

Influência do tempo de resfriamento e soluções diluentes sobre a congelabilidade do sêmen de *Prochilodus brevis**

Influence of Cooling Time and Diluents on the Freezability of *Prochilodus brevis* semen

Renata Vieira do Nascimento¹, Liliane Veras Leite-Castro², Assis Rubens Montenegro³,
Mayara Setúbal Oliveira-Araújo¹, Júlia Trugilio Lopes¹, Priscila Silva de Almeida-Monteiro¹,
Yasmim Maia Ferreira¹ & Carminda Sandra Brito Salmito-Vanderley¹

ABSTRACT

Background: *Prochilodus brevis* is a rheophilic fish of economic and ecological importance. However, anthropic action has made its population vulnerable. Thus, the development of reproductive biotechnologies, such as seminal conservation, is necessary to subsidize their fish farming. However, seminal collections are often performed in places with few laboratory resources, demanding studies to determine the maximum time for which sperm can be cooled, as well as its process until frozen. Thus, the present study aimed to evaluate the influence of cooling time and the presence of dilution solutions on cryopreservation of *P. brevis* semen.

Material, Methods & Results: After seminal collection, nine pools were formed and analyzed for seminal pH, concentration, membrane integrity, morphology and spermatic kinetics - motility, curvilinear velocity (VCL), average path velocity (VAP) and straight line velocity (VSL). After the analysis of the pools in natura (control 1), they were processed as follows: 1)- immediate freezing (control 2); 2)- cooling: undiluted, diluted in coconut water powder (ACP-104) or diluted in 5% glucose, followed by cooling at different times (6, 12, 24 or 48 h); 3)- Post-refrigeration freezing: the pools were diluted in their respective diluents and 10% dimethyl sulfoxide. After 15 days, the samples were thawed and analyzed for the aforementioned parameters. For the cooled and post-thawed semen, a completely randomized design with 2 (diluent × cooling time) and 3 (storage form × cooling time and storage form × diluent) factors, respectively, was utilized. ANOVA and Dunnett tests were applied to compare the means. In case of seminal cooling, there was no difference ($P > 0.05$) in sperm motility between control 1 and the undiluted and diluted treatments in ACP-104 for up to 24 h. After 48 h, only the VCL of the sample diluted in ACP-104 was similar ($P > 0.05$) to that of control 1. When comparing forms of storage (undiluted, diluted in ACP-104 or diluted in glucose) and cooling times, the undiluted samples and the samples diluted in ACP-104 were better ($P < 0.05$) for all the kinetics parameters analyzed, than those diluted in glucose after 24 h. After 48 h, the cooled semen diluted in ACP-104 presented greater ($P < 0.05$) motility than the other treated semen samples. The samples diluted in glucose for 48 h presented lower spermatic velocity ($P < 0.05$) than those subjected to other treatments. Regardless of the diluent used, the post-thawed semen and the cooled semen diluted for 6 h, presented higher sperm kinetic values ($P < 0.05$) than those of control 2 and other treated samples. Overall, the samples diluted in ACP-104 showed satisfactory results when cooled for up to 48 h or cooled for up to 6 h and frozen.

Discussion: This is the first study that froze semen from *P. brevis* after cooling. Although glucose is a commonly used diluent during seminal freezing and has good post-thawing stability for this species, it is not recommended for cooling before seminal freezing, as prolonged exposure of spermatozoa to glucose may cause osmotic stress to sperm cells. Conversely, good results with ACP-104 might be because of its rich composition, mainly the presence of indole-3-acetic acid (IAA), an auxin with proven potential for seminal conservation of other species. Therefore, for fertilization trials, it is recommended to use ACP-104 as diluent for seminal cooling of *P. brevis* for up to 48 h or semen that has been frozen after cooling in ACP-104 for a maximum of 6 h.

Keywords: fish, seminal criopreservation, commom curimata, sperm.

Descritores: peixe, criopreservação seminal, curimatã comum, espermatozoide.

INTRODUÇÃO

Curimatã comum (*Prochilodus brevis*, Steindachner, 1875) é um peixe reofílico pertencente a ordem dos Characiformes, nativo do semiárido brasileiro [6]. Devido a ação antrópica, a sobrevivência da espécie encontra-se ameaçada [8]. Isso é um fator preocupante, pois a curimatã comum é um importante componente ecológico [8] e possui grande importância social [13]. Logo, pesquisas a fim de otimizar sua piscicultura e a conservação em ambiente natural são necessários.

Existem estudos que esclarecem aspectos sobre a reprodução de *P. brevis*, inclusive sobre a aplicação da técnica de congelamento seminal, que demonstraram a boa congelabilidade do sêmen, utilizando diluentes como a glicose [10,13,17] e a água de coco em pó (ACP-104) [4]. Porém, a coleta seminal geralmente ocorre em locais com poucos recursos laboratoriais, sendo necessária a translocação de equipamentos e mais recursos humanos em campo [21]. Uma boa alternativa para solucionar esse problema seria transportar as amostras resfriadas até o laboratório. Entretanto, poucos estudos abordam essa técnica e não existem dados sobre a viabilidade da congelamento (congelabilidade) seminal após o resfriamento.

Assim, é necessário o desenvolvimento de um protocolo de resfriamento seminal de *P. brevis*, que determine o tempo ideal no qual as amostras podem permanecer resfriadas e a melhor forma de armazenagem (diluído ou *in natura*) até a congelamento, para garantir uma boa qualidade seminal pós-descongelamento.

Diante disso, objetivou-se avaliar a influência do tempo de resfriamento sobre a congelabilidade do sêmen *P. brevis*, e verificar se a adição de diluentes durante o resfriamento garante uma maior qualidade seminal pós-descongelamento.

MATERIAIS E MÉTODOS

Manejo dos animais e coleta dos gametas

Foram selecionados 15 machos de *Prochilodus brevis*, do plantel do Laboratório de Biotecnologia da Reprodução de Peixes (LBRP), localizado em Fortaleza-CE, que apresentavam características indicativas de maturidade reprodutiva [10,13]. Esses animais foram induzidos hormonalmente à reprodução por meio da aplicação de duas doses de extrato hipofisário de carpa (EHC; 0,3 mg.kg⁻¹ e 3 mg.kg⁻¹ de peso vivo), com intervalo de 14 h entre as aplicações.

Oito h após a aplicação da segunda dose de EHC, os animais foram sedados com eugenol e o sêmen foi coletado [10,13,17].

Análise do sêmen in natura e formação do pool

Após a coleta seminal, o volume do sêmen de cada animal foi aferido em tubos graduados de polietileno e o pH com fitas de pH. A motilidade foi analisada utilizando o Sistema de Análise Seminal Computadorizado (CASA), por meio do *software Sperm Class Analyser*¹ (versão 3.2). Apenas as amostras com motilidade superior a 85% foram selecionadas para a formação de nove *pools*, cada um composto por 3 a 4 animais. Posteriormente, alíquotas de cada *pool* (controle 1 - semen *in natura*) foram retiradas para analisar concentração (espermatozoides/mL), morfologia (%), integridade de membrana (%) e cinética espermáticas - motilidade (%), velocidade curvilínea (VCL - µm/s), velocidade em linha reta (VSL - µm/s) e velocidade média do percurso (VAP - µm/s) [10,13,17].

Conservação seminal

O experimento foi dividido em três etapas: 1)- congelamento imediato; 2)- resfriamento e 3)- congelamento das amostras resfriadas.

Etapa 1: Congelamento imediato (Controle 2 - hora zero)

O sêmen foi diluído (1:9 - sêmen:solução diluidora) em dois tipos de soluções: Glicose² 5% adicionada de dimetilsulfóxido³ (DMSO) a 10% (Glicose+DMSO) ou em ACP-104 adicionada de DMSO a 10% (ACP+DMSO). Em seguida, as amostras foram envasadas em palhetas francesas de 0,25 mL e congeladas [10,13,17].

Etapa 2: Resfriamento

Os *pools* foram armazenados de três formas: Não Diluído; Diluído (1:4 - sêmen:diluyente) em Glicose 5% ou Diluído em ACP-104. Cada tratamento foi armazenado em tubos estéreis, mantidos a 4°C durante os seguintes tempos de resfriamento: 6, 12, 24 e 48 h. Após cada tempo de resfriamento, as amostras foram analisadas quanto à cinética, morfologia e integridade de membrana espermáticas.

Etapa 3: Congelamento pós-resfriamento

As amostras resfriadas (etapa 2) foram submetidas à congelamento. O tratamento Não Diluído foi adicionado de Glicose+DMSO ou de ACP+DMSO,

na taxa de diluição de 1:9 (sêmen:solução diluidora). O sêmen previamente Diluído em Glicose 5% ou em ACP-104 (etapa 2) foi rediluído em Glicose+DMSO ou em ACP+DMSO, respectivamente, atingindo uma proporção final de 1:9 (sêmen:solução diluidora). Assim, formaram-se os tratamentos que foram congelados após o resfriamento: Não Diluído, que foi adicionado de Glicose+DMSO ou ACP+DMSO, e Diluído em Glicose ou ACP-104, que foi adicionado de Glicose+DMSO ou ACP+DMSO, respectivamente.

As amostras foram mantidas em nitrogênio líquido por no mínimo 15 dias, descongeladas em banho-maria a 30°C por 16 s [13] e analisadas quanto à cinética, morfologia e integridade de membrana espermática [10,13,17].

Análise Estatística

Os dados foram inicialmente submetidos aos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett para verificação da distribuição dos resíduos e homocedasticidade de va-

riâncias entre os tratamentos, respectivamente. Posteriormente, realizou-se a análise de variância (ANOVA), por meio do Programa SAS (2002), considerando um delineamento experimental inteiramente casualizado em arranjo fatorial do sêmen resfriado em dois fatores (diluyente x tempo) e do sêmen pós-descongelação em três fatores (forma de armazenagem x tempo e forma de armazenagem x diluyente). O teste de Dunnett foi utilizado para comparar todos os tratamentos com os controles do experimento de resfriamento (controle 1) e do experimento de congelação (controle 2). Para as variáveis que não atenderam aos pressupostos da ANOVA, foi aplicado o teste não paramétrico de Krukall-Wallis. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão das médias ($P < 0,05$).

RESULTADOS

Características do sêmen in natura

As características do sêmen *in natura* estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Peso, comprimento corporal e características do sêmen *in natura* de *Prochilodus brevis*, média \pm desvio padrão.

| Parâmetro | Média \pm Desvio Padrão |
|--|---------------------------|
| Peso do animal (mg) | 157 \pm 31,98 |
| Comprimento (cm) | 20,8 \pm 1,75 |
| Volume seminal (mL) | 0,54 \pm 0,23 |
| pH | 8,39 \pm 0,12 |
| Concentração ($\times 10^9$ sptz/mL) | 28,12 \pm 8,23 |
| Taxa de motilidade (%) | 95,11 \pm 4,64 |
| VCL (μ m/s) | 99,58 \pm 32,08 |
| VAP (μ m/s) | 72,95 \pm 25,13 |
| VSL (μ m/s) | 44,12 \pm 15,83 |
| Espermatozoides morfologicamente normais (%) | 77,21 \pm 12,29 |
| Espermatozoides com membrana íntegra (%) | 95,29 \pm 5,97 |

Características do sêmen resfriado

Ao comparar a motilidade do controle 1 com os demais tratamentos resfriados (Não Diluído, Diluído em ACP-104 ou Diluído em Glicose), observou-se que por até 6 h de resfriamento não houve diferença entre nenhum dos tratamentos ($P > 0,05$). Após 12 e 24 h, o sêmen Não Diluído e Diluído em ACP-104 foram semelhantes ao controle 1 ($P > 0,05$), enquanto que o Diluído em Glicose apresentou motilidade inferior

($P < 0,05$). Contudo, após 48 h todos os tratamentos apresentaram motilidade inferior ($P < 0,05$) ao controle 1 (Tabela 2).

No que se refere às velocidades espermáticas, os tratamentos resfriados por até 6 h não diferiram do controle 1 ($P > 0,05$). Para VCL, após 12 h de resfriamento o sêmen Diluído em Glicose foi inferior ($P < 0,05$) ao controle 1, porém os outros tratamentos foram semelhantes ($P > 0,05$). Após 48 h, ainda para o mesmo

parâmetro, apenas o sêmen resfriado Diluído em ACP-104 apresentou valores semelhantes ao controle 1 ($P > 0,05$). Os parâmetros VAP e VSL seguiram o mesmo padrão: até 48 h de resfriamento não houve diferença ($P > 0,05$) entre os tratamentos Não Diluído e Diluído em ACP-104 em relação ao controle 1, enquanto que o Diluído em Glicose foi inferior ($P < 0,05$) ao controle 1 após 24 h.

Houve uma interação significativa entre a forma de armazenagem (Não Diluído, Diluído em ACP-104 ou Diluído em Glicose) e o tempo de resfriamento (Tabela 2). Assim, para a motilidade, foi observado que em 12 h de resfriamento não houve diferença entre nenhum dos tratamentos ($P > 0,05$). No entanto, a partir de 24 h, o sêmen resfriado Não Diluído e Diluído em ACP-104 apresentaram motilidade superior ($P < 0,05$) quando comparados com o Diluído em Glicose. O efeito da diluição em função dos tempos de resfriamento demonstrou que, independentemente

do tempo, o sêmen Diluído em ACP-104 apresentou uma maior estabilidade da motilidade espermática do que os demais tratamentos.

Os resultados referentes às velocidades espermáticas foram semelhantes entre os tratamentos até às 12 h de resfriamento. Os tratamentos Diluído em ACP-104 e Diluído em Glicose diferiram entre si ($P < 0,05$) após 24 h de resfriamento, porém foram semelhantes ($P > 0,05$) ao Não Diluído. No entanto, após 48 h o sêmen resfriado Diluído em Glicose apresentou-se inferior ($P < 0,05$) aos demais (Tabela 2).

Independentemente do tempo de resfriamento, as maiores taxas de espermatozoides com membrana íntegra ($P < 0,05$) foram encontradas nas amostras Diluídas em ACP-104 e Não Diluídas, e os espermatozoides com morfologia normal não diferiram entre os tratamentos Não Diluído, Diluído em Glicose e Diluído em ACP-104 ($P > 0,05$; Tabela 3).

Tabela 2. Cinética [motilidade, velocidade curvilínea (VCL), velocidade em linha reta (VSL) e velocidade média do percurso (VAP)] do sêmen de *Prochilodus brevis* resfriado Não Diluído, Diluído em ACP ou Diluído em Glicose, mantidos em diferentes tempos de resfriamento (6, 12, 24 e 48 h).

| Parâmetro | Tratamento | Horas de resfriamento | | | | |
|----------------|-----------------|-----------------------|------------------|--------------------|--------------------|-------------------|
| | | 0 | 6 | 12 | 24 | 48 |
| Motilidade (%) | Não Diluído | 95,11 ± 4,64 | 94,11 ± 4,56 aA | 82,25 ± 16,86 abA | 84,77 ± 17,15 abA | 72,24 ± 16,29 bA* |
| | Diluído ACP | | 86,75 ± 9,82 aA | 87,72 ± 8,62 aA | 89,83 ± 8,21 aA | 77,80 ± 15,66 aA* |
| | Diluído Glicose | | 89,60 ± 7,82 aA | 78,17 ± 8,32 aA* | 53,45 ± 14,12 bB* | 29,65 ± 6,54 bB* |
| VCL (µm/s) | Não Diluído | 99,58 ± 32,09 | 83,86 ± 21,82 aA | 83,89 ± 32,21 aA | 76,95 ± 25,81 aAB | 65,19 ± 17,46 aA* |
| | Diluído ACP | | 90,49 ± 16,64 aA | 84,84 ± 20,18 aA | 85,90 ± 14,08 aA | 77,89 ± 18,24 aA |
| | Diluído Glicose | | 88,03 ± 20,93 aA | 65,55 ± 11,02 abA* | 46,57 ± 12,61 bcB* | 25,35 ± 3,77 cB* |
| VSL (µm/s) | Não Diluído | 44,11 ± 15,83 | 35,73 ± 10,49 aA | 38,60 ± 13,94 aA | 35,39 ± 13,19 aAB | 31,46 ± 9,07 aA |
| | Diluído ACP | | 52,93 ± 8,17 aA | 49,21 ± 12,65 aA | 48,20 ± 9,73 aA | 47,15 ± 13,58 aA |
| | Diluído Glicose | | 43,93 ± 11,36 aA | 38,74 ± 8,62 abA | 23,33 ± 9,03 bcB* | 6,97 ± 1,76 cB* |
| VAP (µm/s) | Não Diluído | 72,95 ± 25,12 | 56,30 ± 14,97 aA | 62,73 ± 25,44 aA | 57,06 ± 22,00 aAB | 50,30 ± 15,63 aA |
| | Diluído ACP | | 75,52 ± 16,27 aA | 72,57 ± 19,70 aA | 73,45 ± 14,06 aA | 66,73 ± 19,43 aA |
| | Diluído Glicose | | 62,23 ± 15,59 aA | 52,24 ± 9,89 abA | 33,06 ± 12,85 bcB* | 12,18 ± 2,64 cB* |

Letras minúsculas (a, b, c) indicam diferença ($P < 0,05$) entre as colunas e letras maiúsculas (A, B) indicam diferença ($P < 0,05$) entre as linhas. Asterisco (*) indica diferença do controle 1 (sêmen *in natura*) com os demais tratamentos.

Tabela 3. Integridade de membrana e morfologia espermática do sêmen de *P. brevis* resfriado Não Diluído, Diluído em ACP ou Diluído em Glicose, independente do tempo de resfriamento.

| Tratamento | Integridade de Membrana | | Morfologia Espermática | |
|--------------------|-------------------------|--|------------------------|--|
| | Vivos (%) | | Normais (%) | |
| Não Diluído | 90,17 ± 8,63 AB | | 71,89 ± 12,22 A | |
| Diluído em ACP | 92,89 ± 7,83 A | | 71,55 ± 9,90 A | |
| Diluído em Glicose | 84,32 ± 13,10 B | | 72,78 ± 9,44 A | |

Letras maiúsculas (A,B) indicam diferença ($P < 0,05$) entre as linhas.

Características do sêmen pós-descongelção

O controle 2 apresentou os seguintes resultados: motilidade $50,56 \pm 12,18\%$, VCL $31,60 \pm 6,45 \mu\text{m/s}$, VSL $13,82 \pm 5,62 \mu\text{m/s}$, VAP $20,67 \pm 6,01 \mu\text{m/s}$, $68,53 \pm 5,4\%$ e $62,22 \pm 10,03\%$ de espermatozoides normais e com membrana íntegra, respectivamente (Tabela 4).

Não houve interação tripla entre a forma de armazenagem, o diluente e o tempo de resfriamento. Ao comparar a cinética espermática do controle 2 com os tratamentos pós-descongelados, observou-se valores de cinética superiores ($P < 0,05$) quando o sêmen foi

mantido Diluído, independente do diluente utilizado, e resfriado por até 6 h (Tabela 4).

Houve interação entre a forma de armazenagem (Diluído ou Não Diluído) e o tempo de resfriamento (Tabela 4). Para todos os parâmetros de cinética avaliados, os tratamentos resfriados Diluídos por 6 h apresentaram as melhores taxas pós-descongelção ($P < 0,05$) do que os resfriados Não Diluídos. Porém, os tratamentos Diluídos resfriados por 12 h apresentaram diminuição nesses parâmetros, tornando-se semelhantes aos Não Diluídos e mantendo valores similares entre si por até 48 h de resfriamento ($P > 0,05$).

Tabela 4. Cinética [motilidade, velocidade curvilínea (VCL), velocidade em linha reta (VSL) e velocidade média do percurso (VAP)] do sêmen de *Prochilodus brevis* congelado após ser mantido previamente resfriado Diluído, independente do diluente empregado, ou Não Diluído, em diferentes tempos de resfriamento (6, 12, 24 e 48 h).

| Parâmetro | Tratamento | Horas de resfriamento | | | | |
|----------------------------|-------------|-----------------------|-------------------|-----------------|------------------|------------------|
| | | 0 | 6 | 12 | 24 | 48 |
| Motilidade (%) | Não Diluído | 50,56 ± 12,18 | 51,23 ± 11,91 aB | 48,31 ± 9,87 aA | 45,31 ± 10,97 aA | 44,81 ± 14,46 aA |
| | Diluído | | 71,34 ± 11,80 aA* | 56,8 ± 18,41 bA | 50,2 ± 18,52 bA | 46,24 ± 20,88 bA |
| VCL ($\mu\text{m/s}$) | Não Diluído | 31,60 ± 6,45 | 33,17 ± 4,34 aB | 32,25 ± 8,11 aA | 29,04 ± 4,5 aA | 31,42 ± 9,21 aA |
| | Diluído | | 43,34 ± 11,69 aA* | 33,75 ± 9,47 bA | 34,41 ± 9,21 bA | 29,28 ± 10,40 bA |
| VSL ($\mu\text{m/s}$) | Não Diluído | 13,82 ± 5,62 | 14,39 ± 4,41 aB | 13,3 ± 5,28 aA | 10,42 ± 4,24 aA | 13,73 ± 7,82 aA |
| | Diluído | | 24,42 ± 7,29 aA* | 17,13 ± 9,34 bA | 13,38 ± 6,5 bA | 11,84 ± 9,21 bA |
| VAP ($\mu\text{m/s}$) | Não Diluído | 20,67 ± 6,01 | 20,74 ± 4,84 aB | 19,72 ± 6,07 aA | 16,79 ± 4,92 aA | 19,95 ± 9,38 aA |
| | Diluído | | 32,64 ± 9,95 aA* | 24,0 ± 10,76 bA | 21,02 ± 7,88 bA | 17,74 ± 10,80 bA |

Letras minúsculas (a, b, c) indicam diferença ($P < 0,05$) entre as colunas e letras maiúsculas (A, B, C) indicam diferença ($P < 0,05$) entre as linhas. Asterisco (*) indica diferença do controle 2 com os demais tratamentos.

Houve interação significativa entre a forma de armazenagem e os diluentes sobre os parâmetros de cinética, independente do tempo de resfriamento (Tabela 5). Assim, não houve diferença ($P < 0,05$) pós-descongelção entre o sêmen Diluído em Glicose e o Não Diluído e que depois recebeu Glicose+DMSO.

Porém, o tratamento Diluído em ACP-104 apresentou cinética espermática superior ao Não Diluído e que posteriormente recebeu ACP+DMSO ($P < 0,05$). Não houve diferença ($P > 0,05$) entre o sêmen congelado em Glicose+DMSO e em ACP+DMSO, que foi mantido resfriado e Não Diluído. Contudo, quando o sêmen foi

mantido resfriado e Diluído, os melhores valores de cinética espermática pós-descongelação ($P < 0,05$) foram obtidos quando este manteve-se em ACP-104 (Tabela 5).

Independentemente da forma de armazenagem e do tempo de resfriamento, as maiores ($P < 0,05$) ta-

xas de espermatozoides com membrana íntegra foram encontradas nas amostras congeladas com ACP-104, e os espermatozoides com morfologia normal foram encontrados em maior quantidade ($P < 0,05$) no sêmen congelado com Glicose (Tabela 6).

Tabela 5. Cinética espermática [motilidade, velocidade curvilínea (VCL), velocidade em linha reta (VSL) e velocidade média do percurso (VAP)] do sêmen de *Prochilodus brevis* previamente resfriado Diluído ou Não Diluído e que posteriormente foi congelado no diluentes Glicose ou ACP, independente do tempo de resfriamento

| Parâmetro | Tratamento | Diluyente | |
|----------------|-------------|------------------|------------------|
| | | Glicose | ACP |
| motilidade (%) | Não Diluído | 45,11 ± 12,45 aA | 51,15 ± 10,46 aB |
| | Diluído | 43,01 ± 14,69 bA | 69,56 ± 14,59 aA |
| VCL (µm/s) | Não Diluído | 29,78 ± 6,31 aA | 33,42 ± 6,69 aB |
| | Diluído | 29,89 ± 9,52 bA | 40,70 ± 10,32 aA |
| VSL (µm/s) | Não Diluído | 12,41 ± 5,70 aA | 13,95 ± 5,37 aB |
| | Diluído | 11,53 ± 7,64 bA | 22,24 ± 7,73 aA |
| VAP (µm/s) | Não Diluído | 18,40 ± 6,51 aA | 20,89 ± 5,96 aB |
| | Diluído | 17,36 ± 8,54 bA | 30,58 ± 9,55 aA |

Letras minúsculas (a, b, c) indicam diferença ($P < 0,05$) entre as colunas e letras maiúsculas (A, B, C) indicam diferença ($P < 0,05$) entre as linhas.

Tabela 6. Integridade de membrana e morfologia espermática do sêmen de *Prochilodus brevis* congelado após o resfriamento com ACP ou Glicose, independentemente da forma de armazenagem (Diluído ou Não Diluído) e do tempo de resfriamento.

| Tratamento | Integridade de membrana | Morfologia espermática |
|------------|-------------------------|------------------------|
| | Vivos (%) | Normais (%) |
| ACP | 72,78 ± 7,59 A | 65,36 ± 8,7 B |
| Glicose | 59,08 ± 11,67 B | 70,52 ± 8,1 A |

Letras maiúsculas (A,B) indicam diferença ($P < 0,05$) entre as linhas.

DISCUSSÃO

O presente estudo foi pioneiro em congelar sêmen após a aplicação da técnica de resfriamento seminal para *Prochilodus brevis*. Além disso, determinou o tempo máximo no qual o sêmen desta espécie pode permanecer resfriado mantendo as características espermáticas viáveis, visando garantir uma boa qualidade seminal pós-descongelação.

Neste trabalho, evidenciou-se a importância de pesquisas sobre a melhor forma de armazenagem do sêmen antes da congelação, pois a coleta seminal habitualmente ocorre em locais com poucos recursos laboratoriais, necessitando de um tempo de transporte do sêmen até um local adequado para a congelação [21]. Foi observado que o uso do diluyente ACP-104, durante a armazenagem do sêmen, foi capaz de manter as células espermáticas viáveis no decorrer do período de resfriamento.

Os dados encontrados para o sêmen *in natura* de *P. brevis* corroboram com os relatados na literatura [10,13]. Possíveis variações podem ter ocorrido devido à estação do ano, o clima, o período de repouso sexual, o método de coleta e ativação seminal [12].

Durante o resfriamento, o sêmen Diluído em Glicose nos diferentes tempos apresentou um decréscimo da cinética espermática e da integridade de membrana, mostrando ser o diluyente menos adequado. Neste estudo, foi utilizado Glicose 5%, que é de comum aplicação na técnica de congelação seminal de diferentes espécies de peixes teleosteos, inclusive de *P. brevis* [10,13,17]. Contudo, devido ao contato prolongado do diluyente com os espermatozoides, é possível que a Glicose tenha ocasionado estresse osmótico na célula, levando ao rompimento da membrana plasmática. Além disso, a diluição em Glicose, um composto

simples, pode ter ocasionado a diminuição de importantes substâncias do plasma seminal, que protegem os espermatozoides contra possíveis efeitos deletérios, tais como íons e anti-oxidantes [3].

Estudos com resfriamento seminal de peixes mostram que a Glicose não consegue manter uma boa qualidade espermática durante um período de resfriamento prolongado. Pesquisas com *P. lineatus* relatam que a glicose é capaz de manter somente 30% de motilidade espermática por até três dias de resfriamento [16]. Por outro lado, trabalhos com piabanha (*Brycon insignis*) indicaram ausência de motilidade espermática após 2 dias de resfriamento, quando diluídos em glicose [1].

Na morfologia espermática do sêmen resfriado, não houve diferença ($P > 0,05$) entre os tratamentos. De fato, o resfriamento é uma técnica menos prejudicial aos espermatozoides do que a congelação, em que é esperada uma redução de espermatozoides normais [20].

O sêmen resfriado Diluído em ACP-104 ou Não Diluído apresentaram os melhores resultados de cinética espermática, diferindo em alguns parâmetros em relação ao controle 1 somente após 24 h de resfriamento. Apesar disso, os dados de motilidade desses tratamentos permaneceram acima de 70% após 48 h de resfriamento, sendo superior ao exigido pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal CBRA [7]. Para as velocidades espermáticas, somente o sêmen resfriado Diluído em ACP-104 apresentou valores semelhantes ao controle 1 após 48 h. Assim, acredita-se que o sêmen resfriado, previamente Diluído em ACP-104, apresente melhores taxas de fertilização, pois a capacidade de fertilização dos espermatozoides de peixes está relacionada com as velocidades, principalmente a VCL [22].

Embora os resultados do sêmen Não Diluído tenham sido semelhantes ao Diluído em ACP-104, no resfriamento, recomenda-se a utilização de um diluente, uma vez que a diluição irá reduzir a competição das células espermáticas por espaço e oxigênio e diminuir a toxicidade dos metabólitos [5]. Além disso, foram relatados diversos benefícios da adição de diluente para o sucesso do resfriamento seminal, entre eles evitar o dessecamento das células [19]. Assim, os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que armazenar o sêmen de *P. brevis* diluído em ACP-104 é o mais recomendado.

Estudos mostram que o uso do ACP como diluente seminal é uma alternativa promissora e eficaz

na conservação de importantes características espermáticas em várias espécies animais [2,9,14,18,22]. Atualmente, poucos são os estudos sobre resfriamento seminal de peixes que envolvem o uso do ACP-104 como diluente, existindo apenas estudos com *Prochilodus lineatus* [22] e *Colossoma macropomum* [15], sendo os resultados de cinética semelhantes aos encontrados na presente pesquisa.

Atribui-se o sucesso do ACP como diluente seminal à sua composição, com poucos fosfolípidos e rica em proteínas, sais, açúcares, vitaminas e fatores de crescimento, como o ácido indol-3-acético (AIA) [2]. Estudos demonstraram que o AIA estimula e mantém uma maior motilidade para sêmen de caprinos e ovinos [14], além de proporcionar um maior número de espermatozoides com membrana íntegra [9] e com morfologia normal [2].

No que se refere à etapa 3, os tratamentos resfriados Diluídos por 6 h mantiveram a melhor congelabilidade, apresentando valores de cinética pós-descongelação superiores aos preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal [7].

Nas pesquisas envolvendo a congelação seminal de *P. brevis*, quando utilizado o diluidor Glicose+DMSO, os resultados de motilidade encontrados na literatura [10,13,17] são inferiores, entretanto, as velocidades foram superiores às do presente estudo. O mesmo padrão foi observado para o sêmen, de *P. brevis* e de *P. lineatus*, congelado em ACP-104 [4,22]. Salienta-se que os resultados gerados por esta pesquisa são uma média de quatro tempos de resfriamento pré-congelação, enquanto que os demais não passaram pelo resfriamento prévio.

No que se refere à morfologia espermática, ainda não foi estabelecido o percentual mínimo de espermatozoides normais para a fertilização em peixes. No presente estudo, foram encontrados mais espermatozoides normais no sêmen congelado com Glicose, independentemente da forma de armazenagem e do tempo de resfriamento. Nesta pesquisa, o defeito mais encontrado foi cauda dobrada, independente do diluente utilizado. Porém, como as morfopatologias que mais afetam a motilidade e a taxa fertilização são cauda curta e cauda enrolada [11], não foi observado, neste estudo, uma diminuição da motilidade nos tratamentos com um maior número de morfopatologias. Além disso, é possível que o percentual crítico de anormalidades espermáticas em peixes de fecundação externa oscile

em torno de 50%, pois a fertilização artificial envolve uma elevada quantidade de espermatozoides e oócitos [11]. Portanto, acredita-se que, para uma fertilização, o sêmen Diluído em Glicose não obtenha resultados superiores ao Diluído em ACP-104, pois a Glicose não apresentou dados de cinética e vitalidade satisfatórios.

É provável que o sêmen Diluído em Glicose não tenha apresentado bons resultados de cinética e vitalidade espermáticas pós-descongelação, devido a sua composição simples associada a longos tempos de resfriamento. Por outro lado, no presente estudo, o sêmen resfriado por 6 h Diluído em ACP-104 apresentou os melhores resultados pós-descongelação. Esses dados diferem dos encontrados na literatura, pois recentemente foi demonstrado que o sêmen de *P. lineatus* permanece viável, sem diluição, por até 3 h [21]. Assim, uma vez definido o diluente adequado, a utilização deste é fortemente recomendada durante o resfriamento, para posterior congelação seminal [5,19].

Os resultados obtidos são bastante promissores para o desenvolvimento da piscicultura de *P. brevis* e para possíveis programas de repovoamento, uma vez que foi determinado um diluente adequado para o resfriamento seminal, a forma ideal de armazená-lo e o tempo no qual este pode ser mantido resfriado para posterior congelação. Assim, para ensaios de fertilização, acredita-se que o sêmen de *P. brevis*, submetido a tais condições, apresentem boas taxas de fertilização.

CONCLUSÃO

Os dados *in vitro* do presente estudo demonstram que o ACP-104 mantém a qualidade das células espermáticas de *Prochilodus brevis* armazenadas a 4 °C, por até 48 horas de resfriamento. Além disso, quando houver necessidade de armazenamento do sêmen antes da congelação seminal, o ACP-104 também é o mais recomendado, pois este mantém a congelabilidade do sêmen que foi resfriado por até 6 h, e garante uma boa qualidade seminal pós-descongelação. Assim, para um ensaio de fertilização (*in vivo*) com sêmen congelado ou resfriado de *P. brevis* recomenda-se a utilização do ACP-104 como diluente.

MANUFACTURERS

¹SCA, Microptics S.L. Barcelona, Espanha.

²Labsynth Produtos para Laboratórios. Diadema, SP, Brazil.

³Fresenius Kabi Brasil Ltda. Aquiraz, CE, Brazil.

⁴ACP Biotecnologia. Fortaleza, CE, Brazil.

Acknowledgements. À FUNCAP pelo financiamento da bolsa de estudos e ao ACP Biotecnologia pela fornecimento do ACP-104.

Ethical approval. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo comitê de ética para uso de animais da Universidade Estadual do Ceará (UECE), com o seguinte número de protocolo: 2397704-2016.

Declaration of interest. The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERENCES

- 1 Amaral T.B. 2009.** Resfriamento e criopreservação de sêmen do peixe teleósteo piabanha *Brycon insignis*. 51f. Lavras, MG. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Lavras.
- 2 Barros T.B. & Toniolli R. 2011.** Uso potencial da água de coco na tecnologia de sêmen. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 35(4): 400-407.
- 3 Cabrita E., Ma S., Diogo P., Martínez-Páramo S., Sarasquete C. & Dinis M.T. 2011.** The influence of certain amino acids and vitamins on post-thaw fish sperm motility, viability and DNA fragmentation. *Animal Reproduction Science*. 125(1): 189-195.
- 4 Cajado F.J.L. 2014.** Utilização do extrato liofilizado de palma forrageira gigante, (*Opuntia ficus indica*) e água de coco em pó (ACP-104) para a criopresevação do sêmen de curimatã (*Prochilodus brevis*). 101f. Fortaleza, CE. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Rede Norte e Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal do Ceará.
- 5 Carolsfeld J. & Harvey B. 1999.** Conservação de recursos genéticos de peixes: teoria e prática. In: *Curso de Treinamento Brasileiro*. Victoria: World Fisheries Trust, 41p.
- 6 Chellappa S., Bueno R.M.X., Chellappa T., Chellappa N.T. & Val V.M.F.A. 2009.** Reproductive seasonality of the fish fauna and limnecology of semi-arid Brazilian reservoirs. *Limnologica*. 39(4): 325-329.
- 7 Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 2013.** *Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal*. 3ed. Belo Horizonte: CBRA, 104p.

- 8 Gurgel L.L., Verani J.R. & Chellappa S. 2012. Reproductive ecology of *Prochilodus brevis* an endemic fish from the semiarid region of Brazil. *The Scientific World Journal*. 2012: 1-7.
- 9 Lima D.B.C., Silva T.F.P., Cortez A.A., Pinto J.N., Magalhães F.F., Caldini B.N. & Silva L.D.M. 2016. Recovery of sperm after epididymal refrigeration from domestic cats using ACP-117c and Tris extenders. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 68(4): 873-881.
- 10 Lopes J.T., Pinheiro J.P.S., Nunes L.T., Pinheiro R.R.R., Souza M.E.M., Almeida P.S., Nascimento R.V., Campello C.C. & Salmito-Vanderley C.S.B. 2014. Avaliação de diferentes crioprotetores e taxas de diluição na criopreservação seminal de *Prochilodus brevis*. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 38(3): 170-175.
- 11 Miliorini A.B., Murgas L.D.S., Rosa P.V., Oberlender G., Pereira G.J.M. & Costa D.V. 2011. Morphological classification proposal for curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm damages after cryopreservation. *Aquaculture Research*. 42(2): 177-187.
- 12 Solis-Murgas L.D., Felizardo V.O., Ferreira M.R., Andrade E.S. & Veras G.C. 2011. Importância da avaliação dos parâmetros reprodutivos em peixes nativos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 35(2): 186-191.
- 13 Nunes L.T., Oliveira M.S., Lopes J.T., Souza M.E.M., Pinheiro R.R.R., Campello C.C. & Salmito-Vanderley C.S.B. 2016. Cryopreservation of *Prochilodus brevis* semen: freezing media and thawing rates. *Semina: Ciências Agrárias*. 37(3): 1643-1654.
- 14 Nunes J.F. & Mello Salgueiro C.C. 1999. Utilização da água de coco como diluidor de sêmen de caprinos e ovinos. *Revista Científica de Produção Animal*. 1(1): 17-26.
- 15 Oliveira F.C.E. 2012. Resfriamento do sêmen de *Colossoma macropomum* em água de coco em pó (ACP-104) associada à crioprotetores - estudo de toxicidade. 66f. Fortaleza, CE. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará.
- 16 Orfão L.H. 2006. Resfriamento e criopreservação do sêmen de curimba *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836). 86f. Lavras, MG. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Feral de Lavras.
- 17 Pinheiro J.P.S., Melo-Maciel M.A.P., Linhares F.R.A., Lopes J.T., Almeida-Monteiro P.S., Pinheiro R.R.R. & Salmito-Vanderley C.S.B. 2016. Use of glucose or BTSTM combined with DMSO or methylglycol under two different freezing protocols for the cryopreservation of sperm from the common curimatã (*Prochilodus brevis*). *Animal Reproduction*. 13(4): 779-786.
- 18 Salmito-Vanderley C.S.B., Vieira M.J.A.F., Leite L.V., Oliveira F.C.E., Linhares F.R. A., Salgueiro C.C.M. & Nunes J.F. 2012. Meios de congelamento para conservação de sêmen de peixes da família Characidae. *Ciência Animal*. 22(1): 255-268.
- 19 Stoss J. & Donaldson E.M. 1982. Preservation of fish gametes. In: *Proceedings os the International Symposium on Reproduction Physiology of Fish* (Wageningen, Holanda), pp.114-122.
- 20 Streit Jr. D.P., Oliveira A.C., Ribeiro R.P., Sirol R.N., Moraes G.V., Galo J.M. & Digmayer M. 2009. Motilidade, vigor e patologias seminal *in natura* e pós criopreservação de *Piaractus mesopotamicus*. *Boletim do Instituto de Pesca*. 35(2): 159-167.
- 21 Viveiros A.T.M., Di Chiacchio I.M., Almeida I.L., Taffarel T.R. & Leal M.C. 2017. Storage and transportation of *Prochilodus lineatus* (Characiformes) sperm prior to cryopreservation. *General and comparative endocrinology*. 245: 84-88.
- 22 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(4): 551-556.