

## **Análise da técnica de criopreservação de sêmen do peixe japonês *Carassius auratus* (Linnaeus, 1766) para a formação de um banco de germoplasma** - Cryopreservation technical analysis of Japanese ornamental fish semen *Carassius auratus* (Linnaeus, 1766), aimed at the formation of a germoplasm bank

Maria Fernanda da Silva Souza<sup>1</sup>, Hilton Amaral Jr<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Oceanógrafa, UNIVALI, Itajaí, [nana.ssouza@hotmail.com](mailto:nana.ssouza@hotmail.com) <sup>2</sup>Medico Veterinário, Pesquisador da EPAGRI; Rua 1950 nº 590, Balneário Camboriú SC, [hilton@epagri.rct-sc.br](mailto:hilton@epagri.rct-sc.br)

---

### **Abstract**

Fish semen freezing with liquid nitrogen it's a valuable technique to preserve genetic material which can be used to genetic improvement programs of economic interest species, besides; it allows the material storage for a long-term period. However, each specie requires a specific protocol. The aim of this study was to develop a semen preservation technique to the Japanese ornamental fish *Carassius auratus* through the cryopreservation process. The sperm needs the addition of cryoprotectant solutions to its appropriate freezing. As the aim of cryopreservation it's to obtain viable sperm which keeps its fertility, the motility analysis, post-freezing, it's one of the most used practices to examine the viability of cryopreserved sperm. So the present study used the motility rate and time to evaluate the effect of semen exposition to different concentrations of the cryoprotectant dimetilsulfoxide, the effect of semen exposition to different activating solution (NaCl 0,3%, NaHCO<sub>3</sub> 1% and distilled water), and the difference of sperm motility between thawed semen and fresh semen. In order to do it, it was used a optic microscopy linked to a digital camera which registered the sperm activity through video. Statistically, there was no difference in the effect of the different concentrations of DMSO and activating solutions in the range and time of motility of fresh semen, however the 10% DMSO concentration and the NaCl 0,3% activating solution demonstrated a bigger average tendency. Therefore, in the semen freezing experiment, DMSO 10% was used as external cryoprotectant, and NaCl 0,3% as the activating solution. Fresh semen also activated with NaCl was used as control. Both treatments showed difference, whereas control demonstrated a bigger sperm motility range,

concluding that the freezing process was not efficient. Yet, the difference of sperm motility duration between thawed and control did not show difference.

**Key words:** Cryopreservation, *Carassius auratus*, sperm motility.

---

## Resumo

O congelamento de sêmen de peixes em nitrogênio líquido trata-se de uma técnica muito valiosa para a preservação de material genético que pode ser utilizado para programas de melhoramento genético de espécies de interesse econômico, além de permitir o armazenamento desse material por longos períodos. Para tanto, cada espécie exige um específico protocolo. O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma técnica de preservação do sêmen para o peixe ornamental japonês *Carassius auratus* através do processo de criopreservação. O espermatozóide necessita da adição de soluções crio protetoras para seu congelamento adequado. Como o objetivo da criopreservação é obter espermas viáveis que mantenham sua fertilidade, a análise da motilidade, pós-congelamento, é uma das técnicas mais utilizadas para examinar a viabilidade de espermas crio preservados. Dessa forma o presente estudo utilizou a taxa e duração da motilidade espermática para avaliar o efeito da exposição de sêmen á diferentes concentrações do crio protetor dimetilsulfóxido, o efeito da ativação dos espermatozóides em diferentes soluções ativadoras (NaCl 0,3%, NaHCO<sub>3</sub> 1% e água destilada), e a diferença da motilidade espermática entre sêmen descongelado e sêmen fresco. Para isso, utilizou-se um microscópio de luz acoplado á uma câmera digital que registrou a atividade espermática através de vídeos. Estatisticamente, não houve diferença no efeito das diferentes concentrações de DMSO e soluções ativadoras na taxa e duração da motilidade do sêmen fresco, porém a concentração de 10% de DMSO e a solução ativadora NaCl 0,3% demonstraram uma tendência á maior média. Dessa forma, no experimento de congelamento de sêmen, utilizou-se DMSO 10% como crio protetor permeável integrado com a gema de ovo como crio protetor impermeável, e a solução ativadora foi o NaCl 0,3%. O controle foi considerado como o sêmen fresco também ativado com NaCl. Os dois tratamentos apresentaram diferença, aonde o controle demonstrou maior taxa de motilidade espermática. Porém, a diferença do tempo de duração do sêmen descongelado e o controle não apresentaram diferença.

**Palavras-chave:** Criopreservação, *Carassius auratus*, motilidade espermática.

---

## Introdução

Aqüicultura é um termo amplamente utilizado nas últimas duas décadas para se referir a todas as formas de cultivo de animais e plantas aquáticas em ambiente marinho, doce e estuarino (KUTTY & PILLAY, 1990).

Inserida na aqüicultura está a piscicultura, que representa o cultivo de peixes (MILLANI, 2007). Esta é uma das alternativas econômicas promissoras que vem se firmando (SANCHES et al., 1995). É muito provável que a aqüicultura teve início com o cultivo de peixes de água doce, e a sua ocorrência até os dias de hoje torna essa modalidade, atualmente, como a mais economicamente importante (LANDAU, 1992).

Dentre as diversas vertentes da piscicultura, a produção de peixes ornamentais é uma modalidade em plena expansão nas últimas décadas (ZUANON, 2007). De acordo com Lima et al. (2001) observa-se um aumento anual no comércio internacional de organismos aquáticos ornamentais com uma taxa média de 14%, chegando a cifras superiores a 200 milhões de dólares por ano para as exportações.

Pouco se sabe sobre a origem desta atividade, porém pode-se assumir que esta se desenvolveu na China, onde o kinguio (*Carassius auratus*) é o peixe ornamental tradicional e onde se deu início ao cultivo de peixes para alimentação, há aproximadamente 2000 anos AC. Em meados do século XIX, a aqüicultura do kinguio e carpa koi (*Cyprinus carpio*) já se encontravam bem estabelecida no Japão (STICKNEY, 2000).

Os peixes japoneses de água doce compreendem 15 ordens, 35 famílias e 96 gêneros, com 211 espécies e subespécies. A maioria deste pertence à família *Cyprinidae* (29% das espécies e subespécies) (FAUSH et al., 1998). De acordo com FAO (2007), esta família integra a espécie *Carassius auratus*, sendo parente próximo da carpa comum, *Cyprinus carpio*, e do carpim *Carassius auratus*. Esta espécie agrega grande valor comercial, considerando-se que é um dos peixes mais criados no mundo pelos aquarofilistas, devido seu grande polimorfismo e por seleção poderem-se obter deformações, principalmente nos olhos, nadadeiras e outras partes do corpo, como também variada coloração (ROSA et al., 1994), permitindo grandes variações dentro da espécie

Para a preservação desse material genético, que pode ser utilizado com finalidade de melhoramento genético de espécies, existe uma técnica muito valiosa que consiste no congelamento de sêmen de peixes. Muitas técnicas de manipulação de sêmen já foram estabelecidas para várias espécies de peixes, e entre seus principais destaques encontram-se os ciprinídeos (CARNEIRO, 2007).

A criopreservação permite o armazenamento do sêmen em nitrogênio líquido, a  $-196^{\circ}\text{C}$ , mantendo-se, assim, a viabilidade deste por tempo indefinido. Dessa forma, o sêmen pode ser crio preservado para ser utilizado em reproduções futuras, possibilitando limitar o estoque de machos na piscicultura intensiva, propiciando a exploração mais racional de reprodutores geneticamente selecionados (FELIZARDO, 2008).

No tocante à atividade produtiva representada pela piscicultura, há muitas vantagens no uso de técnicas de conservação de sêmen de peixes (CARNEIRO, 2007). A crio conservação tem contribuído para o desenvolvimento e aplicação de métodos de controle reprodutivo favorecendo uma manipulação genética, seleção de reprodutores e redução do estoque de machos uma vez que oferece gametas para indeterminado período de tempo (SENHORINI et al., 2006). Além disso, essa técnica facilita um dos grandes objetivos do piscicultor que é de eliminar indivíduos inapropriados e praticar a seleção genética, combinando as qualidades desejáveis de diferentes variedades de peixes da mesma espécie e/ou espécies diferentes (ROSA et al., 1994).

O objetivo da criopreservação é obter espermatozoides viáveis que mantenham sua fertilidade. A análise da motilidade, pós-congelamento, é uma das técnicas mais utilizadas para examinar a viabilidade de espermatozoides crio preservados (YANG et al., 2009). Pode-se analisar as taxas de motilidade de sêmen associando estas à escalas, como a utilizada por Fribourg (1966), para sêmen pós-descongelado de *C. auratus*, através de uma escala que varia de 0 a 5, demonstrada na tabela 2:

**Tabela 2** – Escala de 0 a 5 associada à taxa de motilidade espermática, utilizada por Fribourg (1966).

Escala	Taxa de motilidade espermática (%)
0	Sem motilidade
1	10 - 20 %
2	20 - 40 %
3	40 - 60 %
4	60- 80 %
5	> 80 %

Diferentemente das hemácias, células com alta permeabilidade que possibilitam rápida desidratação, o espermatozoide necessita da adição de substâncias com ação crio protetora e diluidora para o seu congelamento adequado, que são utilizadas para prevenir as crio injúrias dos espermatozoides (FELIZARDO, 2008). O crio protetor mais conhecido e utilizado para sêmen de peixes é o dimetilsulfóxido (DMSO) (CARNEIRO,

2007), que é do grupos dos crio protetores permeáveis, ou intracelulares, e é capaz de passar pela membrana celular e mover-se para o interior das células, diminuindo a velocidade da formação de gelo da água intracelular e reduzindo o efeito da mudança do volume da célula (MORAES, 2004).

Os crio protetores internos combinados com os externos promovem uma proteção mais completa, atuando ao nível de membrana celular (LEUNG et al., 1991 apud MARIA, 2005). Os crio protetores extracelulares revestem a célula externamente e estabilizam sua membrana, diminuindo os danos provocados pelo congelamento. Um exemplo destes é a gema de ovo, que além de funcionar como fonte de nutrientes, também tem ação crio protetora por conter ácidos graxos e antioxidantes que auxiliam na proteção e conservação (CAROLSFELD, 2003 apud CARNEIRO, 2005)

Os crio protetores impedem as crio lesões, mas quando usados em concentrações elevadas podem se tornar tóxicos aos espermatozóides (MARIA, 2005). A toxicidade limita a concentração a que podem ser utilizados e, portanto limita a capacidade protetora desses agentes (ZHANG et al., 2005). Muitos autores afirmam que, para determinar se um protocolo é adequado para a criopreservação, devem-se realizar testes de toxicidade (CHEN & TIAN, 2005; VIVEIROS et al., 2009). Segundo Carneiro (2007), para espécies de peixes ainda pouco estudadas, sugere-se ensaios prévios envolvendo a observação da motilidade do espermatozóide em microscópio com a solução crio protetora.

A maioria dos estudos experimentais no campo da criopreservação focou-se em experimentos com o objetivo de encontrar soluções ótimas para ativação ou conservação, agentes crio preservantes, soluções de descongelamento, e taxas de congelamento e descongelamento para espermatozóides de ciprinídeos (LINHART et al., 2000; MORISAWA et al., 1983; KUROKURA et al., 1984). Entretanto, o conhecimento nesse ramo ainda encontra-se fragmentado (LAHNSTEINER et al., 2000), principalmente no que diz respeito á espécies ornamentais, sendo apenas alguns estudos destinados a criopreservação de sêmen em peixes de aquário (YANG & TIERSCH, 2009).

Sendo assim, como a aplicação desta atividade por longos períodos tem por finalidade prover a necessidade de genes para aumentar a variabilidade genética de uma determinada população, o presente trabalho propôs desenvolver a técnica do crio congelamento, descongelamento e conservação de sêmen do peixe ornamental japonês *Carassius auratus*, podendo ser utilizado para melhoramento genético na reprodução deste peixe, bem como diminuir os custos e os riscos no cultivo de reprodutores desta espécie

## **Materiais e Métodos**

Os procedimentos de congelamento do sêmen sucederam-se nas instalações da piscicultura ornamental AcquaVita, situada em Camboriú, SC, e o descongelamento e análises microscópicas foram realizadas no laboratório de fitopatologia da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina - EPAGRI, Itajaí/SC, entre os meses de setembro e novembro de 2009.

Foram selecionados vinte e dois machos de *Carassius auratus* que apresentaram com facilidade a eliminação de pequena quantidade de sêmen em resposta á leve compressão manual da cavidade abdominal no sentido da abertura genital.

### ***Efeito da toxicidade de diferentes concentrações do crio protetor DMSO sobre o sêmen fresco de C. auratus***

Na realização deste teste, foram utilizados cinco machos. O sêmen foi disponibilizado através da extrusão, e coletado com auxílio de pipeta autoclavável.

Seguindo recomendações de Godinho et al. (2003), a cada 20 µl de solução 5, 10 e 15% do crio protetor, diluiu-se 2µl de sêmen (1:10 sêmen: crio protetor). Para cada concentração realizaram-se três réplicas. Estas foram dispostas em lâminas histológicas e analisadas com o auxílio de um microscópio de luz modelo BH-2 Olympus acoplado á câmera digital Sony DSC-H10 que registrou por meio de vídeo a taxa de motilidade espermática através de avaliação subjetiva dentro do campo focal, com 400x de aumento, e a duração da motilidade espermática considerada como o tempo decorrido entre a mistura do sêmen com o crio protetor até que 10 % dos espermatozóides estivessem móveis.

### ***Efeito de diferentes soluções ativadoras sobre a motilidade espermática de sêmen fresco de C. auratus***

A fim de se estimar o tempo e a taxa de motilidade espermática do sêmen fresco de *C. auratus* ativado com diferentes soluções ativadoras, obteve-se sêmen dos mesmos peixes e da mesma forma que o experimento anterior. Alíquotas de 2 µL de sêmen foram dispostas em lâminas histológicas á qual se juntam 20 µL de umas das soluções ativadoras da motilidade espermática a serem testadas: NaHCO<sub>3</sub> 1%, NaCl 0,3% e água destilada. Após rápida homogeneização, o tempo e taxa de motilidade espermática também foram registrados seguindo o procedimento utilizado na análise da toxicidade do crio protetor.

## **Criopreservação**

Para o procedimento de congelamento de sêmen foram utilizados 17 machos. Conforme o protocolo utilizado por AMARAL (2005), os doadores de sêmen foram tratados com extrato hipofisário de carpas, na dosagem de 2 mg/kg de macho. Após 20 horas, o sêmen foi extraído com o uso de seringas plásticas graduadas. O emprego das seringas permitiu eliminar a contaminação do sêmen com fezes, sangue e principalmente com urina, uma das principais fontes de redução da qualidade do sêmen (RANA, 1995), além de evitar a perda do conteúdo.

Foram realizadas 8 amostras a partir de agrupamentos de sêmen de diferentes doadores. Os conteúdos seminiais de cada amostra foram acondicionados em um mesmo tubo de ensaio

Seguindo a metodologia utilizada por Ninhaus-Silveira et al. (2006) a solução crio protetora foi preparada com a integração de um crio protetor extracelular, a gema de ovo (5%) e o crio protetor intracelular dimetil sulfóxido (DMSO) (10%). O diluidor utilizado foi água de coco (MARIA et al., 2006). Sendo assim, utilizou-se como solução um total de 15 ml de gema de ovo, 30 ml de DMSO diluídos em 300 ml de água de coco.

Cada uma das oito amostras de sêmen foi diluída nas soluções com crio protetor + diluidor, na proporção de 1:3 (sêmen:diluidor) (Ninhaus-Silveira et al., 2006). Os tubos de ensaio foram lacrados, e suspensos três minutos sobre vapor de nitrogênio para resfriamento, e posteriormente, foram armazenados em nitrogênio líquido.

Seguindo recomendações de Magyary et al (1996), o descongelamento foi realizado, por imersão dos tubos de ensaio em banho-maria a 40°C. Estes permaneceram assim até que se observasse uma homogeneidade das amostras, que ao aparentar totalmente descongeladas, eram retiradas da água (cerca de 20 segundos).

Para determinação da viabilidade dos espermatozoides descongelados, alíquotas de 2µL do sêmen foram ativadas com 20 µL de NaCl como solução ativadora da motilidade espermática. Os registros da duração e taxa de motilidade foram conduzidos tal como os experimentos anteriores.

Para análise estatística dos testes foi utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, nível de significância = 0,05, e o não-paramétrico U de Mann-Whitney, nível de significância = 0,05. Ambas as análises foram feitas com auxílio do programa Statistica® 6.0

## Resultados e Discussões

Os resultados obtidos a partir da exposição do sêmen fresco de *C. auratus* á diferentes concentrações do crio protetor DMSO (5, 10 e 15%) e suas respectivas taxas e duração da motilidade espermática estão representados na tabela abaixo (Tabela 2).

**Tabela 2** - Média da taxa e duração da motilidade espermática do sêmen fresco de *C. auratus* expostos a diferentes concentrações do crio protetor DMSO (n=3).

[DMSO]	Tx. De motilidade (%)	Tempo (s)
5%	100	125,3
10%	100	181,5
15%	97,5	143,5

Aplicando o teste de Kruskal-Wallis nos dados referentes ao efeito da toxicidade das diferentes concentrações de DMSO sobre o tempo e taxa de motilidade espermática, obteve-se o resultado apresentado na tabela 3:

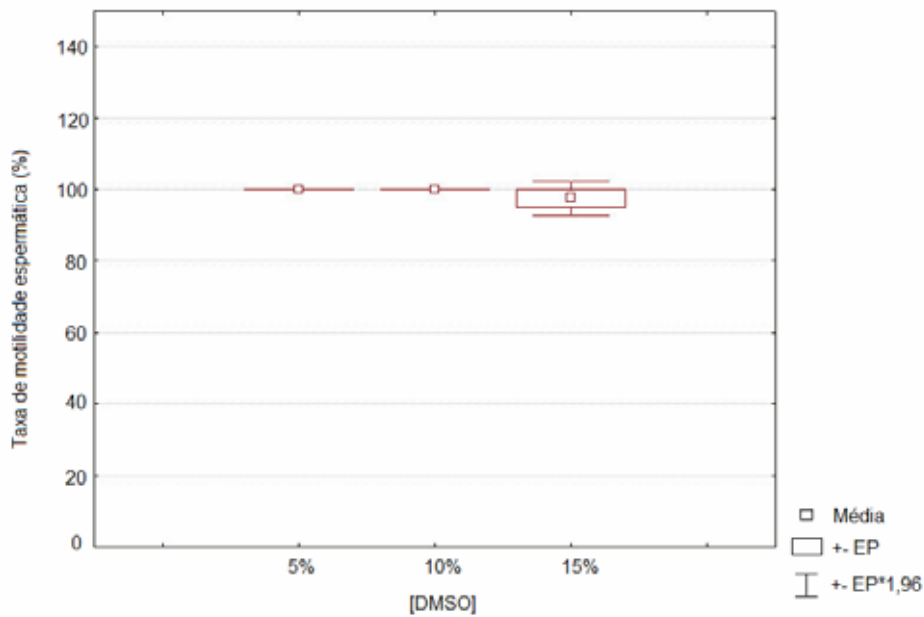
**Tabela 3** - Resultado da análise dos testes de toxicidade sobre o tempo e taxa de motilidade espermática realizado com o teste de Kruskal-Wallis.

ANÁLISE	H	p
Taxa de motilidade (%)	2	0,3679
Tempo (s)	2,22	0,3259

Não foi encontrada diferença entre a média da taxa e tempo da motilidade espermática das diversas concentrações do crio protetor DMSO, afirmando que não há variação nas suas eficiências.

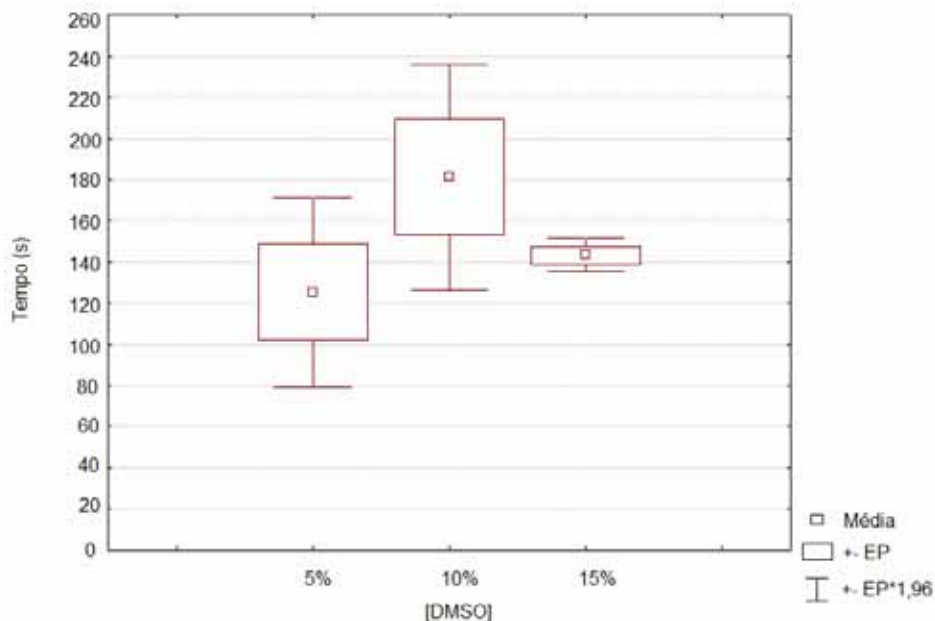
Entretanto, analisando a taxa de motilidade espermática na tabela 2 pode-se observar que há uma tendência de menor média para a concentração de 15% de DMSO, o que também pode ser observado no gráfico representado abaixo (figura 1), apesar da sobreposição dos erros padrões e intervalos de confiança.





**Figura 1** - Taxa de motilidade espermática (média  $\pm$  desvio padrão) para o sêmen fresco de *C. auratus* exposto á concentrações de DMSO, sendo: a) 5%, b) 10% e c) 15%.

Este fato foi verificado também por Godinho et al (2003), que em um experimento expondo o sêmen de tilápia-nilótica (*Oreochromis niloticus*) ás mesmas concentrações de DMSO utilizadas no presente estudo, observou que a concentração de 15% do crio protetor induziu a taxa de motilidade espermática mais baixas do que as de 5% e 10%.



**Figura 2** - Duração da motilidade espermática (média  $\pm$  desvio padrão) do sêmen fresco de *C. auratus* para diferentes concentrações de DMSO, sendo: a) 5%, b) 10% e c) 15%.

Da mesma forma, ao observar as médias do tempo da motilidade espermática (Tabela 2) e a representação desses valores no gráfico abaixo (Figura 2), a concentração de 10% de DMSO demonstrou uma tendência ao maior tempo de duração da motilidade espermática.

Huang et al (2004), propôs um estudo de criopreservação de sêmen para o peixe de aquário *Xiphophorus helleri* (espada), onde expôs os gametas a diferentes concentrações de DMSO. Ao analisar a motilidade espermática, obtiveram que as maiores taxas foram obtidas com DMSO 10%. Além disso, ao observar a motilidade com o passar do tempo, tal estudo demonstrou que DMSO em maior concentração (14%) apresentou um declínio mais rápido (menor duração) que concentrações de 10%, tal como o observado no presente estudo. Resultados semelhantes também foram obtidos por Lahnsteiner et al. (2000) e Lubzens et al. (1997)

A proteção proporcionada pelos crio protetores internos se dá sobre as enzimas lábeis (ex: catalase) e sobre a estabilidade das proteínas em soluções aquosas não congeladas, mas alternativamente pode também induzir a desnaturação em altas temperaturas e causar uma toxicidade nos sistemas celulares. Poucos espermatozóides nas espécies estudados têm sobrevivido á baixas temperaturas de congelamento sem crio protetores. Essas substâncias devem possuir como propriedade uma baixa toxicidade para ás células (MARIA, 2005). Os crio protetores impedem as crio lesões, mas quando usados em concentrações elevadas podem se tornar tóxicos aos espermatozóides (FELIZARDO, 2008). Por essa razão, os testes de toxicidade deste trabalho envolveram concentrações comumente utilizadas em criopreservação.

Analisando o efeito de diferentes soluções ativadoras sobre a motilidade espermática do sêmen fresco de *C. auratus* obteve-se a média de taxa e tempo de motilidade apresentada na tabela a seguir (Tabela 3):

**Tabela 3** - Média da taxa e duração da motilidade espermática do sêmen fresco de *C. auratus* exposto á diferentes soluções ativadoras (n=3)

Ativador	Tx. de Motilidade (%)	Tempo (s)
Água destilada	63,8	71
NaHCO <sub>3</sub>	69,4	100,3
NaCl	99,3	162,7

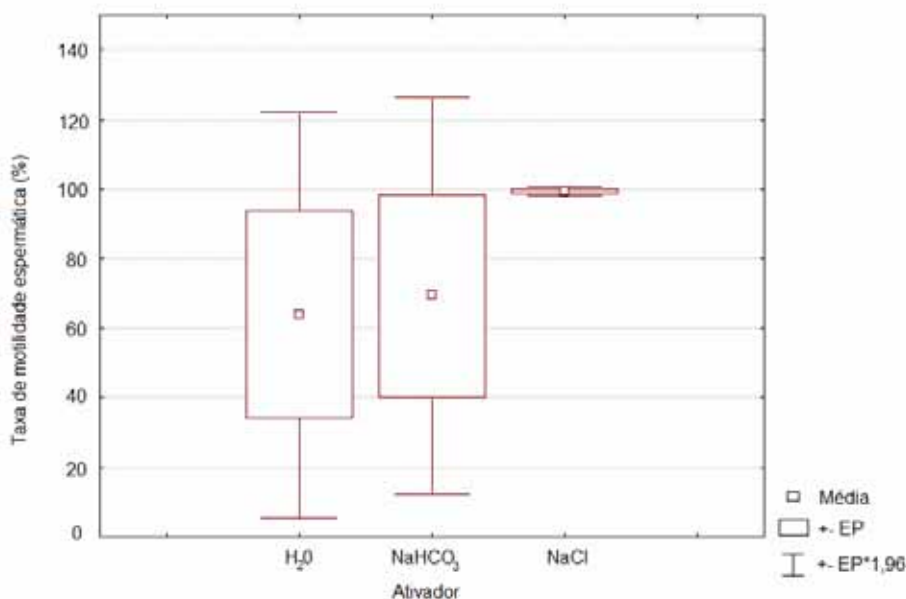
Os valores gerados pela aplicação do teste de Kruskal-Wallis também afirmaram que as três soluções ativadoras não diferem entre si quanto à eficiência (Tabela 4)

**Tabela 4** - Resultado da análise dos testes de toxicidade sobre o tempo e taxa de motilidade espermática realizado com o teste de Kruskal-Wallis.

ANÁLISE	H	p
Taxa de motilidade (%)	1,96	0,3838
Tempo (s)	3,82	0,1479

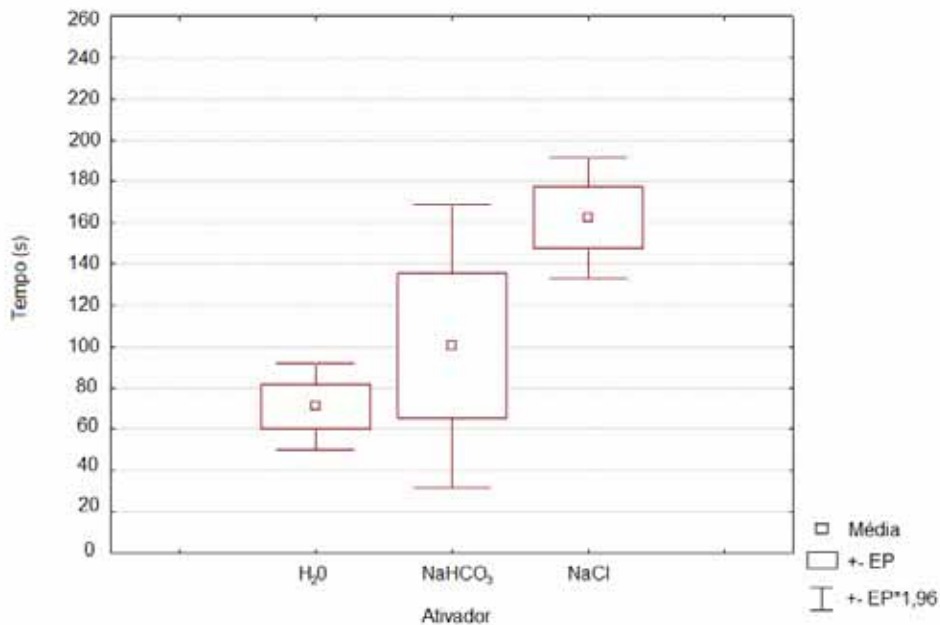
Concordando com os resultado aqui obtidos, Godinho et al (2003) em um estudo semelhante, demonstrou que as várias soluções ativadoras empregadas (NaCl, NaHCO<sub>3</sub> e água destilada) não influenciaram de forma diferente as taxas de motilidade do sêmen da tilápia-nílotica (*Oreochromis niloticus*).

Por outro lado, com base na observação das médias de taxa e tempo da motilidade espermática para as diferentes soluções ativadoras (Tabela 3), pode-se afirmar que o NaCl apresenta médias superiores da taxa de motilidade espermática se comparada com NaHCO<sub>3</sub> e água destilada. Isto também pode ser confirmado observando os gráficos representados abaixo (Figura 3 e 4):



**Figura 3** - Taxa de motilidade espermática (média  $\pm$  desvio padrão) para o sêmen fresco de *C. auratus* exposto á diferentes soluções

### ativadoras



**Figura 4** - Duração da motilidade espermática (média $\pm$  desvio padrão) do sêmen fresco de *C. auratus* para diferentes soluções ativadoras

Essa afirmação se consolida ainda mais se analisarmos o erro padrão para cada uma das soluções ativadoras na figura 3: o NaCl apresenta uma variação de valores bem menor do que todas as outras soluções e ainda assim, esses valores são maiores que os de outras soluções. Na figura 4, a média da duração da motilidade espermática também se encontra superior no NaCl, sendo que o seu erro padrão não se sobrepõe sobre as outras soluções.

Em um estudo sobre criopreservação de sêmen de diversas espécies de ciprinídeos, Lahnsteiner et al. (2000) também demonstrou altas taxas de motilidade para sêmen fresco ativado com NaCl, afirmando que esta é uma solução comumente utilizada na ativação do sêmen e fertilização de ciprinídeos. Moraes (2004), também obteve que soluções ativadoras da motilidade espermática compostas de NaCl apresentaram melhor eficiência que NaHCO<sub>3</sub> para sêmen de piau-açu (*Leporinus macrocephalus*).

Entre os inúmeros fatores que podem afetar a motilidade espermática estão as soluções ativadoras empregadas. A diferença existente entre a pressão osmótica do meio em relação ao plasma seminal é essencial para iniciar a motilidade espermática, o que ocorre quando o sêmen é exposto à solução ativadora CAROSFELD & HARVEY, 1999 apud MORAES, 2004.

Porém como cada tipo de solução apresenta determinado meio osmótico,

ocorrem diferentes respostas da atividade espermática em diferentes soluções ativadoras. Além disso, as soluções ativadoras se comportam de forma específicas para cada espécie. (GODINHO, 2000).

As amostras descongeladas foram ativadas com a solução de NaCl, que foi admitida como a mais eficiente no presente estudo. Sendo assim o sêmen fresco ativado com NaCl nesse mesmo experimento foi considerado como controle para fim de comparações. Neste experimento, obteve-se as médias da taxa e duração da motilidade espermática nos diferentes tratamentos demonstradas na tabela 5:

**Tabela 5** - Média da duração e taxa de motilidade do sêmen descongelado (n=8) e do controle (n=3).

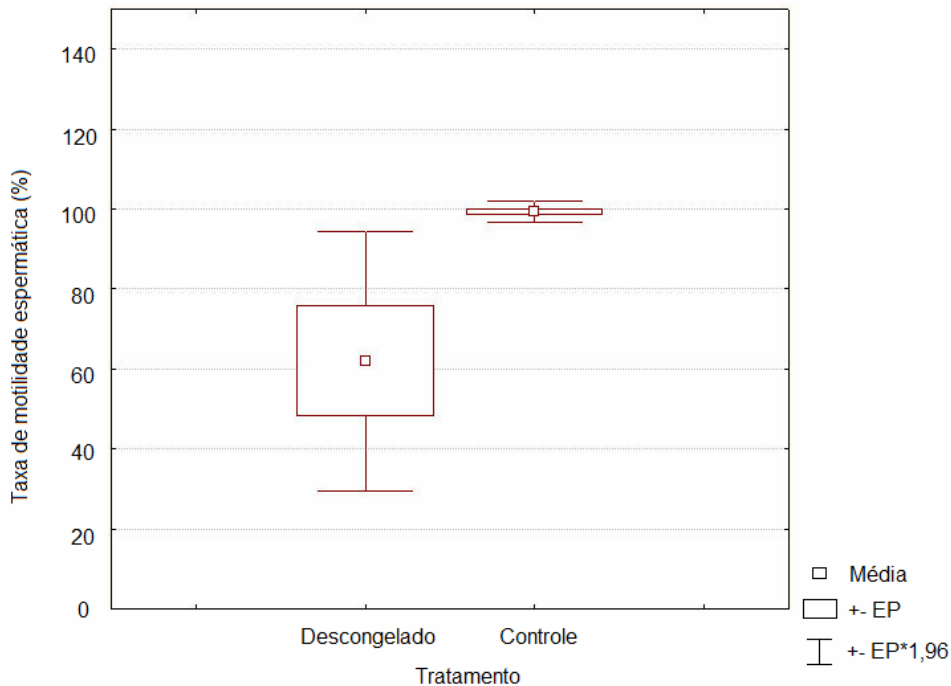
<b>Tratamento</b>	<b>Tx. de motilidade (%)</b>	<b>Tempo (s)</b>
Descongelado	62,09	180,13
Controle	99,35	162.67

Verificou-se diferença na taxa de motilidade espermática observada nos dois tratamentos (tabela 6).

**Tabela 6**- Resultado da diferença entre as amostras de sêmen descongeladas e o controle sobre a duração e taxa de motilidade através do teste U de Mann-Whitney.

<b>Análise</b>	<b>U</b>	<b>p</b>
Tx. de motilidade (%)	0,0	0,014
Tempo (s)	8,0	0,414

Isso também pode ser notado na figura 5 (abaixo), aonde a média do controle é superior ao do sêmen descongelado, sem sobreposições de erro padrão nem intervalo de confiança.



**Figura 15** - Efeito dos diferentes tratamentos (descongelado e controle) sobre a taxa de motilidade espermática para *C. auratus*

No presente estudo, os parâmetros da motilidade foram utilizados como critério para determinar a viabilidade do esperma. Espermatozoides que apresentam motilidade após a criopreservação são supostamente férteis. Em um estudo proposto por Magyary et al. (1996), a taxa de motilidade espermática pós-descongelamento de sêmen de ciprinídeos se correlacionou significativamente com a fertilização.

De acordo com Carneiro (2007), a solução crio protetora intracelular utilizada geralmente é o DMSO (em concentrações de 5 a 10%), e a gema de ovo participa como um crio protetor extracelular revestindo à celular externamente. Maria et al (2006), para a piracanjuba (*Brycon orbignyanus*), obteve que soluções contendo gema de ovo 5% com DMSO 10% produziram motilidade superior ao sêmen crio preservado sem o acréscimo de gema de ovo. Eles obtiveram uma taxa de motilidade média de 11% com essa solução. Esse resultado é inferior ao encontrado no presente trabalho.

Ribeiro & Godinho (2003) e Murgas et al. (2003), em estudos com piauaçu (*Leporinus macrocephalus*) e piracanjuba (*Brycon orbignyanus*), respectivamente, também utilizando DMSO e gema de ovo como crio protetores, obtiveram resultado que condizem com os aqui constatados, aonde as taxas de motilidade espermática pós-congelamento apresentaram-se inferiores em comparação com o sêmen fresco.

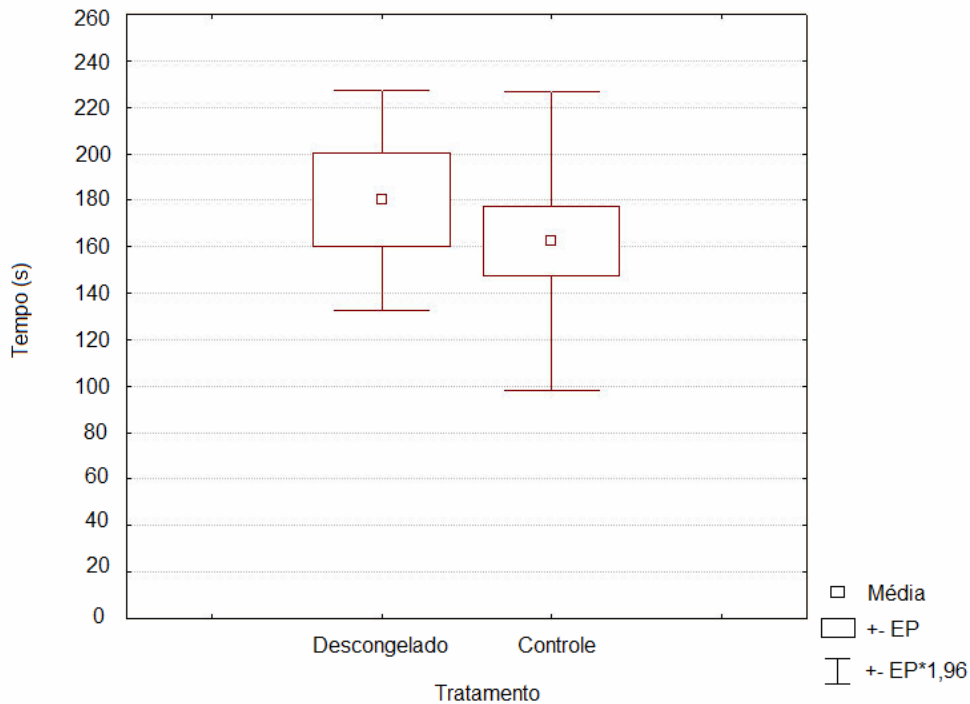
Entretanto, para ciprinídeos, Lahnsteiner et al (2000) obteve que agentes protetores da membrana como a gema do ovo não melhoraram os parâmetros de motilidade pós-descongelamento, e pelo contrário, diminuíram a viabilidade do esperma antes mesmo do congelamento. Da mesma forma, considerando que o presente estudo foi realizado com um ciprinídeo (*C. auratus*), o uso da gema de ovo como crio protetor externo pode ter sido um dos motivos que levaram á diminuição da motilidade pós-descongelamento se comparada com o controle.

Godinho (2000) relata que a motilidade espermática é um dos principais parâmetros a serem considerados na análise da qualidade do sêmen de peixes. Para tanto, deve-se levar em conta que a motilidade espermática é influenciada por inúmeros fatores como temperatura, estado nutricional, estado sanitário, condições de análise, soluções ativadoras empregadas e espécies estudadas.

Dessa forma, considerando a variação da temperatura como parâmetro atuante, outro fator que pode ter afetado na qualidade do sêmen pós-descongelamento é a velocidade de congelamento. A baixa velocidade promove grande perda de água para o meio extracelular; no entanto, a alta velocidade promove pouca perda de água. A desidratação da célula é necessária para evitar a formação de gelo intracelular e conseqüente rompimento da membrana (JAMIESON, 1991 apud MORAES, 2004). Enquanto em outros trabalhos observa-se resfriamentos pré-congelamento que vão desde 15 minutos (KUROKURA et al., 1984) até 48 horas (MARIA, 2005), o presente trabalho suspendeu as amostras para resfriamento em vapor de nitrogênio apenas por três minutos. Isso pode ter causado um dano às células e conseqüentemente, afetado na motilidade espermática pós-congelamento.

Por outro lado, a temperatura da água no descongelamento também pode ser um parâmetro determinante da motilidade espermática pós-descongelamento. Entretanto, aparentemente, esse fator teve um peso positivo no presente estudo se comparado com Lahnsteiner et al (2000), que, expondo o sêmen congelado do ciprinídeo *C. chalcoides* á temperaturas de 20 a 30°C por tempo que variaram de 15 a 30 segundos, obteve taxa de motilidade variando entre 7,2% e 39,25%, valores inferiores ao apresentado no presente estudo. A temperatura ideal de descongelamento é necessária para a recuperação da estabilidade da membrana ou metabolismo dos espermatozóide.

Quando comparamos a média do tempo da motilidade espermática com o controle, não observamos diferença. Entretanto, observando à figura 6, visualiza-se uma tendência á média superior das amostras descongeladas se comparadas com o controle.



**Figura 16** - Efeito dos diferentes tratamentos (descongelado e controle) sobre a duração da motilidade espermática para *C. auratus*

Esses dados diferenciam-se dos resultados obtidos com a taxa de motilidade, e na verdade, parece contraditório que os tratamentos descongelados apresentem maior tempo de duração que o controle. Ainda que incomum, Lahnsteiner (2000) também observou diferenças condizentes com as aqui encontradas, porém referente á taxa de motilidade local, que foi significativamente aumentada de 10,1 % no controle para 25,2% no sêmen descongelado de ciprinídeos. A fragilidade dos resultados decorrente da diferença entre o n amostral do sêmen descongelado (8) e do controle (3) pode ter contribuído para essa divergência nos resultados.

## Conclusões

1. Não houve diferença estatística entre a duração e as taxas de motilidade espermática para o sêmen de *Carassius auratus* ativados com diferentes soluções ativadoras, porém observou-se uma tendência á maiores médias, tanto de duração quanto de taxa de motilidade para a solução de NaCl;
2. Estatisticamente, não houve diferença entre a duração e a taxa da motilidade espermática para o sêmen de *Carassius auratus* exposto a diferentes concentrações (5, 10 e 15%) do crio protetor interno DMSO, entretanto, observando as diferentes médias, a concentração de 10 % demonstrou uma tendência á maior duração e taxa de motilidade;
3. Embora as amostras de sêmen descongelado demonstrassem uma tendência á maior duração de motilidade espermática,



estatisticamente, não houve diferença entre o tempo de duração da motilidade espermática do sêmen descongelado em comparação com o controle (sêmen fresco ativado com NaCl);

4. As baixas taxas de motilidade espermática observada no sêmen descongelado em comparação com o controle, demonstraram estatisticamente que representavam uma diferença, concluindo que a metodologia aplicada não foi eficiente para a taxa de motilidade espermática pós-congelamento quando comparada com o controle;
5. Porém, o sêmen descongelado de *C. auratus*, obteve uma média da taxa de motilidade de 62,09 %. Quando aplicada á escala de 0 a 5 referente à taxa de motilidade espermática utilizada por Fribourg (1966), este valor permanece no grupo 4 (entre 60 - 80%), demonstrando que os resultado aqui obtidos foram positivos, e o sêmen descongelado apresentaria quantidade de espermatozóides suficiente para ser aplicado á qualquer técnica, como melhoramento genético ou produção de alevinos

## Recomendações

A baixa disponibilidade de sêmen de peixes ornamentais, como no caso da espécie de estudo, não permitiu uma quantidade de amostras suficientes para fundamentar estatisticamente com segurança os resultados. Dessa forma, é de extrema importância realizar futuros experimentos visando diminuir a fragilidade dos resultado através de um aumento do n amostral.

## Literatura citada

- AMARAL, H, J. Criocongelamento de sêmen de peixes de água temperadas, para utilização na formação de um banco de germoplasma de espécies nativa do rio Itajaí-Açú, Santa Catarina. **Boletim técnico CNPQ**, Brasília, 15. p, 2005.
- CARNEIRO, P. C. F. Tecnologias de produção e armazenamento de sêmen de peixes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 3, p. 361-366, jul./set. 2007.
- CHEN, S. L. & TIAN, Y. Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos by vitrification. **Theriogenology**, v. 63, p. 1207-1219, 2005.
- FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Global Aquaculture production**. Roma, 2007. Disponível em <<http://www.fao.org>>. Acesso em 10 de outubro de 2008
- FAUSH, K. D. *et al.* **Fish biology in Japan: an anthropology in Honour of Hiroya Kawanabe**. Norwell: Springer, 1998.
- FELIZARDO, V. O. **Manejo reprodutivo da piraicanjuba (*Brycon orbignyanus*): congelamento de sêmen e taxas de fertilidade**. 2008. 84 p. Dissertação para título de mestre em Ciências Veterinárias - UFLA. Lavras, 2008.
- FRIBOURGH, J. H. The application of a differential staining method to low-

- temperature studies on goldfish spermatozoa. **The progressive fish culturist**, v. 28, p. 227-31. 1966
- GODINHO, H. P . Criopreservação de sêmen de peixes. **Informe agropecuário**, v.21, n. 203, p.16-20, 2000.
  - GODINHO, H. P et al. Criopreservação do sêmen de tilápia-nilótica *Oreochromis niloticus*, var. Chitralada: crioprotetores, soluções ativadoras e refrigerador criogênico. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n. 6, p. 1537 - 1543, 2003.
  - HUANG, C. et al. Sperm cryopreservation of green swordtail *Xiphoporus helleri*, a fish with internal fertilization. **Cryobiology**, v. 48, p. 295-308, 2004.
  - KUROKURA, H. et al. Cryopreservation of carp sperm. **Aquaculture**, v.37, p.267-273, 1984.
  - KUTTY, M. N. & PILLAY. T. V. R. **Aquaculture: principles and practices**. Oxford: Fishing New Books, 1990.
  - LAHNSTEINER, F. et al. Cryopreservation of spermatozoa in cyprinid fishes. **Theriogenology**, v.53, p. 1477-1498, 2000.
  - LANDAU, M. **Introduction to aquaculture**, Nova Iorque: John Wiley & Sons Inc, 1991.
  - LIMA, A. O.; BERNARDINO, G.; PROENÇA, C. E. M. Agronegócio de peixes ornamentais no Brasil e no mundo. **Panorama da Aqüicultura**, v.11, n.65, p.14-24, 2001
  - LINHART, O et al. Cryopreservation of sperm in common carp *Cyprinus carpio*: sperm motility and hatching success of embryos. **Cryobiology**, v.41, p. 241-250, 2000.
  - LUBZENS, E. et al. Carp (*Cyprinus carpio* L) spermatozoa cryobanks - strategies in research and application. **Aquaculture**, v. 155, p. 13-30, 1997
  - MAGYARY, I et al. Cryopreservation of. common carp (*C. carpio* L) sperm II: optimal conditions for fertilization. **Journal of applied ichthyology**, v.12, p. 117-119, 1996.
  - MARIA, A. N. **Diluidores e crioprotetores no resfriamento e congelamento do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)**. 2005. 71 p. Dissertação para título de mestre em Zootecnia - UFLA. Lavras, 2005.
  - MARIA, A.N. et al. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of. Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) sêmen, and endangered Brazilian teleost fish. **Aquaculture**, v. 260, p. 298-306, 2006.
  - MILLANI, T.S. **Subsídios à avaliação do ciclo de vida do pescado: avaliação ambiental das atividades de piscicultura e pesque-pague, estudo de caso na bacia hidrográfica do rio Mogi-Guaçu**. 2007. 132 p. Dissertação para título de mestre em Ciência da Engenharia Ambiental - EESC/USP. São Carlos, 2007.
  - MORAES, G. F. **Resfriamento e congelamento do sêmen de piau-açu *Leporinus macrocephalus***. 2004. 68p. Dissertação para título de mestre em Zootecnia - UFLA. Lavras.
  - MORISAWA, M. et al. Effects of osmolality and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes. **The Journal of Experimental Biology**, v.107, p. 95-103, 1983.
  - MURGAS, L, D. S et al. Avaliação espermiática pós-descongelamento em piracanjuba (*Brycon orbignyanus*, Valenciennes, 1849). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n.6, p. 1810-1814, 2003.
  - NINHAUS-SILVEIRA et al. Fertilidade do sêmen de matrinxã (*Brycon*

- amazonicus*) criopreservado em nitrogênio líquido. **Boletim técnico do CEPTA**, Pirassununga, v. 19, p. 1-8, 2006.
- RANA, K. Preservation of gametes. *In*: BROMAGE N. R. & ROBERTS, R. J. (Orgs.). **Broodstock management and egg and larval quality**. Cambridge: Cambridge University Press, 1995. p.88-94
  - RIBEIRO, R. I. M. A. & GODINHO, H. P. Criopreservação do sêmen testicular do teleosteo piau-açu *Leporinus macrocephalus*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 1, p. 75-79, 2003.
  - ROSA, J. C. S.; SILVA, J. W. B.; OLIVEIRA, J. W. B. Propagação artificial do peixe japonês *Carassius auratus* (Linnaeus, 1766) GUNTHER, 1870, com extrato de hipófise. **Ciência agrônômica**, v.25, p. 44 - 52. 1994.
  - SANCHES, E. G. et al. Custos e retornos do pisciculto em São Paulo. **Informações econômicas**, v.25, n.1. 1995
  - SENHORINI, A. et al. Seminal analysis, cryogenic preservation, and fertility in Matrinxã fish, *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). **Brazilian archives of biology and technology**, v.49, n.4, p. 651-659. 2006.
  - STICKNEY, R. R. **Encyclopedia of aquaculture**. Nova Iorque: John Wiley & Sons, Inc, 2000.
  - VIVEIROS, A. T. M. et al. Sensibilidade dos espermatozoides de dourado (*Salminus brasiliensis*) a diferentes soluções crioprotetoras. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 4, p. 883-889, 2009.
  - YANG, H. & TIERSCH, T. R. Current status of sperm cryopreservation in biomedical research fish models: Zebrafish, medaka, and *Xiphophorus*. **Comparative biochemistry and Physiology**, v.149, p. 224-232, 2009.
  - ZHANG, Y. Z. et al. Toxicity and protective efficiency of cryoprotectants to flounder (*Paralichthys oleáceos*) embryos. **Theriogenology**, v. 63, p. 763-773, 2005.
  - ZUANON, J. A. S. Digestibilidade de alimentos protéicos e energéticos para fêmeas de beta. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.4, p.987-991, 2007.

### REDVET: 2010, Vol. 11 Nº 11

Recibido: 19.03.10 / Ref. prov. ABR1008\_REDNET / Aceptado 16.10.10  
Ref. def. 111004\_REDNET / Publicado: 01.11.2010

Este artículo está disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n111110.html> concretamente en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n111110/111004.pdf>

REDNET® Revista Electrónica de Veterinaria está editada por Veterinaria Organización®.  
Se autoriza la difusión y reenvío siempre que enlace con Veterinaria.org® <http://www.veterinaria.org> y con REDNET®- <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>