



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

FRANCISCO JOSÉ LOPES CAJADO

**UTILIZAÇÃO DE EXTRATO LIOFILIZADO DE PALMA
FORRAGEIRA GIGANTE, *Opuntia ficus indica* E ÁGUA DE CÔCO
EM PÓ ACP-104), PARA A CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN DE
CURIMATÃ (*Prochilodus brevis*).**

FORTALEZA – CE

2014

FRANCISCO JOSÉ LOPES CAJADO

**UTILIZAÇÃO DE EXTRATO LIOFILIZADO DE PALMA
FORRAGEIRA GIGANTE, *Opuntia ficus indica* E ÁGUA DE CÔCO
EM PÓ ACP-104), PARA A CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN DE
CURIMATÃ (*Prochilodus brevis*).**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia em Agropecuária.

Orientador: Prof. Manoel Odorico de Moraes Filho, Ph.D.

FORTALEZA – CE

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- C139u Cajado, Francisco José Lopes.
Utilização de extrato liofilizado de palma forrageira gigante, *Opuntia ficus indica* e água de côco em pó ACP-104), para a criopreservação do sêmen de curimatã (*Prochilodus brevis*). / Francisco José Lopes Cajado. – 2014.
119 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (Rede Nordeste de Biotecnologia), Fortaleza, 2014.
Área de Concentração: Biotecnologia Agropecuária.
Orientação: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho.
Coorientação: Profa. Dra. Caminda Sandra Brito Salmito-Vanderley.
1. Peixe. 2. Espermatozoides. 3. Criopreservação. I. Título.

CDD 660.6

FRANCISCO JOSÉ LOPES CAJADO

UTILIZAÇÃO DE EXTRATOS VEGETAIS: (EXTRATO LIOFILIZADO DE PALMA FORRAGEIRA GIGANTE, *Opuntia ficus indica* E ÁGUA DE COCO EM PÓ ACP-104), COMO AGENTE DILUENTE DO SÊMEN DE CURIMATÃ (*Prochilodus brevis*).

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia em Agropecuária.

Data da apresentação: 24 /03 /2014.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho
(Orientador)

RENORBIO – Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Carminda Sandra Brito Salmito-Vanderley
(Co-orientadora)

Universidade Estadual do Ceará

Prof. Dr. José Ferreira Nunes
(Examinador)

RENORBIO – Universidade Estadual do Ceará

Profa. Dra. Cristiane Clemente de Mello Salgueiro
(Examinadora)

RENORBIO – Universidade Potiguar

Prof. Dr. Dárcio Ítalo Alves Teixeira
(Examinador)

PPGCV – Universidade Estadual do Ceará

Prof. Dr. Manuel Antônio de Andrade Furtado Neto
(Examinador)

Universidade Federal do Ceará

À minha mãe Teresinha Collyer, filha Aline Collyer, família e amigos.

A meu pai Meton Cajado de Lima, avós: Miguel Cajado Sobrinho e Maria Nazaré de Jesus, José Lopes Viana e Silvéria Collyer Lopes e tios Francisco das Chagas Collyer Lopes, Ivaldo Gonzaga Roland, Helena Collyer Lopes Roland e Hélio Barros Cavalcante (in memoriam).

DEDICO

“Procure ser uma pessoa de valor,
em vez de procurar ser uma pessoa
de sucesso. O sucesso é
consequência”.

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre estar comigo em todos os momentos de minha existência.

À Fundação Cearense de Amparo a Pesquisa – FUNCAP pela bolsa concedida.

À Universidade Federal do Ceará, Universidade Estadual do Ceará e Rede Nordeste de Biotecnologia pela oportunidade de cursar este doutorado.

Ao Departamento Nacional de Obras Contra as Secas – DNOCS, seus técnicos e funcionários pelo apoio nos experimentos.

Ao Prof. Ph.D. Manoel Odorico de Moraes Filho, pela amizade e orientação no decorrer do curso de doutorado e na elaboração deste trabalho.

À empresa ACP Biotecnologia por fornecer o ACP-104, e em especial a Profa. Dra. Cristiane Clemente de Mello Salgueiro, pelos diluentes e constantes incentivos na realização desta tese.

À minha estimada Coorientadora Doutora Carmina Sandra Brito Salmito Vanderley, pela amizade, orientação e disponibilidade para tirar dúvidas no decorrer do curso e na elaboração deste trabalho.

Ao Prof. Ph.D. José Ferreira Nunes pela amizade ensinamentos passados no Curso de Doutorado e anos de amizade e convivência.

Ao Prof. Ph.D. Manuel Antonio de Andrade Furtado Neto, pela inspiração, incentivo e orientações ao longo de anos de vida acadêmica.

À minha amiga Dra. Maria Audália Marques de Carvalho, que sempre me ajudou ao longo de vários anos de vida acadêmica, com conselhos e orientações pertinentes.

Ao amigo Prof. Dr. Carlos Riedel Porto Carreiro da Universidade Estadual do Maranhão pelos pertinentes incentivos, revisões e colaborações nesta tese.

À Profa. Dra. Ana Gláudia Vasconcelos Catunda por ser sempre prestativa nos momentos acadêmicos e ensinamentos passados no decorrer desta tese.

Ao amigo biólogo Esp. Agenor Galvão do Departamento Nacional de Obras contra as Secas (DNOCS), sempre prestativo nas pesquisas de campo.

Aos amigos M.Sc. Alex Altair Machado, Dr. José Maurício Cavalcante e M.Sc. Talita Câmara, Kelliani Mucida, Raissa Alves obrigado pelo incentivo, amizade e companheirismo no decorrer do doutorado.

Ao amigo Engenheiro Agrônomo e Mestre em Engenharia de Pesca, Pedro Eymar Campos Mesquita, que muito contribuiu para a realização dos trabalhos de campo no DNOCS e por importantes informações técnicas que foram fundamentais para a realização do presente estudo.

Ao produtor rural e pedagogo Francisco Saraiva do município de Quixadá, pelo fornecimento da palma forrageira como matéria prima para este estudo.

Aos professores da graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual do Ceará e mestrado em Engenharia de Pesca, obrigado pela minha formação.

Aos professores do doutorado: Antonio Egito, Marcelo Bertolinni, Luciana Bertolinni, Isabel Guedes, Diana Magalhães, Cláudia do O, Airton de Alencar, Ricardo Figueiredo, Osvaldo Carioca.

Aos amigos Andreia, Yara, João Vicente, Maury, Alice, Eleno, Célia, Heleno Filho, Alexandre, Udilson, Paulo André, Júnior, Eduardo, Janaína, Juliana, André, Flávio, Delany, Lincoln, Shelly, Kivanark, José Forte, Cristiane, Irani, Cláudia, Willian, Alex e Ana Gláudia pela amizade, respeito e incentivo constante.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia da Reprodução de Peixes Liliane, Renan, Cássia, Mônica Aline, Júlia, Mayara, Jordana, Larissa, João Paulo, Priscila, Thaís, Yasmim, Renata, Eduarda, Gustavo, Simon, Tiago, Daniele e Rômulo meu agradecimento pela ajuda no decorrer dos experimentos.

Aos amigos e funcionários da UECE, UNIFOR, IDJ e da UFC.

Aos meus irmãos, primos, sobrinha e tios, Antonio Lopes Cajado, Irisnete Tirabosch, Nayane Tirabosch, Gerardo Collyer, Sarah Collyer, Socorro Lopes e Clearville Collyer pelo incentivo no decorrer de toda minha vida estudantil, em especial aos primos, Silvéria Nêmora, Ana Maria Roland e ao “Mestre Afranio”, responsável direto por meu caminho no mundo da ciência.

À minha filha Aline pela compreensão dos momentos que estive ausente para a elaboração deste trabalho e durante minha vida acadêmica.

Aos demais colegas do NIB, em especial ao Sr. César e dona Iraci Clemnte de Mello pelo incentivo, amizade e espírito de cooperação.

Aos colegas do Laboratório LEAL em Recife e do IFPE especialmente a Asenate Lima pela valorosa colaboração no apoio logístico durante os experimentos na UFPE.

Aos alunos Guima, Maria da Luz, Merisvaldo e Larissa da UFPB, agradeço pela a ajuda na minha última coleta de sêmen de curimatã no DNOCS.

Aos secretários e funcionários da RENOBIO, Helena, Rafaela, Paulo, Patrícia e Adil e colegas dos demais estados meu muito obrigado pela boa acolhida e atendimento.

Aos demais amigos que emanaram energias positivas para a conclusão deste trabalho, meu muito obrigado.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE QUADROS E FIGURAS.....	iv
LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	v
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. A Palma Forrageira Gigante <i>Opuntia ficus indica</i>	4
2.1.1. Potencialidades biotecnológicas da palma forrageira gigante (<i>O. ficus</i>).....	5
2.2. A curimatã comum (<i>Prochilodus brevis</i>)	7
2.2.1. Aspectos gerais da espécie	8
2.2.2. A reprodução natural e induzida de <i>Prochilodus brevis</i>	9
2.2.3. Fatores ambientais na reprodução e desenvolvimento de <i>Prochilodus brevis</i>	10
2.3. A Refrigeração e a congelação do sêmen de peixes.....	12
2.3.1 Diluentes e crioprotetores	13
2.3.2 Diluentes de origem vegetal	14
2.3.3 Refrigeração seminal	15
2.4. Análise da motilidade espermática.....	17
2.5. Análise do sêmen auxiliada pelo computador (CASA).....	17
2.6. Análise morfológica dos espermatozoides	18
3. JUSTIFICATIVAS.....	21
4. HIPÓTESE CIENTÍFICA	22
5. OBJETIVOS.....	23
5.1. Objetivo geral	23
5.2. Objetivos específicos.....	23
6. CAPÍTULO 1. Biotécnicas da reprodução de peixes aplicadas à conservação do sêmen de <i>Prochilodus sp</i>	24
7. CAPÍTULO 2. Criopreservação do sêmen de curimatã comum (<i>Prochilodus brevis</i>) em água de coco em pó ACP-104	44
8. CAPÍTULO 3. Extrato liofilizado de palma forrageira gigante (<i>Opuntia ficus indica</i>) na criopreservação do sêmen de curimatã comum (<i>Prochilodus brevis</i>)	63
9. CONCLUSÕES GERAIS	84
10. PERSPECTIVAS	85

11. REFERÊNCIAS GERAIS	86
------------------------------	----

ANEXOS

ANEXO A. DECLARAÇÃO DE PEDIDO DE DEPÓSITO DE PATENTE JUNTO AO NÚCLEO DE INOVAÇÃO TECNOLÓGICA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ.

ANEXO B. VALORES NUTRICIONAIS DA ACP, ESTABELECIDOS MEDIANTE ANÁLISES EM LABORATÓRIOS DE REFERÊNCIA CERTIFICADOS PELA ANVISA E INMETRO (DADOS FORNECIDOS PELA EMPRESA ACP BIOTECNOLOGIA, FORTALEZA, CEARÁ), 2010.

ANEXO C. COMPOSIÇÃO APROXIMADA DE CLADÓDIOS DE PALMA FORRAGEIRA GIGANTE (OPUNTIA FÍCUS INDICA) CONFORME AYADI et al., (2014).

RESUMO

Esta tese de doutorado apresenta um estudo sobre a utilização de dois bioprodutos, o primeiro a base de extrato líquido da palma forrageira gigante (*Opuntia ficus indica*) liofilizado e o segundo a água de coco em pó ACP-104, como diluente de sêmen de curimatã comum (*Prochilodus brevis*). Este estudo foi motivado pela escassez de informações sobre o sêmen da espécie, dos bioprodutos testados e pela necessidade de desenvolver um protocolo de resfriamento e criopreservação utilizando sêmen de curimatã comum associados aos bioprodutos à base de palma forrageira e ACP-104. A tese está apresentada em três capítulos. O primeiro capítulo trata de um artigo de revisão contendo as biotécnicas empregadas na conservação de gametas. Nele relatam-se as técnicas de resfriamento, congelação e descongelação de sêmen e avaliação morfológica e computadorizada de espermatozoides de curimatã comum (*P. brevis*). O segundo capítulo objetiva a criopreservação e análise morfológica dos espermatozoides de curimatã comum (*P. brevis*) diluídos em soluções a base de extrato de palma forrageira gigante (*O. ficus*) liofilizado, ACP[®] (água de coco em pó) e solução de glicose a 5%. Neste experimento foi utilizado o programa computacional CASA (*Computer-Assisted Sperm Analyser*) para analisar as propriedades de trajetória e velocidade dos espermatozoides para cada solução estudada. Esta pesquisa teve como objetivo principal avaliar os efeitos da criopreservação do sêmen de curimatã comum (*P. brevis*), utilizando como diluente o extrato de palma forrageira gigante (*O. ficus*) liofilizado (EPFL). A metodologia empregada na criopreservação do sêmen de curimatã, utilizando os diluentes ELPF 30%; ELPF 50%, ACP-104 e Glicose 5%, permitiu a obtenção de taxas de motilidade pós-descongelamento superiores a 60%. O melhor meio de congelação seminal de *P. brevis*, nas condições testadas é o que utiliza a associação do ACP-104 com o DMSO 10%. A metodologia empregada na criopreservação do sêmen de curimatã (*P. brevis*), utilizando os diluentes ELPF 30%; ELPF 50%, ACP-104 e Glicose a 5%, foram adequadas, permitindo a obtenção de taxas de motilidade pós-descongelamento superiores a 60%. Os resultados expressivos foram aqueles obtidos quando se utilizou a associação do ACP-104 e DMSO 10%. Os demais tratamentos podem ser considerados num programa de reprodução assistida, já que apresentaram desempenho dentro dos padrões de utilização de sêmen criopreservados na espécie *Prochilodus brevis*.

Palavras-chaves: Diluentes vegetais, sêmen, *Prochilodus brevis*.

ABSTRACT

This thesis presents a study on the use of two bioproducts, the first base of liquid extract of giant cactus pear (*Opuntia ficus indica*) lyophilized and the second the coconut powder ACP-104 as diluent semen common curimatã (*Prochilodus brevis*). This study was motivated by the scarcity of information about the semen of species of tested bioproducts and the need to develop a protocol for cooling and cryopreservation of semen using common curimatã associated with bioproducts based on cactus pear and ACP-104. The thesis is presented in three chapters. The first chapter is a review article containing biotechnologies employed in the preservation of gametes. Report him to the techniques of cooling, freezing and thawing of semen and morphological and computerized assessment of sperm of common curimatã (*P. brevis*). The second chapter aims to morphological analysis and cryopreservation of sperm of common curimatã (*P. brevis*) diluted in solutions based on extracts of giant cactus pear (*O. ficus*) lyophilized, ACP[®] (coconut milk powder) and glucose solution 5%. In this experiment the computer program CASA (Computer-Assisted Sperm Analyser) was used to analyze the properties of trajectory and speed of sperm for each solution studied. This research aimed to evaluate the effects of cryopreservation of semen from common curimatã (*P. brevis*), using as diluent extract giant cactus pear (*O. ficus*) lyophilized (EPFL). The methodology used in sperm cryopreservation of curimatã using the diluents ELPF 30%; ELPF 50%, ACP-104 and 5% dextrose, afforded the rate of post-thaw motility higher than 60%. The best way of semen freezing *P. brevis*, the tested conditions is what uses the association of ACP-104 with 10% DMSO. The methodology used in sperm cryopreservation of curimatã (*P. brevis*) using diluents ELPF 30%; ELPF 50%, ACP-104 and 5% glucose were suitable, capable of producing rates higher post-thaw motility 60%. The significant results were those obtained when using the combination of ACP-104 and 10% DMSO. The other treatments may be considered an assisted reproductive program, as presented within the performance standards for the use of cryopreserved semen in species *Prochilodus brevis*.

Key-words: vegetables diluents, semen, *Prochilodus brevis*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Média e erro padrão da motilidades de espermatozoides de curimatã comum <i>Prochilodus brevis</i> criopreservados em diferentes diluentes.	55
Tabela 2.	Média e erro padrão das velocidades de espermatozoides de <i>Prochilodus brevis</i> analisados objetivamente (CASA) após criopreservação em diferentes diluidores.	56
Tabela 3.	Média e erro padrão dos percentuais de defeitos de cauda e cabeça de espermatozoides descongelados de <i>Prochilodus brevis</i> em função do tempo de coleta	57

LISTA DE QUADROS E FIGURAS

Figura 1.	Palma forrageira gigante (<i>Opuntia ficus indica</i>)	20
Figura 2.	Macho de curimatã comum (<i>Prochilodus brevis</i>)	21

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACP	Água de coco em pó
ALH	Amplitude lateral da cabeça do espermatozoide
ALSV150	Solução de Alsever a 150 mOsmol/kg H ₂ O
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASMA	<i>Computer Automated Sperm Head Morphometry Analysis</i> <i>(Análise Morfométrica Auxiliada por Computador da Cabeça do Espermatozóide)</i>
CASA	<i>Computer-assisted Sperm Analysis</i>
CEUA	Comissão de Ética para Uso Animal
CPAq	Centro de Pesquisas em Aquicultura Rodolpho von Ihering
CP	Comprimento Padrão
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNOCS	Departamento Nacional de Obras contra as Secas
EG	Etilenoglicol
EHC	Extrato bruto de hipófise de carpa
EMBRAPA	Empresa Brasileira Pesquisa Agropecuária
FAO	Food Agricultural Organization
G	Gravidade
IA	Inseminação artificial

IDJ	Instituto Dom José
IFPB	Instituto Federal da Paraíba
LIN	Linearidade
MeOH	Metanol
mOsmol	Miliosmoles
MOT%	Percentual de espermatozoides móveis totais
NaCl	Cloreto de sódio
NIB	Núcleo Integrado de Biotecnologia
PPGCV	Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias
Sptz	Espermatozoide
SCA	<i>Sperm Class Analyser</i>
UECE	Universidade Estadual do Ceará
UEMA	Universidade Estadual do Maranhão
UFC	Universidade Federal do Ceará
VAP	Velocidade média no percurso
VCL	Velocidade curvilínea
VSL	Velocidade linear progressiva

1. INTRODUÇÃO

Peixes de águas continentais da família *Prochilodontidae* tem apresentado um potencial para aquicultura no Brasil. Esta família de peixes endógenos apresenta larga distribuição geográfica em toda a América do Sul, sendo encontrada na Bacia amazônica, na maioria das Bacias do Nordeste brasileiro, do Paraná, do Paraguai, do Uruguai, no Sudeste brasileiro, nas Guianas e na Patagônia Argentina.

Espécies do gênero *Prochilodus* são de grande importância comercial em todas as regiões do Brasil, em especial no Nordeste brasileiro, devido a possibilidade de adaptação em diferentes ambientes aquáticos, grande facilidade de fecundação artificial, alta precocidade e prolificidade, regime alimentar e principalmente pela sua grande aceitação pelos habitantes. (IHERING & AZEVEDO, 1934).

A espécie curimatã comum (*Prochilodus brevis*) (Fig. 1) anteriormente classificada como (*Prochilodus cearensis*), é também conhecida como curimba, curimatá, gurimatá ou curinbatá e é nativa das bacias hidrográficas dos Estados do Ceará, Rio Grande do Norte e Piauí. Este peixe é muito utilizado para alimentação humana nestes Estados, proporcionando grande potencial aquícola para a espécie, uma vez que a mesma é adaptada às condições climáticas locais (ROSA *et al*, 2005).



Figura 1- Exemplar de curimatã comum (*Prochilodus brevis*)

No entanto, a agressão sofrida pelos ambientes aquáticos, provocada por ações antrópicas constantes, tem afetado diretamente os estoques pesqueiros de espécies nativas como a curimatã, havendo a necessidade de estudos de dinâmica populacional

para o desenvolvimento de técnicas de preservação da espécie. Neste sentido, a criopreservação seminal figura como importante ferramenta nas instalações de piscicultura (SILVA *et al*, 2009).

Nas pisciculturas comerciais, a criopreservação seminal tem sido utilizada para aumentar a variabilidade genética dos reprodutores possibilitando a melhoria de características reprodutivas e difusão de material genético, além de diminuir custos com a manutenção dos machos. Para a congelação do sêmen ser efetiva há necessidade de adição de agentes crioprotetores e meios diluentes. Dentre esses últimos, estão as soluções de sais ou carboidratos, que adicionados ao sêmen, mantêm a viabilidade espermática durante a redução da temperatura (WATSON, 2000).

O extrato de palma forrageira gigante (*Opuntia ficus indica*) é um dos diluentes com possibilidades de cumprir tais características, como um bioproduto capaz de conservar o material genético de peixes, podendo ser empregado em programas de reprodução e melhoramento genético (CAJADO *et al*, 1999).

A palma forrageira gigante é uma cactácea comumente encontrada no sertão cearense e tem como característica um alto teor de carboidratos, água e minerais encontrados em seus cladódios, elementos necessários conservação dos espermatozoides de peixes (Fig. 2) (SANTOS & GONDIM, 2004).



Figura 2: Palma forrageira gigante (*Opuntia ficus indica*)

Vários diluentes tem sido o propósito de resfrieração e congelação de diversas espécies, incluindo os peixes (VELASCO-SANTAMARIA *et al*, 2006). A utilização do extrato líquido da palma forrageira gigante como diluente de sêmen foi realizada pela primeira vez por (CAJADO *et al*, 1999), quando foi constatada a sua adequação nas práticas de criopreservação de sêmen em caprinos. A água de coco em pó ACP-104, também tem sido utilizado como diluente para congelação de sêmen de peixes (VIVEIROS *et al*, 2010).

Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da criopreservação do sêmen de curimatã comum (*P.brevis*), utilizando como diluentes o extrato de palma forrageira (*O. ficus*) liofilizado (EPFL) e adicionado do meio de conservação de sêmen de peixes água de coco em pó (ACP[®]-104).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A palma forrageira gigante (*Opuntia ficus indica*)

A palma forrageira é uma espécie nativa das regiões áridas da América Central, principalmente do México. Esta planta foi introduzida no semiárido nordestino no final do século XIX, com o intuito de produção de corante, porém somente após a seca que ocorreu em 1932, a palma surgiu como opção de plantio como alternativa alimentar para o gado (SANTOS & GONDIM, 2004).

Historicamente, a palma (*O. ficus*) foi introduzida por mais de uma vez no Brasil, desde o final do século XVIII (SIMÕES *et al*, 2005). Andrade, (1990) relata que no ano de 1905, a palma forrageira já havia sido introduzida na cidade de Juazeiro do Norte, Ceará. A palma forrageira é conhecida na região do Cariri nordestino por “palma santa” por ter sido supostamente introduzida pelo pároco de Juazeiro do Norte-CE, Padre Cícero Romão Batista. O primeiro grande incentivo para difusão da palma forrageira no Nordeste brasileiro foi em 1932 pelo Ministério da Viação e Obras Públicas, com implantação de campos de palma do Piauí até Bahia, com mudas trazidas das cidades de Caruaru e Custódia em Pernambuco e Monteiro na Paraíba (DUQUE, 1980).

Segundo (Ramos *et al*, 2011) a palma forrageira gigante é a cactácea com maior potencial de exploração no Nordeste brasileiro, constituindo-se em importante recurso forrageiro nos períodos de estiagem, devido ao seu elevado potencial para a produção de fitomassa nas condições ambientais do semiárido.

Nas últimas três décadas a palma forrageira se tornou importante ingrediente na dieta de animais do semiárido nordestino, notadamente, nos municípios que compõem as “bacias” leiteiras dos Estados de Pernambuco, Alagoas, Paraíba e Sergipe. Além do tipo de fisiologia apresentada pela palma, esta forrageira dispensa a realização de processos como ensilagem e fenação, em face da manutenção do seu valor nutricional com o avanço da idade, comportamento este, diferente da maioria das

fORAGEIRAS que diminuem a qualidade com o avanço da idade. Rica em cálcio e potássio, alto valor energético e da digestibilidade da matéria seca (SANTOS *et al*, 2011).

Considerando que são originárias do México, as palmas são cultivadas em ambos os hemisférios e em todos os continentes, exceto na Antártida (MOBHAMMER; STINTZING; CARLE, 2006). O interesse pelas cactáceas, principalmente a palma, cresceu consideravelmente em função do importante papel que ela parece ter no desenvolvimento de sistemas agrícolas sustentáveis em zonas áridas e semiáridas. Isso se deve ao seu grau de resistência à seca e temperaturas elevadas, à sua adaptabilidade a solos pouco férteis e de alta salinidade, e a sua excelente produtividade. As paredes celulares destes vegetais são a fonte renovável mais abundante de carboidratos fermentáveis na terra, e dentre os principais carboidratos têm-se a sacarose, a frutose e a glicose presentes na mucilagem que é o principal reservatório de carbono fixado na natureza (JEYARAMAN *et al*, 2010).

A palma forrageira (*O. ficus*) é considerada uma excelente fonte de energia, sendo rica em carboidratos não fibrosos (WANDERLEY *et al*, 2002), nutrientes digestíveis totais e pectina e devido a alto teor de mucilagem e carboidratos a palma forrageira é passível de ser utilizada como diluente de sêmen de peixes, visto que a presença de carboidratos em diluentes naturais favorece uma maior sobrevivência espermática (MELO *et al*, 2003).

A possibilidade de uso do extrato líquido da palma forrageira como diluente para a criopreservação do sêmen foi testada por CAJADO *et al*, (1999) utilizando solução à base de extrato líquido de palma forrageira (*O. ficus*), para sêmen caprino.

2.1.1 Potencialidades biotecnológicas da palma forrageira gigante (*Opuntia ficus indica*)

A família das cactáceas compreende quase 850 espécies no continente americano, é uma das famílias botânicas que possui poucos estudos científicos, principalmente na área biotecnológica. Devido à notável variabilidade genética,

mostrando uma elevada adaptabilidade ecológica e podendo ser encontrado em locais de praticamente todas as condições climáticas. Considerando que são originários do México, são cultivadas em ambos os hemisférios e em todos os continentes, exceto na Antártida (MOBHAMMER; STINTZING; CARLE, 2006).

O interesse pelas cactáceas, principalmente a palma, cresceu consideravelmente em função do importante papel que ela parece ter no desenvolvimento de sistemas agrícolas sustentáveis em zonas áridas e semi-áridas. Isso se deve ao seu grau de resistência à seca e temperaturas elevadas, à sua adaptabilidade a solos pouco férteis e de alta salinidade, à sua excelente produtividade (MENEZES *et al*, 2005). As paredes celulares destes vegetais são a fonte mais abundante renovável de açúcares fermentáveis na Terra e é o principal reservatório de carbono fixado na natureza (JEYARAMAN *et al*, 2010).

Ravikumar *et al*, (2011) purificaram e caracterizaram uma nova xilose isomerase extremamente termoestável a partir de *O. vulgaris*. A ocorrência de enzimas termoestáveis em plantas como *Opuntia* é considerada como uma necessidade para a adaptação das plantas às condições de vida no clima árido. A xilose isomerase é uma enzima que catalisa reversivelmente a xilose em xilulose. Esta enzima é utilizada industrialmente para produzir frutose, a partir de glicose. A xilose isomerase é amplamente utilizada na produção industrial de xarope de milho rico em frutose e etanol a partir de hemiceluloses.

A palma forrageira (*Opuntia ficus indica*) é considerada uma excelente fonte de energia, sendo rica em carboidratos não fibrosos (Wanderley *et al*, 2002), nutrientes digestíveis totais e pectina (MELO *et al*, 2003). Este alto teor de pectina da palma forrageira faz com que ela possa ser explorada como substrato barato para a produção de enzimas, principalmente as pectinolíticas.

Maciel *et al*, (2011) avaliaram a produção de poligalacturonases (endo-PG e exo-PG), pectina liase (PL) e pectinesterase (PE) produzida *Aspergillus niger* URM4645 por fermentação em estado sólido utilizando a palma forrageira como substrato/suporte. A viabilidade da produção de endo-PG, exo-PG e PL, utilizando *A. niger* URM4645 e a palma forrageira como substrato em fermentação em estado sólido,

foi demonstrada pelos resultados apresentados pelos autores. Estas enzimas produzidas por via microbiológica são de propriedades favoráveis para o uso na indústria de alimentos no processamento de sucos de frutas.

A palma forrageira é um alimento suculento, rico em água e mucilagem, com significativos teores de minerais, principalmente cálcio (Ca), potássio (K) e magnésio (Mg) (Andrade *et al*, 2002), sendo nos últimos anos uma das principais forrageiras cultivadas na região semi-árida do Nordeste. Esta região se caracteriza pela baixa oferta de forragem, em função da irregularidade das chuvas, do manejo e aproveitamento inadequado das pastagens, o que alicerça a utilização da palma forrageira que, devido as suas características morfofisiológicas, tolera bem as estiagens, podendo em alguns casos suprir parte das necessidades de água dos animais, além de muitas vezes ser o único alimento disponível na época seca.

A palma forrageira (*Opuntia ficus indica*) é uma cactácea de extrema importância para alimentação animal na região semiárida, uma vez que, no período de escassez de água torna-se essencial nos sistemas de produção animal. Destaca-se também por ela ser uma excelente fonte de energia, pois, apresenta altos valores de nutrientes digestíveis totais (MELO *et al*, 2003).

2.2. A curimatã comum (*Prochilodus brevis*)

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Classe: Teleostei

Ordem: Characiformes

Família: Prochilodontidae

Gênero: Prochilodus

Espécie: *Prochilodus brevis*

(STEINDACHNER, 1874, *apud* FISHBASE, 2013).

2.2.1 Aspectos gerais da espécie

O *Prochilodus brevis* (STEINDACHNER, 1874, *apud* FISHBASE, 2013) é uma espécie pertencente à ordem Characiforme, família *Prochilodontidae*, e é encontrada nas bacias hidrográficas nordestinas, principalmente nas cearenses e encontra-se disseminada em grande parte da região sudeste do Brasil (DOURADO, 1981).

De acordo com Fontenele (1982), a espécie tem grande aceitação no mercado da região nordeste, devido à sua precocidade e prolificidade, ocupando lugar de destaque na aquicultura continental cearense, especialmente durante a época chuvosa e renovação das águas onde o fenômeno da piracema ocorre. Grande parte dos animais são capturados e retirados os óvulos para consumo humano.

Conforme Nascimento *et al*, (2006), esta espécie apresenta como características anatômicas, o corpo fusiforme e comprido, coberto proporcionalmente por escamas grandes e rugosas. Possui ainda placa pré-dorsal biespinhosa com um sulco mediano ventral que desce das nadadeiras ventrais até o ânus. A boca é pequena em posição terminal com lábios carnosos moderadamente desenvolvidos, formando disco oral quando protraídos. Contém pequenos dentes funcionais e dispostos em duas fileiras em cada maxila (CASTRO, 1991).

Ainda conforme Castro (1991) a linha lateral apresenta de 41 a 48 escamas e a transversal de 7 a 9 acima e de 6 a 8 abaixo. O número total de raios das nadadeiras é: Pélvicas 14-16, Ventrais 9, Dorsais 12-14 e Anais 12-14. Esta espécie possui regime alimentar iliófago alimentando-se preferencialmente de lodo, algas, perifiton e detritos orgânicos, habitando, portanto, as regiões mais profundas dos rios, açudes e viveiros (LEITE *et. al*, 1988). Quanto à forma do estômago, este se apresenta na forma de "U", possuindo duas regiões, a primeira região possui parede mais espessa, muscular, que conforme algum autor trata-se da região pilórica, bastante desenvolvida, atuando como uma moela na maceração dos alimentos; e outra região de parede mais delgada. É característica de espécies detritívoras a presença de um intestino longo, o que permite um trânsito mais lento do alimento, acarretando no aumento da absorção de nutrientes.

Tal particularidade relaciona-se à categoria trófica da espécie, sendo os detritívoros os que possuem maior comprimento intestinal (COSTA *et al*, 2013).

Segundo Chaves e Vazzoler (1984), estruturas macro e microscópicas dos órgãos do tubo digestivo apresentam estreita relação com a natureza do alimento e o modo como ele é ingerido. Estudos acerca da biologia alimentar de várias espécies de peixes continentais vêm recebendo atenção especial devido à sua importância no que se refere à conservação de ambientes aquáticos. Esses estudos são de fundamental importância para que seja compreendida toda a dinâmica ecológica dos ambientes aquáticos (LEAL *et. al.*, 2003).

2.2.2 Reprodução natural e induzida de *Prochilodus brevis*.

A curimatã comum (*P. brevis*) é considerada espécie reofílica, migradora percorrendo longos trechos dos rios até alcançar suas áreas de desova. Durante este percurso completam o desenvolvimento gonadal culminando na liberação de grande quantidade de oócitos. A fêmea *Prochilodus sp* possui quatro estágios de desenvolvimento gonadal. Os exemplares atingem a primeira maturação sexual aos dois anos de idade. Durante o processo de acasalamento os machos nadam junto às fêmeas pressionando lateralmente os flancos da fêmea e emitindo roncos característicos da família (VAZZOLER, 1996), a fêmea então libera os ovos (que são flutuantes e cor de cinza, tornando-se translúcidos após hidratação - apresentando diâmetro médio de 1,6 mm) sem cuidado parental, podendo produzir de 200 a 2 milhões dependendo do peso da mesma. A primeira maturação sexual pode ocorrer a partir de 200 g de peso corpóreo, comumente na época das chuvas (BRITSKI *et al*, 1986).

O desenvolvimento embrionário ocorre entre duas a seis horas em temperatura média de 24,8 °C. As larvas de curimatã comum eclodem num intervalo de 25h20min após a fecundação, à temperatura média de 24,8 °C, medindo aproximadamente 4,13 mm e seu saco vitelino é relativamente grande e os olhos pouco pigmentados. A pigmentação completa dos olhos ocorre quando a larva atinge aproximadamente de 5,33mm do comprimento padrão (CP). O olho é grande, a cabeça é pequena e o corpo moderado (CASTRO, 1991).

A curimatã comum é vulnerável as mudanças climáticas, a saber: alterações do ambiente de desova, aumento na temperatura, alterações no regime de chuvas, correntezas e ações antrópicas tal como a construções de barragens e aumento da poluição aquática. Desta forma, acarreta disfunções reprodutivas, reduzindo as populações naturais; já nas populações em cativeiro, a ovulação e a desova só ocorrem após processo de indução hormonal. Deste modo, medidas conservacionaistas como a hipofisacão (técnica de reprodução artificial de peixes capaz de induzir a desova em fêmeas e fluidificação e liberação de sêmen nos machos), vêm contribuindo de maneira eficaz para a conservação da espécie (WOYNAROVICH, 1986). A *P. brevis* assim como a *Prochilodus lineatus* são utilizadas em propagação artificial, pois oferecem grandes vantagens à piscicultura, devido à rusticidade e à elevada taxa de crescimento (MURGAS *et al*, 2007). Esta técnica constitui uma excelente alternativa para evitar uma possível extinção da espécie.

O procedimento de hipofisacão consiste na captura dos reprodutores, seguidos da identificação de machos e fêmeas, pesagem dos animais, preparo do extrato hipofisário com cálculo da dose total de hormônio a ser aplicada. A técnica de hipofisacão induz e facilita a coleta dos gametas dos peixes além de aumentar a fluidificação seminal (WOYNAROVICH, 1986).

2.2.3. Fatores ambientais na reprodução e desenvolvimento de *Prochilodus sp.*

As mudanças climáticas estão ficando evidentes a cada ano, e as estações do ano estão perdendo cada vez mais suas características marcantes, devido às ações descontroladas do homem sobre a natureza, como, por exemplo, a intensificação do efeito estufa, chuvas ácidas, o desmatamento e a destruição da camada de ozônio (WALTHER, *et al*, 2002).

As mudanças climatológicas podem resultar no adiantamento ou no retardamento da maturação final e ou liberação dos gametas em diferentes períodos da reprodução, como já relatado para o *Prochilodus lineatus*, (SILVA *et al*, 2009).

Para as espécies de piracema, como as do gênero *Prochilodus*, a época chuvosa tem um efeito significativo sobre a reprodução refletindo diretamente na maturação gonadal de espécimes nativas em ambiente natural.

Alguns aspectos referentes à biologia reprodutiva básica das espécies têm sido considerados particularmente importantes, como o tamanho mínimo para a reprodução e as características do local de desova (PEREIRA *et al*, 2007). O conhecimento sobre o desempenho reprodutivo de diversas espécies de peixes, ao longo do período reprodutivo, é escasso, comprovando a necessidade de reflexão sobre a obtenção dessa informação.

Para Simpaúba (1994), as atividades fisiológicas dos peixes, como a reprodução e a alimentação, estão intimamente ligadas à temperatura do meio. Os peixes ajustam sua temperatura corporal de acordo com a temperatura da água. Cada espécie tem uma temperatura na qual melhor se adapta e se desenvolve, sendo essa temperatura chamada de temperatura ótima. As acima ou abaixo do ótimo influenciam de forma a reduzir seu crescimento. Em caso de temperaturas extremas, observa-se aumento na taxa de mortalidade.

A temperatura do meio aquático interfere nos processos químicos dos peixes, pois, de uma maneira geral, as velocidades das reações químicas dobram ou triplicam para cada 10 °C de aumento na temperatura. Isso significa que os organismos aquáticos usarão dois ou três vezes mais oxigênio dissolvido a 30 °C do que a 20 °C. Assim, os tratamentos químicos e os fertilizantes (adubos) dissolvem-se mais rapidamente (decomposição de matéria orgânica), colaborando para o aumento do consumo de oxigênio (SILVA *et al*, 2006).

O metabolismo dos peixes é maior à medida que aumenta a temperatura. Os peixes de águas tropicais geralmente vivem bem com temperaturas entre 20 e 28 °C e seu apetite máximo serão entre 24–28 °C; entre 20–24 °C, eles se alimentam bem, mas abaixo desse patamar o apetite decresce rapidamente e acima de 28 °C perdem-no totalmente, podendo ocorrer mortalidade em temperaturas superiores a 32 °C (WATANABE *et al*, 2007).

Mudanças climatológicas podem resultar no adiantamento ou no retardamento da maturação final e ou liberação dos gametas em diferentes períodos da reprodução, como já relatado para o *Phochilodus lineatus* (SILVA *et al*, 2006).

O desenvolvimento de técnicas de congelação e resfrição de sêmen cumpre notadamente papel de vital importância no controle reprodutivo, contribuindo assim para o maior rendimento reprodutivo, minimizando a dependência dos fatores ambientais (MARQUES & GODINHO, 2004).

2.3 A refrigeração e a congelação de sêmen de peixes

O uso de gelo para a refrigeração do sêmen de peixes é uma prática antiga descrita por diversos autores (BARRET, 1951; BILLARD & LEGENDRE, 1982; KAVAMOTO *et al*, 1987). Segundo Harvey e Carolsfeld (1993), o sêmen de peixe pode ser armazenado a 5 °C por períodos de poucos dias a várias semanas e a melhor estratégia é armazená-lo a fresco, (sem diluição) e sem mudanças significantes na sua qualidade, suavizando os custos em relação ao seu transporte. Os primeiros registros de refrigeração de sêmen de peixes foram oriundos de salmonídeos armazenados em caixas térmicas de madeira com gelo em temperaturas variando entre 2 a 8 °C pelo período de algumas horas a dias (BARRET, 1951).

Marques e Godinho (2004) preconizam a utilização de solução diluente no processo de refrigeração, pois a diluição diminui a competição dos espermatozoides por oxigênio e espaço físico. Além disso, os mesmos autores, afirmam que a preservação do sêmen em curto prazo é um método menos estressante para prolongar a viabilidade dos espermatozoides, sendo este método considerado mais eficiente e econômico que a manutenção de um banco *in vivo*.

A técnica de congelação de gametas é fundamentada no uso de nitrogênio líquido, podendo ser preservados por um período de vários anos. O primeiro trabalho de congelação de sêmen de peixes foi realizado por Blaxter em 1953 e viabilizou o cruzamento de duas espécies de arenque que desovavam em épocas diferentes do ano. Com isso, originou-se um grande número de protocolos tanto para espécie de água doce como marinhas (SUQUET *et al*, 2000).

A etapa de congelação inicia-se com a adição do criodiluyente ao sêmen, em seguida o envasamento em palhetas ou criotubos e a submissão à diminuição de temperatura, que pode ser realizada por diferentes métodos, até serem finalmente mergulhadas e armazenadas em nitrogênio líquido. Esta visão geral, desde a coleta até a

congelamento propriamente dita, do protocolo de criopreservação de sêmen de peixe é uma reunião dos mais diversos protocolos comumente utilizados, mas a comparação entre eles é muito difícil devido à diversidade de parâmetros envolvidos (CABRITA *et al*, 2008; VIVEIROS *et al*, 2005).

2.3.1. Diluentes e crioprotetores

Os diluentes são soluções salinas ou de carboidratos, adicionadas a sêmen, cuja função é manter a viabilidade da célula espermática durante a redução da temperatura. Para um bom diluente, a isotonicidade é uma das condições mínimas requeridas, para que não haja ativação prévia da motilidade dos espermatozoides, seguida da estabilidade, para que suas características físico-químicas não sejam alteradas quando em contato com o sêmen; a condutividade térmica elevada, permitindo que a temperatura do meio seja transmitida de forma rápida para o espermatozoide; a esterilidade, onde o meio não deve conter microrganismos nocivos às células espermáticas e ser ainda carreador de crioprotetores para o processo de congelamento (LEGENDRE & BILLARD, 1980).

Os diluentes são substâncias que além de aumentar o volume total do sêmen, facilitam a sua divisão em doses inseminantes e proporcionam um meio favorável à sobrevivência dos espermatozoides *in vitro* (DERIVAUX, 1980). A diferença existente entre os diluentes está na sua composição e esta depende das características seminais de cada espécie animal e da tecnologia seminal empregada (HOPKINS *et al*, 1991).

Diluentes desenvolvidos para sêmen de mamíferos têm sido utilizados com sucesso para sêmen de peixes, tal como o BTS (*Beltsville Thawing. Solution*[®]), Glicose e ACP[®]-104, (MURGAS *et al*, 2002). Existem, porém, fatores limitantes que podem contribuir para a diminuição da sobrevivência espermática em um curto período de armazenamento, tais como, qualidade do diluente (SALMITO-VANDERELY, 2012), a contaminação seminal por microrganismos (ISAU, 2006), a taxa de diluição, as condições de armazenamento e a quantidade de oxigênio disponível (JENKINS-KEERAN *et al*, 2001).

O efeito da presença ou ausência de oxigênio nos ambientes de estocagem do sêmen sobre a motilidade foi investigado por alguns autores (Christensen e Tiersch, 1996), não observando diferenças nas motilidades espermáticas entre os diversos recipientes analisados. (BENCIC *et al*, 2000; BILLARD, 2004; JENKINS-KEERAN *et al*, 2001).

Ao avaliar o efeito de um ambiente rico em oxigênio, trabalhos realizados por Jenkins-Keeran *et al*, (2001) e Billard (2004) destacaram a alta correlação existente entre a disponibilidade de oxigênio e a alta taxa de motilidade. Marques e Godinho (2004) trabalhando com seis espécies de Characiformes conseguiram manter a viabilidade espermática do sêmen por 20 horas quando mantido a 4 °C em ambiente rico ou não em oxigênio. Sanches e Cerqueira (2011) trabalhando com cioba (*Lutjanus analis*), também não encontraram diferenças na viabilidade espermática em sêmen refrigerado rico em oxigênio.

Os crioprotetores são substâncias capazes de proteger as células dos efeitos de baixas temperaturas, pois possuem alta capacidade de penetração na célula, além de um alto calor específico, reduzindo assim, injúrias à membrana celular espermática (BABIÁK *et al*, 1997). Enquanto que os crioprotetores extracelulares protegem e estabilizam a membrana celular, os crioprotetores permeantes ou intracelulares removem, por ação da osmose, a água do interior da célula reduzindo assim o ponto de congelação e impedindo a formação dos cristais de gelo (AMANN *et al*, 2004). Em alguns casos, os crioprotetores são adicionados para auxiliar na preservação dos gametas em temperaturas levemente abaixo de 0 °C, baixando o ponto de congelação e mantendo os flúidos em estado líquido (STOSS *et al*, 1978). Segundo Viveiros (2005), para congelação do sêmen de peixes, os crioprotetores que oferecem os melhores resultados de conservação são o glicerol, o DMSO, a dimetilacetamida (DMA), o metilglicol e o metanol.

2.3.2 Diluentes de origem vegetal

A diluição é o fator determinante na caracterização da motilidade espermática, sendo a concentração e o volume do diluente os principais desencadeadores da ativação do sêmen (MARQUES, 2001); entretanto, para obter a

motilidade simultânea de aproximadamente, 100% dos espermatozoides é necessária uma diluição relativamente alta (1:1000), pois em baixas diluições poucos espermatozoides são ativados (BILLARD & COSSON, 1992).

Para a congelação do sêmen há necessidade de adição de agentes crioprotetores e diluentes, sendo esses últimos, soluções de sais ou carboidratos, que adicionados ao sêmen, mantêm a viabilidade espermática durante a redução da temperatura. A composição do diluente é um dos fatores que afetam à proporção de espermatozoides vivos após a congelação-descongelação (WATSON, 2000).

Extratos vegetais ainda são pouco utilizados como base para diluentes de criopreservação do sêmen de peixes (CARVALHO *et al*, 2002; VIVEIROS *et al*, 2009a), dentre estes destaca-se o ACP[®]-104, que é um diluente desenvolvido com a finalidade de padronizar e estabilizar o da água de coco na forma em pó, não perdendo suas características físico-químicas. Este diluente pode representar uma alternativa para a difusão de várias biotecnologias (NUNES *et al*, 2006).

A técnica de diluição do sêmen de peixes para fertilização artificial ou conservação dos espermatozoides vem apresentando resultados favoráveis, propiciando ao sêmen de peixes maior vitalidade e tempo de conservação melhorando, conseqüentemente, aspectos da fecundação, contribuindo positivamente para a diversificação dos estoques nativos bem com em cativeiro (FARIAS *et al*, 1999).

2.3.3 Resfrieração seminal

A resfrieração seminal figura como importante ferramenta na solução de problemas em unidades de reprodução de peixes, a saber: facilidade de manejo, pois dispensa a presença do macho no momento da fertilização, como também promove a troca de material genético entre fazendas produtoras de pescado auxiliando nos programas de preservação de espécies ameaçadas de extinção (ISAÚ, 2006).

O resfrieração mantém a viabilidade espermática, reduz a atividade metabólica e a ativação espontânea por um breve período de tempo, enquanto que a congelação permite este armazenamento por tempo indefinido (BILLARD *et al*, 2004).

A técnica de refrigeração é conhecida por sua extrema facilidade sendo um método menos estressante que prolonga a viabilidade dos espermatozoides em temperaturas ao redor de 4 °C (DILAURO *et al*, 1994) por horas ou dias. Esta importante técnica pode ser utilizada na reprodução de peixes, porém existem poucos trabalhos que utilizam a refrigeração como método de conservação seminal em espécies nativas, isto devido, principalmente, ao curto período de armazenamento, apesar dessa metodologia apresentar resultados bastante promissores (MARIA, 2005).

Os possíveis fatores que determinam o sucesso do resfriamento de sêmen são: a diminuição da temperatura, a troca de gases com o meio e a redução do desenvolvimento bacteriano (STOSS *et al*, 1978). Desta forma, a refrigeração do sêmen é possível, observando-se apenas cuidados relativos à contaminação microbiana, pois, estas diminuem a motilidade e a viabilidade espermática (Rurangwa *et al*, 2004). Outro fator que pode ser associado à diminuição da viabilidade espermática é a taxa de diluição, o diluente utilizado e o meio rico ou não de oxigênio, porém os resultados variam de espécie para espécie (SANCHES & CERQUEIRA, 2011).

Durante a refrigeração seminal o diluente irá minimizar a concorrência dos espermatozoides por espaço (com redução da densidade) ajudando a controlar o crescimento bacteriano e reduzindo assim as taxas metabólicas das células espermáticas (CAROSFELD; HARVEY, 1999). O diluente utilizado deverá, ainda, possuir a capacidade de estabilizar a osmolaridade, mantendo assim as células espermáticas imóveis e ainda fornecendo energia para os espermatozoides (MARIA *et al*, 2004).

Normalmente, no processo de refrigeração seminal não há adição de crioprotetor. Trabalhos que avaliaram o efeito de alguns crioprotetores na motilidade espermática, durante o tempo de refrigeração, não encontraram vantagens no acréscimo de um crioprotetor interno para a preservação do sêmen a 4 °C (MARIA, 2005). Porém, outros autores (MURGAS *et al*, 2002) observaram aumento na viabilidade espermática por um período de dias mais prolongados, quando ocorreu a adição de crioprotetores ao diluente.

2.4. Análise da motilidade espermática

Um sêmen de boa qualidade deve apresentar-se imóvel após a coleta sem uso de solução ativadora e apresentar motilidade individual >80% quando diluído em solução ativadora e observado subjetivamente ao microscópio ótico. Em geral, estes parâmetros juntamente com a duração da motilidade são adotados para a seleção prévia das amostras a serem utilizadas nos experimentos de fertilização artificial e criopreservação. O fato do sêmen apresentar-se imóvel durante a coleta sem ativação é um fenômeno fisiológico natural relacionado aos teleósteos de fertilização externa (BILLARD, 1995).

Nos peixes que habitam águas doces a ativação só ocorre após liberação dos espermatozoides na água ou em meio hipoosmótico, enquanto nos peixes marinhos a ativação ocorre em solução hipertônica acima da osmolaridade do plasma seminal (BILLARD & COSSON, 1992).

Em geral a duração da motilidade não ultrapassa os dois minutos na maioria das espécies. A técnica de análise seminal é baseada numa escala subjetiva da motilidade que varia de zero a 100%, observada através de microscópio ótico entre lâmina e lamínula (FRIBOURG, 1966). Desta forma, os parâmetros de motilidade estão susceptíveis ao erro humano (LLEÓ, 2003), devido a fatores como a experiência dos técnicos (HIDALGO *et al*, 2005) e às diferenças na implementação de padrões para a avaliação tal como o tipo de ativador e a taxa de diluição utilizada. Todavia, a técnica de análise convencional ainda é utilizada pela maioria dos laboratórios, embora haja consciência de que devido à elevada subjetividade, pode apresentar resultados diferentes para uma mesma amostra entre laboratórios e entre observadores.

2.5. Análise do sêmen auxiliada pelo computador (CASA)

Ao se constatar a ampla variedade das avaliações manuais nos parâmetros seminais dos espermatozoides, pesquisadores se empenharam na investigação de formas de automatização do processo de análise espermática mediante sistemas computadorizados (LLEÓ, 2003).

Os espermatozoides de peixes apresentam subpopulações de espermatozoides móveis com diferentes velocidades que são classificados objetivamente como rápidos, médios, lentos e estáticos baseado na qualidade da velocidade (CABRITA *et al*, 2001; MARTÍNEZ *et al*, 2008). Contudo, subjetivamente, o olho humano é incapaz de identificar e mensurar estas diferenças ao microscópio ótico.

A análise do sêmen auxiliada pelo computador (CASA) foi realizada pela primeira vez por Dott e Foster (1979) onde foi utilizada em centros andrológicos humanos e veterinários para avaliar a qualidade espermática antes da inseminação artificial e correlacionar morfologia, motilidade e fertilidade.

A análise baseia-se na digitalização da trajetória das cabeças dos espermatozoides e onde a velocidade curvilinear (VCL) é uma projeção bidimensional da trajetória do espermatozoide, sendo esta velocidade medida pela distância percorrida pelo espermatozoide ao longo de um caminho circular e é calculada pela soma das distâncias ao longo da trajetória e dividida pelo tempo que levou para a célula espermática percorrer este percurso.

A velocidade linear progressiva (VSL) é a trajetória percorrida pelo espermatozoide entre o ponto inicial e o ponto final do percurso, dividido pelo tempo em que o mesmo levou para sair de um ponto ao outro em linha reta.

A velocidade média do percurso (VAP) é a velocidade média percorrida pelos espermatozoides entre dois pontos.

Contudo, nem todos os laboratórios dispõem de recursos financeiros suficientes para implementação da análise objetiva computadorizada da motilidade espermática conhecida como CASA.

2.6. Análise morfológica dos espermatozoides

Técnicas convencionais de avaliação têm sido utilizadas para avaliação subjetiva dos parâmetros seminais como a motilidade, morfologia, volume e concentração do sêmen (VERSTEGEN *et al*, 2002). Há muitos anos a morfologia

espermática tem sido avaliada de forma subjetiva utilizando a observação visual ao microscópio, o que deu origem a variações entre os resultados obtidos por diferentes técnicos e laboratórios (OMBELET *et al*, 1997).

Estudos anteriores têm descrito a ultraestrutura de espermatozoides de peixes e examinado sua morfologia através da microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão (TADDEI *et al*, 2001). Embora a microscopia eletrônica seja uma ferramenta para avaliação das estruturas morfológicas por fornecer informações detalhadas, seu uso não é prático, pois não permite uma rápida avaliação de um grande número de espermatozoides. Além disso, a microscopia eletrônica requer reagentes e equipamentos mais caros e um maior tempo é necessário para realização das análises (MARCO-JIMÉNEZ *et al*, 2008).

Assim, a busca por métodos que tenham acurácia, objetividade e repetibilidade na avaliação da fertilidade espermática continua sendo o objetivo de diversos estudos. A introdução do sistema de análise da morfometria espermática assistida por computador (ASMA) tentou superar o problema da subjetividade dos métodos de avaliação visual, pois é totalmente automatizado. Essa técnica de análise tem facilitado à padronização da avaliação da morfologia seminal (MARCO-JIMÉNEZ *et al*, 2006a).

A avaliação das dimensões e conformação geral dos espermatozoides se faz necessária, pois, já foi demonstrado que uma pobre morfologia seminal é um indicador importante da diminuição da fertilidade em caprinos (CHANDLER *et al*, 1988), equinos (VOSS *et al*, 1981), bovinos (SEKONI & GUSTAFSSON, 1987) e humanos (KRUGER *et al*, 1988) e ainda em peixes por Vieira (2010) e Linhares (2012).

A análise da morfometria espermática assistida por computador foi desenvolvida inicialmente para avaliação do sêmen humano (DE MONSERRAT *et al*, 1995) e tem sido progressivamente adaptada a outras espécies mamíferas (GRAVANCE *et al*, 1996) demonstrando níveis altos de precisão e confiança (VERTEGEN *et al*, 2002).

Em peixes, o ASMA tem sido utilizado para descrever mudanças na forma dos espermatozoides da enguia europeia causada pela indução hormonal da espermição

(ASTURIANO *et al*, 2006) e observados efeitos da taxa de diluição, crioprotetores utilizados e suplementação do meio de criopreservação (MARCO-JIMÉNEZ *et al*, 2006b), uma vez que crioprotetores e protocolos de criopreservação são conhecidos por causar danos a morfologia dos espermatozoides (BILLARD, 1983).

3. JUSTIFICATIVAS

A curimatã comum, *Prochilodus brevis* é uma espécie muito apreciada e ocorre nos estados do Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte. As agressões sofridas pelo ambiente, as alterações climáticas, demanda sazonal de óvulos e a pesca predatória vem afetando diretamente o equilíbrio populacional dessa espécie.

Dentre as estratégias de recuperação das espécies, a preservação do sêmen de peixes utilizando diluentes sob baixas temperaturas poderá contribuir para a recuperação das populações naturais de curimatã.

Assim, desenvolver protocolos de criopreservação adequados a espécie poderá representar uma excelente alternativa para a conservação do sêmen de *Prochilodus brevis*.

Neste contexto, o extrato liofilizado de palma forrageira (*Opuntia ficus indica*), e a água de coco em pó (ACP-104), por sua riqueza em água e sais minerais e baixo custo poderão ser potenciais ferramentas na conservação de materiais genéticos de alto padrão, podendo também ser utilizado na formação de um banco de germoplasma com o sêmen de curimatã comum *P. brevis*.

4. HIPÓTESE CIENTÍFICA

São eficientes o extrato liofilizado da palma forrageira gigante (*Opuntia ficus indica*) e a água de coco em pó (ACP-104) como diluentes para a congelação do sêmen de curimatã comum (*Prochilodus brevis*) mantendo as qualidades seminais semelhantes ao sêmen fresco, podendo se constituir em uma alternativa tecnológica para a constituição de um banco de germoplasma para a Região Nordeste.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da criopreservação do sêmen de curimatã comum (*P.brevis*), utilizando como diluentes o extrato de palma forrageira (*O. ficus*) liofilizado (EPFL) e adicionado do meio de conservação de sêmen de peixes água de coco em pó (ACP[®]-104).

5.2. Objetivos específicos

5.2.1 Reunir informações sobre as Biotécnicas utilizadas.

5.2.2 Avaliar os diluentes Extrato Liofilizado de Palma Forrageira (ELPF), nas concentrações 30 e 50%, comparando aos diluentes Água de Coco em Pó (ACP-104) e Glicose 5 %, utilizando o sêmen de curimatã comum (*P. brevis*).

5.2.3 Avaliar os parâmetros cinéticos do sêmen de curimatã, através de análise computadorizada da motilidade espermática (CASA), após descongelação a 60 °C por 8 segundos e ativação com NaCl 100 mOsm.

5.2.4 Testar o diluente à base de água de coco em pó (ACP) em combinação com o ELPF para geração de patente biológica.

6. CAPITULO 1

Biotécnicas da reprodução de peixes aplicadas à conservação do sêmen de

Prochilodus sp.

Reproductive biotechnologies of fish applied to semen conservation of *Prochilodus*

sp.

CAJADO, Francisco José Lopes^{1*}; MORAES-FILHO, Manoel Odorico de¹;
ALMEIDA, Priscila Silva²; CARREIRO, Carlos Ridel Porto³; LEITE, Jordana
Sampaio²; CARVALHO, Maria Audália Marques de ²; SALMITO-VANDERLEY,
Carmina Sandra Brito².

RESUMO

O objetivo geral deste trabalho foi reunir e discutir informações gerais e características referentes aos peixes pertencentes ao gênero *Prochilodus* e a utilização de biotécnicas aplicáveis a sua reprodução. A hipofixação é a principal biotécnica utilizada em peixes de piracema, pois facilita a fluidificação do sêmen e conseqüentemente os trabalhos de fertilização *in vitro*, para que haja uma maior produtividade de alevinos. Outras biotécnicas identificadas foram a conservação de gametas, que envolve a refrigeração de sêmen de peixes a temperatura entre 3 a 5° C, técnica que tem por objetivo prolongar o tempo de vida dos espermatozoides para ser utilizado em poucos dias; e a congelamento de espermatozoides em temperaturas de -196 °C, que pode ser utilizado após longos períodos. Em ambas as técnicas de congelamento quanto à refrigeração há a necessidade da utilização de diluentes de sêmen e de crioprotetores, que são soluções que mantêm a viabilidade espermática durante o tempo e a redução da temperatura, oferecendo melhores resultados para a conservação de sêmen de peixes. Outras técnicas comumente utilizadas e também abordadas neste estudo foram análise morfológica dos espermatozoides, usada para verificar possíveis danos às células espermáticas e a análise computadorizada do sêmen de peixes que visa facilitar a padronização da avaliação da morfologia seminal.

Palavras chaves: Biotécnicas, sêmen, *Prochilodus sp.*

ABSTRACT

The aim of this study was to gather and discuss general information and features related to fish belonging to the genus *Prochilodus* and the use of biotechnology applicable to their reproduction. The hypophysation is the main biotechnologies used in fish spawning because it facilitates the thinning of semen and therefore the work of IVF. So, there is a greater productivity of fries. Other biotechnical identified were the maintenance of gametes, which involves chilling fish roes temperature 3 to 5 °C, a technique which aims to prolong the lifetime of sperm to be used within a few days; and freezing of sperm at temperatures of -196 °C, which can be used after long periods. In both freezing techniques as there is a need for cooling used of semen diluents and cryoprotectants that are solutions that maintain sperm viability over time, and reducing the temperature, providing the best results for the preservation of fish sperm. Other commonly used and also addressed in this study were technical morphological analysis of sperm, used to verify possible sperm cells damages and computer analysis of fish's semen, to make possible the standardization of assessment of seminal morphology.

Key words: Biotechnologies, sperm, *Prochilodus sp.*

INTRODUÇÃO

As biotecnologias aplicadas à reprodução de peixes, descritas nessa revisão, reúnem um conjunto de técnicas que têm contribuído significativamente para a pesquisa e produção piscícola fornecendo subsídios para a conservação de espécies e melhoramento genético. Dentre as espécies de peixes nativos continentais com potencial para o cultivo, destacam-se as do gênero *Prochilodus* (conhecidos em todo Brasil como curimatã, curimbatá, curimba), estando seus representantes entre as espécies mais importantes da pesca continental nos rios sul-americanos (LIZAMA & AMBRÓSIO, 2002).

Espécies de peixes do gênero *Prochilodus* estão presentes nas bacias hidrográficas do leste, sudeste, sul e, sobretudo, no nordeste do Brasil. Existem também espécies nas bacias de rios como o Amazonas e em outros localizados nas Guianas, Colômbia, Venezuela, Paraguai e nordeste da Argentina (FROESE & PAULY, 2011).

As biotecnologias da conservação de gametas, notadamente de sêmen, consistem nas técnicas de refrigeração e congelamento. Estas técnicas são amplamente utilizadas com o auxílio de soluções diluentes (SALMITO-VANDERLEY *et al*, 2012), que proporcionam um melhor aproveitamento do sêmen e de soluções crioprotetoras, que são capazes de manter os gametas congelados por longos períodos, proporcionando assim sua utilização em diferentes épocas do ano ou ainda em fertilizações programadas em regiões distintas (VIVEIROS *et al*, 2010).

A análise da morfologia e a análise computadorizada dos espermatozoides de peixes são Biotécnicas de avaliação seminal comumente realizadas com o objetivo de verificar a qualidade dos gametas, pois a viabilidade dos espermatozoides diminui em razão das possíveis injúrias sofridas durante os procedimentos de refrigeração,

congelamento, adição de diluentes ou crioprotetores. Tais danos podem causar defeitos morfológicos na cabeça dos espermatozoides ou defeitos em peça intermediária e flagelo (STREIT JR *et al*, 2007).

A análise computadorizada do sêmen pode ser utilizada para verificar diversos parâmetros espermáticos, incluindo o percentual de espermatozoides móveis totais, sua velocidade em termos rápidos, médios, lentos, média do percurso ou curvilíneo, além da frequência de batimento cruzado e amplitude do deslocamento lateral de sua cabeça (AMANN & KATZ, 2004).

O objetivo geral deste trabalho foi reunir e discutir informações referentes às técnicas de reprodução de peixes aplicáveis ao gênero *Prochilodus*, a saber: utilização de extratos hipofisários para maturação de gametas; hipofiseção; refrigeração e congelamento de sêmen utilizando soluções diluentes e crioprotetores e análise computadorizada de sêmen.

DESENVOLVIMENTO

A propagação artificial de peixes requer o uso de biotécnicas reprodutivas, entre as se destacam a indução hormonal da reprodução e a criopreservação seminal e a avaliação da qualidade gamética.

A indução hormonal é uma técnica de reprodução a qual utiliza a aplicação de hormônios reprodutivos em peixes de importância econômica, favorecendo assim a maturação das células gaméticas, com influência direta na fluidificação e liberação de sêmen nos machos (MURGAS *et al*, 2007; VIEIRA *et al*, 2010). Determinados espécimes necessitam ainda de condições particulares para o desenvolvimento de características sexuais secundárias importantes para a reprodução, tais como: enchentes, correntezas, fatores climáticos e tipos variados de substratos para desova (MARTE, 1990).

Algumas espécies de peixes reofílicos, dos quais os *Prochilodus* fazem parte, reúnem características de interesse econômico para a aquicultura, porém não possuem a habilidade de reprodução em condições de cativeiro. Por este fato, a biotecnologia da propagação artificial, por meio de doses injetáveis de extrato hipofisário nas regiões intramusculares ou na cavidade celomática torna-se uma ferramenta essencial para obtenção de sêmen e desovas (ZANIBONI FILHO & WEINGARTNER, 2007).

Dentre as espécies de peixes nativos utilizados com a reprodução induzida, podemos citar a curimba (*P. lineatus*), que oferece grandes vantagens à piscicultura devido à rusticidade e à elevada taxa de crescimento (MURGAS *et al*, 2007).

O procedimento de indução hormonal inicia-se com a captura dos reprodutores, seguida da identificação de machos e fêmeas, pesagem e preparo do extrato hipofisário com cálculo da dose total de hormônio a ser aplicada. A técnica de hipofiseção além de

induzir e facilitar a coleta dos gametas dos peixes é preconizada para programas de melhoramento genético ou de fertilização *in vitro* WOYNAROVICH, (1986).

A refrigeração seminal é uma biotécnica que consiste na manutenção de sêmen refrigerado em temperaturas entre 3 a 5 °C com o tempo de refrigeração variando entre poucas horas até vários dias, sendo ainda considerada a melhor técnica armazenamento a fresco não havendo mudanças significantes na qualidade (RAVINDER *et al*, 1997). Já a biotécnica de congelamento consiste na preservação dos gametas em temperaturas inferiores as da refrigeração (BALDISSEROTTO, 2002). Embora atualmente as tecnologias de refrigeração e congelamento do sêmen sejam bastante difundidas em mamíferos e aves, os trabalhos com sêmen de peixes ainda são reduzidos, em razão, provavelmente, do grande número de espécies e do recente crescimento das atividades de aquicultura.

Na refrigeração seminal, é preconizado o uso de solução diluente, pois a diluição diminui a competição dos espermatozoides por oxigênio (O₂) e espaço físico (MARQUES & GODINHO, 2004), ajudando no controle do crescimento bacteriano e reduzindo a taxa metabólica das células espermáticas (CAROSFELD & HARVEY, 1999). Para o sucesso do diluente utilizado, é importante que o mesmo estabilize a osmolaridade do meio e que mantenha as células espermáticas imóveis, viáveis e ainda forneça energia para os espermatozoides (MARIA *et al*, 2004; LEITE *et al*, 2011).

MARQUES & GODINHO (2004) relatam que a preservação do sêmen em curto prazo, como na refrigeração de gametas, tem-se mostrado um método menos estressante para prolongar a viabilidade dos espermatozoides. Sendo este mais eficiente do que manter os peixes capturados em tanques de manutenção, garantindo assim, aplicações para propagações artificiais de estoques de descendentes naturais.

Os diluentes são substâncias que além de aumentar do volume total do sêmen, facilitam a sua divisão em doses inseminantes proporcionando um meio favorável à sobrevivência dos espermatozoides *in vitro* e tornando inviável a sua congelação *in natura* devido aos danos causados nos espermatozoides (PICKETT *et al*, 1987). A diferença existente entre os diluentes está na sua composição e esta depende das características seminais de cada espécie animal e da tecnologia seminal empregada (MARIA *et al*, 2006a). A solução de glicose é um diluente simples, comumente utilizado na conservação das células espermática nas espécies Characiformes (VIVEIROS & GODINHO, 2009a).

Diluentes desenvolvidos para sêmen de mamíferos têm sido utilizados com sucesso para preservar sêmen de peixes, como exemplo o BTS (*Beltsville Thawing Solution*®) (MURGAS *et al*, 2002) e o ACP®-104 para criopreservação de sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*) adicionado de gema de ovo (LEITE *et al*, 2011). Miliorini *et al*, (2004), observaram que o diluente BTS foi eficiente para o sêmen de curimba (*P. lineatus*), mantendo a boa qualidade do mesmo. Franciscatto *et al* (2002), obtiveram após 168 h de refrigeração de espermatozoides móveis em curimba (*P. lineatus*) quando a solução de BTS estava associado ao Iodeto de Potássio.

Nessa técnica de preservação de sêmen, o uso de gelo, uma prática antiga, tem-se demonstrado ser eficiente (BARRET, 1951; BILLARD & LEGENDRE, 1982; KAVAMOTO *et al*, 1987) e em alguns casos, os crioprotetores DMSO e etilenoglicol, são adicionados para auxiliar na preservação dos gametas em temperaturas levemente abaixo de 0 °C, baixando o ponto de congelação e mantendo os fluídos em estado líquido (STOSS *et al*, 1978). Entretanto, normalmente, no processo de refrigeração seminal não há adição de crioprotetores. De fato, MARIA, (2006b), não encontrou vantagens no acréscimo de um crioprotetor interno para a preservação do sêmen a 4 °C.

No entanto, para a congelação do sêmen há necessidade de adição de agentes crioprotetores e diluentes, sendo esses últimos, soluções de sais ou carboidratos, que adicionados ao sêmen, mantêm a viabilidade espermática durante a redução da temperatura e os crioprotetores que oferecem melhores resultados para a conservação seminal de peixes são, segundo VIVEIROS *et al*, (2011), glicerol, DMSO, dimetilacetamida (DMA), metilglicol e metanol.

A congelação de sêmen é uma boa alternativa para a melhoria da reprodução de peixes em cativeiro, tendo em vista que seus benefícios são variados, dentre eles: sincronização na disponibilidade de sêmen; facilidade no transporte e prevenção contra envelhecimento dos gametas. Além disso, esta técnica conserva a variabilidade genética e elimina os custos com a manutenção (alimentação e estocagem) dos reprodutores machos (SUQUET *et al*, 2000). Porém, Watson *et al*, (2000) salientaram que a composição do diluente é um dos fatores que afeta a proporção de espermatozoides vivos após a congelação/descongelação.

A etapa de congelação é iniciada com a adição do criodiluyente ao sêmen, em seguida o envasamento em palhetas ou criotubos e a submissão à diminuição de temperatura, que pode ser realizada por diferentes métodos, até serem finalmente mergulhados e armazenado em nitrogênio líquido. Esta visão geral, desde a coleta até a congelação propriamente dita, do protocolo de criopreservação de sêmen de peixe é uma reunião dos mais diversos protocolos comumente utilizados, mas a comparação entre eles é muito difícil devido à diversidade de parâmetros envolvidos (CABRITA *et al*, 2010; VIVEIROS *et al*, 2005).

Muitos fatores podem influenciar uma criopreservação bem sucedida, tais como: a composição do diluente; a concentração de células ou taxa de diluição; a composição do agente crioprotetor e sua concentração no meio; o tempo e temperatura de equilíbrio; a

natureza da curva de refrigeração; a natureza da curva de descongelação e a composição do meio de descongelação específico (MURGAS *et al*, 2007).

Tanto para a refrigeração quanto para congelação seminal, como condição mínima requerida para um diluente deve incluir a isotonicidade, evitando, uma ativação prévia da motilidade dos espermatozoides; a estabilidade, para que suas características físico-químicas não sejam alteradas com o contato com o sêmen; a condutividade térmica elevada, permitindo que a temperatura do meio seja transmitida de forma rápida para o espermatozoide; a esterilidade, onde o meio não deve conter microrganismos nocivos às células espermáticas e ser ainda carreador de crioprotetores para o processo de congelação (LEGENDRE & BILLARD, 1980).

Moraes *et al*, (2004) relataram a importância da adição de crioprotetores internos, facilitando assim a visualização dos efeitos tóxicos do crioprotetor por um período mais longo permitindo com isso a manipulação do sêmen.

Murgas *et al*, (2007), trabalhando com criopreservação de sêmen de *P. lineatus*, preconizaram o uso de diluente BTS na concentração de 4,5% e que o mesmo deve ser enriquecido com crioprotetores intracelulares como o metanol ou DMSO em concentrações finais de 10%.

O sucesso das biotécnicas de criopreservação seminal, seja na refrigeração ou congelação, depende da qualidade inicial do sêmen, portanto para a avaliação e uso dos protocolos faz-se necessário a utilização de técnicas de avaliação seminal. As mais convencionais que têm sido utilizadas são a avaliação subjetiva da motilidade espermática, da morfologia, do volume e da concentração do sêmen (VERSTEGEN *et al*, 2002). Há muitos anos a morfologia espermática tem sido avaliada de forma subjetiva utilizando a observação visual ao microscópio, o que deu origem a variações entre os resultados obtidos por diferentes técnicos e laboratórios (OMBELET *et al*,

1997). Segundo Murgas *et al*, (2007), a curimba *Prochilodus lineatus* produz um volume de sêmen de 0,8 a 3,8 ml. Conforme Silva *et al*, (2009) a duração média da motilidade do sêmen *in natura* de *P. lineatus* não apresentou diferença significativa ($p>0,05$) entre os anos e períodos estudados, com variação de 51 a 61 segundos.

Estudos anteriores descreveram a ultraestrutura de espermatozoides de peixes e examinado sua morfologia através da microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão (TADDEI *et al*, 2001). Embora a microscopia eletrônica seja uma ferramenta para avaliação das estruturas morfológicas por fornecer informações detalhadas, seu uso não é prático, pois não permite uma rápida avaliação de um grande número de espermatozoides. Além disso, a microscopia eletrônica requer reagentes e equipamentos mais caros e um maior tempo é necessário para realização das análises (MARCO-JIMÉNEZ *et al*, 2008). Assim, a busca por métodos que tenham acurácia, objetividade e repetibilidade na avaliação da fertilidade espermática continua sendo o objetivo de diversos estudos.

A avaliação das dimensões e conformação geral dos espermatozoides se faz necessária, pois, já foi demonstrado que uma pobre morfologia seminal é um indicador importante da diminuição da fertilidade em caprinos (CHANDLER *et al*, 1988), equinos (VOSS *et al*, 1981), bovinos (SEKONI & GUSTAFSSON, 1987) e humanos (KRUGER *et al*, 1988) e em peixes (LEITE *et al*, 2011).

A técnica de análise seminal convencional é imprecisa, devido à subjetividade da avaliação, que é baseada na observação através de microscópio óptico. Desta forma, os parâmetros de motilidade e morfologia estão susceptíveis ao erro humano e sua imprecisão nos resultados deve-se a fatores como: utilização de diferentes métodos de coloração e experiência dos técnicos (HIDALGO *et al*, 2005).

Todavia, a técnica de análise convencional tem sido utilizada pela maioria dos laboratórios, embora haja consciência de que devido à elevada subjetividade, pode apresentar resultados diferentes para uma mesma amostra entre laboratórios e até mesmo entre observadores. Assim, ao se constatar a ampla variedade das avaliações manuais nos parâmetros seminais dos espermatozoides, pesquisadores se empenharam na investigação de formas de automatização do processo de análise espermática mediante sistemas computadorizados.

A análise do sêmen auxiliada pelo computador ou *Computer Assisted Sperm Analyser* (CASA) foi realizada pela primeira vez por DOTT & FOSTER (1979) onde foi utilizada em centros andrológicos humanos e veterinários para avaliar a qualidade espermática antes da inseminação artificial e correlacionar morfologia, motilidade e fertilidade.

A introdução do sistema de análise da morfometria espermática assistida por computador (ASMA) tentou superar o problema da subjetividade dos métodos de avaliação visual, pois é totalmente automatizado. Essa técnica de análise tem facilitado à padronização da avaliação da morfologia seminal (MARCO-JIMÉNEZ *et al*, 2006a).

A análise da morfometria espermática assistida por computador foi desenvolvida inicialmente para avaliação do sêmen humano (DE MONSERRAT *et al*, 1995) e tem sido progressivamente adaptada a outras espécies mamíferas (GRAVANCE *et al*, 1996) demonstrando níveis altos de precisão e confiança (VERSTEGEN *et al*, 2002).

Em peixes, o ASMA tem sido utilizado para descrever mudanças na forma dos espermatozoides da enguia europeia causada pela indução hormonal da espermição (ASTURIANO *et al*, 2006) e observados efeitos da taxa de diluição, crioprotetores utilizados e suplementação do meio de criopreservação (MARCO-JIMÉNEZ *et al*,

2006b), uma vez que crioprotetores e protocolos de criopreservação são conhecidos por causar danos a morfologia dos espermatozoides (BILLARD, 1983).

CONCLUSÕES

As biotécnicas da reprodução aplicadas a conservação do sêmen de *Prochilodus sp* são de fundamental importância para a realização de pesquisas que visem auxiliar na reprodução de peixes reofílicos e conservação de gametas, contribuindo assim para o incremento da produtividade em pisciculturas públicas e privadas brasileiras e auxiliando nos programas de melhoramento genético.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMANN R, KATZ DF. Reflections on CASA after 25 years. *J Androl*, v.25, p.317-325, 2004.

BAGENAL, T.B. 1971. The interrelation of the size of fish eggs, the date of spawning and the production cycle. *J. Fish Biol.* 3:207-219.

BALDISSEROTTO, B. *Fisiologia dos Peixes Aplicada à Piscicultura*. Santa Maria: Editora da UFSM, 2002. 212p.

BILLARD, R. Ultrastructure of trout spermatozoa: changes after dilution and deep-freezing. *Cell Tissue Res.* v. 228, p.205-218, 1983.

CABRITA, E.; SARASQUETE C.; MARTINEZ-PARAMO S.; ROBLES V.; BEIRAO J.; PEREZ-CEREZALES S.; HERRAEZ MP. Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. *J. Appl. Ichthyol*, v. 26, p. 623–635, 2010.

CAROLSFEL, D. J.; HARVEY, B. *Conservação de recursos genéticos de peixes: teoria e prática*. Tradução de H. P. Godinho. Victoria, Canadá: World FisheriesTrust. Curso de treinamento brasileiro. 47 p, 1999.

CHANDLER, J.E.; PAINTER, C.L.; ADKINSON, R.W.; MEMON, M.A.; HOYT, P.G. Semen quality characteristics of dairy goats. *J Dairy Sci*, p. 46, 1988.

DE MONSERRAT, J.J.; PÉREZ-SÁNCHEZ, F.; TABLADO, L.; SOLER, C. The Sperm-Class Analyzer1: a new automated system for human sperm morphometry and classification. *Contracept Fertil Sex*, 1995.

DOTT, H. M. & FOSTER, G. C. The estimation of sperm motility in semen, on membrane slide, by measuring the area change frequency with an image analyzing computer. *Journal Reproduction Fertility.* v. 55, p.161-166.1979.

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

GRAVANCE, C.G; VISHWANATH, R.; PITT, C.; CASEY, P.J. Computer automated morphometric analysis of bull sperm heads. *Theriogenology*, v.46, p.1205–15, 1996.

HIDALGO, M.; RODRIGUEZ, J.; SANZ, J.; SOLER, C. Effect of sample size and staining methods on stallion sperm morphometry by the Sperm Class Analyzer. *Veterinary Medicine*, v.50, n.1, p.24-32. 2005.

KRUGER, T.F.; ACOSTA, A.; SIMMONN, K.F.; SWANSON, R.J.; MATTA, J.F.; OEHNINGER, S. Predictive value of abnormal sperm morphology in vitro fertilization. *Fertil Steril*, v.49, p.112–7, 1988.

LEGENDRE, M.; BILLARD, R. Cryopreservation of rainbow trout sperm by deep-freezing. *Reprod. Nut. Dev.*, v.20, n.6, p.1859-1868, 1980.

LEITE, L.V.; OLIVEIRA, F.C.E.; NUNES, L.T.; NUNES, J.F.; SALMITO-VANDERLEY, C.S.B. Criopreservação de sêmen de tambaqui com ACP® adicionado de gema de ovo. *Revista Brasileira de Engenharia de Pesca* 6(2): 23:29, 2011.

LIZAMA, M.A.P.; AMBÓSIO, A.M. Conduction factor in nine species of fish of Characidae Family in the upper Paraná river flood plain, Brazil. *Revista brasileira de biologia*, v.62, n. 1, 113-124. 2002.

MARCO-JIMÉNEZ, F.; PÉREZ, L.; VIUDES-DE-CASTRO, M.P.; GARZÓN, D.L.; PEÑARANDA, D.S.; VICENTE, J.S.; JOVER, M.; ASTURIANO, J.F. Morphometry characterisation of European eel spermatozoa with computer-assisted spermatozoa analysis and scanning electron microscopy. *Theriogenology*, v 65, p. 1302-1310, 2006a.

MARCO-JIMÉNEZ, F.; VIUDES-DE-CASTRO, M.P.; BALASCH, S.; MOCÉ E.; SILVESTRE, M.A.; GOMEZ, E.A.; VICENTE, J.S. Morphometric changes in goat sperm heads induced by cryopreservation. *Cryobiology*, v. 52, p. 295–304, 2006b.

MARIA, A. N., MURGAS L. D. S., SILVA, M. O. B., MILIORINI, A. B., FRANCISCATTO, R. T., LOGATO, P. V. R. Influência da adição de iodeto de potássio e citrato de sódio na qualidade do sêmen de Pacu (*Piaractus mesopotamicus* – Holmberg, 1887). *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 28, n. 1, p. 191-194, 2004.

MARIA, A. N.; VIVEIROS, A. T. M.; FREITAS, R. T. F.; OLIVEIRA, A. V. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. *Aquaculture*, v. 260, p. 298–306, 2006a.

MARIA, A. N.; VIVEIROS, A. T. M.; ORFÃO, L. H.; OLIVEIRA, A. V.; MORAES, G. F. Effects of cooling and freezing on sperm motility of the endangered fish piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Characiformes, Characidae). *Animal Reproduction*, v. 3, n. 1, p. 55-60, 2006b.

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

MARTE, C.L. Hormone-induced spawning of cultured tropical finfishes. In:_____. *Advances in tropical aquaculture: 1989 Tahiti*. [Brest]: IFREMER, c1990. p. 519-539.

MORAES, G.; STREIT JR., D.; RIBEIRO, R.; SAKAGUTI, E.; SOUZA, E.; POVH, J. Ação de diferentes indutores reprodutivos hormonais no aparecimento de anormalidades morfológicas em espermatozoides de Piavuçu (*Leporinus Macrocephalus*), Curimatá (*Prochilodus Lineatus*) e Carpa Comum (*Cyprinus Carpio*). *Boletim do Instituto da Pesca*, v. 30, n. 2, p. 109 -116, 2004.

MURGAS, L.D.S.; MILIORINI, A.B.; FREITAS, R.T.F.; PEREIRA, G.J.M. Criopreservação de semen de curimba (*Prochilodus lineatus*) mediante adição de diferentes diluidores, ativadores e crioprotetores. *Rev. Bras. Zootec.*, v.36, n.3, p.526-531, 2007.

MURGAS, L. D. S.; MILIORINI, A. B.; SILVA, M. O. B.; FRANCISCATTO, R. T.; MARIA, A. N. Viabilidade seminal de piapara (*Leporinus obtusidens*), empregando-se diferentes diluentes, no resfriado do sêmen a 4 °C. *R. Bras. Reprod. Animal*. v.33, n.6, p.1361-1365, 2002.

OMBELET, W; POLLET, H.; BOSMANS, E; VEREECKEN, A. Results of a questionnaire on sperm morphology assessment. *Hum. Reprod.*, v.12, p.1015–1020, 1997.

PICKETT, B.W.; SQUIRES, E.L.; MACKINNON, A.O. Procedures for collection, evaluation and utilization of stallion semen for artificial insemination. Fort Collins, CO: Colorado State University, Animal Reproduction Laboratory. 1987.

RAVINDER, K.; NASARUDDIN, K.; MAJUNMDAR, K.C.; SHIVAJI, S. Computerized analysis of motility, motility patterns and motility parameters of spermatozoa of carp following short term storage of semen. *Journal of fish biology*, v.50, p. 1309-1328, 1997.

SALMITO-VANDERLEY, C.S.B.; Vieira, M.J.A.F.; LEITE, L.V.; OLIVERA, F.C.E.; LINHARES, F.R.A.; SALGUEIRO, C.C.M.; NUNES, J.F. Meios de congelação para conservação de sêmen de peixes da família characidae. *Ciência Animal*, 22(1): 255-268, 2012.

SEKONI, V.O.; GUSTAFSSON, B.K. Seasonal variations in the incidence of sperm morphological abnormalities in dairy bulls regularly used for artificial insemination. *Br Vet J.*, v.143, p.312–317, 1987.

SILVA, J. M. de A. MURGAS, L. D.S.; FELIZARDO, V. de O.; PEREIRA, G. J. M.; NAVARRO, R. D.; MELLO, R. de A. Características seminais e índices reprodutivos de curimba (*Prochilodus lineatus*) em diferentes períodos reprodutivos. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v.10, n.3, p 668-677 jul/set, 2009.

STACEY, N.E. 1984. Control of timing of ovulation by exogenous and endogenous factors. In *Fish reproduction: strategies and tactics* (Potts, G. W. & Wootton, R. J., ed.). Londres, v. 12, p. 207-222.

STREIT JÚNIOR, D.P.; MORAES, G.V.; RIBEIRO, R.P.; SAKAGUTI, E.S.; SOUZA, E. D.; POVH, J.A.; CAÇADOR, W. Comparação do sêmem de Curimbá (*Prochilodus lineatus*) induzido por extrato de hipófise de frango, coelho ou carpa. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* V.41, n.3, p147-153, 2004.

SUQUET, M.; DREANNO, C.; FAUVEL, C.; COSSON, J.; BILLARD, R. Cryopreservation of sperm in marine fish. *Aquaculture Research.*, n.31, p.231-243, 2000.

TADDEI, A.R.; BARBATO, F.; ABELLI, L.; CANESE, S.; MORETTI, F.; RANA, K. J.; FAUSTO, A.M.; MAZZINI, M. Is cryopreservation a homogeneous process? Ultrastructure and motility of untreated, prefreezing, and postthawed spermatozoa of *Diplodus puntazzo* (Cetti) *Cryobiology*, v.42, p.244–255, 2001.

VELÁSQUEZ-MEDINA, S. (2008). *Criopreservação do sêmen de pirapitinga, Piaratusbrachypomus (Pisces, Characidae)*. [Dissertação]. Fortaleza (CE): Universidade Federal do Ceará.

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

VIEIRA, M.J.A.F; CARVALHO, M.A.M; SALMITO-VANDERLEY, C.S.B; SALGUEIRO, C.C. de M; VIVEIROS, A.T.M; MOURA, A.A.A.N; NUNES, J.F. Características do sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*) em latitude equatorial. *Arch. Zootec.* 60 (232): 1263-1270. 2011.

VIVEIROS, A. T. M. Semen cryopreservation in catfish species, with particular emphasis on the African catfish. *Journal of Animal Breeding Abstracts*, v. 73, n. 3, p. 1-9, abr, 2005.

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. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 61, n. 4, p. 883-889, 2009a.

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

VIVEIROS, A. T. M; AMARAL, T. B; ORFÃO, L. H; ISAU, Z. A; DANILO CANEPPELE & MARCELO C LEAL. Sperm cryopreservation of tiete tetra *Brycon insignis* (Characiformes): effects of cryoprotectants, extenders, thawing temperatures and activating agents on motility features. *Aquaculture Research*, 2011, 42, 858-865.

VOSS, J.L; PICKET, B.W.; SQUIRES, E.L. Stallion spermatozoal morphology and motility and their relationship to fertility. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.178, p.287-9, 1981.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.*, v.60-61, p.481-92, 2000.

WOYNAROVICH, E. Tambaqui e pirapitinga, propagação artificial e criação de alevinos. CODEVASF, Brasília, 1986. 67p.

ZANIBONI FILHO, E.; WEINGARTNER, M. Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v. 31, n. 3, p. 367-373, jul./set. 2007.

7. CAPÍTULO 2

**Criopreservação do sêmen de curimatã comum (*Prochilodus brevis*) em água de
coco em
pó ACP[®]-104.**

**Cryopreservation of sperm of common curimatã (*Prochilodus brevis*) in coconut
water powder ACP[®] -104.**

CAJADO, Francisco José Lopes^{1*}; NUNES, Larissa Teixeira²; OLIVEIRA, Mayara
Setúbal²; SOUZA, Maria Eduarda Magalhães de²; CATUNDA, Ana Gláudia
Vasconcelos²; MORAES-FILHO, Manoel Odorico de¹; NUNES, José Ferreira²,
SALGUEIRO, Cristiane Clemente de Mello³, SALMITO-VANDERLEY, Carminda
Sandra Brito²;

RESUMO

O estudo teve por objetivo avaliar a eficiência do diluente água de coco em pó (ACP[®]-104), para a criopreservação do sêmen de curimatã comum (*Prochilodus brevis*), comparando seus resultados com o diluente glicose a 5%. O sêmen foi coletado e formado quatro *pools* a cada quatro amostras advindas de machos diferentes. Cada *pool* foi alíquotado, sendo as amostras diluídas nos dois diluentes e adicionados de DMSO a 10%, na proporção de 1:9 (sêmen:diluente). O sêmen foi envasado em palhetas de 0,5ml e mantido à temperatura de equilíbrio (22 °C) durante 10 minutos em raques de alumínio e congeladas imediatamente em vapores de nitrogênio, (-170 °C) em *Dry Shiper* (Taylor Wharton, USA). Após 24 horas as palhetas foram transferidas para botijão criogênico (-196 °C). A descongelação ocorreu após 20 dias de estocagem, em banho de imersão a 60 °C por 8 segundos. A análise estatística da motilidade espermática avaliada pelo sistema CASA após descongelamento revelou que o ACP[®]-104 apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao diluente glicose (76.80±2,54; 66.21±3,98, respectivamente). Em relação ao efeito dos diluentes sobre as anormalidades espermáticas não houve diferença significativa entre os tratamentos, sendo observado aproximadamente 2% de anormalidades espermáticas em ambos. Conclui-se que o ACP[®]-104 foi mais eficiente que a glicose na criopreservação seminal de *P. brevis*.

Palavras-Chave: ACP[®]-104, *Prochilodus brevis*, congelação de sêmen; diluidor.

ABSTRACT

The study aimed to evaluate the efficiency of water diluent powdered coconut ACP® -104 for sperm cryopreservation of common curimatã (*Prochilodus brevis*) and compare their results with the diluent 5% glucose. Semen was collected and formed four pool every four samples arising from different males. Each "pool" was aliquoted, and the samples were diluted two solutions in DMSO and added to 10% at a ratio of 1:9 (semen: diluent). The semen was packaged in 0.5 ml straws and kept at stable temperature (22 °C) for 10 minutes in aluminum racks and immediately frozen in nitrogen vapor (-170 °C) in Dry Shiper (Taylor Wharton, USA). After 24 hours, the straws were transferred to cryogenic cylinder (-196 °C). Thawing occurred after 20 days of storage in an immersion bath at 60 °C for 8 seconds. Statistical analysis of sperm motility assessed by CASA system after thawing revealed that the ACP® -104 showed a significant difference ($p < 0.05$) compared to the diluent glucose (76.80 ± 2.54 , 66.21 ± 3.98 , respectively). Regarding to effect of extenders on sperm abnormalities, there was no significant difference between treatments. It was observed approximately 2% of sperm abnormalities in both. In conclusion, ACP-104 was more effective than glucose to cryopreservation of *P. brevis* semen.

Key words: ACP® -104, *Prochilodus brevis*, semen freezing, extender.

INTRODUÇÃO

A curimatã comum, *Prochilodus brevis* (Steindachner, 1874), cujo nome científico anterior era (*P. cearensis*), é um peixe da família *Prochilodontidae*, endógeno dos Estados do Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte, que se destaca pelo alto potencial para aquicultura na região Nordeste do Brasil. Porém esta espécie tem sofrido agressões antrópicas ao seu habitat, como poluição das águas, pesca predatória e em especial a construção de barragens, que impedem a piracema e conseqüentemente afetam a reprodução, reduzindo o tamanho das populações naturais de *P. brevis* (ROSA et al, 2005).

Diante disto, uma alternativa importante a ser utilizada para refazer os estoques naturais e em cativeiro, assim como para direcionar a variabilidade genética, tem sido o uso do sêmen criopreservado, uma biotécnica bastante difundida em outras espécies ameaçadas de extinção ou de alta importância comercial (ÓRFÃO et al, 2010).

A diluição seminal é um dos passos para elaboração de protocolos de criopreservação e constitui um dos fatores que interferem diretamente no sucesso da criopreservação de sêmen de peixes, pois a composição do diluente afeta diretamente a qualidade do sêmen pós-descongelamento, porém esta etapa é fundamental para nutrir e proteger os espermatozoides dos danos contra o frio, melhorar a utilização dos reprodutores e aumentar o número de fêmeas que serão fertilizadas artificialmente (MANSOUR et al, 2006).

Uma das inovações mais recentes da biotecnologia do sêmen de peixe é a utilização de água de coco em pó modificada para sêmen de peixe (ACP-104) como meio diluente seminal (SALMITO-VANDERLEY et al, 2012). Este é um meio natural e estéril composto por sais, proteínas, açúcares, vitaminas, gorduras neutras, além de

indutores da divisão celular e diversos eletrólitos, podendo exercer uma ação benéfica sobre a conservação celular (NUNES E SALGUEIRO, 2006).

A água de coco em pó (ACP-104) adaptada para a criopreservação de sêmen de peixes já foi testado anteriormente com sucesso em várias espécies como *Brycon orbignyianus*, *Prochilodus lineatus*, *Leporinus obtusidens* (VIVEIROS *et al*, 2010), *Piaractus brachypomus* (VELÁSQUEZ-MEDINA, 2008) e *Colossoma macropomum* (LEITE *et al*, 2011). Portanto a ACP[®]-104 tornando-se mais uma inovação tecnológica como alternativa mercadológica para a área de reprodução artificial de peixes (MELO *et al*, 2010). Contudo, não há estudos sobre a conservação do sêmen de *prochilodus brevis* em ACP-104.

Para a criopreservação do sêmen de Characiformes, notadamente de espécies do gênero *Prochilodus*, o crioprotetor interno mais utilizado tem sido o dimetilsulfóxido (DMSO) (GODINHO & VIVEIROS, 2011; MILLIORINI *et al*, 2004). Entretanto, são inexistentes registros sobre o uso do DMSO para a criopreservação do sêmen de *P. brevis*. Assim, desenvolver protocolos de criopreservação adequados à espécie poderá representar uma excelente alternativa para a conservação do sêmen de *P. brevis*, e de seu material genético.

O presente estudo teve por objetivo avaliar o diluente água de coco em pó modificado para peixes (ACP[®]-104) para a criopreservação do sêmen de curimatã comum, comparando seus resultados aos do diluente glicose a 5%, que é o mais utilizado para a criopreservação do sêmen de *Prochilodus sp.*

MATERIAL E MÉTODOS

Para execução do presente estudo foram utilizados peixes do plantel do Centro de Pesquisa em Aquicultura Rodolpho Von Ihering (CPAq) pertencente ao Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS), localizado no município de Pentecoste, Ceará.

Um lote contendo vinte peixes foi cedido pelo Departamento Nacional de Obras Contra as Secas, e transportados para o Laboratório de Biotecnologia da Reprodução de Peixes (LBRP) do Núcleo Integrado de Biotecnologia (NIB) da Universidade Estadual do Ceará, situado a (3°52'18") de latitude Sul e (38°27'28") de longitude Oeste. Os animais foram estocados em tanques de aproximadamente 7000 litros e mantidos com fluxo contínuo de água com sistema de recirculação e filtração.

O plantel de reprodutores foi formado por machos adultos com idade superior a três anos, e aptos a participar do processo reprodutivo. Os exemplares foram previamente selecionados com base na emissão de sêmen, após uma suave pressão abdominal e em seguida foram transferidos para tanques de manejo de 1000 litros, a fim de receberem tratamento de indução hormonal. Para minimizar o estresse da manipulação, os peixes foram sedados através da exposição à solução anestésica contendo óleo de cravo (Eugenol) diluído em álcool absoluto na proporção de (1:10:10.000) (eugenol:álcool:água) e submetidos ao processo de hipofisação.

Os peixes receberam injeções de extrato hipofisário de carpa (EHC) em dose única (1mg.kg^{-1} de peso vivo), aplicado na base da nadadeira peitoral. Dezoito horas após a indução hormonal a coleta de sêmen foi iniciada, sendo a papila urogenital enxuta com papel toalha e após leve massagem abdominal o sêmen foi coletado em tubos de polietileno graduados e conservados sobre gelo em caixas isotérmicas.

Imediatamente após este procedimento, as amostras seminais de cada animal foram avaliadas de forma subjetiva em microscópio ótico (400X). Para isto o sêmen foi diluído na proporção 1:100 com água *in natura* oriunda dos tanques de estocagem. Como critério de seleção, foram utilizadas apenas amostras seminais com ausência de motilidade e aquelas que apresentavam motilidade espermática igual ou superior a 90% após ativação. As amostras selecionadas foram homogeneizadas para a formação de quatro *pools* de sêmen, onde cada pool foi composto pelo sêmen de quatro machos.

Para avaliação das características o sêmen foi avaliado quanto à cor (branco, amarelo ou rosado), quanta a osmolaridade (mOsm kg^{-1}) mensurada através de osmômetro digital de refrigeração Peltier (Roebing, Alemanha) e quanto ao pH através de fita medidora de pH (Merck_Darmstadt, Alemanha). Para a avaliação da concentração espermática ($\text{espermatozoides.mL}^{-1}$) foi utilizada a câmara hematimétrica de *Neubauer*, onde cada *pool* foi diluído na proporção de 1:4000 (sêmen:fixador) em solução citrato-formol a 4%.

Para a criopreservação do sêmen foi realizada uma diluição na proporção de 1:9 (semen: diluidor) nas duas soluções diluentes: ACP-104 (pH 8,0 ; 330 mOsmol) e Glicose 5% (pH 8,0; 330 mOsmol). Antes da diluição, em cada diluente foi acrescentado 10% de DMSO, formando assim o meio diluidor.

As amostras diluídas foram acondicionadas em palhetas francesas de 0.5 mL (RMV, França), e vedadas com álcool polivinílico. As palhetas envasadas foram mantidas à temperatura de 22 °C durante 10 minutos (tempo de equilíbrio), em raques de alumínio, e em seguida transferidas para *Dry shipper* (-170°C) (Taylor-Wharton, CX100; EUA). Após 15 minutos, as palhetas foram transferidas para um botijão de estocagem a -196°C.

Todo o trabalho de congelação foi realizado no LBRP/NIB, da Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza, Ceará, Brasil.

Para análise objetiva do sêmen descongelado, as palhetas foram levadas ao banho de imersão térmica, a 60 °C por 8 segundos e em seguida dois microlitros (2 µL) do sêmen foram depositados em câmara hematimétrica de *Makler*[®] e adicionados 100µL de solução ativadora (NaCl 50mM). O sêmen foi então analisado através do sistema computadorizado de análise seminal CASA (*Computer Assisted Sperm Analyzer*), em aumentos de (400X, filtro verde e posição -pH1) e avaliada por meio do software SCA[®] (*Sperm Class Analyzer*[®]; Madrid, Espanha) versão 5.3.

Usando imagens digitalizadas das células espermáticas, foram verificadas a motilidade total (MOT) e a velocidade curvilínea (VCL, µm.s⁻¹), que é a velocidade da trajetória real dos espermatozoides (VERSTEGEN *et al*, 2002), a velocidade em linha reta (VSL, µm.s⁻¹) e a velocidade média no percurso (VAP, µm.s⁻¹), utilizando as configurações originais do programa para o sêmen de peixes.

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de ética para uso de animais da Universidade Estadual do Ceará (UECE) sob o número de protocolo: 12639924-7.

Análise estatística

Para a análise estatística foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado. Foi realizada uma análise descritiva dos dados para a obtenção das médias e desvios em função dos efeitos. As variáveis que não atendiam as condições de normalidade foram transformadas pelo arco seno, somente para efeito de análise. Os dados foram submetidos à análise de variância para se verificar o efeito de coleta e do tratamento, bem como da interação entre ambos. Para os efeitos significativos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey e Duncan (para a morfologia) com 5% de probabilidade

de erro. As análises foram realizadas empregando-se o programa estatístico SAS v.8 (2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os exemplares adultos de curimatã comum, *P. brevis*, utilizados no experimento, responderam positivamente a indução hormonal, liberando sêmen mediante leve massagem abdominal. O sêmen dos animais apresentou coloração esbranquiçada e aspecto leitoso. A concentração espermática média foi de $2,94 \times 10^{10}$ espermatozoides.mL⁻¹. O pH variou de 7,8 a 8,5 com média de $8,1 \pm 0,19$ e a osmolaridade média foi de $286,66 \pm 0,7$ mOsmol.Kg⁻¹. Os resultados de concentração espermática apresentados neste trabalho foram semelhantes aos apresentados por ROMAGOSA *et al*, (2010) que obtiveram $2,95 \times 10^{10}$ espermatozoides.ml⁻¹ para o sêmen de *P. lineatus*.

Os dados de motilidade e velocidade espermática, obtidos pelo sistema CASA, após o descongelamento estão descritos nas tabelas 1 e 2.

Tabela 01. Médias e erro-padrão dos parâmetros de motilidade dos espermatozoides de curimatã comum (*Prochilodus brevis*) em função dos tratamentos ACP-104 e Glicose 5%, avaliados pelo sistema de análise computadorizada da motilidade espermática (SCA).

Tratamentos	Motilidade total	Sptzs	Sptzs	Sptzs
	MOT (%)	RAP (%)	MED (%)	LEN (%)
ACP-104	$76,80 \pm 2,54^a$	$3,89 \pm 0,81^a$	$27,38 \pm 2,69^a$	$46,67 \pm 1,54^a$
Glicose 5%	$66,21 \pm 3,98^b$	$2,80 \pm 0,67^a$	$18,26 \pm 3,05^b$	$43,38 \pm 3,10^a$

ACP-104 (pH 8,0 ; 330 mOsmol) + DMSO na concentração de 10%; Glicose 5% (pH 8,0; 330 mOsmol) + DMSO na concentração de 10%; sptzs: espermatozóides; MOT: % motilidade total; RAP: % de espermatozoides rápidos progressivos; MED: % de espermatozóides com velocidade média; LEN: % de espermatozoides lentos), considerando-se a configuração padrão do SCA. Valores reais (não transformados). Letras sobrescritas diferentes na mesma coluna diferiram significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A análise estatística da motilidade espermática revelou que o ACP-104 apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao diluente glicose ($76,80 \pm 2,54$; $66,21 \pm 3,98$, respectivamente).

A motilidade espermática é o critério mais utilizado para se avaliar a qualidade seminal, porém, com o advento de métodos computadorizados de avaliação (CASA), a motilidade espermática e outros aspectos do movimento espermático, que não podiam ser avaliados subjetivamente, tais como a separação em diferentes grupos de espermatozoides móveis e a aferição da velocidade espermática passaram a ser analisados, dando assim maior precisão às avaliações e correlacionando-as com capacidade fertilizante do sêmen (VERSTEGEN *et al*, 2002; VIVEIROS *et al*, 2010).

No sêmen de peixes, as subpopulações de espermatozoides móveis (rápidos, médios e lentos) mudam rapidamente em relação ao tempo de ativação uma vez que a duração da motilidade é muito curta, não ultrapassando na maioria das vezes o tempo de dois minutos (BILLARD *et al*, 1995). Isto reflete diretamente na velocidade espermática e conseqüentemente no manejo do sêmen para fertilização artificial (VIVEIROS *et al*, 2010). Contudo, os valores de motilidade total, encontrados para os espermatozoides de *P. brevis* foram superiores aos estudos de Orfão *et al*, (2010) que obteve (25 ± 16), com sêmen *P. lineatus* criopreservado em glicose a 5% associado ao crioprotetor DMSO a 10% e ativado com NaCl, e ao de Martinez *et al*, (2008) congelando o sêmen de *P. magdaleneae* em glicose a 5,5% adicionado de 10% de DMSO, o qual obtiveram 54% de espermatozoides móveis após criopreservação em *Dry shipper*.

Dentre vários fatores, a motilidade espermática pode ser influenciada pela qualidade da solução ativadora e pela taxa de diluição (FELIZARDO *et al*, 2011). Romagosa *et al*, (2010) investigando o efeito das taxas de diluição sobre a duração da

motilidade em *P. lineatus* sugeriram que o aumento nas taxas de diluição até o máximo valor de 1:100 são favoráveis ao aumento na duração da motilidade. É provável então que o elevado percentual de espermatozoides lentos observados neste estudo seja o resultado de uma taxa de diluição inadequada, já que o sêmen de *P. brevis* é do tipo denso com elevada concentração espermática. Além disso, foi observado elevado percentual de espermatozoides normais, assim como com baixa velocidade (tabela 2 e 3).

Viveiros *et al*, (2010), afirmaram que a velocidade curvilínea (VCL) é considerada a velocidade mais importante para o estudo do sêmen de peixes. De fato, foi observado que o movimento dos espermatozoides de um grande número de peixes é circular, e este fato ocorre com o intuito destes percorrerem a superfície do ovócito para localizar e penetrar na micrópila (local de fecundação) (SALMITO-VANDERLEY e SANTANA, 2012).

Tabela 2. Média e erro padrão das velocidades curvilínea, retilínea e média no percurso de espermatozoides de *P. brevis* criopreservados nos tratamentos ACP-104 e Glicose 5%.

<i>Tratamentos</i>	<i>VCL (μm.s⁻¹)</i>	<i>VSL (μm.s⁻¹)</i>	<i>VAP (μm.s⁻¹)</i>
ACP-104	43.13 ± 1.86 ^a	26.12 ± 2.03 ^a	34.11 ± 2.17 ^a
Glicose 5%	37.64 ± 2.87 ^a	21.54 ± 2.88 ^a	28.63 ± 3.20 ^a

VCL: Velocidade curvilínea, VSL: velocidade retilínea; VAP: velocidade média no percurso, considerando-se a configuração padrão do SCA. ACP-104 (pH 8,0; 330 mOsmol) + DMSO a 10; Glicose 5% (pH 8,0; 330 mOsmol) + DMSO a 10%. Valores reais (não transformados). Letras sobrescritas diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de Tukey (p<0,05).

A velocidade curvilínea, (VCL) encontrada para o sêmen de *P. brevis* diluído em solução de ACP-104 foi 43,1±1,86 μm.s⁻¹, não diferindo significativamente do

tratamento com solução de Glicose a 5% ($37,64 \pm 2,87 \mu\text{m.s}^{-1}$). Estes resultados obtidos foram compatíveis com os dados obtidos por VIVEIROS *et al.* (2010), que utilizaram o diluente ACP-104 para a conservação de sêmen de curimba (*P. lineatus*) e obtiveram valores médios de VCL de $53,7 \pm 25,1 \mu\text{m.s}^{-1}$, porém com alta variabilidade entre os machos amostrados, fato demonstrado pelo elevado valor do desvio padrão.

Os valores médios e erro padrão do total de espermatozoides normais, defeitos de cauda e cabeça dos espermatozoides de curimatã comum (*Prochilodus brevis*) criopreservados nos diluentes ACP e Glicose a 5% estão apresentados na tabela 3. Os parâmetros morfológicos dos espermatozoides de curimatã comum não apresentaram diferenças significativas entre os diluentes ACP-104 e glicose a 5%.

Tabela 3. Médias e erro padrão dos parâmetros morfológicos dos espermatozoides (defeitos de cauda e cabeça) de curimatã comum (*Prochilodus brevis*) criopreservados nos diluentes ACP-104 e Glicose 5%.

<i>Tratamentos</i>	<i>Parâmetros Morfológicos (%)</i>				
	Normais	Cauda dobrada	Cauda enrolada	Macrocefalia	Microcefalia
ACP-104	98,06±2,07	1,0±1,26	0,64±0,85	0±0	1,16±0,40
Glicose 5%	98,05±1,00	0,75±0,95	1,0±1,41	0±0	0±0

Os resultados obtidos aqui com sêmen criopreservados de *P. brevis* foram semelhantes ao de KAVAMOTO *et al.* (1997), onde obtiveram 91,50% de espermatozoides normais para sêmen fresco de curimbatá (*P. scrofa*), 96 horas após a indução hormonal, demonstrando que o protocolo utilizado, assim como os diluidores testados não inferiram danos significativos aos espermatozoides. Para o sêmen de peixes não existe uma padronização em relação à determinação de percentuais aceitáveis de patologias primárias e secundárias que possam causar a prejuízos às taxas

de fertilização e, se estabelecidas poderão sem dúvida, contribuir para a otimização dos processos reprodutivos artificiais (STREIT JR, 2007).

CONCLUSÃO

Nas condições do presente experimento, pode-se sugerir a utilização do protocolo testado com ACP[®]-104, associado ao DMSO, uma vez que a criopreservação em neste diluente resultou em elevado percentual de espermatozóides normais comparando com à glicose 5%.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BILLARD, R.; COSSON, J.; PERCHEC, G.; LINHART, O. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 129, p. 95- 112, 1995.

BRITSKI, H. A.; Y.; SATO, Y.; ROSA, A. B. S. Manual de identificação de peixes da região de Três Marias: com chaves de identificação para os peixes da Bacia do São Francisco. 2. ed. Brasília, DF: Câmara dos Deputados: Codevasf, 1986. 182 p.

FELIZARDO, V.O; MURGAS, L.D.S; NAVARRO, R.D; GONÇALVES, A.C.S. E PAULINO, M.S. Osmolaridade e taxa de diluição na ativação do sêmen criopreservado de *Prochilodus lineatus*. *Archivos de zootecnia* vol. 60, núm. 232, p. 1257. 2011.

FRIBOURGH, J. H. (1966), The application of a differential staining method to low-temperature studies on goldfish spermatozoa. *Progr. Fish Cult.*, 28 : (4), 227-231.

GATZ JR., AJ. 1979. Ecological morphology of fresh water stream fishes. *Tulane Stud. Zool. Bot.*, New Orleans, 21: 91-124.

GODINHO, H.P. & VIVEIROS, A.T.M. (2011). Current Status of Sperm Cryopreservation of Brazilian Characiform Fishes. In: *Cryopreservation in Aquatic Species*, Tiersch TR, Green CC (Ed.), World Aquaculture Society. 875-884.

KAVAMOTO, E. T.; MAINARDES-PINTO, C.S.R.; ANDRADE-TALMELLI, E.F. de; CAMPOS, B.E.S. Produção espermiática do Curimatá *Prochilodus scrofa*, Steindachner, 1881. *B. Inst. Pesca* 24 (único) 73-78. 1997.

LEITE, L.V.; OLIVEIRA, F.C.E.; NUNES, L.T.; NUNES, J.F.; SALMITO-VANDERLEY, C.S.B. Criopreservação de sêmen de tambaqui com ACP® adicionado de gema de ovo. *Revista Brasileira de Engenharia de Pesca* 6(2): 23:29, 2011.

MANSOUR N, LAHNSTEINER F (2003) Morphology of the male genitalia and sperm fine structure in siluroid fish. *J Submicrosc Cytol Pathol* 35(3):277–285.

MARTÍNEZ, F.; CABRITA, E.; SOARES, F.; ANEL, L E DINI, D. Multivariate cluster analysis to study motility activation of *Solea senegalensis* spermatozoa: a model for marine teleosts. *Reproduction resech*, 2008.

MELO, M.A.P.; MACIEL, F.S.; OLIVEIRA, F.C.E. O.; SALGUEIRO, C.C.M.S.; SALMITO-VANDERLEY, C.S.B. & NUNES, J.F. (2010). Água de coco em pó (ACP-104®) na criopreservação de sêmen de pirapitinga (*Piaractusbrachypomus*). In: *Seminário Nordestino de Pecuária (Pecnordeste)*. Anais. Fortaleza.

MILIORINI, AB; MURGAS, L.D.S.; VIVEIROS, A.T.M. *et al.* The effects of cryoprotectants and activators on sperm motility of curimba (*Prochilodus lineatus*). In: *International Congress on Animal Reproduction*, 15., 2004, Porto Seguro. Anais... Porto Seguro: 2004. p.523.

NUNES, J. F.; SALGUEIRO, C. C. M. A água de coco em pó como diluidor do sêmen de animais domésticos. *Revista de Ciências Agrárias*, Belém, n. 43, p.58-60 2006.

ORFÃO, L. H., MARIA, A. N., NASCIMENTO, A. F., ISAÚ, Z. A.; VIVEIROS, A. T. M. Sperm fertility of the subtropical freshwater streaked prochilod *Prochilodus lineatus* (Characiformes) improved after dilution and cold storage. *Aquaculture Research*, v. 41, p. 679–687, 2010.

ROMAGOSA, E.; SOUZA, B.E.; SANCHES, E.A.; BAGGIO, D.M.; BOMBARDELLI, R.A. 2010. Sperm motility of *Prochilodus lineatus* in relation to dilution rate and temperature of the activating medium. *Journal of Applied Ichthyology*, Malden, 26(5): 678-681.

ROSA, R. S., MENEZES, N. A., BRITSKI, H. A, COSTA, W. J. E. M & GROTH, F. 2005. Diversidade, padrões de distribuições e conservação dos peixes da Caatinga. In: Leal, I. R., Tabarelli, M., SILVA, J. M. C. eds, *Ecologia e Distribuição da Caatinga*. Editora UFPE, Recife, 135-180.

SALMITO-VANDERLEY, C.S.B. & SANTANA, I.C.H. *Histologia e Embriologia Animal Comparada*. 2ª ed. SEAD/UAB Fortaleza. 2012. 159p.

STREIT-JR, D. P.; RIBEIRO, R. P.; MORAES, G. V.; VARGAS, L. D. M.; DIGMAYER, M.; GALO, J. M.; POVH, J. A.; BRACCINI-NETO, J. Sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) submetido ao resfriamento ao longo do tempo com diferentes meios diluidores. *Revista Biociências*, v. 13, p. 178-187, 2007.

VELÁSQUEZ-MEDINA, S. (2008). *Criopreservação do sêmen de pirapitinga, Piaratusbrachypomus (Pisces, Characidae)*. [Dissertação]. Fortaleza (CE): Universidade Federal do Ceará.

VERSTEGEN, J.,IGUER-OUADA, M. &ONCLIN, K. (2002). Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, 57:149-179.

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

AGRADECIMENTOS

A Universidade Estadual do Ceará (UECE), Universidade Federal do Ceará (UFC), Universidade de Fortaleza (UNIFOR) e Departamento Nacional de Obras contra as Secas (DNOCS).

8. CAPÍTULO 3

Extrato liofilizado de palma forrageira gigante (*Opuntia ficus indica*) na criopreservação do sêmen de curimatã comum (*Prochilodus brevis*).

Lyophilized extract of giant cactus pear (*Opuntia ficus indica*) in sperm cryopreservation of common curimatã (*Prochilodus brevis*).

CAJADO, Francisco José Lopes^{1*}; OLIVEIRA, Cássia de Fátima Evangelista¹; LINHARES, Francisco Renan Aragão²; CATUNDA, Ana Gláudia Vasconcelos²; MORAES-FILHO, Manoel Odorico de¹; NUNES, José Ferreira², SALGUEIRO, Cristiane Clemente de Mello³, SALMITO-VANDERLEY, Carminda Sandra Brito².

RESUMO

O estudo teve por objetivo avaliar a eficiência do diluente Extrato Liofilizado de Palma Forrageira (*Opuntia ficus indica*) – ELPF, em duas concentrações 30% e 50% comparadas com glicose 5% na criopreservação do sêmen de curimatã comum, *Prochilodus brevis*. O sêmen foi coletado e formado um “pool” a cada quatro amostras advindas de vinte machos diferentes. Cada “pool” foi aliqotado para ser diluído nas duas soluções e adicionadas de DMSO a 10%, na proporção de diluição 1:9 (sêmen:diluente). O sêmen foi envasado em palhetas de 0,5ml e mantido à temperatura de equilíbrio (22 °C) durante 10 minutos em racks de alumínio, e em seguida transferidos para *Dry shipper* (-170 °C). Após 24 horas as palhetas foram transferidas para botijão criogênico (-196 °C). A análise computadorizada após descongelamento (60°C por 8 segundos) revelou que não houve diferença significativa na motilidade total dos espermatozoides no desempenho dos diluentes ELPF 30% ($62.62 \pm 2,35\%$) e ELPF 50% ($61.54 \pm 3,72\%$) nas porcentagens testadas frente à Glicose 5% ($66,21 \pm 3,98\%$) assim como também em relação ao efeito dos diluidores sobre as anormalidades espermáticas. Nas condições do presente experimento, recomenda-se a utilização de todos diluentes testados: ELPF 30%, ELPF 50% e glicose a 5% associado ao crioprotetor DMSO, para criopreservação do sêmen de *P. brevis*. Conclui-se que os três diluidores foram eficientes na criopreservação de semen de *P. brevis*.

Palavras-Chave: *Prochilodus brevis*, congelação de sêmen; diluidor.

ABSTRACT

The study aimed to evaluate the efficiency of the diluent Lyophilized extract of cactus pear (*Opuntia ficus indica*) - ELPF in two concentrations 30% and 50% compared with 5% glucose in sperm cryopreservation of common curimatã, *Prochilodus brevis*. Semen was collected and formed a "pool" every four resulting samples of twenty different males. Each "pool" was aliquoted to be diluted two solutions in DMSO and added to 10% at a ratio of 1:9 dilution (semen: diluent). The semen was packaged in 0.5 ml straws and kept at the equilibrium temperature (22 °C) for 10 minutes in aluminum racks, and then transferred to Dry shipper (-170 °C). After 24 hours, the straws were transferred to cryogenic cylinder (-196 °C). Computer analysis after thawing (60 °C for 8 seconds) revealed no significant difference in total motility of spermatozoa in diluents ELPF performance of 30% ($62.62 \pm 2.35\%$) and ELPF 50% ($61.54 \pm 3.72\%$) in percentages tested against the 5% glucose ($66.21 \pm 3.98\%$) as well as in relation to the effect of diluting the sperm abnormalities. In the present experimental conditions, the use of all solvents tested is recommended: ELPF 30% ELPF 50% and 5% glucose associated with DMSO cryoprotectant for sperm cryopreservation of *P. brevis*. In conclusion, the three extenders were effective to semen cryopreservation of *P. brevis* semen.

Key words: *Prochilodus brevis*, semen freezing; extender.

INTRODUÇÃO

O uso de diluentes orgânicos para diluição seminal é uma inovação da biotecnologia aplicada à reprodução artificial. Diluidores orgânicos à base de glicose, água de coco ou extrato de palma forrageira *Opuntias ficus* já foram testados com sucesso para o sêmen de suínos (AIRES e TONIOLLI, 2005), caprinos (AZEVEDO e TONIOLLI, 1999); (NUNES e SALGUEIRO, 1999), ovinos (BRAZ *et al*, 2003), bovinos (ALBERTI, 2004), caninos (CARDOSO *et al*, 2005), felinos (SILVA *et al*, 2007), macacos (ARAÚJO *et al*, 2007) e humanos (NUNES, 1998) e peixes (VIVEIROS *et al*, 2010). Para o sêmen de caprinos Saanen a diluição do sêmen em extrato líquido de palma forrageira demonstrou ser eficiente na conservação da motilidade espermática após teste de termorresistência (CAJADO *et al*, 1999) promovendo $78,33 \pm 10,67$ % de espermatozóides móveis e um vigor de $3,60 \pm 0,40$ após 120 minutos comaprável a água de coco. Contudo, não existem estudos sobre a utilização do extrato de *Opuntias* como diluente do sêmen de peixes. Já a glicose vem demonstrando ser um excelente meio de conservação para o sêmen de *Prochilodus lineatus* (MURGAS *et al*, 2007).

Espécies de peixes prochilodontídeos necessitam migrar durante o período reprodutivo, momento em que costumam ser presas fáceis de pescadores inescrupulosos, que durante a época reprodutiva capturam as fêmeas para consumo das ovas, considerada uma iguaria em certas regiões das bacias nordestinas, ameaçando espécies como a curimatã comum, *Prochilodus brevis*. Porém, mesmo após uso de medidas mitigadoras tal como a época do defeso, ainda encontram-se ameaçadas por ações antrópicas, notadamente da construção de barragens para produção de energia elétrica, que impedem ou dificultam o acesso às áreas de desova (CAROLSFELD *et al*,

2003). Além destes fatores, uma redução na variabilidade genética dos estoques em cativeiro tem sido observada (LOPES, 2010), o que parece ser o resultado de endocruzamentos seguidos, devido ao uso de planteis com pequeno número de reprodutores.

Espécies como *Prochilodus lineatus*, *P. brevis*, *P. argenteus* e *P. magdaleneae* possuem o sêmen tipo denso ou semidenso com elevada concentração espermática, porém com baixo volume seminal. A média de volume observada por Murgas *et al*, (2007), para curimba (*Prochilodus lineatus*) variou de 0,8 a 3,8 ml. Enquanto Romagosa *et al*, (2010) obtiveram apenas $0,51 \pm 0,35$ ml para a mesma espécie. Deste modo, a diluição seminal favorece a utilização do sêmen em estudos de reprodução artificial, onde se pode determinar a dose inseminante ideal e a limitante para a fertilização, ou em programas de melhoramento genético, para renovação dos estoques através da criopreservação, minimizando assim, estas ações antrópicas (MARIA *et al*, 2009).

Não existem registros na bibliografia científica de estudos sobre o uso de sêmen criopreservado de *Prochilodus brevis* em extratos de palma forrageira seja líquido ou liofilizado. Portanto, desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o sêmen de curimatã comum (*Prochilodus brevis*) criopreservado em meio a base de extrato liofilizado de palma forrageira gigante (ELPF) em duas concentrações (30% e 50%), comparando seus resultados ao diluente glicose a 5% e adicionados de dimetilsulfóxido (DMSO).

MATERIAL E MÉTODOS

Seleção dos machos e coleta do sêmen

Para execução do presente estudo foram utilizados peixes cedidos do plantel do Centro de Pesquisa em Aquicultura Rodolpho Von Ihering (CPAq) pertencente ao Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS), localizado no município de Pentecoste, Ceará.

Um plantel de vinte peixes foi mantido no Núcleo Integrado de Biotecnologia (NIB), da Universidade Estadual do Ceará, situado a 3°52'18" de latitude sul e 38°27'28" de longitude oeste e mantidos em sistema de recirculação de água com capacidade de 7000 litros. Os exemplares foram previamente selecionados com base na emissão de sêmen, após suave pressão abdominal, e em seguida foram transferidos para tanques de manejo a fim de receberem tratamento hormonal de indução à espermiacção. Para minimizar o estresse da manipulação, os peixes foram sedados através da exposição à solução anestésica contendo óleo de cravo (Eugenol) diluído em álcool absoluto 1:10:10.000 (eugenol:álcool:água).

Os animais receberam injeções na base da nadadeira peitoral de extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC) em dose única ($1\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de peso vivo). Dezoito horas após a indução hormonal a coleta de sêmen foi iniciada sendo a papila urogenital enxuta com papel toalha, e após leve massagem abdominal o sêmen foi coletado em tubos de polietileno graduados e conservados sobre gelo. Imediatamente as amostras seminais foram avaliadas subjetivamente ao microscópio ótico (400X). Como critério de seleção apenas amostras seminais com ausência de motilidade sem diluição, e aquelas que apresentavam motilidade espermática igual ou superior a 90% após ativação foram utilizadas.

As amostras selecionadas foram homogeneizadas para a formação de quatro *pools* de sêmen, (quatro machos para cada *pool*). A osmolaridade de cada *pool* (mOsm kg⁻¹) foi mensurada através de osmômetro digital de refrigeração Peltier (Roebing, Alemanha) e o pH através de papel medidor de pH (Merck_Darmstadt, Alemanha). Para a avaliação da concentração espermática (espermatozoides.mL⁻¹) utilizou-se a câmara hematimétrica de *Neubauer*, onde cada *pool* foi diluído na proporção de 1:4000 (sêmen:fixador) em solução citrato-formol a 4%.

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de ética para uso de animais da Universidade Estadual do Ceará (UECE) sob o número de protocolo: 12639924-7.

Criopreservação do sêmen

Para a criopreservação o sêmen foi diluído na proporção de 1:9 (sêmen: diluente) em três diluentes a seguir: extrato liofilizado palma forrageira 30% (pH 8,0; 330 mOsm); extrato liofilizado palma forrageira 50% (pH 8,0; 330 mOsm) e Glicose 5% (pH 8,0; 330 mOsm).

Para cada diluente foi acrescentado 10% de DMSO. As amostras diluídas foram acondicionadas em palhetas transparentes de polietileno de 0.5 mL (RMV, França), e vedadas com álcool polivinílico. As palhetas foram mantidas à temperatura de 22 °C durante 10 minutos (tempo de equilíbrio), em racks de alumínio, e em seguida transferidas para *Dry shipper* (-170 °C) (Taylor-Wharton, CX100; EUA). Após 24 horas as palhetas foram transferidas para um botijão a -196 °C. A descongelação ocorreu a 60 °C por 8 segundos em de imersão.

Todo o trabalho de congelação foi realizado no Laboratório do Núcleo Integrado de Biotecnologia (NIB) da Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza, Ceará, Brasil.

Análise objetiva do sêmen após descongelção

Para a análise da motilidade espermática as palhetas envasadas foram descongeladas em banho de imersão a 60 °C por 8 segundos e em seguida analisados na câmara de *Makler*[®] oportunidade em que foram adicionados 100µL de solução ativadora (NaCl 50mM), seguida da adição e mistura de dois microlitros (2 µL) do sêmen. O sêmen foi então analisado através do sistema computadorizado de análise seminal CASA (*Computer Assisted Sperm Analyzer*) – em aumentos de (400X, filtro verde e posição -pH1) para ser avaliada por meio do software SCA[®] (*Sperm Class Analyzer*[®]; Madrid, Espanha) versão 5.3. Usando imagens digitalizadas das células espermáticas, o CASA analisou as propriedades de trajetória e velocidade dos espermatozoides. Foram analisadas a motilidade total (MOT) e as velocidades curvilínea (VCL), a velocidade em linha reta (VSL) e a velocidade média no percurso (VAP), utilizando as configurações originais do programa para o sêmen de peixes.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na análise estatística foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado. Foi realizada uma análise descritiva dos dados para a obtenção das médias e desvios em função dos efeitos. As variáveis que não atendiam as condições de normalidade foram transformadas pelo arco seno, somente para efeito de análise. Os dados foram submetidos à análise de variância para se verificar o efeito de coleta e do tratamento, bem como da interação entre ambos. Para os efeitos significativos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey e Duncan (para os defeitos) com 5% de probabilidade de erro. As análises foram realizadas empregando-se o programa estatístico SAS v.8 (2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os vinte exemplares adultos de curimatã comum, *P. brevis*, utilizados neste estudo, responderam positivamente a indução hormonal, liberando sêmen mediante leve massagem abdominal, não havendo mortalidades durante a condução do experimento. O sêmen de *P. brevis* apresentou coloração esbranquiçada com aspecto leitoso. A concentração espermática média foi de $2,94 \times 10^{10}$ espermatozoides.mL⁻¹. O pH variou de 7,8 a 8,5 com média de $8,1 \pm 0,19$ e a osmolaridade média foi de $286,66 \pm 0,7$ mOsmol.Kg⁻¹. Estes resultados de concentração espermática são semelhantes aos apresentados por (KAVAMOTO *et al*, 1997) que obtiveram $3,29 \times 10^{10}$ espermatozoides.ml⁻¹ para o sêmen de *P. scrofa* e (ROMAGOSA *et al*, 2010) que obtiveram $2,95 \times 10^{10}$ espermatozoides.ml⁻¹ para o sêmen de *P. lineatus*.

Os dados de motilidade e velocidade espermática, obtidos pelo programa CASA, após o descongelamento estão descritos nas tabelas 1 e 2.

Tabela 01. Médias e erro-padrão dos parâmetros seminais (motilidade total e velocidade espermática) de Curimatã comum (*Prochilodus brevis*) em função dos tratamentos (ELPF 30%, ELPF 50% e Glicose 5%, adicionados de DMSO 10%).

Tratamentos	Motilidade total MOT (%)	Sptzs RAP (%)	Sptzs MED (%)	Sptzs LEN (%)
ELPF30%	62.62 ± 2,35 ^a	1.09 ± 0,28 ^b	12.41 ± 1,64 ^b	50.20 ± 2,00 ^a
ELPF 50%	61.54 ± 3,72 ^a	1.08 ± 0,27 ^b	12.09 ± 1,87 ^b	47.86 ± 2,63 ^a
Glicose 5%	66.21 ± 3,98 ^a	2.80 ± 0,67 ^a	18.26 ± 3,05 ^a	43.38 ± 3,10 ^a

EPFL 30% (pH 8,0; 330 mOsmol) + DMSO na concentração de 10%; EPFL 50% (pH 8,0; 330 mOsmol) +DMSO na concentração de 10%); Glicose 5% (pH 8,0; 330 mOsmol) + DMSO na concentração de 10%; sptzs: espermatozóides; RAP: % de espermatozoides rápidos progressivos; MED: % de

espermatozoides com velocidade média; LEN: % de espermatozoides lentos), considerando-se a configuração padrão do SCA. Valores reais (não transformados). Letras sobrescritas diferentes na mesma coluna diferiram significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os valores da motilidade total (tabela 1) para os diferentes grupos de espermatozoides criopreservados em ELPF 30% ($62.62 \pm 2,35\%$) e ELPF 50% ($61.54 \pm 3,72\%$) não apresentaram diferenças significativas entre si ou com os resultados apresentados do diluente Glicose a 5% ($66,21 \pm 3,98$).

A motilidade espermática é o critério mais utilizado para se avaliar a qualidade seminal, porém, com o advento de métodos computadorizados de avaliação da motilidade espermática (CASA), outros aspectos do movimento espermático, que não podiam ser avaliados subjetivamente, tais como a aferição da velocidade espermática e a separação em diferentes grupos de espermatozoides móveis passaram a ser analisados dando assim maior precisão às avaliações e correlacionando-as com capacidade fertilizante do sêmen (VERSTEGEN *et al*, 2002; VIVEIROS *et al*, 2010).

No sêmen de peixes as subpopulações de espermatozoides móveis (rápidos médios e lentos) mudam rapidamente em relação ao tempo de ativação de vez que a duração da motilidade é muito curta, não ultrapassando na maioria das vezes os dois minutos (BILLARD, 1995). Isto reflete diretamente na velocidade espermática e consequentemente no manejo do sêmen para fertilização artificial (VIVEIROS, 2010).

Embora o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal não tenha estabelecidos parâmetros para a fertilização de peixes, todos os tratamentos estão dentro do padrão preconizado para a sua utilização em programas de reprodução assistida em mamíferos, pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1997).

Para os espermatozoides rápidos a glicose 5% ($66.21 \pm 3,98$ %), apresentou diferenças significativas quando comparada aos que utilizaram ELPF como diluidor. Não houve diferenças entre ELPF 30% ($1.09 \pm 0,28$ %) e EPFL 50% ($1.08 \pm 0,27$ %).

Tabela 2. Média e erro padrão das velocidades curvilinear, retilínea e média no percurso de espermatozoides de *Prochilodus brevis* criopreservados em diferentes tratamentos (ELPF 30%, EPFL 50% e Glicose 5%, adicionados de DMSO10%).

Tratamentos	VCL ($\mu\text{m.s}^{-1}$)	VSL ($\mu\text{m.s}^{-1}$)	VAP ($\mu\text{m.s}^{-1}$)
EPFL 30%	31.43 ± 1.84^b	16.08 ± 2.23^b	22.66 ± 2.25^b
EPFL 50%	31.44 ± 1.51^b	15.00 ± 1.45^b	22.21 ± 1.60^b
Glicose 5%	37.64 ± 2.87^a	21.54 ± 2.88^a	28.63 ± 3.20^a

VCL: Velocidade curvilinear, VSL: velocidade retilinear; VAP: velocidade média no percurso, considerando-se a configuração padrão do SCA. EPFL 30% (pH 8,0; 330 mOsm) +DMSO a 10%; EPFL 50% (pH 8,0; 330 mOsm) + DMSO a 10%; Glicose 5% (pH 8,0; 330 mOsm) + DMSO a 10%. Valores reais (não transformados). Letras sobrescritas diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Viveiros *et al*, (2010), afirmam que a velocidade curvilinear (VCL) é a velocidade considerada mais importante para o estudo do sêmen de peixes. Para o sêmen de curimatã comum (*P.brevis*), a VCL encontrada em solução de glicose 5% ($37,64 \pm 2,87 \mu\text{m.s}^{-1}$) mostrou diferenças significativas em relação aos tratamentos ELPF 30% ($31.43 \pm 1.84 \mu\text{m.s}^{-1}$) e EPFL 50% ($31.44 \pm 1.51 \mu\text{m.s}^{-1}$).

Os resultados obtidos neste trabalho foram compatíveis com obtidos por VIVEIROS *et al*, (2010), que utilizaram o diluente ACP-104 para a conservação de sêmen de curimba (*P. lineatus*) e obtiveram valores médios de VCL de ($53,7 \pm 25,1 \mu\text{m.s}^{-1}$). A velocidade retilinear (VSL) mostrou diferenças significativas entre o tratamento glicose 5% ($21.54 \pm 2.88 \mu\text{m.s}^{-1}$) e os tratamentos EPFL 30% ($16.08 \pm 2.23 \mu\text{m.s}^{-1}$) e EPFL 50% ($15.00 \pm 1.45 \mu\text{m.s}^{-1}$). Para a velocidade média do percurso (VAP)

a glicose 5% ($28.63 \pm 3.20 \mu\text{m.s}^{-1}$) apresentou diferenças significativas em relação aos tratamentos contendo ELPF 30% ($22.66 \pm 2.25 \mu\text{m.s}^{-1}$) e ELPF 50% ($22.21 \pm 1.60 \mu\text{m.s}^{-1}$).

Os valores médios e erro padrão dos defeitos de cauda e cabeça dos espermatozoides de curimatã comum (*Prochilodus brevis*) criopreservados nos diluentes ELPF 30%, ELPF 50%, ACP e glicose a 5% estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3. Médias e erro padrão dos parâmetros morfológicos dos espermatozoides (defeitos de cauda e cabeça) de curimatã comum (*Prochilodus brevis*) criopreservados nos diluentes ELPF 30%, ELPF 50% e Glicose 5%.

<i>Tratamentos</i>	<i>Parâmetros Morfológicos (%)</i>				
	Normais	Cauda dobrada	Cauda enrolada	Macrocefalia	Microcefalia
ELPF 30%	98,17±1,72	1,20±1,30	0,51±0,82	0±0	0,25±0,70
ELPF 50%	99,01±1,11	0,28±0,48	0,67±0,81	0,11±0,33	0±0
Glicose 5%	98,05±1,00	0,75±0,95	1,0±1,41	0±0	0±0

*ELPF (extrato liofilizado de palma forrageira)

Porém, baseado nos parâmetros morfológicos observados na tabela 3 onde foram observadas médias acima de 98% de espermatozoides normais é provável que este elevado percentual de espermatozoides lentos esteja relacionado ao efeito da taxa de diluição, já que o sêmen de curimatã comum é do tipo denso com elevada concentração espermática. Sabe-se que além do estado nutricional a motilidade pode ser influenciada pela qualidade da solução ativadora e pela taxa de diluição (FELIZARDO *et al*, 2011). Romagosa *et al*, (2010) investigando o efeito das taxas de diluição sobre a duração da motilidade em *Prochilodus lineatus* sugeriram que o aumento nas taxas de diluição até o máximo valor de 1:100 000 são favoráveis ao aumento na duração da motilidade. Muito embora os diluentes ELPF 30 % e ELPF 50% possam aparentar maior

viscosidade que a Glicose, não houve diferenças com relação ao percentual de lentos. Deste modo, é provável então que taxas de diluição acima de 1:100, utilizadas neste estudo, possam melhorar os parâmetros de motilidade.

O formato da cabeça dos espermatozoides de curimatã comum *P. brevis* é de formato arredondado como na maioria de outras espécies de *Prochilodus*. Conforme Ginzburg (1972), os espermatozoides da maioria dos peixes teleósteos não possuem acrossoma, fato este também observado nos espermatozoides de curimatã comum neste experimento. A ausência de vesícula acrossômica também foi descrita para o espermatozoide do curimatã *P. scrofa* (BORGES FILHO, 1987). Conforme Billard (1970), Ginzburg (1972) e Grier (1985), existem uma relação entre a forma da cabeça dos espermatozoides e o tipo de fertilização realizada, onde espécies com espermatozoides de cabeça arredondada praticam a fertilização externa enquanto as de cabeças alongadas realizam a fertilização interna.

A avaliação da qualidade seminal após criopreservação envolve a análise morfológica, pois já é bem conhecido que o processo de criopreservação causa danos às células espermáticas. Contudo os resultados do presente estudo demonstram que o protocolo adotado, utilizando tanto os extratos de Palma forrageira como a glicose não inferiram danos significativos aos espermatozoides, de vez que foi registrado apenas dois (2%) de anormalidades (tabela 3). Estes dados estão coerentes com os resultados alcançados por Milliorini *et al*, (2011) que obtiveram apenas três (3%) por cento de danos para o sêmen de *P. lineatus* diluído em BTS com DMSO e criopreservados em Dry shipper. Estes resultados foram melhores que os alcançados por Kavamoto *et al* (1999) e Moraes *et al*, (2004) que alcançaram 7,22 e 9,54% respectivamente para *P. lineatus*. Em resumo, os resultados mostram que o protocolo adotado, e os diluentes a

base de palma forrageira foram tão efetivos na criopreservação do sêmen de curimatã quanto o diluidor controle Glicose 5%.

CONCLUSÃO

Nas condições do presente experimento, pode-se sugerir a utilização dos diluentes ELPF 30%, ELPF 50% e Glicose a 5% associado ao crioprotetor DMSO, para criopreservação do sêmen de *Prochilodus brevis*.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Estadual do Ceará (UECE), Universidade Federal do Ceará (UFC), Universidade de Fortaleza (UNIFOR), Departamento Nacional de Obras contra as Secas (DNOCS) e a FINEP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIRES, F. P.; TONIOLLI, R. Congelacao/descongelação e conservacao de semen suino. Anais da 57a Reuniao Anual da SBPC – Fortaleza, CE, 2005.

ALBERTI K. *Congelção do sêmen bovino: novos enfoques em meios diluentes*. 2004. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual de São Paulo, FMVZ, Botucatu, SP, 2004.

ARAÚJO L. L., OLIVEIRA K. G., LIMA J. S., PANTOJA P. S. P., ARAÚJO J. B., DOMINGUES S. F. S. Preservação de sêmen de *Cebus apella* (macaco-prego) em diluidor à base de água de coco a 37°C. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 17, 2007, Curitiba, PR. *Anais...* Belo Horizonte: CBRA, 2007. Disponível em: <http://www.cbra.org.br>.

AZEVEDO D. M. M. R.; TONIOLLI, R. Agua de coco estabilizada suplementada com antibioticos e acido 3-indol acetico na conservacao de semen de caprinos marota. *Ciencia Animal*. V.9, n.1, p.37-42, 1999.

BILLARD, R. 1970 Ultrastructure comparée de spermatozoides de quelques poissons Téléostéens. -In: BACCETI, B., ed. *Comparative spermatology*. New York, Academic Press. p. 71-9.

BORGES FILHO, O.F. 1987 *Caracterização dos estádios de maturação e correlação com avaliações histoquímico-enzimáticas e ultraestruturais das células endócrinas testiculares, durante o ciclo reprodutivo de Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881. São Paulo, Universidade de São Paulo. 234 p. (Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, USP).

BRAZ V.B., ARAÚJO A.A., NUNES J.F., MACHADO V.P., MOURA A.A.A., OLIVEIRA K.P.L. Viabilidade do sêmen ovino diluído em água de coco em pó. *Rev Bras Reprod Anim*, v.27, p.99-107, 2003.

BRITSKI, H. A.; Y.; SATO, Y.; ROSA, A. B. S. Manual de identificação de peixes da região de Três Marias: com chaves de identificação para os peixes da Bacia do São Francisco. 2. ed. Brasília, DF: Câmara dos Deputados: Codevasf, 1986. 182 p.

CAJADO, F.J.L; CARVALHO, M.A.M; FARIAS, J.O. e NUNES, J.F. Avaliação do Extrato líquido de Palma Forrageira Gigante, como diluidor do Sêmen Caprino. IV Congresso aberto aos estudantes de biologia. Unicamp. Campinas-SP. 1999.

CARDOSO R.C.S., Silva AR, Silva LDM. Use of the powdered coconut water (ACP-106) for cryopreservation of canine spermatozoa. *Anim Reprod*, v.2, p.257-262, 2005.

CAROLSFELD, J., GODINHO, H.P., ZANIBONI-FILHO, E. & HARVEY, B.J. (2003). Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. *Journal of Fish Biology*. 63(2):472-489.

GINZBURG, A.S. 1972 *Fertilization in fishes and the problem of polyspermy*. Springfield, Department of Commerce, National AM Technical Information Service, p. 87-359.

GRIER, H.J. 1985 Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. *Amer. Zool.*, 21: 345-57.

GODINHO, H.P. & VIVEIROS, A.T.M. (2011). Current Status of Sperm Cryopreservation of Brazilian Characiform Fishes. In: *Cryopreservation in Aquatic Species*, Tiersch TR, Green CC (Ed.), World Aquaculture Society. 875-884.

LOPES, T.S., STREIT-JUNIOR, D.P., RIBEIRO, R.P., POVH, J.A., LOPERABRANCO; BARRENO, N.M., VARGAS, L., MANSOUR, N., RICHARDSON, G.F. & Mc NIVEN, M.A. (2006). Effect of extender composition and freezing rate on post-thaw motility and fertility of Arctic char, *Salvelinus alpinus* (L.), spermatozoa. *Aquaculture Research*. 37:862-868.

MARIA, N.A., AZEVEDO, H.C. & CARNEIRO, P.C.F. (2009). Criopreservação de sêmen de peixes no contexto do agronegócio da piscicultura. In: *Manejo e sanidade de peixes em cultivo*, Tavares-Dias M (Org.), Embrapa Amapá, 47- 63.

MARTINEZ, J.G., TARAZONA-MORALES, A.M., PARDO-CARRASCO, S.C. 2012. Sperm cryopreservation of freshwater fish bocachico (*Prochilodus magdalenae*) in DMSO and glucose and its effects on fertilization and hatching efficiency. *Anim. Reprod.*, v.9, n.1, p.19-26, Jan./Mar.

MELO, M.A.P.; MACIEL, F.S.; OLIVEIRA, F.C.E. O.; SALGUEIRO, C.C.M.S.; SALMITO-VANDERLEY, C.S.B. & NUNES, J.F. (2010). Água de coco em pó (ACP-104®) na criopreservação de sêmen de pirapitinga (*Piaractus brachypomus*). In: *Seminário Nordestino de Pecuária (PEC Nordeste)*. Anais. Fortaleza.

MILLIORINI, A. B., MURGAS, L. D., ROSA, P. V., OBERLENDER, G., PEREIRA, G. J. M., COSTA, V. C. 2011. A morphological classification proposal for curimba (*Prochilodus lineatus* sperm damage after cryopreservation. *Aquaculture Research*, v.42, p.177-187.

MORAES, G. V., STREIT, D. P. JR., RIBEIRO, R. P., SAKAGUTI, E. S., SOUZA, E. D., POVH, J. A. 2004. Ação de diferentes indutores reprodutivos hormonais no aparecimento de anormalidades morfológicas de piavuçu (*Leporinus macrocephalus*, curimba(*prochilodus lineatus* e carpa comum (*Cyprinus carpio*. *BOL. INST PESCA*. V.30, p.109-116.

NASCIMENTO, A.F., MARIA, A.N. PESSOA, N.O., CARVALHO, M. A. M., VIVEIROS, A. T. M. (2010). Out-of-season sperm cryopreserved in different media of the Amazonian fresh water fish pirapitinga (*Piaractus brachypomus*). *Animal Reproduction Science*, 118: 324-329.

NUNES J. F. Utilização da água de coco como diluidor do sêmen de animais domésticos e do homem. *Rev Bras Reprod Anim*, v.22, p.109-112, 1998.

NUNES J.F., SALGUEIRO C.C.M. Utilização da água de coco como diluidor de sêmen de caprinos e ovinos. *Rev Cient Prod Anim*, v.1, p.17-26, 1999.

MURGAS, L.D.S.; MILIORINI, A.B.; FREITAS, R.T.F.; PEREIRA, G.J.M. Criopreservação de semen de curimba (*Prochilodus lineatus*) mediante adição de diferentes diluidores, ativadores e crioprotetores. *Ver Bras. Zootec.*, v.36, n.3, p.526-531, 2007.

PINTO-FILHO, C. & Queiroz, J.R. (2009). Diversidade genética de estoques de reprodutores de *Colossoma macropomum*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 728-735.

ROMAGOSA, E., SOUZA, B. E., SANCHES., E. A., BAGGIO, D. M., BOMBARDELLI, R. A. 2010. Sperm motility of *Prochilodus lineatus* in relation to dilution rate and temperature of the activating médium. *J. Appl. Ichthyol.* v.26 p.678–681.

SILVA T.F.P., ACKERMANN CL, PINHEIRO F.T.S., SILVA L.D.M. Uso da água de coco em pó (ACP-117) na criopreservação de sêmen de gato doméstico. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 17, 2007, Curitiba, PR. *Anais...* Belo Horizonte: CBRA, 2007. Disponível em: <http://www.cbra.org.br>.

VELÁSQUEZ-MEDINA, S. (2008). *Criopreservação do sêmen de pirapitinga, Piaratusbrachypomus (Pisces, Characidae)*. [Dissertação]. Fortaleza (CE): Universidade Federal do Ceará.

VERSTEGEN, J.,IGUER-OUADA, M. &ONCLIN, K. (2002). Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, 57:149-179.

VIEIRA, M.J.A.F. (2010). *Caracterização do sêmen de tambaqui Colossomama cropomum (Cuvier, 1818) e criopreservação em diluente a base de água de coco em pó (ACP-104)*. [Tese de Doutorado]. Fortaleza (CE): Universidade Estadual do Ceará, (2010). 114 p. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Brazil.

VIVEIROS, A.T.M.; NASCIMENTO, A.F.; ORFÃO, L.H. & ISAÚ, Z.A. (2010). Motility and fertility of the subtropical freshwater fishs streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) sperm cryopreserved in powdered coconut water. *Theriogenology*, 74: 551-556.

9. CONCLUSÕES GERAIS

O protocolo testado na criopreservação do sêmen de curimatã (*Prochilodus brevis*), utilizando os diluentes orgânicos à base de extrato de palma forrageira, (ELPF), ACP-104 e Glicose a 5%, permite a obtenção de elevadas taxas de motilidade.

O melhor meio de congelação seminal de *Prochilodus brevis*, sob as condições que foram realizadas este trabalho, é o que utiliza a associação do ACP-104 adicionados de DMSO 10%. Porém os demais tratamentos podem ser considerados num programa de reprodução assistida, uma vez que apresentaram desempenho dentro dos padrões de utilização de sêmen de peixe criopreservado.

10. PERSPECTIVAS

Este trabalho teve como perspectivas a possibilidade de verificar em *Dry Shipper* o efeito do volume da palheta no sucesso da criopreservação do sêmen de curimatã comum (*Prochilodus brevis*) em ACP-104 e ELPF.

Outros aspectos a serem verificados são novas taxas de diluição pós-descongelamento e seus efeitos sobre o aumento da motilidade espermática e realizar testes de fertilização com a espécie *Prochilodus brevis* em diferentes diluentes.

11. REFERÊNCIAS GERAIS

AIRES, F.P.; TONIOLLI, R. Congelacao/descongelacao e conservacao de semen suino. Anais da 57a Reuniao Anual da SBPC – Fortaleza, CE, 2005.

ANDRADE, J. C. As palmas forrageiras em Alagoas. 1990, 181p.

ASTURIANO, J.F.; MARCO-JIMENEZ, F.; PÉREZ, L.; BALASCH, S.; GARZON, D.L.; PEÑARANDA, D.S.; VICENTE, J.S.; VIUDES DE CASTRO, M.P.; JOVER, M. Effects of hCG as spermiation inducer on European eel semen quality. *Theriogenology* v. 66, p.1012–1020, 2006.

ALBERTI K. *Congelação do sêmen bovino: novos enfoques em meios diluentes*. 2004. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual de São Paulo, FMVZ, Botucatu, SP, 2004.

AMANN R, KATZ DF. Reflections on CASA after 25 years. *J Androl*, v.25, p.317-325, 2004.

ARAÚJO L. L., OLIVEIRA K. G., LIMA J. S., PANTOJA P. S. P., ARAÚJO J. B., DOMINGUES S. F. S. Preservação de sêmen de *Cebus apella* (macaco-prego) em diluidor à base de água de coco a 37°C. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 17, 2007, Curitiba, PR. *Anais...* Belo Horizonte: CBRA, 2007. Disponível em: <http://www.cbra.org.br>.

AZEVEDO D.M.M.R.; TONIOLLI, R. Agua de coco estabilizada suplementada com antibióticos e acido 3-indol acético na conservação de sêmen de caprinos marota. *Ciência Animal*. V.9, n.1, p.37-42, 1999.

BAGENAL, T.B. 1971. The interrelation of the size of fish eggs, the date of spawning and the production cycle. *J. Fish Biol.* 3:207-219.

BARRET, I. Fertility of salmonid eggs and sperm after storage. *J. Fish Res. Bd. Can.*, v.8, n.3, p.125-133, 1951.

BABIAK, L. GLOOWSKI, J., BRZURSKA, E . SZUMIEC, J. & ADAMEK, J. Cryopreservation of sperm of common carp, *Cyprinus carpio* L. Aquaculture Research, 28, 267- 571. 1997.

BALDISSEROTTO, B. Fisiologia dos Peixes Aplicada à Piscicultura. Santa Maria: Editora da UFSM, 2002. 212p.

BILLARD, R.; COSSON, J.; PERCHEC, G.; LINHART, O. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. Aquaculture, Amsterdam, v. 129, p. 95- 112, 1995.

BILLARD, R. Ultrastructure of trout spermatozoa: changes after dilution and deep-freezing. Cell Tissue Res. v. 228, p.205-218, 1983

BILLARD, R. & LEGENDRE, M. Conservation a court terme des gamètes de truite arc-en ciel en condition *in vitro* sous atmosphère d' oxygene. Bull. Fr. Piscic., v.284, p.162-167,1982.

BILLARD, R., COSSON, M. P. Some problems related to the assesment of sperm motility in freshwater fish. The Journal of Experimental Zoology, v.261, p.122-131, 1992.

BILLARD, R.; COSSON, J.; NOVEIRI, S. B.; POUKAZEMI, M. Cryopreservation and short-term storage of sturgeon sperm, a rewiew. Aquaculture, v. 236, p. 1-9, 2004.

BLAXTER, JHS. Sperm storage and cross fertilization of spring and autumn spawning herring. Nature, v.172, 1953.

BRAZ V.B., ARAÚJO A.A., NUNES J.F., MACHADO V.P., MOURA A.A.A., OLIVEIRA K.P.L. Viabilidade do sêmen ovino diluído em água de coco em pó. *Rev Bras Reprod Anim*, v.27, p.99-107, 2003.

BRITSKI, H. A.; Y.; SATO, Y.; ROSA, A. B. S. Manual de identificação de peixes da região de Três Marias: com chaves de identificação para os peixes da Bacia do São Francisco. 2. ed. Brasília, DF: Câmara dos Deputados: Codevasf, 1686. 182 p.

CABRITA E, MARTINEZ F, ALVAREZ M & HERRAEZ MP 2001. The use of flow cytometry to assess membrane stability in fresh and cryopreserved trout spermatozoa. *Cryo Letters* 22 263–272.

CABRITA, E; ROBLES, V; HERRÁEZ, M.P. *Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Fresh water Species*. Taylor and Francis, 549. 2008.

CABRITA, E.; SARASQUETE C.; MARTINEZ-PARAMO S.; ROBLES V.; BEIRAO J.; PEREZ-CEREZALES S.; HERRAEZ MP. Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. *J. Appl. Ichthyol*, v. 26, p. 623–635, 2010.

CAJADO, F. J. L; CARVALHO, M. A. M; FARIAS, J. O; NUNES, J.F. Avaliação do Extrato líquido de Palma Forrageira Gigante, como diluidor do Sêmen Caprino. IV Congresso aberto aos estudantes de biologia. Unicamp. Campinas-SP. 1999.

CARDOSO R.C.S., Silva AR, Silva LDM. Use of the powdered coconut water (ACP-106) for cryopreservation of canine spermatozoa. *Anim Reprod*, v.2, p.257-262, 2005.

CAROLSFEL, D. J; HARVEY, B. Conservação de recursos genéticos de peixes: teoria e prática. Tradução de H. P. Godinho. Victoria, Canadá: World Fisheries Trust. Curso de treinamento brasileiro. 47 p, 1999

CAROSFELD, J; H. P. GODINHO; E. ZANIBONI FILHO; HARVEY. B. J. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. *J. Fish Biol.*, v. 63, p. 472-489, 2003.

CARVALHO, M. A. M.; NUNES, J. F.; GONDIN, J. M. Prolongamento da motilidade espermática de carpa comum, *Cyprinus carpio* L., pelo uso de água de coco (*Cocos nucifera* L.) como diluidor de sêmen. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, n.5, 2002.

CASEY, A.; WALSH, G. Identification and Characterization of a phytase of potential commercial interest. *Journal of Biotechnology*, v. 110, p. 313–322, 2004.

COSTA, S.A.G.L.; NASCIMENTO, R.S.S.; SILVA, M.G.T.; SANTOS, D.A. Relação entre as características morfológicas e comportamentais na alimentação de *Prochilodus brevis* (STEINDACHNER, 1875). 62ª Reunião Anual da SBPC. Recife, 2013.

CASTRO, R. M. C. Revisão Taxonômica da Família Prochilodontidae (Ostariophysi: Characiformes). 1990. 293 f., il. + 43 figs. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1990.

CASTRO, R.M.C. Sistemática e distribuição geográfica da família Prochilodontidae (*Ostariophysi, Characiformes*). In: ENCONTRO BRASILEIRO DE ICTIOLOGIA, 9. 1991, Maringá. Resumos. Maringá: SBI/Nupélia, 1991. p.128, 1991.

CHANDLER, J.E.; PAINTER, C.L.; ADKINSON, R.W.; MEMON, M.A.; HOYT, P.G. Semen quality characteristics of dairy goats. *J Dairy Sci*, p. 46, 1988.

CHAVES, P. T. C. & G. VAZZOLER. 1984. Aspectos biológicos de peixes amazônicos III. Anatomia microscópica do esôfago, estômago e cecos pilóricos de *Sernaprochilodus insignis* (Characiformes: Prochilodontidae). *Acta Amazonica*, Manaus, 14 (3-4): 343-353.

CHRISTENSEN, J. M; TIERSCH, T. R. Refrigerated storage of channel catfish sperm. *Journal of World Aquaculture Society*, Baton rouge, v. 27, n. 3, p.340-345, 1996.

DERIVAUX, J. Reprodução dos Animais Domésticos. Zaragoza, Editora Acribia, 1980.

DE MONSERRAT, J.J.; PÉREZ-SÁNCHEZ, F.; TABLADO, L.; SOLER, C. The Sperm-Class Analyzer1: a new automated system for human sperm morphometry and classification. *Contracept Fertil Sex*, 1995.

DOTT, H. M. & FOSTER, G. C. The estimation of sperm motility in semen, on membrane slide, by measuring the area change frequency with an image analyzing computer. *Journal Reproduction Fertility*. v. 55, p.161-166.1979.

DOURADO, O.F. (1981) Principais peixes e crustáceos dos açudes controlados pelo DNOCS. Fortaleza, Convênio SUDENE/DNOCS 40p.

DUQUE, G. O Nordeste e as lavouras xerófilas. 3 ed.: ESAM, 1980, 337 p.

FARIAS, J.O., NUNES, J.F., CARVALHO, M.A.M. E SALGUEIRO, C.C.M. Avaliação “in vitro” e “in vivo” do sêmen de Tambaqui (*Colossoma macropomum*) conservado a temperatura ambiente e criopreservado em água de coco. Rev. Cient. Prod. Animal, 1 (1): 44-58, 1999.

FISHBASE.

<http://www.fishbase.org/Summary/SpeciesSummary.php?ID=51245&AT=Curimat%C3%A3+comum>. Acessado em: 20/08/2012.

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

FRIBOURGH, J. H. (1966), The application of a differential staining method to low-temperature studies on goldfish spermatozoa. *Progr. Fish Cult.*, 28 : (4), 227-231.

FROESE, R. & PAULY, D. (Eds). 2011. FishBase. World Wide Web electronic publication. Disponível em: <<http://www.fishbase.org>>. Acesso em 13/04/2011.

FELIZARDO, V.O; MURGAS, L.D.S; NAVARRO, R.D; GONÇALVES, A.C.S. E PAULINO, M.S. Osmolaridade e taxa de diluição na ativação do sêmen criopreservado de *Prochilodus lineatus*. Archivos de zootecnia vol. 60, núm. 232, p. 1257. 2011.

FONTENELE, O (1982) Contribuição para o conhecimento da biologia da curimatã pacu, *Prochilodus argenteus* Spix in Spix & Agassiz (Pisces: Characidae, Prochilodontinae). Coletânea de Trabalhos Técnicos. (Pesca e Piscicultura. Ministério do Interior). DNOCS 215-231p.

FURTADO, José Francisco Rodrigues. Piscicultura: uma alternativa rentável. Guaíba: Agropecuária, 1995.

GATZ JR., AJ. 1979. Ecological morphology of fresh water stream fishes. Tulane Stud. Zool. Bot., New Orleans, 21: 91-124.

- GODINHO, H.P. & VIVEIROS, A.T.M. (2011). Current Status of Sperm Cryopreservation of Brazilian Characiform Fishes. In: *Cryopreservation in Aquatic Species*, Tiersch TR, Green CC (Ed.), World Aquaculture Society. 875-884.
- GRAVANCE, C.G; VISHWANATH, R.; PITT, C.; CASEY, P.J. Computer automated morphometric analysis of bull sperm heads. *Theriogenology*, v.46, p.1205–15, 1996.
- GRIER, H.J. 1985 Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. *Amer. Zool.*, 21: 345-57.
- HARVEY, B., CAROLSFELD, J. Preservation of sperm. In: HARVEY, B., CAROLSFELD, J. Induced breeding in tropical fish culture. Ottawa, Ontario: International Development Research Centre: 1993. Chapter 7, p.119-130. 1993.
- HIDALGO, M.; RODRIGUEZ, J.; SANZ, J.; SOLER, C. Effect of sample size and staining methods on stallion sperm morphometry by the Sperm Class Analyzer. *Veterinary Medicine*, v.50, n.1, p.24-32. 2005.
- HOPKINS, S.M.; EVANS, L.E. IN: MCDONALD, E. *Endocrinologia Veterinária e Reprodução*. 4. Ed. Interamericana. Mexico. 1991.
- HUNTER, R.H.F. *Fisiologia e Tecnologia da Reprodução da Fêmea dos animais domésticos*. Ed. Acribia. Zaragoza, 1982.
- HUNTER, B. J., ROBERTS, D. C. K. Potential impact of the fat composition of farmed fish on human health. *Nutrition Research*, v.20, n.7, p. 1047-1058, 2000.
- ISAÚ, Z. A. População bacteriana, motilidade espermática e fertilidade de sêmen de piracanjuba *Brycon orbignyanus* (VALENCIENNES, 1849) submetido ao resfriamento. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. 2006.
- IHERING, R. von.; AZEVEDO, P. A curimatã dos Açudes Nordestinos (*Prochilodus argenteus*). *Archivos do Instituto Biológico*, v. 5, p. 143-184, 1934.
- JENKINS-KEERAN, K.;SCHREUDERS, P.; EDWARDS, K.; WOODS III, L.C. The effects of oxygen on the short-term storage of striped bass semen. *North American Journal of Aquaculture*, v. 63, p. 238-241, 2001.

JEYARAMAN, V.; GALI, N.K.; PANDURANGAN, M.; KOTTEAZETH, S. Thermophilic xylanase isolated from the xerophytic-*Cereus pterogonus* and *Opuntia vulgaris* plant sp. *International Journal of Phytomedicine*, v. 2, p. 304-311, 2010.

KAVAMOTO, E. T., FOGLI DA SILVEIRA, W., RIGOLINO, M. G., TABATA, Y. A., CAMPOS, B. DO E. S. DE C. Produção espermática e teste de fertilização do sêmen de truta arco-íris, *Salmo irideus* Gibbons no primeiro ciclo reprodutivo. B. Inst. Pesca, v.14 (único), p.51-62, 1987.

KAVAMOTO, E. T.; MAINARDES-PINTO, C.S.R.; ANDRADE-TALMELLI, E.F. de; CAMPOS, B.E.S. Produção espermática do Curimbatá *Prochilodus scrofa*, Steindachner, 1881. B. Inst. Pesca 24 (único) 73-78. 1997.

KRUGER, T.F.; ACOSTA, A.; SIMMONN, K.F.; SWANSON, R.J.; MATTA, J.F.; OEHNINGER, S. Predictive value of abnormal sperm morphology in vitro fertilization. *Fertil Steril*, v.49, p.112-7, 1988.

LEAL, I. R., TABARELLI, M. e DA SILVA, J. M.C.; Ecologia e conservação da caatinga. Recife : Ed. Universitária da UFPE, 2003.

LEGENDRE, M.; BILLARD, R. Cryopreservation of rainbow trout sperm by deep-freezing. *Reprod. Nut. Dev.*, v.20, n.6, p.1859-1868, 1980.

LEITE, L. V. Dose inseminante, embriogênese e criopreservação de sêmen de tambaqui (*Colossoma Macropomum*). Fortaleza-CE: Dissertação (Mestrado)-Universidade Estadual do Ceará. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Brazil. 2011, 72f.

LEITE, R.G.; R.L. BARBIERI & F.J.HERNANDEZ-BLAZQUEZ. 1988. Morfologia do trato digestivo do Curimbatá, *Prochilodus scrofa*, 11. Morfometria. *BoI. Inst. Pesca*, São Paulo, 15 (2): 221-227.

LINHARES. F. R. A.; NUNES, J. F; CARVALHO, M.A. M; LOPES, J. T;1; PINHEIRO, R. R. R.; SALMITO-VANDERLEY, C. S. B.. Anormalidades em espermatozoides de carpa comum, *Cyprinus carpio*, frescos ou criopreservados em

diluidor a base de água de coco em pó (ACP-104®). *VI Congresso Norte Nordeste de Reprodução Animal*. *Ciência Animal*, suplemento 12., 671-674. 2012.

LIZAMA, M. A. P. Estimativa do parâmetros de crescimento, recrutamento e mortalidade de *Prochilodus lineatus* da planície de inundação do Alto Rio Paraná, *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, v.26, n. 2, 121-128, 2000.

LIZAMA, M.A.P.; AMBÓSIO, A.M. Condition factor in nine species of fish of Characidae Family in the upper Paraná river flood plain, Brazil. *Revista brasileira de biologia*, v.62, n. 1, 113-124. 2002.

LLEÓ, C.A. *Análisis integrado de morfología y movilidad espermática humana con el uso del "Sperm Class Analyzer"*. Valencia, 2003. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) Universidade de Valencia, Espanha, 2003.

MACIEL, M.H.C.; HERCULANAO, P.N.; PORTO, T.S.; TEIXEIRA, M.F.S.; MOREIRA, K.A.; SOUZA-MOTA, C.M. Production and partial characterization of pectinases from forage palm by *Aspergillus niger* URM4645. *African Journal of Biotechnology*, v. 10, p. 2469-2475, 2011.

MANSOUR N, LAHNSTEINER F (2003) Morphology of the male genitalia and sperm fine structure in siluroid fish. *J Submicrosc Cytol Pathol* 35(3):277–285.

MARCO-JIMÉNEZ, F.; PÉREZ, L.; VIUDES-DE-CASTRO, M.P.; GARZÓN, D.L.; PEÑARANDA, D.S.; VICENTE, J.S.; JOVER, M.; ASTURIANO, J.F. Morphometry characterisation of European eel spermatozoa with computer-assisted spermatozoa analysis and scanning electron microscopy. *Theriogenology*, v 65, p. 1302-1310, 2006a.

MARCO-JIMÉNEZ, F.; VIUDES-DE-CASTRO, M.P.; BALASCH, S.; MOCÉ E.; SILVESTRE, M.A.; GOMEZ, E.A.; VICENTE, J.S. Morphometric changes in goat sperm heads induced by cryopreservation. *Cryobiology*, v. 52, p. 295–304, 2006b.

MARCO-JIMENÉZ, F.; PEÑARANDA, D.L.; PÉREZ, L.; VIUDES-DE-CASTRO, M.P.; MYLONAS, C.C.; JOVER, M.; ASTURIANO, J.F. Morphometric characterization of sharpsnout sea bream (*Diplodus puntazzo*) and gilthead sea bream

(*Sparus aurata*) spermatozoa using computer-assisted spermatozoa analysis (ASMA). J. Appl. Ichthyol. v. 24, p. 382–385, 2008.

MARIA A. N. Diluidores e crioprotetores no resfriamento e congelamento do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2005.

MARIA, A. N., MURGAS L. D. S., SILVA, M. O. B., MILIORINI, A. B., FRANCISCATTO, R. T., LOGATO, P. V. R. Influência da adição de iodeto de potássio e citrato de sódio na qualidade do sêmen de Pacu (*Piaractus mesopotamicus* – Holmberg, 1887). Ciência e Agrotecnologia, Lavras, v. 28, n. 1, p. 191-194, 2004.

MARIA, A. N.; VIVEIROS, A. T. M.; FREITAS, R. T. F.; OLIVEIRA, A. V. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. Aquaculture, v. 260, p. 298–306, 2006a.

MARIA, A. N.; VIVEIROS, A. T. M.; ORFÃO, L. H.; OLIVEIRA, A. V.; MORAES, G. F. Effects of cooling and freezing on sperm motility of the endangered fish piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Characiformes, Characidae). Animal Reproduction, v. 3, n. 1, p. 55-60, 2006b.

MARTE, C.L. Hormone-induced spawning of cultured tropical finfishes. In:_____. Advances in tropical aquaculture: 1989 Tahiti. [Brest]: IFREMER, c1990. p. 519-539.

MARQUES, S. Preservação a curto prazo do sêmen de teleósteos neotropicais de água doce. Belo Horizonte: Pontifícia Universidade Católica, 2001. 98p. Dissertação (Mestrado de Zoologia de Vertebrados) - Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, 2001.

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

MARTÍNEZ, F.; CABRITA, E.; SOARES, F.; ANEL, L E DINI, D. Multivariate cluster analysis to study motility activation of *Solea senegalensis* spermatozoa: a model for marine teleosts. *Reproduction resech*, 2008.

MELO, A.A.S.; FERREIRA, M.A.; VÉRAS, A.S.C.; LIRA, M.A.; LIMA, L.E.; VILELA, M.S.; MELO, E.O.S.; ARAÚJO, P.R.B. Substituição parcial do farelo de soja por uréia e palma forrageira (*Opuntia ficus indica* Mill) em dietas para vacas em lactação. I. Desempenho. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 32, p. 727-736, 2003.

MELO, M.A.P.; MACIEL, F.S.; OLIVEIRA, F.C.E. O.; SALGUEIRO, C.C.M.S.; SALMITO-VANDERLEY, C.S.B. & NUNES, J.F. (2010). Água de coco em pó (ACP-104®) na criopreservação de sêmen de pirapitinga (*Piaractusbrachypomus*). In: *Seminário Nordestino de Pecuária (Pecnordeste)*. Anais. Fortaleza.

MILIORINI, AB; MURGAS, L.D.S.; VIVEIROS, A.T.M. *et al.* The effects of cryoprotectants and activators on sperm motility of curimba (*Prochilodus lineatus*). In: *International Congress on Animal Reproduction*, 15., 2004, Porto Seguro. Anais... Porto Seguro: 2004. p.523.

MOBHAMMER, M.R.; STINTZING, F.C.; CARLE, R. Cactus pear fruits (*Opuntia* spp.): a review of processing technologies and current uses. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, v. 8, p. 1-25, 2006.

MORAES, G.; STREIT JR., D.; RIBEIRO, R.; SAKAGUTI, E.; SOUZA, E.; POVH, J. Ação de diferentes indutores reprodutivos hormonais no aparecimento de anormalidades morfológicas em espermatozóides de Piavuçu (*Leporinus Macrocephalus*), Curimatá (*Prochilodus Lineatus*) e Carpa Comum (*Cyprinus Carpio*). *Boletim do Instituto da Pesca*, v. 30, n. 2, p. 109 -116, 2004.

MURGAS, L. D. S.; MILIORINI, A. B.; SILVA, M. O. B.; FRANCISCATTO, R. T.; MARIA, A. N. Viabilidade seminal de piapara (*Leporinus obtusidens*), empregando-se diferentes diluentes, no resfriado do sêmen a 4 °C. *R. Bras. Reprod. Animal.* v.33, n.6, p.1361-1365, 2002.

MURGAS, L. D. S.; MILIORINI, A. B.; FRANCISCATTO, R. T.; MARIA, A. N. Viabilidade espermática do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) resfriado a 4 °C. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 33, n. 6, p. 1361-1365, 2004.

MURGAS, L.D.S.; MILIORINI, A.B.; FREITAS, R.T.F.; PEREIRA, G.J.M. Criopreservação de semen de curimba (*Prochilodus lineatus*) mediante adição de diferentes diluidores, ativadores e crioprotetores. *Ver Bras. Zootec.*, v.36, n.3, p.526-531, 2007.

NASCIMENTO, Márcia Maria do. Biologia reprodutiva do curimatã comum, *Prochilodus brevis* Steindachener, 1875 e limnologia do açude Marechal Dutra localizado na Caatinga do Rio Grande do Norte. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal (RN), 2006.

NUNES J. F. Utilização da água de coco como diluidor do sêmen de animais domésticos e do homem. *Rev Bras Reprod Anim*, v.22, p.109-112, 1998.

NUNES, J. F.; SALGUEIRO, C. C. M. A água de coco em pó como diluidor do sêmen de animais domésticos. *Revista de Ciências Agrárias*, Belém, n. 43, p.58-60 2006.

OMBELET, W.; POLLET, H.; BOSMANS, E.; VEREECKEN, A. Results of a questionnaire on sperm morphology assessment. *Hum. Reprod.*, v.12, p.1015–1020, 1997.

ORFÃO, L. H., MARIA, A. N., NASCIMENTO, A. F., ISAÚ, Z. A.; VIVEIROS, A. T. M. Sperm fertility of the subtropical freshwater streaked prochilod *Prochilodus lineatus* (Characiformes) improved after dilution and cold storage. *Aquaculture Research*, v. 41, p. 679–687, 2010.

PEREIRA, M.C.; ANDRADE, D.R.; COSTA, A.P.R; VIDAL JÚNIOR, M.V.; YASUI, G.S. Índices de alimentação e ciclo reprodutivo em machos de piau-vermelho *Leporinus copelandii* (Steindachner, 1875) na bacia do baixo rio Paraíba do sul. *Ciência Animal Brasileira*, v.8, n.4, p.599-607, 2007.

PICKETT, B.W.; SQUIRES, E.L.; MACKINNON, A.O. Procedures for collection, evaluation and utilization of stallion semen for artificial insemination. Fort Collins, CO: Colorado State University, Animal Reproduction Laboratory. 1987.

RAMOS, J.P.F.; LEITE, M.L.M.V.; OLIVEIRA JUNIOR, S.; *et al.* Crescimento vegetativo de opuntia ficus-indica em diferentes espaçamentos de plantio. Revista Caatinga, Mossoró, v. 24, n. 3, p. 41- 48, 2011.

RAVINDER, K.; NASARUDDIN, K.; MAJUNMDAR, K.C.; SHIVAJI, S. Computerized analysis of motility, motility patterns and motility parameters of spermatozoa of carp following short term storage of semen. Journal of fish biology, v.50, p. 1309-1328, 1997.

ROMAGOSA, E.; SOUZA, B.E.; SANCHES, E.A.; BAGGIO, D.M.; BOMBARDELLI, R.A. 2010. Sperm motility of *Prochilodus lineatus* in relation to dilution rate and temperature of the activating medium. *Journal of Applied Ichthyology*, Malden, 26(5): 678-681.

ROSA, R. S., MENEZES, N. A., BRITSKI, H. A, COSTA, W. J. E. M & GROTH, F. 2005. Diversidade, padrões de distribuições e conservação dos peixes da Caatinga. In: Leal, I. R., Tabarelli, M., SILVA, J. M. C. eds, Ecologia e Distribuição da Caatinga. Editora UFPE, Recife, 135-180.

RURANGWA, E.; KIME, D. E.; OLIVEIRA, F.; NASH, J. P. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 234, n. 1/4, p. 1-28, 2004.

SALMITO-VANDERLEY, C.S.B. Biotecnologias da reprodução em peixes de água doce. In: In: V Congresso Norte Nordeste de Reprodução Animal, 2010, Patos-PB, Palestra.

SALMITO-VANDERLEY, C.S.B. & SANTANA, I.C.H. *Histologia e Embriologia Animal Comparada*. 2ª ed. SEAD/UAB Fortaleza. 2012. 159p.

SALMITO-VANDERLEY, C.S.B.; VIEIRA, M. J. da A. F.; LEITE, L.V.; OLIVEIRA, F. de C.E. de; LINHARES, F.R.A.; SALGUEIRO, C.C. de M.; NUNES, J.F. Meios de

congelamento para conservação de sêmen de peixes da família characidae. *Revista Ciência Animal*, 22(1): 255-268, 2012.

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

SANTOS, D. C.; SILVA, M. C.; SILVA, D. M. P. Convivência com a cochonilha do carmim em palma forrageira no Estado de Pernambuco. 2º Congresso Brasileiro de Palma e Outras Cactáceas. Garanhuns - PE. 2011.

SANTOS, D. C.; GONDIM, C.A.P. Projeto Palma - Relatório Técnico. Datamétrica, 108p. Ilust.108, Recife, 2004.

SEKONI, V.O.; GUSTAFSSON, B.K. Seasonal variations in the incidence of sperm morphological abnormalities in dairy bulls regularly used for artificial insemination. *Br Vet J.*, v.143, p.312–317, 1987.

SILVA, J. M. de A. MURGAS, L. D.S.; FELIZARDO, V. de O.; PEREIRA, G. J. M.; NAVARRO, R. D.; MELLO, R. de A. Características seminais e índices reprodutivos de curimba (*Prochilodus lineatus*) em diferentes períodos reprodutivos. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v.10, n.3, p 668-677 jul/set, 2009.

SILVA T.F.P., ACKERMANN CL, PINHEIRO F.T.S., SILVA L.D.M. Uso da água de coco em pó (ACP-117) na criopreservação de sêmen de gato doméstico. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 17, 2007, Curitiba, PR. *Anais...* Belo Horizonte: CBRA, 2007. Disponível em: <http://www.cbra.org.br>.

SILVA, V.K. Qualidade da água na piscicultura. Lavras-MG. Universidade Federal de Lavras. Departamento de Zootecnia. 2006. 82 p. Disponível em: http://www.editora.ufla.br/Bolextensão/pdfBE/bol_94.pdf acesso em: 17/12/2011.

SIMÕES, D. A.; SANTOS, D. C.; DIAS, F. M. Introdução da palma forrageira no Brasil. In: MENEZES, R. S. C.; SIMÕES, D. A.; SAMPAIO, E. V. S. B. (eds). *A Palma no Nordeste do Brasil conhecimento atual e novas perspectivas de uso*. 2º ed. Recife: ed universitária da UFPE. p.13-26, 2005.

SIPAÚBA T. L.H. Limnologia aplicada à aquicultura. Boletim Técnico FUNEP, São Paulo, 1994: 1-72p

STINTZING, F.C.; CARLE, R. Cactus stems (*Opuntia* spp.): a review on their chemistry, technology, and uses. *Molecular Nutrition and Food Research*, v. 49, p. 175-194, 2005.

STOSS, J., BÜYÜKHATIPOGLU, S., HOLTZ, W. Short-term and cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) sperm. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, v.18, n.4, p.1077-1082, 1978.

STREIT-JR, D. P.; RIBEIRO, R. P.; MORAES, G. V.; VARGAS, L. D. M.; DIGMAYER, M.; GALO, J. M.; POVH, J. A.; BRACCINI-NETO, J. Sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) submetido ao resfriamento ao longo do tempo com diferentes meios diluidores. *Revista Biociências*, v. 13, p. 178-187, 2007.

SUQUET, M.; DREANNO, C.; FAUVEL, C.; COSSON, J.; BILLARD, R. Cryopreservation of sperm in marine fish. *Aquac. Res.*, n.31, p.231-243, 2000.

TADDEI, A.R.; BARBATO, F.; ABELLI, L.; CANESE, S.; MORETTI, F.; RANA, K. J.; FAUSTO, A.M.; MAZZINI, M. Is cryopreservation a homogeneous process? Ultrastructure and motility of untreated, prefreezing, and postthawed spermatozoa of *Diplodus puntazzo* (Cetti) *Cryobiology*, v.42, p.244–255, 2001.

VAZZOLER, A. E. A. M. *Biologia e Reprodução de Peixes Teleósteos: Teoria e Prática*. Maringá: EDUEM, 1996.

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

VELASCO-SANTAMARIA, Y. M.; MEDINA-ROBLES, V. M.; CRUZ-CASALLAS, P. E. Cryopreservation of yamu (*Brycon amazonicus*) sperm for large scale fertilization. *Aquaculture* 256, p. 264–271, 2000

VELÁSQUEZ-MEDINA, S. (2008). *Criopreservação do sêmen de pirapitinga, Piaratusbrachypomus (Pisces, Characidae)*. [Dissertação]. Fortaleza (CE): Universidade Federal do Ceará.

VIEIRA, M. J. A. F. Caracterização do sêmen de tambaqui *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818) e criopreservação em diluente a base de água de coco em pó (ACP-104). [Tese de Doutorado]. Fortaleza, Ceará: Universidade Estadual do Ceará. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Brazil, 2010, 114 p.

VIEIRA, M.J.A.F; CARVALHO, M.A.M; SALMITO-VANDERLEY, C.S.B; SALGUEIRO, C.C. de M; VIVEIROS, A.T.M; MOURA, A.A.A.N; NUNES, J.F. Características do sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*) em latitude equatorial. Arch. Zootec. 60 (232): 1263-1270. 2011.

VIVEIROS, A. T. M. Semen cryopreservation in catfish species, with particular emphasis on the African catfish. Journal of Animal Breeding Abstracts, v. 73, n. 3, p. 1-9, abr, 2005.

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. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte, v. 61, n. 4, p. 883-889, 2009a.

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

VIVEIROS, A. T. M; AMARAL, T. B; ORFÃO, L. H; ISAU, Z. A; DANILO CANEPPELE & MARCELO C LEAL. Sperm cryopreservation of tiete tetra *Brycon insignis* (Characiformes): effects of cryoprotectants, extenders, thawing temperatures and activating agents on motility features. Aquaculture Research, 2011, 42, 858-865.

VOSS, J.L; PICKET, B.W.; SQUIRES, E.L. Stallion spermatozoal morphology and motility and their relationship to fertility. Journal of the American Veterinary Medical Association, v.178, p.287–9, 1981.

WALTHER, G.; POST, E.; CONVEY, P.; MENZEL, A.; PARMESANK, C.;BEEBEE, T.J.C.; FROMENTIN, J.; HOEGH-GULDBERGI, O.E.; BAIRLEIN, F. Ecological responses to recent climate change. *Nature*, v.416, n.6879, p.389-395, 2002.

WANDERLEY, W.L.; ERREIRA, M.A.; ANDRADE, D.K.B.; VÉRAS, A.S.C.; LIMA, L.E.; DIAS, A.M.A. Palma forrageira (*Opuntia ficus indica* Mill) em substituição à silagem de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) na alimentação de vacas leiteiras. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.31, p. 273-281, 2002.

WATANABE, A.; PREZZOTO, L. D.; GONÇALVEZ, L. D.; CABRAL, N.S. e MENDES, R.A. Princípios Técnicos de Piscicultura. Dossiê Técnico. Serviço brasileiro de respostas técnicas, USP, 2007.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.*, v.60-61, p.481-92, 2000.

WOYNAROVICH, E. Tambaqui e pirapitinga, propagação artificial e criação de alevinos. CODEVASF, Brasília, 1986. 67p.

ZANIBONI FILHO, E.; WEINGARTNER, M. Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v. 31, n. 3, p. 367-373, jul./set. 2007.

ANEXO A – DECLARAÇÃO DE PEDIDO DE DEPÓSITO DE PATENTE JUNTO AO NÚCLEO DE INOVAÇÃO TECNOLÓGICA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ.



Núcleo de Inovação Tecnológica – UECE
Universidade Estadual do Ceará
Av. Paranjana, 1.700 – Campus do Itaperi – 60740-903 Fortaleza, CE
Tel.: (85) 3101.9667
nit@uece.br

Fortaleza, 26 de fevereiro de 2014 Documento nº 2014022600-D

DECLARAÇÃO

Declaramos por meio desta, para os devidos fins que **FRANCISCO JOSÉ LOPES CAJADO** figura como inventor no seguinte processo de pedido de depósito de patente, ativo neste Núcleo:

- **DILUENTE PARA SEMEN DE PEIXES DA FAMÍLIA PROCHILODUS E PROCESSO DE PRESERVAÇÃO DO MESMO.**

Atenciosamente,


CASSIANO OLIVEIRA MOREIRA
ASSESSOR TÉCNICO DO NIT
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ

ANEXO B – VALORES NUTRICIONAIS DA ACP, ESTABELECIDOS MEDIANTE ANÁLISES EM LABORATÓRIOS DE REFERÊNCIA CERTIFICADOS PELA ANVISA E INMETRO (DADOS FORNECIDOS PELA EMPRESA ACP BIOTECNOLOGIA, FORTALEZA, CEARÁ), 2010.

Por 100g	
Carboidrato, por diferença (g)	76,00
Frutose (g)	7,80
Glicose (g)	6,20
Sacarose (g)	0,00
Proteína (g)	12,00
Umidade (g)	1,00
LIPÍDIOS - Por 100g	
Gorduras totais (g)	4,00
Gorduras saturadas (g)	2,46
8:0 ácido caprílico (g)	0,02
10:0 ácido cáprico (g)	0,02
12:0 ácido láurico (g)	1,41
14:0 ácido mirístico (g)	0,60
16:0 ácido palmítico (g)	0,42
<i>Gorduras monoinsaturadas (g)</i>	
18:1 ácido oléico (g)	0,12
<i>Gorduras polinsaturadas (g)</i>	<i>0,47</i>
18:2 ácido linoléico (g)	0,54
Gorduras trans (g)	0,00
Coolesterol (mg)	0,00
MINERAIS - Por 100g	
Sódio, Na (mg)	2.240,00
Cálcio, Ca (mg)	492,00
Ferro, Fe (mg)	8,00
Cobre, Cu (mg)	0,38
Fósforo, P (mg)	430,00
Magnésio, Mg (mg)	510,00
Manganês, Mn (mg)	2,60
Potássio, K (mg)	5.170,00
Selênio, Se (mg)	0,03
Zinco, Zn (mg)	3,30

VITAMINAS - Por 100g	
Vitamina B1 (mg), tiamina	4,55
Vitamina B2 (mg), riboflavina	0,07
Vitamina B3 (mg), niacina (ácido nicotínico e vitamina PP)	3,56
Vitamina B6 (mg), piridoxina	0,13
Vitamina C (mg), ácido ascórbico	16,51
AMINOÁCIDOS - Por 100g	
Ácido Aspártico (mg)	4,73
Ácido Glutâmico (mg)	12,41
Alanina (mg)	7,63
Arginina (mg)	1,88
Cistina (mg)	traços
Fenilalanina (mg)	4,93
Glicina (mg)	3,98
Histidina (mg)	2,36
Isoleucina (mg)	2,65
Leucina (mg)	5,15
Lisina (mg)	2,61
Metionina (mg)	1,58
Prolina (mg)	5,34
Serina (mg)	2,54
Tirosina (mg)	0,82
Treonina (mg)	1,84
Triptofano (mg)	traços
Valina (mg)	5,23
Ômega 3 (g)	0,02
Ômega 6 (g)	0,02

ANEXO C – COMPOSIÇÃO APROXIMADA DE CLADÓDIOS DE PALMA FORRAGEIRA GIGANTE (OPUNTIA FÍCUS INDICA) CONFORME AYADI et al., (2014).

Parâmetros	Cladódios
Umidade	91.04±0.53
pH	3.84±0.1
Acidez titulável	0.652±006
Proteína total	8.88±0.74
Gorduras totais	4.69±0.31
Cinzas totais	23.3±0.78
Carboidratos totais	60.93±0.99
Fibra dietética total (TFD)	41.83±2.98
Fibra dietética insolúvel (IDF)	30.36±0.98
Fibra dietética Solúvel (SDF)	8.78±0.28
Amido	13.09±1.15
Açúcar solúvel	6.01±0.88
Sacarose	2.2±0.95
Glicose	7.47±0.85
Frutose	90.33±3.05