

ALEXMILIANO VOGEL DE OLIVEIRA

AVALIAÇÃO DE TÉCNICAS DE CONSERVAÇÃO DE SÊMEN DE
Prochilodus vimboides E Prochilodus lineatus

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2015

ALEXMILIANO VOGEL DE OLIVEIRA

AVALIAÇÃO DE TÉCNICAS DE CONSERVAÇÃO DE SÊMEN DE
Prochilodus vimboides E Prochilodus lineatus

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2015

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade Federal
de Viçosa - Campus Viçosa

T

Oliveira, Alexmiliano Vogel de, 1980-
O48a Avaliação de técnicas de conservação de sêmen de *Prochilodus*
2015 *vimboides* e *Prochilodus lineatus* / Alexmiliano Vogel de Oliveira. -
Viçosa, MG, 2015.
 x, 51f. : il. ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Eduardo Arruda Teixeira Lanna.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. *Prochilodus vimboides*. 2. *Prochilodus lineatus*. 3. Peixe -
Reprodução. 4. Sêmen - Resfriamento. 5. Criopreservação. I.
Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Zootecnia. Programa
de Pós-graduação em Zootecnia. II. Título.

CDD 22. ed. 597

ALEXMILIANO VOGEL DE OLIVEIRA


AVALIAÇÃO DE TÉCNICAS DE CONSERVAÇÃO DE SÊMEN DE
Prochilodus vimboides E Prochilodus lineatus


Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 04 de dezembro de 2015.


Francisco Carlos de Oliveira Silva


Jener Alexandre Sampaio Zuanon


Juarez Lopes Donzele
(Coorientador)


Jorge Abdala Dergam dos Santos
(Coorientador)


Eduardo Arruda Teixeira Lanna
(Orientador)

Dedico

*À minha esposa Genaina A. de Souza pelo apoio,
paciência e amor incondicional. Ao meu pai Carlos
Alberto M. F. de Oliveira e minha mãe Rosalice de
Fátima V. de Oliveira “in memoria” por todo
amor, carinho e orientação ...*

A todos vocês um muito obrigado ...

AGRADECIMENTOS

A Deus...

À Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais – EPAMIG.

À Universidade Federal de Viçosa.

À FAPEMIG pela concessão de bolsa e pelo apoio financeiro do projeto.

À Barra do Braúna Energética S.A. pelo apoio à pesquisa.

Ao orientador Prof. Eduardo A. T. Lanna pela disponibilidade e confiança.

Aos professores Jorge A. Dergam, Juarez Donzele, Jener Zuanon e ao Pesquisador da EPAMIG Francisco que direta e indiretamente contribuíram para a realização dos trabalhos.

Aos amigos pesquisadores da EPAMIG, Rafael Vianna, Giovanni Resende, Sadaaki Sobue e Thiago Freato por todo apoio, disponibilidade e amizade.

À equipe de piscicultura da EPAMIG de Leopoldina, em especial ao Jardell Peixoto, José Lopes, Geraldo do Carmo e José Carlos Policarpo por todo apoio, amizade e participação no desenvolvimento do trabalho.

Aos colegas do DZO/UFV, Thiago Bernardes, Leandro Pereira e Guisela Mônica.

Aos amigos bolsistas da EPAMIG, Naiara Motta, Felipe dos Santos e Edinael, pela amizade, apoio e dedicação.

Ao Projeto Piabanha, em especial ao Guilherme Souza e Evódio.

Aos meus irmãos Jaxmiliano e Maximiliano, sua esposa Rosângela e seus filhos Ana Beatriz e Luiz Guilherme, por todo carinho, amor e atenção.

E a todos os companheiros que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	5
CAPITULO 1 – PRESERVAÇÃO DO SÊMEN DE GRUMATÃ POR MEIO DO RESFRIAMENTO E CONGELAMENTO.	8
INTRODUÇÃO	10
MATERIAL E MÉTODOS.....	12
RESULTADOS	15
DISCUSSÃO	20
CONCLUSÃO	24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
CAPITULO 2 – PRESERVAÇÃO DO SÊMEN DE CURIMBA POR MEIO DO RESFRIAMENTO E CONGELAMENTO.	28
INTRODUÇÃO	30
MATERIAL E MÉTODOS.....	32
RESULTADOS	35
DISCUSSÃO	41
CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
ANEXOS.....	49

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

FIGURA 1. Motilidade espermática das amostras seminais descongeladas de *P. vimboides*, congeladas em diferentes criosoluções. Teste de t student, $P < 0,05$. Valores são dados em média de porcentagem de motilidade \pm desvio padrão, $n=6$17

FIGURA 2 Atividade de superóxido dismutase (SOD), após o descongelamento, nas amostras de sêmen de *P. vimboides* congeladas em diferentes criosoluções. Teste t student, $P < 0,05$. Valores são dados em média \pm desvio padrão. $n = 6$17

FIGURA 3. Atividade da catalase (CAT), após o descongelamento, nas amostras de sêmen de *P. vimboides* congeladas em diferentes criosoluções. Teste t student, $P < 0,05$. Valores são dados em média \pm desvio padrão. $N = 6$18

FIGURA 4. Concentração de malondialdeído (MDA), após o descongelamento, nas amostras de sêmen de *P. vimboides* congeladas em diferentes criosoluções. Teste t student, $P < 0,05$. Valores são dados em média \pm desvio padrão. $N = 6$19

CAPÍTULO 2

FIGURA 5. Motilidade espermática das amostras seminais descongeladas de *P. lineatus*, congeladas em diferentes criosoluções. Teste de t student, $P < 0,05$. Valores são dados em média de porcentagem de motilidade \pm desvio padrão, $n=6$37

FIGURA 6. Atividade de superóxido dismutase (SOD), após o descongelamento, nas amostras de sêmen de *P. lineatus* congeladas em diferentes criosoluções. Teste t student, $P < 0,05$. Valores são dados em média \pm desvio padrão. $n = 6$38

FIGURA 7. Atividade da catalase (CAT), após o descongelamento, nas amostras de sêmen de *P. lineatus* congeladas em diferentes criosoluções. Teste t student, $P < 0,05$. Valores são dados em média \pm desvio padrão. $n = 6$39

FIGURA 8. Concentração de malondialdeído (MDA), após o descongelamento, nas amostras de sêmen de *P. lineatus* congeladas em diferentes criosoluções. Teste t student, $P < 0,05$, comparando diluidores dentro de cada crioprotetor. Valores são dados em média \pm desvio padrão. $n = 6$40

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

TABELA 1. Motilidade espermática (expressa em %; Média \pm desvio padrão, n=6 reprodutores) do sêmen de *P. vimboides* armazenado a 4-6°C e em diferentes soluções diluidoras.16

CAPÍTULO 2

TABELA 2. Motilidade espermática (expressa em %; média \pm desvio padrão, n=6 reprodutores) do sêmen de curimba *P. lineatus* armazenado a 4-6°C, em diferentes soluções diluidoras.36

RESUMO

OLIVEIRA, Alexmiliano Vogel de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2015. **Avaliação de técnicas de conservação de sêmen de *Prochilodus vimboides* e *Prochilodus lineatus***. Orientador: Eduardo Arruda Teixeira Lanna. Coorientadores: Jorge Abdala Dergam dos Santos e Juarez Lopes Donzele.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver metodologia de conservação de sêmen de *Prochilodus vimboides* e *Prochilodus lineatus*, da bacia do rio Paraíba do Sul, a curto e a longo prazo. Os experimentos foram realizados na estação de piscicultura do Projeto Piabanha/PESAGRO-RJ e no Campo Experimental EPAMIG de Leopoldina, durante as piracemas de 2013/2014 e 2014/2015. Exemplares de Grumatã *Prochilodus vimboides* e Curimba *Prochilodus lineatus* foram induzidos com extrato bruto de hipófise de Carpa. Posteriormente, o sêmen foi coletado e suas características seminais avaliadas. No experimento de resfriamento o sêmen foi diluído na proporção 1:9 (v/v, sêmen: diluidor) em soluções compostas por NaCl 0,9%, NaCl 1,2%, glicose 5%, BTS 5% ou MIII 6%. Uma alíquota do sêmen foi mantida sem diluição (controle). A motilidade espermática foi ativada como solução de NaCl 0,29% e subjetivamente avaliada após 0, 1, 2, 3, 4 e 5 dias de armazenamento a 4-6°C. Na criopreservação do sêmen, foram utilizados os mesmos diluidores testados no resfriamento, porém combinados com três crioprotetores (dimetilsulfóxido-DMSO, Metilglicol e Etilglicol), na proporção 1:8:1 (sêmen:diluidor:crioprotetor). As amostras seminais diluídas foram envasadas em palhetas de 0,5 mL, congeladas em botijão de vapor de nitrogênio líquido e posteriormente armazenadas em nitrogênio líquido. Após o descongelamento em banho-maria a 60°C por 8 segundos, a motilidade espermática foi subjetivamente estimada em percentagem. Além disso, avaliou-se o estresse oxidativo ocorrido nessas amostras. A concentração espermática observada para *P. vimboides* foi de $27,1 \pm 15,8 \times 10^9$ espermatozoides/mL e o volume seminal de $1,4 \pm 0,7$ mL. Para *P. lineatus* foi observado concentração espermática de $20,4 \pm 6,4 \times 10^9$ espermatozoides/mL e volume seminal de $2,0 \pm 0,4$ mL. No resfriamento, amostras diluídas em BTS preservaram a motilidade espermática acima de 30% por até 2 dias em temperaturas de 4-6°C para *P. vimboides* e até 5 dias para *P. lineatus*, sendo este diluidor o melhor entre os testados ($P < 0,05$). No congelamento, amostras seminais diluídas nas criosoluções compostas por glicose 5%+Metilglicol, apresentaram as maiores motilidades espermáticas ($60\% \pm 11,8\%$; $P < 0,05$) para *P. vimboides*, pós-descongelamento. Também foi observado nessas amostras menores atividades de catalase e peroxidação lipídica (MDA; $P < 0,05$) nas

células espermáticas. Já em *P. lineatus* as amostras seminais diluídas nas criosoluções compostas por glicose 5%+DMSO (dimetilsulfóxido) foram as que proporcionaram as maiores motilidades espermáticas ($66,1\% \pm 4,0\%$; $P < 0,05$) e menores atividades de SOD, catalase (CAT) e peroxidação lipídica (MDA; $P < 0,05$). Portanto, o sêmen de *P. vimboides* pode ser resfriado por até 48 horas em solução diluidora de BTS 5% e criopreservado em criosolução composta por glicose 5% + Metilglicol. E o sêmen de *P. lineatus* pode ser resfriado por até 5 dias em solução de BTS 5% e criopreservado em criosolução composta por glicose 5% + DMSO, com sucesso.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Alexmiliano Vogel de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2015. **Evaluation of techniques of semen conservation of *Prochilodus vimboides* e *Prochilodus lineatus*.** Adviser: Eduardo Arruda Teixeira Lanna. Co-advisers: Jorge Abdala Dergam dos Santos and Juarez Lopes Donzele.

The objective in this work was to develop a methodology of semen conservation of *Prochilodus vimboides* and *Prochilodus lineatus*, from Paraíba do Sul river basin, at short and long period. The experiments were realized in the station of fish culture of the project Piabanha/PESAGRO–RJ and in the experimental field EPAMIG from Leopoldina during the “piracemas” from 2013/2014 and 2014/2015. Specimens of Grumatã *Prochilodus vimboides* and Curimba *Prochilodus lineatus* were induced by pituitary extract from carp. After the semen was collected and their seminal characteristics were evaluated. In the cooling experiment, the semen was diluted in the proportion 1:9 (v/v, semen, diluting) in saline solutions of NaCl 0,9%, NaCl 1,2%, glucose 5%, BTS 5% or M III 6%. One semen aliquot was kept undiluted and was used as control. The sperm motility was activated with solution of NaCl 0,29% and subjectively evaluated after 0, 1, 2, 3, 4 and 5 days of storage at 4-6°C. In the semen cryopreservation, were used the same extenders tested in the cooling, however combined with three cryoprotectants (dimethyl sulphoxide – DMSO, methylglycol and ethylglycol), in the proportion of 1:8:1 (semen, extender, cryoprotectant). The seminal samples diluted were potted in containers of 0,5 mL, frozen in nitrogen liquid vapor container and then stored in liquid nitrogen. Sperm motility was subjectively evaluated after thawing at 60°C-water bath for 8 s. Beside this, was evaluated the oxidative stress in these samples. The spermatic concentration observed for *P. vimboides* was of $27,1 \pm 15,8 \times 10^9$ sperm/mL and the seminal volume of $1,4 \pm 0,7$ mL. For *P. lineatus* was observed spermatic concentration of $20,4 \pm 6,4 \times 10^9$ sperm/mL and the seminal volume of $2,0 \pm 0,4$ mL. In cooling, samples diluted in BTS maintained the spermatic motility above 30 % for as long as 2 days at 4-6°C for *P. vimboides* and as long as 5 days for *P. lineatus*, being this extender the better between those tested ($P < 0,05$). In freezing, seminal samples diluted in the cryosolutions composed by glucose 5%+ Methylglycol, presented higher spermatic motility ($60\% \pm 11,8\%$; $P < 0,05$) for *P. vimboides* post-thaw. Was also observed in these samples low activity of catalase and lipid peroxidation (MDA; $P < 0,05$) in the spermatic cells. In *P. lineatus* the seminal samples diluted in cryosolutions composed by glucose 5%+DMSO (dimethyl sulphoxide) were those that provided the higher spermatic motility ($66,1\% \pm 4,0\%$; $P < 0,05$) and lower

activity of SOD, catalase (CAT) and lipid peroxidation (MDA; $P < 0,05$). However, the semen of *P. vimboides* can be cooled for up to 48 hours in extender solution of BTS 5% and cryopreserved in cryosolution composed by glucose 5% + Methylglycol. The semen of *P. lineatus* can be cooled for up to 5 days in solution of BTS 5% and cryopreserved in cryosolution composed by glucose 5% +DMSO, with success.

INTRODUÇÃO GERAL

A atividade reprodutiva em peixes teleósteos é controlada tanto por fatores endógenos (hormonais), quanto por fatores exógenos (ambientais). Para a maioria das espécies tropicais, a chegada do período das chuvas associado ao aumento da temperatura desencadeiam alterações hormonais que são interpretado pelos peixes adultos como o início do período reprodutivo. Inicia-se assim, a migração estes para os locais de desovas, fenômeno conhecido como piracema. A maioria das espécies importantes para a pesca, dentre eles o Dourado *Salminus maxillosus*, Curimba *Prochilodus lineatus*, Grumatã *Prochilodus vimboides*, Piau *Leporinus friderici*, Piapara *Leporinus elongatus*, Piracanjuba *Brycon orbignyanus* e Piabanha *Brycon insignis*, realizam migrações reprodutivas (BITTENCOURT e COX-FERNANDES, 1990; VIVEIROS e GODINHO; 2009).

O Brasil apresenta um relevo muito diversificado ao longo de todo seu território, como planícies, chapadas e cadeias de montanhas. Além disso, possui uma rica rede hídrica, amplamente distribuída. Estas características permitiram ao país o desenvolvimento da atual matriz energética com base nas hidrelétricas. Com o crescimento e desenvolvimento humano, várias hidrelétricas foram e ainda estão sendo construídas nos rios brasileiros.

Muitas vezes, esses empreendimentos foram construídos sem um estudo adequado dos impactos ambientais, principalmente, no que diz respeito ao estudo da ictiofauna diretamente afetada. As construções de hidrelétricas também podem causar a divisão de rios em compartimentos menores, causando inevitáveis alterações nas características ecológicas dos segmentos da bacia hidrográfica. As barragens construídas para a formação do reservatório impõem um obstáculo físico, efeito barreira, pode alterar habitat, diminuir a vazão original, alterar a qualidade da água e aumentar a vulnerabilidade das comunidades ictiológicas a fenômenos de predação e ação de agentes patogênicos. Limitam também a livre movimentação de espécies nativas migratórias para montante ou jusante do obstáculo, reduzindo ou impedindo o seu acesso a áreas fundamentais para o seu ciclo de vida, fragmentando as populações. Essa fragmentação populacional causa desequilíbrio na estrutura das populações, prejudica os recrutamentos de indivíduos jovens através da dificuldade de se transpor o obstáculo e em médio prazo provoca o desaparecimento de espécies migratórias destes segmentos (ARAUJO e NUNAN, 2005). Além dessas alterações anteriormente mencionadas, soma-se ainda a sobrepesca, a urbanização e a poluição.

A bacia do Rio Paraíba do Sul também foi compartimentada. Foram construídas, apenas na calha principal do rio, as usinas hidroelétricas de energia (UHE) de Paraibuna, Santa Branca, Funil, Santa Cecília e Ilha dos Pombos. Há ainda outras hidrelétricas já construídas e outras em construção em toda a bacia do rio Paraíba do Sul.

Baseado nos fatos expostos acima se torna indispensável e urgente a adoção de práticas de conservação genética. A constituição de bancos de germoplasma de peixes ameaçados tem sido uma medida de conservação eficiente adotada em vários países. Isto se deve à sua relativa simplicidade e ao baixo custo de implantação e de manutenção. Sua eventual utilização na restauração da variabilidade genética de estoques debilitados e sob ameaça de extinção iminente, faz desta tecnologia uma poderosa ferramenta de conservação de recursos genéticos de peixes.

A criopreservação do sêmen é uma técnica que exige criosoluções adequadas e taxas de congelamento e descongelamento ótimas (VIVEIROS, 2005). As criosoluções são compostas pela associação de um diluidor combinado com um crioprotetor, com a função de prevenir as crio injúrias dos espermatozoides durante os procedimentos de congelamento e de descongelamento.

Os diluidores são soluções que ajudam a manter a viabilidade das células espermáticas durante a estocagem (TANFERMIN et al., 1999). Elas são utilizadas no processo de resfriamento, pois a diluição diminui a competição entre espermatozoides por oxigênio e espaço, além de estabilizar as condições físico-químicas durante a estocagem do sêmen e prolongar a viabilidade dos espermatozoides (CAROLSFELD et al., 2003). Os diluidores podem ser constituídos por soluções simples à base de NaCl ou de glicose ou soluções mais complexas numa combinação de vários sais e açúcares, como o diluidor Beltsville Thawing solution (BTS[®]) e a água de coco (VIVEIROS e GODINHO, 2009).

Já os crioprotetores são substâncias que devem ser adicionadas ao meio diluidor para que haja proteção do espermatozoide durante o congelamento (SQUIRES et al., 1999). Estes podem ser classificados em intracelulares e extracelulares. Os crioprotetores intracelulares são substâncias químicas que retiram a água da célula espermática e reduzem a temperatura na qual a mesma é congelada, interferindo na formação de cristais de gelo (CHAO et al., 1992). Os crioprotetores extracelulares, por outro lado, recobrem a superfície celular e estabilizam a membrana, ajudando a minimizar e reparar os possíveis danos celulares causados pelo processo de congelamento (CAROLSFELD et al., 2003). Entre os crioprotetores mais utilizados por proporcionar bons resultados em espécies nativas, o dimetilsulfóxido (DMSO) possui lugar de destaque. O metilglicol também foi testado em algumas espécies como crioprotetor e proporcionou resultados

semelhantes e, às vezes, até superiores ao DMSO em sêmen de Piracanjuba, *B. orbignyanus* (MARIA et al., 2006), Pirapitinga *B. nattereri* (OLIVEIRA et al., 2007) e Curimba *P. lineatus* (VIVEIROS et al., 2009b).

Diversas metodologias de criopreservação de sêmen de peixe tem sido testadas em várias espécies, embora o grau de sucesso seja muito variável. A qualidade espermática tem sido avaliada frequentemente, apenas em termos de motilidade após o descongelamento. Entretanto, o processo de criopreservação é conhecido por causar consideráveis danos a célula espermática, por ocasionar excessiva produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (LAHNSTEINER e MANSOUR, 2010; CABRITA et al., 2014). Os EROs são metabólitos de oxigênio que apresentam número ímpar de elétrons, os quais são, portanto, altamente energéticas e instáveis. Eles representam uma categoria de moléculas que se referem aos radicais livres (íon hidroxil, superóxido, óxido nítrico, peróxil, etc.), aos não radicais (ozônio, oxigênio singlete, peroxidases lipídicas, peróxido de hidrogênio) e aos derivados do oxigênio (AGARWAL et al., 2003). Podem ser formados pela ação direta de alguma fonte de energia externa (luz, calor e radiação), ou interna (próprio metabolismo) de reações catalisadas por metais (ferro e cobre) ou enzimas (BORGES et al., 2011). (AGARWAL et al., 2003) Todos esses radicais podem causar injúria oxidativa em membranas lipídicas, proteínas transmembrana e carboidratos, danificando ácidos nucleicos e despolimerizando ácidos hialurônicos (OCHSENDORF, 1999; MOSLEMI e TAVANBAKHS, 2011). O excesso de sua produção parece estar envolvido com os danos causados à membrana plasmática e ao DNA dos espermatozoides (OCHSENDORF, 1999; MOSLEMI e TAVANBAKHS, 2011), resultando em perda da motilidade espermática devido à peroxidação lipídica (SHARMA e AGARWAL, 1996; BUCAK et al., 2010). Após a peroxidação lipídica, a membrana plasmática perde fluidez requerida para participação nos eventos que envolvem fusão de membranas associadas à posterior fecundação e integridade de membrana (HAGEDORN et al., 2012), levando a baixas taxas de fecundidade dessas células espermáticas.

No Brasil, a diversidade de espécies de peixes é enorme e poucos são os grupos de pesquisa que se dedicam ao assunto. Já foram descritos trabalhos experimentais envolvendo criopreservação de sêmen de peixes nativos, em Pacu *Piaractus mesopotamicus* (CAROLSFELD et al., 2003; BEDORE, 1999), Piracanjuba *B. orbignyanus* (VIVEIROS e MARIA, 2008; MARIA et al., 2006; MURGAS et al., 2003; BEDORE, 1999), Piabanha *B. insignis* (SHIMODA, 2004), Parpitinga *B. nattereri* (OLIVEIRA et al., 2007), Dourado *S. maxillosus* (VIVEIROS et al., 2009a) e até mesmo

Curimba *P. lineatus*, (MILIORINI, 2006; VIVEIROS et al., 2009b), da bacia do rio Grande. Entretanto, para a Grumatã *P. vimboides* e a para Curimba *P. lineatus* da bacia do Paraíba do Sul, estas técnicas ainda não foram avaliadas ou pouco se tem avançado no desenvolvimento de metodologia para o resfriamento e a criopreservação do sêmen destas espécies.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, R. A.; SALEH, R. A.; BEDAIWY, M. A. Role of reactive oxygen species in the phatophysiology of human reproduction. *Fertility and Sterility*. v. 79, p. 829-843, 2003.
- ARAÚJO, J. R. S. & NUNAN, G. W. Ictiofauna do rio Paraíba do Sul - danos ambientais e sociais causados por barragens, hidrelétricas e poluição no techo Fluminense. Comissão Permanente de Defesa do Meio Ambiente - Assembléia Legislativa do Estado do Rio de Janeiro (PDMA - ALERJ). Relatório Técnico, set 2005, 59 p., 2005.
- BEDORE, A. G. 1999. Características e criopreservação do sêmen de pacu-caranha (*Piaractus mesopotamicus*) e de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). Dissertação. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte,. 53p.
- BITTENCOURT, M. M.; COX-FERNANDES, C. 1990. Peixes migradores sustentam pesca comercial. *Ciência Hoje*, 11(64): 20-24.
- BORGES, J. C. et al. Membrana plasmática de espermatozoides bovinos: efeito de metabólitos do oxigênio, antioxidantes e criopreservação. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 35, n. 3, p. 303–314, 2011.
- BUCAK, M.N.; SARIÖZKAN, S.; TUNCER, P.B.; SAKIN, F.; ATEŞŞAHIN, A.; KULAKSIZ, R.; ÇEVİK, M. The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (*Capra hircus ancryrensis*) spermparameters, lipid peroxidation and antioxidant activities. *Small Rumin Res*, v.89, p.24-30, 2010.
- CABRITA, E. et al. Factors enhancing fish sperm quality and emerging tools for sperm analysis. *Aquaculture*, v. 432, p. 389–401, 2014.
- CAROLSFELD, J. et al. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. *Journal of Fish Biology*, v. 63, n. 2, p. 472–489, 2003.
- CHAO, N. H.; TSAI, H. P.; LIAO, I. C. Short-term and long-term cryopreservation of sperm and sperm suspension of the grouper, *Epinephelus malabracious* (Bloch & Schneider). *Asian Fish Science*, Taiwan, n. 5, p. 3-16, 1992.
- HAGEDORN, M. et al. Oxidative Stress in Zebrafish (*Danio rerio*) Sperm. *PLoS ONE*, v. 7, n. 6, p. e39397, 2012.
- LAHNSTEINER, F., MANSOUR, N. A comparative study on antioxidant systems in semen of species of the Percidae, Salmonidae, Cyprinidae, and Lotidae for improving semen storage techniques. *Aquaculture*. v. 307, p. 130–140, 2010.
- MARIA, A. N. et al. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. *Aquaculture*, v. 260, n. 1-4, p. 298–306, 2006.
- MILLIORINI, A. B. Ativadores e concentrações de metanol e dimetilsulfóxido na qualidade do sêmen criopreservado de Curimba (*Prochilodus lineatus*). 2006. 99 p. Dissertação (Mestrado em Veterinária)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

- MOSLEMIL, M. K.; TAVANBAKHS, S. Selenium–vitamin E supplementation in infertile men: effects on semen parameters and pregnancy rate. *International Journal of General Medicine*. Dovepress. v.4, 2011.
- MURGAS, L.D.S. 2003. Avaliação espermática pós-descongelamento em piracanjuba (*Brycon orbignyanus*, Valenciennes, 1849). *Revista Brasileira Zootecnia*, v.32, n.6, p.1810-1814, 2003 (Supl. 2).
- OCHSENDORF, F.R. Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. *Human Reproduction Update*. v.5, p.399–420, 1999.
- OLIVEIRA, A. V. et al. 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.
- SHARMA RK, AGARWAL A. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology*, v.48, p.835-850, 1996.
- SHIMODA, E. Análise e criopreservação do sêmen da piabanha *Brycon insignis* Steindachner, 1877 (Pisces, Characidae). 2004. 121 p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ.
- SQUIRES, E. L.; PICKETT, B. W.; GRAHAM, J. K.; VANDERWALL, D. K.; McCUE, P. M.; BRUEMMER, J. E. Principles of cryopreservation. In: *Cooled and Frozen Stallion Semen*. 1999. Cap. 9.
- TANFERMIN, J. D.; MIURA, T.; ADACHI, S.; YAMAUCHI, K. Seminal plasma compositions, sperm motility and milt dilution in the Asian catfish *Clarias macrocephalus* (Gunther). *Aquaculture*, Amsterdam, v. 171, n. 3/4, p. 323-338, Feb. 1999.
- VIVEIROS, A. T. M.; GODINHO, H. P. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: A review. *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 35, n. 1, p. 137–150, 2009.
- VIVEIROS A.T.M., OLIVEIRA A.V., MARIA A.N., ORFÃO L.H., SOUZA J.C. Sensibilidade dos espermatozoides de dourado (*Salminus brasiliensis*) a diferentes soluções crioprotetoras. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.61, n.4, p.883-889, 2009a
- VIVEIROS, A.T.M.; ORFÃO, L.H.; MARIA, A.N. et al. A simple, inexpensive and successful freezing method for curimba *Prochilodus lineatus* (Characiformes) semen. *Anim. Reprod.Sci.*, v.112, p.293-300, 2009b.
- VIVEIROS, A.T.M.; MARIA, A.N. Sêmen cryopreservation of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*), an endangered Brazilian species.. In: CABRITA, E.; ROBLES, V.; HERRAEZ, P. (Ed.). *Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species*. Boca Raton: CRC Press, p.361-365, 2008.
- VIVEIROS, A.T.M. Semen cryopreservation in catfish species, with particular emphasis on the African catfish. *Animal Breeding Abstracts*, v.73, p.1N-9N, 2005.

CAPÍTULO 1

PRESERVAÇÃO DO SÊMEN DE GRUMATÃ POR MEIO DO RESFRIAMENTO E CONGELAMENTO.

CAPITULO 1 – PRESERVAÇÃO DO SÊMEN DE GRUMATÃ POR MEIO DO RESFRIAMENTO E CONGELAMENTO.

RESUMO – O objetivo deste trabalho foi desenvolver metodologia de preservação de sêmen de Grumatã *Prochilodus vimboides*, por meio do resfriamento e do congelamento. O trabalho foi realizado nas estações de piscicultura do Projeto Piabanha/PESAGRO–RJ e no Campo Experimental EPAMIG de Leopoldina, durante a piracema de 2013/2014, bacia do Rio Paraíba do Sul. Os experimentos foram realizados em delineamento em blocos casualizados, com 6 repetições. O sêmen de cada peixe representou um bloco e cada bloco representou uma repetição. Para os experimentos, 12 machos com peso médio 367 ± 186 g foram induzidos com extrato bruto de hipófise de carpa e seus sêmens coletados. No experimento 1 (resfriamento) o sêmen foi diluído 1:9 (v/v sêmen: diluidores), em soluções compostas por NaCl 0,9%, NaCl 1,2%, glicose 5%, BTS 5% ou MIII 6%. Uma alíquota do sêmen foi avaliada sem diluição (tratamento controle). A motilidade espermática foi subjetivamente avaliada após 0, 24, 48 e 72 horas de resfriamento a 4-6°C por um mesmo observador e a ativação da motilidade do sêmen foi realizada com adição de solução de NaCl 0,29%. No experimento 2 (congelamento) o sêmen foi diluído na proporção 1:8:1 (sêmen:diluidor:crioprotetor), em criosolução compostas pelos os mesmos diluidores mencionados anteriormente, combinados com três crioprotetores (dimetilsulfóxido-DMSO, Metilglicol e Etilglicol). Após diluição as amostras foram envasadas em palhetas de 0,5 mL e congeladas em botijão de vapor de nitrogênio líquido por 24 horas. Posteriormente, foram transferidas e armazenadas em nitrogênio líquido. O descongelamento procedeu-se em banho-maria a 60°C por 8 segundos e a motilidade espermática avaliada após ativação. O estresse oxidativo também foi avaliado nas amostras descongeladas. As amostras seminais de *P. vimboides* apresentaram coloração branca leitosa, ligeiramente amarelada e com média viscosidade. A concentração espermática observada foi de $27,1 \pm 15,1 \times 10^9$ espermatozoides/mL e o volume seminal foi de $1,3 \pm 0,7$ mL. No experimento 1, amostras diluídas em BTS preservaram a motilidade espermática acima de 40% por até 48 horas de resfriamento. Entretanto, as 72 horas de resfriamento, não foram mais observadas motilidades espermáticas em nenhuma das amostras. No experimento 2, amostras seminais diluídas nas criosoluções compostas por glicose 5% e metilglicol apresentaram as maiores motilidades espermáticas ($60\% \pm 11,8\%$; $P < 0,05$) pós-descongelamento. Também foi observado nessas mesmas amostras, menores atividades de catalase e peroxidação lipídica (MDA) ($P < 0,05$). Em relação a atividade da SOD, não observou diferença significativa. Portanto, o sêmen de *P. vimboides* pode ser resfriado por até 48 horas em solução diluidora de BTS e criopreservado em criosolução composta por glicose 5% e metilglicol.

Palavras-chave: *Prochilodus vimboides*, sêmen, resfriamento, criopreservação, estresse oxidativo.

CHAPTER 1 – PRESERVATION OF GRUMATÃ SEMEN THROUGH COOLING AND FREEZING METHODS.

ABSTRACT – The objective in this work was to develop a methodology of semen conservation of *Prochilodus vimboides* (Grumatã), through cooling and freezing methods. The experiments were realized in the station of fish culture of the project Piabanha/PESAGRO–RJ and in the experimental field EPAMIG from Leopoldina during the “piracemas” from 2013/2014 and 2014/2015, Paraíba do Sul river basin. The experiments were conducted in a randomized block design, with 6 repetitions. The semen of each fish represented a block and each block represented a repetition. For the experiments, 12 males with average weight of 367 ± 186 g were induced with extract of pituitary from carp and their semen was collected. In the experiment 1 (cooling) the semen was diluted 1:9 (v/v, semen, diluting) in saline solutions of NaCl 0,9%, NaCl 1,2%, glucose 5%, BTS 5% or M III 6%. One semen aliquot was kept undiluted and was used as control. The sperm motility was subjectively evaluated after 0, 24, 48 and 72 hours of cooling at 4-6°C by the same observer and the activation of the semen motility was realized with the addition of saline solution of NaCl 0,29%. In the experiment 2 (freezing) the semen was diluted in the proportion 1:8:1 (semen, extender, cryoprotectant), in cryosolution composed by the same extenders mentioned previously, combined with three cryoprotectants (dimethyl sulphoxide – DMSO, methylglycol and ethylglycol). After the dilution the samples were potted in containers of 0,5 mL and frozen in nitrogen liquid vapor container for 24 hours and then stored in liquid nitrogen. Sperm motility was subjectively evaluated after thawing at 60°C-water bath for 8 s. Beside this, was evaluated the oxidative stress in the thawed samples. The seminal samples of *P. vimboides* presented milky white coloration slightly with yellow coloration and with medium viscosity. The spermatic concentration observed was of $27,1 \pm 15,1 \times 10^9$ sperm/mL. In the experiment 1, samples diluted in BTS maintained the spermatic motility above 40 % for as long as 48 hours of cooling. However, the 72 hours of cooling, was not more observed spermatic motility in any samples. In the experiment 2, seminal samples diluted in cryosolutions composed by glucose 5% and methylglycol presented the higher spermatic motilities ($60\% \pm 11,8\%$; $P < 0,05$) post-thaw. Was also observed in these samples, lower activity of catalase and lipid peroxidation (MDA) ($P < 0,05$). Related to the activity of SOD, was not observed significant difference. However, the semen of *P. vimboides* can be cooled for up to 48 hours in extender solution of BTS and cryopreserved in cryosolution composed by glucose 5% + Methylglycol.

Keywords: *Prochilodus vimboides*, semen, cooling, cryopreservation, oxidative stress.

INTRODUÇÃO

A bacia do Rio Paraíba do Sul exhibe expressiva alteração, principalmente devido às construções de hidrelétricas e o crescimento das cidades. Essa transformação de grandes rios de águas límpidas em sistemas com altas cargas de sedimentos em suspensão é um processo com rebatimento em diversos grupos da fauna aquática, sendo apontado como a causa de extinção de diversas espécies de peixes na região (SHIMODA, 2004). A Grumatã (*Prochilodus vimboides*) é uma espécie de peixe nativa do Brasil, reoflúvia e iliófaga. Ela é uma das 13 espécies que compõem o gênero *Prochilodus*, gênero muito importante uma vez que estão distribuídos nas principais bacias da América do Sul (SANTOS, 2014). Além disso, estes peixes são importantíssimos para a pesca comercial e servem de alimento básico para as populações ribeirinhas e carentes. Entretanto, suas populações vêm sendo reduzidas devido às mudanças já mencionada anteriormente, somado a sobrepesca, urbanização e poluição. A Grumatã foi considerada ameaçada de extinção no estado de São Paulo, conforme o artigo 3º do Decreto nº 60.133, de 7 de fevereiro de 2014. Há ainda relatos de pescadores que indicam sua situação como gravíssima no Rio de Janeiro e sensível, em Minas Gerais e Espírito Santo (SANTOS, 2014). Toda essa situação aliada a falta de conhecimentos sobre essa espécie, apontam para o risco dessa espécie desaparecer dos rios brasileiros.

Baseado nos fatos expostos acima, torna-se indispensável e urgente a adoção de práticas de conservação genética. A constituição de bancos de germoplasma de peixes ameaçados de extinção tem sido uma medida de conservação eficiente adotada em vários países. Isto se deve à sua relativa simplicidade e ao baixo custo de implantação e de manutenção (ÓRFÃO, 2006). A técnica de criopreservação do sêmen exige solução crioprotetoras adequadas e taxas de congelamento e de descongelamento ótimas (VIVEIROS, 2005). As soluções crioprotetoras são compostas por um diluidor e um crioprotetor intracelular, com a função de prevenir as crioinjúrias dos espermatozoides durante os procedimentos de congelamento e de descongelamento. Os diluidores podem ser soluções simples à base de NaCl ou de glicose, ou soluções mais complexas numa combinação de vários sais e açúcares, como o diluidor Beltsville Thawing Solution (BTS, Minitub®) e a água de coco (VIVEIROS e GODINHO, 2009). O crioprotetor intracelular mais utilizado e que tem proporcionado bons resultados em espécies nativas é o dimetilsulfóxido (DMSO). Mais recentemente, o metilglicol foi utilizado em algumas espécies como crioprotetor e proporcionou resultados semelhantes e, às vezes, até superiores ao DMSO em sêmen de piracanjuba *Brycon orbignyanus* (MARIA et al.,

2006), pirapitinga *Brycon nattereri* (OLIVEIRA et al., 2007) e curimba *Prochilodus lineatus* (VIVEIROS et al., 2009). Entretanto, não há relatos de trabalhos de criopreservação utilizando grumatã *Prochilodus vimboides*.

No Brasil, a diversidade de espécies de peixes é enorme e poucos são os grupos de pesquisa que se dedicam ao assunto. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar diluidores e crioprotetores na conservação do sêmen de *P. vimboides* da bacia do rio Paraíba do Sul.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta do sêmen

A coleta do sêmen foi realizada na estação de piscicultura do Projeto Piabanha/PESAGRO–RJ, situada na bacia do rio Paraíba do Sul, durante o período de piracema de dezembro de 2013 a janeiro de 2014.

Os experimentos foram realizados em delineamento em blocos casualizados. O sêmen de cada reprodutor representou um bloco e cada bloco, uma repetição. Para a realização do trabalho foram utilizados sêmen de 12 reprodutores de Grumatã, sendo o sêmen de seis reprodutores utilizados no experimento 1 (resfriamento) e outros seis, no experimento 2 (congelamento).

No manejo dos reprodutores, os mesmos foram capturados com rede de arrasto, selecionados e levados para o laboratório de reprodução. Após serem identificados e pesados, os reprodutores receberam indução hormonal de extrato bruto de hipófise de carpa, intraperitoneal, abaixo da nadadeira peitoral, em dosagem única de 2 mg/kg de peso vivo. Após seis a oito horas, o sêmen de cada reprodutor foi coletado em tubos eppendorfs de 2 ml, evitando contaminações com urina, fezes ou sangue, e armazenados a 4-6 °C, protegidos da incidência direta da luz do sol até posterior manipulação.

Todos os métodos que envolveram o manejo dos animais foram realizados em conformidade com os regulamentos aprovados pela comissão de ética no uso de animais (CEUA – UFV).

Avaliação seminal

Após a coleta do sêmen foram verificadas as características seminais de volume, concentração espermática (estimada em câmara hematimétrica Newbauer “Improved”) e motilidade espermática. Ativação do sêmen foi realizada misturando uma parte de sêmen para 5 partes de solução de NaCl 0,29% (MARIA et al., 2006). Posteriormente, a motilidade espermática foi estimada subjetivamente por uma mesma pessoa, em microscópio óptico sob aumento de 400X, em porcentagem de espermatozoides móveis em relação ao total observado.

Experimento 1 (resfriamento)

No experimento de resfriamento do sêmen foram avaliados seis tratamentos. O tratamento controle, composto por amostra de sêmen “in natura” sem diluição, e outros cinco tratamentos, os quais as amostras de sêmen foram diluídas 1:9 (sêmen: diluidor) em cinco soluções diluidoras diferentes. Duas delas a base de sal: NaCl 0,9% ou NaCl 1,2% (MARIA et al., 2006). E três delas a base de glicose: solução de BTS[®] 5% (glicose monohidratada 80%; citrato de sódio 12,7%; EDTA 2,6%; sulfato de gentamicina 0,5%; NaHCO₃ 2,6%; KCl 1,6%); solução de MIII[®] 6% (glicose monohidratada 89%; citrato de sódio 3,0%; EDTA 3,0%; sulfato de gentamicina 0,5%; NaHCO₃ 4,2%)(MARIA et al., 2006) ou glicose 5% (CAROLSFELD et al., 2003). Todas soluções diluidoras tiveram o pH ajustado para 7,6, com soluções de 0,1M de HCl ou 0,1M de NaOH, 24 horas após seu preparo. Posteriormente, amostras de 100 µL de sêmen foram adicionados a 900 µL de solução diluidora em eppendorf de 2 mL, fechados, homogeneizados e armazenados abertos em temperaturas de 4-6 °C até o momento de avaliação. A cada 24 horas, esses eppendorfs foram fechados, homogeneizados, abertos, e três alíquotas de cada eppendorf foram analisadas, em microscópio óptico, quanto a motilidade espermática. O delineamento utilizado nesse experimento foi DBC com parcelas subdividas no tempo.

Experimento 2 (congelamento)

O experimento de congelamento foi realizado em esquema fatorial 5 x 3, sendo cada tratamento compostos pela combinação de cinco soluções diluidoras (as mesmas utilizadas no experimento 1) com três soluções crioprotetores (DMSO - dimetilsulfóxido, metilglicol ou etilglicol), totalizando 15 tratamentos. O delineamento utilizado neste experimento foi em blocos casualizados, sendo o sêmen de cada reprodutor considerado um bloco e cada bloco um repetição. Foram utilizados o sêmen de seis reprodutores.

Após a coleta do sêmen, amostras foram adicionadas aos tratamentos formando uma criosolução composta por 100 µL de sêmen: 800 µL de diluidor: 100 µL de crioprotetor. Essas criosoluções foram então, envasadas em palhetas de 0,5 mL (n = 2 palhetas/criosolução/ reprodutor), congeladas e armazenadas em botijão de vapor de nitrogênio. Então o sêmen criopreservado foi transportado 100 km de carro para o laboratório de Reprodução de Peixes da EPAMIG, campo experimental de Leopoldina e após 24 horas de seu congelamento, o mesmo foi transferido para botijão de nitrogênio líquido.

O descongelamento das amostras procederam em banho-maria a 60 °C por 8 segundos, e as motilidades espermáticas avaliadas, conforme descrito anteriormente.

Atividade das enzimas antioxidantes

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi mensurada segundo Dieterich et al. (2000), em leitor de microplacas ($\lambda = 570\text{nm}$), baseado na capacidade desta enzima em catalisar a reação do superóxido e do peróxido de hidrogênio e, assim, diminuir a razão de auto-oxidação do pirogalol. Brevemente, 30 μL de sêmen dos peixes foram acrescentados a 99 μL de tampão fosfato de potássio 0.2 M (pH 7.0), 6 μL de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) e 15 μL de pirogalol 1,25mM. Em seguida a, as amostras foram aquecidas a 37°C por 5 min. e a reação foi paralisada com 150 μL de dimetilsulfóxido (DMSO). Os resultados foram expressos U SOD mg proteína⁻¹.

A atividade da catalase (CAT) foi mensurada segundo Aebi et al., (1984). A enzima foi determinada pela taxa de queda da absorbância de 10 μL de amostras em 60 segundos do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (10 mM) em 1 mL de tampão fosfato de potássio 0.2 M (pH 7.0) e lido em espectrofotômetro ($\lambda = 240\text{nm}$). Foi utilizado o coeficiente de extinção molar do peróxido de hidrogênio $\epsilon_{240} = 36 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ e os resultados foram expressos em U CAT / mg proteína⁻¹.

Peroxidação lipídica - Determinação do malondialdeído

A concentração de malondialdeído (MDA) foi estimada conforme descrito por Buege e Aust (1978). Brevemente, 200 μL de cada tratamento descongelado foi pipetado para eppendorf de 1,5 mL e acrescido de 400 μL de uma solução de ácido tricloroacético (15%) / ácido tiobarbitúrico (0,375%) / ácido clorídrico (0,25 M), aquecido por 15 min. em água fervente (90°C) e resfriado. Posteriormente, a fase superior foi utilizada para quantificar a concentração de MDA em leitor de microplacas ($\lambda = 532\text{nm}$). Foi utilizado o coeficiente de extinção molar $\epsilon_{340} = 1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Os resultados foram expressos em MDA nanomoles/mg proteína.

A concentração de proteína total das amostras foi mensurada de acordo com Lowry et al. (1951), utilizando-se albumina do soro bovino como curva padrão.

Análises estatísticas

As análises estatística foram conduzidas utilizando SISVAR (FERREIRA, 2011). Motilidade espermática foi testada para a distribuição normal usando o procedimento univariado. Os dados que não apresentaram distribuição normal, foram transformados usando arc sen \sqrt{X} . Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste t student, a 5% de probabilidade.

RESULTADOS

Características seminais de Grumatã

O sêmen de Grumatã (*P. vimboides*) apresentou coloração branca leitosa, ligeiramente amarelada e viscosa. O volume seminal observado foi de $1,3 \pm 0,7$ mL. A concentração espermática encontrada foi de $27,1 \pm 15,1 \times 10^9$ espermatozoides/ mL, após hipofisacção. Todas as amostras de sêmen “in natura” recém coletadas, proporcionaram motilidades espermáticas acima de 90 %.

Experimento 1 (resfriamento)

A motilidade espermática nas amostras armazenadas a 4-6 °C, reduziram com o tempo de armazenamento. Imediatamente após diluição (0 horas), observamos motilidade espermática, antes do processo de ativação da motilidade, nas amostras seminais diluídas em NaCl 0,9%. Este diluidor não foi capaz de diluir o sêmen sem que o mesmo fosse ativado, sendo considerado inadequado para essa finalidade. Nos demais tratamentos, somente após a ativação que observamos motilidades espermáticas e estas foram acima de 90% (Tabela 1).

Passadas 24 horas de armazenamento, após ativação do sêmen, as maiores ($P < 0,05$) motilidades espermáticas foram observadas nas amostras do controle (sem diluição e “in natura”). As motilidades observadas nas amostras diluídas em glicose 5% ou BTS foram inferiores àquelas observadas no tratamento controle, porém superiores àquelas diluídas em NaCl 1,2% ou MIII. As motilidades observadas nas amostras diluídas em MIII foram superiores àquelas diluídas em NaCl 1,2%. E nas amostras diluídas em NaCl 0,9% já não haviam mais motilidade espermática.

Em sequência, após 48 horas de armazenamento, observamos as mais altas ($P < 0,05$) motilidades espermáticas nas amostras diluídas em BTS. Estas motilidades foram inferiores àquelas observadas no período de armazenamento de 24 horas, porém, ainda viáveis para serem utilizadas na reprodução artificial de peixes (acima de 30% de motilidade).

Após esse período, não foram observadas motilidades espermáticas viáveis em quaisquer dos tratamentos.

TABELA 1: Motilidade espermática (expressa em %; Média \pm desvio padrão, n=6 reprodutores) do sêmen de *P. vimboides* armazenado a 4-6°C e em diferentes soluções diluidoras.

Diluidores	Armazenamento (horas)			
	0	24	48	72
NaCl 0,9%*	0 \pm 0	0 \pm 0 e	0 \pm 0 c	0 \pm 0
NaCl 1,2%	98 \pm 5	40 \pm 17 d	0 \pm 0 c	0 \pm 0
Glicose 5%	100 \pm 0	62 \pm 19 b	2 \pm 4 c	0 \pm 0
BTS	100 \pm 0	66 \pm 9 b	44 \pm 6 a	16 \pm 11
MIII	100 \pm 0	54 \pm 25 c	18 \pm 13 b	10 \pm 17
Controle	96 \pm 6	82 \pm 5 a	15 \pm 14 b	0 \pm 0

*Ativou a motilidade logo após a diluição; Médias seguidas por letras diferentes na coluna, diferem entre si pelo teste de t student (P<0,05).

Experimento 2 (congelamento do sêmen)

O processo de congelamento reduziu a motilidade espermáticas nas amostras seminais de *P. vimboides*. Entretanto, foi observada interação significativa (P<0,001) entre diluidores e crioprotetores.

Nas criosoluções contendo o crioprotetor DMSO, não houve diferença significativa (P>0,05) entre as motilidades espermáticas observadas nas amostras descongeladas. Em todas elas foi observado motilidades espermáticas abaixo de 30% (Figura 1).

Nas criosoluções contendo metilglicol (METIL), a maior (P<0,05) motilidade espermática foi observada nas amostras diluídas em glicose 5%. Nas demais amostras não foram observadas diferença significativa entre as motilidades e nem motilidades espermáticas acima de 20%.

E nas criosoluções contendo etilglicol (ETIL), também não houve diferença significativa (P>0,05) entre as motilidades espermáticas observadas e essas também estavam abaixo de 30%, ou seja, inviáveis.

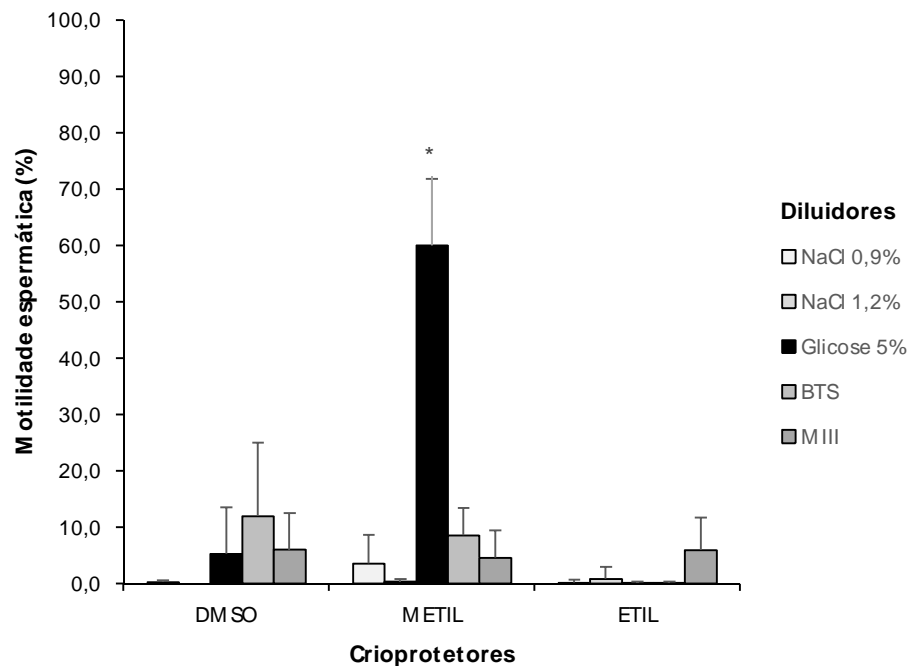


Figura 1: Motilidade espermática das amostras seminais descongeladas de *P. vimbooides*, congeladas em diferentes criosoluções. Teste de t student, $P < 0,05$. Valores são dados em média de porcentagem de motilidade \pm desvio padrão, $n=6$.

Avaliação do estresse oxidativo no sêmen de *P. vimbooides* submetidos a criopreservação

Nas amostras seminais descongeladas de *P. vimbooides* não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre as atividades de SOD (atividade antioxidante) entre as diferentes criosoluções testadas no congelamento (Figura 2).

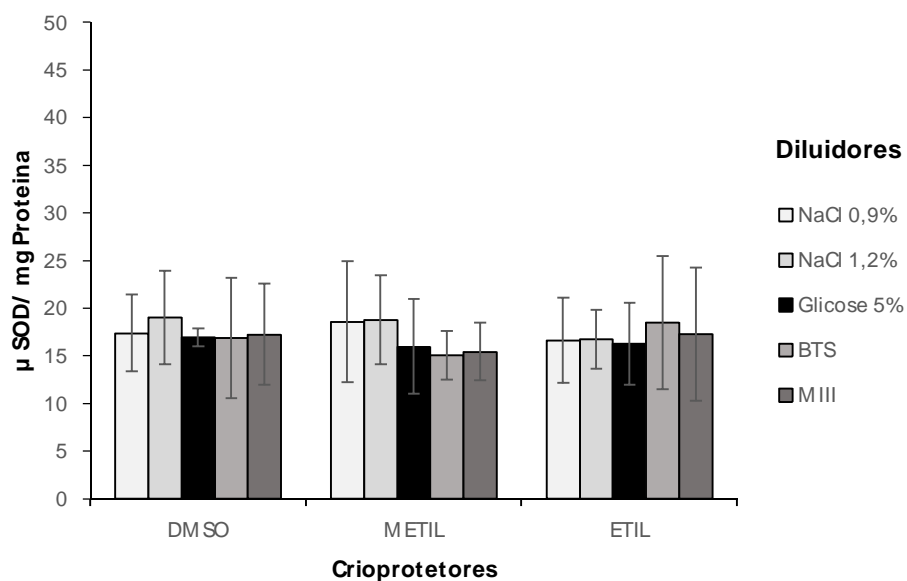


Figura 2: Atividade de superóxido dismutase (SOD), após o descongelamento, nas amostras de sêmen de *P. vimbooides* congeladas em diferentes criosoluções. Teste t student, $P < 0,05$. Valores são dados em média \pm desvio padrão. $n = 6$.

Para a atividade da enzima catalase (CAT) nas amostras descongeladas, podemos observar interação significativa ($P < 0,05$) entre diluidor e crioprotetor (figura 3). Nas criosoluções contendo o crioprotetor DMSO, observamos que as amostras diluídas em NaCl 0,9% apresentaram atividade de CAT inferior ($P < 0,05$) às aquelas observadas nas amostras diluídas em glicose 5% e MIII, entretanto, semelhantes às aquelas diluídas em NaCl 1,2% e BTS.

Nas criosoluções contendo metilglicol, somente as amostras diluídas em glicose 5% apresentaram atividades de CAT significativamente inferior as demais.

Já nas criosoluções contendo etilglicol, não foi observada diferenças em relação aos valores de atividade da CAT nas amostras descongeladas.

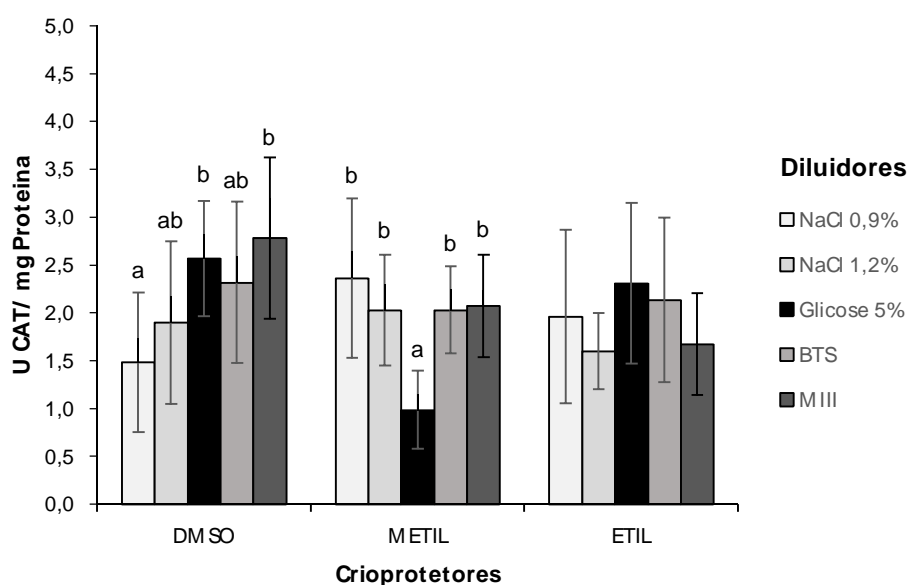


Figura 3: Atividade da catalase (CAT), após o descongelamento, nas amostras de sêmen de *P. vimbooides* congeladas em diferentes criosoluções. Teste t student, $P < 0,05$. Valores são dados em média \pm desvio padrão. N = 6.

Nos resultados da peroxidação lipídica (MDA), interações ($P < 0,05$) entre diluidores e crioprotetores, também foram observadas. Neste caso, nas amostras diluídas nas criosoluções contendo DMSO e NaCl 0,9% ou BTS proporcionaram valores de peroxidação lipídica inferiores ($P < 0,05$) às aquelas diluídas em MIII, porém, semelhantes às aquelas diluídas em NaCl 1,2% ou Glicose 5%.

Em meio contendo metilglicol, as amostras diluídas em glicose 5% apresentaram menores valores de peroxidação lipídicas ($P < 0,05$) do que aquelas diluídas em NaCl 0,9%, NaCl 1,2% ou MIII. Entretanto, esses valores foram semelhantes aos valores observados para as amostras diluídas em BTS.

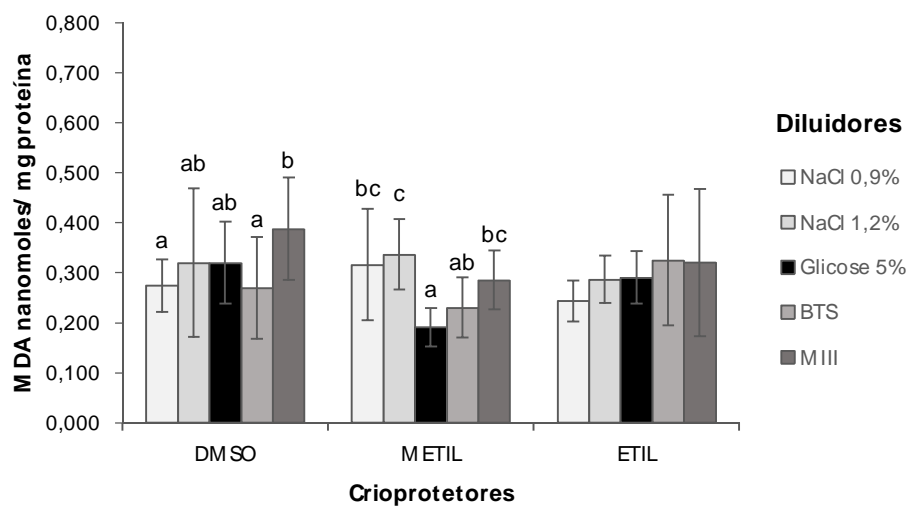


Figura 4: Concentração de malondialdeído (MDA), após o descongelamento, nas amostras de sêmen de *P. vimbooides* congeladas em diferentes criosoluções. Teste t student, $P < 0,05$. Valores são dados em média \pm desvio padrão. N = 6.

DISCUSSÃO

Entre as características seminais, o volume e a concentração espermática tem grande importância para as biotecnologias aplicadas à reprodução de peixes. O volume do sêmen e a concentração espermática encontrados nas diferentes espécies de peixes são bastante variáveis. É importante o conhecimento desses valores para que se possa avaliar a qualidade do sêmen coletado e, com isso, otimizar sua utilização no processo de fertilização artificial (VIVEIROS, 2005). No presente trabalho, observamos volumes seminais e concentração espermática de *P. vimboides* ($1,4 \pm 0,7$ mL e $27,1 \pm 15,8 \times 10^9$ sptz/mL) condizentes com os valores observados em outras espécies de *Prochilodus*, como *P. argenteus* com volume de $0,41 \pm 0,27$ mL e concentração espermática de $25,7 \pm 1,7 \times 10^9$ sptz/mL (SHIMODA et al., 1997), e o *P. lineatus*, com volumes de 1,1-2,4 mL e concentrações espermáticas de $14,4-34,2 \times 10^9$ sptz/mL (VIVEIROS e GODINHO, 2009). Tem sido característico deste gênero as espécies produzirem reduzidos volumes seminais e concentrações espermáticas mais elevadas, mesmo após indução hormonal.

Os espermatozoides de peixes são imóveis no plasma seminal. Essa característica favorece sua preservação através de técnicas de resfriamento, a curto prazo, pois não há requerimento de energia para locomoção. Entretanto, uma solução diluidora deve ser utilizada no processo de resfriamento, uma vez que a diluição diminui a competição dos espermatozoides por oxigênio e espaço (CAROLSFELD e HARVEY, 1999). Além disso, os diluidores podem estabilizar as condições físico-químicas durante a estocagem do sêmen, prolongando a viabilidade dos espermatozoides. No resfriamento do sêmen de *P. vimboides* (Experimento 1), observamos motilidades espermáticas viáveis até 48 horas, quando diluídas em BTS ($44\% \pm 5,5\%$). O diluidor BTS foi originalmente desenvolvido para o resfriamento do sêmen suíno e tem sido usado com sucesso no resfriamento do sêmen de peixes tropicais (MILIORINI, 2006; ÓRFÃO, 2006; OLIVEIRA et al., 2007;). Em termos práticos, amostras de sêmen mantidas resfriadas e com motilidade, de pelo menos 30%, poderiam ser utilizadas com sucesso em procedimentos de desova induzida em laboratório (MARQUES, 2001). Entretanto no resfriamento por até 24 horas, o sêmen sem diluição (tratamento controle) proporcionou as maiores taxas de motilidades espermáticas ($82\% \pm 4,5\%$). Ela foi superior até das amostras diluídas em BTS. Possivelmente, a demanda de oxigênio dos espermatozoides no sêmen “in natura” foi atendida durante o resfriamento por 24 horas, mas não até 48 horas, refletindo a redução da motilidade espermática observada nesses dois intervalos. Já quando diluído em BTS, provavelmente este meio foi capaz de estabilizar as condições físico-químicas durante a

estocagem do sêmen, refletindo no prolongamento da viabilidade desses espermatozoides. Resultados semelhantes foram observados para *P. lineatus*, outra espécie do gênero *Prochilodus*, utilizando o mesmo diluidor (VIVEIROS et al., 2009). Neste caso, motilidades espermáticas de $52\% \pm 16\%$ foram observadas nas amostras resfriadas a $4-6^{\circ}\text{C}$ após 5 dias.

No processo de criopreservação, o sêmen antes de ser congelado, necessita de prévia diluição em meio contendo, no mínimo, um diluidor e um crioprotetor interno. Esta combinação é formulada para prevenir a iniciação da motilidade e posteriormente, crioinjúrias aos espermatozoides durante o congelamento e descongelamento. Em alguns casos é comum o uso de um crioprotetor externo, juntamente com o crioprotetor interno. Entre os crioprotetores extracelulares utilizados, podemos citar os açúcares (sacarose, glicose), os polímeros (dextran) e as proteínas (gema de ovo e leite desnatado), que atuam recobrando a superfície da célula, estabilizando a membrana, protegendo-a e reparando os possíveis danos causados pela criopreservação (CAROLSFELD e HARVEY, 1999).

No presente trabalho, várias combinações entre diluidores e crioprotetores foram avaliadas no congelamento do sêmen de *P. vimboides*. Dentre elas, a criosolução composta por glicose 5% e metilglicol foi o meio mais eficiente em proteger as células espermáticas contra os danos causados pela criopreservação. Esses resultados são baseados nas motilidades espermáticas superiores observadas nas amostras descongeladas em comparação as demais combinações. O diluidor glicose já tem sido usado na criopreservação do sêmen de várias espécies de peixes de água doce do Brasil. Viveiros e Godinho (2009) listaram a utilização desse diluidor na criopreservação do sêmen de *Brycon amazônicos*, *Brycon insignis*, *Brycon orbignyanus*, *Leporinus macrocephalus*, *Leporinus obtusidens*, *Piaractus mesopotamicus*, *Prochilodus argenteus* e *Prochilodus lineatus*. Possivelmente, embora neste trabalho a glicose 5% tenha sido usada como um diluidor de sêmen, ela também pode ter contribuído na proteção dos espermatozoides atuando como um crioprotetor externo.

O crioprotetor interno metilglicol é derivado do metanol (CH_3OH) e do óxido de eteno (CH_2OCH_2), tendo se mostrado menos tóxico para as células espermáticas de peixes submetidas a criopreservação (VIVEIROS e GODINHO, 2009). Os crioprotetores intracelulares são muito importantes no desenvolvimento de um protocolo de criopreservação do sêmen, por protegerem os espermatozoides dos efeitos do congelamento. Eles agem reduzindo a temperatura na qual o interior da célula é congelado, permitindo parcial desidratação celular adiante a fase de cristalização. A água quando congelada, se dilata aumentando seu volume (SILVA e ALBERTONI, 2013). As

moléculas de H₂O têm um formato angular e, quando as resfriamos, elas começam a se agrupar em um formato muito especial, devido à geometria e à atração entre as moléculas, formando cristais que ocupam mais espaço do que as mesmas moléculas ocupariam se estivessem soltas (SILVA e ALBERTONI, 2013). Portanto, para que a célula espermática não se romperem no processo de congelamento o uso do crioprotetor interno é fundamental. o crioprotetor metilglicol já foi utilizado com sucesso na criopreservação do sêmen de *. nattereri* OLIVEIRA et al.,2007 e *P. lineatus* (VIVEIROS et al.,2008).

O estresse oxidativo tem sido um dos principais fatores que contribuem para a baixa qualidade espermática. Em nossos estudos, nas amostras que observamos as maiores motilidades espermáticas também foi observado as menores taxas de peroxidação lipídica e atividade de catalase. Resultados semelhantes foram observados em estudos com congelamento de sêmen de Zebrafish (*Danio rerio*), onde as amostras que apresentavam as maiores motilidades espermáticas também apresentaram as menores taxas de peroxidação lipídica e estresse oxidativos (HAGEDORN et al., 2012). Em outro trabalho também foi observado comportamento semelhante. No caso, Chen et al.(2010) avaliando a qualidade do sêmen criopreservado de Red seabream (*Pagrus major*) em relação ao tempo de armazenamento, associaram a baixa motilidade espermática com a alta peroxidação lipídica e altas motilidades espermáticas com baixa peroxidação lipídica e o estresse oxidativo. Isso pode ser explicado, uma vez que os espermatozoides são particularmente suscetíveis a peroxidação lipídica, por conter altas concentrações de ácidos graxos insaturados (JONES et al., 1979; HAGEDORN et al., 2012). Além disso, eles ao final de sua diferenciação celular perdem grande parte de seu citoplasma, limitando seus mecanismos de reparação (HAGEDORN et al., 2012). Como consequência da peroxidação lipídica, a membrana plasmática perde sua fluidez e a integridade requerida para sua participação nos eventos que envolvem fusão de membranas (STOREY, 1997; HAGEDORN et al., 2012), reduzindo sua qualidade espermática.

As produções das espécies reativas de oxigênios (EROs) após o descongelamento, afetam principalmente a estrutura das membranas espermáticas, desestabilizando-as (BORGES et al., 2011; CABRITA et al., 2014) e permitindo que o conteúdo citoplasmático saia para o meio externo. Apesar das células espermáticas produzirem naturalmente compostos antioxidantes em condições normais de metabolismo, com função de sinalização molecular, a produção de EROs acima de um determinado limite pode afetar de forma intensa a qualidade do sêmen (BORGES et al., 2011; CABRITA et

al., 2014). Além das membranas, os EROs também afetam a estrutura do núcleo, o DNA celular, o que pode reduzir a taxa de fertilidade. Para contornar estes problemas os mecanismos antioxidantes agem de forma a eliminar estes EROs em excesso (CABRITA et al., 2014). Em nossos resultados a ação da SOD não foi crucial entre os tratamentos para minimizar a produção dessas moléculas. Não houve diferença entre os tratamentos avaliados e a atividade desta enzima, que age desmutando o superóxido e transformando-o em oxigênio e água. No entanto, nas amostras diluídas em glicose 5% e metilglicol, foi observada a menor atividade de CAT e menor concentrações de malondialdeído (MDA). A enzima antioxidante CAT age degradando moléculas de H_2O_2 em H_2O e O_2 . O H_2O_2 atravessa facilmente as membranas celulares e neste processo causa diversos danos. As concentrações de MDA estão relacionadas à peroxidação lipídica das células espermáticas. Quanto maior a concentração de malondialdeído, maior é a peroxidação lipídica e conseqüentemente, maior são os danos na membrana dessa célula. Possivelmente, a menor atividade de CAT e a menor concentração de MDA, nas amostras que apresentaram as maiores motilidades espermáticas, são conseqüências de uma maior proteção do meio composto por glicose 5% e metilglicol aos danos causados pelo congelamento e descongelamento do sêmen de *P. vimboides*. Em decorrência desse menor estresse oxidativo, houve menor danos nas membranas espermáticas, ou seja, menor peroxidação de lipídica, requerendo menor atividade da CAT para neutralização do H_2O_2 , refletindo na maior motilidade e viabilidade dessa amostra de sêmen.

CONCLUSÃO

Portanto, o sêmen de grumatã (*P. vimboides*) pode ser criopreservado com sucesso, em criosolução composta de glicose 5% e metilglicol, proporcionando menores danos de estresse oxidativos e peroxidação lipídica após seu descongelamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*. V. 105, p. 121-126, 1984.
- BORGES, J. C. et al. Membrana plasmática de espermatozoides bovinos: efeito de metabólitos do oxigênio, antioxidantes e criopreservação. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 35, n. 3, p. 303–314, 2011.
- BUEGE, J. A. E; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*. V. 52, p. 302-310, 1978.
- CABRITA, E. et al. Factors enhancing fish sperm quality and emerging tools for sperm analysis. *Aquaculture*, v. 432, p. 389–401, 2014.
- CAROLSFELD, J. et al. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. *Journal of Fish Biology*, v. 63, n. 2, p. 472–489, 2003.
- CHEN, Y. K. et al. Effect of long-term cryopreservation on physiological characteristics, antioxidant activities and lipid peroxidation of red seabream (*Pagrus major*) sperm. *Cryobiology*, v. 61, n. 2, p. 189–193, 2010.
- DIETERICH, S.; BIELIGK; U.; BEULICH, K.; HASENFUSS, G. E.; PRESTLE, J. Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: increased expression of catalase in the end-stage failing heart. *Circulation* . v.101, n. 1, p. 33-39, 2000.
- FERREIRA, D. F. SISVAR: A Computer statistical analysis system. *Ciencia e Agrotecnologia*, v. 35, n. 6, p. 1039–1042, 2011.
- HAGEDORN, M. et al. Oxidative Stress in Zebrafish (*Danio rerio*) Sperm. *PloS ONE*, v. 7, n. 6, p. e39397, 2012.
- JONES, R.; HAMILTON, D.W.; FAWCETT, D.W. Morphology of the epithelium of the extratesticular rete testis, ductuli efferentes and ductus epididymidis of the adult male rabbit. *Am Journal Anatomic*, v. 156, n. 3, p. 373–400, 1979.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-75 , 1951.
- MARIA, A. N. et al. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. *Aquaculture*, v. 260, n. 1-4, p. 298–306, 2006.
- MARQUES, S. Preservação a curto prazo do sêmen de teleósteos neotropicais de água doce. 2001. 83 p. Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- MILLIORINI, A. B. Ativadores e concentrações de metanol e dimetilsulfóxido na qualidade do sêmen criopreservado de Curimba (*Prochilodus lineatus*). 2006. 99 p. Dissertação (Mestrado em Veterinária)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.
- OLIVEIRA, A. V. et al. Sucesso do resfriamento e congelamento de sêmen de pirapitinga *Brycon nattereri*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*, v. 59, n. 6, p. 1509–1515, 2007.

- ÓRFÃO, L. H. Resfriamento e criopreservação de sêmen de curimba *Prochilodus lineatus* (VALENCIENNES, 1836). 2006. 86p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.
- SANTOS, L. C. Crescimento de juvenis de curimba (*Prochilodus vimboides*, Kner, 1859) no inverno, em diferentes densidades de estocagem. 2014. 40 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- SHIMODA, E. Análise e criopreservação do sêmen da piabanha *Brycon insignis* Steindachner, 1877 (Pisces, Characidae). 2004. 121 p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, R J.
- SHIMODA, E. et al. Influência da presença da fêmea sobre as características seminais do curimatá (*Prochilodus marggravii* Walbaum, 1972) Influence of female presence on seminal characteristics of curimatá (*Prochilodus marggravii*). *Revista Brasileira de Ciências Veterinárias*, v. 4, n. 1, p. 39–42, 1997.
- SILVA, C. P.; ALBERTONI, E. F. Características físicas e químicas da água. 2013.
- STOREY, B. T. Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa. *Molecular Human Reproduction*. V.3, p.203–213, 1997.
- VIVEIROS, A. T. M. et al. A simple, inexpensive and successful freezing method for curimba *Prochilodus lineatus* (Characiformes) semen. *Animal Reproduction Science*, v. 112, n. 3-4, p. 293–300, 2009.
- VIVEIROS, A. T. M.; GODINHO, H. P. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: A review. *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 35, n. 1, p. 137–150, 2009.
- VIVEIROS, A.T.M.; MARIA, A.N. Sêmen cryopreservation of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*), an endangered Brazilian species.. In: CABRITA, E.; ROBLES, V.; HERRAEZ, P. (Ed.). *Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species*. Boca Raton: CRC Press, p.361-365, 2008.
- VIVEIROS, A.T.M. Semen cryopreservation in catfish species, with particular emphasis on the African catfish. *Anim. Breed. Abstr.*, v.73, p.1N-9N, 2005.

CAPÍTULO 2

PRESERVAÇÃO DO SÊMEN DE CURIMBA POR MEIO DO RESFRIAMENTO E CONGELAMENTO.

CAPITULO 2 – PRESERVAÇÃO DO SÊMEN DE CURIMBA POR MEIO DO RESFRIAMENTO E CONGELAMENTO.

RESUMO – O objetivo deste trabalho foi desenvolver metodologia de preservação de sêmen de Curimba *Prochilodus lineatus*, por meio do resfriamento e do congelamento. O trabalho foi realizado na estações de piscicultura do Campo Experimental EPAMIG de Leopoldina, durante a piracema de 2014/2015, bacia do Rio Paraíba do Sul. Os experimentos foram realizados em delineamento em blocos casualizados, com 6 repetições. O sêmen de cada peixe representou um bloco e cada bloco representou uma repetição. Para os experimentos, 12 machos com peso médio $1,29 \pm 0,32$ kg foram induzidos com extrato bruto de hipófise de carpa e seus sêmens coletados. No experimento 1 (resfriamento) o sêmen foi diluído 1:9 (v/v sêmen: diluidor), em soluções compostas por NaCl 0,9%, NaCl 1,2%, glicose 5%, BTS 5% ou MIII 6%. Uma alíquota do sêmen foi avaliada sem diluição (tratamento controle). A motilidade espermática foi subjetivamente avaliada após 0, 1, 2, 3, 4 e 5 dias de resfriamento a 4-6°C por um mesmo observador e a ativação da motilidade do sêmen foi realizada com adição de solução de NaCl 0,29%. No experimento 2 (congelamento) o sêmen foi diluído na proporção 1:8:1 (sêmen:diluidor:crioprotetor), em criosolução compostas pelos os mesmos diluidores mencionados anteriormente, combinados com três crioprotetores (dimetilsulfóxido-DMSO, Metilglicol e Etilglicol). Após diluição as amostras foram envasadas em palhetas de 0,5 mL e congeladas em botijão de vapor de nitrogênio líquido por 24 horas. Posteriormente, foram transferidas e armazenadas em nitrogênio líquido. O descongelamento procedeu-se em banho-maria a 60°C por 8 segundos e a motilidade espermática avaliada após ativação. O estresse oxidativo também foi avaliado nas amostras descongeladas. A concentração espermática observada foi de $20,4 \pm 6,4 \times 10^9$ espermatozoides/mL após hipofiseação e o volume seminal de $2,0 \pm 0,4$ mL. No resfriamento, amostras diluídas em BTS preservaram a motilidade espermática acima de 30% por até 5 dias, quando armazenadas em temperaturas de 4-6°C. No congelamento, amostras seminais diluídas nas criosoluções compostas por glicose 5% e DMSO, apresentaram as maiores motilidades espermáticas ($66,1 \pm 4,0\%$; $P < 0,05$) pós-descongelamento. Também foi observado nessas mesmas amostras menores atividades de SOD, e baixas atividades de catalase e peroxidação lipídica (MDA) ($P < 0,05$). Portanto, o sêmen de *P. lineatus* pode ser resfriado por até 5 dias em solução diluidora de BTS 5% e criopreservado em criosolução composta por glicose 5% e DMSO com sucesso.

Palavras-chave: *Prochilodus lineatus*, sêmen, resfriamento, criopreservação, estresse oxidativo

CHAPTER 2 – PRESERVATION OF CURIMBA SEMEN THROUGH COOLING AND FREEZING METHODS.

ABSTRAT – The objective in this work was to develop a methodology of semen conservation of *Prochilodus lineatus* (Curimba), through cooling and freezing methods. The experiments were realized in the station of fish culture of the project Piabanha/PESAGRO–RJ and in the experimental field EPAMIG from Leopoldina during the “piracemas” from 2013/2014 and 2014/2015, Paraíba do Sul river basin. The experiments were conducted in a randomized block design, with 6 repetitions. The semen of each fish represented a block and each block represented a repetition.

For the experiments, 12 males with average weight of $1,29 \pm 0,32$ kg were induced with extract of pituitary from carp and their semen was collected. In the experiment 1 (cooling) the semen was diluted 1:9 (v/v, semen, diluting) in saline solutions of NaCl 0,9%, NaCl 1,2%, glucose 5%, BTS 5% or M III 6%. One semen aliquot was kept undiluted and was used as control. The sperm motility was subjectively evaluated after 0, 24, 48 and 72 hours of cooling at 4-6°C by the same observer and the activation of the semen motility was realized with the addition of saline solution of NaCl 0,29%. In the experiment 2 (freezing) the semen was diluted in the proportion 1:8:1 (semen, extender, cryoprotectant), in cryosolution composed by the same extenders mentioned previously, combined with three cryoprotectants (dimethyl sulphoxide – DMSO, methylglycol and ethylglycol). After the dilution the samples were potted in containers of 0,5 mL and frozen in nitrogen liquid vapor container for 24 hours and then stored in liquid nitrogen. Sperm motility was subjectively evaluated after thawing at 60°C-water bath for 8 s. Beside this, was evaluated the oxidative stress in the thawed samples. The spermatic concentration observed was of $20,4 \pm 6,4 \times 10^9$ sperm/mL after hypophysation and the seminal volume was of $2,0 \pm 0,4$ mL. In cooling, samples diluted in BTS preserved the spermatic motility above 30% for as long as 5 days, when stored at temperatures of 4-6°C. In freezing, seminal samples diluted in cryosolutions composed by glucose 5% and DMSO, presented the higher spermatic motilities ($66,1\% \pm 4,0\%$; $P < 0,05$) post-thaw. Was also observed in these samples, lower activity of SOD and lower activity of catalase and lipid peroxidation (MDA) ($P < 0,05$). However, the semen of *P. lineatus* can be cooled for up to 5 days in extender solution of BTS 5% and cryopreserved in cryosolution composed by glucose 5% + DMSO with success.

Keywords: *Prochilodus lineatus*, semen, cooling, cryopreservation, oxidative stress.

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de técnicas cada vez mais apuradas de resfriamento e criopreservação de espermatozoides de peixes de espécies nativas vão ao encontro com questões econômicas e ecológicas cada vez mais atuais. A bacia do Rio Paraíba do Sul exibe expressiva alteração, principalmente devido às construções de grandes barragens e hidrelétricas. Estas construções transformam grandes rios de águas límpidas em sistemas com altas cargas de sedimentos em suspensão, e este, é um processo com rebatimento em diversos grupos da fauna aquática, sendo apontado como a causa de extinção de diversas espécies de peixes na região (SHIMODA, 2004). A curimba (*Prochilodus lineatus*) está distribuída nas principais bacias da América do Sul (SANTOS, 2014). Muitas vezes estes peixes, servem de alimento básico para as populações ribeirinhas e carentes, além de apresentar grande importância para os centros de reprodução de peixes. Suas larvas são muito bem utilizadas como alimento para espécies carnívoras na fase larval, servem como espécie-modelo no desenvolvimento de pesquisas em biotecnologia reprodutiva, dada sua elevada prolificidade e facilidade de manejo.

A criopreservação tem sido uma ferramenta de grande utilidade para a aquicultura, sendo fundamental na rotina de reprodução artificial. O crescente desenvolvimento do setor aquícola, associado com a necessidade de preservação das espécies ameaçadas de extinção, tem impulsionado cada vez mais o desenvolvimento de técnicas apuradas de criopreservação (CARVALHO, 2012). Esta técnica exige solução crioprotetora adequada e taxas de congelamento e de descongelamento ótimas (VIVEIROS, 2005). As soluções crioprotetoras são compostas por diluidores e crioprotetores, com a função de prevenir as crioinjúrias dos espermatozoides durante os procedimentos de congelamento e de descongelamento. Várias espécies nativas de peixes já tiveram seus espermatozoides criopreservados com sucesso: Do gênero *Brycon*, o *Brycon amazonicus* (NINHAUS-SILVEIRA et al., 2006; VELASCO-SANTAMARIA et al., 2006), o *B. insignis* (SHIMODA, 2004), o *B. orbignyanus* (BEDORE, 1999; MURGAS et al., 2003; VIVEIROS et al., 2007) e *B. orthotaenia* (MELO e GODINHO, 2006). Para o gênero *Leporinus*, foram o *Leporinus macrocephalus* (RIBEIRO e GODINHO, 2003) e o *L. obtusides* (TAITSON et al., 2007). Para o gênero *Piaractus*, foi para *Piaractus mesopotamicus* (BEDORE, 1999; CAROLSFELD et al., 2003). Para o gênero *Salminus*, foi o *Salminus brasiliensis* (VIVEIROS et al., 2009). E para o gênero *Prochilodus*, foram *Prochilodus argenteus* (COSER et al., 1992) e *P. lineatus* (CAROLSFELD et al., 2003; VIVEIROS et al., 2008; CARVALHO, 2012), mesma espécie usada no presente estudo.

Entretanto, nenhum destes trabalhos utilizaram exemplares de *P. lineatus* pertencentes à bacia do Rio Paraíba do Sul. Adicionalmente, pouca atenção foi dada a produção das espécies reativas de oxigênios (EROs), que alteram suas concentrações em consequência do processo de criopreservação, afetando o metabolismo celular.

A criopreservação é um processo conhecido por causar consideráveis modificações na membrana espermática do espermatozoide, consequência do estresse oxidativo (CABRITA et al., 2014). O estresse oxidativo tem sido um dos principais fatores que contribuem para a baixa qualidade espermática, devido as alterações metabólicas e estrutural que provocam. Os espermatozoides são particularmente suscetíveis a peroxidação lipídica, pois eles contêm altas concentrações de ácidos graxos insaturados nas membranas plasmáticas (JONES et al., 1979; HAGEDORN et al., 2012). Dentre as alterações podem ser citadas, diminuição do potencial de fertilização da célula associado com a menor motilidade e viabilidade espermática, integridade de membrana, quantidade de antioxidante e funções espermáticas (BORGES et al., 2011; CABRITA et al., 2014).

O objetivo deste estudo foi desenvolver metodologia de criopreservação de sêmen de curimba *Prochilodus lineatus* pertencentes a bacia do Rio Paraíba do Sul, com foco no estresse oxidativo causado pela criopreservação.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta do sêmen

A coleta do sêmen foi realizada na estação de piscicultura do Campo Experimental EPAMIG de Leopoldina, situada na bacia do rio Paraíba do Sul, durante o período de piracema de dezembro de 2014 a janeiro de 2015.

Os experimentos foram realizados em delineamento em blocos casualizados. O sêmen de cada reprodutor representou um bloco e cada bloco, uma repetição. Para a realização do trabalho foram utilizados sêmen de 12 reprodutores de Curimba *P. lineatus*, sendo o sêmen de seis reprodutores utilizados no experimento 1 (resfriamento) e outros seis, no experimento 2 (congelamento).

No manejo dos reprodutores, os mesmos foram capturados com rede de arrasto, selecionados e levados para o laboratório de reprodução. Após serem identificados e pesados, os reprodutores receberam indução hormonal de extrato bruto de hipófise de carpa, intraperitoneal, abaixo da nadadeira peitoral, em dosagem única de 2 mg/kg de peso vivo. Após seis a oito horas, o sêmen de cada reprodutor foi coletado em tubos eppendorfs de 2 ml, evitando contaminações com urina, fezes ou sangue, e armazenados a 4-6 °C, protegidos da incidência direta da luz do sol até posterior manipulação.

Todos os métodos que envolveram o manejo dos animais foram realizados em conformidade com os regulamentos aprovados pela comissão de ética no uso de animais (CEUA – UFV).

Avaliação seminal

Após a coleta do sêmen foram verificadas as características seminais de volume, concentração espermática (estimada em câmara hematimétrica Newbauer “Improved”) e motilidade espermática. Ativação do sêmen foi realizada misturando uma parte de sêmen para 5 partes de solução de NaCl 0,29% (MARIA et al., 2006). Posteriormente, a motilidade espermática foi estimada subjetivamente por uma mesma pessoa, em microscópio óptico sob aumento de 400X, em porcentagem de espermatozoides móveis em relação ao total observado.

Experimento 1 (resfriamento)

No experimento de resfriamento do sêmen foram avaliados seis tratamentos. O tratamento controle, composto por amostra de sêmen “in natura” sem diluição, e outros cinco tratamentos, os quais as amostras de sêmen foram diluídas 1:9 (sêmen: diluidor) em

cinco soluções diluidoras diferentes. Duas delas a base de sal: NaCl 0,9% ou NaCl 1,2% (MARIA et al., 2006). E três delas a base de glicose: solução de BTS[®] 5% (glicose monohidratada 80%; citrato de sódio 12,7%; EDTA 2,6%; sulfato de gentamicina 0,5%; NaHCO₃ 2,6%; KCl 1,6%); solução de MIII[®] 6% (glicose monohidratada 89%; citrato de sódio 3,0%; EDTA 3,0%; sulfato de gentamicina 0,5%; NaHCO₃ 4,2%)(MARIA et al., 2006) ou glicose 5% (CAROLSFELD et al., 2003). Todas soluções diluidoras tiveram o pH ajustado para 7,6, com soluções de 0,1M de HCl ou 0,1M de NaOH, 24 horas após seu preparo. Posteriormente, amostras de 100 µL de sêmen foram adicionados a 900 µL de solução diluidora em eppendorf de 2 mL, fechados, homogeneizados e armazenados abertos em temperaturas de 4-6 °C até o momento de avaliação. A cada 24 horas, esses eppendorfs foram fechados, homogeneizados, abertos, e três alíquotas de cada eppendorf foram analisadas, em microscópio óptico, quanto a motilidade espermática. O delineamento utilizado nesse experimento foi DBC com parcelas subdividas no tempo.

Experimento 2 (congelamento)

O experimento de congelamento foi realizado em esquema fatorial 5 x 3, sendo cada tratamento compostos pela combinação de cinco soluções diluidoras (as mesmas utilizadas no experimento 1) com três soluções crioprotetores (DMSO - dimetilsulfóxido, metilglicol ou etilglicol), totalizando 15 tratamentos. O delineamento utilizado neste experimento foi em blocos casualizados, sendo o sêmen de cada reprodutor considerado um bloco e cada bloco um repetição. Foram utilizados o sêmen de seis reprodutores.

Após a coleta do sêmen, amostras foram adicionadas aos tratamentos formando uma criosolução composta por 100 µL de sêmen: 800 µL de diluidor: 100 µL de crioprotetor. Essas criosoluções foram então, envasadas em palhetas de 0,5 mL (n = 2 palhetas/criosolução/ reprodutor), congeladas e armazenadas em botijão de vapor de nitrogênio por 24 horas. Posteriormente, o mesmo foi transferido para botijão de nitrogênio líquido.

O descongelamento das amostras procederam em banho-maria a 60 °C por 8 segundos, e as motilidades espermáticas avaliadas, conforme descrito anteriormente.

Atividade das enzimas antioxidantes

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi mensurada segundo Dieterich et al. (2000), em leitor de microplacas ($\lambda = 570\text{nm}$), baseado na capacidade desta enzima em catalisar a reação do superóxido e do peróxido de hidrogênio e, assim, diminuir a razão de auto-oxidação do pirogalol. Brevemente, 30 µL de sêmen dos peixes foram

acrescentados a 99µL de tampão fosfato de potássio 0.2 M (pH 7.0), 6µL de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) e 15 µL de pirogalol 1,25mM . Em seguida a, as amostras foram aquecidas a 37°C por 5 min. e a reação foi paralisada com 150 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). Os resultados foram expressos U SOD mg proteína⁻¹.

A atividade da catalase (CAT) foi mensurada segundo Aebi et al., (1984). A enzima foi determinada pela taxa de queda da absorbância de 10µL de amostras em 60 segundos do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (10 mM) em 1 mL de tampão fosfato de potássio 0.2 M (pH 7.0) e lido em espectrofotômetro ($\lambda = 240\text{nm}$). Foi utilizado o coeficiente de extinção molar do peróxido de hidrogênio $e_{240} = 36 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ e os resultados foram expressos em U CAT / mg proteína⁻¹.

Peroxidação lipídica - Determinação do malondialdeído

A concentração de malondialdeído (MDA) foi estimada conforme descrito por Buege e Aust (1978). Brevemente, 200 µL de cada tratamento descongelado foi pipetado para eppendorf de 1,5 mL e acrescido de 400 µL de uma solução de ácido tricloroacético (15%) / ácido tiobarbitúrico (0,375%) / ácido clorídrico (0,25 M), aquecido por 15 min. em água fervente (90°C) e resfriado. Posteriormente, a fase superior foi utilizada para quantificar a concentração de MDA em leitor de microplacas ($\lambda = 532\text{nm}$). Foi utilizado o coeficiente de extinção molar $e_{340} = 1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Os resultados foram expressos em MDA nanomoles/mg proteína.

A concentração de proteína total das amostras foi mensurada de acordo com Lowry et al. (1951), utilizando-se albumina do soro bovino como curva padrão.

Análises estatísticas

As análises estatística foram conduzidas utilizando SISVAR (FERREIRA, 2011). Motilidade espermática foi testada para a distribuição normal usando o procedimento univariado. Os dados que não apresentaram distribuição normal, foram transformados usando $\text{arc sen } \sqrt{X}$. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste t student, a 5% de probabilidade.

RESULTADOS

Características seminais

As amostras de sêmen de curimba (*P. lineatus*) apresentaram coloração branca leitosa, ligeiramente amarelada e viscosa. O volume seminal observado foi de $2,0 \pm 0,4$ mL. A concentração espermática encontrada foi de $20,4 \pm 6,4 \times 10^9$ espermatozoides/mL, após hipofização. Todas as amostras de sêmen “in natura” recém coletadas, proporcionaram motilidades espermáticas acima de 90 %.

Experimento 1 (resfriamento)

A motilidade espermática nas amostras armazenadas a 4-6 °C, reduziram com o tempo de armazenamento (Tabela 2). Imediatamente após a diluição, as amostras diluídas em glicose 5% proporcionaram as maiores motilidades espermáticas ($P < 0,05\%$) em relação às demais amostras diluídas. No sêmen “in natura” foi observado motilidades espermáticas semelhante ao sêmen diluído em glicose 5% e, portanto, superior a outras amostras.

Após um dia de resfriamento a 4-6°C, as maiores motilidades espermáticas ($P < 0,05$) foram observadas nas amostras diluídas em solução de BTS ou MIII, sendo estas semelhantes estatisticamente. A amostras diluídas em glicose 5%, proporcionaram motilidades inferiores ($P < 0,05$) àquelas diluídas em BTS ou MIII, porém superiores àquelas diluídas em NaCl 0,9%, NaCl 1,2% ou no sêmen “in natura”. E o sêmen “in natura” proporcionou motilidades espermáticas superiores somente as amostras diluídas em NaCl 0,9% ou NaCl 1,2%.

A partir do 2º dia não foram observadas motilidades espermáticas ou estas eram próximas de zero, nas amostras diluídas em NaCl 0,9%, NaCl 1,2%, glicose 5% ou no sêmen “in natura”. Nas amostras diluídas em BTS foram observadas as maiores motilidades ($P < 0,05$), deste dia até o final do resfriamento. As amostras diluídas em MIII, proporcionaram motilidades inferiores ($P < 0,05$) àquelas diluídas em BTS, porém foram superiores as demais. Esse comportamento pode ser observado a partir do 2º dia até o 4º dia de resfriamento. Entretanto, o MIII proporcionou motilidades espermática viáveis (acima de 30%) no sêmen resfriado, por até o 3º dia.

Já no 5º dia de resfriamento, somente nas amostras diluídas em BTS foram observadas motilidades espermáticas acima de 30 %, ou seja, ainda viáveis para serem utilizadas na reprodução dessa espécie. A partir do 6º dias em diante, nenhuma motilidade espermática foi observada em qualquer uma das amostras resfriadas.

TABELA 2: Motilidade espermática (expressa em %; média \pm desvio padrão, n=6 reprodutores) do sêmen de curimba *P. lineatus* armazenado a 4-6°C, em diferentes soluções diluidoras.

Diluidores	Armazenamento (dias)													
	0		1		2		3		4		5			
NaCl 0,9	73,3 \pm 13,3	b	15,0 \pm 6,3	d	0,2 \pm 0,4	c	0,0 \pm 0,0	c	0,0 \pm 0,0	c	0,0 \pm 0,0	c	0,0 \pm 0,0	b
NaCl 1,2	62,5 \pm 14,1	c	16,7 \pm 6,1	d	0,0 \pm 0,0	c	0,0 \pm 0,0	c	0,0 \pm 0,0	c	0,0 \pm 0,0	c	0,0 \pm 0,0	b
Glicose 5%	98,3 \pm 2,6	a	51,7 \pm 7,5	b	1,1 \pm 2,0	c	0,0 \pm 0,0	c	0,0 \pm 0,0	c	0,0 \pm 0,0	c	0,0 \pm 0,0	b
BTS	79,2 \pm 7,4	b	71,7 \pm 6,8	a	69,2 \pm 8,6	a	59,2 \pm 8,6	a	47,5 \pm 5,2	a	34,2 \pm 4,9	a	2,3 \pm 3,9	b
MIII	52,5 \pm 12,9	d	65,8 \pm 11,6	a	42,5 \pm 6,9	b	30,0 \pm 11,4	b	26,7 \pm 10,3	b	2,3 \pm 3,9	b	0,0 \pm 0,0	b
Controle	100,0 \pm 0,0	a	28,3 \pm 9,8	c	0,2 \pm 0,4	c	0,0 \pm 0,0	c	0,0 \pm 0,0	c	0,0 \pm 0,0	c	0,0 \pm 0,0	b

Médias seguidas por letras diferentes na coluna, diferem entre si pelo teste de t student (P<0,05).

Experimento 2 (congelamento do sêmen)

O processo de criopreservação reduziu a motilidade espermática nas amostras de *P. lineatus* em relação àquela observada no sêmen “in natura”. Além disso, foi observado interação significativa ($P < 0,001$) entre diluidores e crioprotetores.

Nas criosoluções contendo o crioprotetor DMSO, a maior motilidade espermática ($P < 0,05$) foi observada nas amostras combinadas com glicose 5% ($66,1\% \pm 4,0\%$). Nas demais amostras, após o descongelamento, não foram observadas diferença significativa ($P > 0,05$) e nem motilidades espermáticas viáveis, ou seja, acima de 30% (Figura 5).

Já nas criosoluções contendo o crioprotetor metilglicol (METIL) ou etilglicol (ETIL), não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre as motilidades espermáticas das amostras combinadas aos diferentes diluidores. Em todos esses tratamentos, não foram observadas motilidades espermáticas viáveis, após seu descongelamento.

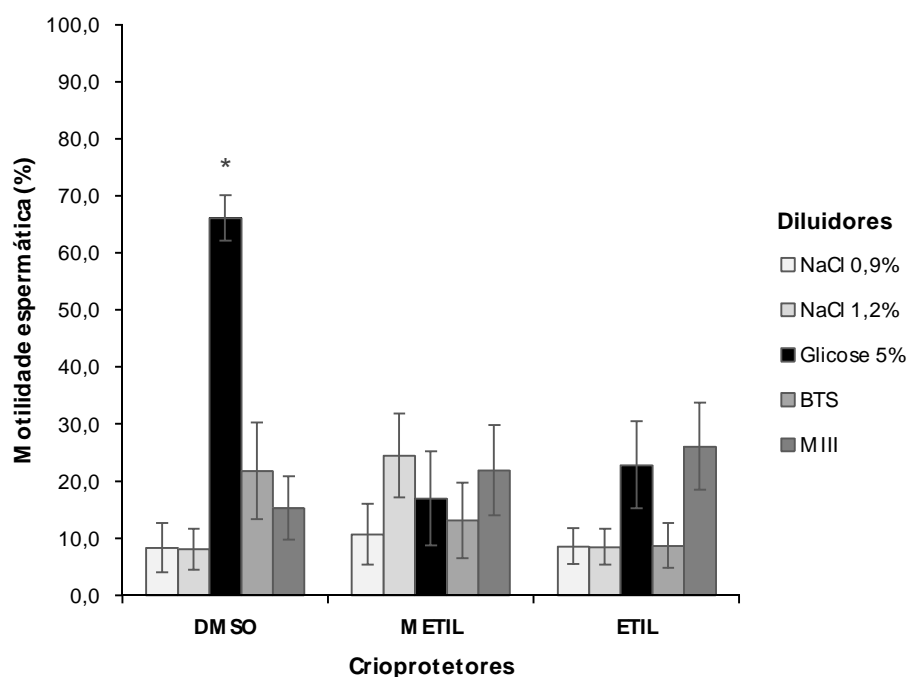


Figura 5: Motilidade espermática das amostras seminais descongeladas de *P. lineatus*, congeladas em diferentes criosoluções. Teste de t student, $P < 0,05$. Valores são dados em média de porcentagem de motilidade \pm desvio padrão, $n=6$.

Avaliação do estresse oxidativo no sêmen de *P. lineatus* submetidos a criopreservação

Observamos interação ($P < 0,001$) entre diluidor e crioprotetore, na atividade da superóxido dismutase (SOD) das amostras descongeladas. Nas criosoluções contendo o crioprotetore DMSO, observamos que as amostras diluídas em glicose 5% apresentaram

atividade de SOD inferior ($P < 0,05$) àquelas observadas nas amostras diluídas em NaCl 1,2%, BTS ou MIII, entretanto, semelhantes àquelas diluídas em NaCl 0,9% (Figura 6).

Nas criosoluções contendo metilglicol como crioprotetor, somente as amostras diluídas em BTS apresentaram atividades de SOD inferior ($P < 0,05$) as demais.

E nas criosoluções contendo etilglicol, as amostras diluídas em glicose 5%, BTS ou MIII apresentaram valores de atividade de SOD inferiores ($P < 0,05$) àquelas diluídas em NaCl 0,9% ou NaCl 1,2%.

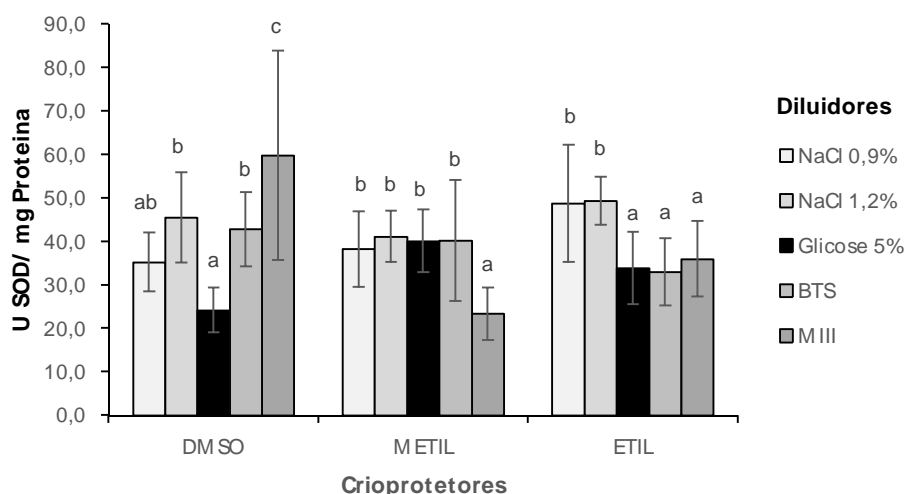


Figura 6: Atividade de superóxido dismutase (SOD), após o descongelamento, nas amostras de sêmen de *P. lineatus* congeladas em diferentes criosoluções. Teste t student, $P < 0,05$. Valores são dados em média \pm desvio padrão. $n = 6$.

Em relação a atividade da catalase (CAT), também houve interação ($P < 0,001$) entre diluidor e crioprotetor. Nas criosoluções contendo o crioprotetor DMSO, observamos que as amostras diluídas em NaCl 0,9%, NaCl 1,2% ou glicose 5%, os valores da atividade de catalase foram inferiores ($P < 0,05$) aos valores observados nas amostras diluídas em BTS ou MIII (Figura 7).

Ao utilizarmos criosoluções contendo metilglicol, observamos nas amostras diluídas em NaCl 0,9% ou MIII, valores de atividade de catalase inferiores ($P < 0,05$) aos valores observados nas amostras diluídas em BTS. Entretanto, a atividade de CAT observadas nas amostras diluídas em NaCl 1,2% ou glicose 5% foram semelhantes ($P > 0,05$) tanto aos valores observados nas amostras diluídas em NaCl 0,9% ou MIII, quanto aquelas diluídas em BTS.

Nas criosoluções contendo etilglicol, não observamos diferença ($P > 0,05$) entre os valores de atividade de catalase, nas amostras diluídas nas diferentes soluções.

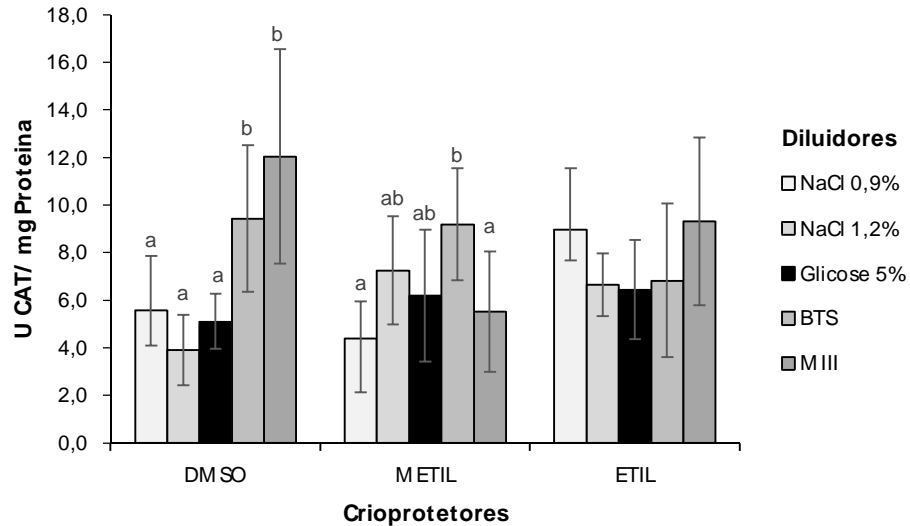


Figura 7: Atividade da catalase (CAT), após o descongelamento, nas amostras de sêmen de *P. lineatus* congeladas em diferentes criosoluções. Teste t student, $P < 0,05$. Valores são dados em média \pm desvio padrão. $n = 6$.

Nos resultados da peroxidação lipídica (MDA), interações ($P < 0,001$) entre diluidores e crioprotetores, também foram observadas. Neste caso, as amostras diluídas em criosoluções contendo DMSO e NaCl 0,9% ou glicose 5% proporcionaram valores de peroxidação lipídica inferiores ($P < 0,05$) àquelas diluídas em NaCl 1,2% ou MIII, porém, semelhantes àquelas diluídas em BTS.

Em meio contendo metilglicol, as amostras diluídas em MIII apresentaram os menores valores de peroxidação lipídica ($P < 0,05$) do que aquelas diluídas em NaCl 1,2% ou glicose 5%. As amostras diluídas em NaCl 0,9% ou BTS, apresentaram valores de peroxidação lipídica semelhantes tanto a das amostras diluídas em MIII, quanto nas amostras diluídas em NaCl 1,2% ou BTS.

E no meio contendo etilglicol, as amostras diluídas em BTS apresentaram os menores valores de peroxidação lipídica ($P < 0,05$) em relação àquelas diluídas em NaCl 1,2%. E, as amostras diluídas em NaCl 0,9%, glicose 5% ou MIII, apresentaram valores de peroxidação lipídica semelhantes tanto a das amostras diluídas em BTS, quanto em NaCl 1,2%.

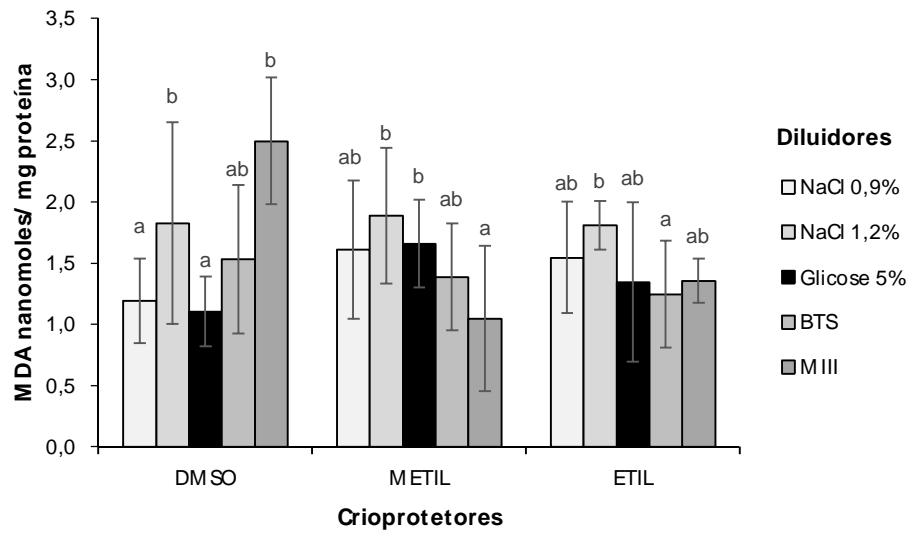


Figura 8: Peroxidação lipídica (MDA), após o descongelamento, nas amostras de sêmen de *P. lineatus* congeladas em diferentes criosoluções. Teste t student, $P < 0,05$, comparando diluidores dentro de cada crioprotetor. Valores são dados em média \pm desvio padrão. $n = 6$.

DISCUSSÃO

As características seminais como, volume e a concentração espermática tem grande relevância quando biotecnologias são aplicadas à reprodução animal. Em reprodução artificial de peixes, relações ideais de espermatozoides/ovócitos, são cada vez mais estudadas visando otimizar a utilização do sêmen, reduzindo o número de reprodutores e gastos demandados para manutenção destes (SHIMODA et al., 2007). É importante o conhecimento desses valores para que se possa avaliar a qualidade do sêmen coletado e, com isso, otimizar sua utilização no processo de fertilização artificial (VIVEIROS, 2005). No presente estudo, os volumes seminais e as concentração espermática observadas para *P. lineatus* foram condizentes aos valores observados para o gênero *Prochilodus*. Em trabalho com *P. argenteus* foram observados volumes seminais de $0,41 \pm 0,27$ mL e concentração espermática de $25,7 \pm 1,7 \times 10^9$ sptz/mL (SHIMODA et al., 1997). Em uma revisão realizada por Viveiros e Godinho (2009), para a *P. lineatus*, mesma espécie em estudo, porém de bacias diferentes, foram encontrados variações nos volumes seminais coletados (1,1-2,4 mL) e nas concentrações espermáticas ($14,4$ - $34,2 \times 10^9$ sptz/mL). Já Carvalho (2012), também trabalhando com *P. lineatus*, observou volumes seminais ligeiramente superior ao observados no presente estudo ($2,3 \pm 4,4$ mL), porém concentrações espermáticas ligeiramente inferiores ($0,41 \pm 0,10 \times 10^9$ sptz/mL). Ainda segundo esse mesmo autor, variações nas concentrações espermáticas podem ocorrer devidos a fatores como a fase reprodutiva que se encontrava a espécie nativa no momento da coleta e o tipo de hormônio ministrado.

O resfriamento é uma biotecnologia de preservação do sêmen a curto prazo, que consiste na manutenção dos gametas em baixas temperaturas, porém acima da temperatura de congelamento (3 a 5°C) (ZANIBONI-FILHO e BALDISSEROTTO, 2015). Segundo estes mesmos autores, ela permite que o sêmen esteja disponível por intervalo de tempo de poucas horas até vários dias. Isso só acontece por que os espermatozoides de peixes são imóveis no plasma seminal. Essa característica favorece sua preservação através do resfriamento, pois não há requerimento de energia para locomoção (CAROLSFELD et al., 2003). Entretanto, uma solução diluidora deve ser utilizada no processo de resfriamento, para diminuir a competição dos espermatozoides por oxigênio e espaço (CAROLSFELD et al., 2003). No resfriamento do sêmen de *P. lineatus*, da bacia do Rio Paraíba do Sul foi observado motilidades espermáticas viáveis por até 5 dias, quando as amostras foram diluídas em BTS e motilidades viáveis por até 3 dias, quando diluídas em MIII. Em termos práticos, amostras de sêmen mantidas resfriadas e com

motilidade, de pelo menos 30%, poderiam ser utilizadas em procedimentos de desova induzida em laboratórios (MARQUES, 2001). Além disso, resultados semelhantes foram observado por Órfão (2006) em resfriamento de sêmen de *P. lineatus* da bacia do Rio Grande, quando diluído em BTS. Já para o diluidor MIII, este autor observou motilidades viáveis por até 5 dias de resfriamento, diferentemente do que foi observado no presente trabalho, no qual amostras diluídas em MIII ficaram viáveis por apenas 3 dias. Possivelmente, o que poderia explicar essa diferença de comportamento das amostras, seria a composição seminal para essas duas populações. Outra possível explicação para as maiores viabilidades das amostras diluídas em BTS ou MIII em relação aos demais seriam, a sua composição de glicose (80% e 89,2% respectivamente) e a presença de sulfato de gentamicina, que diminui o crescimento bacteriano durante o armazenamento (ÓRFÃO, 2006).

A criopreservação do sêmen é uma biotecnologia de preservação a longa prazo. No presente trabalho, observamos que os crioprotetores metilglicol e etilglicol, não foram eficientes em preservar a motilidades espermáticas, após o descongelamento. Dentro das criosoluções compostas pelo crioprotetor DMSO, somente aquela combinada com a solução diluidora glicose 5%, foi capaz de preservar a motilidade espermática nas amostras descongeladas de *P. lineatus*. O DMSO, como os demais crioprotetores internos, protegem os espermatozoides dos efeitos do congelamento. Ele age diminuindo a temperatura na qual o interior da célula é congelado, permitindo parcial desidratação celular e melhor rearranjo interno das moléculas de água adiante sua fase de cristalização e expansão molecular. Já a solução de glicose 5%, funcionaria como um crioprotetor externo, recobrando a superfície celular, estabilizando a membrana e ajudando a minimizar os possíveis danos celulares causados pelo processo de criopreservação (CAROLSFELD et al., 2003). Essa criosolução, acrescida de gema de ovo, vem sendo testadas com sucesso na criopreservação de sêmen de várias espécies de peixes nativos: para o gênero *Brycon*, já foram relatados sucesso na criopreservação de sêmen de *Brycon amazonicus* (NINHAUS-SILVEIRA et al., 2006; VELASCO-SANTAMARIA et al., 2006), *B. insignis* (SHIMODA, 2004), *B. orbignyana* (BEDORE, 1999; MURGAS et al., 2003) e *B. orthotaenia* (MELO e GODINHO, 2006); para o gênero *Leporinus*, foram as espécies *Leporinus macrocephalus* (RIBEIRO e GODINHO, 2003) e *L. obtusides* (TAITSON et al., 2007); para o gênero *Piaractus*, foi para *Piaractus mesopotamicus* (BEDORE, 1999; CAROLSFELD et al., 2003); e para o gênero *Prochilodus*, gênero da mesma espécie em estudo, foram criopreservado o sêmen de *Prochilodus argenteus*, porém sem gema de ovo (COSER et al., 1992), e o sêmen de *P. lineatus*, com gema de

ovo (CAROLSFELD et al., 2003) e sem adição de gema de ovo (ÓRFÃO, 2006). Contudo, existem problemas ao se tentar definir protocolos específicos de criopreservação do sêmen para cada espécie, já que as mesmas espécies que coabitam nossas diferentes bacias hidrográficas, tendem a apresentar diferentes sensibilidades de seus espermatozoides à redução na temperatura e ao contato com soluções crioprotetoras (MILIORINI, 2006), como pudemos observar no presente trabalho.

O processo de criopreservação é conhecido por causar consideráveis danos a célula espermática, por ocasionar excessiva produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). O estresse oxidativo é um dos principais fatores que contribuem para a baixa qualidade espermática. Os espermatozoides são particularmente suscetíveis a peroxidação lipídica, pois eles contêm altas concentrações de ácidos graxos insaturados nas membranas plasmática (JONES et al., 1979; HAGEDORN et al., 2012). Somado a isso, durante a diferenciação final do espermatozoide, ocorre perda de grande parte de seu citoplasma, limitando seus mecanismos de reparação (HAGEDORN et al., 2012). No sêmen descongelado de *P. lineatus*, observamos baixa atividade de SOD nas amostras com altas motilidades espermática. A SOD atua removendo o radical superóxido (O_2^-) convertendo-o em oxigênio e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Possivelmente, a criosolução utilizada nestas amostras foram capazes de prevenir a formação dessa espécie reativa de oxigênio durante o processo de congelamento e descongelamento, refletindo também na menor produção do O_2^- e conseqüentemente, menor conversões destes radicais em H_2O_2 . Conjuntamente, observamos para essas mesmas amostras baixa atividade de catalase (CAT), reforçando a confiabilidade dos resultados. A catalase atua destruindo o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), transformando-o em H_2O e O_2 . O peróxido de hidrogênio são danosos por atravessarem com facilidade as membranas biológicas e formarem radicais de hidrogênio altamente tóxicos (OH^-). Este radical livre causa sérios danos ao DNA, perda do potencial fertilizante dos espermatozoides através de peroxidação lipídica da membrana e perda da adenosina trifosfato do axonema da cauda (BORGES et al., 2011). Após a peroxidação lipídica, a membrana plasmática perde fluidez requerida para participação nos eventos que envolvem fusão de membranas associadas a posterior fecundação e integridade de membrana (STOREY, 1997; HAGEDORN et al., 2012).

No caso das membranas das mitocôndrias a ação dos EROs afetam o fornecimento de energia responsável pelo movimento do flagelo, ou seja, da motilidade espermática (CABRITA et al., 2014). Isso pode ser verificado no trabalho de Liu et al., (2015), trabalhando com adição de antioxidantes na criopreservação de sêmen Red seabream (*Pagrus major*). Neste caso, foi observado que a diminuição da motilidade espermática

do sêmen descongelado estava fortemente associada com a redução da integridade de membrana e com a redução da função mitocondrial. Em outro trabalho avaliando o estresse oxidativo em sêmen de Zebrafish (*Danio rerio*) foi observado que amostras que apresentavam as maiores motilidades espermáticas também apresentaram menores taxas de peroxidação lipídica e estresse oxidativos (HAGEDORN et al., 2012). Chen et al. (2010) avaliando a qualidade do sêmen criopreservado de Red seabream (*Pagrus major*), em relação ao tempo de armazenamento, associaram a baixa motilidade espermática com a alta peroxidação lipídica. Esses mesmos autores ainda observaram que nas amostras com motilidades espermáticas mais altas, a peroxidação lipídica e o estresse oxidativo eram mais baixos. Comportamento semelhante foi observado nas amostras diluídas em glicose 5% e DMSO, onde observamos as maiores motilidades espermáticas e as mais baixas peroxidação lipídicas nas células espermáticas.

CONCLUSÃO

O sêmen de curimba *Prochilodus lineatus* da bacia do Rio paraíba do Sul, pode ser resfriado por até 5 dias em solução diluidora de BTS e criopreservado em criosolução composta por glicose 5% e DMSO com sucesso.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*. v. 105, p. 121-126, 1984.
- BEDORE, A. G. Característica e conservação do sêmen de Pacu-Caranha (*Piaractus mesopotamicus*) e de Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). 1999. 53. p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- BORGES, J. C. et al. Membrana plasmática de espermatozoides bovinos: efeito de metabólitos do oxigênio, antioxidantes e criopreservação. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 35, n. 3, p. 303–314, 2011.
- BUEGE, J. A. E; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*. v. 52, p. 302-310, 1978.
- CABRITA, E. et al. Factors enhancing fish sperm quality and emerging tools for sperm analysis. *Aquaculture*, v. 432, p. 389–401, 2014.
- CAROLSFELD, J. et al. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. *Journal of Fish Biology*, v. 63, n. 2, p. 472–489, 2003.
- CARVALHO, A. F. S. Criopreservação do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e curimba (*Prochilodus lineatus*): predição de potencial de congelabilidade e uso da cafeína na solução ativadora. 2012, 97 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- CHEN, Y. K. et al. Effect of long-term cryopreservation on physiological characteristics, antioxidant activities and lipid peroxidation of red seabream (*Pagrus major*) sperm. *Cryobiology*, v. 61, n. 2, p. 189–193, 2010.
- COSER, A. M. L.; GODINHO, H. P.; SATO, Y.; CARDOSO, E. L. Capacidade de fertilização do sêmen de *Prochilodus marggravii* (curimatã-pacu) congelado sob forma de “pellets”. In: Godinho HP (ed) *Proceedings of the 10th annual aquaculture meeting*, Belo Horizonte, MG, Brazil, p. 56–59, 1992.
- DIETERICH, S.; BIELIGK; U.; BEULICH, K.; HASENFUSS, G. E.; PRESTLE, J. Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: increased expression of catalase in the end-stage failing heart. *Circulation*. v.101, n. 1, p. 33-39, 2000.
- FERREIRA, D. F. SISVAR: A Computer statistical analysis system. *Ciencia e Agrotecnologia*, v. 35, n. 6, p. 1039–1042, 2011.
- HAGEDORN, M. et al. Oxidative Stress in Zebrafish (*Danio rerio*) Sperm. *PLoS ONE*, v. 7, n. 6, p. e39397, 2012.
- JONES, R.; HAMILTON, D.W.; FAWCETT, D.W. Morphology of the epithelium of the extratesticular rete testis, ductuli efferentes and ductus epididymidis of the adult male rabbit. *Am Journal Anatomic*, v. 156, n. 3, p. 373–400, 1979.
- LIU, Q.; WANG, X.; WANG, W.; ZHANG, X.; XU, S.; MA, D.; XIAO, Z.; XIAO, Y.; LI, J. Effect of the addition of six antioxidants on sperm motility, membrane integrity and mitochondrial function in red seabream (*Pagrus major*) sperm cryopreservation. *Fish Physiology Biochemisc.* 41:413-422, 2015.

- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-75
- MARIA, A. N. et al. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. *Aquaculture*, v. 260, n. 1-4, p. 298–306, 2006.
- MARQUES, S. Preservação a curto prazo do sêmen de teleósteos neotropicais de água doce. 2001. 83 p. Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- MELO, F. C. S. A; GODINHO, H. P. A protocol for cryopreservation of spermatozoa of the fish *Brycon orthotaenia*. *Animal reproduction science*, v. 3, p. 380–385, 2006.
- MILLIORINI, A. B. Ativadores e concentrações de metanol e dimetilsulfóxido na qualidade do sêmen criopreservado de Curimba (*Prochilodus lineatus*). 2006. 99 p. Dissertação (Mestrado em Veterinária)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.
- MORAES, G. F. Resfriamento e congelamento do sêmen de piau-açu (*Leporinus macrocephalus*). 2004. 68 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- MURGAS L. S. D.; FRANCISCATTO, R. T.; SANTOS, A. G. O. Avaliação espermática pós-descongelamento em piracanjuba (*Brycon orbignyanus*, Valenciennes, 1849). *Revista Brasileira de Zootecnia*. v.32, p. 1810–1814, 2003.
- NINHAUS-SILVEIRA, A.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R.; SENHORINI, J. A.; ALEXANDRE, J. S.; CHAGURI, M. P. Fertilidade do sêmen de matrinxã (*Brycon amazonicus*) criopreservado em nitrogênio líquido. *Boletim Técnico CEPTA*. v.19, p. 1–8, 2006.
- ÓRFÃO, L. H. Resfriamento e criopreservação de sêmen de curimba *Prochilodus lineatus* (VALENCIENNES, 1836). 2006. 86p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.
- RIBEIRO, R. I. M. A; GODINHO, H. P. Criopreservação do sêmen testicular do teleósteo piau-açu *Leporinus macrocephalus*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 55, p.75–79, 2003
- SANTOS, L. C. Crescimento de juvenis de curimba (*Prochilodus vimboides*, Kner, 1859) no inverno, em diferentes densidades de estocagem. 2014. 40 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- SHIMODA, E.; ANDRADE, D. R.; VIDAL JUNIOR, M. V.; GODINHO, H. P.; YASUI, G. S. Determinação da razão ótima de espermatozoides por ovócitos de piabanha *Brycon insignis* (pisces - characidae). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.59, n.4, p.877-882, 2007.
- SHIMODA, E. Análise e criopreservação do sêmen da piabanha *Brycon insignis* Steindachner, 1877 (Pisces, Characidae). 2004. 121 p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ.

- SHIMODA, E. et al. Influência da presença da fêmea sobre as características seminais do curimatá (*Prochilodus marggravii*Walbaum, 1972) Influence of female presence on seminal characteristics of curimatá (*Prochilodus marggravil*). Revista Brasileira de Ciências Veterinárias, v. 4, n. 1, p. 39–42, 1997.
- STOREY, B. T. Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa. Molecular Human Reproduction. v.3, p.203–213, 1997.
- TAITSON, P. F.; CHAMI, E.; GODINHO, H. P. Gene banking of the neotropical fish *Leporinus obtusidens* (Valenciennes, 1836): a protocol to freeze its sperm in the field. Anim Reprod Sci, v.105, n. 3–4, p.283–291, 2007.
- VELASCO-SANTAMARÍA, Y. M.; MEDINA-ROBLES, V. M.; CRUZ-CASALLAS, P. E. Cryopreservation of yamú (*Brycon amazonicus*) sperm for large scale fertilization. Aquaculture, v.256, p. 264–271, 2006.
- VIVEIROS, A. T. M.; GODINHO, H. P. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: A review. Fish Physiology and Biochemistry, v. 35, n. 1, p. 137–150, 2009.
- VIVEIROS, A. T. M.; ORFÃO, L. H.; MARIA, A. N.; ALLAMAN, I. B. A simple, inexpensive and successful freezing method for curimba *Prochilodus lineatus* (Characiformes) semen. Animal Reproduction Science, v. 112, p. 293-300, 2009.
- VIVEIROS, A.T.M.; MARIA, A.N. Sêmen cryopreservation of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*), an endangered Brazilian species.. In: CABRITA, E.; ROBLES, V.; HERRAEZ, P. (Ed.). Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species. Boca Raton: CRC Press, p.361-365, 2008.
- VIVEIROS, A. T. M.; MARIA, A. N.; ORFÃO, L. H.; CARVALHO, M. A.; NUNES, J. F. Powder coconut water (ACP-104) as extender for semen cryopreservation of Brazilian migratory fish species. In: Roudaut G, Labbe´ C, Bobe J (eds) Proceedings of the 8th international symposium on reproductive physiology of fish, Saint Malo, France, p. 3–8, June, 2007.
- VIVEIROS, A.T.M. Semen cryopreservation in catfish species, with particular emphasis on the African catfish. Anim. Breed. Abstr., v.73, p.1N-9N, 2005.
- ZANIBONI-FILHO, E.; BALDISSEROTTO, B. Congelamento de sêmen e tecidos de peixes brasileiros. Rev. Bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte, v.39, n.1, p.189-194, 2015.

ANEXOS

CAPÍTULO 1

TABELA 1. Análise de variância do efeito das soluções diluidoras do sêmen de *Prochilodus vimboides* no processo de resfriamento.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
PEIXE	4	917.583333	229.395833	1.863	0.1566
DILUIDORES	5	39398.366667	7879.673333	63.979	0.0000
erro 1	20	2463.216667	123.160833		
TEMPO_DIA_	3	116002.066667	38667.355556	483.443	0.0000
DILUIDORES*TEMPO_DIA	15	29936.633333	1995.775556	24.952	0.0000
erro 2	72	5758.800000	79.983333		
Total corrigido	119	194476.666667			
CV 1 (%) =	29.46				
CV 2 (%) =	23.74				
Média geral:	37.6666667	Número de observações:	120		

TABELA 2. Análise de variância do efeito das criosoluções sob a motilidade espermática de *P. vimboides*, no sêmen descongelado.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
PEIXE	5	325.888889	65.177778	1.980	0.0923
DILUIDOR	4	5333.488889	1333.372222	40.500	0.0000
CRIOPROTET	2	3216.272222	1608.136111	48.845	0.0000
DILUIDOR*CRIOPROTET	8	10519.394444	1314.924306	39.939	0.0000
erro	70	2304.611111	32.923016		
Total corrigido	89	21699.655556			
CV (%) =	79.94				
Média geral:	7.1777778	Número de observações:	90		

TABELA 3. Análise de variância da atividade da SOD no sêmen de *P. vimboides* descongelado.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
PEIXE	5	529.328307	105.865661	5.897	0.0001
DILUIDOR	4	38.668111	9.667028	0.538	0.7080
CRIOPROTET	2	8.120747	4.060373	0.226	0.7982
DILUIDOR*CRIOPROTET	8	73.554276	9.194284	0.512	0.8434
erro	70	1256.751160	17.953588		
Total corrigido	89	1906.422600			
CV (%) =	24.80				
Média geral:	17.0833333	Número de observações:	90		

TABELA 4. Análise de variância da atividade da catalase (CAT) no sêmen de *P. vimboides* descongelado.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
PEIXE	5	3.594419	0.718884	1.114	0.3612
DILUIDOR	4	1.559044	0.389761	0.604	0.6612
CRIOPROTET	2	1.762196	0.881098	1.365	0.2622
DILUIDOR*CRIOPROTET	8	13.892782	1.736598	2.690	0.0122
erro	70	45.192031	0.645600		
Total corrigido	89	66.000472			
CV (%) =	39.96				
Média geral:	2.0105556	Número de observações:		90	

TABELA 5. Análise de variância da peroxidação lipídica (MDA) no sêmen de *P. vimboides* descongelado.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
PEIXE	5	0.174686	0.034937	5.951	0.0001
DILUIDOR	4	0.053211	0.013303	2.266	0.0707
CRIOPROTET	2	0.026056	0.013028	2.219	0.1163
DILUIDOR*CRIOPROTET	8	0.110489	0.013811	2.352	0.0266
erro	70	0.410964	0.005871		
Total corrigido	89	0.775406			
CV (%) =	26.17				
Média geral:	0.2927778	Número de observações:		90	

CAPÍTULO 2

TABELA 1. Análise de variância do efeito das soluções diluidoras do sêmen de *Prochilodus lineatus* no processo de resfriamento.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
PEIXE	5	515.064815	103.012963	1.644	0.1852
DILUIDOR	5	55855.231481	11171.046296	178.255	0.0000
erro 1	25	1566.726852	62.669074		
TEMPO	5	130576.564815	26115.312963	712.047	0.0000
TEMPO*DILUIDOR	25	36819.893519	1472.795741	40.157	0.0000
erro 2	150	5501.458333	36.676389		
Total corrigido	215	230834.939815			
CV 1 (%) =	27.73				
CV 2 (%) =	21.21				
Média geral:	28.5509259	Número de observações:		216	

TABELA 2. Análise de variância do efeito das criosoluções sob a motilidade espermática de *P. lineatus*, no sêmen descongelado.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
PEIXE	5	3051.980556	610.396111	2.058	0.0810
DILUIDOR	4	6611.666667	1652.916667	5.573	0.0006
CRIOPROTET	2	2819.338889	1409.669444	4.753	0.0116
DILUIDOR*CRIOPROTET	8	11519.716667	1439.964583	4.855	0.0001
erro	70	20761.977778	296.599683		
Total corrigido	89	44764.680556			
CV (%) =	101.47				
Média geral:	16.9722222	Número de observações:	90		

TABELA 3. Análise de variância da atividade da SOD no sêmen de *P. lineatus* descongelado.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
PEIXE	5	447.985352	89.597070	0.807	0.5489
DILUIDOR	4	1483.842367	370.960592	3.339	0.0146
CRIOPROTET	2	387.540962	193.770481	1.744	0.1823
DILUIDOR*CRIOPROTET	8	5613.402693	701.675337	6.316	0.0000
erro	70	7776.424964	111.091785		
Total corrigido	89	15709.196339			
CV (%) =	26.75				
Média geral:	39.4061111	Número de observações:	90		

TABELA 4. Análise de variância da atividade da catalase (CAT) no sêmen de *P. lineatus* descongelado.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
PEIXE	5	32.508142	6.501628	0.963	0.4465
DILUIDOR	4	157.016411	39.254103	5.814	0.0004
CRIOPROTET	2	19.613562	9.806781	1.452	0.2410
DILUIDOR*CRIOPROTET	8	245.490182	30.686273	4.545	0.0002
erro	70	472.628524	6.751836		
Total corrigido	89	927.256822			
CV (%) =	36.52				
Média geral:	7.1144444	Número de observações:	90		

TABELA 5. Análise de variância da peroxidação lipídica (MDA) no sêmen de *P. lineatus* descongelado.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
PEIXE	5	1.694570	0.338914	1.410	0.2315
DILUIDOR	4	2.871033	0.717758	2.985	0.0246
CRIOPROTET	2	0.451620	0.225810	0.939	0.3958
DILUIDOR*CRIOPROTET	8	8.380247	1.047531	4.357	0.0003
erro	70	16.831180	0.240445		
Total corrigido	89	30.228650			
CV (%) =	31.94				
Média geral:	1.5350000	Número de observações:	90		