



## Avaliação de diferentes crioprotetores e taxas de diluição na criopreservação seminal de *Prochilodus brevis*

*Evaluation of different cryoprotectants and dilution ratios on Prochilodus brevis sperm cryopreservation*

J.T. Lopes<sup>1</sup>, J.P.S. Pinheiro<sup>1</sup>, L.T. Nunes<sup>1</sup>, R.R.R. Pinheiro<sup>2</sup>, M.E.M. Souza<sup>1</sup>, P.S. Almeida<sup>2</sup>,  
R.V. Nascimento<sup>2</sup>; C.C. Campello<sup>1</sup>, C.S.B. Salmito-Vanderley<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Faculdade Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil.

<sup>2</sup>Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual do Ceará, Ceará, Brasil.

<sup>3</sup>Correspondência: sandra.salmito@uece.br

### Resumo

Este estudo objetivou caracterizar o sêmen de *Prochilodus brevis* e avaliar os efeitos de diferentes crioprotetores e taxas de diluição sobre a cinética e a morfologia do sêmen criopreservado. Inicialmente, amostras seminais de *P. brevis* (n = 40) foram analisadas quanto ao volume, pH, osmolaridade, concentração, motilidade e morfologia espermáticas. Para a criopreservação, o material coletado foi distribuído em 10 pools de sêmen (n = 10), submetidos a seis tratamentos compostos pela combinação de glicose 5%, dois crioprotetores (DMSO ou MG) e três taxas de diluição (1:3, 1:6 ou 1:9 – sêmen:diluidor). As amostras, *in natura* e pós-descongeladas, foram analisadas quanto à sua morfologia e cinética espermática utilizando o CASA. O sêmen de *P. brevis* apresentou características semelhantes a demais espécies de *Prochilodus*. O sêmen congelado com glicose e MG apresentou resultados significativamente superiores (P < 0,05) comparado àquele congelado utilizando DMSO. As diluições 1:3 e 1:6 apresentaram melhores resultados para glicose + MG, enquanto 1:9 foi melhor para glicose + DMSO. Portanto, a associação glicose + MG, numa taxa de diluição de 1:3 ou 1:6, é a mais indicada para a criopreservação do sêmen de *Prochilodus brevis*.

**Palavras-chave:** curimatã comum, congelação, dimetilsulfóxido, metilglicol, sêmen.

### Abstract

*This study aimed to characterize Prochilodus brevis sperm and evaluate the effects of different diluents and dilution ratios on kinetics and morphology of cryopreserved sperm. Initially, sperm samples of P. brevis (n = 40) were assessed for volume, pH, osmolality, spermatid concentration, motility and morphology. For cryopreservation, the collected material was distributed in ten pools of semen (n = 10), submitted to six treatments composed by a combination of glucose 5% with two cryoprotectants (DMSO or MG) and three dilution ratios (1:3, 1:6 or 1:9 - sperm:diluent). In natura and post-thawed samples were assessed for spermatid morphology and kinetics using CASA. The sperm of P. brevis showed similar characteristics to other Prochilodus species. Sperm cryopreserved in glucose plus MG presented significantly higher results (P < 0.05) compared to sperm frozen in DMSO. The dilution ratios of 1:3 and 1:6 yielded better results for glucose + MG, while 1:9 was the best dilution for glucose + DMSO. In conclusion, the association of glucose + MG, in a dilution ratio of 1:3 or 1:6, is the most indicated for Prochilodus brevis sperm cryopreservation.*

**Keywords:** common curimatã, dimethyl sulfoxide, freezing, methyl glycol, sperm.

### Introdução

A curimatã comum (*Prochilodus brevis*) é um peixe reofílico brasileiro, nativo do Nordeste brasileiro e de grande valor econômico nessa região (Araújo e Gurgel, 2002). Por se tratar de uma espécie migratória, a curimatã comum tem sido ameaçada pela construção de reservatórios de água, que impedem a sua migração para reprodução no ambiente natural, e pela pesca excessiva, sobretudo durante o período reprodutivo (Nascimento et al., 2012).

Entretanto, poucos estudos existem atualmente contemplando aspectos da biologia reprodutiva de *P. brevis*, principalmente abordando as características de seus gametas e a aplicação de biotecnologias, como a criopreservação do sêmen, uma área em ascensão para a produção em aquicultura e preservação do material genético de diferentes espécies (Carolsfeld et al., 2003).

Para a criopreservação do sêmen, faz-se necessária a adição de soluções diluidoras, compostas por diluentes e crioprotetores, responsáveis por manter a viabilidade da célula espermática e prevenir as crioinjúrias durante a congelação e descongelação seminal (Salmito-Vanderley et al., 2012).

Dentre os diluentes, destaca-se a glicose, facilmente adquirida como uma solução estéril, que pode ser manipulada em campo, sem a necessidade de estrutura laboratorial complexa (Viveiros et al., 2009). A glicose já foi utilizada com bons resultados para diferentes espécies, como *Prochilodus lineatus* (Viveiros et al., 2009), *Piaractus brachyomus* (Nascimento et al., 2010) e *Brycon insignis* (Viveiros et al., 2011).



Quanto aos crioprotetores, o dimetilsulfóxido (DMSO) é o agente crioprotetor utilizado, com sucesso, na criopreservação seminal da maioria das espécies Characiformes sul-americanas (Carolsfeld et al., 2003). Outro crioprotetor, alternativo ao DMSO, é o metilglicol (MG), já testado com bons resultados na criopreservação de sêmen de *P. lineatus* (Viveiros et al., 2009) e *P. brachyponomus* (Nascimento et al., 2010), entre outros.

No processo de criopreservação, as peculiaridades de cada espécie e os diversos aspectos do protocolo utilizado podem influenciar a qualidade do sêmen descongelado, o que gera a necessidade de elaboração de protocolos adaptados a cada espécie. Para isso, é necessário padronizar etapas e parâmetros do processo de congelamento (Carneiro et al., 2012), entre eles a determinação da melhor taxa de diluição (sêmen:diluidor), dos melhores diluentes e crioprotetores, assim como da melhor combinação entre eles.

Dessa forma, este estudo teve como objetivos caracterizar o sêmen de *Prochilodus brevis* e avaliar a utilização de diferentes crioprotetores e taxas de diluição na criopreservação do sêmen dessa espécie por meio de análise cinética e morfológica.

## Material e Métodos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (UECE) com a seguinte numeração: 12776936-6. O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia da Reprodução de Peixes (LBRP) da UECE, em Fortaleza, Ceará, Brasil.

Utilizou-se um total de 55 machos de curimatã comum, pertencentes ao plantel de reprodutores do LBRP, que foram pesados e induzidos hormonalmente à espermiacção, por via intracelomática, com dose única de extrato hipofisário de carpa comum (*Cyprinus carpio*) (EHC) na proporção de 3 mg/kg de peso animal. Após 18 h da indução hormonal, os animais foram sedados com solução à base de óleo de cravo (Eugenol; União Vegetal Suplementos Nutricionais Ltda.), até que fosse evidenciada sua perda de equilíbrio. Ao atingir esse estado, o animal foi submetido à coleta de sêmen.

Para a coleta, o orifício genital dos machos foi enxuto com papel-toalha, a fim de evitar contaminação por água, sangue, fezes ou urina. A espermiacção foi realizada por meio de uma leve pressão abdominal no sentido anteroposterior, o sêmen foi coletado em tubos graduados de polietileno e mantido em caixa térmica com gelo, a aproximadamente 4°C, até que fosse analisado e processado.

Foram selecionadas para os experimentos as amostras não contaminadas e que exibiam motilidade  $\geq 80\%$ , após a ativação com água do tanque.

### Experimento 1

Para a caracterização seminal, foram realizadas quatro coletas, utilizando-se 10 animais em cada ( $n = 40$ ). As amostras *in natura* foram destinadas às seguintes análises:

- volume do ejaculado (mL) – aferido por meio de tubos graduados;
- osmolaridade seminal – mensurada pela deposição de 100  $\mu\text{L}$  de sêmen de cada animal em osmômetro digital de refrigeração Peltier (Roebing, Alemanha);
- pH seminal (0-14) – obtido por meio da utilização de fitas de pH (Merck-Alemanha), umedecidas com 10  $\mu\text{L}$  de sêmen de cada animal;
- motilidade espermática – expressa pela porcentagem de espermatozoides móveis, em escala arbitrária de 0-100%, por meio de análise subjetiva em microscopia óptica (400x), após a ativação de 2  $\mu\text{L}$  de sêmen com 100  $\mu\text{L}$  de água do tanque;
- concentração espermática – estimada por meio de contagem das células em câmara de Neubauer por meio de microscopia ótica (400x), após a fixação destas em solução de citrato formolizado a 4% na proporção de 1:4000 (sêmen:fixador);
- morfologia espermática – analisada por meio da observação de esfregaços de sêmen corados com rosa bengala (1:10 – corante:sêmen). As leituras foram realizadas com auxílio de microscópio óptico de contraste de fase (Nikon® H550S, ECLIPSE 50i, Japan). O exame consistiu na observação da presença de morfoanormalias de cabeça (microcefalia e macrocefalia) e cauda, de acordo com a classificação usada por Galo et al. (2011), de 100 espermatozoides por lâmina, duas lâminas por animal.

### Experimento 2: Criopreservação

Foram feitas duas novas coletas, a partir das quais foram formados 10 *pools* de sêmen, no total, compostos de três animais cada.

Cada *pool* ( $n = 10$ ) foi submetido a seis tratamentos, resultantes da combinação entre duas soluções diluidoras e três taxas de diluições (1:3, 1:6 ou 1:9 – sêmen:diluidor). As soluções diluidoras foram compostas por glicose a 5% (Fresenius Kabi Brasil Ltda.), associada aos crioprotetores DMSO (Vetec Química Fina Ltda., Rio de Janeiro, Brasil) ou metilglicol (Vetec Química Fina Ltda., Rio de Janeiro, Brasil), numa proporção final de 90% de glicose e de 10% do crioprotetor.

Cada tratamento foi envasado em duas palhetas francesas de 0,25 mL, totalizando 120 palhetas (10 pools x seis tratamentos x duas palhetas replicadas). Após envase, as palhetas foram vedadas com álcool polivinílico e mantidas sob refrigeração (4°C) por 15 min em tempo de equilíbrio. Em seguida, as palhetas foram congeladas em *dry shipper* por 15 min e, posteriormente, transferidas para um botijão de nitrogênio líquido a -196°C. Após 15 dias, o sêmen foi descongelado em banho-maria a 25°C por 30 s.

Para as análises das amostras, uma alíquota de cada pool *in natura* e pós-descongelamento foi fixada para a análise da morfologia espermática. A confecção dos esfregaços foi realizada utilizando-se o mesmo procedimento descrito no experimento 1.

Outra alíquota dos pools foi utilizada para a avaliação da cinética espermática do sêmen *in natura* e pós-descongelado. Para tanto, sobre uma câmara de Makler, 1 µL de sêmen foi homogeneizado com 100 µL de solução ativadora (NaCl 50 mM – 100 mOsm) e submetido imediatamente à análise.

As análises foram feitas utilizando-se o sistema de análise seminal auxiliada por computador (CASA), por meio do *software Sperm Class Analyser* (SCA, Microoptics, Barcelona, Espanha, versão 3.2). Foram analisados os seguintes parâmetros: percentual de espermatozoides móveis (motilidade – %), velocidade curvilínea (VCL – µm/s), velocidade em linha reta (VSL – µm/s) e velocidade média do percurso (VAP – µm/s).

#### Análise estatística

Os dados foram inicialmente submetidos aos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett para verificação da normalidade da distribuição dos resíduos e homogeneidade de variâncias entre os tratamentos, respectivamente. Quando confirmado o atendimento das exigências para realização da análise de variância (ANOVA), esta foi então executada com auxílio do procedimento GLM do Programa SAS, 2002, considerando-se um delineamento experimental inteiramente ao acaso, em arranjo fatorial 2 x 3 (crioprotetores x diluições), e a interação entre crioprotetor e diluição. Quando algum dos efeitos principais ou a interação demonstrou ser significativo, o teste de Student-Newman-Keuls (SNK) foi aplicado para comparação das médias. Nos casos em que não houve atendimento das exigências para realização da ANOVA, mesmo após transformação de dados (logarítmica, radicial ou angular), foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Diferenças foram consideradas significativas quando  $P < 0,05$ , e os resultados foram apresentados como média ± erro-padrão das médias.

### Resultados

Os resultados referentes à caracterização seminal de *P. brevis*, assim como o peso dos animais, encontram-se descritos na Tab. 1.

As análises cinética e morfológica das amostras *in natura* a serem criopreservadas forneceram os seguintes valores (médias ± erro-padrão): 98,56 ± 0,24% de espermatozoides móveis; VCL = 108,27 ± 6,76 µm/s; VSL = 45,80 ± 1,92 µm/s; VAP = 84,49 ± 4,65 µm/s; e 94,80 ± 0,63% de espermatozoides morfolologicamente normais. Tais resultados foram superiores aos valores obtidos do sêmen descongelado ( $P < 0,05$ ), exceto com relação à morfologia espermática, que não apresentou diferença entre o sêmen *in natura* e criopreservado ( $P > 0,05$ ).

Tabela 1. Média ± desvio-padrão do peso e dos parâmetros do sêmen *in natura* de *Prochilodus brevis* (n=40).

Parâmetro	Média ± D.P.
Peso animal (g)	477,68 ± 88,13
Volume seminal (mL)	1,31 ± 0,64
pH	8,21 ± 0,27
Osmolaridade (mOsm)	276,18 ± 23,70
Concentração ( $\times 10^9$ spz/mL)	22,26 ± 9,34
Motilidade total (%)	95,54 ± 3,63
Espermatozoides morfolologicamente normais (%)	97,21 ± 1,46

Para todos os parâmetros cinéticos avaliados, o sêmen congelado utilizando a glicose associada ao MG apresentou resultados superiores ( $P < 0,05$ ), quando comparado às amostras criopreservadas com o DMSO, independentemente da taxa de diluição. Entretanto, não foi observada diferença ( $P > 0,05$ ) nas taxas de espermatozoides morfolologicamente normais, que variaram de 75,95 ± 1,32 a 84,05 ± 2,10% (Tab. 2).

Com relação às taxas de diluição, quando houve diferença entre elas ( $P < 0,05$ ), a proporção 1:3 tendeu a apresentar os melhores resultados (motilidade, VCL, VSL e VAP) quando o crioprotetor utilizado foi o MG, apesar de não ter havido diferença ( $P > 0,05$ ) entre 1:3 e 1:6. Contudo, quando o sêmen foi congelado utilizando DMSO, os melhores resultados foram alcançados com a diluição 1:9 ( $P < 0,05$ ), exceto para o parâmetro VCL, quando não se observou diferença estatística ( $P > 0,05$ ; Tab. 2).

Desse modo, os melhores resultados foram alcançados com a utilização do MG associado às taxas de diluição 1:3 e 1:6, seja para taxa de motilidade espermática (41,04 ± 6,11 e 43,05 ± 6,75%, respectivamente),



VCL ( $67,65 \pm 2,88$  e  $65,01 \pm 1,68$   $\mu\text{m/s}$ , respectivamente), VSL ( $34,17 \pm 2,72$  e  $32,77 \pm 1,11$   $\mu\text{m/s}$ , respectivamente) ou VAP ( $53,20 \pm 4,18$  e  $48,72 \pm 0,99$   $\mu\text{m/s}$ , respectivamente; Tab. 2).

Além disso, foi observado um efeito significativo da interação entre o crioprotetor e a taxa de diluição nos parâmetros VCL ( $P < 0,0142$ ) e VSL ( $P < 0,0015$ ).

Tabela 2. Média  $\pm$  erro-padrão dos parâmetros cinéticos (porcentagem de espermatozoides móveis – motilidade; velocidade curvilínea – VCL; velocidade em linha reta – VSL; e velocidade média do percurso – VAP) e morfológicos (porcentagem de espermatozoides normais – morfologia) do sêmen pós-descongelamento de *Prochilodus brevis* ( $n=10$  pools) em função do crioprotetor e da taxa de diluição utilizados.

Parâmetro	Crioprotetor	Diluição		
		1:3	1:6	1:9
Motilidade (%)	MG	$41,04 \pm 6,11^{\text{Aa}}$	$43,05 \pm 6,75^{\text{Aa}}$	$41,26 \pm 4,51^{\text{Aa}}$
	DMSO	$11,36 \pm 1,48^{\text{Bb}}$	$13,16 \pm 1,73^{\text{Bb}}$	$23,98 \pm 2,86^{\text{Ab}}$
VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	MG	$67,65 \pm 2,88^{\text{Aa}}$	$65,01 \pm 1,68^{\text{Aba}}$	$59,01 \pm 2,57^{\text{Ba}}$
	DMSO	$35,91 \pm 1,45^{\text{Ab}}$	$35,90 \pm 0,98^{\text{Ab}}$	$38,53 \pm 1,33^{\text{Ab}}$
VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	MG	$34,17 \pm 2,72^{\text{Aa}}$	$32,77 \pm 1,11^{\text{Aba}}$	$27,78 \pm 1,65^{\text{Ba}}$
	DMSO	$15,28 \pm 2,03^{\text{Bb}}$	$16,41 \pm 1,56^{\text{Bb}}$	$22,26 \pm 1,62^{\text{Ab}}$
VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	MG	$53,20 \pm 4,18^{\text{Aa}}$	$48,72 \pm 0,99^{\text{Aba}}$	$44,07 \pm 2,17^{\text{Ba}}$
	DMSO	$24,50 \pm 1,58^{\text{Bb}}$	$25,39 \pm 1,26^{\text{Bb}}$	$31,27 \pm 1,44^{\text{Ab}}$
Morfologia (%)	MG	$80,30 \pm 1,05^{\text{Aa}}$	$79,55 \pm 1,81^{\text{Aa}}$	$75,95 \pm 1,32^{\text{Aa}}$
	DMSO	$84,05 \pm 2,10^{\text{Aa}}$	$79,70 \pm 3,25^{\text{Aa}}$	$78,45 \pm 1,88^{\text{Aa}}$

<sup>A, B</sup> Letras maiúsculas distintas representam diferenças significativas entre as diluições, dentro de um mesmo parâmetro ( $P < 0,05$ ).

<sup>a, b</sup> Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas entre crioprotetores, dentro de um mesmo parâmetro ( $P < 0,05$ ).

## Discussão

Inicialmente, buscou-se caracterizar o sêmen *in natura* dessa espécie, visando conhecer melhor o material a ser trabalhado, já que as características do sêmen *in natura* podem estar relacionadas à qualidade seminal após a criopreservação. Isso faz com que a avaliação dessas características seja indispensável na rotina de reprodução artificial de qualquer espécie (Solis-Murgas et al., 2011).

Apesar de não terem sido encontrados na literatura trabalhos descrevendo as características seminais de *P. brevis*, foram obtidos, neste estudo, valores próximos aos encontrados para outras espécies do gênero *Prochilodus*, cujos valores estão compreendidos entre: 254 e 1400 g – peso corporal; 1,05 e 1,09 mL – volume seminal; 286 e 337 mOsm – osmolaridade seminal; 17,37 e 19,2.10<sup>9</sup> espermatozoides/mL – concentração espermática; 89 e 99,8% de espermatozoides móveis – motilidade; e aproximadamente 90% de espermatozoides morfológicamente normais – morfologia (Kavamoto et al., 1999; Felizardo et al., 2010; Viveiros et al., 2010; Martínez et al., 2012; Nascimento et al., 2012; Gonçalves et al., 2013). O pH seminal também estava dentro do esperado para peixes de água doce, o qual varia de 6,5 a 8,5 (Tabares et al., 2005).

Entretanto, deve-se ressaltar que tais características podem ser influenciadas por muitos fatores, tais como: espécie, estado nutricional, idade e peso do animal, tipo e dosagem da indução hormonal, clima, período do ano, frequência de coleta, entre outros (Solis-Murgas et al., 2011).

No tocante aos resultados obtidos do sêmen descongelado, foi evidente o decréscimo da qualidade seminal em comparação ao sêmen fresco, revelando que, assim como esperado, o processo de criopreservação provoca danos que afetam o desempenho das células espermáticas (Martínez e Pardo-Carrasco, 2013).

Com relação à morfologia espermática de peixes, não existem valores de referência preestabelecidos para julgar o material espermático apto ou não à fertilização. No entanto, os resultados de porcentagem de espermatozoides morfológicamente normais (75,95 a 84,05%) encontrados na presente pesquisa assemelham-se aos de Felizardo et al. (2010; 69,18 a 79,34%) para sêmen criopreservado de *P. lineatus*. Além disso, está de acordo com o preconizado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal para outras espécies animais, que determina que os índices de anormalidades morfológicas dos espermatozoides descongelados (no presente estudo variaram de 15,95 a 24,05%) permitidos são de 30% para bovinos e equinos, estando apenas pouco acima do recomendado para ovinos e suínos (20%; Colégio Brasileiro de Reprodução Animal – CBRA, 2013).

A ausência de diferença estatística nos resultados de morfologia espermática indica que os protocolos utilizados foram igualmente eficientes na manutenção da normalidade morfológica dos espermatozoides e que a manipulação do sêmen foi feita de modo adequado. Isso porque, quando não provocadas por falhas na





espermatogênese, as morfoanomalias espermáticas podem ser causadas por choques térmico ou osmótico durante a criopreservação ou por falhas durante a coleta e manipulação do sêmen (Solis-Murgas et al., 2011).

Os valores encontrados para as velocidades (VCL, VSL e VAP) no sêmen pós-descongelado, independentemente do tratamento, foram superiores aos obtidos para *P. lineatus* por Viveiros et al. (2010), que encontraram VCL = 49,1  $\mu\text{m/s}$ ; VSL = 24,3  $\mu\text{m/s}$  e VAP = 36,0  $\mu\text{m/s}$ . Bons resultados referentes a esses parâmetros são de notável importância, uma vez que existe uma correlação positiva das velocidades espermáticas com a taxa de fertilização, especialmente da velocidade curvilínea, de acordo com os resultados encontrados para *P. lineatus* (Viveiros et al., 2010).

Com relação aos crioprotetores utilizados, foi observado que, apesar de o DMSO ser um crioprotetor amplamente testado e apresentar bons resultados em diversas espécies de Characiformes (Godinho e Viveiros, 2011), o sêmen criopreservado com DMSO alcançou, no presente estudo, resultados de motilidade espermática significativamente inferiores quando comparado ao MG, corroborando resultados encontrados para *P. lineatus*, cuja motilidade foi  $\geq 93\%$  (MG) e  $\leq 50\%$  (DMSO; Viveiros et al., 2009), e para *C. macropomum*, 57% (MG) e 23% (DMSO; Carneiro et al., 2012).

Apesar de apresentar toxicidade menor do que alguns crioprotetores, como o glicerol, já foi relatado que o DMSO apresenta elevada toxicidade. Além disso, concentrações ou tempos de equilíbrio elevados desse crioprotetor podem provocar redução significativa na qualidade do sêmen de peixes. Assim, o tempo de equilíbrio utilizado neste trabalho pode ter sido demasiado, fazendo com que as células ficassem superexpostas à ação tóxica dos crioprotetores. De outro modo, o tempo de equilíbrio pode não ter sido suficiente para que o crioprotetor penetrasse adequadamente nas células, diminuindo sua capacidade protetora (Bedore, 1999). Salienta-se que alguns autores sugerem ser o tempo de equilíbrio desnecessário (Nascimento et al., 2012).

A diferença estatística entre as taxas de diluição, que evidenciaram a tendência de melhores resultados utilizando as proporções 1:3 e 1:6 como taxa de diluição para o diluidor glicose + MG, pode estar relacionada à sensibilidade dos espermatozoides dessa espécie ao crioprotetor, já que, nessas diluições, as células espermáticas entram em contato com uma quantidade menor dele. Isso demonstra que os espermatozoides de diferentes espécies apresentam variados graus de sensibilidade a diferentes crioprotetores (Peñaranda et al., 2009).

Além disso, é possível que a interação diluente + crioprotetor tenha sido mais efetiva entre glicose e MG do que entre glicose e DMSO, assim como o observado por Viveiros et al. (2009), fazendo com que, mesmo com uma menor proporção sêmen:diluidor, a proteção aos espermatozoides fosse eficiente. Essa eficiência, no entanto, foi menor quando se utilizou a associação glicose + DMSO, levando à necessidade de uma maior quantidade de diluidor para a obtenção de melhores resultados, observados quando se utilizou a diluição 1:9. Tais hipóteses são reforçadas pela presença de uma forte interação do diluidor com as taxas de diluição, observada no presente estudo, em especial nos parâmetros VCL ( $P < 0,0142$ ) e VSL ( $P < 0,0015$ ).

O estado funcional das células descongeladas é resultado de injúrias acumuladas durante todo o processo de congelamento, de modo que os danos celulares de diversos graus de severidade podem ser induzidos por diferentes mecanismos e variáveis em cada fase da criopreservação (Medeiros et al., 2002). Além das variáveis testadas no presente estudo, outras podem interferir nos resultados pós-descongelamento, tais como concentração e toxicidade dos crioprotetores (Peñaranda et al., 2009), taxa de resfriamento, tempo e método de adição dos crioprotetores, métodos de envase, condições de congelamento, tempo de descongelamento, método de análise da motilidade (Salmito-Vanderley et al., 2012).

A redução de alguns valores encontrados para os parâmetros avaliados neste estudo não se traduz, necessariamente, em baixa capacidade fertilizante, uma vez que a alta velocidade individual de alguns espermatozoides dentro de um ejaculado pode ser suficiente para se obterem boas taxas de fertilização (Haugland et al., 2009). Tal fato foi observado no trabalho de Menezes et al. (2008), que alcançou 76% de taxa de fertilização com 20% de motilidade em sêmen criopreservado de *C. macropomum*.

## Conclusões

O sêmen *in natura* de *Prochilodus brevis* possui características que se enquadram no padrão encontrado para diferentes espécies do gênero *Prochilodus*. Entre os tratamentos empregados neste estudo, a associação de glicose a 10% de metilglicol, numa taxa de diluição de 1:3 ou 1:6, é a mais indicada para a criopreservação do sêmen de curimatã comum.

## Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e à Financiadora de Estudos e Projetos, pelo apoio financeiro.

## Referências

Araújo SA, Gurgel HCB. Aspectos da biologia de *Prochilodus cearensis* (Steindachner, 1911) (Characiformes, Prochilodontidae) no açude Itans/Caicó, Rio Grande do Norte. Rev Bras Zool, v.4, p.85-96, 2002.



- Bedore AG.** Características e criopreservação do sêmen de pacu-caranha (*Piaractus mesopotamicus*) e de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). 1999. 53f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 1999.
- Carneiro PCF, Azevedo HC, Santos JP, Maria AN.** Cryopreservation of tambaqui (*Colossoma macropomum*) semen: extenders, cryoprotectants, dilution ratios and freezing methods. *Cryo Lett*, v.33, p.285-393, 2012.
- Carolsfeld J, Godinho HP, Zaniboni-Filho E, Harvey BJ.** Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. *J Fish Biol*, v.63, p.472-489, 2003.
- Colégio Brasileiro de Reprodução Animal.** Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3.ed. Belo Horizonte, CBRA, 2013.
- Felizardo VO, Mello RA, Murgas LDS, Andrade ES, Drumond MM, Rosa PV.** Effect of cryopreservant combinations on the motility and morphology of curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm. *Anim Reprod Sci*, v.122, p.259-263, 2010.
- Galo JM, Streit Jr DP, Sirol RN, Ribeiro RP, Digmayer M, Andrade VXL, Ebert AR.** Spermatic abnormalities of piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849) after cryopreservation. *Braz J Biol* v.71, p.693-699, 2011.
- Godinho, HP, Viveiros ATM.** Current status of sperm cryopreservation of brazilian characiform fishes. In: Tiersch TR, Green CC (Ed.). *Cryopreservation in aquatic species*. Baton Rouge, LA: World Aquaculture Society, 2011. p.875-884.
- Gonçalves ACS, Nascimento AF, Costa AC, Leal MC, Viveiros ATM.** Initiation and suppression of sperm motility is osmolality-dependent in two South American fish species: streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) and piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). *Anim Reprod*, v.10, p.62-70, 2013.
- Haugland T, Rudolfsen G, Figenschou L, Folstad I.** Sperm velocity and its relation to social status in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Anim Reprod Sci*, v.115, p.231-237, 2009.
- Kavamoto ET, Barnabe VH, Campos BES.** Anormalidades morfológicas nos espermatozoides do curimatã, *Prochilodus lineatus* (Steindachner, 1881) (Osteichthyes, Characiformes, Prochilodontidae). *Bol Inst Pesca*, v.25, p.61-66, 1999.
- Martínez JG, Pardo SC.** Effect of freezing and thawing rates on sperm motility in Bocachico *Prochilodus magdalenae* (Pisces, Characiformes). *Rev MVZ Córdoba*, v.18, p.3295-3303, 2013.
- Martínez JG, Tarazona-Morales AM, Pardo-Carrasco SC.** Sperm cryopreservation of freshwater fish bocachico (*Prochilodus magdalenae*) in DMSO and glucose and its effects on fertilization and hatching efficiency. *Anim Reprod*, v.9, p.19-26, 2012.
- Medeiros CMO, Forell F, Oliveira ATD, Rodrigues JL.** Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*, v.57, p.327-344, 2002.
- Menezes JTB, Queiroz LJ, Doria CRC, Menezes Jr JB.** Avaliação espermática pós-descongelamento em tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). *Acta Amaz*, v.38, p.365-368, 2008.
- Nascimento AF, Maria AN, Pessoa NO, Carvalho MAM, Viveiros ATM.** Out-of-season sperm cryopreservation in different media of the Amazonian freshwater fish pirapitinga (*Piaractus brachypomus*). *Anim Reprod Sci*, v.118, p.324-329, 2010.
- Nascimento MM, Nascimento WS, Chellapa NT, Chellapa S.** Biologia reprodutiva do curimatã comum, *Prochilodus brevis* (Characiformes: Prochilodontidae) no açude Marechal Dutra, Rio Grande do Norte, Brasil. *Biota Amaz*, v.2, p.31-43, 2012.
- Peñaranda DS, Pérez L, Gallego V, Jover M, Asturiano JF.** Improvement of European eel sperm cryopreservation method by preventing spermatozoa movement activation caused by cryoprotectants. *Cryobiology*, v.59, p.119-126, 2009.
- Salmite-Vanderley CSB, Vieira MJAF, Leite LV, Oliveira FCE, Linhares FRA, Salgueiro CCM, Nunes JF.** Meios de congelação para conservação de sêmen de peixes da família Characidae. *Ciênc Anim*, v.22, p.255-268, 2012.
- Solis-Murgas LD, Felizardo VO, Ferreira MR, Andrade ES, Veras GC.** Importância da avaliação dos parâmetros reprodutivos em peixes nativos. *Rev Bras Reprod Anim*, v.35, p.186-191, 2011.
- Tabares J, Tarazona A, Oliveira M.** Fisiología de la activación del espermatozoide en peces de agua dulce. *Rev Col Cienc Pec*, v.18, p.149-16, 2005.
- Viveiros ATM, Amaral TB, Orfão LH, Isaú ZA, Caneppele D, Leal MC.** Sperm cryopreservation of tiete tetra *Brycon insignis* (Characiformes): effects of cryoprotectants, extenders, thawing temperatures and activating agents on motility features. *Aquacult Res*, v.42, p.858-865, 2011.
- Viveiros ATM, Nascimento AF, Orfão LH, Isaú ZA.** Motility and fertility of the subtropical freshwater fish streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) sperm cryopreserved in powdered coconut water. *Theriogenology*, v.74, p.551-556, 2010.
- Viveiros ATM, Orfão LH, Maria AN, Alamman IBA.** Simple, inexpensive and successful freezing method for curimba *Prochilodus lineatus* (Characiformes) semen. *Anim Reprod Sci*, v.112, p.293-300, 2009.