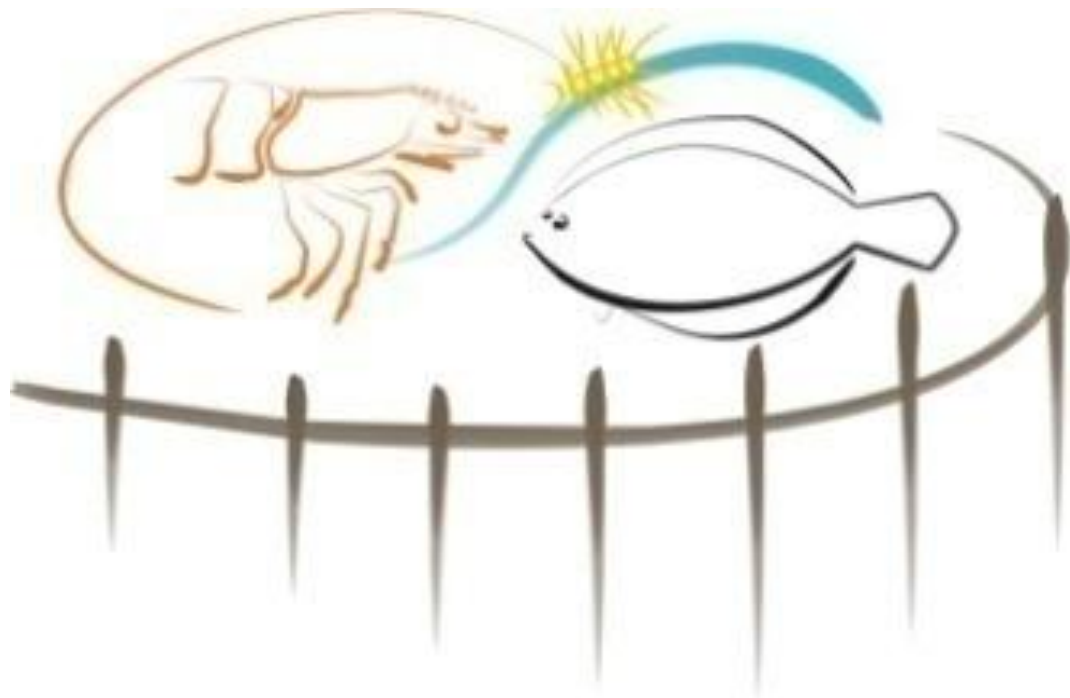


UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

ANTONIO SERGIO VARELA JUNIOR

CRIOPRESERVAÇÃO SEMINAL DE TAMBAQUI,
Colossoma macropomum



Rio Grande – RS

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA

CRIOPRESERVAÇÃO SEMINAL DE TAMBAQUI,
Colossoma macropomum

ANTONIO SERGIO VARELA JUNIOR

Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do grau de doutor em Aquicultura no Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal do Rio Grande.

Orientador: Dr. Mario Roberto Chim Figueiredo

Rio Grande – RS

Dezembro - 2011

Banca examinadora:

Prof. Dr. Mario Roberto Chim Figueiredo.
Universidade Federal do Rio Grande.
(Orientador)

Prof. Dr. Danilo Pedro Streit Junior.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Prof. Dr. Elton Pinto Colares.
Universidade Federal do Rio Grande.

Prof. Dr. Luis Fernando Fernandes Marins.
Universidade Federal do Rio Grande.

Prof. Dr. Thomaz Lucia Jr.
Universidade Federal de Pelotas.

FICHA CATALOGRÁFICA

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	VIII
RESUMO GERAL.....	IX
ABSTRACT.....	X
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS	5
CAPITULO I.....	10
RESUMO	12
ABSTRACT.....	13
INTRODUÇÃO.....	14
MATERIAL E MÉTODOS	15
<i>Peixes</i>	<i>15</i>
<i>Coleta e avaliação seminal</i>	<i>15</i>
<i>Criopreservação Seminal.....</i>	<i>16</i>
<i>Descongelamento seminal e avaliações da taxa de fertilização e eclosão.....</i>	<i>17</i>
<i>Funcionalidade mitocondrial, viabilidade, integridade de membrana e DNA</i>	<i>18</i>
<i>Análise Estatística</i>	<i>18</i>
RESULTADOS	18
DISCUSSÃO.....	19
CONCLUSÃO	21
AGRADECIMENTOS.....	22
LITERATURA CITADA	22
CAPITULO II.....	29
RESUMO	30
1. INTRODUÇÃO	31
2. MATERIAL E MÉTODOS	33
2.1. <i>Coleta e avaliação espermática</i>	<i>33</i>
2.2. <i>Criopreservação espermática</i>	<i>34</i>
2.3. <i>Avaliações do espermatozóide descongelado e fertilização.....</i>	<i>34</i>
2.4. <i>Análise estatística.....</i>	<i>37</i>
3. RESULTADOS.....	37
4. DISCUSSÃO	38

5. AGRADECIMENTOS	41
6. REFERÊNCIAS	41
CAPITULO III.....	51
RESUMO	52
1. INTRODUÇÃO	53
2. MATERIAL E MÉTODOS	55
2.1. <i>Peixes</i>	55
2.2. <i>Coleta e avaliação seminal</i>	56
2.3. <i>Criopreservação Seminal</i>	57
2.4. <i>Descongelamento seminal e avaliações da taxa de fertilização e eclosão</i>	58
2.5. <i>Funcionalidade mitocondrial, viabilidade, integridade de membrana e DNA</i>	59
2.6. <i>Análise Estatística</i>	60
3. RESULTADOS.....	60
4. DISCUSSÃO	61
5. CONCLUSÕES	63
6. AGRADECIMENTOS	64
7. REFERÊNCIAS	64
DISCUSSÃO GERAL	77
REFERÊNCIAS	81
CONCLUSÕES GERAIS.....	87
ANEXO I	88

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Sergio e Elionet, irmãos Saimon e Samanta e principalmente a minha esposa amada Carine pelo amor, carinho, incentivo e compreensão por todo o período de obtenção deste título.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, agradeço a Deus por ser fonte de luz no meu caminho, fortaleza e perseverança para enfrentar os desafios da vida.

Aos meus pais, Antonio Sergio Varela e Elionet Freitas Camara Varela, e aos meus irmãos Samanta e Saimon, por ser hoje o que sou, pela confiança dedicada a mim, por nunca medirem esforços e fazerem tudo que estava ao alcance, e provavelmente abdicando dos seus sonhos para que eu realizasse o meu.

A minha esposa amada, Carine Dahl Corcini, pelo amor, compreensão, amizade, apoio e por me incentivar a ir à busca dos meus ideais.

Ao meu orientador e amigo, Mario Chim, minha admiração pelo profissional de elevada capacidade, a quem devo a oportunidade de grandes ensinamentos como, principalmente, questionar, duvidar, pensar e até sonhar. Agradeço principalmente pela confiança depositada em mim e pelas oportunidades de crescimento profissional e pessoal.

Aos co-orientadores Thomaz Lucia Jr e Danilo P. Streit Jr., pelo grande apoio, auxílio, incentivo e ensinamentos em todos os momentos.

Aos amigos e colegas de trabalho do Instituto de Ciências Biológicas cujo convívio me proporcionou momentos de alegria, mas também de aprendizado para o crescimento pessoal, assim como auxílio na execução deste trabalho.

Aos amigos e colegas de trabalho da Histologia, Rodrigo Jardim, Dionísio Loch, João Cassimiro, Ana Paula e Marcelo Vargas por terem me apoiado, auxiliado e incentivado nesta empreitada.

Um grande agradecimento aos amigos da Piscicultura Nova Esperança, Simone Yokoyama, Erica Yokoyama e principalmente ao Sr Pedrinho, pela cooperação, incentivo e ensinamentos durante todo o momento que estivemos em Pimenta Bueno.

Aos animais utilizados na realização dos experimentos e ao meu amigo e companheiro Adelson Átila, vulgo Dedé, que durante todo o período esteve ao meu lado brincando, correndo e demonstrando um afeto incondicional.

RESUMO GERAL

A biotecnologia reprodutiva aplicada à aquicultura vem sendo incrementada com trabalhos de criopreservação seminal, melhoramento genético e produção de bancos de germoplasma. Durante a crioconservação de células espermáticas, podem ser utilizados diferentes crioprotetores internos e externos, curvas de resfriamento, ou formas de congelamento para minimizar o efeito deletério desta biotecnologia. O objetivo desta tese foi avaliar o efeito de diferentes crioprotetores sobre características das células espermáticas de tambaqui *Colossoma macropomum* observadas *in vitro* e *in vivo*. Os experimentos avaliaram Dimetilsulfoxido (DMSO) (5, 10, 15 e 20%); Dimetilformamida (DMF), dimetilacetamida (DMA) e Metilformamida (MF) (todas as amidas em 2, 5, 8 e 11%); Lipoproteína de baixa densidade (LDL) da gema do ovo de galinha (4, 8, 12 e 16%) assim como Trealose (50, 100, 150 e 200 mM), para crioproteção espermática de tambaqui. Após o sêmen ter sido congelado e descongelado, foi avaliada sua qualidade quanto às taxas de motilidade espermática, fertilização, eclosão, funcionalidade mitocondrial, integridade da membrana, integridade do DNA e ao tempo de latência. As taxas de fertilização e de eclosão com 10% DMSO não diferiram do sêmen fresco. Devido aos resultados obtidos com 10% de DMSO, este foi comparado com as amidas, LDL e Trealose. As maiores taxas de fertilização e eclosão ocorreram quando se utilizou amidas nas concentrações de 5% DMA, 8% DMF e 8% MF, as quais não diferiram entre si. Nesses tratamentos, as taxas de fertilização e eclosão foram semelhantes às observadas com sêmen fresco. As concentrações mais elevadas de LDL asseguraram a manutenção da integridade de membrana e da mitocôndria e promoveram maior viabilidade celular. Por outro lado, se obsevou que, quanto maiores as concentrações de LDL, menores foram o tempo de latência, as taxas de motilidade, fertilização e eclosão. As taxas de fertilização e eclosão não diferiram entre DMSO e os tratamentos que utilizaram trealose, sendo que a taxa da fertilização com 150 mM de trealose não diferiu do tratamento com sêmen fresco. Com estes resultados conclui-se que as amidas (5% DMA, 8% DMF e 8% MF) e 150 mM trealose preservaram de forma eficiente células espermáticas de *Colossoma macropomum*.

ABSTRACT

The use of reproductive biotechniques in aquaculture has been incremented in studies focused on sperm cryopreservation, genetic improvement and germplasm production. Distinct penetrating and non penetrating cryoprotectants, cooling curves and other freezing methods can be used to minimize the potential deleterious effects for spermatozoa arising from the cryopreservation process. The objective of this thesis was to evaluate the effect of different cryoprotectants on *in vitro* and *in vivo* characteristics of tambaqui, *Colossoma macropomum*, sperm. The experiments evaluated Dimethyl sulfoxide (DMSO) (5, 10, 15 and 20%); Dimethylformamide (DMF), Dimethylacetamide (DMA) and Methylformamide (MF) (all amides in 2, 5, 8 and 11%); Low density lipoprotein (LDL) from chicken egg yolk (4, 8, 12 and 16%) for as Trehalose (50, 100, 150 and 200 mM), for tambaqui sperm cryopreservation. The post-thawing sperm quality evaluations were: sperm motility, fertilization and hatching rates; mitochondrial functionality, integrity of sperm membrane and DNA and period of motility. The fertilization and hatching rates with 10% DMSO did not differ from fresh semen. Therefore, 10% DMSO was used as a control for comparisons against amides, LDL and Trehalose. The greatest fertilization and hatching rates were obtained with 5% DMA, 8% DMF and 8% MF, which not only did not differ among themselves, but were also similar to those observed with fresh sperm. The highest LDL concentrations ensured maintenance of sperm membrane integrity, mitochondrial functionality and sperm viability. However, period of motility, sperm motility, fertilization and hatching rates decreased as LDL concentration increased. Fertilization and hatching rates were similar for treatments including DMSO and trehalose and the fertilization rate obtained with 150 mM trehalose was similar to that observed with fresh sperm. In conclusion, some amides (5% DMA, 8% DMF and 8% MF) and trehalose are efficient cryoprotectans for *Colossoma macropomum* sperm.

INTRODUÇÃO GERAL

O tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier 1818), uma espécie migradora nativa da bacia amazônica, é considerado o segundo maior peixe de escamas dos rios Amazonas - Solimões (Goulding & Carvalho 1982) e Madeira, localizado no estado de Rondônia. Neste rio, está em fase de implantação uma usina hidrelétrica (Lopes et al. 2009), isto poderá dificultar a migração dessa espécie, pela mudança do regime lótico para o lântico, ocasionando a formação de populações com alto grau de parentesco e restringindo o fluxo genético, o que poderá acarretar na redução da heterogeneidade genética (Odum 1971, Braga et al. 2005, Carpio 2006). Nestes casos a preservação da heterogeneidade do patrimônio genético de espécies nativas torna-se importante para evitar impactos negativos sobre a ictiofauna (Sirol & Britto 2006).

Em relação à aquicultura o *C. macropomum* é a espécie nativa brasileira mais produzida comercialmente com mais de 30 mil toneladas (FAO 2008) e apresenta bons resultados em diferentes tipos de criação intensiva (Chellapa et al. 1995, Valenti et al. 2000). Nos sistemas comerciais de produção a variabilidade genética é importante, pois possibilita a melhoria de características produtivas (Suquet et al. 2000). Atualmente esta espécie foi incluída no programa brasileiro de melhoramento genético, em várias instituições de pesquisa, cabendo destacar que somente a Embrapa possui oito unidades desenvolvendo trabalhos com esta espécie. Além desta, também estão envolvidas dez universidades federais, três estaduais e uma universidade norte-americana (Lopes et al. 2009).

A criopreservação seminal, além de servir como forma de manutenção de estoques de sêmen para reproduções futuras, colabora também para a redução dos custos com a manutenção dos machos, além de ser uma ótima ferramenta para seleção e difusão de material genético, otimizando, desta forma o melhoramento genético (Suquet et al. 2000). Esta ferramenta possibilita também o atendimento, através de banco de germoplasma, da conservação da variabilidade genética dos animais na natureza (Martínez-Páramo et al. 2009).

Com os protocolos de congelamento de sêmen, mediante o uso dos crioprotetores internos e externos, busca-se a proteção dos espermatozoides evitando a formação de

cristais de gelo intracelular, que ocasionam danos na membrana espermática (Bianchi et al. 2008, Hu et al. 2009, Varela Junior et al. 2009), desnaturação do DNA (Hu et al. 2008, Koderle et al. 2009) e lesão nas mitocôndrias e microtúbulos (Hammerstedt & Graham 1992). Em peixes deve-se ter uma preocupação especial em relação à osmolalidade do diluente, pois este não pode ativar as células espermáticas (Chambeyron & Zohar 1990). Além disto, ressalta-se a necessidade de desenvolver alternativas de soluções crioprotetoras, que protejam o material genético, minimizando as perdas na qualidade seminal após o descongelamento (Holt 2000).

Atualmente, um composto largamente empregado para a crioproteção intracelular no processo de preservação de gametas masculinos de várias espécies é o glicerol (Alvarenga et al. 2005). Entretanto, este álcool apresenta algumas desvantagens para a manutenção da integridade celular, devido ao alto peso molecular, à alta viscosidade e pouca permeabilidade. Estas características alteram a polimerização da proteína tubulina, modificando a forma dos microtúbulos associados, prejudicando a integridade da membrana plasmática, comprometendo a estrutura da camada de glicocálix e o balanço energético (Hammerstedt & Graham 1992). Além disso, também ocorre estresse osmótico, devido à retirada de água intracelular (Gilmore et al. 1995).

Por exemplo, no congelamento de sêmen de peixes de água doce, nativos, o crioprotetor interno mais utilizado é o dimetil sulfoxido - DMSO (Viveiros & Godinho 2009). Os crioprotetores internos mais recentemente testados na preservação espermática de mamíferos são as amidas. Sua ação crioprotetora é atribuída ao baixo peso molecular e à alta permeabilidade celular, reduzindo a possibilidade de danos à membrana celular (Ball & Vo 2001). Seu grupo funcional amina associa-se ao hidrogênio da molécula de água através de uma união mais eficiente com a água, quando comparada à do glicerol, promovendo a formação de micro-cristais de gelo (gel intracelular), que são benéficos, pois minimizam as criofraturas da membrana espermática (Bianchi et al. 2008). Porém, até o presente momento, não foram realizados estudos para avaliar tanto o efeito direto do DMSO, quanto o efeito da utilização de amidas, sobre as estruturas celulares de peixes nativos brasileiros, de água doce.

Estudos preliminares, em peixes, comprovaram que a substituição do glicerol, propilenoglicol ou metanol por amida promoveu uma maior manutenção da motilidade e fertilização (Richardson et al. 2000, McNiven et al. 1993). Um recente trabalho com *Lutjanus argentimaculatus* demonstrou que a toxidez da dimetilacetamida e formamida, diminuiu a motilidade espermática, quando exposto durante 10 minutos a 25° C, entretanto a capacidade crioprotetora de ambos os compostos não foi avaliada (Vuthiphandchai et al. 2009)

Segundo o estudo realizado por Menezes et al. (2008) no qual foram utilizados como crioprotetores etileno glicol, DMSO, propileno glicol, dimetilacetamida e metanol (concentrações e diluente base não descritos), o percentual de motilidade espermática pós-descongelamento do tambaqui variou entre 5 e 20%. Farias & Nunes (1999), que utilizaram como diluidor de congelamento do sêmen de tambaqui água de coco e 5% de glicerol, observaram uma variação na motilidade espermática pós-descongelamento entre 30 e 80%. Estes autores atribuíram esta heterogeneidade nos resultados à grande variação da osmolalidade da água de coco. Porém, não foi utilizado nenhum diluente controle, além de não ter sido verificada a ação sobre as estruturas celulares.

Em espécies como *Piaractus mesopotamicus*, *Prochilodus scrofa*, *Brycon orbignyanus*, *Paralichthys orbignyanus* e *Morone saxatilis* foi avaliada a ação dos crioprotetores sobre a integridade da membrana plasmática (Silveira et al. 1990, Kavamoto et al. 1989, Murgas et al. 2003, He & Woods 2004, Lanes et al. 2008) ou sobre as mitocôndrias (He & Woods 2004). Entretanto, em células espermáticas descongeladas de peixes nativos de água doce não foi avaliado o efeito dos crioprotetores, simultaneamente sobre os componentes celulares (membranas, DNA e mitocôndrias).

Além da utilização de crioprotetores internos é importante adicionar ao diluidor de congelamento um crioprotetor externo como, por exemplo, as lipoproteínas de baixa densidade (LDL). Estas se aderem à membrana espermática impedindo a saída dos fosfolipídios da membrana celular (Foulkes 1977, Watson 1981, Graham & Foote 1987, Bergeron et al. 2004), além de formarem uma película protetora entre a água e os ácidos graxos do espermatozóide (Anton et al. 2003). Vários estudos em mamíferos relatam que a utilização da LDL promove a proteção da membrana espermática durante o processo de

congelamento (Moussa et al. 2002, Bergeron et al. 2004, Varela Junior et al. 2009), porém a efetiva proteção na manutenção da estrutura celular pós-descongelamento não foi avaliada em espécies de peixes nativos, de água doce.

Diversos açúcares têm sido incluídos nos diluentes para criopreservação de sêmen, por atuarem como substratos de energia, componentes osmóticos e agentes crioprotetores, em função de seu alto peso molecular, contribuindo para o equilíbrio osmótico (Holt 2000). Entretanto, com o intuito de reduzir as injúrias causadas pela cristalização de gelo utilizam-se açúcares que atuam na desidratação celular (aumento da pressão osmótica), reduzindo assim o volume de água passível de ser congelada no interior da célula (Aisen et al. 2002). Geralmente, dissacarídeos, como sacarose (glicose + frutose) e trealose (glicose + glicose), são mais efetivos na função de estabilizar a bicamada lipídica da membrana espermática do que os monossacarídeos (De Leeuw et al. 1993). Alguns estudos demonstraram o efeito benéfico da trealose na proteção da membrana espermática de mamíferos (Aisen et al. 2005, Berlinguer et al. 2007).

O efeito crioprotetor da trealose é atribuído ao seu efeito osmótico, bem como às interações específicas com os fosfolipídios presentes na membrana (Bakás & Disalvo 1991). Neste sentido, a trealose interage com os grupos polares do fosfolipídio, impedindo o espaçamento lateral entre os fosfolipídios, prevenindo a fusão, justaposição e rompimento das membranas (Crowe et al. 1984, Anchoroguy et al. 1987). Este dissacarídeo auxilia também na contensão da excessiva desidratação celular, reduz a formação de cristais de gelo, reduzindo, assim, as crioinjúrias das organelas celulares. Desta forma, confere maior flexibilidade à membrana espermática, tornando-a mais resistente aos danos causados pelo choque térmico (Aisen et al. 2005). Cabe destacar ainda, que a sua ação como antioxidante protege a membrana contra o ataque de radicais livres, produzidos pelas reações oxigênio-especie específicos (Bucak et al. 2007). O efeito da utilização da trealose sobre as estruturas dos gametas masculinos de peixes de água doce criopreservados é desconhecido.

Em decorrência destes fatos, esta tese teve como objetivo avaliar o efeito do DMSO, amidas, lipoproteína de baixa densidade e trealose sobre as estruturas (mitocôndrias, membranas celulares e DNA) e sobre a funcionalidade (motilidade, tempo de latência, taxa

de fertilização e taxa de eclosão) de células espermáticas criopreservadas de tambaqui *Colossoma macropomum*.

REFERÊNCIAS

- AISEN, EG, VH MEDINA & A VENTURINO. 2002. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different threalose concentrations. *Theriogenology*, 57: 1801-1808.
- AISEN, E, M QUINTANA, VH MEDINA, H MORELLO & A VENTURINO. 2005. Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders. *Cryobiology*, 50: 239-249.
- ALVARENGA, MA, FO PAPA, FC LANDIM-ALVARENGA & ASL MEDEIROS. 2005. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: A review. *Animal Reproduction Science*, 89: 105–113
- ANCHORDOGUY, TJ, AS RUDOLPH, JF CARPENTER & JH CROWE. 1987. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. *Cryobiology*, 24: 324–331.
- ANTON, M, V MARTINET, M DALGALARRONDO, V BEAUMAL, E DAVID-BRIAND & H RABESONA. 2003. Chemical and structural characterization of low-density lipoproteins purified from hen egg yolk. *Food Chemistry*, 83: 175-183.
- BAKÁS, LS & EA DISALVO. 1991. Effect of Ca²⁺ on the cryoprotective action of trehalose. *Cryobiology*, 28: 347-353.
- BALL, BA & A VO. 2001. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. *Journal of Andrology*, 22: 1061-1069.
- BERGERON, A, MH CRÊTE, Y BRINDLE & P MANJUNATH. 2004. Low-density lipoprotein fraction from hen`s egg yolk decreases the binding of the major protein of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. *Biology Reproduction*, 70: 708-717.

- BERLINGUER, F, GG LEONI, S SUCCU, F MOSSA, M GALIOTO, M MADEDDU & S NAITANA. 2007. Cryopreservation of European Mouflon (*Ovis Musimon*) semen during the non-breeding season is enhanced by the use trehalose. *Reproduction in Domestic Animals*, 42: 202–207.
- BIANCHI, I, K CALDERAM, EF MASCHIO, EM MADEIRA, RR ULGUIM, CD CORCINI, DC BONGALHARDO, EK CORRÊA, T LUCIA JUNIOR, JC DESCHAMPS & MN CORRÊA. 2008. Evaluation of amides and centrifugation temperature in boar semen cryopreservation. *Theriogenology*, 69: 632–638.
- BILLARD, R, J COSSON & LW CRIM. 1995. Broodstock management and seed quality- General considerations. In: BROMAGE, N & RJ ROBERTS, (Eds.). *Broodstock management and egg larval quality*, Oxford: Blackwell Science, 1-24.
- BRAGA, B, I HESPANHOL & JG CONEJO. 2005. *Introdução à Engenharia Ambiental*. 2 ed, São Paulo: Pearson Prentice hall, 322p.
- BUCAK, MN, A ATESSAHIN, O VARISLI, A YUCE, N TEKIN & A AKCAY. 2007. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen. Microscopic and oxidative stress parameters after freeze–thawing process. *Theriogenology*, 67: 1060–1067.
- CARPIO, MJ 2006. Analisis de los studios de impacto ambiental del complejo hidroeléctrico Del Rio Madeira: hidrologia y sedimentos. Ministerio de agricultura y ganaderia. La paz, Bolívia, 28 p.
- CECCARELLI, PS, JA SENHORINI & GL VOLPATO. 2000. *Dicas em piscicultura; perguntas e respostas*. Santana Gráfica Editora: Botucatu, 247 p.
- CHAMBEYRON, F & Y ZOHAR.1990. A diluent for sperm cryopreservation of gilthead sea bream, *Sparus aurata*. *Aquaculture*, 90: 345-352.
- CHELLAPA, S, NT CHELLAPA, WT BARBOSA, FA HUNTIGORD & MCM BEVERIDGE. 1995. Growth and production of the Amazonian Tambaqui in fixed cages under different feeding regimes. *Aquaculture International*, 3: 11-21.
- CROWE, LM, R MOURADIAN, JH CROWE, SA JACKSON & C WOMERSLEY. 1984. Effects of carbohydrates on membrane stability at low water activities. *Biochimica et Biophysica Acta*, 779: 141–150.

- DE LEEUW, FE, AM DE LEEUW, JHG DEN DAAS, B COLENBRANDER & AJ VERKLEIJ. 1993. Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compound on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology*, 30: 32-44.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2008. Fishery and Aquaculture Statistics - Aquaculture production, 220 p.
- FARIAS, JO & JF NUNES. 1999. Avaliação *in vitro* e *in vivo* do sêmen de Tambaqui (*Colossoma macropomum*) conservado a temperatura ambiente e criopreservado em água de coco. *Revista Científica de Produção Animal*, 1: 44-58.
- FOULKES, JA. 1977. The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa. *Journal Reproduction and Fertility*, 49: 277-84.
- GILMORE, JA, LE MCGANN, J LIU, DY GAO, AT PETER, FW KLEINHANS & JK CRITSER. 1995. Effects of cryoprotectant solutes on water permeability of human spermatozoa. *Biology Reproduction*, 53: 985-995.
- GOULDING, MA & ML CARVALHO, 1982. Life history and management of the Tambaqui (*Colossoma macropomum*, characidae): An important Amazonian foodfish. *Revista Brasileira de Zoologia*, 1: 107-138.
- GRAHAM, JK & RH FOOTE. 1987. Effect of several lipids fatty acyl chain length and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. *Cryobiology*, 24: 42-52.
- HAMMERSTEDT, RH & JK GRAHAM. 1992. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. *Cryobiology*, 29: 26-38.
- HE, S & LC WOODS. 2004. Effects of dimethyl sulfoxide and glycine on cryopreservation induced damage of plasma membrane and mitochondria to striped bass (*Morone saxatilis*) sperm. *Cryobiology*, 48: 254-262.
- HOLT, WV 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*, 62: 3-22.
- HU, J, Q LI, Z JIANG & W LI. 2008. Effects of different extenders on DNA integrity of boar spermatozoa following freezing-thawing. *Cryobiology*, 57: 257-262

- KAVAMOTO, ET, WF SILVEIRA, HM GODINHO & E ROMAGOSA. 1989. Fertilização em *Prochilodus scrofa*, Steindachner 1881, com sêmen criopreservado em nitrogênio líquido. Boletim do Instituto de Pesca, 16: 29–36.
- KODERLE, M, C AURICH & S SCHAFER-SOMI, 2009. The influence of cryopreservation and seminal plasma on the chromatin structure of dog spermatozoa. Theriogenology, 72: 1215-1220.
- LANES, CFC, M OKAMOTO, PV CAVALCANTI, T COLLARES, VF CAMPOS, JC DESCHAMPS, RB ROBALDO, LF MARINS & LA SAMPAIO. 2008, Cryopreservation of Brazilian flounder (*Paralichthys orbignyanus*) sperm. Aquaculture, 275: 361-365.
- LOPES, TS, DP STREIT JUNIOR, RP RIBEIRO, JA POVH, NM LOPERA-BARRERO, L VARGAS, C PINTO FILHO & JR QUEIROZ. 2009. Diversidade genética de estoques de reprodutores de *Colossoma macropomum*. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 61: 728-735.
- MARTÍNEZ-PÁRAMO, S, S PÉREZ-CEREZALES, F GÓMEZ-ROMANO, G BLANCO, JA SÁNCHEZ & MP HERRÁEZ. 2009. Cryobanking as tool for conservation of biodiversity: Effect of brown trout sperm cryopreservation on the male genetic potential. Theriogenology, 71: 594–604.
- McNIVEN, MA, RK GALLANT & GF RICHARDSON. 1993. Dymethyl acetamide as a cryoprotectants for rainbow trout spermatozoa. Theriogenology, 40: 343-948.
- MENEZES, JTB, LJ QUEIROS, CRC DORIA & JB MENEZES JUNIOR. 2008. Avaliação espermática pós-descongelamento em Tambaqui, *Colossoma Macropomum* (Cuvier, 1818). Acta Amazônica, 38: 365-368.
- MOUSSA, M, V MARINET, A TRIMECHE, D TAINTURIER & M ANTON. 2002. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. Theriogenology, 57: 1695-1706.
- MURGAS, LSD, RT FRANCISCATTO & AGO SANTOS. 2003 Avaliação espermática pós-descongelamento em piracanjuba (*Brycon orbignyanus*, Vallenciennes, 1849). Revista Brasileira de Zootecnia, 32: 1810–1814

- ODUM, EP 1971. Fundamentals of ecology. 3 rd edition. W.B. SAUNDERS Company – Philadelphia, 927 p.
- RICHARDSON, GF, TI MILLER & MA MCNIVEN. 2000. Cryopreservation of artic charr, *Salvelinus alpinus* (L.), semen in various extenders and in three sizes of straw. Aquaculture Research, 31: 307-315.
- SILVEIRA WF, ET KAVAMOTO, MA CESTAROLLI, HM GODINHO, SM RAMOS & NA SILVEIRA. 1990. Avaliação espermática, preservação criogênica e fertilidade do sêmen do pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), proveniente de reprodução induzida. Boletim do Instituto de Pesca, 17: 1–13.
- SIROL, RN & SG BRITTO. 2006. Conservação e manejo da ictiofauna: Repovoamento. In: NOGUEIRA, MG, R HENRY & A JORCIN. (Ed. Ecologia de reservatórios: Impactos potenciais, ações de manejo e sistemas em cascatas). São Carlos: RIMA, 275-284.
- SUQUET, M, C DREANNO, C FAUVEL, J COSSON & R BILLARD. 2000. Cryopreservation of sperm in marine fish. Aquaculture Research, 31: 231-243.
- VALENTI, WC, CR POLI, JA PEREIRA & JR BORGHETTI, 2000. Aqüicultura no Brasil. Brasília: CNPQ:MCT, 399 p.
- VARELA JUNIOR, AS, CD CORCINI, RR ULGUIM, MVF ALVARENGA, I BIANCHI, MN CORRÊA, T LUCIA JUNIOR & JC DESCHAMPS. 2009. Effect of low density lipoprotein on the quality of cryopreserved dog semen. Animal Reproduction Science, 115: 323-327
- VIVEIROS, ATM & HP GODINHO. 2009. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. Fish Physiology and Biochemistry, 35: 137–150.
- VUTHIPHANDCHAI, V, S CHOMPHUTHAWACH & S. NIMRAT. 2009. Cryopreservation of red snapper (*Lutjanus argentimaculatus*) sperm: Effect of cryoprotectants and cooling rates on sperm motility, sperm viability, and fertilization capacity. Theriogenology, 72: 129–138.
- WATSON, PF. 1981. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 degrees C by egg-yolk lipoprotein. Journal of Reproduction and Fertility, 62: 483-492

CAPITULO I

**EFEITO CRIOPROTETOR DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO
DIMETILSULFÓXIDO NO CONGELAMENTO DE SÊMEN DE TAMBAQUI,
Colossoma macropomum.**

ARTIGO ACEITO NA REVISTA ATLÂNTICA.

TÍTULO: EFEITO CRIOPROTETOR DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO DIMETILSULFÓXIDO NO CONGELAMENTO DE SÊMEN DE TAMBAQUI, *Colossoma macropomum*.

SUBTÍTULO: DMSO NO CONGELAMENTO DE SÊMEN DE TAMBAQUI

Antonio Sergio Varela Junior^{ab*}, Carine Dahl Corcini^c, Danilo Pedro Streit Jr.^d,
Guilherme Rizzoto^c, Rodrigo Dessesards Jardim^a, Thomaz Lucia Jr.^d, Mario Roberto Chim
Figueiredo^b

^aInstituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande, 96201-900, Rio Grande, RS, Brasil

^bPrograma de Pós Graduação em Aqüicultura, Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande, 96201-900, Rio Grande, RS, Brasil

^cREPROPEL - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 96010-900, Pelotas, RS, Brasil.

^dAquam - Departamento de Zootecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 91540-000 Porto Alegre, RS, Brasil

*Endereço de contato: Setor de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Prédio 6, Campus Carreiros, Av. Itália km 8, Bairro Carreiros, 96201-900, Rio Grande, RS, Brasil.
Telefone: 55 53 32935186, e-mail: antoniovarela@furg.br

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do diluente com dimetilsulfóxido (DMSO) sobre a estrutura e funcionalidade do espermatozóide de Tambaqui *Colossoma macropomum* criopreservado. O sêmen foi diluído 1/9 (v/v) em Beltsville Thawing Solution acrescido de 5, 10, 15 e 20% de DMSO. Após dois minutos foi congelado em botijão *dry shipper* (-76°C/12h), sendo armazenado em botijão de NL (-196°C) Após 15 dias o sêmen criopreservado foi avaliado quanto às taxas de motilidade, latência, fertilização, eclosão, integridade de membrana e de DNA, funcionalidade mitocondrial e viabilidade. As taxas de fertilização e eclosão com 10% DMSO não diferiram ($P > 0,05$) do sêmen fresco. Os diluentes com 5 e 10% de DMSO foram superiores ($P < 0,05$), nas avaliações de motilidade, latência e integridade de DNA do espermatozóide, às concentrações 15 e 20%. Entretanto, a viabilidade celular nas concentrações 5 e 10% de DMSO foi inferior ($P < 0,05$) à obtida com 20% de DMSO, enquanto com 15% de DMSO não diferiu ($P > 0,05$) das demais concentrações. Considerando os resultados *in vivo* e *in vitro*, nas condições experimentais relatadas, o DMSO na concentração de 10% foi associado à melhor manutenção da qualidade de sêmen criopreservado de Tambaqui.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of an extender including dimethylsulfoxide (DMSO) on the structure and functionality of frozen sperm of Tambaqui *Colossoma macropomum*. Sperm was extended 1/9 (v/v) in Beltsville Thawing Solution including 5%, 10%, 15% and 20% DMSO. After two minutes, sperm was frozen in *dry shipper* (-76 °C/12h) and subsequently stored in liquid nitrogen (-196 °C). After 15 days, sperm was evaluated according to: motility; latency period; fertilization and hatching rates; membrane and DNA integrity; mitochondrial functionality; and viability. Fertilization and hatching rates with 10% DMSO did not differ from those with fresh sperm ($P > 0.05$). Extenders including 5% and 10% DMSO presented greater ($P < 0.05$) sperm motility, latency period and DNA integrity than extenders including 15% and 20% DMSO. However, sperm viability with 5% and 10% DMSO was lower ($P < 0.05$) than with 20% DMSO, but for the extender with 15% DMSO, sperm viability was similar to that with other concentrations ($P > 0.05$). Considering those results, the extender with 10% DMSO was associated with improved quality of frozen sperm of Tambaqui.

INTRODUÇÃO

O Tambaqui *Colossoma macropomum* é a espécie nativa brasileira mais produzida comercialmente (FAO 2008), sendo um peixe de fácil manuseio e rápido crescimento (Chellapa et al. 1995, Maria et al. 2011). Entretanto, por ser uma espécie reofílica (Froese & Pauly 2009), sua reprodução em cativeiro depende de realização de indução hormonal e posterior fertilização artificial.

A fertilização artificial pode ser aplicada para aumentar a produção, atendendo à grande demanda e diminuindo a exploração dos recursos naturais. A criopreservação é uma técnica valiosa no melhoramento genético em planteis (Suquet et al. 2000), além de proporcionar um contínuo fornecimento de sêmen de boa qualidade para a fertilização artificial. Para o sucesso do congelamento é necessário que os diluentes utilizados na preservação seminal tenham pH e osmolalidade adequados, boa capacidade de tamponamento e proteção da lesão criogênica (Salamon & Maxwell 2000). A composição dos diluentes, concentração dos crioprotetores e método de congelamento podem afetar a qualidade final do sêmen (Sansone et al. 2002, DeGraaf & Berlinsky 2004). Os crioprotetores internos minimizam as perdas da qualidade espermática, agindo diretamente sobre as organelas e funcionalidades espermáticas (Holt 2000). As ações destas substâncias crioprotetoras são evitar danos na membrana espermática (Hu et al. 2009), prevenir a desnaturação do DNA (Hu et al. 2008, Koderle et al. 2009) e evitar lesões nas mitocôndrias e microtúbulos (Hammerstedt & Graham 1992). Vários crioprotetores internos tem sido testados em peixes brasileiros, sendo o dimetilsulfóxido (DMSO), nas concentrações de 5-15%, o mais efetivo na crioproteção aos espermatozoides (Viveiros & Godinho 2009).

Segundo Menezes et al. (2008), utilizando os crioprotetores etileno glicol, dimetilsulfóxido, propilenoglicol, dimetilacetamida e metanol (concentrações e diluente base não descritos), a motilidade pós-descongelamento do sêmen de Tambaqui variou entre 5 e 20%. Farias & Nunes (1999), que utilizaram água de coco e 5% de glicerol como diluidores de congelamento do sêmen de Tambaqui, observaram uma variação na motilidade espermática pós-descongelamento entre 30 e 80%. Porém, nesses estudos, não foi verificada a ação das diferentes concentrações de um mesmo crioprotetor, nem a ação

destes sobre a viabilidade e as estruturas (membrana, mitocôndria e DNA) das células espermáticas descongeladas.

Em decorrência destes fatos, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito das diferentes concentrações de DMSO sobre as estruturas (mitocôndrias, membranas celulares e DNA) e sobre a funcionalidade (motilidade, tempo de latência, viabilidade, taxa de fertilização e taxa de eclosão) de células espermáticas criopreservadas de *Colossoma macropomum*.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho de coleta foi realizado no período de novembro de 2009 a fevereiro de 2010, na Piscicultura Boa Esperança, em Pimenta Bueno, Rondônia. As análises da qualidade seminal foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia em Reprodução Animal da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) e no Laboratório de Histologia da Universidade Federal de Rio Grande (FURG), Rio Grande do Sul, Brasil. Todas as substâncias químicas utilizadas são provenientes da Sigma Chemical Company® (St. Louis, MO – USA).

Peixes

Avaliou-se o efeito do DMSO, durante a criopreservação seminal, sobre as células espermáticas de *C. macropomum*. Foram utilizados oito machos e quatro fêmeas em idade reprodutiva (3 a 4 anos) no experimento. Os animais foram mantidos em viveiros, sob condições ambientais, sendo alimentados com ração comercial com 40% de proteína bruta e 2900 kcal de energia metabolizável/kg de ração, com uma frequência alimentar de três vezes na semana, servindo-se 3% do peso vivo por vez.

Coleta e avaliação seminal

Os machos foram despescados dos viveiros, sendo imediatamente induzidos com 1,0 mg de extrato de hipófise de carpa/kg de animal vivo, diluído em 0,5 mL de soro fisiológico estéril (0,9% de NaCl), aplicado na região dorso lateral. Após, os peixes foram mantidos em dois tanques (3.000 L) de manipulação (no máximo quatro animais em cada), com coluna d'água de 70 centímetros, em fluxo constante sob temperatura de 28 °C, por no

máximo 24 h. Após 6 h e 15 min (175 horas-grau) foi realizada massagem abdominal, coletando-se o sêmen com tubo cônico de 15 mL (um para cada animal), registrando-se o volume coletado. Foi evitada a extrusão simultânea de fezes e/ou urina, a fim de não ativar os espermatozóides nem contaminar as amostras, como recomendado por Billard et al. (1995).

Antes da criopreservação, cada amostra seminal foi avaliada, por um único observador, quanto à motilidade e tempo de latência, descartando amostras que não apresentavam motilidade acima de 80% em 10 s após a ativação com água destilada. A motilidade (percentual de células móveis) foi avaliada colocando-se 1,0 µL de sêmen e 99,0 µL de água destilada em lâmina sob lamínula, em microscópio óptico de contraste de fases (Maria et al. 2011). Para avaliar o tempo de latência, foi mensurado o tempo desde a ativação até a parada total da movimentação espermática (segundos). A concentração espermática foi determinada por meio de câmara de Neubauer, contando-se em microscópio óptico (Maria et al. 2011).

Criopreservação Seminal

A solução base para diluição foi o Beltsville Thawing Solution (BTS) constituído de 37,00 g de glicose; 6,00 g de citrato de sódio di-hidratado; 1,25 g de bicarbonato de sódio; 1,25 g de etilenodiamino tetracetato e 0,90 g de cloreto de potássio em 1,00 L de água destilada (Pursel & Johnson 1975).

O sêmen de cada macho (n = 8) foi diluído 1/9 (v/v) em todos os tratamentos (5, 10, 15 e 20%) de DMSO em solução base (BTS). Para cada repetição (machos) de cada tratamento (5, 10, 15 e 20% de DMSO em BTS) foram envasadas 5 palhetas de 250 µL, identificadas, colocadas em tubos plásticos e fixadas nas racks, permanecendo por cinco minutos a 24 °C. Após, foram alocadas no canister de um botijão do tipo *dry shipper* (Taylor-Wharton, modelo CP 300 *dry shipper*), com vapor de nitrogênio, sendo congeladas de acordo com Taitson et al. (2008). As palhetas permaneceram por 12 horas no *dry shipper*, sendo finalmente transferidas para o botijão de nitrogênio líquido (MVE, modelo CP-34), onde ficaram estocadas por, no mínimo, 15 dias a -196 °C.

Descongelamento seminal e avaliações da taxa de fertilização e eclosão

Para avaliar a taxa de fertilização foram utilizadas quatro fêmeas, uma para cada dois machos, ou seja, na desova de uma fêmea eram testados os quatro tratamentos de dois machos. As fêmeas foram induzidas à desova com extrato de hipófise de carpa (5,0 mg/kg de peso corpóreo), diluído em 2,0 mL de soro fisiológico estéril (0,9% de NaCl), sendo aplicado com seringa de 2,0 mL (2/0,01 mL), na região dorso lateral. Os óvulos foram extrusados por massagem abdominal e coletados em Becker de 1000 mL, sendo divididos em seis alíquotas de 2,0 g cada.

Alíquotas de 150 µL de sêmen oriundos de cada macho, criopreservada com diferentes tratamentos foram descongeladas de acordo com Streit Jr et al. (2006), a 45 °C, por 5 s, e fertilizaram as alíquotas de óvulos. As outras duas alíquotas de óvulos restantes de cada fêmea foram fertilizadas com 15 µL sêmen fresco, coletado de dois machos no momento da execução do teste. As alíquotas de ovos fertilizados com sêmen fresco serviram de controle para assegurar a qualidade dos óvulos, descartando-se as amostras com menos de 80% de taxa de fertilização. O sêmen fresco foi utilizado para fertilizar a primeira e a última alíquota de óvulos.

Na execução dos testes de fertilização, as células espermáticas foram colocadas em contato com as alíquotas dos óvulos em becker de 20 mL. A ativação do sêmen foi realizada mediante a adição, ao Becker com 2 g de óvulos, de 2,0 mL de água destilada na temperatura de 28 °C. Após, o material foi homogeneizado suavemente por aproximadamente 5 s e permaneceu em descanso por 2 minutos. Ao final deste período, foram adicionados 10,0 mL de água destilada em cada uma das alíquotas, visando hidratar os ovos fertilizados. Após foram incubados sob fluxo de água delicado e constante de 150 mL/min em incubadoras experimentais de 2 L.

O acompanhamento dos estágios de desenvolvimento embrionário foi realizado com uso de estereomicroscópio. A taxa de fertilização foi avaliada após 8 horas, sendo considerado o número de ovos fertilizados sobre o total de óvulos (2 g) e ao final expresso em percentual. Já a taxa de eclosão foi avaliada considerando-se o total de embriões eclodidos, sobre o total de ovos fertilizados, sendo ao final expresso em percentual.

Funcionalidade mitocondrial, viabilidade, integridade de membrana e DNA

As amostras foram descongeladas a 45 °C durante 5 s (Streit Jr et al. 2006), sendo re-suspensas em 400 µL de BTS (1:3, v/v), à temperatura de 22 °C, em tubo cônico de 1,5 mL, sendo posteriormente analisada a motilidade espermática, tempo de latência, funcionalidade mitocondrial, viabilidade celular, integridade de membrana e DNA.

As avaliações de motilidade espermática e de tempo de latência foram realizadas conforme descrito para o sêmen fresco. A funcionalidade mitocondrial foi avaliada com a utilização da coloração fluorescente rhodamina 123 (He & Woods 2004). A viabilidade celular foi avaliada com os corantes histoquímicos eosina e nigrosina (Maria et al. 2011). A integridade de membrana dos espermatozóides foi avaliada com uso de sondas fluorescentes de diacetato de carboxifluoresceína - CFDA e iodeto de propídio - PI (Harrison & Vickers 1990). A integridade do DNA foi avaliada por meio da sonda laranja de acridina (Bencharif et al. 2010). As avaliações de funcionalidade mitocondrial, integridade de membrana e de DNA foram realizadas em microscópio de epifluorescência (Olympus® BX 51, América INC, São Paulo - Brasil), com 5 µL de solução com espermatozóides em lâmina sob lamínula (18 x 18 mm), avaliando-se 200 células por amostra. As taxas foram expressas através do percentual entre células íntegras/funcionais sobre o total de células avaliadas.

Análise Estatística

Foi realizada análise de variância de Kruskal-Walis para medidas não paramétricas, com posterior comparação Post Hoc entre os tratamentos. As diferentes concentrações de DMSO foram consideradas variáveis independentes, e as taxas de fertilização e eclosão, motilidade espermática, tempo de latência, funcionalidade mitocondrial, viabilidade celular, e integridade de membrana e DNA, foram consideradas variáveis dependentes. Para fins de interpretação, os dados foram expressos em média ± erro padrão da média. As correlações, dentre as variáveis, foram realizadas através do teste de Spearman. Todas as análises foram realizadas no software Statistix 9.0 (2008).

RESULTADOS

Os machos utilizados no experimento produziram em média $8,6 \pm 0,4$ mL de volume de sêmen fresco coletado ($n = 8$), com concentração de $7,3 \pm 0,7 \times 10^9$ espermatozóides/mL, motilidade de $91,0 \pm 1,7$ % e o tempo de latência de $86,0 \pm 5,7$ segundos.

Verificou-se associação ($P < 0,05$) entre as diferentes concentrações de DMSO e as variáveis dependentes avaliadas para estimar a qualidade e funcionalidade do espermatozóide de Tambaqui criopreservado. As taxas de fertilização e de eclosão utilizando-se o diluente com 10% DMSO não diferiram ($P > 0,05$) das obtidas com sêmen fresco (Tabela 1).

As variáveis motilidade, tempo de latência e integridade de DNA dos espermatozóides, utilizando os diluentes com 5 e 10% de DMSO foram superiores ($P < 0,05$) aos resultados obtidos nas concentrações 15 e 20% de DMSO (Tabelas 2 e 3). Entretanto, a viabilidade celular dos tratamentos com a adição de 5 e 10% de DMSO foi inferior ($P < 0,05$) à obtida no tratamento com 20% de DMSO, enquanto no tratamento com 15% de DMSO não diferiu ($P > 0,05$) de nenhum outro tratamento (Tabela 2).

Quanto à integridade de membrana, os tratamentos com 10, 15 e 20% de DMSO não diferiram ($P < 0,05$) entre si, porém o tratamento com 5% de DMSO foi inferior ($P < 0,05$) aos tratamentos com 15 e 20% de DMSO (Tabela 3). Já para a funcionalidade mitocondrial não houve diferença ($P > 0,05$) entre as concentrações de DMSO utilizadas na criopreservação espermática (Tabela 3). Houve correlações significativas ($P < 0,05$) entre as diferentes concentrações do crioprotetor com as variáveis dependentes motilidade espermática ($r = -0,82$), tempo de latência ($r = -0,83$), integridade de DNA ($r = -0,83$), viabilidade celular ($r = 0,50$), integridade de membrana ($r = 0,65$) e funcionalidade mitocondrial ($r = 0,36$).

DISCUSSÃO

Em várias espécies de peixes nativos brasileiros, *Brycon amazonicus* (Cruz-Casallas et al. 2004, Velasco-Santamaria et al. 2006), *B. orthotaenia* (Melo & Godinho 2006), *Leporinus obtusidens* (Taitson et al. 2008), *Salminus brasiliensis* (Cosser et al. 1984, Carolsfeld et al. 2003), *Prochilodus lineatus* (Carolsfeld et al. 2003, Felizardo et al. 2010), *B. orbignyanus*, *L. elongatus* e *Piaractus mesopotamicus* (Carolsfeld et al. 2003), o DMSO foi

utilizado com sucesso no congelamento seminal. No presente estudo foram observados resultados similares, pois na concentração de 10% de DMSO obtiveram-se os melhores resultados nas avaliações de motilidade, tempo de latência e integridade de DNA dos espermatozóides, e nas taxas de fertilização e de eclosão. Deve ser ressaltado que não houve diferença, nas taxas de fertilização e eclosão, entre o sêmen fresco e o sêmen criopreservado com 10% de DMSO.

Observou-se que os espermatozóides perderam qualidade devido à toxidez da solução crioprotetora e a exposição à baixa temperatura, promovendo a queda da motilidade no sêmen fresco para valores não superiores a 20%. Um indicativo desta combinação de fatores pode ser deduzido a partir dos resultados da funcionalidade mitocondrial, integridade de membrana e DNA, obtidos com as diferentes concentrações utilizadas de DMSO. As concentrações mais baixas mantiveram melhor a integridade de DNA, apresentando correlação negativa (-0,83) e significativa ($P < 0,05$) com as concentrações deste crioprotetor, demonstrando sua toxidez em relação ao material genético do espermatozóide. Já as altas concentrações diminuíram o rompimento das membranas, pois minimizam a formação de cristais de gelo e promovem a desidratação espermática (He & Woods 2004), melhorando assim a integridade de membrana e mitocôndria, e apresentaram correlações positivas (0,66 e 0,36, respectivamente) e significativas ($P < 0,05$) com a concentração do crioprotetor. Deste modo, a concentração de crioprotetor que produziu melhor combinação entre menor toxidez e maior proteção no congelamento do espermatozóide de *C. macropomum* foi de 10%.

Na criopreservação de *B. amazonicus*, Cruz-Casallas et al. (2004) obtiveram, com 10% de DMSO, as melhores taxas de motilidade (68,8%) e de fertilização, que foram de 31, 51 e 58% para 114.285, 228.571 e 457.142 espermatozóides por ovo (respectivamente), sendo que os autores utilizaram quantidade de espermatozóides muito superior ao utilizado no presente trabalho (30.416 espermatozóides por ovo). No estudo com *L. obtusidens*, a taxa de fertilização com sêmen criopreservado variou também de acordo com o número de espermatozóides (móveis) utilizados, obtendo taxa de fertilização de 74, 58, 37 e 22% com 112.456, 84.343, 56.228 e 28.114 espermatozóides móveis por ovo, respectivamente (Taitson et al. 2008). Esses resultados comprovam que a fertilização (60,3%) encontrada no

presente trabalho, com 10% de DMSO diluído em BTS, está relativamente alta, considerando o baixo número de espermatozóides móveis utilizados (6.083 espermatozóides móveis por ovo).

A toxidez do DMSO nas concentrações de 15 e 20% resultou em motilidade e tempo de latência nulos, entretanto, ocorreu fertilização e eclosão. Isto pode estar relacionado à elevada concentração espermática das espécies reofílicas e/ou em razão do tempo necessário para preparação da lâmina (10 s), promovendo assim valores nulos ou próximos de zero quando o tempo de movimentação espermático é inferior ao intervalo desde a ativação espermática até a visualização dos espermatozóides no microscópio ótico.

O DMSO é considerado o melhor crioprotetor para peixes de água doce (Leung 1991) tendo proporcionado os melhores resultados em vários trabalhos com peixes nativos brasileiros de água doce (Viveiros & Godinho 2009). No entanto, um estudo que considera o DMSO ineficiente como crioprotetor para a sêmen congelado de Tambaqui (Menezes et al. (2008), foi baseado no uso de somente um reprodutor, sem descrição da concentração dos crioprotetores, da solução base utilizada, e do número de espermatozóides por ovo, o que dificulta a repetição de sua metodologia. Além disto, este mesmo estudo não avaliou as variáveis viabilidade celular, integridade da membrana e do DNA espermático, funcionalidade mitocondrial, taxa de fertilização e de eclosão com o DMSO.

O diluente e o protocolo de congelamento testados no presente estudo viabilizam o emprego desta ferramenta para programas de melhoramento animal ou formação de banco de germoplasma de *C. macropomum*, pois uma alta produtividade não é necessária nestas condições. Por outro lado, para uso em condições comerciais, são necessários trabalhos futuros avaliando diluentes, crioprotetores e protocolos de congelamento e descongelamento em sêmen de *C. macropomum*.

CONCLUSÃO

Considerando os resultados *in vivo* e *in vitro*, nas condições experimentais relatadas, o DMSO na concentração de 10% foi associado à melhor manutenção da qualidade de sêmen criopreservado de Tambaqui.

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi patrocinado pela CAPES e CNPq. Os autores agradecem aos proprietários da Piscicultura Boa Esperança (Pimenta Bueno, RO, Brasil) por suas valiosas contribuições.

LITERATURA CITADA

- BENCHARIF, D, L AMIRAT, O PASCAL, M ANTON, E SCHMITT, S DESHERCES, G DELHOMME, M-L LANGLOIS, P BARRIÈRE, M LARRAT & D TAINTURIER, 2010. The Advantages of Combining Low-Density Lipoproteins with Glutamine for Cryopreservation of Canine Semen. *Reprod. Dom. Anim.*, 45: 189-200.
- BILLARD, R, J COSSON & LW CRIM. 1995. Broodstock management and seed quality- General considerations. In: BROMAGE, N & RJ ROBERTS. (Eds.). *Broodstock management and egg larval quality*, Oxford: Blackwell Science. 1-24.
- CAROLSFELD, J, HP GODINHO, E ZANIBONI FILHO & BJ HARVEY. 2003. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. *J. Fish Biol.*, 63: 472-489.
- CHELLAPA, S, NT CHELLAPA, WT BARBOSA, FA HUNTIGORD & MCM BEVERIDGE. 1995. Growth and production of the Amazonian Tambaqui in fixed cages under different feeding regimes. *Aquacult. Intern.*, 3: 11-21.
- COSER, AM, H GODINHO & DM RIBEIRO. 1984. Cryogenic preservation of spermatozoa from *Prochilodus scrofa* and *Salminus maxillosus*. *Aquacult.*, 37: 387-390.
- CRUZ-CASALLAS, PE, SC PARDO-CARRASCO, JA ARIAS-CASTELLANOS, PE LOMBO-CASTELLANOS, DA LOMBO-RODRÍGUEZ & JE PARDO-MARIÑO. 2004. Cryopreservation of *Yamú Brycon siebenthalae* milt. *J. World Aquacult. Soc.*, 35: 529-535.
- DEGRAAF, JD & DL BERLINSKY. 2004. Cryogenic and refrigerated storage of rainbow smelt *Osmerus mordax* spermatozoa. *J. World Aquacult. Soc.*, 35: 209-216.

- FAO, Fishery and Aquaculture Statistics - Aquaculture production. 2008. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 220p.
- FARIAS, JO & JF NUNES. 1999. Avaliação in vitro e in vivo do sêmen de Tambaqui (*Colossoma macropomum*) conservado a temperatura ambiente e criopreservado em água de coco. Ver. Cient. Prod. Anim., 44-58.
- FELIZARDO, VO, RA MELLO, LDS MURGAS, ES ANDRADE, MM DRUMOND & PV ROSA. 2010. Effect of cryopreservant combinations on the motility and morphology of curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm. Anim. Reprod. Sci., 122: 259–263
- FROESE, R. & PAULY, D. 2009. Fish Base. Disponível em: www.fishbase.org, Acesso em: 29/04/2011.
- HAMMERSTEDT, RH & JK GRAHAM. 1992. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. Cryobiology, 29: 26–38.
- HARRISON, RAP & SE VICKERS. 1990. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. J. Reprod. Fert., 88: 343-352.
- HE, S & LC WOODS. 2004. Effects of dimethyl sulfoxide and glycine on cryopreservation induced damage of plasma membrane and mitochondria to striped bass (*Morone saxatilis*) sperm. Cryobiology, 48: 254–262.
- HOLT, WV. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. Anim. Reprod. Sci., 62: 3-22.
- HU, J, Q LI, Z JIANG & W LI. 2008. Effects of different extenders on DNA integrity of boar spermatozoa following freezing-thawing. Cryobiology, 57: 257–262.
- HU, J, Q LI, Z JIANG, H YANG, S ZHANG & H ZHAO. 2009. The Cryoprotective Effect of Trehalose Supplementation on Boar Spermatozoa Quality. Reprod. Dom. Anim., 44: 571–575.
- KODERLE, M, C AURICH & S SCHAFFER-SOMI 2009. The influence of cryopreservation and seminal plasma on the chromatin structure of dog spermatozoa. Theriogenology. 72: 1215-1220.
- LEUNG, LKP. Principles of biological cryopreservation. In: JAMIESON, GM. (Ed.). 1991. Fish evolution and systematics: evidence from spermatozoa. Cambridge: University Press, 244 p.

- MARIA, AN, HC AZEVEDO, JP SANTOS & PCF CARNEIRO. 2011. Hormonal induction and semen characteristics of Tambaqui *Colossoma macropomum*. *Zigote*,5:1-5.
- MELO FCSA & HP GODINHO. 2006 A protocol for cryopreservation of spermatozoa of the fish *Brycon orthotaenia*. *Anim. Reprod.*, 3: 380–385.
- MENEZES, JTB, LJ QUEIROS, CRC DORIA & JB MENEZES JR. 2008. Avaliação espermiática pos-descongelamento em Tambaqui, *Colossoma Macropomum* (Cuvier, 1818). *Acta Amaz.*, 38: 365-368.
- PURSEL, VG & LA JOHNSON. 1975. Freezing of boar spermatozoa: Fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *J. Anim. Sci.*, 40: 99-102.
- SALAMON, S & WM MAXWELL. 2000. Storage of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 62: 77–111.
- SANSONE, G, A FABBROCINI, S IEROPOLI, AL LANGELLOTTI, M OCCIDENTE & D MATASSINO. 2002. Effects of extender composition, cooling rate, and freezing on the motility of sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*) spermatozoa after thawing. *Cryobiology*, 44: 229–239.
- STATISTIX®9.0. 2008. Statistix for Windows User's manual. Tallahassee: Analytical software.
- STREIT JR, DP, C BENITES, GV MORAES, RP RIBEIRO, ES SAKAGUTI & RF CALDIERI. 2006. Sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) criopreservado com diluentes utilizados para sêmen de suínos. *Ciênc. Anim. Bras.*, 7: 289-297.
- SUQUET, M, C DREANNO, C FAUVEL, J COSSON & R BILLARD. 2000. Cryopreservation of sperm in marine fish. *Aquacult. Res.*, 31: 231-243.
- TAITSON, PF, E CHAMI & HP GODINHO. 2008. Gene banking of the neotropical fish *Leporinus obtusidens* (Valenciennes, 1836): A protocol to freeze its sperm in the field. *Anim. Reprod. Sci.*, 105: 283–291.
- VELASCO-SANTAMARIA, YM, VM MEDINA-ROBLES & PE CRUZ-CASALLAS. 2006. Cryopreservation of yamú (*Brycon amazonicus*) sperm for large scale fertilization. *Aquacult.*, 256: 264–271.

VIVEIROS ATM & HP GODINHO. 2009. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. *Fish Physiol. Biochem.*, 35: 137–150.

Tabela 1. Taxas de fertilização e de eclosão (média \pm erro padrão da média) obtidas com sêmen de *C. macropomum* fresco e descongelado, após congelamento com diferentes concentrações de dimetilsulfóxido (DMSO)

Diluentes	Taxa de Fertilização (%)	Taxa de Eclosão (%)
Sêmen fresco	86,8 \pm 2,0 ^a	79,9 \pm 1,7 ^a
5% DMSO	39,8 \pm 3,6 ^{bc}	37,4 \pm 4,5 ^b
10% DMSO	60,3 \pm 2,2 ^{ab}	47,3 \pm 2,5 ^{ab}
15% DMSO	26,0 \pm 3,8 ^{bc}	18,5 \pm 3,4 ^{bc}
20% DMSO	5,4 \pm 1,2 ^c	2,4 \pm 1,4 ^c

^{a-b} Médias com letras sobrescritas diferentes, na mesma coluna, diferem estatisticamente ($P < 0,05$), de acordo com o teste de Kruskal-Wallis e comparação com Post Hoc entre os tratamentos.

Tabela 2. Taxas de motilidade, tempo de latência e viabilidade espermática (média \pm erro padrão da média) obtidas com sêmen de *C. macropomum* descongelado, após congelamento com diferentes concentrações dimetilsulfóxido (DMSO)

Diluentes	Taxa de Motilidade (%)	Tempo de Latência (s)	Viabilidade Celular (%)
5% DMSO	19,0 \pm 2,6 ^a	21,3 \pm 2,3 ^a	49,4 \pm 1,9 ^b
10% DMSO	20,0 \pm 2,5 ^a	29,7 \pm 2,7 ^a	48,7 \pm 2,8 ^b
15% DMSO	0,0 \pm 0,0 ^b	0,0 \pm 0,0 ^b	53,4 \pm 3,1 ^{ab}
20% DMSO	0,0 \pm 0,0 ^b	0,0 \pm 0,0 ^b	60,8 \pm 2,6 ^a

^{a-b} Médias com letras sobrescritas diferentes, na mesma coluna, diferem estatisticamente ($P < 0,05$), de acordo com o teste de Kruskal-Wallis e comparação com Post Hoc entre os tratamentos.

Tabela 3. Taxas de integridade de membrana, integridade do DNA e funcionalidade da mitocôndria (média \pm erro padrão da média) obtidas com sêmen de *C. macropomum* descongelado, após congelamento com diferentes concentrações de dimetilsulfóxido (DMSO)

Diluentes	Integridade de Membrana (%)	Integridade do DNA (%)	Funcionalidade da Mitocôndria (%)
5% DMSO	19,8 \pm 2,0 ^b	71,8 \pm 4,0 ^a	26,0 \pm 2,3 ^a
10% DMSO	23,9 \pm 2,1 ^{ab}	48,2 \pm 2,8 ^a	29,5 \pm 2,2 ^a
15% DMSO	30,8 \pm 1,4 ^a	19,4 \pm 1,9 ^b	36,2 \pm 4,1 ^a
20% DMSO	32,1 \pm 1,7 ^a	24,1 \pm 3,2 ^b	36,6 \pm 4,3 ^a

^{a-b} Médias com letras sobrescritas diferentes, na mesma coluna, diferem estatisticamente ($P < 0,05$), de acordo com o teste de Kruskal-Wallis e comparação com Post Hoc entre os tratamentos.

CAPITULO II

**UTILIZAÇÃO DE AMIDAS COMO CRIOPROTETOR EM DILUENTES PARA
O CONGELAMENTO DE SÊMEN DE TAMBAQUI *Colossoma macropomum*.**

ARTIGO ENVIADO PARA REVISTA THERIOGENOLOGY

UTILIZAÇÃO DE AMIDAS COMO CRIOPROTETOR EM DILUENTES PARA O CONGELAMENTO DE SÊMEN DE TAMBAQUI *Colossoma macropomum*.

A.S. Varela Jr.¹¹, C.D. Corcini³, S.M.M. Gheller³, RD Jardim¹, T. Lucia Jr.³, D.P. Streit Jr.⁴; M.R.C. Figueiredo²

¹Instituto de Ciências Biológicas, ²Instituto de Oceanografia, Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande, RS, Brasil

³ReproPel, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil

⁴Aquam, Departamento de Zootecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

RESUMO

Foram testadas amidas como crioprotetor interno, em comparação com os crioprotetores tradicionais Glicerol e dimetilsulfoxido (DMSO), para a preservação de espermatozoides do peixe tambaqui (*Colossoma macropomum*). O sêmen foi diluído em Beltsville Thawing Solution, em seguida congelado com a adição de 2%, 5%, 8% ou 11% de 1) dimetilacetamida (DMA), 2) dimetilformamida (DMF), 3) methylformamide (MF), 5% de glicerol ou 10% dimetilsulfóxido. As amidas, 8% DMF ($91,6 \pm 1,3\%$), 5% DMF ($88,9 \pm 1,6\%$) e 8% MF ($83,0 \pm 1,6\%$), obtiveram taxas de fertilização maior ($P < 0,001$) que as encontradas com glicerol ($51,6 \pm 2,4\%$) e DMSO ($61,9 \pm 3,1\%$) e não diferiram entre si. As maiores taxas de eclosão ($P < 0,001$) ocorreram para 5% e 8% DMF e 8% MF ($79,1 \pm$

¹Corresponding author: Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Rio Grande, Campus Carreiros, 96201-900, Rio Grande, RS, Brasil. E-mail:

antoniovarela@furg.br

3,1; $87,6 \pm 1,5$ e $74,8 \pm 3,0\%$, respectivamente) e também não diferiram entre si ($P > 0,05$). Nesses tratamentos a taxa de fertilização e de eclosão foram semelhantes ($P > 0,05$) aos observados com sêmen fresco ($91,7 \pm 1,4$ e $87,4 \pm 1,4\%$, respectivamente). A motilidade espermática mais alta (pelo menos 55,7%) foi observada entre os diluentes com 5%, 8% e 11% DMF ($P < 0,001$). Os tratamentos citados, juntamente com 11% MF, promoveram o maior período de motilidade, ($P < 0,001$), sendo todos maior que um minuto. As maiores integridades espermáticas (mais de 54%) foram observadas em 5% e 11% de MF e com todas as concentrações de DMA e DMF ($P < 0,001$). As maiores viabilidades espermáticas (pelo menos 31%) foram em 5%, 8% e 11% DMA, 8% e 11% MF e todas as nas concentrações de DMF ($P < 0,001$). As maiores integridades de DNA espermático (maiores que 50%) ocorreram com 2%, 5% e 8% MF e para todas as concentrações DMA e DMF ($P < 0,001$), enquanto que em 2% DMA, 11% MF, 11% DMF, 5% e 8%, nas três amidas, produziram as mais altas funcionalidades mitocondriais ($P < 0,001$), sendo todas maior que 44%. Considerando os parâmetros avaliados *in vivo* e *in vitro*, os crioprotetores associados com melhor qualidade de sêmen de Tambaqui pós-descongelamento foram 8% MF, 5% e 8% de DMF.

Palavras chave: crioprotetores, congelamento, esperma, *Collossoma macropomum*.

1. INTRODUÇÃO

O tambaqui (*Collossoma macropomum*; Cuvier, 1818) é uma espécie migradora nativa da bacia amazônica, sendo considerado o segundo maior peixe de escamas [1]. O *C. macropomum* é a espécie nativa brasileira mais produzida comercialmente com mais de 30,6 mil t em 2008 [2], apresentando bons resultados em diferentes tipos de criação intensiva [3] sendo necessário o desenvolvimento de linhagens genéticas para aperfeiçoar a produção [4]. Dessa forma, a perpetuação da variabilidade genética de linhagens de *C. macropomum* são necessários para a aquicultura, na redução dos custos envolvidos com a manutenção de linhagens e na natureza onde as populações estão ameaçadas pela

construção de barragens [5]. A preservação de material genético de diferentes espécies de peixes pode ser otimizado por meio de criopreservação de sêmen [6].

Crioprotetores são incluídos em diluentes de congelamento seminal para prevenir a formação letal, para as células espermáticas, de cristais de gelo intracelular [7], reduzir o dano nas membranas e organelas celulares [8, 9] e preservar a integridade de DNA [10-13].

O glicerol é o composto largamente empregado para a crioproteção intracelular de gametas masculinos de diferentes classes e espécies animais [7, 8, 14], entretanto apresenta algumas desvantagens para a manutenção da integridade celular, devido ao alto peso molecular, alta viscosidade e pouca permeabilidade [8]. Além disso, o glicerol pode ter efeitos contraceptivos em aves [8], estando relacionado à apoptose [15]. Outros crioprotetores podem ser utilizados na criopreservação de sêmen de peixe, como etileno glicol, metanol, dimetilsulfoxido (DMSO) [16], sendo este o crioprotetor interno comumente utilizado no congelamento de sêmen de peixes de água doce nativos brasileiros [17]. Entretanto, no congelamento de sêmen de Tambaqui, o DMSO e glicerol não alcançaram resultados satisfatórios, além de não ter sido avaliada a ação destas substâncias sobre as estruturas das células espermáticas [18, 19]. Amidas, como a dimetilacetamida (DMA), dimetilformamida (DMF) e metilformamida (MF) têm sido utilizadas como crioprotetores penetrantes em diluentes para congelamento de ejaculados de garanhões [20, 21], suínos [22], cães [23], aves [24] e peixes [26]. O efeito crioprotetor das amidas é imputável ao seu baixo peso molecular e viscosidade, que lhes fornecem grande permeabilidade da membrana, reduzindo a ocorrência de dano celular causado por estresse osmótico [25], já que quando um crioprotetor penetrante atravessa as membranas celulares mais lentamente do que a água [27], faz com que o volume da célula seja diminuída ou expandida além de sua capacidade máxima, quando o crioprotetor é adicionado ou removido, respectivamente [28]. No entanto, até o momento as amidas não foram testadas como crioprotetor penetrante no congelamento seminal de *C. macropomum*.

Devido ao valor comercial do *C. macropomum* [2, 3], alguns estudos têm abordado a criopreservação de espermatozoides [18, 19], mas estes não avaliaram detalhadamente a qualidade do espermática pós-descongelamento e obtiveram resultados desanimadores com crioprotetores convencionais. Recentemente, Maria et al [29] avaliaram algumas

características seminais de *C. macropomum*, usando apenas o sêmen fresco. O objetivo do presente estudo foi testar a eficiência crioprotetora de DMA, DMF e MF, em concentrações distintas sobre a qualidade pós-descongelamento do espermatozoide de *C. macropomum*, avaliando a fertilização, eclosão, viabilidade, latência, motilidade, funcionalidade mitocondrial, integridade de membrana e de DNA.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta e avaliação espermática

Foi coletado o semen de quatorze machos de *C. macropomum* ($5,4 \pm 0,4$ kg) de uma fazenda comercial localizada em Pimenta Bueno RO Brasil ($11^\circ 41'46,95''$ S e $61^\circ 13'47,50''$ O), durante a sua época reprodutiva, a partir de dezembro de 2009 a fevereiro de 2010. Todos os peixes foram mantidos em viveiros, recebendo uma dieta comercial com proteína bruta de 40% e 2.900 kcal de energia metabolizável / kg, o que foi equivalente a 3% do peso vivo total de todos os peixes, três vezes por semana. Depois da despesca, foi administrado extrato pituitário de carpa na região dorsal de cada macho (1mg/kg) diluída em 0,5 mL de solução salina estéril (0,9% NaCl). Os machos foram mantidos em dois tanques com uma coluna de água de 0,7 m (quatro peixes por tanque). Após 6,5 horas, os machos foram retirados dos tanques e secos com uma toalha de pano, e em seguida a papila urogenital foi limpa e seca com uma toalha de papel. O sêmen foi coletado com um tubo cônico de 15 mL através de massagem abdominal evitando a extrusão simultânea de fezes e urina para não contaminar o semen e ativar os espermatozoides[30].

A motilidade espermática e período de motilidade foram avaliados antes do congelamento, colocando uma amostra de esperma 1 μ L e 100 μ L de água destilada a 25° C, em uma lâmina coberta por uma lamínula, utilizando um microscópio de contraste de fase (Olympus BX 41 ®, 400x) com ampliação de 200X. O período de motilidade espermática foi determinada como o tempo de ativação até o momento em que o espermatozoide parou de se mover. Todas as avaliações foram feitas pelo mesmo técnico treinado. Todas as amostras de sêmen que apresentaram pelo menos 80% motilidade

espermática, 10 s após a ativação. A concentração de espermatozóides foi determinado com uma câmara de Neubauer, sendo de $8,7 \times 10^9$ espermatozóides/ml.

2.2. Criopreservação espermática

O diluente básico foi o Beltsville Thawing Solution (BTS) [31], originalmente utilizado para o sêmen suíno, mas comumente usado em protocolos de congelamento de espermatozóides de peixes migratórios de espécies nativas brasileiras [16]. As amostras de sêmen foram diluídas individualmente 1/9 (v / v), homogeneizadas e divididas em 14 tratamentos, nos diferentes concentrações e crioprotetores: 5% de glicerol [17], 10% DMSO [29], e 2 %, 5%, 8% e 11% de DMA, MF e DMF. Para cada macho, 5 repetições por tratamento foram processados. Assim, o número total de amostras foi 980. Todos os produtos químicos utilizados no experimento foram obtidos da Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, EUA).

Amostras diluídas foram armazenados em palhetas de 250 μ L estabilizadas a temperatura ambiente por 2 min. Posteriormente, as palhetas foram expostas ao vapor de nitrogênio líquido em um botijão comercial de vapor de nitrogênio – “dry-shipper” (Taylor-Wharton ®, CP 300) [33]. As palhetas permaneceram no dry-shipper por 12 h, sendo posteriormente armazenadas em nitrogênio líquido por pelo menos 15 dias, até o descongelamento.

2.3. Avaliações do espermatozóide descongelado e fertilização

Foram utilizadas quatorze fêmeas de *C. macropomum* ($7,9 \pm 0,5$ kg) mantidas sob as mesmas condições descritas acima (uma para cada macho). As fêmeas foram induzidas a desova através da administração de 5 mg / kg extrato de hipófise de carpa diluído em 2 mL solução salina (0,9% NaCl), na região dorso lateral. Após 9 h, os ovos foram extrusados através de massagem abdominal e recolhidos em um becker de 1 litro, e dezesseis alíquotas de 2 g cada foram separadas para cada fêmea

Para cada macho, 14 palhetas (uma por tratamento) foram descongeladas em banho-maria a 45 ° C por 5 s [32]. Para cada alíquota, 150 µL de cada amostra de sêmen diluído (n = 14) foram usados. Ao mesmo tempo, duas outras alíquotas foram fertilizadas com o mesmo número de espermatozóides por ovo, com sêmen fresco previamente coletados de outros dois machos, para garantir a qualidade dos ovos (todas as repetições com fecundação inferior a 70% foram descartadas). Durante a fertilização, os óvulos e espermatozoides entraram em contato em um becker de 50 mL, que foi gentilmente homogeneizada por 5 s. O número média de espermatozóides por ovo foi de 7×10^4 . Os espermatozoides foram ativados através da adição de 2 mL de água destilada a 29 ° C. Em seguida, o conteúdo foi homogeneizado novamente por 5 s e deixada em repouso por 2 min. Depois disso, 20 mL de água destilada a 29 ° C foram adicionados em cada alíquota, para hidratação dos ovos fertilizados. Posteriormente, o conteúdo foi incubado sob um suave fluxo de água, ascendente e constante (150 mL / min) em incubadoras cônicas de 2 L. Os estágios de desenvolvimento foram monitorados com um estereomicroscópio (Olympus SZX 7). A taxa de fertilização foi avaliada após 8 h, como o número de ovos com a divisão celular em relação ao número total de ovos (n = 200). A taxa de eclosão foi calculada como o número de embriões eclodidos sobre todos os embriões avaliados.

Amostras de sêmen foram transportadas para o laboratório ReproPel para análises posteriores. Duas palhetas de cada tratamento foram descongeladas em banho-maria a 45 ° C por 5 s e re-suspensas em 400 µL BTS (1:3, v / v) a 22 ° C em um tubo de 1,5 mL cônica, para minimizar potenciais efeitos tóxicos do do crioprotetor.

Para as avaliações de viabilidade espermática, integridade do DNA e funcionalidade mitocondrial, foram avaliados 200 espermatozóides, com um microscópio de epifluorescência a 400 X ampliação (Olympus ® BX 51, América INC, São Paulo, Brasil).

Para a avaliação da viabilidade de espermatozóides, 10 µL da amostra de sêmen foi diluído em uma solução de trabalho de 40 µL de uma solução salina isotônica, incluindo: 1,7 mM-formaldeído; 20 mM diacetato carboxifluoresceína (CFDA) e 7,3 mM de iodeto de propídio (IP) . Espermatozóides com fluorescência verde foram consideradas viáveis, uma vez que sua atividade metabólica permitiu acumular CFDA no seu citoplasma, enquanto que os espermatozóides apresentando fluorescência vermelha ou vermelho e verde foram

classificados como não viável [34]. A porcentagem de viabilidade espermática foi determinada pela proporção de espermatozoides que emitem fluorescência verde em comparação com os espermatozoides total (verde, vermelho ou vermelho e verde fluorescente).

Integridade do DNA espermático foi avaliada após a colocação de 45 μ L da amostra de espermatozoides em 50 μ L TNE (0,01 M Tris-HCl; 0,15 M NaCl; 0,001 M EDTA, pH 7,2). Após 30 s, 200 μ L de solução Triton 1x foi adicionado e, 30 s depois, 50 μ L de laranja de acridina foi adicionado (2 mg / mL em H₂O deionizada). A avaliação foi feita após 5 min, sem ultrapassar 1 min de exposição das lâminas. Espermatozoides que apresentam fluorescência verde foram consideradas como tendo DNA inteiro, enquanto que aqueles que apresentam fluorescência vermelha ou laranja foram consideradas como tendo DNA desnaturado [35]. A taxa de integridade do DNA foi determinada pela proporção de espermatozoides que emitem fluorescência verde em comparação com o total de espermatozoides avaliados (verde, vermelho ou laranja fluorescente).

Funcionalidade mitocondrial foi avaliada após incubação de uma amostra de sêmen de 10 μ L com 40 μ L de solução de rodamina 123 (13 μ M), a 20 ° C por 10 min. Espermatozoides apresentando coloração rodamina positivo (fluorescência verde) foram considerados como tendo mitocôndrias funcionais. Por outro lado, mitocôndrias não funcional foram caracterizadas por coloração rodamina negativo (espermatozoides que não apresentam fluorescência) [36]. A taxa de funcionalidade mitocondrial determinada pela proporção de espermatozoides que emitem fluorescência verde em comparação com os espermatozoides total (verde ou ausência de fluorescência).

Integridade do espermatozoide foi avaliado pela adição de uma amostra de 1 μ L de sêmen em uma solução de coloração de 10 μ L, contendo 5 g eosina Y e 10 g nigrosin homogeneizadas em 100ml de BTS. Depois de 1 min, um esfregaço foi feito e deixado para secar. Após a contagem de 200 células de espermáticas utilizando um microscópio de campo claro com objetiva de imersão em óleo (100 X), o percentual de células espermáticas integras (sem ruptura de membranas) foi avaliado. Espermatozoides foram considerados integros quando não coraram, aqueles que apresentaram coloração rosa ou vermelho foram considerados rompidos [29].

2.4. *Análise estatística*

Todas as variáveis tiveram distribuição normal de acordo com o teste de Shapiro-Wilk. Os efeitos de combinações de crioprotetores e concentrações nas respostas foram testadas por análise de variância, com comparações de médias feitas pelo teste de Tukey. Associações entre as respostas foram determinadas por coeficientes de correlação de Pearson, independentemente dos tratamentos utilizados. As análises foram feitas com Statistix ® [37].

3. RESULTADOS

Quanto ao sêmen coletado, o volume foi de $4,5 \pm 0,3$ mL, concentração espermática de $8,7 \pm 0,2 \times 10^9$ /mL, motilidade espermática de $95,7 \pm 2,0\%$ e o período de motilidade foi $122,6 \pm 5,0$ seg.

A maior taxa de fertilização e eclosão ($P < 0,001$) ocorreram para amostras congeladas com amidas: 5%, 8% de DMF e 8% de MF (Tabela 1). Essas taxas não diferiram entre si e foram semelhantes aos observados com sêmen fresco ($P > 0,05$).

Como mostra a Tabela 2, as amostras congeladas com 5%, 8% e 11% de DMF proveram as mais altas taxas de motilidade espermática e tempo de latência ($P < 0,001$), sendo estas similares, na motilidade, à observada com 11% de MF ($P > 0,05$). As taxas de integridade espermática (a porcentagem de espermatozoides com membranas não rompidas) foram maiores ($P < 0,001$) nas amostras congeladas com 5% e 11% de MF e em todas as concentrações de DMA e DMF (Tabela 2).

As viabilidades dos espermatozoides ($P < 0,001$) observado foram menores nas amostras congeladas com glicerol, DMSO, 2% de DMA e MF e 5% MF (Tabela 3). Por outro lado, as maiores integridades do DNA foram observados para 2%, 5% e 8% de MF e em todas as concentrações testadas de DMA e DMF ($P < 0,001$). Os menores percentuais de funcionalidade mitocondrial ($P < 0,001$) foram encontrados em amostras congeladas com glicerol, DMSO, 8% MF, 11% DMA e 2% das três amidas testadas (Tabela 3).

Taxas de fertilização e de eclosão foram fortemente correlacionados ($P < 0,01$) entre si (Tabela 4). A forte correlação positiva também foi observada entre motilidade espermática e período de motilidade ($P < 0,01$). Motilidade espermática e período de motilidade foram moderadamente correlacionados com a integridade da membrana espermática e funcionalidade mitocondrial ($P < 0,01$).

4. DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo sobre o uso de amidas como crioprotetores para espermatozoides *C. macropomum*. Nós demonstramos que as amidas proporcionaram maior taxa de fertilização e de eclosão quando comparado ao glicerol e DMSO. As taxas de fertilização e eclosão com amidas foram semelhantes as com sêmen fresco, além de proporcionar altas taxas de viabilidade espermática, integridade do DNA e funcionalidade mitocondrial. Nossos melhores protocolos permitirão o congelamento espermático de *C. Macropomum*, facilitando o transporte do ambiente nativo da espécie, ou de instalações de aquicultura, podendo ser enviado para toda a América Latina ou mantidos indefinidamente para preservar sua variação genética [3].

O uso de amidas como crioprotetores tem sido relatado em outras espécies de peixes. A DMA foi mais eficiente que o glicerol, DMSO, propilenoglicol na preservação da viabilidade espermática e funcionalidade mitocondrial, após descongelamento do sêmen congelado de bagre Europeu (*Silurus glanis*), [25]. Para esperma de salmão do ártico (*Salvelinus alpinus*), a DMA obteve taxa de fertilização e de motilidade semelhante ao DMSO e estes foram maiores do que com glicerol [38]. Apesar do sêmen de bagre Africano (*Clarias gariepinus*) criopreservado com DMA apresentar maior motilidade quando comparado ao glicerol, o DMSO foi mais eficiente que o DMA na preservação da motilidade e apresentou taxa de eclosão similar [16]. Em salmão a motilidade e taxa de fertilização dos espermatozoides descongelados de *Oncorhynchus masou formosanus* não apresentaram diferenças com DMA ou DMSO, já para *Oncorhynchus masou ishikawae* o DMSO foi mais eficiente do que o DMA na preservação dos mesmos parâmetros de qualidade [39]. Assim, DMA é um crioprotetor eficaz para o congelamento de

espermatozoides de peixes, mas seu efeito varia entre as espécies e entre peixes do mesmo gênero. Entretanto, para os espermatozoides de Garoupa (*Epinephelus septemfasciatus*) [40], *Guppy* (*Poecilia reticulata*) e *Black molly* (*P. latipinna*) [41] a motilidade pós-descongelamento dos espermatozoides diluídos com DMF foi semelhante ao observado com DMSO ou glicerol. Até onde sabemos a MF ainda não foi testada como crioprotetor para o sêmen de outras espécies de peixes além do *C. macropomum*. No entanto, as três amidas testadas no presente estudo têm sido usadas como crioprotetores em diluentes de sêmen congelado de mamíferos. Benefícios para a manutenção da qualidade dos espermatozoides descongelados estão relacionados com a substituição do glicerol e DMSO por DMA sendo relatado para roedores: coelhos [42, 43]; cangurus [44] e coalas [45]. O uso da DMF e em alguns casos da DMA, como crioprotetores em substituição ao glicerol melhorou a qualidade dos espermatozoides descongelados em sêmen de suínos [22], galos [24, 46] e anfíbios [47]. Para espermatozoides de garanhão o DMF e MF obtiveram motilidade semelhante ao observado com glicerol [21]. Portanto, a resposta de espermatozoides para as diferentes amidas pode ser influenciada pela diferenças entre as espécies.

Apesar da DMA, na maioria dos estudos referidos acima, ser geralmente o amida tendo o efeito crioprotetor mais eficiente, no presente estudo, o uso de 8% DMF rendeu após o descongelamento motilidade espermática, viabilidade, integridade de membrana do DNA e funcionalidade mitocondrial que foram quase o dobro das observadas com glicerol, além de apresentar uma taxa de fertilização e eclosão semelhante ao do esperma fresco. No entanto, muitos estudos relatam danos em espermatozoides de peixes devido à criopreservação, afetando a motilidade, o metabolismo celular, estrutura da membrana plasmática, mitocôndrias, cauda e cromatina [9,10,13, 19, 25, 36, 39-41]. No presente estudo, a redução na viabilidade espermática e integridade foi observado, em algumas concentrações, para todos os crioprotetores testados, que pode influenciar negativamente a iniciação a motilidade dos espermatozoides, devido ao papel da membrana na sinalização do processo [48] ou pode levar a uma incapacidade no potencial de despolarização da membrana, devido perda de íons [49]. Podem ocorrer também efeitos negativos na manutenção da motilidade, devido a perdas de ATP intracelular [50], que só é produzido quando as

mitocôndrias são funcionais. Além disso, efeitos nocivos podem ser observados na fusão da membrana e na capacidade de fusão nuclear durante o processo de fertilização, dificultando a produção da primeira célula embrionária [51]. Pode ocorrer a redução da qualidade do espermatozóide após descongelamento devido à ampliação da produção de espécies reativas de oxigênio, com formação de peróxidos lipídicos e aldeídos citotóxicos [52], causando alterações na integridade e fluidez da membrana, comprometimento das interações lipídio-proteína e modificações do DNA e proteínas [53]. Além disso, o aumento da fragmentação do DNA do espermatozoide observada para alguns crioprotetores podem aumentar a probabilidade de fertilização por um espermatozóide com DNA danificado, que provavelmente teria impacto negativo sobre as taxas de fertilização e eclosão, devido ao comprometimento do desenvolvimento embrionário. No presente estudo, apesar das limitações potenciais mencionadas acima, algumas das concentrações das amidas testadas apresentam efeito crioprotetor eficiente.

O efeito crioprotetor destas amidas pode ser atribuído à sua atividade lipofílica e ao seu baixo peso molecular e viscosidade [26]. Tais características proporcionam as amidas testadas grande permeabilidade da membrana e eficiente ligação com as moléculas de água, o que pode reduzir o estresse osmótico e a formação de cristais de gelo intracelular, permitindo que estes compostos penetrem a membrana plasmática de espermatozoides mais facilmente, diminuindo assim sua toxicidade osmótica em comparação ao glicerol [21]. No entanto, como a integridade do DNA do esperma descongelado foi geralmente reduzida quando se utilizou a maior concentração (11%), estas concentrações não pode ser recomendadas, pois apesar de ter o DNA danificado a célula espermática pode fertilizar o oócito, prejudicando o desenvolvimento embrionário subsequente, reduzindo a taxa de eclosão, como relatado em sêmen de truta arco-íris [13].

As taxas de fertilização e eclosão foram altamente correlacionados, portanto para estimar a qualidade espermática *in vivo* de *C. macropomum* após o descongelamento é necessário apenas uma destas avaliações. Outra correlação forte foi observada entre motilidade espermática e período de motilidade. Apesar de apresentar significância estatística, oito correlações foram moderadas e dez foram fracamente relacionadas. A integridade espermática foi pouco correlacionada ou não correlacionada com outros

parâmetros de qualidade do sêmen, além de não ter diferido os distintos crioprotetores. Apesar da taxa de fertilização ser um importante indicador da qualidade do espermática, o uso de concentração espermática excessiva no teste pode mascarar estimativas da qualidade espermática, pois as amostras apresentando redução percentual de espermatozóides funcionais podem ser erroneamente considerados altamente férteis [54]. Devido a isto no presente estudo, o número médio de espermatozóides por ovo foi de 7×10^4 , o que é considerado baixo para a espécie, uma vez que tal concentração é comumente usado para sêmen fresco. No entanto, mais estudos são necessários para determinar o número mínimo de espermatozóides por óvulo de *C. macropomum* que não conduza a uma reduzida taxa de fertilização.

Em conclusão, o uso das amidas testadas para o congelamento de espermatozóides de *C. macropomum* são uma alternativa de crioprotetores quando comparado ao glicerol e DMSO. Entre as amidas, as concentrações que mantiveram a qualidade espermática após o descongelamento foram as de 5%, 8% de DMF e 8% de MF e as taxas de fertilização e eclosão não diferenciaram do obtido com sêmen fresco.

5. AGRADECIMENTOS

Este estudo foi patrocinado pela CAPES e CNPq. Os autores agradecem aos proprietários da Piscicultura Boa Esperança (Pimenta Bueno, RO, Brasil) por sua contribuição inestimável para o estudo.

6. REFERÊNCIAS

[1] Goulding MA, Carvalho ML. Life history and management of the Tambaqui (*Colossoma macropomum*, *characidae*): an important amazonian foodfish. Revista Brasileira de Zoologia 1982;1:107-138.

[2] FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Fishery and Aquaculture Statistics - Aquaculture production 2008; 220 p.

[3] Chellapa S, Chellapa NT, Barbosa WT, Huntigord FA, Beveridge MCM. Growth and production of the Amazonian Tambaqui in fixed cages under different feeding regimes. *Aquacult Int* 1995;3:11-21.

[4] Suquet M, Dreanno C, Fauvel C, Cosson J, Billard R. Cryopreservation of sperm in marine fish. *Aquacult Res* 2000;31:231-243.

[5] Lopes TS, Streit Jr. DP, Ribeiro RP, Povh JA, Lopera-Barrero NM, Vargas L, Pinto Filho C, Queiroz Jr. Genetic variability of Tambaqui (*Teleostei: Characidae*) from different regions of Brazil. *Braz J Vet Anim Sci* 2009;61:728-735.

[6] Martínez-Páramo S, Pérez-Cerezales S, Gómez-Romano F, Blanco G, Sánchez JA, Herráez MP. Cryobanking as tool for conservation of biodiversity: Effect of brown trout sperm cryopreservation on the male genetic potential. *Theriogenology* 2009;71:594–604.

[7] Holt WV. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci* 2000;62:3-22.

[8] Hammerstedt RH, Graham JK. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. *Cryobiology* 1992;29:26–38.

[9] Cabrita E, Anel I, Herraéz MP. Effect of different external cryoprotectants as membrane stabilizers on cryopreservation of rainbow trout sperm. *Theriogenology* 2001;56:623-635.

[10] Cabrita E, Robles V, Rebordinos L, Sarasquete C, Herraéz MP. Evaluation of DNA damage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cryopreserved sperm. *Cryobiology* 2005;50:144-153.

[11] Hu J, Li Q, Jiang Z, Li W. Effects of different extenders on DNA integrity of boar spermatozoa following freezing–thawing. *Cryobiology* 2008;57:257–262.

[12] Koderle M, Aurich C, Schafer-Somi S. The influence of cryopreservation and seminal plasma on the chromatin structure of dog spermatozoa. *Theriogenology* 2009;2:1215-1220.

[13] Pérez-Cerezales S, Martínez-Páramo S, Beirão J, Herráez M. Fertilization capacity with rainbow trout DNA-damaged sperm and embryo developmental success. *Reproduction* 2010;139:989-997.

[14] Watson, PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 2000;61: 481–492.

- [15] Wundrich K, Paasch U, Leicht M, Glander HJ. Activation of caspases in human spermatozoa during cryopreservation an immunoblot study. *Cell Tissue Bank* 2006;7:81–90.
- [16] Horvath A, Urbanyi B. The effect of cryoprotectants on the motility and fertilizing capacity of cryopreserved African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell 1822) sperm. *Aquacult Res* 2000;31:317-324.
- [17] Viveiros ATM, Godinho HP. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. *Fish Physiol Biochem* 2009;35:137–150.
- [18] Farias JO, Nunes JF. Avaliação *in vitro* e *in vivo* do sêmen de Tambaqui (*Colossoma macropomum*) conservado a temperatura ambiente e criopreservado em água de coco. *Revista Científica de Produção Animal* 1999;1:44-58.
- [19] Menezes JTB, Queiroz LJ, Doria CRC, Menezes Jr JB. Sperm evaluation of Tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), after thawing. *Acta Amazonica* 2008;38:366-368.
- [20] Medeiros ASL, Gomes GM, Carmo MT, Papa FO, Alvarenga MA. Cryopreservation of stallion sperm using different amides. *Theriogenology* 2002;58:273–6.
- [21] Squires EL, Keith SL, Graham JK. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology* 2004;62:1056–1065.
- [22] Bianchi I, Calderam K, Maschio EF, Madeira EM, Ulguim RR, Corcini CD, Bongalhardo DC, Corrêa EK, Lucia T Jr, Deschamps JC, Corrêa MN. Evaluation of amides and centrifugation temperature in boar semen cryopreservation. *Theriogenology* 2008;69:632–638.
- [23] Futino DO, Mendes MCB, Matos WNL, Mondadori RG, Lucci CM. Glycerol, methyl-formamide and dimethyl-formamide in canine semen cryopreservation. *Reprod Domestic Anim* 2008;45:214-220.
- [24] Tselutin K, Seigneurin F, Blesbois E. Comparison of cryoprotectants and methods of cryopreservation of fowl spermatozoa. *Poult Sci* 1999;78:586–590.
- [25] Ogier de Baulny B, Labbe C, Maise G. Membrane integrity, mitochondrial activity, ATP content and motility of European Catfish (*Silurus glanis*) testicular spermatozoa after freezing with different cryoprotectants. *Cryobiology* 1999;39:177–184.

- [26] Ball BA, Vo A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. *J Androl* 2001;22:1061-1069.
- [27] Gao DY, Liu J, Liu C, McGann LE, Watson PF, Kleinhans FW, Mazur P, Critser ES, Critser JK. Andrology: Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of Glycerol. *Hum Reprod* 1995; 10: 1022–1109.
- [28] Buranaamnuay K, Grossfelda R, Struckmanna C, Ratha D. Influence of cryoprotectants glycerol and amides, combined with antioxidants on quality of frozen-thawed boar sperm *Anim Reprod Sci* 2011;127:56-61.
- [29] Maria AN, Azevedo HC, Santos JP, Carneiro PCF. Hormonal induction and semen characteristics of Tambaqui *Colossoma macropomum*. *Zygote* 2010; doi:10.1017/S0967199410000559
- [30] Billard R, Cosson J, Crim LW. Broodstock management and seed quality-general considerations. In: Bromage, N, Roberts RJ, (Ed.). *Broodstock management and egg larval quality*, Oxford: Blackwell Science, 1995, 1-24.
- [31] Pursel VG, Johnson LA. Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *J Anim Sci* 1975;40:99-102.
- [32] Streit Jr. DP, Benites C, Moraes GV, Ribeiro RP, Sakaguti ES, Caldieri RF. Sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) criopreservado com diluentes utilizados para sêmen de suínos. *Ciência Animal Brasileira* 2006;7:289-297.
- [33] Taitson PF, Chami E, Godinho HP. Gene banking of the neotropical fish *Leporinus obtusidens* (Valenciennes, 1836): A protocol to freeze its sperm in the field. *Anim Reprod Sci* 2008;105:283–291.
- [34] Harrison RAP, Vickers SE. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J Reprod Fert* 1990;88:343-352.
- [35] Bencharif D, Amirat L, Pascal O, Anton M, Schmitt E, Desherces S, Delhomme G, Langlois ML, Barriere P, Larrat M, Tainturier D. The advantages of combining low-density lipoproteins with glutamine for cryopreservation of canine semen. *Reprod Domestic Anim* 2008;45:189-200.

- [36] He S, Woods LC. Effects of dimethylsulfoxide and glycine on cryopreservation induced damage of plasma membrane and mitochondria to striped bass (*Morone saxatilis*) sperm. *Cryobiology* 2004;48: 254–262.
- [37] Statistix[®]. Statistix[®] 9 for Windows. Tallahassee, FL, USA. 2008.
- [38] Richardson GF, Miller TI, McNiven MA. Cryopreservation of artic charr, *Salvelinus alpinus* (L.), semen in various extenders and in three sizes of straw. *Aquacult Res* 2000;31:307-315.
- [39] Gwo JC, Ohta H, Okuzawa K, Wu HC. Cryopreservation of sperm from the endangered Formosan landlocked salmon (*Oncorhynchus masou formosanus*). *Theriogenology* 1999;51:569-582.
- [40] Koh ICC, Yokoi K-I, Tsuji M, Tsuchihashi Y, Ohta H. Cryopreservation of sperm from seven-band grouper, *Epinephelus septemfasciatus*. *Cryobiology* 2010;61:263-267.
- [41] Huang C, Sun C, Su X, Zhao X, Miao M, Liu Y, Dong Q. Sperm cryopreservation in guppies and black mollies - a generalized freezing protocol for livebearers in *Poeciliidae*. *Cryobiology* 2009;59:351-356.
- [42] Hanada A, Nagase H. Cryoprotective effects of some amides on rabbit spermatozoa. *J Reprod Fert* 1980;60:247–52.
- [43] Okuda Y, Seita Y, Hisamatsu S, Sonoki S, Shino M, Masaoka T, Inomata T, Kamijo S-I, Kashiwazaki N. Fertility of spermatozoa cryopreserved with 2% acetamide or glycerol through artificial insemination in the Japanese White Rabbit. *Exp Anim* 2007;56:29-34.
- [44] McClean R, Zee YP, Holt WV, Johnston SD. Cryopreservation of kangaroo spermatozoa using alternative approaches that reduce cytotoxic exposure to glycerol. *Cryobiology* 2008;57:304-307.
- [45] Zee YP, Holt WV, Gosalvez J, Allen CD, Nicolson V, Pyne M, Burr ridge M, Carrick FN, Johnston SD. Dimethylacetamide can be used as an alternative to glycerol for the successful cryopreservation of koala (*Phascolarctos cinereus*) spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 2008;20:724-733.

[46] Chalah T, Seigneurin F, Blesbois E, Brillard JP. In vitro comparison of fowl sperm viability in ejaculates frozen by three different techniques and relationship with subsequent fertility in vivo. *Cryobiology* 1999;39:185–191.

[47] Shishova NR., Uteshev VK., Kaurova SA., Browne RK., Gakhova EN. Cryopreservation of hormonally induced sperm for the conservation of threatened amphibians with *Rana temporaria* as a model research species. *Theriogenology* 2011; 75:220-232.

[48] Boitano S, Omoto CK. Trout sperm swimming patterns and role of intracellular Ca. *Cell Motil Cytoskel* 1992; 21:74–82.

[49] Gatti JK, Billard R, Christen R. Ionic regulation of the plasma membrane potential of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) spermatozoa: Role in the initiation of sperm motility. *J Cell Physiol* 1990;143:546–554.

[50] Baulny BO, Levern Y, Kerboeuf D, Maise G. Flow cytometric evaluation of mitochondrial activity and membrane integrity in fresh and cryopreserved rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Cryobiology* 1997; 34:141–149.

[51] Labbe C, Martoriati A, Devaux A, Maise G. Effect of sperm cryopreservation on sperm DNA stability and progeny development in rainbow trout. *Mol Reprod Dev* 2001; 60:397–404.

[52] Aitken RJ. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reprod Fertil Dev* 1995;7:659–668.

[53] Halliwell B, Chiroco S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. *Am J Clin Nutr* 1993;57:715–725.

[54] Viveiros ATM, So N, Komen J. Sperm cryopreservation of African catfish (*Clarias gariepinus*): cryoprotectants, freezing rates and sperm:egg dilution ratio. *Theriogenology* 2000;54:1305–1308.

Tabela 1: Taxas de fertilização e eclosão para todos os crioprotetores e concentrações com semen fresco e congelado de *Collossoma macropomum*

Crioprotetor*	Concentração (%)	Fertilização (%)	Eclosão (%)
Sêmen fresco		91.7 ± 1.4 ^a	87.4 ± 1.4 ^a
Glicerol	5	51.6 ± 2.4 ^{de}	39.7 ± 3.8 ^{ef}
DMSO	10	61.9 ± 3.1 ^{bcd}	46.1 ± 3.2 ^{def}
	2	54.8 ± 3.1 ^{cd}	44.8 ± 4.3 ^{def}
DMA	5	69.3 ± 2.7 ^b	59.7 ± 3.7 ^{bcd}
	8	58.6 ± 2.6 ^{bcd}	49.5 ± 3.4 ^{cde}
	11	50.5 ± 2.8 ^{de}	38.6 ± 3.1 ^{ef}
	2	57.1 ± 3.0 ^{bcd}	43.6 ± 3.7 ^{ef}
DMF	5	88.9 ± 1.6 ^a	79.1 ± 3.1 ^a
	8	91.6 ± 1.3 ^a	87.6 ± 1.5 ^a
	11	68.0 ± 3.2 ^{bc}	62.4 ± 3.9 ^{bc}
	2	61.6 ± 3.5 ^{bcd}	45.9 ± 2.6 ^{def}
MF	5	65.4 ± 3.3 ^{bc}	52.6 ± 3.1 ^{cde}
	8	83.0 ± 1.6 ^a	74.8 ± 3.0 ^{ab}
	11	40.0 ± 4.1 ^e	30.7 ± 3.2 ^f

*DMSO: Dimetilsulfoxido; DMA: dimetilacetamida; DMF: dimetilformamida; MF: metilformamida.

^{a-g}Médias ± SEM com diferentes sobrescritos na coluna, diferem pelo menos P < 0.001

Tabela 2: Motilidade, integridade e latência de sêmen após o descongelamento de semen de *Colossoma macropomum*, para todos os crioprotetores e concentrações testadas

Crioprotetor*	Concentração (%)	Motilidade (%)	Latência (s)	Integridade (%)
Glicerol	5	8.9 ± 1.9 ^g	20.2 ± 3.7 ^f	47.3 ± 4.9 ^b
DMSO	10	21.8 ± 2.4 ^{dei}	29.1 ± 3.4 ^{ef}	46.4 ± 5.5 ^b
DMA	2	17.5 ± 2.8 ^{efg}	33.4 ± 4.1 ^{ef}	58.9 ± 3.0 ^{ab}
	5	27.5 ± 4.0 ^{de}	39.9 ± 4.9 ^{def}	58.0 ± 2.8 ^{ab}
	8	32.9 ± 2.9 ^{cd}	43.6 ± 3.8 ^{cde}	61.1 ± 1.8 ^{ab}
	11	21.8 ± 2.8 ^{defg}	34.1 ± 2.8 ^{ef}	60.4 ± 3.1 ^{ab}
DMF	2	24.6 ± 3.6 ^{dei}	41.1 ± 3.8 ^{de}	58.2 ± 4.3 ^{ab}
	5	55.7 ± 2.4 ^{ab}	62.1 ± 6.5 ^{ab}	55.1 ± 4.7 ^{ab}
	8	64.3 ± 3.0 ^a	77.1 ± 4.5 ^a	56.9 ± 5.0 ^{ab}
	11	62.5 ± 3.1 ^a	64.9 ± 2.4 ^{ab}	72.6 ± 2.9 ^a
MF	2	11.4 ± 2.2 ^{fg}	27.2 ± 5.3 ^{ef}	43.4 ± 2.9 ^b
	5	21.4 ± 3.1 ^{defg}	34.9 ± 4.3 ^{ef}	54.6 ± 2.4 ^{ab}
	8	44.6 ± 4.3 ^{bc}	56.4 ± 4.9 ^{bcd}	54.2 ± 4.2 ^b
	11	46.8 ± 3.6 ^b	58.7 ± 4.5 ^{abcd}	59.3 ± 3.9 ^{ab}

*DMSO: Dimetilsulfoxido; DMA: dimetilacetamida; DMF: dimetilformamida; MF: metilformamida.

^{a-g}Médias ± SEM com diferentes sobrescritos na coluna, diferem pelo menos P < 0.001

Tabela 3: Viabilidade espermática, integridade do DNA, e funcionalidade mitocondrial, após o descongelamento de sêmen de *Colossoma macropomum*, para todos os crioprotetores e concentrações testadas.

Crioprotetor*	Concentração (%)	Viabilidade (%)	Integridade de DNA (%)	Funcionalidade Mitocondrial (%)
Glicerol	5	15.6 ± 3.2 ^c	31.1 ± 4.1 ^c	37.3 ± 6.8 ^{cd}
DMSO	10	23.0 ± 5.2 ^{bc}	43.3 ± 3.0 ^{bc}	35.7 ± 3.7 ^{cd}
DMA	2	24.1 ± 4.2 ^{bc}	53.8 ± 6.6 ^{abc}	44.9 ± 4.4 ^{abcd}
	5	35.9 ± 5.9 ^{abc}	50.3 ± 5.1 ^{abc}	51.4 ± 3.2 ^{abc}
	8	34.5 ± 6.7 ^{abc}	59.5 ± 5.7 ^{ab}	55.7 ± 3.5 ^{abc}
	11	38.0 ± 5.8 ^{abc}	57.8 ± 5.1 ^{ab}	42.0 ± 5.2 ^{bcd}
DMF	2	31.1 ± 6.3 ^{abc}	62.4 ± 4.7 ^{ab}	46.3 ± 5.4 ^{abcd}
	5	32.5 ± 5.4 ^{abc}	64.6 ± 3.0 ^{ab}	62.4 ± 5.1 ^{ab}
	8	52.9 ± 5.4 ^a	73.1 ± 4.2 ^a	66.4 ± 3.0 ^a
	11	50.6 ± 6.6 ^a	53.8 ± 6.0 ^{abc}	63.4 ± 4.9 ^{ab}
MF	2	16.1 ± 4.2 ^c	54.4 ± 6.7 ^{abc}	27.3 ± 5.2 ^d
	5	21.7 ± 3.0 ^{bc}	57.6 ± 5.4 ^{ab}	54.9 ± 5.5 ^{abc}
	8	32.1 ± 4.9 ^{abc}	63.0 ± 5.0 ^{ab}	49.7 ± 4.6 ^{abcd}
	11	44.6 ± 5.4 ^{ab}	30.4 ± 5.9 ^c	62.2 ± 4.8 ^{ab}

*DMSO: Dimetilsulfoxido; DMA: dimetilacetamida; DMF: dimetilformamida; MF: metilformamida.

^{a-g}Médias ± SEM com diferentes sobrescritos na coluna, diferem pelo menos P < 0.001

Tabela 4: Correlação entre parâmetros de qualidade após o descongelamento de semen de *Colossoma macropomum*.

Parâmetros	Taxa de Fertilização	Taxa de eclosão	Motilidade de	Latência	Viabilidade de	Integridade e de DNA	Funcionalidade e Mitocondrial
Taxa de eclosão	0.87*						
Motilidade	0.42*	0.49*					
Latência	0.41*	0.47*	0.83*				
Viabilidade	0.09	0.19*	0.54*	0.51*			
Integridade de DNA	0.27*	0.22*	0.26*	0.29*	0.33*		
Funcionalidade Mitocondrial	0.26*	0.34*	0.52*	0.50*	0.38*	0.20*	
Integridade	0.09	0.07	0.26*	0.18*	0.11	0.02	0.20*

*Coeficientes de correlação de Pearson são estatisticamente significativos sendo pelo menos $P < 0.01$

CAPITULO III

**USO DE LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE E TREALOSE NO
CONGELAMENTO DE SÊMEN DE TAMBAQUI, *Colossoma macropomum*.**

ARTIGO NAS NORMAS DA REVISTA AQUACULTURE

USO DE LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE E TREALOSE NO CONGELAMENTO DE SÊMEN DE TAMBAQUI, *Colossoma macropomum*.

Antonio Sergio Varela Junior^{ab*}, Carine Dahl Corcini^c, Danilo Pedro Streit Jr.^d, Tainã Cardoso^c, Rodrigo Dessesards Jardim^a, Thomaz Lucia Jr.^d, Mario Roberto Chim Figueiredo^b

^aInstituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande, 96201-900, Rio Grande, RS, Brasil

^bPrograma de Pós Graduação em Aquicultura, Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande, 96201-900, Rio Grande, RS, Brasil

^cREPROPEL - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 96010-900, Pelotas, RS, Brasil.

^dAquam - Departamento de Zootecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 91540-000 Porto Alegre, RS, Brasil

*Endereço de contato: Setor de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Prédio 6, Campus Carreiros, Av. Itália km 8, Bairro Carreiros, 96201-900, Rio Grande, RS, Brasil. Telefone: 55 53 32935186, e-mail: antoniovarela@furg.br

Palavras chave: tambaqui, espermatozóide, crioprotetor, mitocôndria, DNA, membrana e viabilidade

RESUMO

Neste trabalho foram testadas, como crioprotetores externos, a lipoproteína de baixa densidade purificada da gema do ovo (LDL) e a trealose, no congelamento de sêmen de Tambaqui, *Colossoma macropomum*. O sêmen foi diluído 1/9 (v/v) em Beltsville Thawing Solution (BTS) acrescido de 4, 8, 12 e 16% de LDL no experimento I (Exp. I) e 50, 100, 150 e 200 mM de trealose, no experimento II (Exp.II), sendo o controle BTS com 10 % de DMSO. Após dois minutos foi congelado em botijão *dry shipper* (12 horas), sendo armazenado em botijão de nitrogênio líquido. Após um período mínimo de 15 dias as

amostras foram avaliadas quanto ao tempo de latência do espermatozóide e às taxas de fertilização, eclosão, motilidade espermática, funcionalidade mitocondrial, viabilidade celular, integridade da membrana e do DNA. No Exp. I, A LDL acrescentada ao diluente permitiu uma melhor ($P < 0.05$) manutenção da integridade de membrana, da funcionalidade mitocondrial e da viabilidade celular. Por outro lado, nas concentrações mais elevadas de LDL não houve preservação das taxas de fertilização e de eclosão, da motilidade espermática e do tempo de latência. No Exp. II observou-se o efeito da trealose, nas concentrações utilizadas, em todas as avaliações *in vivo* ($P < 0.05$) e *in vitro* ($P < 0.05$). As taxas de fertilização e de eclosão não diferiram entre o DMSO e os tratamentos que utilizaram trealose. Também não houve diferença na taxa de fertilização do tratamento com 150 mM de trealose comparado com as amostras com sêmen fresco ($P > 0.05$). Houve uma alta correlação ($r = 0,95$, $P < 0.001$) entre as avaliações de fertilização e de eclosão. Considerando os parâmetros avaliados *in vivo* e *in vitro*, o crioprotetor externo trealose (150mM) foi associado à melhoria da qualidade de sêmen de Tambaqui pós-descongelamento, já a inclusão de LDL diminuiu a funcionalidade espermática.

1. INTRODUÇÃO

O *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) é a espécie nativa brasileira mais produzida comercialmente, apresentando bons resultados em diferentes tipos de criação intensiva (Chellapa et al., 1995; Valenti et al., 2000). É um animal de fácil manuseio e rápido crescimento (Maria et al., 2010), sendo a espécie escolhida como base para o programa de melhoramento de espécies nativas de água doce do Brasil.

A criopreservação seminal é uma ótima ferramenta para a difusão de material genético, otimizando o desenvolvimento de programas de melhoramento animal (Suquet et al., 2000). Para o sucesso desta biotécnica é necessário que os diluentes utilizados na preservação seminal tenham pH e osmolalidade adequada, boa capacidade de tamponamento e redução da lesão criogênica (Salamon & Maxwell, 2000). Geralmente os diluentes incluem crioprotetores externos, internos, um tampão, um ou mais açúcares, sais e antibióticos (Evans e Maxwell, 1987).

Os crioprotetores externos podem minimizar as perdas da qualidade espermática, agindo diretamente sobre as organelas espermáticas (Holt, 2000). Um bom exemplo é a lipoproteína de baixa densidade da gema do ovo (LDL) que se incorpora à membrana celular (Bergeron et al. 2004; Graham & Foote, 1987; Watson, 1981), ou forma uma película protetora entre a água e os ácidos graxos do espermatozóide (Anton et al., 2003). Este mecanismo produzido pela LDL atua de forma efetiva na proteção do espermatozóide, mantendo a motilidade e integridade da membrana (Hu et al., 2008; Varela Junior et al., 2009).

Outra possibilidade são os açúcares, substâncias presentes na maioria dos diluentes, os quais, dependendo do seu peso molecular, podem atuar como substratos de energia, componentes osmóticos e/ou agentes crioprotetores (Holt, 2000). Reduzir as injúrias causadas pela cristalização da água (gelo) pode ser conseguido utilizando dissacarídeos que aumentam a pressão osmótica (desidratação celular) (Bakás & Disalvo, 1991) e reduzem o volume de água passível de ser congelada no interior da célula (Aisen et al., 2002). A trealose, por exemplo, auxilia na desidratação celular, reduzindo a formação de cristais de gelo, acarretando na diminuição das crioinjúrias das organelas celulares (Aisen et al., 2005).

Outra função dos dissacarídeos, como sacarose (glicose + frutose) e trealose (glicose + glicose), reside na sua função de estabilizar a bicamada lipídica da membrana espermática (De Leeuw et al., 1993), promovendo interações específicas com os fosfolipídios (Bakás & Disalvo, 1991). Neste sentido, a trealose interage com os grupos polares do fosfolipídio, impedindo o espaçamento lateral entre os fosfolipídios, prevenindo a fusão, justaposição e rompimento das membranas (Anchordoguy et al., 1987; Crowe et al., 1984). Esta característica, confere maior flexibilidade à membrana espermática, tornando-a mais resistente aos danos causados pelo choque térmico (Aisen et al., 2005), além de proteger a membrana contra o ataque de radicais livres (reações oxigênio-espécie específicas) (Bucak et al., 2007).

Os relatos, nas diferentes espécies animais, utilizando a trealose como crioprotetor externo de sêmen são conflitantes. Este açúcar não foi útil na preservação de espermatozoides de bovinos (Chen et al., 1993; Foote et al., 1992; Tuncer et al., 2011),

gazela (Garde et al., 2002), equinos (Squires et al., 2004), veados (Fernandez-Santos et al., 2007), elefante asiático (Saragusty et al., 2010) e garoupa (Koh et al., 2010), pois a qualidade dos espermatozóides congelados com tratamentos com trealose não foi superior aos demais tratamentos. Em contraste, quando comparado ao tratamento controle, a trealose demonstrou manter ou melhorar a qualidade espermática em coelhos (Dalimata & Graham, 1997), em duas raças de cães (Yamashiro et al., 2007; Yildiz et al., 2000), camundongos (Sztejn et al., 2001), caprinos (Aboagla & Terada, 2004), ovinos (Aisen et al., 2005; Bucak et al., 2007; Tonieto et al., 2010), ostra (Acosta-Salmón et al., 2007), suínos (Gutiérrez-Pérez et al., 2009; Malo et al., 2010) e aves (Blanco et al., 2011). Contudo, é desconhecido, até o momento, o efeito destes crioprotetores sobre espermatozóides de peixes de água doce.

O presente estudo tem como objetivo avaliar o efeito da LDL e da trealose sobre as estruturas (mitocôndrias, membranas celulares e DNA) e sobre a funcionalidade (motilidade, tempo de latência, taxas de fertilização e de eclosão) de células espermáticas criopreservadas de *C. macropomum*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no período de novembro de 2009 a fevereiro de 2010, na Piscicultura Boa Esperança em Pimenta Bueno, Rondônia; no Laboratório de Biotecnologia em Reprodução Animal da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) e no Laboratório de Histologia da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil. Todas as substâncias químicas utilizadas nos experimentos foram de procedência da Sigma Chemical Company (St. Louis, MO – USA).

2.1. Peixes

Dois experimentos foram conduzidos no período reprodutiva espécie, de novembro a fevereiro, na Piscicultura Boa Esperança, em Pimenta Bueno, Rondônia. Primeiramente avaliou-se o efeito do LDL na criopreservação seminal sendo posteriormente avaliada a

ação da trealose sobre as células espermáticas de *C. macropomum*. Foram utilizados 10 machos e 10 fêmeas em idade reprodutiva em cada um dos experimentos. Ao longo do ano, os animais foram mantidos em viveiros, sob condições ambientais, sendo alimentados com ração comercial com 40% de proteína bruta e 2900 kcal energia metabolizável/kg de ração, com uma taxa de arraçoamento de 3% do peso vivo/dia, com frequência alimentar de três vezes na semana.

2.2. Coleta e avaliação seminal

Os machos foram despescados dos viveiros, sendo imediatamente induzidos na região dorso lateral, com 1 mg de extrato de hipófise de carpa/kg de animal vivo, diluído em 0,5 mL de soro fisiológico estéril (0,9% de NaCl). Após, os peixes foram mantidos em dois tanques de manipulação (no máximo quatro animais em cada) com coluna d'água de 70 centímetros, fluxo constante, à temperatura de 28° C. Após 6 h e 25 min foi realizada coleta do sêmen através de massagem abdominal, com um tubo cônico de 15 mL (um para cada animal), registrando-se o volume coletado. Foi evitada a extrusão simultânea de fezes e/ou urina, a fim de não ativar os espermatozóides nem contaminar as amostras (Billard et al., 1995).

Após constatar que não ocorreu ativação dos espermatozóides, a motilidade (percentual de células móveis) foi avaliada colocando-se 1 µL de sêmen e 100 µL de água destilada em lâmina sob lamínula e levando-se ao microscópio óptico de contraste de fases (Maria et al., 2010). O mesmo técnico treinado avaliou cada amostra seminal quanto à motilidade e tempo de latência. Foram utilizadas para criopreservação, somente amostras que apresentaram motilidade acima de 80%, 10 s após a ativação com água destilada. Para avaliar o tempo de latência, foi mensurado o tempo desde a ativação até a parada total da movimentação espermática (segundos). A concentração espermática foi determinada através de câmara de Neubauer, em microscópio óptico (Maria et al., 2010).

2.3. Criopreservação Seminal

A solução base dos diluentes de ambos os experimentos foi o Beltsville Thawing Solution (BTS) constituído de 37 g de glicose; 6 g de citrato de sódio di-hidratado; 1,25 g de bicarbonato de sódio; 1,25 g de etilenodiamino tetracetato e 0,9 g de cloreto de potássio diluídos em 1 L de água destilada (Pursel & Johnson, 1975).

O sêmen foi diluído 1/9 (v/v), sendo que no experimento I (exp. I) foi utilizado o tratamento de BTS somente com o crioprotetor interno 10% de DMSO (Streit Jr. et al., 2006) e BTS com 10% de DMSO adicionado de diferentes concentrações do crioprotetor externo (4, 8, 12 ou 16%) LDL. Já no experimento II, o sêmen foi diluído em BTS+10% de DMSO, e os demais tratamentos substituiu-se o DMSO pela Trealose (50, 100, 150 ou 200 mM).

A LDL utilizada nos tratamentos do exp. I foi purificada a partir de gemas de ovos de galinha. As gemas foram separadas das claras e colocadas sobre filtro de papel para facilitar a remoção manual dos traços de clara da membrana vitelina. Após, com o auxílio de uma seringa de 40 mL, o conteúdo da gema foi aspirado, separando a gema de suas membranas, colocando-se o conteúdo em becker resfriado em gelo ($\cong 0^\circ \text{C}$) (McBee & Cotterill, 1979). A gema foi diluída duas vezes em solução salina isotônica (0,17 M) de cloreto de sódio, sendo agitada por uma hora. Posteriormente, a gema foi centrifugada (10.000 x g) por 45 min a 4°C e, em seguida, o sobrenadante foi centrifugado novamente para remoção completa dos grânulos, sendo o plasma resultante misturado com 40% de sulfato de amônia por uma hora, mantendo-se o pH em 8,7 e a temperatura em 4°C . O plasma da gema foi centrifugado (10.000 x g) por 45 min, a 4°C . O sobrenadante foi coletado e dialisado durante 12 h em água destilada, para eliminar o sulfato de amônia. Após a diálise, o LDL foi centrifugado (10.000 x g) por 45 min (Moussa et al., 2002).

Para cada repetição de cada tratamento nos experimentos I e II, foram envasadas 5 palhetas de 250 μL , identificadas, colocadas em tubos plásticos e fixadas nas *racks* permanecendo por cinco minutos a 24°C . Após, foram alocadas no canister de um botijão com vapor de nitrogênio do tipo *dry shipper*, previamente preparado de acordo com as recomendações de Taitson et al. (2008). As palhetas permaneceram por 12 horas no *dry*

shipper, sendo finalmente transferidas para o botijão de nitrogênio líquido (MVE, modelo CP-34) onde ficaram estocadas por, no mínimo, 15 dias a -196°C .

2.4. Descongelamento seminal e avaliações da taxa de fertilização e eclosão

Para avaliar a taxa de fertilização, em cada um dos experimentos, foram utilizadas 10 fêmeas, uma para cada macho. As fêmeas foram induzidas à desova com extrato de hipófise de carpa 5 mg/kg de peso corpóreo diluída em 2 mL de soro fisiológico estéril (0,9% de NaCl), sendo aplicado com seringa de 2 ml (2/0,01 mL) na região dorso lateral. Nos dois experimentos os oócitos foram extrusados por massagem abdominal sendo coletadas em Becker de 1000 mL e posteriormente reservadas em sete alíquotas de 2 g (cada experimento). Para a obtenção da taxa de fertilização nos diferentes tratamentos, as amostras de sêmen de um mesmo macho foram descongeladas em banho-maria a 45°C por 5 s (Streit Jr. et al., 2006). As amostras descongeladas de sêmen (150 μL) fertilizaram sete alíquotas de óvulos, sendo cinco para os tratamentos de cada experimento, e duas alíquotas fertilizadas com 15 μL sêmen fresco, coletado de dois machos no momento da execução do teste (controle com sêmen fresco). Essas alíquotas foram utilizadas para fertilizar a primeira e a última alíquota de oócitos extrusados. As alíquotas de sêmen fresco serviram de controle para assegurar a qualidade dos oócitos. Assim, fêmeas com repetições com taxa de fertilização inferior a 70% foram descartadas, sendo substituídas por outras fêmeas.

Para cada combinação de óvulos com sêmen congelado e fresco foram testadas 10 repetições em cada um dos experimentos, todas em beckers de 50 mL. A ativação do sêmen foi realizada adicionando-se 2 mL de água destilada, homogeneizando-se suavemente por 5 s e, em seguida, permanecendo em descanso por 2 minutos. Ao final deste período, foram adicionados 20 mL de água destilada em cada um das alíquotas, visando hidratar os óvulos fertilizados. Após, os ovos foram incubados sob fluxo de água delicado e constante de 150 mL/min, em incubadoras experimentais de 2 L.

O acompanhamento dos estágios de desenvolvimento embrionário foi realizado através de estereomicroscópio. A taxa de fertilização foi avaliada após 8 horas, sendo considerado

número de embriões viáveis sobre o total de ovos avaliados, expresso em percentual. Já a taxa de eclosão foi avaliada considerando-se o total de embriões eclodidos, sobre o total de ovos fertilizados, expresso em percentual.

2.5. Funcionalidade mitocondrial, viabilidade, integridade de membrana e DNA

As amostras, em ambos os experimentos (I e II), foram descongeladas a 45° C durante 5 s (Streit Jr. et al., 2006), sendo ressuspensas em 400 µL de BTS (1:3, v/v), temperatura de 22° C, em tubo cônico de 1,5 mL, analisando-se, em seguida, a motilidade espermática, o tempo de latência, a funcionalidade mitocondrial, a viabilidade celular, a integridade de membrana e do DNA.

A funcionalidade mitocondrial foi obtida colocando-se 10 µL de sêmen descongelado em 40 µL de solução de trabalho de rodamina 123 (13µM), incubando-se a 20°C/10 min (He & Woods, 2004).

Para a obtenção da integridade de membrana dos espermatozoides utilizaram-se sondas fluorescentes de diacetato de carboxifluoresceína - CFDA e iodeto de propídio - PI; colocando-se 10 µL de sêmen descongelado e 40 µL de solução de trabalho sendo incubado a 20°C, por 10 min (Harrison & Vickers, 1990).

A integridade do DNA foi avaliada coletando-se 45 µL de sêmen descongelado em 50 µL TNE (0,01 M Tris-HCl; 0,15 M NaCl; 0,001 M EDTA; pH 7,2). Após 30 s adicionou-se 200 µL de *Triton solution* 1x. Passados 30 s adicionou-se 50 µL de *Acridine Orange* (2 mg por mL em H₂O deionizada) e, após 5 min, avaliou-se a integridade do DNA, não ultrapassando 1 minuto de exposição da lâmina montada (Bencharif et al., 2010b).

As avaliações de funcionalidade da mitocôndria, integridade da membrana e do DNA foram realizadas em microscópio de epifluorescência (Olympus® BX 51, América INC, São Paulo - Brasil), realizadas com 1 µL de solução com espermatozoides em lâmina sob lamínula (18 x 18 mm), avaliando-se 200 células espermáticas por amostra. As taxas foram expressas através do percentual entre células espermáticas íntegras/funcionais sobre o total de células espermáticas avaliadas.

A avaliação da viabilidade celular foi realizada com os corantes histoquímicos eosina e nigrosina, adicionando-se 1 μL de sêmen diluído em 10 μL de solução de coloração realizando-se, após um minuto, o esfregaço. Após a secagem das lâminas os espermatozoides foram observados em campo claro (BX51 Olympus®) com objetiva de imersão em óleo (Maria et al., 2010).

2.6. Análise Estatística

Em ambos os experimentos foi realizada a análise de normalidade para todas as variáveis dependentes, pelo teste de Shapiro-Wilk e em seguida, análise de variância para medidas não paramétricas de Kruskal-Walis. Os diferentes crioprotetores foram considerados variáveis independentes, e as variáveis motilidade espermática, tempo de latência, taxa de fertilização e de eclosão, funcionalidade da mitocôndria, viabilidade celular, integridade da membrana e do DNA foram consideradas variáveis dependentes. Adicionalmente foi avaliada a correlação de Spearman entre as variáveis dependentes de cada experimento. Todos os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média (S.E.M) e as análises realizadas no software Statistix 9.0 (2008).

3. RESULTADOS

Os machos utilizados no experimento obtiveram média de $4,7 \pm 0,2$ e $6,0 \pm 0,6$ mL de volume de sêmen fresco coletado ($n = 10$), com concentração de $8,6 \pm 0,2 \times 10^9$ e $8,2 \pm 0,5 \times 10^9$, motilidade de $96,0 \pm 2,2\%$ e $98,0 \pm 1,3\%$ e o tempo de latência de $98,0 \pm 6,0$ s e $96,2 \pm 6,8$ s, respectivamente para o experimento I e II.

Os resultados obtidos com LDL acrescentado ao diluente evidenciam uma melhor ($P < 0,05$) manutenção da integridade da membrana, da funcionalidade mitocondrial e da viabilidade celular (Tabela 1). Por outro lado, nas concentrações mais elevadas de LDL, não houve preservação das taxas de fertilização e de eclosão (Tabela 2), da motilidade espermática e do tempo de latência (Tabela 3).

As taxas de fertilização e de eclosão das amostras criopreservadas com 10% de DMSO não diferiram dos tratamentos que utilizaram trealose (Tabela 4). Porém, a média das amostras com sêmen fresco foi superior à maioria dos tratamentos, não diferindo, contudo, da taxa de fertilização com 150 mM de trealose ($P > 0.05$). Houve uma alta correlação ($r = 0,95$; $P < 0.001$) entre as avaliações da taxa de fertilização e de eclosão.

Nas avaliações, *in vitro*, do sêmen criopreservado (Tabelas 5 e 6), a utilização da trealose nas concentrações de 100 e 150 mM foi mais eficiente, produzindo maiores ($P < 0.05$) tempo de latência, integridade da membrana e do DNA, funcionalidade da mitocôndria e viabilidade celular, não diferindo entre si ($P > 0,05$). Os tratamentos com 10% de DMSO, 50 e 200 mM de trealose também não diferiram entre si ($P > 0,05$) nas avaliações de motilidade, tempo de latência, integridade da membrana, da mitocôndria e viabilidade celular. Entretanto, na integridade de DNA as quatro concentrações diferentes de trealose não diferiram entre si ($P > 0,05$) mas foram superiores ($P < 0,05$) ao tratamento com 10% de DMSO

4. DISCUSSÃO

Em várias espécies de mamíferos (cães: Bencharif et al., 2010a e Varela et al., 2009; suínos: Hu et al., 2008; bovinos: Hu et al., 2011 e Vera-Munoz et al., 2009; ovinos: Tonieto et al., 2010), a LDL foi eficiente na proteção aos espermatozoides congelados. No presente estudo foram encontrados resultados similares, especialmente quanto à viabilidade celular, à integridade da membrana e à funcionalidade da mitocôndria, com a adição de LDL. O efeito deste crioprotetor está associado à sua capacidade de estabilização da membrana espermática, pois previne o efluxo de fosfolípido (Thérien et al., 1999) e de colesterol (Bergeron et al., 2004), além de formar uma barreira física que protege a membrana do choque térmico (Manjunath and Thérien, 2002). Quanto à integridade de DNA do espermatozoide criopreservado de *C. macropomum*, a LDL não foi capaz de promover um incremento de qualidade reprodutiva quando comparado ao tratamento controle. Todavia, em suínos, Hu et al. (2008) relatou a manutenção da qualidade do material genético devido à adição da LDL. De todo modo cabe ressaltar que espermatozoides de peixes e suínos

apresentam grandes diferenças, como, por exemplo, a presença de acrossoma no mamífero e ausência em peixes da espécie estudada.

Os resultados verificados neste estudo com altas concentrações de LDL, são bastante curiosos, pois, ao mesmo tempo em que a funcionalidade mitocondrial e a integridade da membrana foram melhor preservadas nas altas concentrações, os resultados de taxa de fertilização e de eclosão, que determinam a eficiência da solução crioprotetora, foram pífios. Apesar da LDL ser dotada de interessantes propriedades crioprotetoras, as taxas de fertilização, eclosão, motilidade espermática e tempo de latência foram prejudicados com o aumento de sua concentração. Isto pode estar relacionado à crescente aglutinação celular, ocorrida após a adição da água destilada necessária para a ativação espermática. Provavelmente este fenômeno é decorrente da instabilidade da gema de ovo, possivelmente da LDL, quando utilizada com diluente base BTS (Maria et al. 2006), o que pode ser contornado com a retirada da LDL antes da ativação espermática. Entretanto, a metodologia (centrifugações sequenciais) para a retirada da LDL inviabilizaria sua utilização em pisciculturas comerciais, o que tornou necessário avaliar outros crioprotetores.

A ação da trealose ocorre no meio extracelular da célula espermática criopreservada, diretamente sobre a pressão osmótica. Todavia, esta ação pode ser positiva ou negativa, dependendo necessariamente da concentração utilizada. Isto foi possível observar no presente estudo, em que a ação positiva da trealose nas concentrações de 100 e 150 mM manteve com maior eficiência a integridade do DNA, tempo de latência e viabilidade celular das células espermáticas descongeladas de *C. macropomum*, quando comparadas ao tratamento controle (somente com 10% de DMSO). Por outro lado, o efeito nocivo da trealose ficou evidente na concentração mais elevada (200 mM), que reduziu a motilidade espermática, tempo de latência, integridade da membrana, viabilidade celular e funcionalidade mitocondrial. Estes efeitos nocivos também foram relatados, em espermatozoides criopreservados de suínos (Hu et al., 2009) e de ovinos (Naing et al., 2010), nos tratamentos com a maior concentração de trealose testada, 200 mM e 264,32mM, respectivamente.

A concentração com 150 mM de trealose, realmente parece ser a mais apropriada para o congelamento do sêmen do *C. macropomum*. Pois muito embora não tenha ocorrido diferença na taxa de fertilização e de eclosão entre os diferentes tratamentos, o sêmen congelado com 150 mM de trealose não foi diferente no percentual de ovos fertilizados comparando-se ao sêmen fresco. Este fato pode ser considerado como incremento promovido por este dissacarídeo e corrobora com a eficiência da trealose observada no sêmen de diferentes espécies (Aboagla & Terada 2004; Acosta-Salmón et al., 2007; Aisen et al., 2005; Blanco et al., 2011; Bucak et al 2007; Dalimata & Graham, 1997; Gutiérrez-Pérez et al., 2009; Malo et al., 2010; Sztejn et al., 2001; Tonieto et al., 2010; Yamashiro et al., 2007; Yildiz et al., 2000).

A observação de Aisen et al. (2005) ressalta qualidades de açúcares de alto peso molecular, como a redução da peroxidação lipídica e o consumo de glutatión, resultando em uma melhor proteção da membrana plasmática do espermatozóide. Este fato pode ser observado nos espermatozóides congelados de *C. macropomum* com trealose, em especial na concentração de 150 mM. De todo modo, a trealose confirma a observação clássica de Nagase (1964), que relaciona o aumento da pressão osmótica dos açúcares de alto peso molecular, que promovem desidratação celular, causando uma menor incidência de formação de gelo intracelular e aumentando a viabilidade da célula criopreservada. Diferente do que ocorre com os açúcares de baixo peso molecular, como a glucose presente no BTS, que podem passar pela membrana plasmática da célula espermática, fornecendo energia para o metabolismo normal e para sua funcionalidade.

5. CONCLUSÕES

O aumento da concentração de LDL no diluente seminal promoveu o aumento da manutenção das estruturas dos espermatozóides criopreservados de *C. macropomum*, entretanto, reduziu sua funcionalidade. A adição de 150 mM de trealose no diluente de congelamento manteve com maior eficiência as características *in vivo* e *in vitro* do espermatozóide da espécie.

6. AGRADECIMENTOS

Este estudo foi patrocinado pela CAPES, FAPERGS e CNPq. Os autores agradecem à equipe da Piscicultura Boa Esperança (Pimenta Bueno, RO, Brasil) por sua contribuição inestimável para o estudo.

7. REFERÊNCIAS

- Aboagla, E.M., Terada, T., 2004. Effects of the supplementation of trehalose extender containing egg yolk with sodium dodecyl sulfate on the freezability of goat spermatozoa. *Theriogenology*. 62, 809–818.
- Acosta-Salmón, H., Jerry, D.R, Southgate, P.C., 2007. Effects of cryoprotectant agents and freezing protocol on motility of black-lip pearl oyster (*Pinctada margaritifera L.*) spermatozoa. *Cryobiology*. 54, 13-18.
- Aisen, E.G., Medina, V.H., Venturino, A., 2002. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology*. 57, 1801-1808.
- Aisen, E., Quintana, M., Medina, V., Morello, H., Venturino, A., 2005. Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders. *Cryobiology*. 50, 239-249.
- Anchordoguy, T.J., Rudolph, A.S., Carpenter, J.F., Crowe, J.H. 1987. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. *Cryobiology*. 24, 324–331.
- Anton, M., Martinet, V., Dalgalarondo, M., Beaumal, V., David-Briand, E., Rabesona, H., 2003. Chemical and structural characterization of low-density lipoproteins purified from hen egg yolk. *Food Chemistry*, 83, 175-183.
- Bakás, L.S., Disalvo, E.A., 1991. Effect of Ca²⁺ on the cryoprotective action of trehalose. *Cryobiology*. 28, 347-353.

- Bergeron, A., Crête, M.H., Brindle, Y., Manjunath, P., 2004. Low-density lipoprotein fraction from hen`s egg yolk decreases the binding of the major protein of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. *Biol. Reprod.* 70, 708-717.
- Bencharif, D., Amirat-Briand, L., Garand, A., Anton, M., Schmitt, E., Desherces, S., Delhomme, G., Langlois, M.L., Barrière, P., Destrumelle, S., Vera-Munoz, O., Tainturier, D., 2010a. Freezing canine sperm: Comparison of semen extenders containing Equex® and LDL (Low Density Lipoproteins). *Anim. Reprod. Sci.* 119, 305-313.
- Bencharif, D., Amirat, L., Pascal, O., Anton, M., Schmitt, E., Desherces, S., Delhomme, G., Langlois, M-L., Barrière, P., Larrat, M., Tainturier, D., 2010b. The Advantages of Combining Low-Density Lipoproteins with Glutamine for Cryopreservation of Canine Semen. *Reprod. Dom. Anim.* 45, 189-200.
- Billard, R., Cosson J., Crim, L.W., 1995. Broodstock management and seed quality- General considerations. In: BROMAGE, N & RJ ROBERTS, (Eds.). *Broodstock management and egg larval quality*, Oxford: Blackwell Science, 1-24.
- Blanco, J.M., Long, J.A., Gee, G., Wildt, D.E., Donoghue, A.M., 2011. Comparative cryopreservation of avian spermatozoa: Benefits of non-permeating osmoprotectants and ATP on turkey and crane sperm cryosurvival. *Anim. Reprod. Sci.* 123, 242-248.
- Bucak, M.N., Atessahin, A., Varisli, O., Yuce, A., Tekin, N., Akcay, A., 2007. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen. Microscopic and oxidative stress parameters after freeze–thawing process. *Theriogenology.* 67, 1060–1067.
- Chellapa, S., Chellapa, N.T., Barbosa, W.T., Huntigord, F.A., Beveridge, M.C.M., 1995. Growth and production of the Amazonian Tambaqui in fixed cages under different feeding regimes. *Aquacult. Intern.* 3, 11-21.
- Chen, Y., Foote, R.H., Brockett, C.C., 1993. Effect of sucrose, trehalose, hypotaurine, taurine, and blood serum on survival of frozen bull sperm. *Cryobiology.* 30, 423–431.

- Crowe, L.M., Mouradian, R., Crowe, J.H., Jackson, S.A., Womersley, C., 1984. Effects of carbohydrates on membrane stability at low water activities. *Biochimica et Biophysica Acta*. 779, 141–150.
- Dalimata, A.M., Graham, J.K., 1997. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methyl cellulose. *Cryobiology*. 48, 831–841.
- De Leeuw, F.E., De Leeuw, A.M., Den Daas, J.H.G., Colenbrander, B., Verkleij, A.J., 1993. Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compound on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology*. 30, 32-44.
- Evans, G., Maxwell, W., 1987. Salamon's artificial insemination of sheep and goats. Butterworth, Sydney.
- Fernández-Santos, M.R., Martínez-Pastor, F., Garcia-Macia, V., Estes, M.C., Soler, A.J., Paz, P., Anel, L., Garde, J.J., 2007. Extender osmolality and sugar supplementation exert a complex effect on the cryopreservation of Iberian reed deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa. *Theriogenology*. 67, 738–753.
- Foote, R.H., Chen, C., Brockett, C., Kaproth, M.T., 1992. Fertility of bull frozen in whole milk extender with trehalose, taurine or blood serum. *J. Dairy Sci.* 76, 1908–1913.
- Garde, J.J., Soler, A.J., Cassienello, J., Crespo, C., Malo, A.F., Espeso, G., Gomendio, M., Roldan, E.R.S., 2002. Sperm cryopreservation in three species of endangered gazelles (*Gazella cuvieri*, *G. dama mhorh*, and *G. dorcas neglecta*). *Biol. Reprod.* 69, 602–611.
- Gutiérrez-Pérez, O., Juárez-Mosqueda M.L., Carvajal, S.U., Ortega, M.E.T., 2009. Boar spermatozoa cryopreservation in low glycerol/trehalose enriched freezing media improves cellular integrity. *Cryobiology*. 58, 287- 292.
- Graham, J.K., Foote, R.H., 1987. Effect of several lipids fatty acyl chain length and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. *Cryobiology*. 24, 42-52.
- Harrison, R.A.P., Vickers, S.E., 1990. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 88, 343-352.

- He, S., Woods, L.C., 2004. Effects of dimethyl sulfoxide and glycine on cryopreservation induced damage of plasma membrane and mitochondria to striped bass (*Morone saxatilis*) sperm. *Cryobiology*. 48, 254–262.
- Holt, W.V., 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62, 3-22.
- Hu, J., LI, Q., Jiang, Z., Li, W., 2008. Effects of different extenders on DNA integrity of boar spermatozoa following freezing–thawing. *Cryobiology*. 57, 257–262.
- Hu, J., Li, Q., Jiang, Z., Yang, H., Zhang, S., Zhao, H., 2009. The cryoprotective effect of trehalose supplementation on boar spermatozoa quality. *Reprod. Dom. Anim.* 44, 571–575.
- Hu, J., Jiang, Z., Lv, R., Li, K., Zhang, S., Zan, L., Li, Y., Li, X., 2011. The advantages of low-density lipoproteins in the cryopreservation of bull semen. *Cryobiology*. 62, 83-87.
- Koh, I.C.C., Yokoi, K., Tsuji, M., Tsuchihashi, Y., Ohta, H., 2010. Cryopreservation of sperm from seven-band grouper, *Epinephelus septemfasciatus*. *Cryobiology*. 61, 263-267.
- Lopes, T.S., Streit Junior, D.P., Ribeiro, R.P., Povh, J.A., Lopera-Barrero, N.M., Vargas, L., Pinto Filho, C., Queiroz, J.R., 2009. Diversidade genética de estoques de reprodutores de *Colossoma macropomum*. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.* 61, 728-735.
- Malo, C., Gil, L., Gonzalez, N., Cano, R., Blas, I., Espinosa, E., 2010. Comparing sugar type supplementation for cryopreservation of boar semen in egg yolk based extender. *Cryobiology*. 61, 17-21.
- Manjunath, P., Thérien, I., 2002. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *J. Reprod. Immunol.* 53, 109-119.
- Maria, A.N., Viveiros, A.T.M, Freitas, R.T.F., Oliveira A.V., 2006. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. *Aquaculture*. 260, 298-306.
- Maria, A.N., Azevedo, H.C., Santos, J.P., Carneiro, P.C.F., 2010. Hormonal induction and semen characteristics of tambaqui *Colossoma macropomum*. *Zigote*.
Doi:10.1017/S0967199410000559

- McBee, L., Cotterill, O., 1979. Ion exchange chromatography and electrophoresis of egg yolk. *J. Food Sci.* 44, 656–660.
- Moussa, M., Marinet, V., Trimeche, A., Tainturier, D., Anton, M., 2002. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*. 57, 1695-1706.
- Nagase, H., Niwa, T., Yamashita, S., Irie, S., 1964. Deep freezing of bull semen in concentrated pellet form. II. Protective action of sugars. In: *Proceedings of the 5 th International Congress of Animal Reproduction A. I., Trento*, 489–502.
- Naing, S.W., Wahid, H., Mohd Azam, K., Rosnina, Y., Zuki, A.B., Kazhal, S., Bukar, M.M., Thein, M., Kyaw, T., San, M.M., 2010. Effect of sugars on characteristics of boer goat semen after cryopreservation. *Anim. Reprod. Sci.* 122, 23-28.
- Pursel, V.G., Johnson L.A., 1975. Freezing of boar spermatozoa: Fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *J. Anim. Sci.* 40, 99-102.
- Salamon, S., Maxwell, W.M., 2000. Storage of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62, 77–111.
- Saragusty, J., Hildebrandt, T.B., Behr, B., Knieriem, A., Kruse, J., Hermes, R., 2009. Successful cryopreservation of Asian elephant (*Elephas maximus*) spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 115, 255-266.
- Squires, E.L., Keith, S.L., Graham, J.K., 2004. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology* 62, 1056–1065.
- Statistix®9.0, 2008. Statistix for Windows User’s manual. Tallahas-see: Analytical software.
- Streit Junior, D.P., Benites, C., Moraes, G.V., Ribeiro, R.P., Sakaguti, E.S., Caldieri, R.F., 2006. Sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) criopreservado com diluentes utilizados para sêmen de suínos. *Ciênc. Anim. Bras.* 7, 289-297.
- Suquet, M., Dreanno, C., Fauvel, C., Cosson, J., Billard, R., 2000. Cryopreservation of sperm in marine fish. *Aquacult. Res.* 31, 231-243.
- Sztein, J.M., Noble, K., Farley, J.S., Mobraaten, L.E., 2001. Comparison of permeating and nonpermeating cryoprotectans for mouse sperm cryopreservation, *Cryobiology* 41, 28–39.

- Taitson P.F., Chami E., Godinho H.P., 2008. Gene banking of the neotropical fish *Leporinus obtusidens* (Valenciennes, 1836): A protocol to freeze its sperm in the field. *Anim Reprod. Sci.* 105, 283–291
- Thérien, I., Moreau, R., Manjunath, P., 1999. Bovine seminal plasma phospholipid-binding proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm. *Biol. Reprod.* 61, 590–598.
- Tonieto, R.A., Goularte, K.L., Gastal, G.D.A., Schiavon, R.S., Deschamps, J.C., Lucia Jr., T., 2010. Cryoprotectant effect of trehalose and low-density lipoprotein in extenders for frozen ram semen. *Small Rum. Res.* 93, 206-209.
- Tuncer, P.B., Sariözkan, S., Bucak, M.N., Ulutas, P.A., Akalın, P.P., Büyükleblebici, S., Canturk, F., 2011. Effect of glutamine and sugars after bull spermatozoa cryopreservation. *Theriogenology.* 75, 1459-1465.
- Valenti, W.C., Poli, C.R., Pereira J.A., Borghetti, J.R., 2000. *Aqüicultura no Brasil. Brasília.*
- Varela Junior, A.S., Corcini, C.D., Ulguim, R.R., Alvarenga, M.V.F., Bianchi, I., Corrêa, M.N., Lucia Jr., T., Deschamps, J.C., 2009. Effect of low density lipoprotein on the quality of cryopreserved dog semen *Anim. Reprod. Sci.* 115, 323-327.
- Vera-Munoz, O., Amirat-Briand, L., Diaz, T., Vásquez, L., Schmidt, E., Desherces, S., Anton, M., Bencharif, D., Tainturier, D., 2009. Effect of semen dilution to low-sperm number per dose on motility and functionality of cryopreserved bovine spermatozoa using low-density lipoproteins (LDL) extender: Comparison to Triladyl and Bioxcell. *Theriogenology.* 71, 895-900.
- Watson, P.F., 1981. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 degrees C by egg-yolk lipoprotein. *J. Reprod. Fert.* 62, 483-92.
- Yamashiro, H., Narita, K., Sugimura, S., Han, Y.J., Sugarawa, A., Mohoraku, K., Nakazato, F., Cono, T., Yoshida, M., Sato, E., 2007. Trehalose enhanced the freezability of poodle dog sperm collected by artificial vagina (AV). *Anim. Reprod. Sci.* 102, 165–171.

Yildiz, C., Kaya, A., Aksoy, M., Tekeli, T., 2000. Influence of sugar supplement action of the extender on motility viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology*. 54, 579–785.

Tabela 1. Taxas de integridade da membrana e do DNA e funcionalidade da mitocôndria (média \pm erro padrão da média) do sêmen de tabaqui *C. macropomum* descongelado, após congelamento com diferentes concentrações de lipoproteína de baixa densidade (LDL)

Diluentes	Integridade		Funcionalidade da Mitocôndria (%)
	Membrana (%)	DNA (%)	
10% DMSO	33,2 \pm 1,7 ^c	39,5 \pm 7,2 ^a	53,3 \pm 2,6 ^c
10% DMSO + 4% LDL	56,7 \pm 5,6 ^{bc}	46,7 \pm 8,7 ^a	50,9 \pm 3,7 ^c
10% DMSO + 8% LDL	64,5 \pm 5,5 ^{ab}	50,6 \pm 8,0 ^a	62,4 \pm 5,3 ^{bc}
10% DMSO + 12% LDL	78,5 \pm 4,3 ^{ab}	48,4 \pm 8,2 ^a	83,0 \pm 3,0 ^{ab}
10% DMSO + 16% LDL	84,5 \pm 3,4 ^a	46,9 \pm 8,9 ^a	88,4 \pm 2,8 ^a

DMSO: Dimetil sulfoxido; ^{a-c} Médias com letras sobrescritas diferentes, na mesma coluna, diferem significativamente ($P < 0,05$).

Tabela 2. Taxas de fertilização e de eclosão (média \pm erro padrão da média) do sêmen de tabaqui *C. macropomum* fresco e descongelado, após congelamento com diferentes concentrações de lipoproteína de baixa densidade (LDL)

Diluentes	Taxa	
	Fertilização (%)	Eclosão (%)
Sêmen fresco	92,8 \pm 1,4 ^a	90,6 \pm 2,0 ^a
10% DMSO	58,5 \pm 4,8 ^{ab}	52,7 \pm 5,4 ^{ab}
10% DMSO + 4% LDL	56,1 \pm 2,8 ^{abc}	44,5 \pm 4,0 ^{abc}
10% DMSO + 8% LDL	42,9 \pm 5,1 ^{bcd}	36,2 \pm 4,6 ^{bcd}
10% DMSO + 12%LDL	19,9 \pm 5,1 ^{cd}	15,3 \pm 2,7 ^{cd}
10% DMSO + 16%LDL	10,3 \pm 4,5 ^d	8,7 \pm 3,7 ^d

DMSO: Dimetil sulfóxido; ^{a-d} Médias com letras sobrescritas diferentes, na mesma coluna, diferem significativamente (P < 0,05).

Tabela 3. Taxas de motilidade, viabilidade espermática e tempo de latência (média ± erro padrão da média) do sêmen de tambaqui *C. macropomum* descongelado, após congelamento com diferentes concentrações de lipoproteína de baixa densidade (LDL)

Diluentes	Taxa de Motilidade (%)	Tempo de Latência (s)	Viabilidade Celular (%)
10% DMSO	35,0 ± 2,2 ^a	19,6 ± 1,7 ^a	47,2 ± 4,3 ^b
10% DMSO + 4% LDL	11,0 ± 2,8 ^{ab}	12,1 ± 2,7 ^{ab}	65,0 ± 4,1 ^{ab}
10% DMSO + 8% LDL	8,0 ± 2,2 ^b	11,4 ± 2,8 ^{ab}	66,7 ± 4,3 ^{ab}
10% DMSO + 12% LDL	5,0 ± 2,0 ^b	6,8 ± 2,0 ^b	79,3 ± 2,7 ^a
10% DMSO + 16% LDL	3,0 ± 1,1 ^b	4,8 ± 1,7 ^b	79,3 ± 3,3 ^a

DMSO: Dimetil sulfoxido; ^{a-b} Médias com letras sobrescritas diferentes, na mesma coluna, diferem significativamente (P < 0,05).

Tabela 4. Taxas de fertilização e de eclosão (média \pm erro padrão da média) do sêmen de tabaqui *C. macropomum* fresco e descongelado, após congelamento com diferentes molaridade de trealose

Diluentes	Taxa	
	Fertilização (%)	Eclosão (%)
Sêmen fresco	92,8 \pm 1,4 ^a	84,6 \pm 2,2 ^a
10% DMSO	57,8 \pm 3,7 ^b	49,9 \pm 3,9 ^b
50 mM Trealose	42,2 \pm 8,8 ^b	37,4 \pm 7,8 ^b
100 mM Trealose	61,3 \pm 6,3 ^b	52,4 \pm 4,4 ^b
150 mM Trealose	63,2 \pm 6,7 ^{ab}	54,4 \pm 6,3 ^b
200 mM Trealose	60,4 \pm 6,1 ^b	53,4 \pm 5,4 ^b

DMSO: Dimetil sulfóxido; ^{a-b} Médias com letras sobrescritas diferentes, na mesma coluna, diferem significativamente ($P < 0,05$).

Tabela 5. Taxas de motilidade, tempo de latência e viabilidade espermática (média \pm erro padrão da média) do sêmen de tambaqui *C. macropomum* fresco e descongelado, após congelamento com diferentes molaridades de trealose

Diluentes	Taxa de Motilidade (%)	Tempo de Latência (s)	Viabilidade celular (%)
10% DMSO	14,0 \pm 2,4 ^{ab}	17,3 \pm 2,4 ^b	42,5 \pm 2,8 ^b
50 mM Trealose	9,0 \pm 2,6 ^b	15,7 \pm 3,6 ^b	50,0 \pm 5,1 ^{ab}
100 mM Trealose	26,5 \pm 3,2 ^a	38,4 \pm 2,6 ^a	62,7 \pm 3,8 ^a
150 mM Trealose	20,5 \pm 1,7 ^a	35,5 \pm 2,1 ^a	66,4 \pm 2,9 ^a
200 mM Trealose	8,5 \pm 1,7 ^b	12,6 \pm 2,7 ^b	59,8 \pm 3,6 ^{ab}

DMSO: Dimetil sulfoxido; ^{a-b} Médias com letras sobrescritas diferentes, na mesma coluna, diferem significativamente ($P < 0,05$).

Tabela 6. Taxas de integridade da membrana e do DNA e funcionalidade mitocondrial (média \pm erro padrão da média) do sêmen de tabaqui *C. macropomum* fresco e descongelado, após congelamento com diferentes molaridades de trealose

Diluentes	Integridade		Funcionalidade
	Membrana (%)	DNA (%)	Mitocondrial
10% DMSO	24,2 \pm 3,3 ^{ab}	29,1 \pm 4,3 ^b	38,4 \pm 1,6 ^{ab}
50 mM Trealose	24,4 \pm 4,6 ^{ab}	53,4 \pm 5,3 ^a	33,9 \pm 4,6 ^{ab}
100 mM Trealose	37,3 \pm 6,6 ^a	57,9 \pm 5,1 ^a	54,6 \pm 5,7 ^a
150 mM Trealose	31,5 \pm 2,7 ^a	51,9 \pm 4,4 ^a	44,0 \pm 3,4 ^a
200 mM Trealose	13,2 \pm 2,9 ^b	55,0 \pm 7,0 ^a	23,6 \pm 3,8 ^b

DMSO: Dimetil sulfóxido; ^{a-b} Médias com letras sobrescritas diferentes, na mesma coluna, diferem significativamente ($P < 0,05$).

DISCUSSÃO GERAL

Esta tese é o primeiro estudo sobre o efeito da utilização de dimetilsulfoxido (DMSO), amidas, Lipoproteína de baixa densidade da gema do ovo (LDL) e trealose como crioprotetores para espermatozoides de tambaqui, *Colossoma macropomum*. Nestes trabalhos ficou evidente que alguns crioprotetores proporcionaram ação efetiva na proteção dos gametas masculinos, durante o processo de congelamento e descongelamento. A trealose, dimetilacetamida, dimetilformamida e metilformamida proporcionaram boa preservação da membrana, mitocôndria e DNA espermático, mantendo assim sua motilidade e latência, taxas de fertilização e/ou eclosão. Os melhores crioprotetores permitirão o congelamento espermático de *C. macropomum* para facilitar o transporte do ambiente nativo da espécie ou de viveiros de aquicultura, podendo o sêmen ser enviado para toda a América Latina ou mantidos indefinidamente para preservar sua variabilidade genética, sem que ocorra prejuízo na funcionalidade espermática. Isto se confirma pelo fato de que alguns crioprotetores obtiveram taxas de fertilização e de eclosão semelhantes às observadas com sêmen fresco.

Inicialmente foi determinada a concentração ideal do crioprotetor (DMSO) mais utilizado para o congelamento de sêmen de peixes de água doce nativos brasileiros pertencentes aos Characidae, tais como: *Salminus brasiliensis* (Coser et al. 1984, Carolsfeld et al. 2003); *Prochilodus lineatus* (Carolsfeld et al. 2003, Felizardo et al. 2010); *B. orbignyanus*, *L. elongatu* e *Piaractus mesopotamicus* (Carolsfeld et al. 2003); *Brycon amazonicus* (Cruz-Casallas et al. 2004, Velasco-Santamaria et al. 2006); *B. orthotaenia* (Melo & Godinho 2006); e *Leporinus obtusidens* (Taitson et al. 2008). Observou-se que o DMSO, na concentração de 10%, foi o que melhor preservou a motilidade e o tempo de latência dos espermatozoides, a integridade do DNA e as taxas de fertilização e de eclosão. Entretanto, os espermatozoides criopreservados com 10% de DMSO foram sensivelmente prejudicados quanto a qualidade quando comparados ao sêmen fresco. Isto pode ser decorrente da toxidez da solução crioprotetora, pois a integridade de DNA apresentou correlação negativa ($r = -0,83$) e significativa ($P < 0,05$) com as concentrações desse crioprotetor, demonstrando sua toxidez em relação ao material genético do espermatozoide.

Com estes resultados tornou-se necessário avaliar o efeito da adição de LDL ou da substituição do DMSO por amidas ou trealose durante o congelamento espermático de tambaqui *C. macropomum*.

A adição da LDL foi eficaz na proteção aos espermatozóides congelados/descongelados em várias espécies de mamíferos (suínos: Hu et al. 2008; cães: Varela et al. 2009 e Bencharif et al. 2010; bovinos: Vera-Munoz et al. 2009 e Hu et al. 2011; ovinos: Tonieto et al. 2010), ocorrendo resultados similares com o sêmen de Tambaqui, especialmente quanto à viabilidade celular, à integridade da membrana e à funcionalidade da mitocôndria com a adição de LDL. O efeito deste crioprotetor está associado a sua capacidade de estabilização da membrana espermática, prevenindo o efluxo de fosfolípido (Thérien et al. 1999) e colesterol (Bergeron et al. 2004), além de formar uma barreira física que protege a membrana do choque térmico (Manjunath & Thérien 2002).

Em suínos, Hu et al. (2008) relataram a manutenção da qualidade do material genético devido à adição da LDL, entretanto em espermatozóides criopreservados de tambaqui, *C. macropomum* o LDL não promoveu a manutenção da qualidade do DNA. Além disto, as taxas de fertilização e de eclosão, a motilidade espermática e o tempo de latência foram prejudicados com o aumento da concentração de LDL. Isto pode ser devido à crescente aglutinação celular, ocorrida após a adição da água destilada necessária na ativação espermática. Provavelmente este fenômeno é decorrente da instabilidade da gema de ovo, possivelmente da LDL, quando utilizada com diluente base BTS (Maria et al. 2006), o que pode ser contornado com a retirada da LDL antes da ativação espermática. Entretanto, a metodologia (centrifugações sequenciais) para a retirada da LDL inviabilizaria sua utilização em pisciculturas comerciais, o que tornou necessário avaliar outros crioprotetores.

Uma alternativa é a trealose, que age no meio extracelular da célula espermática aumentando a pressão osmótica, desidratando a célula, diminuindo assim a incidência de formação de gelo intracelular, aumentando a viabilidade da célula criopreservada (Nagase 1964). Dependendo da concentração de trealose utilizada, esta ação pode ser benéfica ou produzir danos durante a criopreservação. No presente estudo esta ação positiva da trealose nas concentrações de 100 e 150 mM foi evidente, pois manteve com maior eficiência a

integridade do DNA, o tempo de latência e a viabilidade celular das células espermáticas de tambaqui, *C. macropomum* descongeladas, quando comparado ao tratamento controle (10% de DMSO). Por outro lado, o efeito nocivo da trealose também ocorreu na concentração mais elevada (200 mM), onde diminuiu a motilidade espermática, o tempo de latência, a integridade da membrana, a viabilidade celular e a funcionalidade mitocondrial. Estes efeitos nocivos também foram relatados em espermatozóides criopreservados de suínos (Hu et al. 2009) e de ovinos (Naing et al. 2010), nos tratamentos com a maior concentração de trealose testada, 200 mM e 264,32 mM, respectivamente.

Dentre as diferentes concentrações de trealose, 150 mM é a mais apropriada para o congelamento do sêmen do Tambaqui, *C. macropomum*, pois, muito embora não tenha ocorrido diferença nas taxas de fertilização e de eclosão entre os diferentes tratamentos com trealose, o sêmen congelado com 150 mM de trealose não apresentou diferença no percentual de ovos fertilizados comparando-se ao sêmen fresco. Este fato pode ser considerado como incremento promovido por este dissacarídeo e corrobora com a eficiência da trealose observada no sêmen de diferentes espécies (Dalimata & Graham 1997, Yildiz et al. 2000, Sztejn et al. 2001, Aboagla & Terada 2004, Aisen et al. 2005, Acosta-Salmón et al. 2007, Bucak et al. 2007, Yamashiro et al. 2007, Gutiérrez-Pérez et al. 2009, Malo et al. 2010, Toniato et al. 2010, Blanco et al. 2011).

Outra alternativa para a criopreservação de sêmen de tambaqui comprovada nesta tese foram as amidas. O uso de 8% DMF rendeu, após o descongelamento, motilidade espermática, viabilidade, funcionalidade mitocondrial, integridade da membrana e do DNA que foram aproximadamente o dobro das observadas com glicerol e resultando em taxas de fertilização e de eclosão semelhantes às obtidas com sêmen fresco.

Estes resultados encontrados corroboram com os relatados de outras espécies de peixes. Na preservação seminal de bagre Europeu, *Silurus glanis*, o DMA foi mais eficiente que o glicerol, o DMSO e o propilenoglicol, na viabilidade espermática e funcionalidade mitocondrial (Ogier de Baulny et al. 1999). Para sêmen de salmão do ártico, *Salvelinus alpinus*, o DMA também rendeu taxa de fertilização e motilidade semelhantes ao DMSO e maior do que com glicerol (Richardson et al. 1999). Apesar do sêmen de bagre Africano, *Clarias gariepinus* congelado com DMA apresentar maior motilidade quando comparado

ao glicerol, o DMSO foi mais eficiente que a DMA na preservação da motilidade e não diferenciou na taxa de eclosão (Horvath & Urbanyi 2000). Em salmão, a motilidade e a taxa de fertilização dos espermatozoides descongelados de *Oncorhynchus masou formosanus* não apresentou diferença com DMA ou DMSO, já para *Oncorhynchus masou ishikawae* o DMSO foi mais eficiente do que o DMA na preservação dos mesmos parâmetros de qualidade (Gwo et al. 1999). Assim, DMA é um crioprotetor eficaz para o congelamento de espermatozoides de peixes, mas seu efeito varia entre as espécies e também entre os peixes do mesmo gênero. Em sêmen de garoupa, *Epinephelus septemfasciatus* (Koh et al. 2010), guppy, *Poecilia reticulata* e black molly, *P. latipinna* (Huang et al. 2009) a motilidade pós-descongelamento, quando diluídos com DMF foi semelhante ao observado com DMSO ou glicerol. Até onde se sabe, a MF ainda não foi testada como crioprotetor para o sêmen de outras espécies de peixes além do tambaqui, *C. macropomum*. No entanto, as três amidas testadas no presente estudo vem sendo utilizadas como crioprotetores em diluente seminal de congelamento de diferentes mamíferos. Os benefícios na manutenção da qualidade dos espermatozoides descongelados estão relacionados com a substituição do glicerol e DMSO por DMA em roedores: coelhos (Hamada et al. 1980, Okuda et al. 2007); cangurus (McClellan et al. 2008) e coalas (Zee et al. 2008). O uso de DMF e, em alguns casos, de DMA em substituição ao glicerol melhorou a qualidade dos espermatozoides descongelados em sêmen de galos (Tselutin et al. 1999), Chalah et al. 1999), suínos (Bianchi et al. 2008), e anfíbios (Shishova et al. 2011). Para espermatozoides de garanhão o DMF e MF proporcionaram motilidade semelhante ao observado com glicerol (Squires et al. 2004). Portanto, a resposta de espermatozoides para as diferentes amidas pode ser influenciada pelas diferenças entre as espécies.

O efeito crioprotetor destas amidas pode ser atribuído à sua atividade lipofílica e ao seu baixo peso molecular e viscosidade (Ball & Vo 2001). Tais características proporcionam às amidas testadas grande permeabilidade da membrana e eficiente ligação com as moléculas de água, o que pode reduzir o estresse osmótico e a formação de cristais de gelo intracelular, permitindo que estes compostos penetrem a membrana plasmática dos espermatozoides mais facilmente, diminuindo assim sua toxicidade osmótica em

comparação ao glicerol (Squires et al. 2004). No entanto, como a integridade do DNA do esperma descongelado foi geralmente reduzida quando se utilizou a maior concentração (11%), esta não pode ser recomendada, pois mesmo tendo o DNA danificado a célula espermática pode fertilizar o oócito, prejudicando o desenvolvimento embrionário subsequente e reduzindo a taxa de eclosão, como relatado em sêmen de truta arco-íris (Pérez-Cerezales et al. 2010).

Portanto, o conhecimento adquirido durante este estudo demonstra que a trealose (150 mM) e as amidas testadas (5% e 8% DMF e 8% MF) para o congelamento de espermatozoides de tabaqui, *C. macropomum* são ótimas alternativas de crioprotetores, pois mantiveram a qualidade espermática após o descongelamento e obtiveram taxas de fertilização e de eclosão semelhantes às obtidas com sêmen fresco.

REFERÊNCIAS

- ABOAGLA, EM & T TERADA. 2004. Effects of the supplementation of trehalose extender containing egg yolk with sodium dodecyl sulfate on the freezability of goat spermatozoa. *Theriogenology*, 62: 809–818.
- ACOSTA-SALMÓN, H, DR JERRY & PC SOUTHGATE. 2007. Effects of cryoprotectant agents and freezing protocol on motility of black-lip pearl oyster (*Pinctada margaritifera* L.) spermatozoa. *Cryobiology*, 54: 13-18.
- AISEN, E, M QUINTANA, V MEDINA, H MORELLO & A VENTURINO. 2005. Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders. *Cryobiology*, 50: 239-249.
- CAROLSFELD, J, HP GODINHO, E ZANIBONI FILHO & BJ HARVEY. 2003. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. *J. Fish Biol.*, 63: 472–489.
- BALL, BA & A VO. 2001. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential, *Journal of Andrology*, 22: 1061-1069.

- BERGERON, A, MH CRÊTE, Y BRINDLE & P MANJUNATH. 2004. Low-density lipoprotein fraction from hen`s egg yolk decreases the binding of the major protein of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. *Biol. Reprod.*, 70: 708-717.
- BENCHARIF, D, L AMIRAT-BRIAND, A GARAND, M ANTON, E SCHMITT, S DESHERCES, G DELHOMME, ML LANGLOIS, P BARRIÈRE, S DESTRUMELLE, O VERA-MUNOZ & D TAINTURIER. 2010. Freezing canine sperm: Comparison of semen extenders containing Equex® and LDL (Low Density Lipoproteins). *Anim. Reprod. Sci.*, 119: 305-313.
- BIANCHI, I, K CALDERAM, EF MASCHIO, EM MADEIRA, RR ULGUIM, CD CORCINI, DC BONGALHARDO, EK CORRÊA, T LUCIA JUNIOR, JC DESCHAMPS & MN CORRÊA. 2008. Evaluation of amides and centrifugation temperature in boar semen cryopreservation. *Theriogenology*, 69: 632–638.
- BLANCO, JM, JA LONG, G GEE, DE WILDT & AM DONOGHUE. 2011. Comparative cryopreservation of avian spermatozoa: Benefits of non-permeating osmoprotectants and ATP on turkey and crane sperm cryosurvival. *Anim. Reprod. Sci.*, 123: 242-248.
- BUCAK, MN, A ATESSAHIN, O VARISLI, A YUCE, N TEKIN & A AKCAY. 2007. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen. Microscopic and oxidative stress parameters after freeze–thawing process. *Theriogenology*, 67: 1060–1067.
- CHALAH T, F SEIGNEURIN, E BLESBOIS & JP BRILLARD. 1999. In vitro comparison of fowl sperm viability in ejaculates frozen by three different techniques and relationship with subsequent fertility in vivo. *Cryobiology*, 39: 185–191.
- COSER, AM, H GODINHO & DM RIBEIRO. 1984. Cryogenic preservation of spermatozoa from *Prochilodus scrofa* and *Salminus maxillosus*. *Aquacult.*, 37: 387–390.
- CRUZ-CASALLAS, PE, SC PARDO-CARRASCO, JA ARIAS-CASTELLANOS, PE LOMBO-CASTELLANOS, DA LOMBO-RODRÍGUEZ & JE PARDO-MARIÑO. 2004. Cryopreservation of *Yamú Brycon siebenthalae* milt. *J. World. Aquacult. Soc.*, 35: 529–535.

- DALIMATA, AM & JK GRAHAM. 1997. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methyl cellulose. *Cryobiology*, 48: 831–841.
- FELIZARDO, VO, RA MELLO, LDS MURGAS, ES ANDRADE, MM DRUMOND & PV ROSA. 2010. Effect of cryopreservant combinations on the motility and morphology of curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm. *Anim. Reprod. Sci.*, 122: 259–263
- GUTIÉRREZ-PÉREZ, O, ML JUÁREZ-MOSQUEDA, SU CARVAJAL & MET ORTEGA. 2009. Boar spermatozoa cryopreservation in low glycerol/trehalose enriched freezing media improves cellular integrity. *Cryobiology*, 58: 287- 292.
- GWO JC, H OHTA, K OKUZAWA & HC WU. 1999. Cryopreservation of sperm from the endangered Formosan landlocked salmon (*Oncorhynchus masou formosanus*). *Theriogenology*, 51: 569-582.
- HANADA A & H NAGASE. 1980. Cryoprotective effects of some amides on rabbit spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, 60: 247–52.
- HORVATH A & B URBANYI. 2000. The effect of cryoprotectants on the motility and fertilizing capacity of cryopreserved African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell 1822) sperm. *Aquacult. Res.*, 31: 317-324.
- HU, J, Q LI, Z JIANG & W LI. 2008. Effects of different extenders on DNA integrity of boar spermatozoa following freezing-thawing. *Cryobiology*, 57: 257–262.
- HU, J, Q LI, Z JIANG, H YANG, S ZHANG & H ZHAO. 2009. The Cryoprotective Effect of Trehalose Supplementation on Boar Spermatozoa Quality. *Reprod. Dom. Anim.*, 44: 571–575.
- HU, J, Z JIANG, Z, R LU, K LI, S ZHANG, L ZAN, Y LI & X LI. 2011. The advantages of low-density lipoproteins in the cryopreservation of bull semen. *Cryobiology*, 62: 83-87.
- HUANG C, C SUN, X SU, X ZHAO, M MIAO, Y LIU & Q DONG. 2009. Sperm cryopreservation in guppies and black mollies - a generalized freezing protocol for livebearers in *Poeciliidae*. *Cryobiology*, 59: 351-356.

- KOH ICC, K-I YOKOI, M TSUJI, Y TSUCHIHASHI & H OHTA. 2010. Cryopreservation of sperm from seven-band grouper, *Epinephelus septemfasciatus*. *Cryobiology*, 61: 263-267.
- MALO, C, L GIL, N GONZALEZ, R CANO, I BLAS & E ESPINOSA, E, 2010. Comparing sugar type supplementation for cryopreservation of boar semen in egg yolk based extender. *Cryobiology*, 61: 17-21.
- MANJUNATH, P & I THÉRIEN. 2002. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *J. Reprod. Immunol.*, 53: 109-119.
- MARIA, AN, ATM VIVEIROS, RTF FREITAS & AV OLIVEIRA. 2006. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. *Aquaculture*, 260: 298-306.
- MCCLEAN R, YP ZEE, WV HOLT & SD JOHNSTON. 2008. Cryopreservation of kangaroo spermatozoa using alternative approaches that reduce cytotoxic exposure to glycerol. *Cryobiology*, 57: 304-307.
- MELO FCSA & HP GODINHO. 2006. A protocol for cryopreservation of spermatozoa of the fish *Brycon orthotaenia*. *Anim. Reprod.*, 3: 380–385.
- NAGASE, H, T NIWA, S YAMASHITA & S IRIE. 1964. Deep freezing of bull semen in concentrated pellet form. II. Protective action of sugars. In: *Proceedings of the 5 th International Congress of Animal Reproduction A. I., Trento*, 489–502.
- NAING, SW, H WAHID, K MOHD AZAM, Y ROSNINA, AB ZUKI, S KAZHAL, MM BUKAR, M THEIN, T KYAW & MM SAN. 2010. Effect of sugars on characteristics of Boer goat semen after cryop- reservation. *Anim. Reprod. Sci.*, 122: 23-28.
- OGIER DE BAULNY B, C LABBE & G MAISSE. 1999. Membrane integrity, mitochondrial activity, ATP content and motility of european catfish (*Silurus glanis*) testicular spermatozoa after freezing with different cryoprotectants. *Cryobiology*, 39: 177–184.
- OKUDA Y, Y SEITA, S HISAMATSU, S SONOKI, M SHINO, T MASAOKA, T INOMATA, S-I KAMIJO & N KASHIWAZAKI. 2007. Fertility of spermatozoa

- cryopreserved with 2% acetamide or glycerol through artificial insemination in the Japanese white rabbit. *Exp. Anim.*, 56: 29-34.
- PÉREZ-CEREZALES S, S MARTÍNEZ-PÁRAMO, J BEIRÃO & M HERRÁEZ. 2010. Fertilization capacity with rainbow trout DNA-damaged sperm and embryo developmental success. *Reproduction*, 139: 989-997.
- RICHARDSON, GF, TI MILLER & MA MCNIVEN. 2000. Cryopreservation of arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.), semen in various extenders and in three sizes of straw. *Aquaculture Research*, 31: 307-315.
- SHISHOVA NR, VK UTESHEV, SA KAUROVA, RK BROWNE & EN GAKHOVA. 2011. Cryopreservation of hormonally induced sperm for the conservation of threatened amphibians with *Rana temporaria* as a model research species. *Theriogenology*, 75: 220-232.
- SQUIRES EL, SL KEITH & JK GRAHAM. 2004. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 62: 1056–1065.
- SZTEIN, JM, K NOBLE, JS FARLEY & LE MOBRAATEN. 2001. Comparison of permeating and nonpermeating cryoprotectants for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology*, 41: 28–39.
- TAITSON, PF, E CHAMI & HP GODINHO. 2008. Gene banking of the neotropical fish *Leporinus obtusidens* (Valenciennes, 1836): A protocol to freeze its sperm in the field. *Anim. Reprod. Sci.*, 105: 283–291.
- THÉRIEN, I, R MOREAU & P MANJUNATH. 1999. Bovine seminal plasma phospholipid-binding proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm. *Biol. Reprod.*, 61: 590–598.
- TONIETO, RA, KL GOULARTE, GDA GASTAL, RS SCHIAVON, JC DESCHAMPS & T LUCIA JR. 2010. Cryoprotectant effect of trehalose and low-density lipoprotein in extenders for frozen ram semen. *Small Rum. Res.*, 93: 206-209.
- TSELUTIN K, F SEIGNEURIN & E BLESBOIS. 1999. Comparison of cryoprotectants and methods of cryopreservation of fowl spermatozoa. *Poult. Sci.*, 78: 586–590.
- VARELA JUNIOR, AS, CD CORCINI, RR ULGUIM, MVF ALVARENGA, I BIANCHI, MN CORRÊA, T LUCIA JR. & JC DESCHAMPS. 2009. Effect of low

- density lipoprotein on the quality of cryopreserved dog semen Anim. Reprod. Sci., 115: 323-327.
- VELASCO-SANTAMARIA, YM, VM MEDINA-ROBLES & PE CRUZ-CASALLAS. 2006. Cryopreservation of yamú (*Brycon amazonicus*) sperm for large scale fertilization. Aquacult., 256: 264–271.
- VERA-MUNOZ, O, L AMIRAT-BRIAND, T DIAZ, L VÁSQUEZ, E SCHMIDT, S DESHERCES, M ANTON, D BENCHARIF & D TAINTURIER. 2009. Effect of semen dilution to low-sperm number per dose on motility and functionality of cryopreserved bovine spermatozoa using low-density lipoproteins (LDL) extender: Comparison to Triladyl and Bioxcell. Theriogenology, 71: 895-900
- YAMASHIRO, H, K NARITA, S SUGIMURA, YJ HAN, A SUGARAWA, K MOHORAKU, F NAKAZATO, T CONO, M YOSHIDA & E SATO. 2007. Trehalose enhanced the freezability of poodle dog sperm collected by artificial vagina (AV). Anim. Reprod. Sci., 102: 165–171.
- YILDIZ, C, A KAYA, M AKSOY & T TEKELI. 2000. Influence of sugar supplement action of the extender on motility viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. Theriogenology, 54: 579–785.
- ZEE YP, WV HOLT, J GOSALVEZ, CD ALLEN, V NICOLSON, M PYNE, M BURRIDGE, FN CARRICK & SD JOHNSTON. 2008. Dimethylacetamide can be used as an alternative to glycerol for the successful cryopreservation of koala (*Phascolarctos cinereus*) spermatozoa. Reprod. Fertil. Dev., 20: 724-733.

CONCLUSÕES GERAIS

1. Quando comparadas as concentrações de 5, 10, 15 e 20% de DMSO, a concentração de 10% foi associada à melhor manutenção da qualidade de sêmen criopreservado de tambaqui.

2. A inclusão de LDL no diluente seminal promoveu a manutenção das estruturas dos espermatozoides criopreservados de *C. macropomum*, entretanto, diminuiu a funcionalidade.

3. A adição de 150 mM de trealose no diluente de congelamento manteve as características *in vivo* e *in vitro* do espermatozóide de *Colossoma macropomum*.

4. O uso das amidas testadas para o congelamento de sêmen de *C. macropomum* são as melhores alternativas de crioprotetores.

5. Dentre as concentrações de amidas testadas em sêmen de tambaqui, os tratamentos com 5% e 8% DMF e 8% MF foram os que mantiveram melhor a qualidade espermática após o descongelamento e não diferenciaram do sêmen fresco nas taxas de fertilização e eclosão.

6. Em função dos resultados obtidos nesses experimentos recomenda-se a utilização das amidas DMF (na concentração de 5%) ou MF (na concentração de 8%) para criopreservação de sêmen de tambaqui *C. macropomum*.

ANEXO I

TRABALHO EM INGLÊS DO CAPITULO II ENVIADO PARA A REVISTA THERIOGENOLOGY.

Use of amides as cryoprotectants in extenders for frozen sperm of Tambaqui, *Colossoma macropomum*

A.S. Varela Jr.^{1,2}, C.D. Corcini³, S.M.M. Gheller³, RD Jardim¹, T. Lucia Jr.³, D.P. Streit Jr.⁴; M.R.C. Figueiredo²

¹Instituto de Ciências Biológicas, ²Instituto de Oceanografia, Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande, RS, Brasil

³ReproPel, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil

⁴Aquam, Departamento de Zootecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

Abstract

Amides were tested as cryoprotectants in comparison to more traditional cryoprotectants glycerol and DMSO for the recovery of Tambaqui fish (*Colossoma macropomum*) sperm. Milt was extended in Beltsville Thawing Solution then frozen with the addition of either 2%; 5%, 8%; and 11% of 1) dimethylacetamide (DMA), 2) dimethylformamide (DMF), 3) methylformamide (MF), or with 5% glycerol or 10% dimethylsulfoxide, The highest

²Corresponding author: Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Rio Grande, Campus Carreiros, 96201-900, Rio Grande, RS, Brasil. E-mail:

antoniovarela@furg.br

fertilization rates ($P < 0.001$) occurred using amides; 8% DMF ($91.6 \pm 1.3\%$), 5% DMF ($88.9 \pm 1.6\%$) and 8% MF ($83.0 \pm 1.6\%$), which did not significantly differ among themselves, when compared with glycerol ($83.0 \pm 1.6\%$) and DMSO ($83.0 \pm 1.6\%$). The highest hatching rates ($P < 0.001$) also occurred for 5% DMF, 8% DMF and 8% MF (79.1 ± 3.1 ; 87.6 ± 1.5 and 74.8 ± 3.0 , respectively) and were also similar ($P > 0.05$). For such treatments, both fertilization and hatching rates were similar ($P > 0.05$) to those observed with fresh sperm (91.7 ± 1.4 and 87.4 ± 1.4 , respectively). The highest sperm motility across extenders (at least 55.7%) was observed with 5%, 8% and 11% DMF ($P < 0.001$). Those same treatments, along with 11% MF, provided the highest period of motility ($P < 0.001$) of at least one minute. The highest sperm integrity (more than 54%) was observed with 5% and 11% MF and with DMA and DMF at all tested concentrations ($P < 0.001$). The highest sperm viability (at least 31%) was for 5%, 8% and 11% DMA, 8% and 11% MF and also for DMF at all tested concentrations ($P < 0.001$). The highest sperm DNA integrity (more than 50%) occurred for 2%, 5% and 8% MF and for DMA and DMF at all concentrations ($P < 0.001$), whereas 2% DMA, 11% MF, 11%DMF and the three amides at both 5% and 8% yielded the highest mitochondrial functionality ($P < 0.001$); at least 44%. Thus, 8% MF and DMF at both 5% and 8% were the cryoprotectants achieving the most effective post-thawing quality for *C. macropomum* sperm.

Key words: cryoprotectants, freezing, sperm, *Colossoma macropomum*.

1. Introduction

The Tambaqui (*Colossoma macropomum*; Cuvier, 1818) is the second largest South American scaled fish and a migratory species [1]. *Colossoma macropomum* is the native Brazilian fish with the highest agricultural production of above 30,000 T in 2008 [2], and provides high production under intensive aquaculture [3] using genetic strains to optimize production [4]. Therefore, means to perpetuate the genetic variation of strains of *C. macropomum* are required in aquaculture, both for security and to reduce costs involved with maintaining strains, and in nature where populations are threatened by dam building

[5]. Preservation of genetic material of fish species can be practically optimized through sperm cryopreservation [6].

Cryoprotectants are included in cryodiluents for freezing sperm to prevent formation of intracellular ice crystals that are lethal to sperm cells [7], to reduce damage to sperm membranes and organelles [8, 9], and to preserve the integrity of DNA [10-13]. Glycerol is the most common penetrating cryoprotectant included in extenders for frozen sperm [7, 8, 14], despite of its high molecular weight and viscosity, which may lead to a cytotoxic effect [8]. Furthermore, glycerol may have contraceptive effects in poultry [8] and may be related to apoptosis [15]. Other cryoprotectants can also be used for freezing fish sperm, such as ethylene glycol, methanol and dimethylsulfoxide (DMSO) [16], which are commonly used for freezing sperm of Brazilian native freshwater fish species [17]. However, glycerol and DMSO are not efficient cryoprotectants for freezing sperm of *C. macropomum* [18, 19]. Amides such as dimethylacetamide (DMA), dimethylformamide (DMF) and methylformamide (MF) have been used as penetrating cryoprotectants in extenders for freezing sperm of stallions [20, 21], boars [22], dogs [23], poultry [24] and fish [26]. The cryoprotectant effect of such amides is attributed to their low molecular weight and viscosity, which provide them great membrane permeability, reducing the occurrence of cellular damage due to osmotic stress [25], since when a penetrating cryoprotectant permeates cell membranes slower than water does [27], the cell's volume may either contract or expand beyond its maximal capacity when the cryoprotectant is added or removed, respectively [28]. Nevertheless, amides have never been tested as penetrating cryoprotectants for freezing *C. macropomum* sperm.

Due to the commercial value of *C. macropomum* [2, 3], some studies have addressed its sperm cryopreservation [18, 19], but these lacked detailed evaluation of post-thawing sperm quality and obtained discouraging results with conventional cryoprotectants. Recently, Maria et al [29] evaluated some sperm characteristics of *C. macropomum*, using only fresh sperm. The objective of the present study was to test the cryoprotectant efficiency of DMA, DMF and MF, in distinct concentrations, on post-thawing quality of *C. macropomum* sperm, evaluating hatching and fertilization rates, latency, motility, integrity of plasma membrane and DNA, and mitochondrial functionality.

2. Materials and methods

2.1. Sperm collection and evaluation

Fourteen *C. macropomum* males (5.4 ± 0.4 kg) from a commercial farm located in Pimenta Bueno RO Brazil ($11^{\circ}41'46.95''$ S and $61^{\circ}13'47.50''$ O) were used to provide milt, during their reproductive season, from December 2009 to February 2010. All fish were kept in fish ponds, receiving a commercial diet with 40% crude protein and 2,900 kcal of metabolizable energy/kg, which was equivalent to 3% of the total live weight of all fish, three times weekly. After capture, each male was administered carp pituitary extract in its dorsal region (1mg/kg) diluted in 0.5 mL of sterile saline (0.9% NaCl). The males were then kept in two tanks with a 0.7 m water column (at most four fish per tank). After 6.5 hrs, the males were removed from the tanks and dried with a cloth towel, then the urogenital papilla was cleaned and dried with a paper towel. Sperm was collected with a 15 mL conical tube through abdominal massage with the simultaneous extrusion of feces and urine avoided to prevent milt contamination and spermatozoa activation [30].

Sperm motility and motility period were evaluated before freezing, by putting a 1 μ L sperm sample and 100 μ L distilled water at 25° C in a slide covered with a coverslip, using a phase contrast microscopy (BX 41 Olympus®, 400x) with 200X magnification. Sperm motility period was determined as the time from activation up to the moment the sperm stopped moving. All evaluations were done by the same trained technician. All sperm samples presented at least 80% sperm motility, 10 s after activation. The sperm concentration, determined with a Neubauer chamber, was 8.7×10^9 spermatozoa/ml.

2.2. Sperm cryopreservation

The basic extender was the Beltsville Thawing Solution (BTS) [31], originally used to cool boar sperm, but commonly used in sperm freezing protocols for Brazilian native

migratory fish species [16]. Individual sperm samples were diluted 1/9 (v/v), homogenized and split in 14 treatments, combining distinct cryoprotectants and concentrations of: 5% glycerol [17]; 10% DMSO [29]; and DMA, MF and DMF at 2%, 5%, 8% and 11%. For each male, 5 repeats per treatment were processed. So, the total number of samples was 980. All chemicals used in the experiment were obtained from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA).

Sperm samples were stored in 250 μ L straws and stabilized at room temperature for 2 min. Subsequently, the straws were exposed to liquid nitrogen vapor in a commercial liquid nitrogen vapor dry-shipper (Taylor-Wharton®, CP 300) [33]. The straws remained in the dry-shipper for 12 h and were subsequently stored in liquid nitrogen for at least 15 d, until thawing.

2.3. Fertilization and post-thawing sperm evaluation

Fourteen *C. macropomum* females (7.9 ± 0.5 kg) kept under the same conditions described above for the males were used (one per male). The females were induced to spawn through administration of 5 mg/kg carp pituitary extract diluted in 2 mL saline (0.9% NaCl), in the dorsal lateral region. After 9 h, the eggs were extruded through abdominal massage and collected in a 1 L Beaker, and sixteen aliquots of 2 g each were selected for each female.

For each male, 14 straws (one per treatment) were thawed in water bath at 45° C for 5 s [32]. For each aliquot, 150 μ L of each sperm sample ($n = 14$) were used. At the same time, two other aliquots were fertilized with the same sperm number per egg, with fresh sperm previously collected from other two males, to assure the quality of the eggs (all repeats with fertilization inferior to 70% were discharged). During fertilization, the eggs and sperm were in contact inside a 50 mL beaker, which was gently homogenized for 5 s. The mean sperm number per egg was 7×10^4 . Sperm activation was done through the addition of 2 mL distilled water at 29° C. Then, the content was homogenized again for 5 s and allowed to rest for 2 min. After that, 20 mL distilled water at 29° C were added to each aliquot, to hydrate the fertilized eggs. Thereafter, the content was incubated under a gentle, ascending

and constant water flow (150 mL/min) in conical 2 L incubators. The developmental stages were monitored with a stereomicroscope (Olympus SZX 7). The fertilization rate was assessed after 8 h, as the number of eggs with cell division over the total number of eggs ($n = 200$). The hatching rate was calculated as the number of hatched embryos over all evaluated embryos.

Sperm samples were transported to the ReproPel laboratory for further analyses. Two straws of each treatment were thawed in water bath at 45° C for 5 s and re-suspended in 400 μ L BTS (1:3, v/v) at 22° C in a 1.5 mL conical tube, to minimize potential toxic effects of the cryoprotectant.

For the evaluations of sperm viability, DNA integrity and mitochondrial functionality, 200 sperm cells were counted and evaluated with an epifluorescent microscope at 400 X magnification (Olympus® BX 51, América INC, São Paulo, Brazil).

For evaluation of sperm viability, a 10 μ L sperm sample was diluted in a 40 μ L work solution in an isotonic saline solution, including: 1.7 mM-formaldehyde; 20 μ M Carboxyfluorescein diacetate (CFDA); and 7.3 μ M propidium iodide (IP). Spermatozoa having green fluorescence were considered viable, since their metabolic activity allowed CFDA to accumulate in their cytoplasm, whereas spermatozoa with heads having either red or red and green fluorescence were classified as non viable [34]. The percent of sperm viability was determined by the proportion of spermatozoa emitting green fluorescence compared to the total spermatozoa (green, red or red and green fluorescence).

Sperm DNA integrity was evaluated after putting a 45 μ L sperm sample in 50 μ L TNE (0.01 M Tris-HCl; 0.15 M NaCl; 0.001 M EDTA; pH 7.2). After 30 s, 200 μ L of Triton solution 1x was added and, 30 s later, 50 μ L of acridine orange was added (2 mg/mL in deionized H₂O). The evaluation was done after 5 min, without surpassing 1 min of slide exposure. Spermatozoa presenting green fluorescence were considered as having integer DNA, whereas those presenting red or orange fluorescence were considered as having denatured DNA [35]. The rate of DNA integrity was determined by the proportion of spermatozoa emitting green fluorescence compared to the total spermatozoa (green, red or orange fluorescence).

Mitochondrial functionality was evaluated after incubation of a 10 μL sperm sample with a 40 μL rhodamine 123 solution (13 μM), at 20°C for 10 min. Spermatozoa presenting positive rhodamine staining (green fluorescence) were considered as having functional mitochondria. Conversely, non functional mitochondria were characterized by negative rhodamine staining (spermatozoa presenting no fluorescence) [36]. The rate of mitochondrial functionality determined by the proportion of spermatozoa emitting green fluorescence compared to the total spermatozoa (green or no fluorescence).

Sperm integrity was evaluated by adding a 1 μL sperm sample to a 10 μL staining solution including 5 g eosin Y and 10 g nigrosin, homogenized in BTS. After 1 min, a smear was done and left to dry. After counting 200 sperm cells using a bright field microscope with an oil immersion objective (100 X), the percent of integer sperm cells (having non-ruptured membranes) was recorded. Sperm cells were considered integer when remained unstained whereas those having either pink or red staining were considered non integer [29].

2.4. Statistical analyses

All variables were normally distributed according to the Shapiro-Wilk test. The effects of combinations of cryoprotectants and concentrations on the responses were tested by analysis of variance, with comparisons of means done with the Tukey's test. Associations between responses were determined by Pearson's correlation coefficients, regardless of the treatments. All analyses were done with Statistix® [37].

3. Results

Before freezing, the volume of collected fresh sperm was 4.5 ± 0.3 mL. Sperm concentration was $8.7 \pm 0.2 \times 10^9/\text{mL}$, sperm motility was $95.7 \pm 2.0\%$ and the motility period was 122.6 ± 5.0 sec.

The highest fertilization and hatching rates ($P < 0.001$) occurred for samples frozen with amides: 5% DMF; 8% DMF; and 8% MF (Table 1). Such rates did not differ among themselves and were similar to those observed for fresh sperm ($P > 0.05$).

As shown in Table 2, samples frozen with DMF at 5%, 8% and 11 % provided the highest sperm motility and the longest motility period ($P < 0.001$), although their motility was similar to that observed with 11% MF ($P > 0.05$). Sperm integrity (the percent of sperm cells having non-ruptured membranes) was highest for samples frozen with DMA and DMF ($P < 0.001$), both at all concentrations, and with 5% and 11% MF (Table 2).

The lowest sperm viability ($P < 0.001$) was observed for samples frozen with glycerol, DMSO, 2% DMA, 2% MF and 5% MF (Table 3). Conversely, the greatest sperm DNA integrity was observed for 2%, 5% and 8% MF and for both DMA and DMF at all tested concentrations ($P < 0.001$). The lowest percentages of mitochondrial functionality ($P < 0.001$) were found in samples frozen with glycerol, DMSO, 8% MF, 11% DMA and with all the three tested amides at 2% (Table 3).

Fertilization and hatching rates were strongly correlated ($P < 0.01$) with each other (Table 4). A strong positive correlation was also observed between sperm motility and motility period ($P < 0.01$). Sperm motility and motility period were moderately correlated with sperm membrane integrity and mitochondrial functionality ($P < 0.01$).

4. Discussion

This is the first study of the use of amides as cryoprotectants for *C. macropomum* sperm. We showed that amides as cryoprotectants provided higher fertilization and hatching rates than glycerol and DMSO. The fertilization and hatching rates with amides were similar to those with fresh sperm, and amides also provided high rates of sperm viability and DNA integrity, and mitochondrial function. Our best protocols will enable *C. macropomum* frozen sperm to be transported from the species' native environment, or from aquaculture facilities, over its wide range throughout Latin American, and be kept indefinitely to perpetuate their unique genetic variation [3].

The use of amides as cryoprotectants has been reported for other fish species. For European catfish (*Silurus glanis*), DMA was more efficient than glycerol, DMSO, and propylene glycol on preserving post-thawing sperm viability and mitochondrial functionality [25]. For Arctic salmon (*Salvelinus alpinus*) sperm, DMA also yielded fertilization rate and motility similar to that with DMSO and greater than that with glycerol [38]. However, sperm of African catfish (*Clarias gariepinus*) frozen with DMA presented greater motility than with glycerol, but DMSO was more efficient than DMA on preserving post-thawing sperm motility and presented similar hatching rate [16]. Although post-thawing motility and fertilization rate for frozen sperm of Salmon heart (*Oncorhynchus masou formosanus*) were similar for samples frozen with either DMA or DMSO, for sperm of Formosan landlocked salmon (*Oncorhynchus masou ishikawae*), DMSO was more efficient than DMA on preserving the same parameters of sperm quality [39]. Thus, DMA is an efficient cryoprotectant for frozen fish sperm, but its effect varies among species and also among fish from the same genus. Nevertheless, for sperm of Seven-band grouper (*Epinephelus septemfasciatus*) [40], Guppy (*Poecilia reticulata*) and Black molly (*P. latipinna*) [41], post-thawing sperm motility with extenders including DMF was similar to that observed with either DMSO or glycerol. To our knowledge, MF has not yet been tested as a cryoprotectant for the sperm of other fish sperm besides *C. macropomum* in the present study. However, all the three amides tested in the present study have been used as cryoprotectants in extenders for frozen sperm from other fish species. Benefits for post-thawing sperm quality related to the replacement of glycerol and DMSO by DMA were reported for rodents: rabbits [42, 43]; kangaroos [44]; and koalas [45]. The use of DMF, and in some cases DMA, as cryoprotectants instead of glycerol improved post-thaw sperm quality with the sperm of boars [22], roosters [24, 46], and amphibians [47]. For stallion sperm, DMF and MF provided motility similar to that observed with glycerol [21]. Therefore, the response of spermatozoa to different amides used as cryoprotectants may be influenced by species differences.

Although in most of the previous studies referred to above, DMA was generally the amide having the most efficient cryoprotectant effect, in the present study, the use of 8% DMF yielded post-thawing sperm motility, viability and integrity, DNA integrity and

mitochondrial functionality that were nearly the double of those observed with glycerol, along with a hatching rate similar to that of fresh sperm. However, many studies reported damages in fish spermatozoa due to cryopreservation, affecting motility, cell metabolism, structure of plasma membrane, mitochondria, tail and chromatin [9,10,13, 19, 25, 36, 39-41]. In the present study, reduction in sperm viability and integrity was observed for all the tested cryoprotectants, at some concentrations, which may have negative influence on sperm motility initiation, because of the role of membrane signaling in the process [48] or may lead to an inability for membrane potential depolarization as a function of ion leakage [49]. Negative effects may also occur for motility maintenance, due to losses of intracellular ATP [50], which is only produced when mitochondria are functional. Furthermore, harmful effects may be observed on membrane fusion and on the ability of the sperm nucleus to produce the first embryonic cell during the fertilization process [51]. Reduced post-thawing sperm quality may also occur due to amplification of the reactive oxygen species production, with formation of lipid peroxides and cytotoxic aldehydes [52], causing changes in membrane fluidity and integrity, impairment of lipid-protein interactions and modifications of DNA and proteins [53]. Additionally, the increased sperm DNA fragmentation observed for some cryoprotectants may increase the probability of fertilization by sperm having damaged DNA, which would likely have negative impact on fertilization and hatching rates, due to impairment of embryo development. Despite of the potential limitations mentioned above, in the present study, some of the tested amides present efficient cryoprotectant effect.

These amides' cryoprotectant effect may be attributed to their lipophilic activity and to their low molecular weight and low viscosity [26]. Such characteristics provide the tested amides with great membrane permeability and efficient binding to water molecules, which may reduce osmotic stress and the formation of intracellular ice crystals, enabling these compounds to penetrate the sperm plasma membrane more readily, thereby, decreasing their osmotic toxicity in comparison to glycerol [21]. However, as the DNA integrity of thawed sperm was generally decreased when using the highest concentration (11%) of all tested amides, these concentrations cannot be recommended, because although

sperm having damaged DNA may fertilize oocytes, subsequent embryo development is impaired, which leads to reduced hatch rates as reported for rainbow trout sperm [13].

As fertilization and hatching rates were highly correlated, only one of such rates is necessary to estimate post-thawing quality of *C. macropomum* sperm. The only other strong correlation was observed between sperm motility and motility period. Despite presenting statistical significance, eight other correlations can be considered moderate and ten others can be considered weak. Nevertheless, post-thaw sperm integrity was not only uncorrelated or poorly correlated with other parameters of sperm quality, but it also did not differ across distinct cryoprotectants. Although fertilization rate is an important indicator of sperm quality, the use of an excessive sperm concentration may mask estimations of post-thawing sperm quality, because samples presenting reduced percent of functional sperm cells may be mistakenly considered highly fertile [54]. In the present study, the mean sperm number per egg was 7×10^4 , which may be considered low for such species, since such concentration is commonly used for fresh sperm. However, further studies are still necessary to determine the minimum number of *C. macropomum* sperm to be used per egg that would not lead to reduced fertilization and hatching rates.

In conclusion, the use of the tested amides as cryoprotectants for *C. macropomum* sperm gave higher recovery than the alternative cryoprotectants, glycerol and DMSO. Among amides, 5% and 8% DMF and 8% MF provided the highest post-thaw sperm quality with fertilization and hatching rates similar to those of fresh sperm.

Acknowledgments

This study was sponsored by CAPES and CNPq. The authors would like to thank the staff of Piscicultura Boa Esperança (Pimenta Bueno, RO, Brazil) for their invaluable contribution for this study.

References

- [1] Goulding MA, Carvalho ML. Life history and management of the Tambaqui (*Colossoma macropomum, characidae*): an important amazonian foodfish. *Revista Brasileira de Zoologia* 1982;1:107-138.
- [2] FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. *Fishery and Aquaculture Statistics - Aquaculture production 2008*; 220 p.
- [3] Chellapa S, Chellapa NT, Barbosa WT, Huntigord FA, Beveridge MCM. Growth and production of the Amazonian Tambaqui in fixed cages under different feeding regimes. *Aquacult Int* 1995;3:11-21.
- [4] Suquet M, Dreanno C, Fauvel C, Cosson J, Billard R. Cryopreservation of sperm in marine fish. *Aquacult Res* 2000;31:231-243.
- [5] Lopes TS, Streit Jr. DP, Ribeiro RP, Povh JA, Lopera-Barrero NM, Vargas L, Pinto Filho C, Queiroz Jr. Genetic variability of Tambaqui (*Teleostei: Characidae*) from different regions of Brazil. *Braz J Vet Anim Sci* 2009;61:728-735.
- [6] Martínez-Páramo S, Pérez-Cerezales S, Gómez-Romano F, Blanco G, Sánchez JÁ, Herráez MP. Cryobanking as tool for conservation of biodiversity: Effect of brown trout sperm cryopreservation on the male genetic potential. *Theriogenology* 2009;71:594–604.
- [7] Holt WV. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci* 2000;62:3-22.
- [8] Hammerstedt RH, Graham JK. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. *Cryobiology* 1992;29:26–38.
- [9] Cabrita E, Anel I, Herraéz MP. Effect of different external cryoprotectants as membrane stabilizers on cryopreservation of rainbow trout sperm. *Theriogenology* 2001;56:623-635.
- [10] Cabrita E, Robles V, Rebordinos L, Sarasquete C, Herraéz MP. Evaluation of DNA damage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cryopreserved sperm. *Cryobiology* 2005;50:144-153.
- [11] Hu J, Li Q, Jiang Z, Li W. Effects of different extenders on DNA integrity of boar spermatozoa following freezing–thawing. *Cryobiology* 2008;57:257–262.
- [12] Koderle M, Aurich C, Schafer-Somi S. The influence of cryopreservation and seminal plasma on the chromatin structure of dog spermatozoa. *Theriogenology* 2009;2:1215-1220.

- [13] Pérez-Cerezales S, Martínez-Páramo S, Beirão J, Herráez M. Fertilization capacity with rainbow trout DNA-damaged sperm and embryo developmental success. *Reproduction* 2010;139:989-997.
- [14] Watson, PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 2000;61: 481–492.
- [15] Wundrich K, Paasch U, Leicht M, Glander HJ. Activation of caspases in human spermatozoa during cryopreservation an immunoblot study. *Cell Tissue Bank* 2006;7:81–90.
- [16] Horvath A, Urbanyi B. The effect of cryoprotectants on the motility and fertilizing capacity of cryopreserved African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell 1822) sperm. *Aquacult Res* 2000;31:317-324.
- [17] Viveiros ATM, Godinho HP. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. *Fish Physiol Biochem* 2009;35:137–150.
- [18] Farias JO, Nunes JF. Avaliação *in vitro* e *in vivo* do sêmen de Tambaqui (*Colossoma macropomum*) conservado a temperatura ambiente e criopreservado em água de coco. *Revista Científica de Produção Animal* 1999;1:44-58.
- [19] Menezes JTB, Queiroz LJ, Doria CRC, Menezes Jr JB. Sperm evaluation of Tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), after thawing. *Acta Amazonica* 2008;38:366-368.
- [20] Medeiros ASL, Gomes GM, Carmo MT, Papa FO, Alvarenga MA. Cryopreservation of stallion sperm using different amides. *Theriogenology* 2002;58:273–6.
- [21] Squires EL, Keith SL, Graham JK. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology* 2004;62:1056–1065.
- [22] Bianchi I, Calderam K, Maschio EF, Madeira EM, Ulguim RR, Corcini CD, Bongalhardo DC, Corrêa EK, Lucia T Jr, Deschamps JC, Corrêa MN. Evaluation of amides and centrifugation temperature in boar semen cryopreservation. *Theriogenology* 2008;69:632–638.
- [23] Futino DO, Mendes MCB, Matos WNL, Mondadori RG, Lucci CM. Glycerol, methyl-formamide and dimethyl-formamide in canine semen cryopreservation. *Reprod Domestic Anim* 2008;45:214-220.

- [24] Tselutin K, Seigneurin F, Blesbois E. Comparison of cryoprotectants and methods of cryopreservation of fowl spermatozoa. *Poult Sci* 1999;78:586–590.
- [25] Ogier de Baulny B, Labbe C, Maise G. Membrane integrity, mitochondrial activity, ATP content and motility of European Catfish (*Silurus glanis*) testicular spermatozoa after freezing with different cryoprotectants. *Cryobiology* 1999;39:177–184.
- [26] Ball BA, Vo A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. *J Androl* 2001;22:1061-1069.
- [27] Gao DY, Liu J, Liu C, McGann LE, Watson PF, Kleinhans FW, Mazur P, Critser ES, Critser JK. Andrology: Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of Glycerol. *Hum Reprod* 1995; 10: 1022–1109.
- [28] Buranaamnuay K, Grossfelda R, Struckmanna C, Ratha D. Influence of cryoprotectants glycerol and amides, combined with antioxidants on quality of frozen-thawed boar sperm *Anim Reprod Sci* 2011;127:56-61.
- [29] Maria AN, Azevedo HC, Santos JP, Carneiro PCF. Hormonal induction and semen characteristics of Tambaqui *Colossoma macropomum*. *Zygote* 2010; doi:10.1017/S0967199410000559
- [30] Billard R, Cosson J, Crim LW. Broodstock management and seed quality-general considerations. In: Bromage, N, Roberts RJ, (Ed.). *Broodstock management and egg larval quality*, Oxford: Blackwell Science, 1995, 1-24.
- [31] Pursel VG, Johnson LA. Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *J Anim Sci* 1975;40:99-102.
- [32] Streit Jr. DP, Benites C, Moraes GV, Ribeiro RP, Sakaguti ES, Caldieri RF. Sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) criopreservado com diluentes utilizados para sêmen de suínos. *Ciência Animal Brasileira* 2006;7:289-297.
- [33] Taitson PF, Chami E, Godinho HP. Gene banking of the neotropical fish *Leporinus obtusidens* (Valenciennes, 1836): A protocol to freeze its sperm in the field. *Anim Reprod Sci* 2008;105:283–291.
- [34] Harrison RAP, Vickers SE. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J Reprod Fert* 1990;88:343-352.

[35] Bencharif D, Amirat L, Pascal O, Anton M, Schmitt E, Desherces S, Delhomme G, Langlois ML, Barriere P, Larrat M, Tainturier D. The advantages of combining low-density lipoproteins with glutamine for cryopreservation of canine semen. *Reprod Domestic Anim* 2008;45:189-200.

[36] He S, Woods LC. Effects of dimethylsulfoxide and glycine on cryopreservation induced damage of plasma membrane and mitochondria to striped bass (*Morone saxatilis*) sperm. *Cryobiology* 2004;48: 254–262.

[37] Statistix[®]. Statistix[®] 9 for Windows. Tallahassee, FL, USA. 2008.

[38] Richardson GF, Miller TI, McNiven MA. Cryopreservation of arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.), semen in various extenders and in three sizes of straw. *Aquacult Res* 2000;31:307-315.

[39] Gwo JC, Ohta H, Okuzawa K, Wu HC. Cryopreservation of sperm from the endangered Formosan landlocked salmon (*Oncorhynchus masou formosanus*). *Theriogenology* 1999;51:569-582.

[40] Koh ICC, Yokoi K-I, Tsuji M, Tsuchihashi Y, Ohta H. Cryopreservation of sperm from seven-band grouper, *Epinephelus septemfasciatus*. *Cryobiology* 2010;61:263-267.

[41] Huang C, Sun C, Su X, Zhao X, Miao M, Liu Y, Dong Q. Sperm cryopreservation in guppies and black mollies - a generalized freezing protocol for livebearers in *Poeciliidae*. *Cryobiology* 2009;59:351-356.

[42] Hanada A, Nagase H. Cryoprotective effects of some amides on rabbit spermatozoa. *J Reprod Fert* 1980;60:247–52.

[43] Okuda Y, Seita Y, Hisamatsu S, Sonoki S, Shino M, Masaoka T, Inomata T, Kamijo S-I, Kashiwazaki N. Fertility of spermatozoa cryopreserved with 2% acetamide or glycerol through artificial insemination in the Japanese White Rabbit. *Exp Anim* 2007;56:29-34.

[44] McClean R, Zee YP, Holt WV, Johnston SD. Cryopreservation of kangaroo spermatozoa using alternative approaches that reduce cytotoxic exposure to glycerol. *Cryobiology* 2008;57:304-307.

[45] Zee YP, Holt WV, Gosalvez J, Allen CD, Nicolson V, Pyne M, Burridge M, Carrick FN, Johnston SD. Dimethylacetamide can be used as an alternative to glycerol for

the successful cryopreservation of koala (*Phascolarctos cinereus*) spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 2008;20:724-733.

[46] Chalah T, Seigneurin F, Blesbois E, Brillard JP. In vitro comparison of fowl sperm viability in ejaculates frozen by three different techniques and relationship with subsequent fertility in vivo. *Cryobiology* 1999;39:185–191.

[47] Shishova NR., Uteshev VK., Kaurova SA., Browne RK., Gakhova EN. Cryopreservation of hormonally induced sperm for the conservation of threatened amphibians with *Rana temporaria* as a model research species. *Theriogenology* 2011; 75:220-232.

[48] Boitano S, Omoto CK. Trout sperm swimming patterns and role of intracellular Ca. *Cell Motil Cytoskel* 1992; 21:74–82.

[49] Gatti JK, Billard R, Christen R. Ionic regulation of the plasma membrane potential of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) spermatozoa: Role in the initiation of sperm motility. *J Cell Physiol* 1990;143:546–554.

[50] Baulny BO, Levern Y, Kerboeuf D, Maise G. Flow cytometric evaluation of mitochondrial activity and membrane integrity in fresh and cryopreserved rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Cryobiology* 1997; 34:141–149.

[51] Labbe C, Martoriati A, Devaux A, Maise G. Effect of sperm cryopreservation on sperm DNA stability and progeny development in rainbow trout. *Mol Reprod Dev* 2001; 60:397–404.

[52] Aitken RJ. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reprod Fertil Dev* 1995;7:659–668.

[53] Halliwell B, Chiroco S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. *Am J Clin Nutr* 1993;57:715–725.

[54] Viveiros ATM, So N, Komen J. Sperm cryopreservation of African catfish (*Clarias gariepinus*): cryoprotectants, freezing rates and sperm:egg dilution ratio. *Theriogenology* 2000;54:1305–1308.

Table 1: Fertilization and hatching rates for all cryoprotectants and concentrations with *Colossoma macropomum* fresh and frozen sperm

Cryoprotectant*	Concentration (%)	Fertilization (%)	Hatching (%)
Fresh sperm		91.7 ± 1.4 ^a	87.4 ± 1.4 ^a
Glycerol	5	51.6 ± 2.4 ^{de}	39.7 ± 3.8 ^{ef}
DMSO	10	61.9 ± 3.1 ^{bcd}	46.1 ± 3.2 ^{def}
	2	54.8 ± 3.1 ^{cd}	44.8 ± 4.3 ^{def}
DMA	5	69.3 ± 2.7 ^b	59.7 ± 3.7 ^{bcd}
	8	58.6 ± 2.6 ^{bcd}	49.5 ± 3.4 ^{cde}
	11	50.5 ± 2.8 ^{de}	38.6 ± 3.1 ^{ef}
	2	57.1 ± 3.0 ^{bcd}	43.6 ± 3.7 ^{ef}
DMF	5	88.9 ± 1.6 ^a	79.1 ± 3.1 ^a
	8	91.6 ± 1.3 ^a	87.6 ± 1.5 ^a
	11	68.0 ± 3.2 ^{bc}	62.4 ± 3.9 ^{bc}
	2	61.6 ± 3.5 ^{bcd}	45.9 ± 2.6 ^{def}
MF	5	65.4 ± 3.3 ^{bc}	52.6 ± 3.1 ^{cde}
	8	83.0 ± 1.6 ^a	74.8 ± 3.0 ^{ab}
	11	40.0 ± 4.1 ^e	30.7 ± 3.2 ^f

*DMSO: Dimethylsulfoxide; DMA: dimethylacetamide; DMF: dimethylformamide; MF: methylformamide.

^{a-g}Means ± SEM having distinct superscripts differ in the column by at least P < 0.001

Table 2: Post-thaw motility, integrity and motility period for all cryoprotectants and concentrations with *Colossoma macropomum* sperm

Cryoprotectant *	Concentration (%)	Sperm motility (%)	Latency period (s)	Sperm integrity (%)
Glycerol	5	8.9 ± 1.9 ^g	20.2 ± 3.7 ^f	47.3 ± 4.9 ^b
DMSO	10	21.8 ± 2.4 ^{def}	29.1 ± 3.4 ^{ef}	46.4 ± 5.5 ^b
DMA	2	17.5 ± 2.8 ^{efg}	33.4 ± 4.1 ^{ef}	58.9 ± 3.0 ^{ab}
	5	27.5 ± 4.0 ^{de}	39.9 ± 4.9 ^{def}	58.0 ± 2.8 ^{ab}
	8	32.9 ± 2.9 ^{cd}	43.6 ± 3.8 ^{cde}	61.1 ± 1.8 ^{ab}
	11	21.8 ± 2.8 ^{defg}	34.1 ± 2.8 ^{ef}	60.4 ± 3.1 ^{ab}
DMF	2	24.6 ± 3.6 ^{def}	41.1 ± 3.8 ^{de}	58.2 ± 4.3 ^{ab}
	5	55.7 ± 2.4 ^{ab}	62.1 ± 6.5 ^{ab}	55.1 ± 4.7 ^{ab}
	8	64.3 ± 3.0 ^a	77.1 ± 4.5 ^a	56.9 ± 5.0 ^{ab}
	11	62.5 ± 3.1 ^a	64.9 ± 2.4 ^{ab}	72.6 ± 2.9 ^a
MF	2	11.4 ± 2.2 ^{fg}	27.2 ± 5.3 ^{ef}	43.4 ± 2.9 ^b
	5	21.4 ± 3.1 ^{defg}	34.9 ± 4.3 ^{ef}	54.6 ± 2.4 ^{ab}
	8	44.6 ± 4.3 ^{bc}	56.4 ± 4.9 ^{bcd}	54.2 ± 4.2 ^b
	11	46.8 ± 3.6 ^b	58.7 ± 4.5 ^{abcd}	59.3 ± 3.9 ^{ab}

*DMSO: Dimethylsulfoxide; DMA: dimethylacetamide; DMF: dimethylformamide; MF: methylformamide

^{a-g}Means ± SEM having distinct superscripts differ in the column by at least P < 0.001

Tabela 3: Post-thaw sperm viability, DNA integrity, and mitochondrial function, for all cryoprotectants and concentrations with *Collossoma macropomum* sperm

Cryoprotectant *	Concentration (%)	Sperm viability (%)	DNA integrity (%)	Mitochondrial functionality (%)
Glycerol	5	15.6 ± 3.2 ^c	31.1 ± 4.1 ^c	37.3 ± 6.8 ^{cd}
DMSO	10	23.0 ± 5.2 ^{bc}	43.3 ± 3.0 ^{bc}	35.7 ± 3.7 ^{cd}
DMA	2	24.1 ± 4.2 ^{bc}	53.8 ± 6.6 ^{abc}	44.9 ± 4.4 ^{abcd}
	5	35.9 ± 5.9 ^{abc}	50.3 ± 5.1 ^{abc}	51.4 ± 3.2 ^{abc}
	8	34.5 ± 6.7 ^{abc}	59.5 ± 5.7 ^{ab}	55.7 ± 3.5 ^{abc}
	11	38.0 ± 5.8 ^{abc}	57.8 ± 5.1 ^{ab}	42.0 ± 5.2 ^{bcd}
DMF	2	31.1 ± 6.3 ^{abc}	62.4 ± 4.7 ^{ab}	46.3 ± 5.4 ^{abcd}
	5	32.5 ± 5.4 ^{abc}	64.6 ± 3.0 ^{ab}	62.4 ± 5.1 ^{ab}
	8	52.9 ± 5.4 ^a	73.1 ± 4.2 ^a	66.4 ± 3.0 ^a
	11	50.6 ± 6.6 ^a	53.8 ± 6.0 ^{abc}	63.4 ± 4.9 ^{ab}
MF	2	16.1 ± 4.2 ^c	54.4 ± 6.7 ^{abc}	27.3 ± 5.2 ^d
	5	21.7 ± 3.0 ^{bc}	57.6 ± 5.4 ^{ab}	54.9 ± 5.5 ^{abc}
	8	32.1 ± 4.9 ^{abc}	63.0 ± 5.0 ^{ab}	49.7 ± 4.6 ^{abcd}
	11	44.6 ± 5.4 ^{ab}	30.4 ± 5.9 ^c	62.2 ± 4.8 ^{ab}

*DMSO: Dimethylsulfoxide; DMA: dimethylacetamide; DMF: dimethylformamide; MF: methylformamide

^{a-g}Means ± SEM having distinct superscripts differ in the column by at least P < 0.001

Table 4: Correlation among parameters of post-thaw quality for *Colossoma macropomum* sperm

Parameter	Fertilization rate	Hatching rate	Sperm motility	Motility Period	Sperm viability	DNA integrity	Mitochondrial functionality
Hatching rate	0.87*						
Sperm motility	0.42*	0.49*					
Motility period	0.41*	0.47*	0.83*				
Sperm viability	0.09	0.19*	0.54*	0.51*			
DNA integrity	0.27*	0.22*	0.26*	0.29*	0.33*		
Mitochondrial functionality	0.26*	0.34*	0.52*	0.50*	0.38*	0.20*	
Sperm integrity	0.09	0.07	0.26*	0.18*	0.11	0.02	0.20*

Pearson's correlation coefficients are statistically significant by at least $P < 0.01$

