, inclusive comparado ao sêmen *in natura*. Para cauda curta, este mesmo diluidor foi mais efetivo em relação a solução Hanks, podendo ser observado no gráfico (figura 11), e muito próximo na amostra *in natura*.

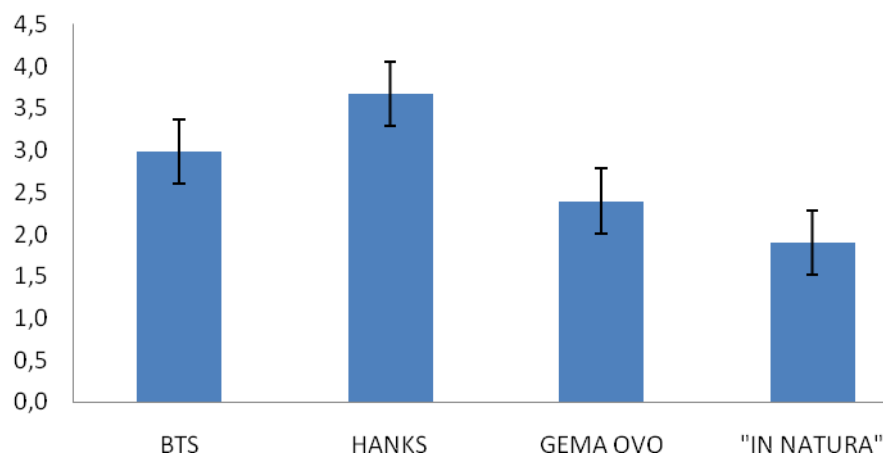
Apesar da espécie *Colossoma macropomum* não ser citada diretamente por Carolsfeld *et al.*, (2003) em seus estudos, eles sugerem a utilização do meio diluidor composto a base de glicose e gema de ovo para cinco espécies de Characidae, *Brycon orbignyanus*, *Prochilodus lineatus*, *Piaractus mesopotamicus*, *Salminus maxillosus* e *Leporinus elongatus*.

### Cauda quebrada parte intermediária



**Figura 10.** Médias de ocorrência e desvio padrão da anormalidade morfológica que apresentou significância entre as diferentes soluções diluidoras, mais a *in natura* (valores transformados a partir de  $x = y + 0,375$  raiz).

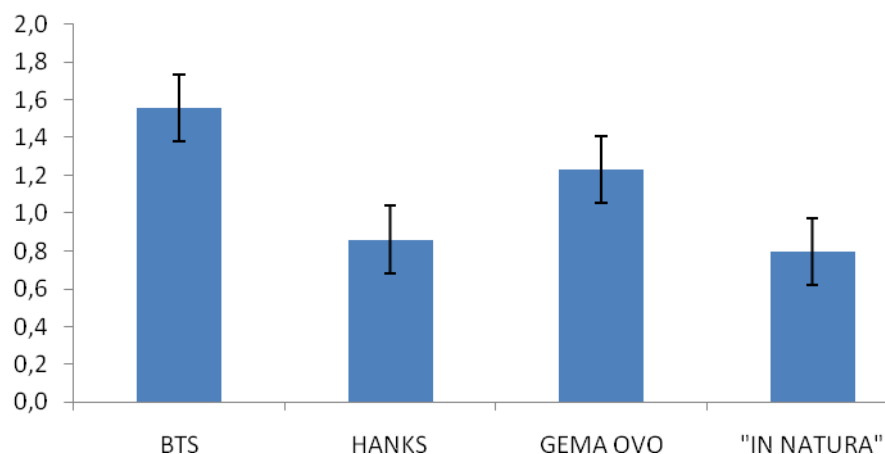
### Cauda curta



**Figura 11.** Médias de ocorrência e desvio padrão da anormalidade morfológica que apresentou significância entre as diferentes soluções diluidoras, mais a *in natura* (valores transformados a partir de  $x = y + 0,375$  raiz).

Diferentemente dos resultados observados para cauda quebrada na parte intermediária e cauda curta onde o diluidor a base de gema de ovo apresentou melhores resultados com um baixo índice patológico, o gráfico da figura 12, aponta a gema de ovo e o BTS como os responsáveis pelos maiores índices da patologia, contudo equiparado ao sêmen *in natura*.

## Cauda quebrada parte final



**Figura 12. Médias de ocorrência e desvio padrão da anormalidade morfológica que apresentou significância entre as diferentes soluções diluidoras, mais a *in natura* (valores transformados a partir de  $x = y + 0,375$  raiz).**

Conforme Murgas *et al.*, (2007), do mesmo modo que a utilização de crioprotetores é importante na preservação criogênica de sêmen de peixes, a utilização de soluções diluidoras é fundamental para proporcionar um meio osmótico e nutricional adequado aos espermatozóides nestes processos.

As anormalidades de cauda quebrada são alterações morfológicas que segundo Kavamoto *et al.*, (1999), provocam movimentos circulares e oscilatórios, o que causa a redução da taxa de fertilização a partir dos espermatozóides.

Godinho *et al.*, (2003) constatou em experimentos com *Oreochromis niloticus*, a eficiência da combinação do diluidor gema de ovo ao DMSO, considerando-os adequados para o congelamento dessa espécie.

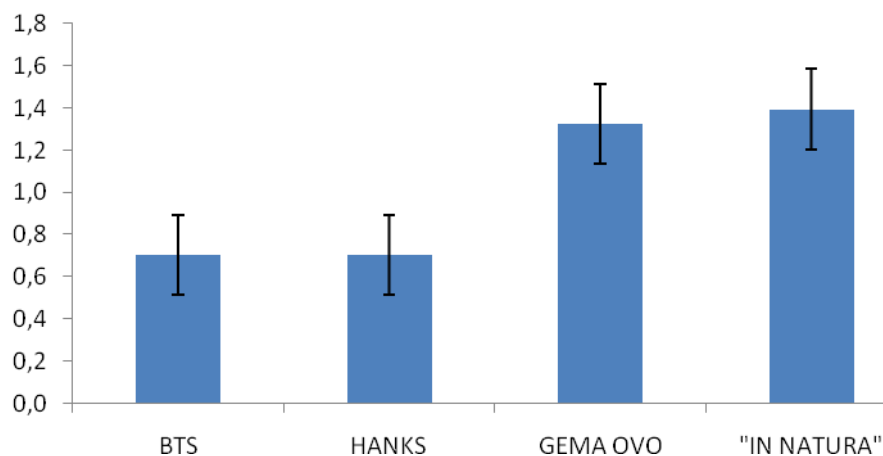
Drumond *et al.*, (2007), em estudo com morfologia espermática do jaú, *Zungaro jahu*, observou um maior percentual de alterações relacionado à cauda, o que relatou poder estar ligado ao manejo, pois é sabido que sob forte agitação, as caudas de espermatozóides de peixes sofrem avarias que podem comprometer o sucesso da fertilização. Além destas afirmações, relacionaram também as anormalidades morfológicas com variações ambientais e genéticas. Além das hipóteses anteriores os autores também consideram as alterações com a composição dos meios diluidores, como possíveis responsáveis em exercer ação criotóxica sobre o sêmen neste experimento.

Streit jr *et al.*, (2009) correlacionaram o aumento de patologias primárias em espermatozoides de *Piaractus mesopotamicus* pós-congelação, com algum processo gerado durante a criopreservação, fazendo uso do DMSO com gema de ovo, glicose e água destilada. O mesmo fato pode ter ocorrido no presente estudo, envolvendo as patologias macrocefalia e microcefalia, que apresentaram resultados com alto índice destas anormalidades relacionados ao diluidor a base de gema de ovo. Contudo Godinho *et al.*, (2003), considerou o uso da gema de ovo para preservação de sêmen de *Oreochromis niloticus* adequado para congelação desta espécie utilizando diferentes crioprotetores.

Os meios diluidores BTS e Hanks no presente ensaio foram mais efetivos que o diluidor gema de ovo na redução das patologias microcefalia e macrocefalia (gráficos 13 e 14). Resultados satisfatórios foram obtidos na criopresevação de sêmen de *Prochilodus lineatus* por Murgas *et al.*, (2007), utilizando BTS enriquecido com crioprotetores intracelulares.

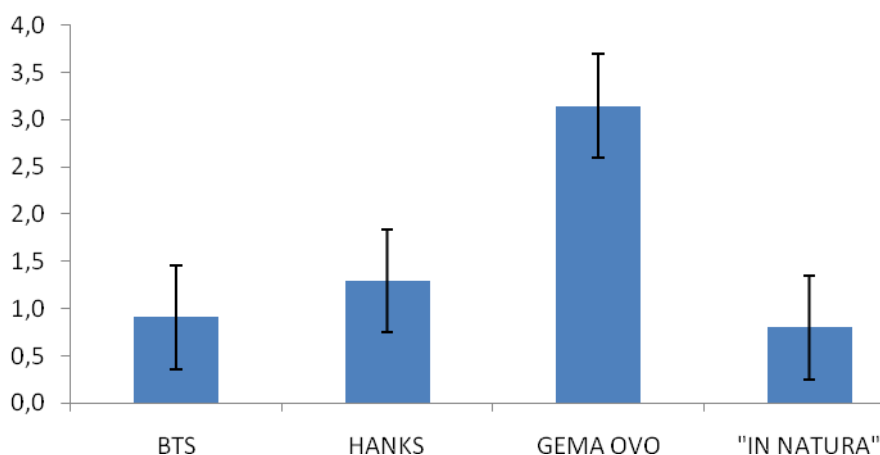
O BTS, inicialmente, foi um diluidor desenvolvido para conservação de sêmen de suínos, contudo Murgas *et al.*, (2007) citaram inúmeros autores que fizeram uso com sucesso deste diluidor para pesquisas com peixes reofílicos. Além de proteger a face intracelular da membrana citoplasmática durante o congelamento, ele tem a capacidade de nutrir as células espermáticas, proporcionando assim um microambiente favorável.

## Microcefalia



**Figura 13.** Médias de ocorrência e desvio padrão da anormalidade morfológica que apresentou significância entre as diferentes soluções diluidoras, mais a *in natura* (valores transformados a partir de  $x = y + 0,375$  raiz).

## Macrocefalia

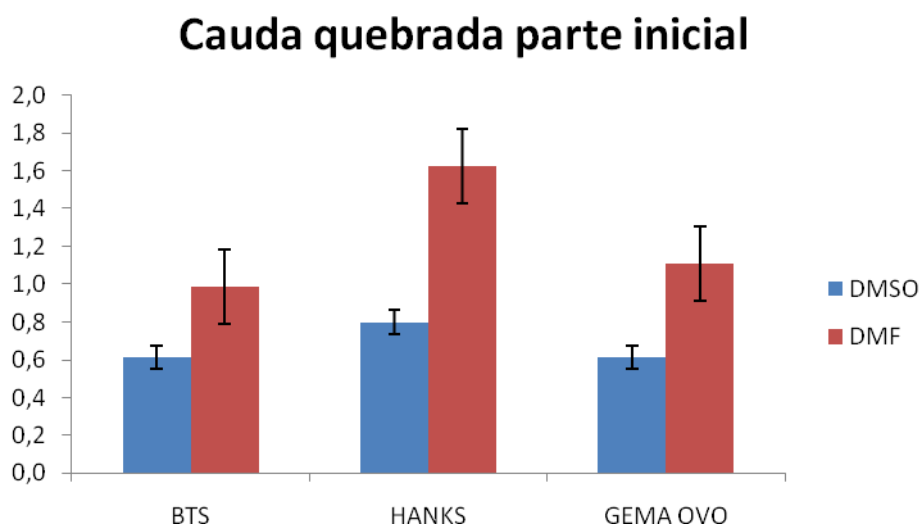


**Figura 14.** Médias de ocorrência e desvio padrão da anormalidade morfológica que apresentou significância entre as diferentes soluções diluidoras, mais a *in natura* (valores transformados a partir de  $x = y + 0,375$  raiz).

A macrocefalia apresentou um aumento significativo comparado ao sêmen *in natura*, a qual, apesar de ser uma patologia primária, pode estar relacionada a ação do processo de congelação (STREIT JR *et al.*, 2009). Os autores ainda relataram que, supostamente, essas patologias ocorreram devido a um possível choque osmótico atribuído ao diluidor. Geralmente lesões na cabeça do espermatozóide

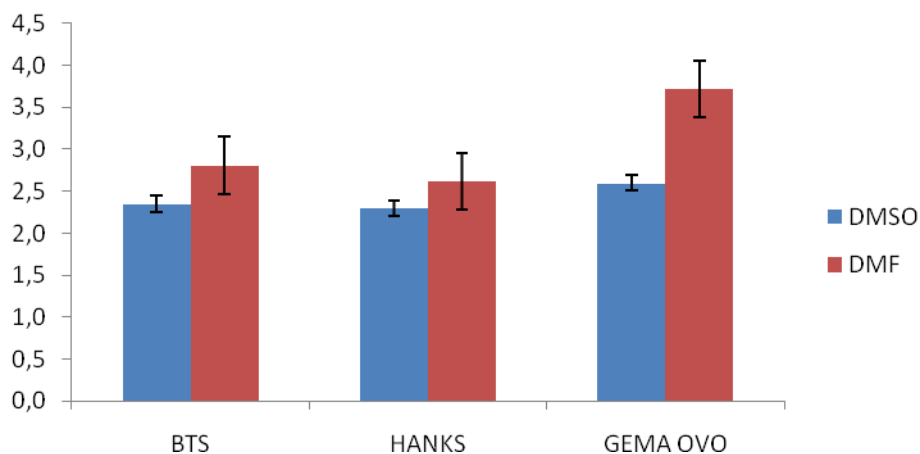
estão relacionadas com o meio hiposmótico, onde a principal responsável por tal é a osmolaridade do meio diluidor, que causa estas injúrias nas caudas e cabeças dos espermatozóides (COSSOM *et al.*, (1999).

Entre os crioprotetores os valores foram significativos ( $p < 0,05$ ) para cauda quebra na parte inicial, cauda solta e cauda curta (Figura 15, 16 e 17). A toxidez dos crioprotetores, entre outros fatores, no processo de criopreservação, é apontada como uma das principais responsáveis pelas crioinjúrias, causadas aos espermatozóides (FABBROCINI *et al.*, (2000). Estas patologias foram menores com o crioprotetor DMSO, comparado ao DMF (dimetilformamida) quase na totalidade das médias observadas. O DMSO é citado por Bedore (1999), como um dos melhores crioprotetores para peixes de água doce. Conforme He; Woods III, (2003), este crioprotetor possui características importantes para sua aplicação por apresentar baixo peso molecular e elevada permeabilidade celular o que pode explicar os resultados. Porém ainda assim, o DMSO pode causar danos decorrentes de choque osmótico e pela sua toxicidade.



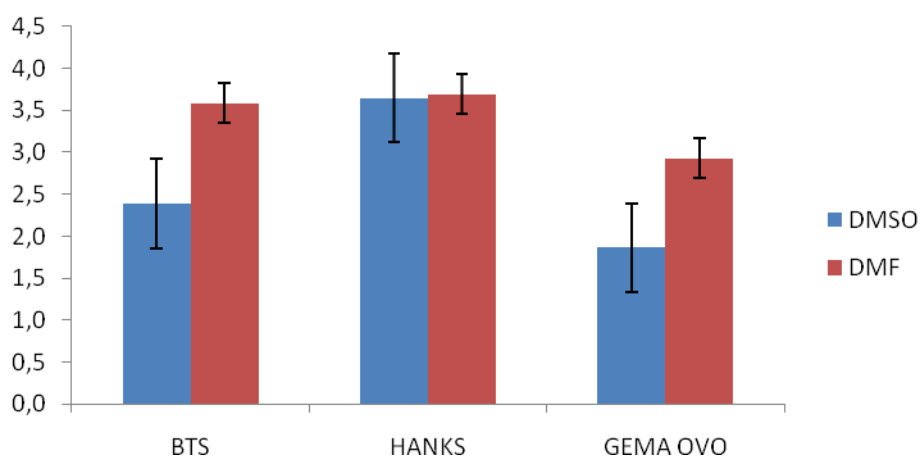
**Figura 15.** Médias de ocorrência e desvio padrão da anormalidade morfológica que apresentou significância entre os crioprotetores ( valores transformados de  $x = y + 0,375$  raiz).

### Cauda solta



**Figura 16.** Médias de ocorrência e desvio padrão da anormalidade morfológica que apresentou significância entre os crioprotetores (valores transformados de  $x = y + 0,375$  raiz).

### Cauda curta



**Figura 17.** Médias de ocorrência e desvio padrão da anormalidade morfológica que apresentou significância entre os crioprotetores (valores transformados de  $x = y + 0,375$  raiz).

Filho (2009), em testes com intuito de melhorar os protocolos já existentes para a congelação de sêmen canino, obteve resultados insatisfatórios fazendo uso do DMF em diferentes concentrações, contra indicando seu uso. Em outro estudo, porém com sêmen de ovino, Soares *et al.*, (2007) também não obtiveram resultados satisfatórios com DMF na preservação da membrana plasmática das células espermáticas, igualmente com estudo em bovinos por Gonzalez (2004).

Streit jr *et al.*, (2009) relacionaram a redução da motilidade progressiva e do vigor espermático do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) ao aumento de anormalidades morfológicas primárias e secundárias em decorrência do processo relacionado à criopreservação. Neste ensaio os autores atribuíram ao crioprotetor DMSO, o aumento das patologias primárias pós congelação atrelada a algum processo durante a criopreservação, relatando um possível choque osmótico, o tempo em que os espermatozóides ficaram expostos a solução crioprotetora (equilíbrio tempo: solução), a curva de resfriamento e o processo de congelação o que fez reduzir o número de espermatozóides normais.

Na presente monografia foi possível observar nos gráficos onde foram comparados os crioprotetores (gráficos 15,16 e 17) que o DMSO causou o menor número das anormalidades de cauda quebrada na parte inicial, cauda solta e cauda curta em relação ao DMF, ou seja, foi mais efetivo em não apresentar valores elevados referentes a estas patologias.



## 6 CONCLUSÃO

Na comparação entre os tratamentos onde se observa a ação do diluidor/crioprotetor conjuntamente, a combinação BTS/DMSO foi a que apresentou a maior redução na anormalidade cabeça solta nas análises dos valores estatísticos apesar da baixa significância observada com outras combinações no gráfico.

A solução Hanks, na leitura dos gráficos considerando os diluidores apresentou o melhor resultado na redução de algumas patologias como macrocefalia, microcefalia e cauda quebrada na parte final, principalmente em relação a solução gema de ovo. Contudo, o mesmo Hanks manteve-se igualmente ao BTS nos índices em macrocefalia e microcefalia. Nesta mesma leitura dos diluidores, a anormalidade cabeça solta ocorreu em maior número em função do diluidor Hanks.

Na ocorrência de cauda curta, ainda considerando as soluções diluidoras apenas, a solução gema de ovo foi mais efetiva na redução desta patologia comparada ao Hanks, contudo a mesma não foi melhor que o BTS e a amostra *in natura* na redução desta patologia. Cauda quebrada na parte intermediária apresentou redução das anormalidades na solução gema de ovo comparada as demais (BTS e Hanks), porém acima do índice da amostra *in natura*.

Na análise dos dados que apresentaram significância entre os crioprotetores, o DMF (dimetilformamida) causou maior número de anormalidades de cauda quebrada na parte inicial cauda curta e cauda solta do que o DMSO (dimetilsulfóxido) praticamente na totalidade dos comparativos.

O maior número de anormalidades que apresentaram significância no experimento foi constatado nos tratamentos em função da ação dos diluidores e não dos crioprotetores. Outro aspecto a ser destacado é que as anormalidades do tipo primárias foram as que mais ocorreram entre os resultados com significância para diluidores.

As informações sobre as características da ação de crioprotetores e diluidores sobre o sêmen das diversas espécies de peixes permitem a padronização das técnicas de criopreservação, definindo com utilizar estes componentes, bem

como definir os procedimentos adequados para o congelamento e descongelamento nestes processos. Estas pesquisas podem avançar para um caminho que possibilite a melhor gestão dos recursos em programas de melhoramento genético para piscicultura, repovoamento dos estoques nativos, preservação de material genético de espécies em risco de extinção e na formação de bancos de genes.

Muitos trabalhos estão sendo realizados sobre os procedimentos para armazenamento de sêmen de algumas espécies de peixes, porém ainda há necessidade de estudos adicionais para inúmeras espécies nativas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO-LIMA, C. A. R. M.; GOMES, L. C. Tambaqui (*Colossoma macropomum*).  
*In*: BALDISSEROTTO, B; GOMES, L. de C. (Org) **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: UFSM, 2005. p.175-202.

BILLARD, R. *et al.* Biology of sperm and artificial reproduction in carp. **Aquaculture**, Amsterdam, v.129, n.1/4, p.95 -112, 1995.

BATISTA, V.S.; PETRERE JR., M. Characterization of the commercial fish production landed at Manaus, Amazonas state, Brazil . **Acta amazonica**, v.33 n.1, p. 53-66 2003.

BEDORE, A.G. **Características e criopreservação do sêmen de pacu-caranha (*Piaractus mesopotamicus*) e de piracanjuba (*Brycon orbignianus*)**. 53f.  
Dissertação de Mestrado (Instituto de Ciências Biológicas) Universidade Federal de Minas Gerais-UFMG, Belo Horizonte,1999.

BOLETIM ESTATÍSTICO DA PESCA E AQUICULTURA (2009). **Ministério da pesca e aquicultura – MPA**.<[www.mpa.gov.br](http://www.mpa.gov.br)>. Acesso em 12 maio 2011.

BOTSFORD, L. W.; CASTILLA, J. C.; PETERSON, C. H. The management of fisheries and marine ecosystems. **Science**, v. 277, p. 509 – 515, 1997.

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

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

COSSON, J. *et al.*, Ionic factors regulating the motility of fish sperm. *In*: GAGNON, C. **The male gamete: from basic science to clinical applications**. Viena: Cache River Press, 1999, p.162-186.

DRUMOND, M. M.; *et al.* Morfologia espermática de jaú (*Zungaro jahu*) - análise do sêmen *in natura* e pós-descongelado. *In: Congresso brasileiro e encontro de piscicultores de Mato Grosso do Sul*, 1ª ed. 2007, Dourados, MS. **Produção de peixes nativos de água doce.**

FABBROCINI, A. *et al.*, Criopreservation of seabream (*Sparus aurata*) spermatozoa. **Cryobiology**, San Diego, v.40, n.10, p.46-53, 2000.

FILHO, A. C. M.; **Efeito da adição de dimetilformamida ao diluente ACP-106 C sobre as características do sêmen canino congelado.** 103 f. Dissertação Mestrado (Acadêmico em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza, 2009.

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

GONZALEZ, R. A. F.; **Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelação e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de membranas do espermatozóide bovino.** 92 f. Tese de Doutorado (Medicina Veterinária e Zootecnia) - Universidade de São Paulo. Pirassununga , 2004.

GRUBER, N. L. S.; BARBOSA, E. G.; NICOLODI, J. L.; Geografia dos sistemas costeiros e oceanográficos: subsídios para gestão Integrada da zona costeira. **GRAVEL**, Porto Alegre, n.1, p 81- 89, jan. 2003.

HE, S.; WOODS III, L.C.Effects of glycine and alanine on short-term storage and cryopreservation of striped bass (*Morone saxatilis*) spermatozoa. **Cryobiology**, San Diego, v.46, n.1, p.17-25, 2003

HERMAN, H.A.; MITCHELL, J.R.; DOAK, G.A. **The artificial insemination and embryo transfer of dairy and beef cattle.** Illinois: Interstate Publishers,1994. 382p.

HILBORN R. *et al.* State of the world's fisheries. **Annual Review of Environment and Resources** 28: 359–399, (2003).

JACKSON, J. B. C. *et al.* Historical overfishing and the recent collapse of coastal ecosystems. **Science**, v. 293, p. 629-638, 2001.

KAVAMOTO, E.T. *et al.*, Anormalidades morfológicas nos espermatozoides do curimatá, *Prochilodus lineatus* (Steindachner, 1881) (Osteichthyes, Characiformes, Prochilodontidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 25(único), p. 61-66. 1999

KNOPPERS, B. *et al.* A Interface Terra-Mar do Brasil. *In* PEREIRA, R. C.; SOARES-GOMES A. (Org) **Biologia marinha**. 2. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2009. p. 529 - 553.

La biodiversidad de agua dulce - un recurso escondido y amenazado (IUCN), 2008. <[http://www.iucn.org/about/work/programmes/species/red\\_list/review/](http://www.iucn.org/about/work/programmes/species/red_list/review/)>. Acesso em 20 jun. 2011.

LAHNSTEINER, F. *et al.* Determination of semen quality of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by sperm motility, seminal plasma parameters, and spermatozoal metabolism. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 163, n.1-2, p.163-181, 1998.

MARIA, A. N. **Diluidores e crioprotetores no resfriamento e congelamento do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)**. 73 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras. Lavras, 2005.

MURGAS L.D.S. *et al.*, (2007) Criopreservação do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) mediante adição de diferentes diluidores, ativadores e crioprotetores. **Revista Brasileira de Zootecnia-Braz. Journal of Animal Science** n.36, p. 526–531.

MYERS, R.A. e WORM, B. Rapid worldwide depletion of predatory fish communities. **Nature**, London, 423, p. 280-283, 2003.

NINHAUS-SILVEIRA, A; Preservação dos gametas de peixes e suas aplicações. **Revista Colombiana de Ciências Pecuárias**, Medellin, v. 20, n.4, p. 516-517. 2007.

NOGUEIRA, C. *et al.*, Restricted-Range Fishes and the Conservation of Brazilian Freshwaters **Watershed Endemism and Threat**. V.5, n.6, 2010.

NORTHRIDGE, S. Effects of fishing industry. *In*: PERRIN, W. F. ; WÜRSIG, B.; THEWISSEN, H.(eds.) **Encyclopedia of Marine Mammals**. Academic Press, San Diego, CA. p. 442-446, 2002.

PANDOLFI, J. M. *et al.* Global trajectories of the long-term decline of coral reef ecosystems. **Science**. v301, p. 955–958, 2003.

PAULY, D. *et al.* Towards sustainability in world fisheries. **Nature**, London, v.418, p. 689-695. 2002.

RANA, K. Preservation of gametes. In: BROMAGE, N. e ROBERTS, R.J. Broodstock management and egg larval quality. Oxford: Blackwell Science, p.53-75, 1995.

REIS *et al.* Peixes. In: FONTANA, C. S.; BANKE, G. A.; REIS, R. E. (Org) **Livro vermelho da fauna ameaçada de extinção no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre :EDIPUCRS, 2003. p. 117-145.

SCHIFINO, L. C ; FIALHO, C. B.; VERANI, J. R. Fish community composition, seasonality and abundance in Fortaleza Lagoon, Cidreira. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 47. n. 5 p. 755-763. sept. 2004.

SOARES, P.; **Efeito de três crioprotetores sobre a membrana de células espermáticas de ovinos**. (Projeto - Relatório final) Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2007.

SORENSEN JR., A.M. **Laboratory for animal reproduction**. 4.ed. Massachusetts: American Press. 1979. 151p.

STREIT JR. D. P., *et al.* Avaliação de diferentes técnicas para coloração de sêmen de peixes. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar**, v.7, p.157-162, 2004.

STREIT JR. D. P; *et al.* Motilidade, vigor e patologias seminal *in natura* e pós criopreservação de *Piaractus mesopotamicus*. **B. Inst. Pesca**, São Paulo, v35, n.2,p. 159 - 167, 2009.

STREIT JR. D, P.; *et al.* Sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) criopreservado com diluentes utilizados para sêmen de suínos. **Ciência Animal Brasileira**, v. 7, n. 3, p. 289-297, jul./set. 2006.

THE STATE of world fisheries and aquaculture. Rome: Fisheries technical Organization of the United Nations (FAO), 2004. – Anual. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/011/i0250e/i0250e00.htm>>. Acessado em 22 abril 2011.

VIEIRA, E. F.; RANGEL, S. R. S. **Planície costeira do Rio Grande do Sul.** Geografia física, vegetação e dinâmica sócio-demográfica. Porto Alegre. Sagra, 1998. 256p.

WOYNAROVICH, E.; HORVATH, L. **A propagação artificial de peixes de águas tropicais: manual de extensão.** Brasília: Escopo. 1983. 220p.