

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DOS GAMETAS DE
TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*) AO LONGO DA
ESTAÇÃO REPRODUTIVA**

Autor: Juliana Minardi Galo
Orientador: Ricardo Pereira Ribeiro
Coorientador: Danilo Pedro Streit Jr.

MARINGÁ
Estado do Paraná
Janeiro – 2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DOS GAMETAS DE
TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*) AO LONGO DA
ESTAÇÃO REPRODUTIVA**

Autor: Juliana Minardi Galo
Orientador: Ricardo Pereira Ribeiro
Coorientador: Danilo Pedro Streit Jr.

“Tese apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR EM ZOOTENIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá – Área de concentração Produção Animal”.

MARINGÁ
Estado do Paraná
Janeiro – 2013

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

G178a Galo, Juliana Minardi
Avaliação da qualidade dos gametas de
tambaqui (*Colossoma macropomum*) ao longo da estação
reprodutiva/ Juliana Minardi Galo. - Maringá, 2013.
89 f., il., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro.
Tese (doutorado em Zootecnia) - Universidade
Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias,
Programa de Pós-graduação em Zootecnia, 2013.

1. Characidae. 2. Oócitos. 3. Parâmetros seminais.
4. Período reprodutivo. 5. Plasma seminal. I. Ribeiro,
Ricardo Pereira, orient. II. Streit Junior, Danilo
Pedro, co-orient III. Universidade Estadual de
Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-
graduação em Zootecnia. III. Título.

CDD 22. ED. 639.311

JLM-000739



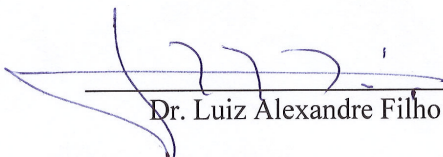
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DOS GAMETAS DE
TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*) AO LONGO
DA ESTAÇÃO REPRODUTIVA**

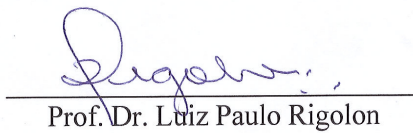
Autora: Juliana Minardi Galo
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro

TITULAÇÃO: Doutora em Zootecnia - Área de Concentração Produção
Animal

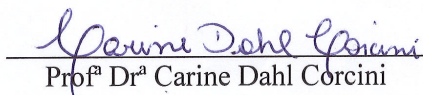
APROVADA em 30 de janeiro de 2013.



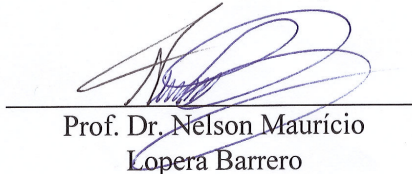
Dr. Luiz Alexandre Filho



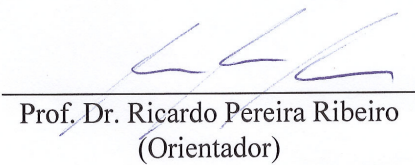
Prof. Dr. Luiz Paulo Rigolon



Profª Drª Carine Dahl Corcini



Prof. Dr. Nelson Mauricio
Lopera Barrero



Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro
(Orientador)

“Talvez meio caminho andado seja a gente acreditar no que faz. Mas acima de tudo, o que mais nos valoriza e também mais nos torna conscientes de nossa responsabilidade, é saber que os outros creem em nós. E não há palavras que descrevam o que sentimos ao saber dos sacrifícios a que eles se impõem por crerem não apenas em nós, mas também no que cremos.”

Albert Einstein

Aos meus pais

Antonio Galo e Mirian G. Minardi Galo,

Pelo apoio e amor incondicional,

e por sempre acreditarem na minha vitória

À minha irmã

Fernanda Minardi Galo,

Pela amizade, ajuda e apoio

Ao Pláudio Fabrício da Cruz Roma,

Pelo amor, paciência, ajuda e incentivo constantes

Ofereço e Dedico

"Toda vitória é alcançada com luta e sofrimento. Porém, a luta passa. O sofrimento é apenas temporário, mas a vitória que se consegue é para sempre"

Ao Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro

Ao Prof. Dr. Danilo R. Streit Jr.

Pela dedicação e ensinamentos transmitidos com segurança, essenciais ao bom desenvolvimento deste trabalho, e pelas experiências acadêmico-científicas que, certamente, serão de grande valia em minha carreira. Agradeço a confiança em mim depositada, a atenção e compreensão.

Minha Homenagem

AGRADECIMENTOS

A *Deus*, pelo dom da vida e da sabedoria, e que me iluminou durante esta jornada;

Agradeço em especial à minha *família*, pelo amor, acolhimento, torcida e incentivo em todos os momentos;

À *Universidade Estadual de Maringá* e ao curso de Pós-graduação em Zootecnia, que permitiram a realização de mais uma etapa da minha formação;

Ao Prof. Dr. *Ricardo Pereira Ribeiro*, pelo exemplo profissional de competência, determinação e honestidade. Pela orientação constante, por todos esses anos de convivência, paciência, amizade e compreensão;

Ao Prof. Dr. *Danilo Pedro Streit Jr.*, pela coorientação, pela grande amizade construída, e não somente pelos ensinamentos científicos, mas pelos conselhos e cumplicidade nesses 9 anos de convivência;

Ao Prof. Dr. *Carlos A. Lopes de Oliveira*, por realizar as análises estatísticas desse trabalho com toda competência e boa vontade.

A Prof. Dra. *Carine Corcini* e Prof. Dr. *Antonio Sérgio Varela Jr.*, e todos os seus estagiários, pela ideia para realização do experimento e por me auxiliarem e ajudarem nas realizações das análises em laboratório e estatísticas.

Aos professores do curso de Pós-graduação em Zootecnia, que muito contribuíram na transmissão do conhecimento e aos que aceitaram a participar da minha banca de qualificação e defesa;

Aos grandes amigos da Piscigranja “Boa Esperança”, *Simone Yokoyama, Érica Yokoyama, Luci, Marcelo Yokoyama*, e principalmente ao *Sr. Pedrinho (Megumi Yokoyama)*, pela amizade, cooperação, incentivo, e ensinamentos durante os experimentos e todos estes anos em Pimenta Bueno-RO.

Agradeço aos meus amigos *Darci Carlos Fornari, Nelson Lopera-Barrero e Jayme Povh*, pela amizade, companheirismo e força no decorrer deste trabalho;

Agradeço a minha amiga, *Daniele Menezes de Albuquerque*, pela amizade, descontração e por me salvar nas análises estatísticas, além de me ajudar na compreensão das mesmas;

Agradeço a minha amiga, *Valéria Crisóstomo*, pela amizade, força, auxílio e companheirismo nos momentos difíceis na condução deste experimento;

Agradeço a minha amiga, *Melanie Digmayer*, pela amizade e auxílio constantes em todos momentos que não pude estar presente em Maringá;

Aos meus queridos amigos: *Diego Oliveira, Ligia Uribe, Luis J. Guerreiro, Maria Del Pilar, Raycon Garcia, Raquel Mesquita*, e tantos outros que me auxiliaram, agradeço pela força, amizade, disposição e colaboração;

Aos meus grandes amigos “EQUIPE FOREVER”: *Erlan Fonseca de Souza, Vanuza Siqueira, Marcel Eméric, Paulo Moraes, Walquiria Lagares, Antonio Cícero Junior, Aline Moraes, Alyne de Fátima, Gina R. Paredes* e a todos colegas do Instituto Federal de Rondônia, que me acolheram e ajudaram, agradeço pelo incentivo, amizade, descontração, compreensão e por acreditarem em mim;

Aos funcionários da piscicultura “*Boa Esperança*”, além de todos os estagiários pelo auxílio durante a realização dos experimentos;

A todos os membros do grupo PEIXEGEN e *Aquam*;

A todos os colegas do curso de Pós-graduação;

A todos os colegas que conheci durante esta minha jornada do doutorado, aos amigos de Rondônia, Mato Grosso, Paraná e Rio Grande do Sul, que de uma forma ou outra, contribuíram para eu chegar até aqui;

À técnica do Laboratório de Reprodução Animal Zeni, pela amizade, auxílio e carinho;

À CAPES pela bolsa de estudo;

Aos *animais* utilizados na realização dos experimentos;

A todos os amigos e colegas não mencionados que de alguma forma colaboraram durante este trabalho, e aqueles que estiveram presentes através de um abraço apertado, um cafezinho, uma boa risada, uma palavra ou um olhar amigo, meus eternos agradecimentos!

Obrigada por todo apoio e por terem vibrado a cada conquista!

BIOGRAFIA

JULIANA MINARDI GALO, filha de Antonio Galo e Mirian Gritts Minardi Galo. Nasceu na cidade de Maringá, Estado do Paraná, aos 26 dias do mês de julho de 1983.

Em fevereiro de 2007, concluiu o curso de Zootecnia pela Universidade Estadual de Maringá.

Em março de 2007, ingressou no Programa de Pós-graduação em Zootecnia, em nível de mestrado, área de concentração Produção Animal, na Universidade Estadual de Maringá, realizando estudos na área de Piscicultura.

No dia 15 de abril de 2009, submeteu-se à banca para defesa da Dissertação.

Em março de 2009, ingressou no Programa de Pós-graduação em Zootecnia, em nível de doutorado, área de concentração Produção Animal – Piscicultura, na Universidade Estadual de Maringá.

No dia 30 de janeiro de 2013, submeteu-se à banca para defesa da Tese de doutorado.

ÍNDICE

	Página
TABELAS DO APÊNDICE.....	xii
FIGURAS DO APÊNDICE.....	xiii
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvii
CAPÍTULO I.....	1
1. Introdução Geral.....	2
2. Revisão da Literatura.....	3
2.1) Situação atual da aquicultura.....	3
2.2) Espécie: Tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>) (Cuvier, 1818).....	3
2.3) Desempenho e produção de gametas no período reprodutivo.....	5
2.3.1) Fatores abióticos que influenciam a qualidade dos gametas em peixes.....	6
2.4) Banco de germoplasma.....	7
2.4.1) Criopreservação de sêmen.....	7
2.4.1.1) Diluidores e crioprotetores.....	9
2.4.1.2) Dimetilsulfóxido (DMSO).....	11
2.4.1.3) Metanol.....	11
2.5) Metodologias utilizadas para a validação de resultados	11

2.5.1) Motilidade, concentração e morfologia espermática.....	11
2.5.2) Integridade da membrana plasmática e DNA.....	11
2.5.3) Potencial Mitocondrial.....	12
2.5.4) Proteínas do plasma seminal.....	14
3. Literatura Citada.....	17
OBJETIVOS GERAIS.....	27
CAPÍTULO II	
Avaliação espermática de tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>) ao longo da estação reprodutiva.....	28
RESUMO.....	29
ABSTRACT.....	29
Introdução.....	30
Material e Métodos.....	31
Resultados.....	34
Discussão.....	39
Conclusão.....	44
Agradecimentos.....	44
Referências.....	44
CAPÍTULO III	
Qualidade ovocitária de tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>) ao longo da estação reprodutiva.....	49
RESUMO.....	50
ABSTRACT.....	50
Introdução.....	51
Material e Métodos.....	52

Resultados.....	55
Discussão.....	57
Conclusão.....	60
Agradecimentos.....	60
Referências.....	60
CAPÍTULO IV	
Avaliação do perfil proteico do plasma seminal com a qualidade do sêmen de <i>Colossoma macropomum</i> congelado.....	64
RESUMO.....	65
ABSTRACT.....	66
Introdução.....	67
Material e Métodos.....	69
Resultados.....	75
Discussão.....	80
Conclusão.....	85
Referências.....	85
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	89

TABELAS DO APÊNDICE

	Página
CAPÍTULO II	
Tabela 1 Média e desvio padrão dos parâmetros quali-quantitativos do sêmen de <i>Colossoma macropomum</i> durante a estação reprodutiva de 2009-2010.....	35
CAPÍTULO III	
Tabela 1 Parâmetros qualitativos dos oócitos de <i>Colossoma macropomum</i> durante o período reprodutivo de 2010/2011.....	56
CAPÍTULO IV	
Tabela 1 Média, erro padrão, valor mínimo e máximo dos parâmetros seminais do <i>Colossoma macropomum</i> “in natura” e criopreservado com DMSO 8%.....	75
Tabela 2 Interação da presença ou ausência das proteínas encontradas no plasma seminal corridas em gel de poliacrilamida 8% sobre os parâmetros espermáticos do <i>Colossoma macropomum</i> congelado com DMSO.....	77
Tabela 3 Interação da presença ou ausência das proteínas encontradas no plasma seminal corridas em gel de poliacrilamida 15% sobre os parâmetros espermáticos do <i>Colossoma macropomum</i> congelado com DMSO.....	78
Tabela 4 Distribuição de frequência das bandas proteicas detectadas através de SDS-PAGE, no plasma seminal de <i>Colossoma macropomum</i>	80

FIGURAS DO APÊNDICE

	Página
 CAPÍTULO II	
Figura 1	35
<p>Variação mensal da média da temperatura do ar (°C) e precipitação (mm) da cidade de Pimenta Bueno – Rondônia (Fonte: http://www.agritempo.gov.br/agroclima/pesquisaWeb).....</p>	
Figura 2	36
<p>Comportamento dos parâmetros espermáticos de <i>Colossoma macropomum</i> ao longo da estação reprodutiva. A- Motilidade progressiva; B- Probabilidade de espermatozoides normais; C- Probabilidade de anormalidades primárias e secundárias. Período (1) – início de novembro (09/11); (2) – final de novembro (25/11); (3) – meados de dezembro (14/12); (4) – início de janeiro (03/01), e (5) – final de janeiro (22/01).....</p>	
Figura 3	37
<p>Ilustrações de morfologias obtidas por microscopia eletrônica de varredura de espermatozoides de <i>Colossoma macropomum</i> ao longo da estação reprodutiva. (A) normal; (B) cauda enrolada na parte final; (C) cauda dobrada; (D) cauda dobrada na parte final; (E) cauda quebrada; (F) cauda e cabeça solta.....</p>	
Figura 4	38
<p>Comportamento da taxa de fertilização, eclosão (A) e morfologia das larvas (B) no sêmen de <i>Colossoma macropomum</i> ao longo da estação reprodutiva. Período (1) – início de novembro (09/11); (2) – final de novembro (25/11); (3) – meados de dezembro (14/12); (4) – início de janeiro (03/01), e (5) – final de janeiro (22/01).....</p>	
Figura 5	39
<p>Índice de correlação entre a taxa de fertilização e eclosão dos oócitos fertilizados com sêmen de <i>Colossoma macropomum</i> ao longo da estação reprodutiva.....</p>	
Figura 6	39
<p>Representação hipotética, a partir dos resultados obtidos, na variação das características quali-quantitativas do sêmen de <i>Colossoma macropomum</i> durante o período reprodutivo da espécie de 2009/2012. Período (1) – início de novembro (09/11); (2) – final de novembro (25/11); (3) – meados de dezembro (14/12); (4) – início de janeiro (03/01), e (5) – final de janeiro (22/01). Adaptado de</p>	

Babiak et al. (2006) com os dados para <i>C. macropomum</i>	40
---	----

CAPÍTULO III

Figura 1	Varição mensal da temperatura média do ar e da precipitação no local do experimento de março de 2010 a março de 2011 (Fonte: http://www.agritempo.gov.br/agroclima/pesquisaWeb).....	55
Figura 2	Correlações observadas entre o período reprodutivo (coleta), o peso das fêmeas (g) e o peso de oócitos liberados (g).....	57

CAPÍTULO IV

Figura 1	Eletroforese de gel de poliacrilamida (8% SDS-PAGE corado com Coomassie blue) de plasma seminal de <i>Colossoma macropomum</i> mostrando 9 bandas (com peso molecular de 12 a 100 kDa).....	76
Figura 2	Ilustrações de morfologias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão de espermatozoides de <i>Colossoma macropomum</i> . (A) e (E) membrana rompida na peça intermediária; (B) e (C) membrana da cabeça íntegra; (D) membranas rompidas na cabeça e na peça intermediária; (F) mitocôndria íntegra.....	83

RESUMO

O objetivo, neste trabalho, foi analisar o comportamento reprodutivo da espécie *Colossoma macropomum*, quanto à qualidade de seus gametas masculinos e femininos ao longo da estação reprodutiva, a fim de determinar a melhor época para realizar a reprodução. Além disso, foi analisada a interação entre a presença de proteínas do plasma seminal do *C. macropomum* como indicadores de qualidade seminal pós-descongelamento. O experimento foi executado em Pimenta Bueno-Rondônia, na estação reprodutiva de novembro de 2009 a janeiro de 2010, e de novembro de 2010 a março de 2011. Utilizaram 27 machos de *C. macropomum* durante a estação reprodutiva de 2009-2010, e 36 fêmeas na estação de 2010-2011. Os gametas masculinos foram coletados para as análises quali-quantitativas ao longo da estação reprodutiva, a cada 15 ± 5 dias, igualmente ocorrido com a coleta dos gametas femininos, sendo classificado como: período (1) – início de novembro (09/11); (2) – final de novembro (25/11); (3) – meados de dezembro (14/12); (4) – início de janeiro (03/01), e (5) – final de janeiro (22/01); (6) – início de fevereiro (07/02); (7) – final de fevereiro (23/02); (8) – início de março (10/03) e (9) – final de março (28/03). Durante as avaliações da qualidade espermática no período três (meados de dezembro) e quatro (início de janeiro) de 2009/2010, uma alíquota de sêmen de cada animal foi criopreservada, a base de Beltsville Thawing Solution (BTS) com 8% DMSO. Uma amostra de 200 μ L de sêmen de cada animal foi diluída em 800 μ L de BTS, e centrifugada em 800 rpm, e somente o sobrenadante (proteínas) foi criopreservado para posterior análise do perfil proteico do plasma seminal, através da eletroforese unidimensional (SDS-PAGE). Decorridos 15 dias da criopreservação, uma palheta com sêmen criopreservado foi descongelado para análise dos parâmetros quali-quantitativos. Para os parâmetros espermáticos, não foi verificado ($P > 0,05$) efeito de período dentro da estação para volume do sêmen, vigor espermático, tempo de motilidade e concentração espermática. Quando se avaliou a motilidade progressiva entre os períodos de coleta, o efeito ($P < 0,05$) encontrado foi de

comportamento quadrático. Quanto à morfologia espermática do sêmen, verificaram diferenças ($P < 0,05$) na probabilidade de ocorrências de espermatozoides normais, anormalidades primárias e secundárias em função do período de coleta. A taxa de fertilização e eclosão apresentaram efeito significativo ($P < 0,05$) dentro do período. Para os parâmetros qualitativos dos gametas femininos durante a estação 2010-2011, foi verificado efeito ($P < 0,05$) de período (coleta) dentro da estação para peso de oócitos, índice de produtividade e taxa de fertilização ($P < 0,05$). Apesar do período 3 (mês de dezembro) não ter diferenciado ($P > 0,05$) de alguns períodos, foi o período que apresentou os melhores parâmetros estabelecidos para a qualidade dos oócitos. Para a análise do plasma seminal, considerando todas as coletas, o SDS-PAGE identificou 15 bandas proteicas (12, 25, 29, 34, 37, 40, 44, 50, 65, 70, 75, 78, 85, 90 e 100 kDa). Quando se avaliou a interação (presença ou ausência) das proteínas encontradas no plasma seminal, com os parâmetros espermáticos pós-descongelamento, observou-se grande influência da presença das proteínas para a qualidade espermática. A maioria das proteínas encontradas no plasma seminal influenciou ($P < 0,05$) a motilidade progressiva do sêmen congelado com DMSO. Em consequência, observou-se maior taxa de fertilização ($P < 0,05$) com a presença das proteínas 12, 34, 44, 85 e 90 kDa. Em conclusão, os parâmetros qualitativos do sêmen e oócitos de *C. macropomum* apresentaram mudanças durante a estação reprodutiva. As mudanças nos parâmetros qualitativos do sêmen estão associadas aos processos de envelhecimento dos espermatozoides no final da estação reprodutiva, que podem levar a consequente redução das taxas de fertilização e eclosão. Já o peso de oócitos liberados, índice de produtividade e taxa de fertilização, foram observados melhores resultados nos períodos de dezembro e janeiro, indicando melhor época para se realizar a reprodução da espécie. As proteínas do plasma seminal de *C. macropomum* apresentam influência na qualidade espermática pós-descongelamento, assim como podem ser utilizadas como indicadores para a qualidade espermática após descongelamento, principalmente, as proteínas com peso molecular ≤ 50 kDa.

Palavras-chave: characidae, oócitos, parâmetros seminais, período reprodutivo, plasma seminal.

ABSTRACT

The objective, in this work, was to analyze the reproductive behavior of the *Colossoma macropomum* specie, on quality of its male and female gametes throughout along the reproductive station, in order to determine the best time to accomplish the reproduction. Besides, it was analyzed the interaction among the presence of proteins of the seminal plasma of the *C. macropomum* as an indicators of seminal quality post-thawing. The experiment was carried out in Pimenta Bueno-Rondônia, in the reproductive station of November of 2009 to January of 2010, and November of 2010 to March of 2011. 23 males of *C. macropomum* were used during the reproductive station of 2009-2010, and 36 females in the station of 2010-2011. The male gametes were collected for the quali-quantitative analyses along the reproductive station, every 15 ± 5 days, the same happened with the collection of the feminine gametes, being classified as: period (1) - beginning of November (11/09); (2) - final of November (11/25); (3) - middle of December (12/14); (4) - beginning of January (01/03), and (5) - final of January (01/22); (6) - beginning of February (02/07); (7) - final of February (02/23); (8) - beginning of March (03/10) and (9) - final of March (03/28). During the evaluations of the spermatic quality in the periods three (middle of December) and four (beginning of January) from 2009/2010, an aliquot of semen of each animal was cryopreserved, using Beltsville Thawing Solution (BTS) with 8% DMSO. A sample of 200 μL of semen of each animal, was diluted in 800 μL of BTS, and centrifuged in 800 rpm, and only the supernatant (proteins) was cryopreserved to subsequent analysis of the protein outline of the seminal plasma, through the unidimensional electrophoresis (SDS-PAGE). After 15 days the cryopreservation, a "pallet" with cryopreserved semen was thawed for analysis of the quali-quantitative parameters. For the sperm parameters, it was not verified ($P>0.05$) period effect inside station for semen volume, spermatic vigor, time motility and spermatic concentration. When the progressive motility was evaluated among the collection periods, the effect ($P <0.05$) found was of quadratic behavior. About the

sperm morphology significant differences were verified ($P < 0.05$) in the probability of occurrences of normal sperms, primary and secondary abnormalities in function of the collection period. The fertilization rate and hatching presented significant effect ($P < 0.05$) inside the period. For the qualitative parameters of the female gametes during the season 2010-2011, it was verified ($P < 0.05$) period effect (it collects) inside the season for amount of oocytes, productive index and fertilization rate ($P < 0.05$). In spite of the period 3 (collection - month of December) had not differentiated ($P > 0.05$) from some periods, it was the period that presented the best established parameters for the oocytes' quality. For the analysis of the seminal plasma, considering all the collections, SDS-PAGE identified 15 protein bands (12, 25, 29, 34, 37, 40, 44, 50, 65, 70, 75, 78, 85, 90 and 100 kDa). When the interaction was evaluated (presence or absence) of the proteins found in the seminal plasma, with the sperm parameters post-thawing, great influence of the presence of the proteins was observed for sperm quality. Most of the proteins found in the seminal plasma influenced ($P < 0.05$) the progressive motility of the frozen semen with DMSO. In consequence, a larger fertilization rate was observed ($P < 0.05$) with the presence of the proteins 12, 34, 44, 85 and 90 kDa. In conclusion, the qualitative parameters of the semen and oocytes of *C. macropomum* presented changes during the reproductive station. The changes in the qualitative parameters of the semen can be associated to the aging processes of the sperms in the end of the reproductive station that can take a consequent reduction of the fertilization rates and hatching. The weight of liberated oocytes, production index and fertilization rate, had better results observed in the periods of December and January, indicating a better time to place the species reproduction. The proteins of the seminal plasma of *C. macropomum* influence the sperm quality post-thawing, as well as they can be used as indicators for the sperm quality post-thawing, mainly the proteins with molecular weight ≤ 50 kDa.

Key words: characidae, oocytes, seminal parameters, reproductive season, seminal plasma.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

1. Introdução Geral

O uso de gametas de alta qualidade de peixes é de grande importância para assegurar a produção de descendentes para aquicultura (Bromage & Roberts, 1995). Segundo Bobe & Labbé (2010) a qualidade de oócitos em peixes, pode ser definida como a capacidade de serem fertilizados e conseqüentemente desenvolver um embrião normal. De maneira semelhante, a qualidade espermática pode ser definida como sua habilidade para fertilizar um ovócito e subseqüentemente permitir o desenvolvimento de um embrião normal. Em condições selvagens ou até mesmo na criação em cativeiro, a qualidade dos gametas de peixes podem ser altamente variável e influenciada significativamente por inúmeros fatores externos e manejo dos reprodutores, além de possuir uma variação conforme o período da estação reprodutiva (Bobe & Labbé, 2010).

Em cultivo comercial, o sêmen é frequentemente inadequado em termos de qualidade e quantidade e nem sempre tem apresentado sucesso na fertilização e no processo de inseminação artificial comumente utilizado nas espécies aquáticas (Rurangwa et al., 2004). Existem poucos estudos que informe sobre o desempenho reprodutivo, produção de oócitos e sêmen durante a estação reprodutiva, além da qualidade dos gametas de peixes em cativeiro (Murgas et al., 1999; Streit Jr. et al., 2008). A qualidade dos oócitos e produção de larvas em cativeiro são considerados um fator limitante e de muita importância na produção de larvas (Kjorsvik et al., 1990) e conseqüentemente, no desenvolvimento aquícola Assim como a qualidade do sêmen é igualmente importante, podendo afetar o sucesso da fertilização e produção de ovos viáveis (Bromage, 1995).

Trabalhos relatam assíncronia entre os sexos, enquanto as fêmeas ainda estão produzindo oócitos de boa qualidade, o mesmo não ocorre com o sêmen que declina severamente com o final da estação reprodutiva (Babiak et al., 2006). Um protocolo seguro de armazenamento de sêmen (criopreservação) poderia reduzir o problema da baixa qualidade no final da estação, pela disponibilidade deste material com qualidade. Além disso, o estabelecimento de uma rotina poderia facilitar outros aspectos no manejo dos reprodutores. A frequente extrusão do sêmen para fertilizar os grupos de oócitos, pode reduzir consideravelmente a mão de obra, tempo, custo com grandes estoques de reprodutores inviabilizados, e reduzir o risco de injúrias nos reprodutores durante a coleta do sêmen.

Dentre os grupos de espécies cultivadas no Brasil, os Characiformes apresentam destaque, pela textura e sabor de sua carne e ao bom rendimento de carcaça. O cultivo de tambaqui, *Colossoma macropomum* (Characiformes, Characidae), vem crescendo rapidamente, principalmente na região norte do Brasil, em função da sua rusticidade, do seu aparente potencial de crescimento, e de sua resistência a baixas condições de oxigênio (Val & Almeida-Val, 1995; Baldisserotto & Gomes, 2005).

2. Revisão de Literatura

2.1. Situação atual da aquicultura

A aquicultura representa hoje a única alternativa para o aumento da produção de pescados, tendo apresentado um desenvolvimento crescente nos últimos anos. Segundo dados da FAO (2011), em 2011 a produção mundial da aquicultura (sem plantas aquáticas) foi superior a 55 milhões de toneladas. Já no Brasil, em 2010 a produção da aquicultura brasileira foi superior a 479 mil toneladas, a aquicultura continental representou 82,3% deste total. As regiões brasileiras mais representativas na produção em águas continentais foram o sul (133.425 ton), nordeste (78.579 ton), sudeste (70.915 ton) e centro-oeste (69.840 ton), ficando a região norte em quinto lugar com 41.581 toneladas. Das espécies produzidas em 2010 (ambiente continental) destacando a tilápia (*Oreochromis ssp.*) (155.450 ton), carpas diversas (94.579 ton), e em seguida, os peixes redondos, tambaqui (54.313 ton), tambacu (21.621 ton) e o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (21.245 ton) (MPA, 2012). Os peixes redondos somam um total de 97.179 toneladas, representando 24,6% da produção total da aquicultura continental do Brasil (MPA, 2012).

Com o avanço da piscicultura no Brasil, a partir da década de 1980 começaram a surgir novas técnicas de criação e também alternativas quanto às espécies de peixes nativos criadas, como o *C. macropomum* e o *P. mesopotamicus* (Martins et al., 2002). Analisando a situação das perspectivas da produção comercial de pescado no Brasil, destaca-se o potencial do país em se tornar um importante fornecedor mundial de pescado de água doce, a partir da criação de espécies nativas (Fonseca & Silva, 2004).

2.2. Espécie: Tambaqui (*Colossoma macropomum*) (Cuvier, 1818)

O *C. macropomum* pertence à ordem Characiformes, família Characidae e subfamília Serrasalminae, sendo considerado o segundo maior peixe de escama da América do Sul, chegando a atingir 90 cm e 30 Kg (Lopera-Barrero et al. 2011). Esta

espécie ocorre naturalmente nas bacias dos rios Amazonas, Solimões e Orinoco, amplamente distribuído na parte da América do Sul e na Amazônia Central, que é conhecido como cachama negra (Colômbia e Venezuela) e gamitana (Peru). No Rio Amazonas, a espécie é comumente encontrado da foz do rio Xingu, no Estado do Pará, até o médio rio Ucaiali, no Peru (Araujo-Lima & Gomes, 2005).

No Brasil, o *C. macropomum* é a espécie endêmica mais produzida (MPA, 2012), sendo muito apreciado por seu sabor e considerado como importante fonte de proteína animal, principalmente pelas comunidades tradicionais da Amazônia, que é explorado desde o século XIX (Menezes et al., 2008). Hoje o *C. macropomum* é a principal espécie de importância comercial da Amazônia, sendo uma das criações mais presentes em todo o Brasil, 24 estados dos 27 existentes, em que o Estado do Amazonas é o principal produtor. Segundo o Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura do Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA, 2012), a produção de *C. macropomum* se elevou, de 31.000 toneladas em 2007, para mais de 54.313 toneladas em 2010. Devido a estes fatores, a Embrapa iniciou, em 2008, o programa de melhoramento genético de espécies aquática no Projeto Aquabrazil, que escolheu o *C. macropomum* como uma das espécies a estudar, por representar grande potencial de desenvolvimento.

A primeira maturação sexual no *C. macropomum* ocorre com cerca de 60 cm comprimento padrão e aproximadamente dois anos idade. Seu período reprodutivo se estende de setembro a fevereiro, sendo uma espécie de água tropical de desova total e com movimento reprodutivo migratório, espécie de piracema. Em cativeiro só se reproduz com indução hormonal, e com elevada prolificidade (Castagnolli, 1992). A reprodução induzida vem sendo estudada com inúmeros relatos sobre o uso de diferentes indutores hormonais. A literatura descreve o uso de produtos naturais, como extrato de hipófise e hCG (Gonadotrofina coriônica humana), e substâncias sintéticas, como os análogos do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH ou LH-RH) e de antagonistas do hormônio bloqueador de gonadotrofinas (dopamina) (Araujo-Lima & Gomes, 2005). O extrato de hipófise é o indutor reprodutivo mais usado em *C. macropomum*. Porém, é usando intensamente o Ovopel® que é análogo de hormônio liberador de gonadotrofina (mGnRH_a e sGnRH_a) associado a bloqueador de receptor da dopamina. No trabalho de Zaniboni Filho & Weingartner (2007), foi comparado o custo de indução hormonal reprodutivo do Ovopel® e do extrato de hipófise, e levou a conclusão ser o primeiro o indutor reprodutivo mais econômico.

A área de vida do *C. macropomum* é caracterizada por águas ricas em nutrientes com temperaturas médias entre 25 e 34°C e abundâncias de áreas alagáveis. A espécie é capaz de resistir a baixas concentrações de oxigênio dissolvido na água, aproximadamente 1 mg/L, que são características do seu habitat (Val & Almeida-Val, 1995). Segundo Reis Neto (2007) os resultados na criação em sistema-intensivo são satisfatórios quando divididas nas fases de recria (60 dias) e engorda (240-300 dias) com ração comercial de 34 a 28% de proteína, respectivamente.

2.3. *Desempenho e produção de gametas no período reprodutivo*

A qualidade dos oócitos em cativeiro é considerada fator limitante e muito importante na produção de larvas (Kjorsvik et al., 1990) e conseqüentemente, no desenvolvimento aquícola. A qualidade do sêmen é igualmente importante, podendo afetar o sucesso da fertilização e produção de ovos viáveis (Bromage, 1995). De todo modo, mudanças podem ocorrer nas características de qualidade do sêmen durante o período reprodutivo (Fauvel et al., 1999) e o “stress” ou estresse ocasionado em peixes no cativeiro podem ocasionar efeito negativo na função reprodutiva e qualidade dos gametas (Papadaki et al., 2008).

Avaliando o sêmen de *Hippoglossus hippoglossus* e *Mastacembelus mastacembelus* ao longo do período reprodutivo, Babiak et al. (2006) e Sahinoz et al., (2007), relataram que houve perda de qualidade no final da estação. As alterações resultam na redução da capacidade de fertilização, sendo observado um aumento da concentração espermática, correlacionada negativamente com a perda de motilidade progressiva (Babiak et al., 2006). Além disto, os autores observaram deterioração morfológica do espermatozoide, incluindo a peça intermediária, no final da estação reprodutiva.

Assim como a qualidade dos oócitos é considerada, como potencialmente futuras larvas viáveis (Kjorsvik et al., 1990) os mesmos, dependem de vários fatores e que frequentemente podem mudar durante o ciclo reprodutivo. Aspectos como o estado endócrino das fêmeas durante a ovogênese, quantidade e qualidade da ração fornecida, parâmetros físico-químicos da água, manejo dos reprodutores (stress) e outros, são relacionados por Bromage (1995) como determinantes para o sucesso na produção de larvas viáveis.

Chambers & Waiwood (1996), estudando *Gadus mohua*, relataram que houve redução do tamanho dos oócitos no período reprodutivo e este fato estaria relacionando a redução da oferta de alimentação dos reprodutores durante o período reprodutivo e subsequente redução da nutrição maternal. Na época de reprodução, os oócitos atingem um tamanho crítico específico para as espécies (Romagosa et al., 1988), sendo que o tamanho da larva, após a absorção do saco vitelino esta correlacionada ao tamanho do óvulo.

O “stress” ocasionado em peixes em cativeiro pode ter resultados negativos na função reprodutiva e qualidade dos gametas femininos e masculinos (Schreck et al., 2001). Então, é de extrema importância que para cada nova espécie selecionada para a aquicultura seja observado à existência de mudanças sazonais e relacionar com a qualidade dos espermatozoides e oócitos (Mylonas et al., 2003; 2004). Tais informações podem ajudar na organização das instalações comerciais e, se possível, no aperfeiçoando da produção de ovos e alevinos de peixes.

2.3.1. *Fatores abióticos que influenciam a qualidade dos gametas em peixes*

O processo reprodutivo, em peixes, depende da interação de fatores endógenos, como os hormônios e exógenos, tais como temperatura, precipitação, fotoperíodo, nível da coluna d'água, dentre outros. Trabalhos sobre influência de fatores abióticos na fisiologia reprodutiva de peixes indicam que dificilmente um único fator interfere na complexidade do processo reprodutivo (Barbieri et al., 2000).

O papel de fatores ambientais na sincronização dos ciclos reprodutivos, dando ênfase à influência do fotoperíodo e temperatura da água neste processo, foi amplamente discutido por Bye (1984). Segundo este autor, os peixes que vivem fora dos trópicos, apresentam ciclos, de tal forma que larvas e jovens são produzidos quando as condições ambientais são favoráveis a sobrevivência.

Autores como Naumov (1956), Ashan (1966), De Viaming (1975) e Sundararaj & Vasal (1976), consideram temperaturas altas e fotoperíodo longo como fatores responsáveis pela desova de peixes de clima temperado. Para peixes de clima tropical e subtropical, além desses fatores, a precipitação atmosférica parece exercer papel importante nas espécies migradoras e com desova total, a variação do nível do rio está na dependência das chuvas. Segundo Lowe-McConnel (1975), os teleósteos de regiões tropicais e subtropicais possuem estreita relação entre o período reprodutivo e as estações chuvosas. Assim como para Munro (1990) existem evidências de que a

temperatura pode ser utilizada como fonte de informação sobre o advento de condições adequadas de desova.

2.4. Banco de Germoplasma

O objetivo da criopreservação é obter sêmen viável que mantenha sua fertilidade. Os parâmetros qualitativos do sêmen “*in natura*” (motilidade e vigor espermático, tempo de motilidade, morfologia espermática, concentração espermática, dentre outros) que possa ser resfriado ou criopreservado (Billard, 1992; Dreanno et al., 1998; Lee & Donaldson, 2001) juntamente com aplicação correta dos procedimentos de criopreservação (Glogowski et al., 1999) devem ser monitorados de maneira reduzir a perda de qualidade após o descongelamento. Portanto, Rurangwa et al. (2004) sugerem que os espermatozoides tenham qualidade, característica necessária para eficientes fertilizações dos oócitos.

A formação do banco de germoplasma permite o armazenamento do sêmen em nitrogênio líquido a -196°C , mantendo assim, a viabilidade deste por tempo indefinido. Dessa forma, o sêmen pode ser criopreservado para ser utilizado em reproduções futuras, possibilitando reduzir o estoque de machos na piscicultura intensiva, propiciando a exploração mais racional de reprodutores geneticamente selecionados (Felizardo, 2008).

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

2.4.1. Criopreservação de sêmen de peixe

O processo de criopreservação busca redução do metabolismo e a desidratação celular. No entanto, durante esse processo de estabilização (resfriamento) a célula espermática é exposta ao choque térmico, que é definido como um conjunto de alterações que ocorrem nos espermatozoides quando expostos rapidamente a uma

temperatura inferior à fisiológica (Graham, 1996). Como consequências do choque térmico nos espermatozoides ocorrem: perda rápida na motilidade e/ou presença de movimento circular ou retrógrado; danos no metabolismo da célula espermática e nas membranas plasmáticas (Carneiro et al., 2012; Varela Jr., 2011).

Durante o congelamento do sêmen, é importante que haja a remoção da maior parte da água intracelular (Watson, 2000), do contrário, formam-se grandes cristais de gelo intracelulares, entre as temperaturas de -5° a -10°C que podem resultar em severos danos e frequentemente em morte celular. Por outro lado, a desidratação celular extrema também é prejudicial, quando a solução crioprotetora com hiperosmolaridade não está ajustada adequadamente ou quando o tempo de exposição é muito alto.

O processo de resfriamento é responsável pela mudança na estrutura bidimensional dos lipídios componentes da membrana da célula espermática, estando associado a mudanças na sua fluidez (Watson, 1995), reduzindo a longevidade dos espermatozoides após o descongelamento (Buhr et al., 1994; Holt, 2000). A severidade dos efeitos do resfriamento durante o processo de criopreservação depende da sua velocidade e também dos intervalos de temperatura (Watson, 1981).

Para se obter sucesso no processo de congelamento de sêmen, é preciso ter material fresco e de boa qualidade, aliado a uma técnica apropriada de criopreservação. É imprescindível evitar seu contato com a água ou mesmo a urina do peixe durante sua extração, para que não haja ativação (Harvey & Carolsfeld, 1993). Também é indispensável a utilização de soluções diluentes com agentes protetores para que não ocorram injúrias com os espermatozoides durante o congelamento e descongelamento, como o rompimento das estruturas celulares. Para que tenha maior proteção e prolongamento da viabilidade dos espermatozoides faz-se necessário a utilização combinada do diluidor com o crioprotetor. Sem estas é praticamente impossível alcançar algum sucesso na criopreservação seminal. Pois, submeter os espermatozoides a temperaturas abaixo do ponto de congelamento, requer uma solução que não permita que os mesmos iniciem a sua atividade motora, além de não provocar sequelas nos espermatozoides como inchaço de cabeça ou da cauda ou mesmo desidratação (Carneiro, 2007). Logo, as soluções devem conter parâmetros equivalentes como do sêmen, em especial pH e osmolaridade. Em geral, estas soluções crioprotetoras devem conter solutos que permitam manter as células espermáticas protegidas, seja por um “filme externo” de proteção, passando por solutos que substituam a água intracelular, até substâncias que suplementem os espermatozoides com energia. Na prática, o

desenvolvimento de uma solução dessas, para uma determinada espécie de peixe necessita de ensaios para a avaliação dos seus eventuais efeitos tóxicos e sua influência sobre a integridade e funcionalidade espermática (Ohta & Izawa, 1996).

Segundo Hopkins & Evans (1991), a sensibilidade dos espermatozoides quanto as mudanças de temperatura se deve a ação protetora do plasma seminal e a integridade da membrana espermática. Esta última, relaciona-se tanto com sua composição lipídio-proteica como de colesterol e fosfolipídios (Darin-Bennett & White, 1977). Alguns diluentes mantêm a viabilidade do sêmen a temperatura ambiente, enquanto outros se refrigeram entre 4 e 5°C para ajudar a controlar o crescimento bacteriano e reduzir a taxa metabólica das células espermáticas (Hopkins & Evans, 1991).

A criopreservação de sêmen é uma biotécnica, que dentre outras vantagens reduz a quantidade de reprodutores machos que devam ser estocados (Herman et al., 1994), para a produção de alevinos. Outra vantagem atribuída a biotécnica de congelamento de sêmen se refere a montagem e desenvolvimento de um programas de melhoramento genético. Pois, não havendo troca de gametas, poderia ocorrer um processo de consanguinidade dos indivíduos, resultando em baixa variabilidade genética na prole (Hafez, 1995; Bromage, 1995; Honeyfield & Krise, 2000). Outro ponto positivo a ser destacado é o de facilitar o transporte de sêmen para um possível intercâmbio entre pisciculturas comerciais e conservação do material genético das espécies ameaçadas de extinção (Zhang et al., 2003).

2.4.1.1. Diluidores e Crioprotetores

Os diluidores são soluções de sais ou de carboidratos, que ajudam a manter a viabilidade das células em baixas temperaturas (Legendre & Billard, 1980). Para um meio diluente ser completo e eficiente, algumas substâncias são necessárias na sua composição como: lipoproteínas ou material de alto peso molecular que previnem o choque térmico, como a gema de ovo ou leite; glicose ou frutose como fonte de energia; substâncias iônicas e não iônicas que mantêm a osmolaridade; além dos agentes crioprotetores intracelulares.

A solução de criopreservação regularmente utilizada para sêmen de peixes de escamas no Brasil é composta por glicose + gema de ovo + DMSO (Carolsfeld et al., 2003), e glicose + gema de ovo + metanol, para peixes de couro (Carolsfeld et al.,

2003). Neste caso, observa-se dois crioprotetores extracelulares recomendados, glicose e gema de ovo (proteína), e dois intracelulares, DMSO ou metanol.

Outra solução diluidora que passou a ser utilizada e com ótimos resultados a partir dos trabalhos iniciais de Murgas et al. (1999) é o BTS (Beltsville Thawing Solution[®]). Este é um diluidor desenvolvido e preconizado para conservação do sêmen suíno, mas que para peixes são obtidos excelentes resultados (Franciscatto et al., 2002; Miliorini et al., 2002; Murgas et al., 2002; Maria et al., 2004; Miliorini et al., 2004). O BTS possui, em sua fórmula, componentes que, além de nutrirem células espermáticas e proporcionarem um microambiente osmoticamente favorável, protegem a face intracelular da membrana citoplasmática durante o congelamento (Murgas et al., 2007).

Os crioprotetores podem ser classificados como intracelulares (permeáveis) e extracelulares (impermeáveis), de acordo com o peso molecular e a consequente propriedade de atravessar ou não a membrana celular (Seidel, 1984; Rodrigues, 1992). Os extracelulares recobrem a superfície celular e estabilizam a membrana, minimizando e reparando os possíveis danos celulares causados pelo congelamento. Enquanto o intracelular retira a água da célula e reduz a temperatura na qual o interior da célula é congelado, impedindo a formação de cristais de gelo.

Os crioprotetores intracelulares mais utilizados na criopreservação de sêmen animal são: glicerol, etilenoglicol, dimetilsulfóxido (DMSO) e metanol, sendo estes dois últimos mais utilizados em sêmen de peixes. Já os extracelulares, em geral, são moléculas de açúcares, como: glicose, sacarose e frutose, além de outras substâncias como proteína derivada de gema de ovo e leite em pó.

O uso de soluções crioprotetoras com baixo peso molecular é uma estratégia que permite minimizar a toxidez durante a exposição da célula espermática, reduzindo a concentração do crioprotetor utilizado, prevenindo o inchaço osmótico nos espermatozoides. Entre os crioprotetores permeáveis, o metanol (PM: 46,07), etilenoglicol (PM: 62,02), propanodiol (PM: 76,10) e o dimetilformamida (PM: 73,1) possuem peso molecular inferiores quando comparados com o dimetilsulfóxido (PM: 78,13) e glicerol (PM: 92,10) (Baudot et al., 2000). Alternativas de crioproteção também propostas na congelação do sêmen de peixes são o uso das amidas, incluindo a formamida (dimetilformamida - DMF), acetamida (dimetilacetamida - DMA) e lactamida. Estes têm estruturas que promovem ligações de hidrogênio com a molécula da água e estas ligações mudam a orientação da molécula da água nos cristais de gelo,

criando um ambiente celular menos nocivo para as células espermáticas (Dalimata & Graham, 1997).

2.4.1.2. Dimetilsulfóxido (DMSO)

O DMSO é um dos crioprotetores intracelulares com alto peso molecular (PM=78,13). Preserva a integridade de proteínas isoladas e das membranas lipídicas durante o processo de resfriamento e aquecimento (Anchordoguy et al., 1991).

A desvantagem do DMSO é a toxicidade, além da dificuldade de seu emprego, já que apresenta a necessidade de preparo da solução no momento do uso, em função de sua característica higroscópica, prejudicando sua aplicação nos roteiros de criopreservação (Werlich et al., 2006). Outros autores observaram que o DMSO é um dos melhores crioprotetores para espécies de peixes de água doce (Bedore, 1999; Miliorini et al., 2002) e de água salgada (Ritar, 1999). Porém, Bedore (1999) relatou elevada toxicidade para o sêmen de peixes, mas que pode ser suprida pela adição de carboidratos (Leung & Jamielson, 1991).

2.4.1.3. Metanol

Segundo Harvey (1993), o metanol é a substância que mais facilmente permeia a membrana celular, sendo, entretanto, considerada a substância mais tóxica, exceto para o sêmen de tilápia (*Oreochromus niloticus*).

2.5. Metodologias utilizadas para a validação de resultados

2.5.1. Motilidade, concentração e morfologia espermática

Motilidade, concentração e morfologia espermáticas são os parâmetros clássicos na avaliação de amostras de sêmen (fresco, resfriado ou congelado). Usualmente, a motilidade espermática é estimada em análise do sêmen entre lâmina e lamínula, enquanto as anormalidades espermáticas são avaliadas em esfregaços corados. Ambas as técnicas são realizadas sob uso de microscopia óptica (Galo et al., 2011; Arruda et al., 2007).

2.5.2. Integridade de membrana plasmática e DNA

Todos os testes laboratoriais de análise de sêmen buscam a predição da capacidade fertilizante do sêmen (Arruda et al., 2007). Dentre esses exames, a técnica que utiliza sondas fluorescentes é importante por sua característica de marcar estruturas

específicas das células e de detectar integridade estrutural ou funcionalidade de forma clara (Celeghini, 2005).

A avaliação das membranas espermáticas é um indicador importante do sucesso da criopreservação, uma vez que são extremamente sensíveis às crioinjúrias. As inúmeras funções da membrana citoplasmática estão relacionadas ao metabolismo celular e manutenção da motilidade (Peña et al., 2005). A integridade da membrana plasmática garante a manutenção da homeostase celular, atuando como barreira entre o meio interno e externo (Amman & Picket, 1987). Em condições de estresse provocado pela criopreservação, as membranas podem sofrer rearranjos, formando pontos vulneráveis e, com isso, induzir a excessiva permeabilidade ou mesmo rompimento da membrana (Amann & Graham, 1993). Na membrana espermática, esse estresse está relacionado à fase de transição dos lipídeos, alterando o estado funcional da membrana (Holt et al., 1992).

Várias sondas fluorescentes podem ser utilizadas para a avaliação da integridade da membrana plasmática espermática, como o brometo de etídio (Halangk et al., 1984), corantes supravitais Hoechst 33258 (H258), 33342 (H342) (Casey et al., 1993; Maxwell et al., 1997), SYBR-14 (Garner et al., 1999; Thomas et al., 1998) e diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) (Harrison & Vickers, 1990; Peña et al., 1998; Souza, 2001; Valcárcel et al., 1994). Todavia, o iodeto de propídio (PI) se destaca em pesquisas pela sua facilidade de preparação e aplicação da técnica, estabilidade e eficiência na avaliação da integridade da membrana, seja isoladamente ou associada a outro corante fluorescente para avaliar membrana plasmática (Arruda et al., 2007). Esta sonda possui afinidade ao DNA e cora em vermelho o núcleo de células com membrana plasmática lesada (Arruda, 2000; Arruda et al., 2003, Arruda et al., 2007). Outras sondas fluorescentes com especificidade com ácido desoxirribonucleico (DNA) também são usadas para determinar a integridade da membrana plasmática, tais como Hoechst 3358 (H258), Hoechst 33342 (H342) e SYBR- 14 (Coelho et al., 1995; Celleghini et al., 2007).

2.5.3. Potencial Mitocondrial

O conhecimento atual do papel das mitocôndrias nas alterações patológicas está se expandido rapidamente. As disfunções desta organela são responsáveis por uma grande variedade de problemas. Os órgãos ou células envolvidas nestas síndromes são aqueles

que demandam grande quantidade de energia respiratória. Alterações no funcionamento da mitocôndria pode ser um fator relacionado à infertilidade. Ela é chave para a manutenção energética da motilidade espermática, um dos maiores determinantes da fertilidade do macho (Ruiz-Pesini et al., 1998).

A energia necessária para motilidade espermática é promovida pelas mitocôndrias localizadas na peça intermediária (Gravance et al., 2000). Estas produzem energia em forma de adenosina trifosfato (ATP) que é quebrada em moléculas de adenosina trifosfatase, liberando a energia necessária para a movimentação da cauda (Barth & Oko, 1989). Assim, qualquer mudança na função mitocondrial pode ser refletida na alteração da motilidade espermática (Gravance et al., 2000).

A motilidade é o critério mais comum de avaliação da qualidade espermática, mensurando indiretamente a atividade metabólica e apesar de ser um método simples, dependente da experiência do avaliador. O espermatozoide apresenta movimento flagelar na presença de energia derivada da produção de ATP. Medidas diretas da função mitocondrial podem ser alternativas úteis para uma avaliação mais precisa da qualidade espermática (Carreira, 2008).

Sondas fluorescentes, como a Rhodamina 123, MitoTracker Green, MitoTracker Red, MitoTracker Orange, MitoTracker Deep Red e JC-1, podem ser utilizadas para visualização destas organelas. A sonda JC-1 possui baixa toxicidade, boa solubilidade e características fluorescentes apropriadas para detecção por sistema de filtros, comumente usada em microscopia de epifluorescência (Smiley et al., 1991).

A energia liberada durante as reações de oxidação na cadeia respiratória mitocondrial é armazenada como um gradiente eletroquímico que consiste de um potencial elétrico trans-membrana ($\Delta \psi$), negativo dentro de cerca de 180-200 mV, e de um gradiente de próton de uma unidade. Esta energia é capaz de conduzir a síntese de ATP para ser utilizada como combustível nos processos celulares. Cátions lipofílicos membrana-permeáveis, denominados de sondas, acumulam-se em células vivas, organelas e lipossomos exibindo um potencial de membrana negativo e são utilizados para decifrar os mecanismos de regulação e controle da transdução energética. Estas sondas incluem aquelas que apresentam atividade óptica e fluorescente após acumulação em sistemas energizados, sondas radio-coradas e sondas não coradas utilizadas com eletrodos específicos (Cossarizza et al., 1993).

A sonda de iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3' tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1) é utilizada para coloração diferencial de

mitocôndrias com alto ou baixo potencial de membrana (Gravance et al., 2000). A sonda separa duas populações por código de cor, mostrando mitocôndrias com alto potencial de membrana em vermelho e marcando em verde as com baixo potencial (Garner et al., 1999; Celeghini et al., 2005). O uso da sonda JC-1 é mais vantajosa do que as Rodaminas e Carbocianinas, é capaz de se ligar seletivamente à mitocôndria e as mudanças de coloração são reversíveis, do verde ao alaranjado de acordo com o aumento do potencial de membrana acima de valores de 80 a 100 mV. Esta propriedade é reversível pela formação de agregados na membrana polarizada que causam a mudança da emissão de luz de 530 nm (emissão das formas monoméricas de JC-1) para 590 nm (emissão dos J-agregados), quando excitados a 490 nm. Assim, quando a coloração passa de verde para laranja a membrana mitocondrial está mais polarizada (Cossarizza et al., 1993; Gravance et al., 2000; Cossarizza, 2007). Troiano et al., (1998) observaram correlação significativa entre potencial mitocondrial e motilidade, assim como entre potencial mitocondrial e degeneração da cromatina.

Cabe ressaltar que o número de mitocôndrias nos espermatozoides de peixes varia entre as espécies (2 a 9 mitocôndrias por espermatozoide), e se apresentam frequentemente em forma de colar, sendo que esta característica está fortemente relacionada com a duração da motilidade (Yao et al., 1999).

2.5.4. *Proteínas do plasma seminal*

A qualidade do sêmen é determinante para o sucesso do processo reprodutivo, especialmente aquele em que os espermatozoides sofreram alterações físicas pelo resfriamento. Os estudos realizados com sêmen de peixes têm demonstrado variações individuais nos parâmetros, tais como: motilidade espermática e capacidade para fertilizar e ser armazenado. Além disso, os índices espermáticos podem variar entre machos ou mesmo no próprio indivíduo (Rana, 1995). O efeito individual do macho é o fator com maior influência sobre a variação na eficiência do congelamento de sêmen (Roca et al., 2006). Torna-se importante estudar técnicas que identifiquem variações na resposta ao congelamento entre diferentes machos e que permitam desenvolver testes para detectar o seu potencial de congelabilidade.

Nesse contexto, a composição proteica do plasma seminal deve ser considerada como um fator importante a influenciar a fertilidade masculina (Autiero et al., 1991; Strzeýek et al., 2002). Em tilápias (*Oreochromis niloticus*) foi identificado uma glicoproteína no plasma seminal com alto peso molecular (120 kDa) como fator

imobilizante dos espermatozoides (Mochida et al., 1999; Mochida et al., 2002). Algumas dessas proteínas poderão se constituir em marcadores bioquímicos que permitam identificar indivíduos com maior ou menor potencial de fertilidade e congelabilidade do sêmen (Autiero et al., 1991; Strzeýek et al., 2002; Jobim et al., 2004; Zilli et al., 2005; Asadpour et al., 2007).

O sêmen é composto pelo plasma seminal e pelos espermatozoides. Entretanto, a concentração dos componentes do plasma seminal pode variar de indivíduo para indivíduo, dentro de uma espécie. Cabe destacar, que sua função é prover um ótimo ambiente para o armazenamento dos espermatozoides dentro e fora dos testículos (Ciereszko et al., 2000). O plasma seminal, na maioria dos teleósteos, é um produto sintetizado nos testículos e nos ductos espermáticos (Lahnsteiner et al., 1994), considerando que muitas espécies não apresentam glândulas acessórias. Alguns componentes do plasma seminal não são secretados, mas sim podem ser originados de células espermáticas em decomposição (Ciereszko et al., 2000).

O plasma seminal de peixes teleósteos tem grande importância na fisiologia espermática. Sua composição mineral inibe a motilidade espermática dentro dos ductos espermáticos e provêem um meio isotônico e equilibrado para os espermatozoides (Morisawa e Suzuki, 1980; Cosson et al., 1999), além de monossacarídeos e lipídios para recursos energéticos dos espermatozoides. De acordo com Loir et al., (1990), o constituinte orgânico em maior abundância no fluido seminal de peixes teleósteos são as proteínas. Estudos recentes demonstram a importância das proteínas do plasma para os espermatozoides, como em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), em que os espermatozoides foram armazenados em solução salina semelhante a composição do fluido seminal. Ainda, as taxas de motilidade e velocidade natatória, que poderiam ser ativadas, aumentaram quando a solução de armazenamento continha proteínas do plasma seminal, indicando que estas estabilizam e viabilizam os espermatozoides (Lahnsteiner et al., 2004).

Alguns grupos de polipeptídeos podem ser distinguidos no líquido seminal de peixes como as lipoproteínas (Loir et al., 1990), as antiproteínases (Ciereszko et al., 2000) entre outras proteínas ainda não bem descritas. Seis lipoproteínas foram identificadas no plasma seminal de trutas *O. mykiss*. Estas proteínas foram inicialmente identificadas como sendo lipoproteínas de alta densidade (HDL). A importância destas lipoproteínas pode ser associada a interação com a membrana plasmática dos espermatozoides para manter a composição lipídica ideal durante o armazenamento nos

ductos espermáticos (Wojtczak et al., 2005). A atividade de antiproteínases foi descrita no plasma seminal de muitas espécies de peixes teleósteos (Dabrowski & Ciereszko, 1994; Ciereszko et al., 1998, 2000). A principal função das antiproteínases no plasma seminal de peixes está associada à proteção do espermatozoide do ataque proteolítico (Kowalski et al., 2003).

Diversos autores procuraram marcadores bioquímicos para a fertilidade ou infertilidade em machos de várias espécies, pelas técnicas de eletroforese uni ou bi-dimensional, tanto no plasma como na membrana dos espermatozoides (Romito, 2003). Marcadores bioquímicos de plasma seminal são também sugeridos por diversos autores para identificar animais superiores ou inferiores quanto ao seu potencial de fertilidade e diferenciar graus de congelabilidade do sêmen. Alguns autores já correlacionaram as proteínas presentes no plasma seminal com grau de congelabilidade do sêmen de diversas espécies, como búfalos (Dhami et al., 1986), galos (Bentley et al., 1984), bovinos (Pangawkar et al., 1988) e suínos (Corcini, 2008).

Os procedimentos de criopreservação de gametas de peixes causam injúrias irreparáveis a estas células, tornando-as muitas vezes incapazes de desempenhar suas funções. O congelamento pode causar dano tanto em proteínas dos espermatozoides quanto nas proteínas presentes plasma seminal, tornando, muitas vezes, a célula incapaz ou com reduzida capacidade de fertilização (Zilli et al., 2005).

De forma interessante, parâmetros bioquímicos comuns a peixes e mamíferos providenciam evidências para o uso do sêmen de peixes como modelo para pesquisa biomédica (Coward et al., 2002). Em outro caminho, com os avanços nos estudos de proteômica do sêmen de peixes, marcadores bioquímicos de congelabilidade dos espermatozoides podem ser descobertos, fornecendo subsídios para a formação de bancos de germoplasma de espécies em extinção.

Na avaliação das proteínas presentes no plasma seminal (PSP) pela técnica de eletroforese unidimensional, as proteínas são separadas pelo seu ponto isoelétrico, enquanto, na avaliação pela técnica de eletroforese bidimensional, as proteínas são separadas pela sua massa molecular. Portanto, a técnica bidimensional possui a vantagem de separar proteínas em maior quantidade e com uma alta resolução, facilitando a identificação de potenciais marcadores ligados à fertilidade e congelabilidade de sêmen em machos de diferentes espécies, como bovinos (Wolfe et al., 1993; Roncoleta, 1999; Jobim et al., 2004), humanos (Autiero et al., 1991), equinos (Frazer & Bucci, 1996; Brandon et al., 1999) e suínos (Strzeżek et al., 2002).

3. Literatura Citada

- AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. Spermatozoal function. In: McKINNON, A.O.; VOSS, J.L. **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea & Febinger, Cap. 80, p.715-746, 1993.
- AMMAN, R.P.; PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Equine Veterinary Science**, v.7, p.143-173, 1987.
- ANCHORDOGUY, T.J.; CECCHINI, C.A.; CROWE, J.H. Insights into the cryoprotective mechanism of dimethyl sulfoxide for phospholipid bilayers. **Cryobiology**, v.28, p.467-473, 1991.
- ARAUJO-LIMA, C.A.R.M.; GOMES, L.C. Tambaqui (*Colossoma macropomum*) In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L.C. (Eds). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: UFSM, p.67-104, 2005.
- ARRUDA, R.P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozóide eqüino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA)**. 2000. 121f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.
- ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; PERES, K.R. et al. Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do sêmen eqüino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, p.8-16, 2007.
- ARRUDA, R.P.; BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G. et al. Determinação da integridade da membrana plasmática e acrossomo de espermatozoides de garanhões pela técnica de citometria de fluxo. **Acta Science Veterinae**, v.31, p.226-227, 2003.
- ASADPOUR, R.; ALAVI-SHOUSHTARI, S.M.; ASRI REZAILI, S. et al. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of buffalo bulls seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. **Animal Reproduction Science**, v.102, p.308-313, 2007.
- ASHAN, S.N. Cyclical changes in the testicular activity of the Lake Chub, *Clouesius plumbeus* (Agassiz). **Canadian Journal of Zoology**, v.44, p.149-177, 1966.
- AUTIERO, M. SANSONE, G.; ABRESCIA, P. Relative ratios of lactoferrin, albumin, and acid phosphatase seminal levels as sperm quality markers in fertile and infertile men. **Journal of Andrology**, v.12, p.91-200, 1991.
- BABIAK, I.; OTTESEN, O.; RUDOLFSEN, G. et al. Quantitative characteristics of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L., semen throughout the reproductive season. **Theriogenology**, v.65, p.1587-1604, 2006.
- BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L.C. Espécies nativas para piscicultura no Brasil. In: ARAUJO-LIMA, C.A.R. M.; GOMES, L.C. (Eds). **Tambaqui (*Colossoma macropomum*) (Cuvier, 1818)**. Santa Maria: Editora da UFSM. p.175-202, 2005.
- BARBIERI, G.; SALLES, F.A.; CESTAROLLI, M.A. Influência dos fatores abióticos na reprodução do dourado, *Salminus maxillosus* e do curimbatá *Prochilodus lineatus* do Rio Mogi Guaçu (Cachoeira de Emas, Pirassununga/SP). **Acta Limnologica Brasiliensis**, v.12, p.85-91, 2000.

- BARTH, A.D.; OKO, R.J.; **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Estados Unidos: Iowa State University Press. 285p, 1989.
- BAUDOT, A.; ALGER, L.; BOUTRON, P. Glass-Forming Tendency in the System Water-Dimethyl Sulfoxide. **Cryobiology**, v.40, p.151-158, 2000.
- BEDORE, A.G. **Características criopreservação do sêmen de pacu-caranha (*Piaractus mesopotamicus*) e de piracanjuba (*Brycon orbignyianus*)**. 1999. 53p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- BENTLEY, L.G.; ANSAH, G.A.; BUCKLAND, R.B. Seminal plasma proteins from a line of chickens selected for fertility of frozen-thawed semen and control line. **Poultry Science**, v.63, p.1444-1445, 1984.
- BILLARD, R. Reproduction in rainbow trout: sex differentiation, dynamics of gametogenesis, biology and preservation of gametes. **Aquaculture**, v.100, p.263-298, 1992.
- BOBE, J.; LABBÉ, C. Egg and sperm quality in fish. **General and Comparative Endocrinology**, v.165, p.535-548, 2010.
- BRANDON, C.I.; HEUSNER, G.L.; CAUDLE, A.B.; FAYRER-HOSKEN, R.A. Two-dimensional polyacrilamye gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. **Theriogenology**, v.52, p.863-873, 1999.
- BROMAGE, N.R. Broodstock management and seed quality—general considerations. In: Bromage, N.R.; Roberts, R.J. (Eds.) **Broodstock Management and Egg and Larval Quality**. Blackwell Science, Oxford, p.1-24, 1995.
- BROMAGE, N.R.; ROBERTS, R.J. (Eds) **Broodstock Management and Egg and Larval Quality**. Blackwell Science Ltd., Oxford, 1995, p. 424.
- BUHR, M.M. CURTIS, E.F.; KAKUDA, N.S. Composition and behaviour of head membrane lipid of fresh and cryopreserved boar sperm. **Cryobiology**, v.31, p.224 – 238, 1994.
- BYE, V.J. The role of environmental factors in the timing reproductive cycles. In: Potts, G.W. & Wotton, R.J. (eds) **Fish reproduction: strategies e tactics**. Academic Press, p-187-205, 1984.
- CARNEIRO, P.C.F. Tecnologias de produção e armazenamento de sêmen de peixes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, p.361-366, 2007.
- CARNEIRO, P.C.F.; AZEVEDO, H.C.; SANTOS, J.P.; MARIA, A.N. Cryopreservation of tambaqui (*Colossoma macropomum*) sêmen: extenders, cryoprotectants, dilution rations and freezing methods. **CryoLetters**, v.33, p.385-393, 2012.
- CAROLSFELD, J.; GODINHO, H.P.; ZANIBONI FILHO, E. et al. Cryopreservation of sperm in brazilian migratory fish conservation. **Journal of Fish Biology**, v.63, p.472-489, 2003.
- CARREIRA, J.T. **Avaliação da integridade do acrossoma, membrana citoplasmática, cromatina, potencial mitocondrial e produção de embriões *in vitro* de sêmen bovino com altos índices de gota citoplasmática proximal**. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. 56f, 2008.

- CASEY, P.J.; HILLMAN, R.B.; ROBERTSON, K.R. et al. Validation of an acrosomal stain for equine sperm that differentiates between living and dead sperm. **Journal of Andrology**, v.14, p.289-297, 1993.
- CASTAGNOLLI, N. Espécies nativas próprias para a piscicultura. In: Castagnolli, N. (Ed.). **Piscicultura de água doce**. Jaboticabal: FUNEP, p.59-70, 1992.
- CELEGHINI, E.C.C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes**. 2005. 186f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C. et al. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. **Animal Reproduction Science**, v.104, p.119-131, 2007
- CELEGHINI, E.C.C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F. et al. Uso de CMXROS e JC-1 na avaliação da função mitocondrial, associadas a sondas fluorescentes para avaliação da membrana plasmática e acrossomal em espermatozoides bovinos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 2005, Angra dos Reis. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, p.321-321, 2005.
- CHAMBERS, R.C.; WAIWOOD, K.G. Maternal and seasonal differences in egg sizes and spawning characteristics of captive Atlantic cod, *Gadus morhua*. **Canadian Journal Fisheries and Aquatic Science**, v.53, p.1986-2003, 1996.
- CIERESZKO, A.; GLOGOWSKI, J.; DABROWSKI, K. Biochemical characteristics of seminal plasma and spermatozoa of freshwater fishes. Editors In: **Cryopreservation in Aquatic Species**. Tiersch, T.R. and Mazik, P.M. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana. Pp 20-48, 2000.
- CIERESZKO, A.; PIROS, B.; DABROWSKI, K. et al. Serine proteinase inhibitors of seminal plasma of teleost fish: distribution of activity, electrophoretic profiles and relation to proteinase inhibitors of blood. **Journal of Fish Biology**, v.53, p.1292-1305, 1998.
- COELHO, L.A.; ESPER, C.E. ; GARCIA, J.M. Avaliação da integridade da membrana plasmática dos espermatozoides de bovinos, através de corantes fluorescentes e sua relação com a motilidade progressiva. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.19, p.173-180, 1995.
- CORCINI, C.D. **Perfil protéico do plasma seminal de suínos e sua associação com a qualidade do sêmen congelado**. 2008. 76f. Dissertação (Mestrado em Ciências veterinária) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- COSSARIZZA, A.; BACCARANI-CONTRI, M.; KALASHNIKOVA, G. et al. A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1). **Biochemistry Biophysical Research Communications**, v.197, p.40-45, 1993.
- COSSON, J.F.; PONS, J.M.; MASSON, D. Effects of forest fragmentation on frugivorous and nectarivorous bats in French Guiana. **Journal of Tropical Ecology**, v.15, p.515-534, 1999.

- COWARD, S.K.D.; BROWN, V.M.; CRUMP, D.R. et al. Indoor air quality in homes in England: volatile organic compounds. **BRE Report 446**, CRC press, London, 2002.
- DABROWSKI, K.; CIERESZKO, A. Proteinases inhibitor(s) in seminal plasma of teleost fish. **Journal of Fish Biology**, v.45, p.801-809, 1994.
- DALIMATA, A.M.; GRAHAM, J.K. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methylcellulose. **Theriogenology**, v.49, p.831-41, 1997.
- DARIN-BENNETT, A.; WHITE, I.G. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. **Cryobiology**, v.14, p. 466-70, 1977.
- DE VIAMING, V.L. Efeccts of photoperiod and temperature on gonadal activity in the cyprinid teleost *Notemigonus crysotucas*. **Biology Bull**, v.148, p.402-415, 1975.
- DHAMI, A.J.; KODAGALI, S.B. Correlation betweed biochemical and enzymatic constituents of semen from Surti buffalo bulls. **Indian Journal of Animal Science**, v.57, p.1283-1286, 1986.
- DREANNO, C.; SUQUET, M.; DESBRUYÈRES, E. et al. Effect of urine on semen quality in turbot (*Psetta maxima*). **Aquaculture**, v.169, p.247-262, 1998.
- FAO. Fishery Statistical Databases (Fishstart Plus, atualizado em março/2011). Disponível em: <http://www.fao.org/fishery/statistics/programme/3,1,1,> 2011.
- FAUVEL, C.; SAVOYE, O.; DREANNO, C. et al. Characteristics of sperm of captive sea bass in relation to its fertilization potential. **Journal of Fish Biology**, v.54, p.356-369, 1999.
- FELIZARDO, V.O. **Manejo reprodutivo da piracanjuba (*Brycon orbignyanus*): congelamento de sêmen e taxas de fertilidade**. 2008. 84 p. Dissertação para título de mestre em Ciências Veterinárias - UFPA. Lavras, 2008.
- FONSECA, M.G.; SILVA, R.J. Occurrence of Rondonia rondoni, Travassos, 1920 (Nematoda:Atractidae) in the pacu, *Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887(Osteichthyes: Characidae) celomatic cavity. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.71, p.279, 2004.
- FRANCISCATTO, R.T.; MURGAS, L.D.S.; MILIORINI, A.B. et al. Qualidade do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) e taxa de fertilidade após resfriamento a 4°C. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, p.213-215, 2002.
- FRAZER, G.S.; BUCCI, D.M. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine semen after cryopreservation in halfmillilitre straws. **Theriogenology**, v.46, p.1103-1115, 1996.
- GALO, J.M.; STREIT-JR, D.P.; SIROL, R.N. et al. Spermatic abnormalities of piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849) after cryopreservation. **Brazilian Journal Biology**, v.71, p.1-7, 2011.
- GARNER, D.L.; THOMAS, A.C.; GRAVANCE, C.G. The effect of glycerol on the viability, mitochondrial function and acrosomal integrity of bovine spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v.34, p.399-404, 1999.
- GLOGOWSKI, J.; BABIAK, I.; KUCHARCZYK, D. et al. Some propieties of bream *Abramis brama* L. sperm and its cryopreservation. **Aquaculture Research**, v.30, p.765-772, 1999.

- GRAHAM, J.K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.12, p.131-147, 1996.
- GRAVANCE, C.V.; GARNER, D.L.; BAUMBER, J. et al. Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. **Theriogenology**, v.53, p.1691-1703, 2000.
- HAFEZ, E.S.E. **Reprodução animal**. São Paulo: Editora Manole, p.582, 1995.
- HALANGK, W.; FRANK, K. Bohnensack R. Zur bestimmung der menge intakter spermien in bullenejakulaten. **Archivos Experience Veterinary Medicine**, v.38, p.105-114, 1984.
- HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction & Fertility**, v.88, p.343-352, 1990.
- HARVEY, B. Cryopreservation of Fish Spermatozoa. In: CLOUD, G. H. **Genetic conservation of salmonid fishes**. New York: Plenum Press, 1993.
- HARVEY, B.; CAROLSFELD, J. **Induced breeding in tropical fish culture**. Ottawa: International Development Research Centre, 1993.
- HERMAN, H.A.; MITCHELL, J.R.; DOAK, G.A. **The artificial insemination and embryo transfer of dairy and beef cattle**. Illinois: Interstate Publishers, 1994.
- HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.3 – 22, 2000.
- HOLT, W.V.; HEAD, M.F.; NORTH, R.D. Freeze-induced membrane damage in ram spermatozoa is manifested after thawing: observations with experimental cryomicroscopy. **Biology of Reproduction**, v.46, p.1086-1094, 1992.
- HONEYFIELD, D.C; KRISE, W.F. Measurement of milt quality and factors affecting viability of fish spermatozoa. In: TIERSCH, T. R.; MAZIK, P.M. (Eds.) **Cryopreservation in aquatic species**. Louisiana: WAS, p.49-58, 2000.
- HOPKINS, S.M.; EVANS, L.E. In: McDONALD, L.E. **Endocrinologia Veterinária y Reproducción**. 4 Ed. Interamericana. México, 1991.
- JOBIM, M.I.M.; OBERST, E.R.; SALBEGO, C.G. et al. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. **Theriogenology**, v.61, p.255–266, 2004.
- KJORSVIK, E.; MANGOR-JENSEN, A.; HOLMEFJORD, I. Egg quality in fishes. **Advances in Marine Biology**, v.26, p.71–113, 1990.
- KOWALSKI, R.; GLOGOWSKI, J.; KUCHARCZYK, D. et al. Proteolytic activity and electrophoretic profiles of proteases from seminal plasma of teleosts. **Journal of Fish Biology**, v.63, p.1008-1019, 2003.
- LAHNSTEINER, F.; MANSOUR, N.; BERGER, B. Seminal plasma proteins prolong the viability of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. **Theriogenology**, v.62, p.801-808, 2004.
- LAHNSTEINER, F.; PATZNER R.; WEISMANN, T. The testicular main duct and the spermatic duct in some cyprinid fishes II. Composition of the seminal fluid. **Journal of Fish Biology**, v.44, p.459-467, 1994.
- LEE, C.S.; DONALDSON, E.M. General discussion on “reproductive biotechnology in finfish aquaculture”. **Aquaculture**, v.197, p.303-320, 2001.

- LEGENDRE, M.; BILLARD, R. Cryopreservation of rainbow trout sperm by deep-freezing. **Reproduction Nutrition Development**, v.20, p.1859-1868, 1980.
- LEUNG, L.K.P.; JAMIESON, B.G.M. Live preservation of fish gametes. In: JAMIESON, B.G.M. (Ed.) **Fish evolution and systematics: evidence from spermatozoa**. Cambridge: Cambridge University Press, p. 245- 295, 1991.
- LOIR, M.; LABBE, C.; MAISSE, G. et al. Proteins of seminal fluid and spermatozoa of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): partial characterization and variations. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.8, p.485-495, 1990.
- LOPERA-BARRERO, N. M.; RIBEIRO, R. P.; POVH, J. A.; et al. **Produção de organismos aquáticos: uma visão no Brasil e no mundo**. Guaíba, RS: Agrolivros, 320 p, 2011.
- LOWE-MCCONNEL, R.H. Fish communities in tropical freshwater. **Longman, London**, 337p, 1975.
- MARIA, A.N.; MURGAS, L.D.S.; SILVA, M.O.B. et al. Influência da adição de iodeto de potássio e citrato de sódio na qualidade do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus* – Holmberg, 1887). **Ciência e Agrotecnologia**, v.28, p.191-195, 2004.
- MARTINS, M.L.; ONAKA, E.M.; MORAES, F.R. et al. Recent studies on parasitic infections of freshwater cultivated fish in the state of Sao Paulo, Brazil. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v.24, p.981-985, 2002.
- MAXWELL, W.M.C.; WELCH, G.R.; JOHNSON, L.A. Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. **Reproduction, Fertility and Development**, v.8, p.1165-1178, 1997.
- MENEZES, J.T.B.; QUEIROZ, L.J; DORIA, C.R.C. et al. Avaliação espermiática pós-descongelamento em tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). **Acta Amazonica**, v.38, p.365-368, 2008.
- MILIORINI, A.B.; MURGAS, L.D.S.; VIVEIROS, A.T.M. et al. Resfriamento do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) a 4°C, utilizando diferentes concentrações de dimetilsulfóxido. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, p.209-211, 2002.
- MILIORINI, A.B.; MURGAS, L.D.S.; VIVEIROS, A.T.M. et al. The effects of cryoprotectants and activators on sperm motility of curimba (*Prochilodus lineatus*). In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 15., 2004, Porto Seguro. **Anais...** Porto Seguro: 2004. p.523.
- MOCHIDA, K.; KONDO, T.; MATSUBARA, T. et al. A high molecular weight glycoprotein in seminal plasma is a sperm immobilizing factor in the teleost Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Developmental, Growth and Differentiation**, v.41, p.619-627, 1999.
- MOCHIDA, K.; MATSUBARA, T.; ANDOH, T. et al. A novel seminal plasma glycoprotein of a teleost, the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), contains a partial von willebrand factor type D domain and a zona pellucida-like domain. **Molecular Reproduction and Development**, v.62, p.57-68, 2002.
- MORISAWA, M.; SUZUKI, K. Osmolality and potassium ion: Their roles in initiation of sperm motility in teleosts. **Science**, v.210, p.1145-1147, 1980.

- MPA – Ministério de Pesca e Aquicultura. Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura. Brasil 2010. **Disponível em:** <http://www.mpa.gov.br>. Acessado em 2012.
- MUNRO, A.D. Tropical freshwater fish. In. Munro, A.D.; Scott, A.P.; Lam, T.J. Reproductive seasonality in teleosts: environmental influences. **CRC Press**, p.145-239, 1990.
- MURGAS, L.D.S.; MILIORINI, A.B.; FREITAS, R.T.F. et al. Criopreservação do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) mediante adição de diferentes diluidores, ativadores e crioprotetores. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, p.526-531, 2007.
- MURGAS, L.D.S.; MILIORINI, A.B.; SILVA, M.O.B. et al. Viabilidade seminal de piapara (*Leporinus obtusidens*), empregando-se diferentes diluentes, no resfriamento do sêmen a 4°C. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, p.211-213, 2002.
- MURGAS, L.D.S.; SILVA, M.O.B.; MELLO, C.B.M. et al. Avaliação quantitativa e qualitativa do sêmen de piaparas (*Leporinus obtusidens*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.23, p.246-248, 1999.
- MYLONAS, C.C.; PAPADAKI, M.; PAVLIDIS, M. et al. Evaluation of egg production and quality in the Mediterranean red porgy (*Pagrus pagrus*) during two consecutive spawning seasons. **Aquaculture**, v.232, p.637-649, 2004.
- MYLONAS, C.C.; SIGELAKI, I.; DIVANACH, P. et al. Multiple spawning and egg quality of individual European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) females after repeated injections of GnRH α . **Aquaculture**, v.221, p.605-620, 2003.
- NAUMOV, V.M. The ovogenesis and ecology of the sexual cycle of the Murmansk herring *Clupea harengus harengus*. **Species Science Reproduction Fish**, v.327, p.203-262, 1956.
- OHTA, H.; IZAWA, T. Diluent for cool storage of the Japanese eel (*Anguilla japonica*) spermatozoa. **Aquaculture**, v.142, p.107-118, 1996.
- PANGAWKAR, G.R.; SHARMA, R.D.; SINGH, R. Protein, sialic acid and zinc concentration in the seminal plasma of bulls in relation to freezability of semen. **Indian Veterinary Journal**, v.65, p.58-60, 1988.
- PAPADAKI, M.; PAPADOPOULOU, M.; SIGGELAKI, I. et al. Egg and sperm production and quality of sharpnose sea bream (*Diplodus puntazzo*) in captivity. **Aquaculture**, v.276, p.187-197, 2008.
- PEÑA, A.L.; QUINTELA, L.A.; HERRADÓN, P.G. Viability assessment of dog spermatozoa using flow cytometry. **Theriogenology**, v.50, p.1211-1220, 1998.
- PEÑA, F.J.; SARAVIA, F.; JOHANNISSON, A. et al. A new and simple method to evaluate early membrane changes in frozen-thawed boar spermatozoa. **International Journal of Andrology**, v.28, p.107-114, 2005.
- RANA, K. **Preservation of Gametes**. Page 424 in N.R. Bromage and R.J. Roberts, editor. Broodstock Management and Egg and Larval Quality. Blackwell Science, 1995.
- REIS NETO, R.V. **Avaliações morfométricas de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), tambaqui (*Colossoma macropomum*) e seus híbridos**. 2007. 74f.

- Dissertação do Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- RITAR, A.J. Artificial insemination with cryopreserved semen from striped trumpeter (*Latris lineate*). **Aquaculture Research**, v.180, p. 177-187, 1999.
- ROCA, J.; HERNÁNDEZ, M.; CARVAJAL, G. et al. Factors influencing boar sperm cryosurvival. **Journal of Animal Science**, v.84, p.2692 – 2699, 2006.
- RODRIGUES, J. L. Aspectos da congelação de embriões bovinos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES, Jaboticabal. **Anais...**[S.l.: s.n.], p. 55-79, 1992.
- ROMAGOSA, E.; PAIVA, P.; GODINHO, H.M. et al. Desenvolvimento dos ovócitos de *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) (*Colossoma mitrei* Berg, 1895) em condições de cultivo intensivo. **Ciência e Cultura**, v.40, p.60-63, 1988.
- ROMITO, G.C. **Perfil dimensional de proteínas do plasma seminal e características ligadas ao desempenho reprodutivis de touros de corte**. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.
- RONCOLETTA, M. Perfil em SDS-PAGE das proteínas de plasma seminal e membrana de espermatozóides e sua relação com a congelabilidade do sêmen de touros doadores de sêmen. Tese de Mestrado, FCAVJ/UNESP, p. 110, 1999.
- ROSA, J.C.S.; SILVA, J.W.B.; OLIVEIRA, J.W.B. Propagação artificial do peixe japonês *Carassius auratus* (Linnaeus, 1766) GUNTHER, 1870, com extrato de hipófise. **Ciência agrônômica**, v.25, p.44 - 52. 1994.
- RUIZ-PESINI, E.; DIEZ, C.; LAPENÑA, C. et al. Correlation of sperm motility with mitochondrial enzymatic activities. **Clinical Chemistry**, v.44, p.1616-1620, 1998.
- RURANGWA, E.; KIME, D.E.; OLLEVIER, F.; et al. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. **Aquaculture**, v.234, p.1-28, 2004.
- SAHINOZ, E.; ARAL, F.; DOGU, Z. Changes in Mesopotamian spiny eel, *Mastacembelus mastacembelus* (Bank & Solender in Russell, 1794) (Mastacembelidae) milt quality during a spawning period. **Theriogenology**, v. 67, p. 848-854, 2007.
- SCHRECK, C.B.; CONTRERAS-SANCHEZ, W.; FITZPATRICK, M.S. Effects of stress in fish reproduction, gamete quality, and progeny. **Aquaculture**, v.197, p.3–24, 2001.
- SEIDEL, G.E. Principles of cryopreservation of mammalian embryos. In: TECHNIQUES FOR FREEZING MAMMALIAN EMBRYOS, Colorado State University. **Proceedings...** [S.l.: s.n.], 1984, p. 7-14, 1984.
- SENHORINI, A.; NINHAUS-SILVEIRA, A.; FORESTI, F. et al. Seminal analysis, cryogenic preservation, and fertility in Matrinxã fish, *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). **Brazilian archives of biology and technology**, v.49, p.651-659, 2006.
- SMILEY, S.T.; REERS, M.; MOTTOLA-HARTSHORN, C. et al. Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. **Cell Biology**, v.88, p.3671-3675, 1991.

- SOUZA, N.L. **Avaliação de técnicas para determinar a viabilidade e a integridade do acrossomo de espermatozoides criopreservados eqüinos.** 2001. 76p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2001.
- STREIT JR., D.P.; SIROL, R.N.; RIBEIRO, R.P. et al. Parâmetros qualitativos do sêmen de dourado (*Salminus maxillosus*) em cativo. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.34, p.337-344, 2008.
- STRZEÝEK, J.; SAIZ-CIDONCHA, F.; WYSOCKI, P. et al. Seminal plasma proteins as markers of biological value of boar semen. **Animal Science Papers and Reports**, v. 22, p. 255 – 266, 2002.
- SUNDARARAJ, B.I.; VASAL, S. Photoperiod and temperature control in the regulation of reproduction in the female catfish, *Heteropneustes fossilis*. **Journal Fish Research Board Canada**, v.33, p.959-973, 1976.
- THOMAS, C.A.; GANER, D.L.; DEJARNETE, J.M. et al. Effect of cryopreservation on bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. **Biology Reproduction**, v.58, p.786-793, 1998.
- TROIANO, L.; GRANATA, A.M.; COSSARIZA, A. et al. Mitochondrial membrane potential and DNA stainability in Human sperm cells: A flow cytometry analysis with implications for male infertility. **Experimental Cell Research**, v.241, p.384-393, 1998.
- VAL, A.L.; ALMEIDA-VAL, V.M.F. Fishes of the Amazon and Their Environment: Physiological and Biochemical Aspects. **Berlin: Springer Verlag**, 1995.
- VALCÁRCEL, A.; DE LAS HERAS, M.A.; PÉREZ, L. et al. Fluorescent staining as a method of assessing membrane damage and post-thaw survival of ram spermatozoa. **Theriogenology**, v.41, p.483-89, 1994.
- VARELA JUNIOR, A.S. **Criopreservação seminal de tambaqui, *Colossoma macropomum*.** 2011. 118p. Rio Grande: Universidade Federal do Rio Grande, (Tese de doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande.
- WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction, Fertility and Development**, v.7, p.871-891, 1995.
- WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v.60, p.481 – 492, 2000.
- WATSON, P.F. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 degree C by egg yolk lipoprotein. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.7, p.871–891, 1995.
- WATSON, P.F. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 degree C by egg yolk lipoprotein. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.62, p.483 –492, 1981.
- WERLICH, D.E.; BARRETA, M.H.; MARTINS, L.T. et al. Embriões bovinos PIV vitrificados em diferentes soluções crioprotetoras com ou sem o uso de nitrogênio super-resfriado. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.34, p.77-82, 2006.

- WOJTCZAK, M.; DIETRICH, G. J.; CIERESZKO, A. Transferrin and antiproteinases are major proteins of common carp seminal plasma. **Fish and Shellfish Immunology**, v.19, p.387-391, 2005.
- WOLFE, D.F.; BRADLEY, J.T.; RIDDELL, M.G. Characterization of seminal plasma proteins and sperm proteins in ejaculates from normospermic bulls and bulls with thermally- induced testicular degeneration. **Theriogenology**, v.40, p. 1083-1091, 1993.
- YAO, Z.; RICHARDSON, G.; CRIM, L. A diluent for prolonged motility of ocean pout (*Macrozoarces americanus* L.) sperm. **Aquaculture**, v.174, p.183–193, 1999.
- ZANIBONI FILHO, E.; WEINGARTNER, M. Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, p.367-373, 2007.
- ZHANG, Y.Z.; ZHANG, S.C.; LIU, X.Z. et al. Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) sperm with a practical methodology. **Theriogenology**, v.60, p.989-996, 2003.
- ZILLI, L.; SCHIAVONE, R.; ZONNO, V. et al. Effect of cryopreservation on sea bass sperm proteins. **Biology of Reproduction**, v.72, p.1262 – 1267, 2005.

OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho foi realizado com o objetivo de analisar o comportamento reprodutivo da espécie *Colossoma macropomum* em cativeiro, ao longo da estação reprodutiva, caracterizando os parâmetros quali-quantitativos de seus gametas. Além de congelar o sêmen e avaliar a interação do conteúdo proteico do sêmen de *C. macropomum* com os parâmetros quali-quantitativos do sêmen congelado com DMSO, visando à identificação de marcadores bioquímicos (proteínas) em condições de predizer o potencial de congelabilidade do sêmen.

CAPÍTULO II

Avaliação espermática de tambaqui (*Colossoma macropomum*) ao longo da estação reprodutiva

(Trabalho nas normas da Revista Neotropical Ichthyology)

35 volume; motilidade progressiva; vigor espermático; tempo de motilidade; concentração
36 espermática, morfologia espermática, taxa de fertilização e eclosão. Não foi verificado
37 ($P>0,05$) efeito de período dentro da estação para volume do sêmen, vigor espermático,
38 tempo de motilidade e concentração espermática. Quando se avaliou a motilidade
39 progressiva entre os períodos de coleta, o efeito ($P<0,05$) encontrado foi de
40 comportamento quadrático. Quanto à morfologia espermática do sêmen, verificaram
41 diferenças ($P<0,05$) na probabilidade de ocorrências de espermatozoides normais,
42 anormalidades primárias e secundárias em função do período de coleta. A taxa de
43 fertilização e eclosão de ovos apresentaram efeito ($P<0,05$) dentro do período, porém
44 com comportamento linear negativo para a taxa de eclosão e quadrático para o taxa de
45 fertilização. Os parâmetros qualitativos do sêmen de *C. macropomum* sofrem alterações
46 de seus valores durante o período reprodutivo. O melhor momento para realizar a
47 reprodução do *C. macropomum* são os primeiros dois meses do período de espermição
48 (novembro e dezembro), que apresentaram qualidade superior nos parâmetros
49 espermáticos.

50

51 **INTRODUÇÃO**

52 Dentre os grupos de espécies cultivadas no Brasil, os Characiformes apresentam
53 destaque, por causa da textura e sabor de sua carne e o bom rendimento de carcaça. O
54 tambaqui *Colossoma macropomum* é a espécie endêmica mais produzida no Brasil
55 (Borghetti et al., 2003). Hoje a espécie é a principal em importância comercial da
56 Amazônia, sendo uma das criações mais presentes em todo o estado brasileiro (MPA,
57 2012).

58 O uso de gametas com bons índices espermáticos quali-quantitativos de
59 reprodutores de peixes é de grande importância para assegurar a produção de
60 descendentes “de qualidade” para aquicultura (Bromage e Roberts, 1995). De acordo
61 com Beirão et al. (2009) a qualidade espermática parece ser uma das razões para a
62 ineficiência na reprodução, em cativeiro, de algumas espécies de peixes. Em cultivo
63 comercial, a qualidade e quantidade do sêmen é frequentemente inadequada e nem
64 sempre possui capacidade fecundante no processo de inseminação artificial comumente
65 utilizado nas espécies aquáticas (Rurangwa et al., 2004).

66 Existem poucos estudos que informam sobre o desempenho reprodutivo,
67 produção de sêmen e a qualidade dos gametas em cativeiro durante o período
68 reprodutivo (Murgas et al., 2012; Streit Jr. et al., 2008). De todo modo, mudanças nas

69 características de qualidade do sêmen podem ocorrer durante o período reprodutivo
70 (Fauvel et al., 1999) e o estresse ocasionado em peixes em cativeiro podem representar
71 um efeito negativo na função reprodutiva e qualidade dos gametas (Papadaki et al.,
72 2008). Avaliando a qualidade do sêmen de *Hippoglossus hippoglossus* e *Mastacembelus*
73 *mastacembelus* ao longo do período reprodutivo, Babiak et al., (2006) e Sahinoz et al.,
74 (2007), relataram que o sêmen perde em qualidade no final da estação. As alterações
75 resultam na redução da capacidade de fertilização, observando aumento da concentração
76 espermática correlacionada negativamente com a redução da motilidade progressiva
77 (Babiak et al., 2006). Além disto, os autores observaram deterioração morfológica do
78 espermatozoide, incluindo a peça intermediária, especificamente no final da estação
79 reprodutiva.

80 O estudo foi realizado para analisar o desempenho reprodutivo do *C. macropomum*
81 em cativeiro, quanto à qualidade de seus gametas masculinos ao longo da estação
82 reprodutiva, a fim de se estimar a melhor época para realizar a reprodução.

83

84 MATERIAL E MÉTODOS

85 *Local*

86 O projeto foi executado em uma piscicultura comercial localizada em Pimenta
87 Bueno, Rondônia-Brasil (11°41'46 0,95 "S e 61°13'47 .50" O), pelos Grupos de
88 Pesquisa: PeixeGen da Universidade Estadual de Maringá (UEM) e *Aquam* da
89 Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), durante a estação reprodutiva do
90 *C. macropomum*, no início de novembro (2009) a final de janeiro de 2010 (90 dias).

91 Os dados de temperatura do ar e índice pluviométricos (precipitação) foram
92 coletados da estação meteorológica Cacoal-CPTEC (latitude -11.48 e longitude -61.37),
93 da cidade de Cacoal – Rondônia, localizada próxima da propriedade em que se realizou
94 o estudo, a fim de se observar a influência dos fatores abióticos nos parâmetros
95 espermáticos.

96

97 *Animais e experimento*

98 Utilizaram 23 machos adultos de *C. macropomum* (7,4 ±1,5 kg e 5±2 anos) que
99 representavam 30,3% do plantel de reprodutores da piscicultura. Os peixes foram
100 mantidos em dois viveiros de 2.000m², com temperatura média de 28±2° C e 6 mg/l de
101 oxigênio dissolvido, recebendo uma dieta comercial com proteína bruta de 36% e 2.900

102 kcal de energia digestível/kg de ração, que foi equivalente a 1% do peso vivo total de
103 todos os peixes, três vezes por semana.

104 Todos os animais foram marcados com “transponders” abaixo da nadadeira dorsal
105 para identificação dos mesmos. Os reprodutores foram selecionados segundo as
106 características reprodutivas secundárias de peixes migradores; liberação de sêmen com
107 uma leve compressão no abdômen. Em seguida submetidos a aplicações hormonais com
108 2,5 mg/Kg do peso vivo, em dose única, de extrato de hipófise de carpa, intramuscular,
109 entre a nadadeira dorsal e a linha lateral.

110 Os gametas masculinos foram coletados para as análises quali-quantitativas ao
111 longo da estação reprodutiva, com um intervalo de 15 ± 5 dias, sendo: período (1) –
112 início de novembro (09/11); (2) – final de novembro (25/11); (3) – meados de dezembro
113 (14/12); (4) – início de janeiro (03/01), e (5) – final de janeiro (22/01). Foram utilizados
114 quatro machos no período 1 ($7,8 \pm 1,3$ kg e 5 ± 2 anos), sete machos no período 2 ($7,2$
115 $\pm 1,5$ kg e 5 ± 2 anos), quatro machos no período 3 ($6,3 \pm 0,1$ kg e 5 ± 2 anos), quatro
116 machos no período 4 ($8,9 \pm 2,5$ kg e 5 ± 2 anos) e quatro machos no período 5 ($6,6 \pm 0,5$
117 kg e 5 ± 2 anos).

118

119 *Colheita e Análise de Sêmen*

120 O sêmen liberado foi colhido em seringas de 10 mL junto ao orifício urogenital
121 (Billard et al., 1995), sendo avaliados os seguintes parâmetros: volume; motilidade
122 progressiva; vigor espermático; tempo de motilidade; concentração e morfologia
123 espermática. As metodologias descritas a seguir foram realizadas conforme Galo et al.
124 (2011).

125 *Motilidade e vigor espermático:* diluiu-se 20 μ L de sêmen em 400 μ L de água
126 destilada em uma lâmina de microscopia ótica, cobrindo com uma lamínula e
127 imediatamente avaliando em microscópio óptico (40X), ambas as variáveis. Escorre de
128 0 a 100% para motilidade e de 0 a 5 pontos para o vigor espermático.

129 *Tempo de motilidade:* um cronômetro foi acionado quando se colocou 20 μ L de
130 sêmen em contato com 400 μ L de água destilada em uma lâmina de microscopia ótica.
131 Marcando o tempo decorrido até que o último espermatozoide parou de se mover no
132 campo ótico (40X).

133 Após a diluição de 1:1000, sêmen:formol-salina tamponada, homogenizou-se a
134 solução preenchendo por capilaridade a câmara de Neubauer, contando, em seguida, os
135 espermatozoides para registro da *concentração espermática*. A partir da diluição,

136 extensões foram produzidas e coradas pelo método de Rosa de Bengala (Streit Jr. et al.,
137 2004), contando 100 espermatozoides/extensão/animal em microscópio óptico (40X).
138 Anormalidades consideradas primárias foram: cauda quebrada, enrolada e degenerada; e
139 as anormalidades secundárias: cabeça solta, cauda dobrada e solta.

140

141 *Taxa de Fertilização*

142 Para avaliar a capacidade fecundante dos espermatozoides durante a estação
143 reprodutiva, utilizaram três fêmeas de *C. macropomum*, para cada período, com
144 características reprodutivas secundárias para peixes reofílicos; abdômen abaulado e
145 macio, além do orifício urogenital avermelhado. As fêmeas foram submetidas a indução
146 hormonal intramuscular de 5,5 mg/Kg do peso vivo de extrato de hipófise de carpa,
147 sendo dividido em duas frações, 10% na primeira aplicação e o restante 12 horas após a
148 primeira.

149 Após a fertilização, os ovos foram depositados em incubadoras de 60 litros,
150 individualizadas para cada macho, e decorridos seis horas de incubação (Temperatura
151 de $28 \pm 1^\circ\text{C}$), estimou-se a taxa de fertilização. Uma alíquota de cada incubadora foi
152 retirada e se colocou em uma placa de petri para contagem dos ovos viáveis. Esta
153 operação foi realizada três vezes, contabilizando, em média, 100 ovos por amostra. Da
154 soma das amostras, calculando a média e obtendo a taxa de fertilização.

155 Para a contabilização da taxa de eclosão, transferiu-se 100 embriões viáveis de
156 cada uma das incubadoras de 60 litros para incubadoras de 3,0 litros. Após cinco horas,
157 todas as larvas e ovos gorados foram retirados e contabilizados para determinar o
158 percentual, classificando em: larvas normais (movimentação regular); larvas defeituosas
159 (não apresentaram movimentação vigorosa ao se deslocar ou deformidade na
160 notocorda); larvas mortas (larvas eclodidas, mas que estavam mortas no momento da
161 contagem) e ovos gorados.

162

163 *Microscopia Eletrônica de Varredura*

164 Dez μL de sêmen “*in natura*” foram fixados em 990 μL em solução de
165 Glutaraldeído 2,5%, com tampão cacodilato 0,1M em pH 7,2 e refrigerados a 5°C até o
166 momento da desidratação (processamento das amostras). Em seguida as amostras foram
167 centrifugadas em 10.000 rpm/3 minutos e lavadas com tampão cacodilato três vezes. A
168 desidratação ocorreu em séries crescentes de álcool, passando por concentrações de 50,
169 70, 80, 90 e 95%/10 minutos em cada etapa e três banhos em álcool 100%/10 minutos

170 em cada exposição. As amostras foram fixadas com L-polisina em lamínulas, e a
171 secagem foi obtida em aparelho de Ponto Crítico BAL-TEC CPD 030 (Critical Point
172 Dryer), utilizando CO₂ líquido. Os fragmentos contendo as amostras de sêmen foram
173 montados em bases metálicas de alumínio (*stubs*) e em seguida metalizadas com íons
174 ouro-paládio em Metalizador Shimadzu IC-50 Ion Coater. Nos procedimentos de
175 microscopia eletrônica, o material foi examinado e eletromicrografado em microscópio
176 eletrônico de varredura Shimadzu SS-550 Superscan – (*Scanning Electron Microscope*).

177

178 *Análise estatística*

179 Foram ajustadas curvas de regressão para descrever o comportamento das
180 variáveis em função dos meses. Previamente a estimação das equações de regressão,
181 testou-se a normalidade dos dados. Assim as análises estatísticas para o volume, vigor e
182 motilidade espermática, os modelos de regressão foram estimados pela metodologia de
183 modelos lineares generalizados, considerando a distribuição gamma e função de ligação
184 recíproca. Para tempo de motilidade e concentração espermática, nas análises
185 realizadas, considerando que as variáveis apresentavam distribuição normal.

186 Para estimar o comportamento das probabilidades de ocorrências de
187 espermatozoides normais, com anormalidades primárias e os respectivos complementos,
188 em função dos meses do ano, foi utilizada a metodologia de modelos lineares
189 generalizados, considerando que estas variáveis apresentavam distribuição binomial,
190 resultando em regressões logísticas das diferentes probabilidades de ocorrências em
191 função dos meses dentro do ano.

192 Nas análises estatísticas, utilizou-se o Proc Genmod do sistema computacional
193 SAS versão 9.0 (2002) as diferentes abordagens foram realizadas a partir de
194 consideração das diferentes distribuições para as variáveis, conforme citado
195 anteriormente.

196 Índice de correlação de Pearson entre a taxa de fertilização e eclosão dos ovos
197 fertilizados com sêmen de *C. macropomum* ao longo da estação reprodutiva foi
198 utilizado o software computacional *Statistica 7.0*[®] (Statsoft, 2005).

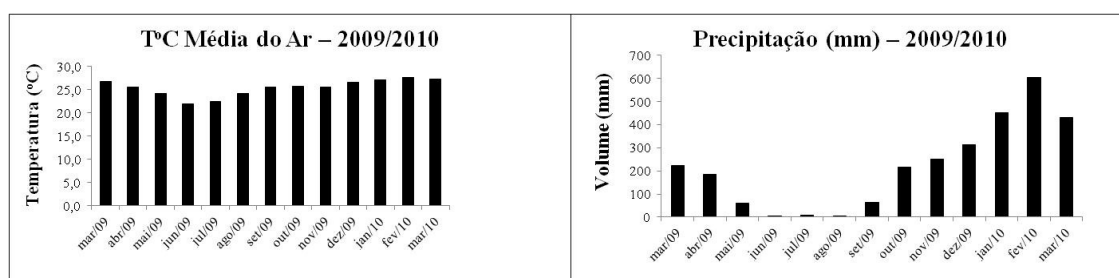
199

200 **RESULTADOS**

201 As temperaturas médias do ar foram de 25,5°C no mês de novembro, 26,7°C em
202 dezembro e 27,1°C em janeiro. Já os índices pluviométricos (precipitações) foram de

203 251,7 mm em novembro, de 313,4 mm em dezembro e 450,4 mm em janeiro (Fig. 1).

204



205

206 **Fig. 1.** Variação mensal da média da temperatura do ar (°C) e precipitação (mm) da
 207 cidade de Pimenta Bueno – Rondônia (Fonte:
 208 <http://www.agritempo.gov.br/agroclima/pesquisaWeb>).
 209

210 *Motilidade, vigor, tempo de motilidade, volume e concentração espermática*

211 Não foi verificado ($P>0,05$) efeito de período (início, meio e fim) dentro da
 212 estação reprodutiva para volume do sêmen, vigor espermático, tempo de motilidade e
 213 concentração espermática (Tabela 1).

214

215 **Tabela 1.** Média e desvio padrão dos parâmetros quali-quantitativos do sêmen de
 216 *Colossoma macropomum* durante a estação reprodutiva de 2009-2010.

Parâmetros Seminais	Estação Reprodutiva (2009/2010)
Volume do sêmen (mL)	3,71±1,74
Vigor espermático (pontos)	4,82±0,38
Tempo de motilidade (segundos)	41,40±9,68
Concentração espermática (espermatozoides/mL)	8,67x10 ⁹ ±485,45

217

218 Quando se avaliou a motilidade progressiva entre os períodos de coleta, o efeito
 219 ($P<0,05$) encontrado foi de comportamento quadrático (Fig. 2a).

220

221 *Morfologia espermática*

222 Quanto a morfologia espermática do sêmen, verificaram diferenças significativas
 223 ($P<0,05$) na probabilidade de ocorrências de espermatozoides normais, anormalidades
 224 primárias e secundárias em função do período de coleta (Figs. 2b;2c e 3).

225

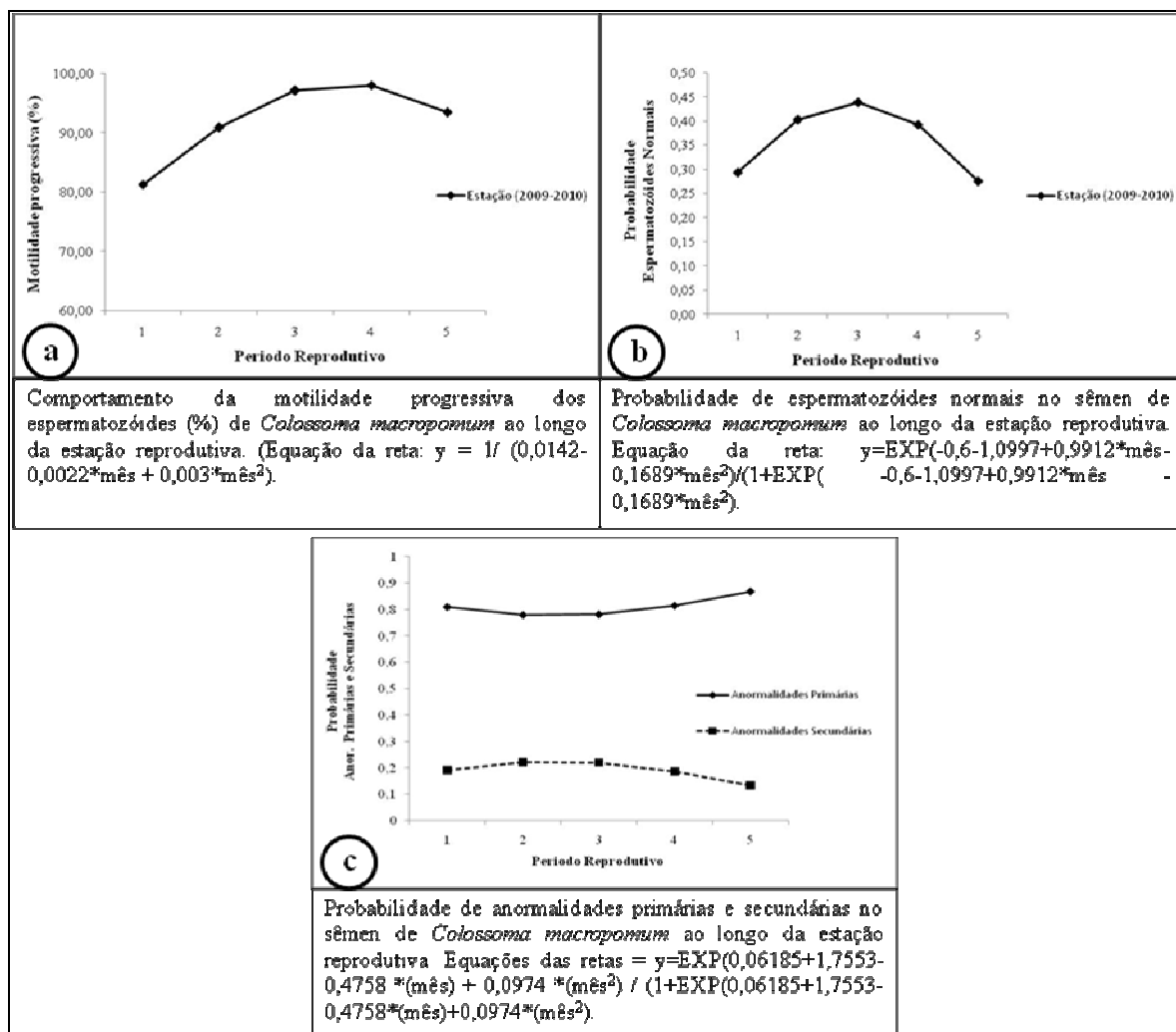
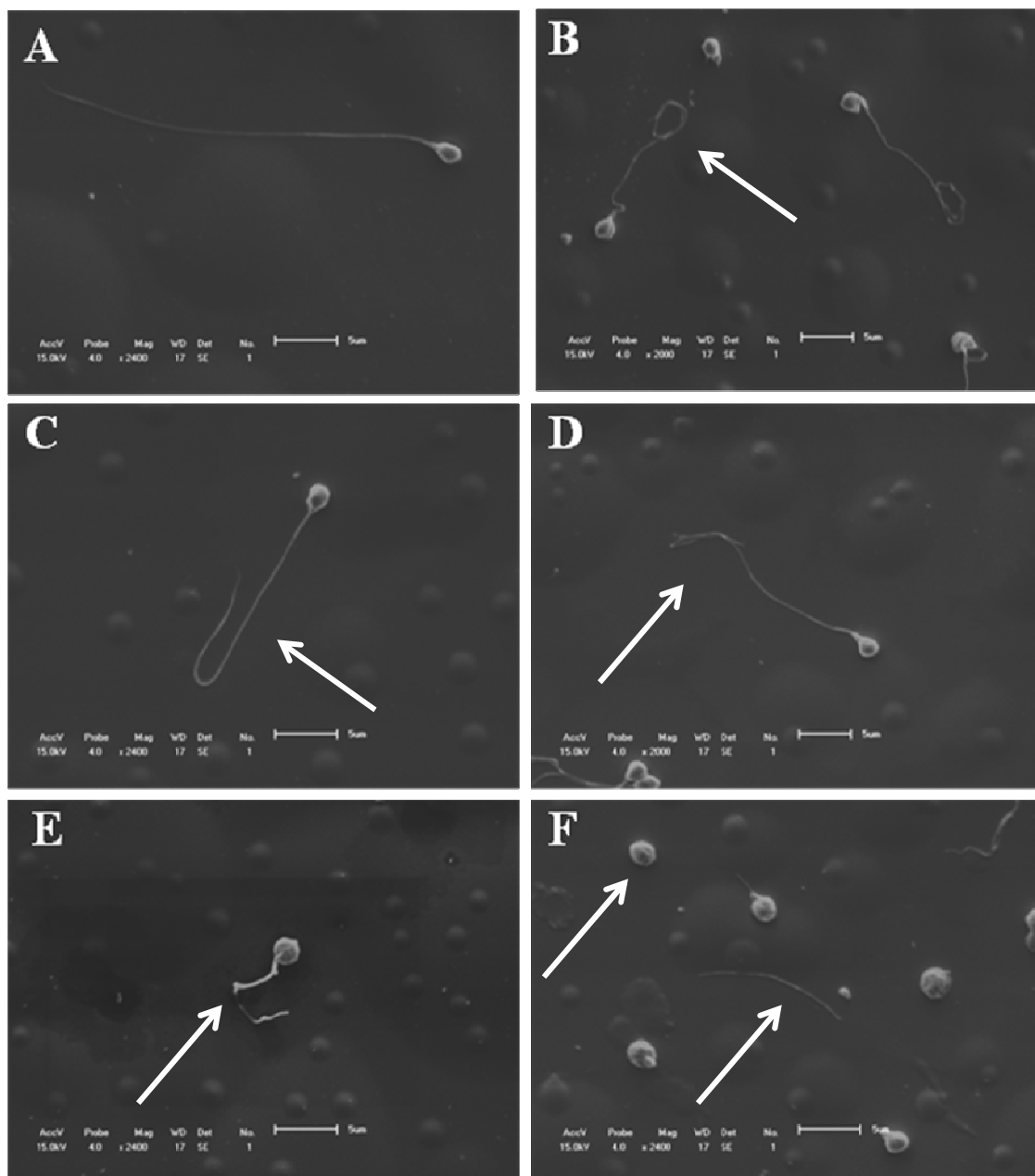


Fig. 2. Comportamento dos parâmetros espermáticos de *Colossoma macropomum* ao longo da estação reprodutiva. **A-** Motilidade progressiva; **B-** Probabilidade de espermatozoides normais; **C-** Probabilidade de anomalias primárias e secundárias. Período (1) – início de novembro (09/11); (2) – final de novembro (25/11); (3) – meados de dezembro (14/12); (4) – início de janeiro (03/01), e (5) – final de janeiro (22/01).

226
227
228
229
230
231
232
233



234
235
236
237
238
239
240

Fig. 3. Ilustrações de morfologias obtidas por microscopia eletrônica de varredura de espermatozoides de *Colossoma macropomum* ao longo da estação reprodutiva 2009-2010. (A) normal; (B) cauda enrolada na parte final; (C) cauda dobrada; (D) cauda dobrada na parte final; (E) cauda quebrada; (F) cauda e cabeça solta.

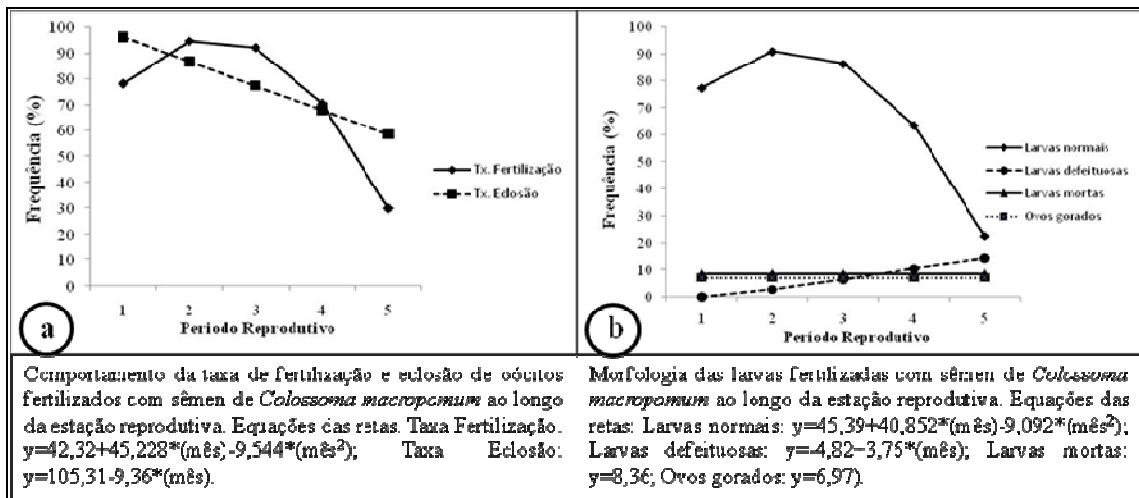
241 *Taxa de Fertilização, eclosão e morfologia das larvas*

242 Para a taxa de fertilização e eclosão o efeito verificado foi significativo ($P < 0,05$)
243 dentro do período (Fig. 4a), porém com comportamento linear negativo para a taxa de
244 eclosão e quadrática para a taxa de fertilização.

245 Quando se avaliou a morfologia das larvas ao longo da estação reprodutiva,
246 observando diferença significativa ($P < 0,05$) para larvas normais e defeituosas. Porém,

247 quanto a larvas mortas e ovos gorados não houve diferença significativa ($P>0,05$) (Fig.
248 4b) ao longo do período.

249



250

251

Fig. 4. Comportamento da taxa de fertilização, eclosão (A) e morfologia das larvas (B) no sêmen de *Collossoma macropomum* ao longo da estação reprodutiva. Período (1) – início de novembro (09/11); (2) – final de novembro (25/11); (3) – meados de dezembro (14/12); (4) – início de janeiro (03/01), e (5) – final de janeiro (22/01).

252

253

254

255

256

257

258

259

260

261

262

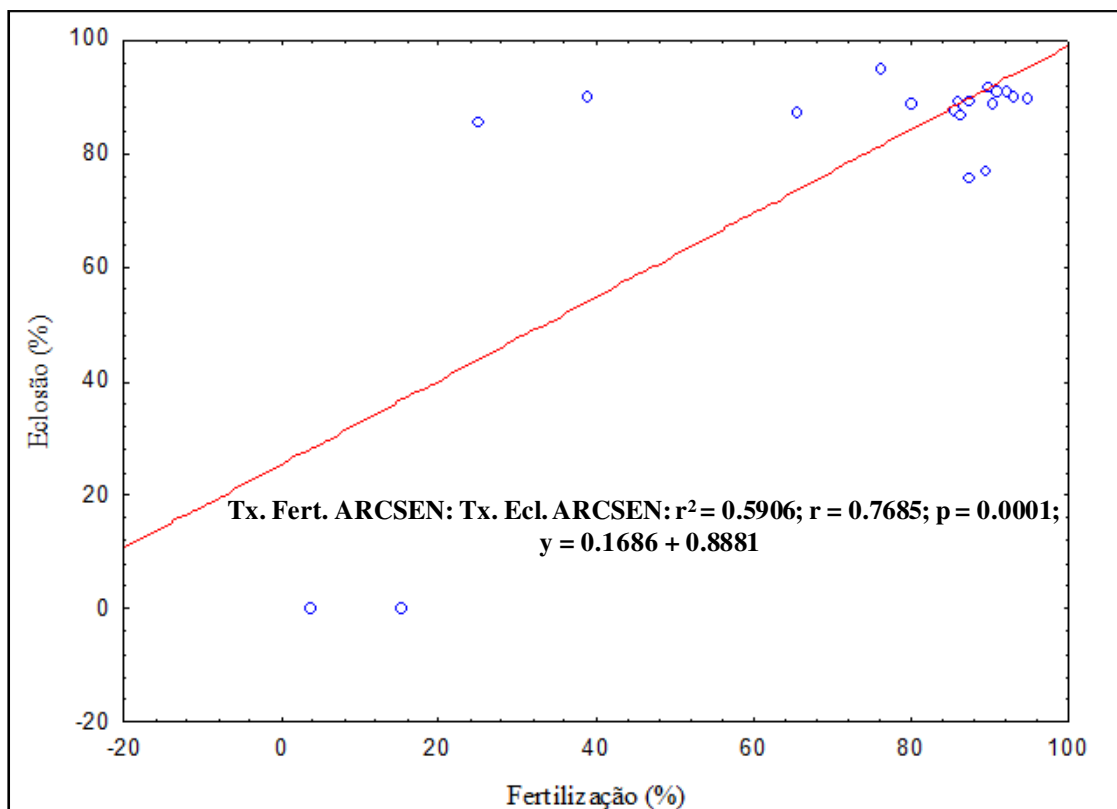
263

264

265

266

Os parâmetros seminais tiveram influência ($P<0,05$) na taxa de fertilização, fato que não ocorreu com a taxa de eclosão. De todo modo, a correlação foi positiva entre a taxa de fertilização e de eclosão ($r^2 = 0,5906$; $p = 0,0001$). O comportamento da taxa de fertilização foi obtido pela seguinte equação: $Fertilização = 71,3575 + 71,8662(TA) - 92,181(TAXTN) - 18,9193(volume) + 33,83(TNXvolume)$, com um $R^2 = 77\%$. Em que TA= número de espermatozoides normais/anormalidades totais; TN= número de anormalidades secundárias/anormalidades primárias. De modo que um aumento de TA (maior número de espermatozoides normais) observa-se um aumento da taxa de fertilização, porém uma redução do volume de semen. (Fig. 5).



267

268

Fig. 5. Índice de correlação entre a taxa de fertilização e eclosão dos oócitos fertilizados com sêmen de *Colossoma macropomum* ao longo da estação reprodutiva.

269

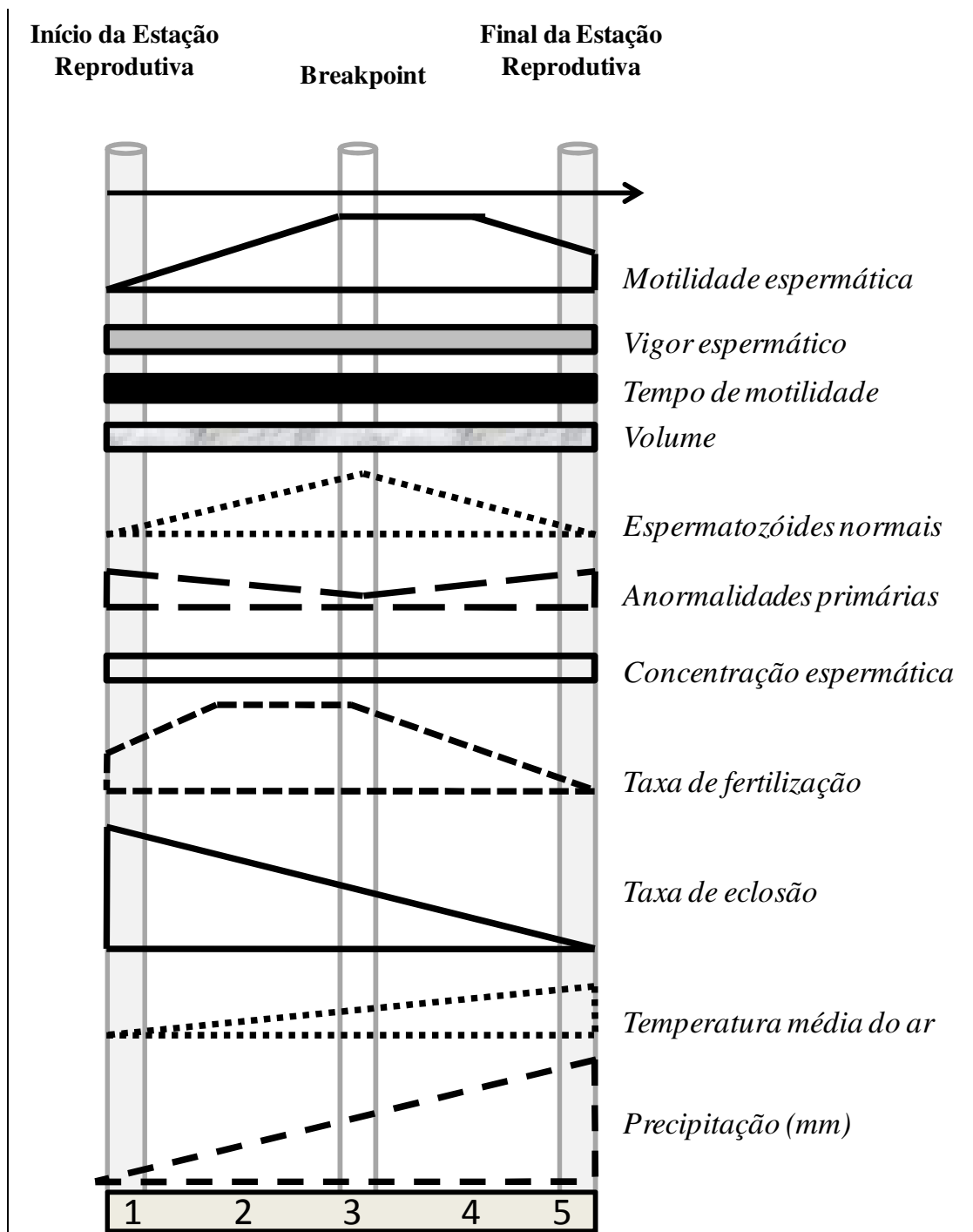
270

271 DISCUSSÃO

272 *Parâmetros quali-quantitativos do sêmen, taxa de fertilização, eclosão e morfologia das*
 273 *larvas*

274 A variação nos valores dos parâmetros seminais do *C. macropomum*, qualitativo e
 275 quantitativo, era de certo modo esperado, e com algumas exceções no início do período
 276 reprodutivo, a melhor qualidade seminal foi em dezembro (meio do período
 277 reprodutivo) (Fig. 6).

278



279
280
281
282
283
284
285
286
287

Fig. 6. Representação hipotética, a partir dos resultados obtidos, na variação das características quali-quantitativas do sêmen de *Colossoma macropomum* durante o período reprodutivo da espécie de 2009/2010. Período (1) – início de novembro (09/11); (2) – final de novembro (25/11); (3) – meados de dezembro (14/12); (4) – início de janeiro (03/01), e (5) – final de janeiro (22/01). Adaptado de Babiak et al. (2006) com os dados para *C. macropomum*.

288 Em um modelo clássico esperado para o comportamento da motilidade
289 espermática durante o ciclo reprodutivo, é que a mesma aumente os valores absolutos

290 até certo período e posteriormente reduza, como observou Rainis et al. (2003) em
291 *Dicentrarchus labrax*, ressaltado por Nynca et al. (2012) observado em *Oncorhynchus*
292 *mykiss*. O comportamento quadrático negativo supracitado também foi observado no
293 presente trabalho, atingindo o seu ponto máximo no terço final do período, de acordo
294 com a equação da reta sugerida. Se por um lado, no final do período reprodutivo, a
295 queda na motilidade progressiva pode estar relacionada com a deterioração espermática,
296 o índice mais baixo no início do período não é claro. Pode estar relacionado com a baixa
297 concentração de hormônio circulante para maturação espermática ou mesmo a baixa
298 quantidade de espermátides primárias e secundárias que dão origem aos
299 espermatozoides. Por outro lado, este fato não ficou claro neste estudo, por não ter
300 ocorrido variação na concentração espermática em todo período reprodutivo.

301 Em geral, em peixes, as células germinativas passam rapidamente pelas fases
302 espermiogênica e meiótica, tornando muito rápido o tempo necessário para se produzir
303 um espermatozoide (Nóbrega et al., 2009). Desta forma, nas espécies migradoras como
304 o *C. macropomum*, os espermatozoides permanecem por longos períodos estocados no
305 interior das gônadas, uma vez que os mesmos começam a ser produzidos ainda nos
306 meses de inverno (Grier e Taylor, 1998; Brown-Peterson et al., 2002; Batlouni *et al.*,
307 2006) para serem liberados apenas no fim do ano, no curto período de desova. Desta
308 forma é razoável supor que as condições de manejo aplicadas aos reprodutores ao longo
309 do ano (densidade de estocagem, nutrição, vazão, temperatura, níveis de oxigênio
310 dissolvido, e outros), além dos parâmetros abióticos (temperatura, índice
311 pluviométricos, luminosidade, e outros) também devem interferir na qualidade do
312 sêmen e dos espermatozoides (volume do sêmen, concentração espermática, taxas de
313 sobrevivência, anormalidades, e outros), e conseqüentemente na sua capacidade de
314 fertilizar os oócitos, principalmente com relação aos espermatozoides estocados há mais
315 tempo nas gônadas (Souza, 2011).

316 A partir do conceito de recrutamento das células germinais, formação, estocagem
317 e posterior liberação dos espermatozoides, os fenômenos observados nos parâmetros
318 seminais do *C. macropomum*, podem ser explicados com maior lógica. Pois, a
319 coincidência do comportamento quadrático negativo da motilidade espermática e do
320 percentual de espermatozoides normais, contrário a incidência de anormalidades
321 primárias (quadrático positivo), é uma indicação segura do envelhecimento dos
322 espermatozoides no final da estação reprodutiva. Esta observação é documentada por
323 inúmeros autores, (Billard et al., 1997; Dreanno et al., 1999) para *Dicentrarchus labrax*;

324 Mylonas et al. (2003) para *Pagrus pagrus* e Babiak et al., (2006) para *Hippoglossus*
325 *hippoglossus*, que ainda relacionam as alterações morfológicas a mudanças bioquímicas
326 que resultam em baixa qualidade espermática em termos de parâmetros quantitativos e
327 capacidade fertilização. A observação de Suquet et al. (1998) reforça a observação
328 quanto ao resultado do processo de envelhecimento, que conduz a deterioração na
329 morfologia espermática dos espermatozoides, inclusive na região da peça intermediária.

330 Muito embora a motilidade progressiva, sempre foi relacionada como um fator
331 preponderante para a qualidade seminal, os resultados obtidos com *C. macropomum*,
332 reafirmam a ideia da prevalência das alterações morfológicas como decisivo, em função
333 do “envelhecimento” do espermatozoide e, por isso irá resultar em baixa motilidade.
334 Neste sentido é pertinente a observação de Babiak et al. (2006) sobre o envelhecimento
335 dos espermatozoides de *H. hippoglossus*, resultarem em decomposição física,
336 observando caudas soltas e cabeças destruídas, no final da estação reprodutiva. A região
337 da cabeça dos espermatozoides de turbot (*Scophthalmus maximus*) também foi a que
338 mais sofreu alterações morfológicas nos espermatozoides envelhecidos, incluindo a
339 condensação da cromatina (Suquet et al., 1998). Os mesmos autores citam que as
340 mudanças observadas nos parâmetros quantitativos do sêmen, durante a estação
341 reprodutiva podem ser o reflexo do intensivo resultado dos três processos envolvidos
342 dentro da formação do sêmen: espermiogênese, hidratação e decomposição celular.
343 Além disso, a sobrevivência dos embriões reduz significativamente, indicando que os
344 processos de envelhecimento dos espermatozoides reduzem a capacidade para formação
345 do zigoto. Este fato foi evidenciado neste estudo, que se observou redução da taxa de
346 fertilização, eclosão e porcentagem de larvas normais, juntamente com um aumento de
347 larvas deformadas.

348 A influência dos parâmetros seminais, principalmente da morfologia espermática
349 na taxa de fertilização foi evidenciada neste estudo, assim como observado por Galo
350 (2009) para *P. mesopotamicus*. Apesar dos parâmetros seminais não apresentarem
351 influência na taxa de eclosão, notou-se uma forte correlação ($r^2 = 0,5906$; $p = 0,0001$)
352 entre as taxas (fertilização e eclosão). Fato que confirma a observação de Varela Junior
353 (2011), que as taxas de fertilização e eclosão do sêmen de *C. macropomum* estavam
354 altamente correlacionadas ($r = 0,87$; $p < 0,01$) em seu estudo. O mesmo autor cita que
355 para estimar a qualidade espermática *in vivo* de *C. macropomum* após o
356 descongelamento é necessário apenas uma destas avaliações. Rizzo et al. (2003)
357 observaram em *Prochilodus marginatus*, uma correlação negativa ($r = -0,82$) entre taxa

358 de fertilização e a porcentagem de larvas deformadas, ocorrendo durante o
359 armazenamento “in situ” (26°C). Já Springate et al. (1984) observaram uma alta
360 correlação entre a taxa de fertilidade e a porcentagem de larvas deformadas, que de
361 acordo com estes autores, pode ser suficiente para indicar o desempenho subsequente
362 dos embriões e larvas, através da taxa de fertilização.

363

364 *Influência dos fatores abióticos no período reprodutivo*

365 O processo reprodutivo em peixes depende da interação de fatores endógenos
366 (hormônios) e exógenos, tais como temperatura, precipitação, fotoperíodo, nível da
367 coluna d’água, dentre outros. Trabalhos recentes sobre influência de fatores abióticos na
368 fisiologia reprodutiva de peixes indicam que dificilmente um único fator interfere na
369 complexidade do processo reprodutivo (Barbieri et al., 2000). O papel de fatores
370 ambientais na sincronização dos ciclos reprodutivos, dando ênfase a influência do
371 fotoperíodo e temperatura da água neste processo, foi discutido por Bye (1984).
372 Segundo este autor, os peixes que vivem fora dos trópicos, apresentam ciclos, de tal
373 forma que larvas e jovens são produzidos quando as condições ambientais são
374 favoráveis a sobrevivência.

375 Neste estudo, a motilidade espermática se comportou da mesma maneira quanto a
376 temperatura (°C) e precipitação (mm) durante a estação reprodutiva. Barbieri et al.
377 (2000) estudando a influência dos fatores na reprodução do *Salminus maxillosus* e
378 *Prochilodus lineatus* na natureza, verificaram que as variações da relação
379 gonadossomática e das frequências absolutas dos estádios de maturação gonadal
380 seguem variações das temperaturas da água e do ar, precipitação atmosférica e
381 fotoperíodo. O mesmo comportamento foi observado por Vazzoler et al. (1997) para
382 peixes dominantes na planície de inundação do alto Rio Paraná. Segundo Lowe-
383 McConnell (1975) os teleósteos de regiões tropicais e subtropicais possuem uma estreita
384 relação entre o período reprodutivo e as estações chuvosas.

385 Querol et al. (2004), pesquisando os fatores abióticos na dinâmica da reprodução
386 do cascudo viola *Loricariichthys platymetopon*, encontraram maior índice
387 gonadossomático para machos nos meses de novembro e dezembro, coincidindo com o
388 período de elevação da temperatura. No presente estudo, não se avaliou o índice
389 gonadossomáticos, porque os reprodutores eram de uma propriedade particular, e
390 sacrificá-los não era possível. Porém, analisaram os parâmetros quali-quantitativos do
391 sêmen, observando melhor taxa de motilidade espermática e porcentagem de

392 espermatozoides normais durante o período crescente de temperatura e índice
393 pluviométrico (dezembro e janeiro), coincidindo com o mesmo período dos melhores
394 índice gonadossomáticos do *L. platymetopon* (Querol et al., 2004) e *S. maxillosus*
395 (Barbieri et al., 2000). Ainda, Querol et al. (2002), estudando *L. platymetopon* e Melo et
396 al. (1995) com *L. anus* observaram que de modo geral, as condições crescentes de
397 temperatura estão ligadas ao período de maior atividade reprodutiva, influenciando
398 diretamente na maturação gonadal. Segundo Barbieri et al. (2000) considerando que
399 existe uma enorme e complexa interação entre os eventos biológicos entre si e desses
400 com eventos ambientais, há necessidade de um aprofundamento nas pesquisas nesta
401 área de estudo.

402

403 **CONCLUSÃO**

404 Os parâmetros qualitativos do sêmen de *C. macropomum* sofrem alterações de
405 seus valores durante o período reprodutivo. As alterações nos parâmetros qualitativos
406 estão associadas aos processos de envelhecimento dos espermatozoides no final da
407 estação reprodutiva, levando a consequentemente redução das taxas de fertilização e
408 eclosão, além do aumento da probabilidade de anormalidades primárias e redução da
409 probabilidade de espermatozoides normais. Os melhores parâmetros espermáticos foram
410 observados nos dois primeiros meses do período de espermiacão (novembro e
411 dezembro), consequentemente o melhor momento para realizar a reprodução da espécie.

412

413 **AGRADECIMENTOS**

414 À piscicultura Boa Esperança (Pimenta Bueno-RO) e projeto Aquabrazil
415 (Embrapa), pela parceria na execução deste estudo.

416

417 **REFERÊNCIAS**

418 Babiak, I.; Ottesen, O. Rudolfsen, G. & Johnsen, S. 2006. Quantitative characteristics of
419 Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L., semen throughout the reproductive
420 season. Theriogenology, 65: 1587-1604.

421 Barbieri, G., Salles, F. A. & Cestarolli, M. A. 2000. Influência dos fatores abióticos na
422 reprodução do dourado, *Salminus maxillosus* e do curimatá *Prochilodus lineatus* do
423 Rio Mogi Guaçu (Cachoeira de Emas, Pirassununga/SP). Acta Limnologica
424 Brasiliensia, 12: 85-91.

- 425 Batlouni, S. R., Romagosa, E. & Borella, M. I. 2006. The reproductive cycle of male
426 catfish *Pseudoplatystoma fasciatum* (Teleostei, Pimelodidae) revealed by changes of the
427 germinal epithelium an approach addressed to aquaculture. *Animal Reproduction*
428 *Science*, 96: 116-132.
- 429 Beirão, J., Soares, F., Herraez, M. P., Dinis, M. T. & Cabrita, E. 2009. Sperm quality
430 evaluation in *Solea senegalensis* during the reproductive season at cellular level.
431 *Theriogenology*, 72: 1251-1261.
- 432 Billard, R., Cosson, J., Perchec, J. & Linhart, O. 1995. Biology of sperm and artificial
433 reproduction in carp. *Aquaculture*, 129: 95-112.
- 434 Billard, R., Dupont, J. & Barnabe, G. 1997. Diminution de la motilité et de la durée de
435 conservation du sperme de *Dicentrarchus labrax* L. (Poisson, teleostéen) pendant la
436 période de spermiation. *Aquaculture*, 11: 363–367.
- 437 Borghetti, N. R. B., Ostrensky, A. & Borghetti, Jr. 2003. Aqüicultura: uma visão geral
438 sobre a produção de organismos aquáticos no Brasil e no mundo. Curitiba: Grupo
439 Integrado de Aqüicultura e Estudos Ambientais, 128 p.
- 440 Bromage, N. R. & Roberts, R. J. (Eds). 1995. Broodstock Management and Egg and
441 Larval Quality. Blackwell Science Ltd., Oxford, 424 p.
- 442 Bromage, N. R. 1995. Broodstock management and seed quality—general
443 considerations. In: Bromage, N. R. & Roberts, R. J. (Eds.) Broodstock Management and
444 Egg and Larval Quality. Blackwell Science, Oxford, p. 1–24.
- 445 Brown-Peterson, N. J., Grier, H. J. & Overstreet, R. M. 2002. Annual changes in
446 germinal epithelium determine male reproductive classes of the cobia. *Journal of Fish*
447 *Biology*, 60: 178-202.
- 448 Bye, V. J. 1984. The role of environmental factors in the timing reproductive cycles. In:
449 Potts, G. W. & Wotton, R.J. (eds) Fish reproduction: strategies e tactics. Academic
450 Press, p-187-205.
- 451 Dreanno, C., Suquet, M., Fauvel, C., Le Coz, JR., Dorange, G., Quemener, L. & Billard
452 R. 1999. Effect of the aging process on the quality of sea bass (*Dicentrarchus labrax*)
453 semen. *Journal of Applied Ichthyology*, 15: 176–180.

- 454 Fauvel, C., Savoye, O., Dreanno, C., Cosson, J. & Suquet, M. 1999. Characteristics of
455 sperm of captive sea bass in relation to its fertilization potential. *Journal of Fish*
456 *Biology*, 54: 356–369.
- 457 Galo, J. M., Streit-Jr, D. P., Sirol, R. N., Ribeiro, R. P, Digmayer, M., Andrade, V. X. L.
458 & Ebert, A.R. 2011. Spermatic abnormalities of piracanjuba *Brycon orbignyanus*
459 (Valenciennes, 1849) after cryopreservation. *Brazilian Journal Biology*, 71: 1-7.
- 460 Galo. J. M. Avaliação dos parâmetros seminais de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e
461 sua correlação com as taxas de fertilização, eclosão e morfologia das larvas.
462 (Dissertação de Mestrado). Programa de Pós-graduação em Zootecnia. Universidade
463 Estadual de Maringá. 2009. 83p.
- 464 Grier, H. J. & Taylor, R. G. 1998. Testicular maturation and regression in the common
465 snook. *Journal of Fish Biology*, 53: 521-542.
- 466 Lowe-McConnell, R. H. 1975. Fish communities in tropical freshwaters. Longman,
467 London. 337p.
- 468 Melo, J. F. de. & Querol, M. V. 1995. Dados preliminares sobre biologia e reprodução
469 de cascudo viola *Loricariichthys anus* (Pisces, Loricariidae) na região Uruguaiana, RS,
470 Brasil. *Hífen*, 19: 34-37.
- 471 MPA – Ministério de Pesca e Aquicultura. Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura.
472 Brasil 2010. Disponível em: <http://www.mpa.gov.br>. Acessado em 2012.
- 473 Murgas, L. D. S., Felizardo, V. O., Ferreira, M. R., Veras, G. C., Andrade, E. S. &
474 Paula, D. A. J. 2012. Eficiência reprodutiva em espécies nativas de peixes de água doce.
475 *Ciência Animal*, 22: 197-206.
- 476 Mylonas, C. C., Papadaki, M. & Divanach, P. 2003. Seasonal changes in sperm
477 production and quality in the red porgy *Pagrus pagrus* (L.). *Aquaculture Research*, 34:
478 1161–70.
- 479 Nóbrega, R. H., Batlouni, S. R. & França, L. R. 2009. An overview of functional and
480 stereological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish. *Fish*
481 *Physiology and Biochemistry*, 35: 197-206.
- 482 Nynca, A., Nynca, J., Wasowska, B., Kolesarova, A., Kolomycka, A., Ciereszko, R.E.
483 2012. Effects of the phytoestrogen genistein, and protein tyrosine kinase inhibitor-

- 484 dependent mechanisms on steroidogenesis and estrogen receptor expression in porcine
485 granulosa cells of medium follicles. In Domestic animal endocrinology, 44: 10-18.
- 486 Nynca, J., Kuzminski, H., Dietrich, G.J., Hliwa, P., Dobosz, S., Liszewska, E., Karol,
487 H., Ciereszko, A. 2012. Biochemical and physiological characteristics of semen of sex-
488 reversed female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). Theriogenology, 77:
489 174-183.
- 490 Papadaki, M., Papadopoulou, M., Siggelaki, I. & Mylonas, C. C. 2008. Egg and sperm
491 production and quality of sharpsnout sea bream (*Diplodus puntazzo*) in captivity.
492 Aquaculture, 276: 187–197.
- 493 Querol, M. V. M., Querol, E. & Gomes, N. N. A. 2002. Fator de condição Gonadal,
494 índice Hepatosomático e Recrutamento como Indicadores do período de reprodução de
495 *Loricariichthys platymetopon* (Osteichthyes, Loricariidae) Bacia do Rio Uruguai
496 Médio, Sul do Brasil. Iheringia, 92: 79-84.
- 497 Querol, M. V. M., Querol, E. & Pessano, E. F. 2004. Influência de fatores abióticos na
498 dinâmica da reprodução do cascudo viola *Loricariichthys platymetopon* (Isbrucker &
499 Nijssen, 1979) (Osteichthyes, Loricariidae), no reservatório da estância Nova
500 Esperança, Uruguaiana, Bacia do Rio Uruguai, RS, Brasil. Biodiversidade Pampeana, 2:
501 24-29.
- 502 Rainis, S., Mylonas, C. C., Kyriakou, Y. & Divanach, P. 2003. Enhancement of
503 spermiation in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) at the end of the reproductive
504 season using GnRH α implants. Aquaculture, 219: 873–890.
- 505 Rizzo, E., Godinho, H. P., Sato, Y. 2003. Short-term storage of oocytes from the
506 neotropical teleost fish *Prochilodus marggravii*. Theriogenology, 60: 1059-1070.
- 507 Rurangwa, E., Kime, D. E., Ollevier, F. & Nash, J. P. 2004. The measurement of sperm
508 motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. Aquaculture, 234: 1-28.
- 509 Sahinoz, E., Aral, F. & Dogu, Z. 2007. Changes in Mesopotamian spiny eel,
510 *Mastacembelus mastacembelus* (Bank & Solender in Russell, 1794) (Mastacembelidae)
511 milt quality during a spawning period. Theriogenology, 67: 848-854.
- 512 Souza, T. G. 2011. Biologia reprodutiva e qualidade do sêmen de reprodutores de
513 curimatá, *Prochilodus lineatus*, em condições distintas de manejo. Jaboticabal: Centro

- 514 de Aquicultura da UNESP – CAUNESP. (Dissertação de mestrado) -Universidade
515 Estadual Paulista – UNESP, 82p.
- 516 Springate, J. R. C., Bromage, N. R., Elliott, J. A. K., Hudson, D. H. 1984. The timing of
517 ovulation and stripping and their effects on the rates of fertilization and survival to
518 eyeing, hatch and swim up in the rainbow trout (*Salmo qairdneri*). R. Aquaculture, 43:
519 313-322.
- 520 Stasoft. Inc. Statistic (data analysis software system). Version 7.1. Tulsa, USA.
- 521 Streit Jr., D. P., Moraes, G. V., Ribeiro, R. P., Povh, J. A., Souza, E. D. & Oliveira, C.
522 A. F., 2004. Avaliação de diferentes técnicas para coloração de sêmen de peixes.
523 Arquivos de Ciência Veterinárias e Zoologia da Unipar, 7: 157-162.
- 524 Streit Jr., D.P., Sirol, R.N., Ribeiro, R.P, Moraes, G. V., Galo, J. M., Digmayer, M.
525 2008. Parâmetros qualitativos do sêmen de dourado (*Salminus maxillosus*) em cativeiro.
526 Boletim do Instituto de Pesca, 34: 337-344.
- 527 Suquet, M., Dreanno, C., Dorange, G., Normant, Y., Quemener, L., Gaignon, J.L. &
528 Billard, R. 1998. The ageing phenomenon of turbot spermatozoa: effects on
529 morphology, motility and concentration, intracellular ATP content, fertilization, and
530 storage capacities. Journal of Fish Biology, 52: 31–41.
- 531 Varela Junior, A.S. 2011. Criopreservação seminal de tambaqui, *Colossoma*
532 *macropomum*. Rio Grande: Universidade Federal do Rio Grande, (Tese de doutorado) –
533 Universidade Federal do Rio Grande, 118p.
- 534 Vazzoler, A. E. M., Lizama, M. A. P. & Inada, P. 1997. Influências ambientais sobre a
535 sazonalidade reprodutiva. In: Vazzoler, A. E. M.; Agostinho, A.A.; Hahan, N.S. (eds).
536 Planície de inundação do Alto Rio Paraná: aspectos físicos, biológicos e sócio-
537 econômicos. EDUEM, 267-280.

CAPÍTULO III

Qualidade ovocitária de tambaqui (*Colossoma macropomum*) ao longo da estação reprodutiva

(Trabalhos nas normas da Revista Brasileira de Ciência Veterinária – Brazilian Journal of Veterinary Science)

1 **QUALIDADE OVOCITÁRIA DE TAMBAQUI (*COLOSSOMA***
2 ***MACROPOMUM*) AO LONGO DA ESTAÇÃO REPRODUTIVA**

3
4 **Quality oocyte of tambaqui (*Colossoma macropomum*) during**
5 **reproductive station**
6

7 **RESUMO**

8 O estudo foi conduzido com o objetivo de analisar o comportamento
9 reprodutivo da espécie *Colossoma macropomum*, quanto à qualidade de seus
10 gametas femininos ao longo da estação reprodutiva. O experimento foi
11 executado em Pimenta Bueno-Rondônia durante a estação reprodutiva do *C.*
12 *macropomum*. Utilizaram 36 fêmeas durante a estação de 2010-2011. Cada
13 coleta apresentou um intervalo de 15±5 dias. Através da extrusão foram
14 coletados os gametas femininos e realizadas as seguintes análises ao longo da
15 estação: peso de oócitos liberados (g); índice de produtividade; taxa de
16 fertilização e eclosão. Durante a estação 2010-2011 foi verificado efeito
17 (P<0,05) de período (coleta) dentro da estação para peso de oócitos, índice de
18 produtividade e taxa de fertilização. Apesar do período 3 (coleta – mês de
19 dezembro) não ter diferenciado significativamente de alguns períodos, foi o que
20 apresentou os melhores parâmetros estabelecidos para a qualidade dos
21 oócitos de *C. macropomum*.

22 **PALAVRAS-CHAVE:** characidae, oócitos, período reprodutivo, reprodução,
23 taxa de fertilização.
24

25 **ABSTRACT**

26 The study was carried out to analyze the reproductive behavior of the
27 *Colossoma macropomum* species, on quality of their female gametes
28 throughout the reproductive station. The experiment was executed in Pimenta
29 Bueno-Rondônia during the reproductive season of the *C. macropomum*. 36
30 females were used during the season of 2010-2011. Each collection presented
31 an interval of ± 15 days. Through the reproductive method for extrusion were
32 collected the female gametes and accomplished the following analyses along
33 the season: amount of liberated oocytes (g;) productive index fertilization rate
34 and hatching. During the station 2010-2011, it was verified (P <0.05) a period
35 effect (collection) inside the season for amount of oocytes, production index and

36 fertilization rate. In spite of period 3 (collection - month of December) not had
37 significantly differentiation from some periods, it presented the best established
38 parameters for the quality of oocytes of *C. macropomum*.

39 **KEY WORDS:** characidae, oocytes, reproduction period, reproduction,
40 fertilization rate.

41

42 **INTRODUÇÃO**

43 Das espécies sul-americanas cultivadas no Brasil o *Colossoma*
44 *macropomum* é caracterizado como uma das principais, pelas excelentes
45 características zootécnicas apropriadas para o cultivo, e também pela grande
46 aceitação na piscicultura e mercado consumidor brasileiro (Urbinati &
47 Gonsalves, 2005). É uma importante espécie na pesca profissional e amadora.
48 Com grande potencial zootécnico e uma boa quantidade de informações
49 científicas disponível, o *C. macropomum* se tornou a principal espécie para o
50 cultivo na região norte e centro-oeste do Brasil estando presente em 24 dos 27
51 estados brasileiros (Lopera-Barrero et al., 2011), motivando o desenvolvimento
52 de novas pesquisas na área de reprodução, a fim de servir como modelo para
53 outras espécies.

54 O uso de gametas de alta qualidade de reprodutores de peixes é de
55 grande importância para assegurar a produção de descendentes “viáveis” para
56 aquicultura (Bromage e Roberts, 1995). A qualidade dos oócitos e produção de
57 larvas em cativeiro são considerados fator limitante e muito importante na
58 produção de alevinos (Kjorsvik et al., 1990).

59 A qualidade dos oócitos é considerada, como potencialmente futuras
60 larvas viáveis (Kjorsvik et al., 1990) e depende de vários fatores que
61 frequentemente podem mudar durante o ciclo reprodutivo. Aspectos como o
62 estado endócrino das fêmeas durante a ovogênese, quantidade e qualidade da
63 ração fornecida durante o período de preparação, variáveis dos parâmetros
64 físico e químico da água, o estresse com o manejo dos reprodutores e outros,
65 são relacionados como determinantes para o sucesso na produção de larvas
66 viáveis (Campbell et al., 1992; Bromage, 1995; Brooks et al., 1997;
67 Christiansen e Torrissen, 1997; Carrillo et al., 2000).

68 Chambers e Waiwood (1996), estudando *Gadus mohua*, relataram que o
69 tamanho dos oócitos reduziu no período reprodutivo, em razão da baixa oferta

70 na dieta dos reprodutores durante o período e subsequente subfornecimento
71 da nutrição maternal. Na época de reprodução, os oócitos atingem um tamanho
72 crítico, específico para as espécies (Romagosa et al., 1988), sendo que o
73 tamanho da larva, após a absorção do saco vitelino, está correlacionado ao
74 tamanho do oócito.

75 Estudos sobre fecundidade são importantes nas pesquisas de peixes
76 (Almatar e Bailey, 1989). Informação sobre o número de ovos é utilizada para
77 estimar o potencial reprodutivo e relações comprimento animal/fecundidade
78 (Laine e Rajasilta, 1998). Diferenças observadas na fecundidade dos peixes
79 são atribuídas a fatores genéticos e ambientais (Baxter, 1959; Burd e Howlett,
80 1974; Messieh, 1976; Kelly e Stevenson, 1985; Sinclair e Trembley, 1985).
81 Bromage (1995) sugere que o manejo nutricional das matrizes influencia na
82 produção de larvas viáveis de peixes. Além disso, inúmeros autores informam
83 que o nível alimentar das fêmeas, afeta o número de oócitos (Watanabe, 1985;
84 Horwood et al, 1989.; Kamler, 1992; Tyler & Sumpter, 1996) e também
85 variações no tamanho do ovo (Hettler, 1981; Hay et al, 1988). Winters et al.
86 (1993) citam que a partir do ambiente físico, a temperatura da água do mar
87 influencia o número médio e tamanho dos ovos produzidos pelos peixes.

88 Nenhuma informação está disponível referente aos parâmetros de
89 qualidade de oócitos e larvas de peixes nativos brasileiros gerados em cativeiro
90 e subseqüentes taxas de fertilização e eclosão. Tal informação se torna
91 importante para o sucesso da produção comercial de peixes com constante
92 abastecimento de oócitos de alta qualidade para o crescimento.

93 O estudo foi realizado para analisar o comportamento reprodutivo da
94 espécie *C. macropomum*, quanto à qualidade de seus gametas femininos ao
95 longo da estação reprodutiva, a fim de se determinar a melhor época para
96 realizar a reprodução.

97

98 **MATERIAL E MÉTODOS**

99 *Local*

100 O projeto foi executado em uma piscicultura comercial localizada em
101 Pimenta Bueno, Rondônia-Brasil (11°41'46 0,95 "S e 61°13'47.50" O), pelos
102 Grupos de Pesquisa: PeixeGen da Universidade Estadual de Maringá (UEM) e
103 *Aquam* da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), durante a

104 estação reprodutiva do *C. macropomum*, no início de novembro de 2010 a final
105 de março de 2011 (150 dias).

106 Os dados de temperatura do ar e índice pluviométricos (precipitação)
107 foram coletados da estação meteorológica Cacoal-CPTEC (latitude -11.48 e
108 longitude -61.37), da cidade de Cacoal – Rondônia, localizada próxima da
109 propriedade em que se realizou o estudo, a fim de se observar a influência dos
110 fatores abióticos nos parâmetros espermáticos.

111

112 *Animais e obtenção dos gametas*

113 Utilizaram 36 fêmeas de *C. macropomum* (9,3 ±2,5 kg e 6±2 anos),
114 durante a estação de 2010-2011, que representavam 40% do plantel de
115 matrizes da piscicultura.

116 Os animais foram mantidos em seis viveiros de 2.000 m², com
117 temperatura média de 28±2° C e 6 mg/l de oxigênio dissolvido, sendo
118 alimentados com ração comercial com 36% de proteína bruta e 3.400 kcal de
119 energia digestível/kg de ração. Foram alimentados três vezes por semana com
120 1% da biomassa, do mês de agosto até o período reprodutivo (outubro),
121 quando foi utilizada a estratégia de arraçoamento de duas vezes por semana
122 com 1% da biomassa. Após a desova, os animais permaneceram 15 dias sem
123 alimentação e retornaram a receber arraçoamento diário com 3,5% da
124 biomassa.

125 Os animais foram marcados com “transponders” para identificação
126 individual. As fêmeas foram selecionadas pelas características reprodutivas
127 secundárias em peixes migradores, como abdômen abaulado e macio, além do
128 orifício urogenital avermelhado. Após a seleção, os animais foram pesados e
129 submetidos a indução hormonal intramuscular, entre a nadadeira dorsal e a
130 linha lateral, sendo ministrados 5,5 mg/Kg do peso vivo das fêmeas, aplicando
131 10% na primeira administração e o restante 12 horas após.

132 Os peixes foram mantidos em dois tanques contendo 3.000 L para
133 manejo (no máximo quatro animais em cada), com coluna d’água de 70
134 centímetros, em fluxo constante sob temperatura 28±2° C e 6 mg/l de oxigênio
135 dissolvido, ou seja, a mesma água e parâmetros físico-químicos dos viveiros.

136 O intervalo médio de cada coleta foi de 15±5 dias. Sendo período (1) –
137 início de novembro; (2) – final de novembro; (3) – meados de dezembro; (4) –

138 início de janeiro; (5) – final de janeiro; (6) – início de fevereiro; (7) – final de
139 fevereiro; (8) – início de março e (9) – final de março.

140

141 *Avaliação de parâmetros*

142 Através do método reprodutivo por extrusão (Woynarovich & Horváth,
143 1980) foram coletados os gametas femininos e realizadas as seguintes
144 análises, ao longo da estação reprodutiva:

145 *Peso de oócitos liberados (g)* - após a desova de cada fêmea, os oócitos foram
146 pesados em balança analítica.

147 *Índice de produtividade* – quantidade de gametas liberados (g), divididos pelo
148 peso do animal, multiplicado por 100 ($IP = \text{oócitos (g)} / \text{peso do animal (g)} * 100$).

149 Uma alíquota de 60 mL, de cada fêmea avaliada, foi imediatamente
150 fertilizada com 150 μ L de sêmen, de um animal do período reprodutivo
151 correspondente. Em seguida, cada alíquota, agora como ovos, foi depositada
152 em incubadoras de 60 litros para completar o desenvolvimento embrionário.
153 Decorridos seis horas de incubação ($28 \pm 1^\circ\text{C}$) foi contabilizada a *taxa de*
154 *fertilização*, obtendo a média de 100 ovos de três alíquotas de cada uma das
155 incubadoras, avaliando número de embriões viáveis e ovos gorados.

156 Cem embriões viáveis foram transferidos para incubadoras de 3,0 L,
157 independente para cada fêmea. Decorridos 12 horas da fertilização ($28 \pm 1^\circ\text{C}$),
158 foi contabilizada a *Taxa de Eclosão*, uma média do número de larvas eclodidas
159 e ovos gorados foi obtida a partir da contabilização de três alíquotas de cada
160 incubadora de 3,0 L.

161

162 *Análise estatística*

163 Utilizou-se o software computacional *Statistica 7.0*[®] (Statsoft, 2005) para
164 descrever o banco de dados dos parâmetros de peso de oócitos, índice de
165 produtividade, taxa de fertilização e eclosão durante o período reprodutivo de
166 2010-2011. Foram analisados os pressupostos de normalidade e
167 homogeneidade a 5% dos resíduos, pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene. Em
168 seguida, submetidos à ANOVA *one way* em que se avaliou o efeito período
169 reprodutivo com 5% de significância e, em caso de diferença significativa entre
170 pelo menos um dos tratamentos as médias foram comparadas por Tukey a 5%.
171 Foi realizado o índice de correlação de Pearson entre o período, peso de

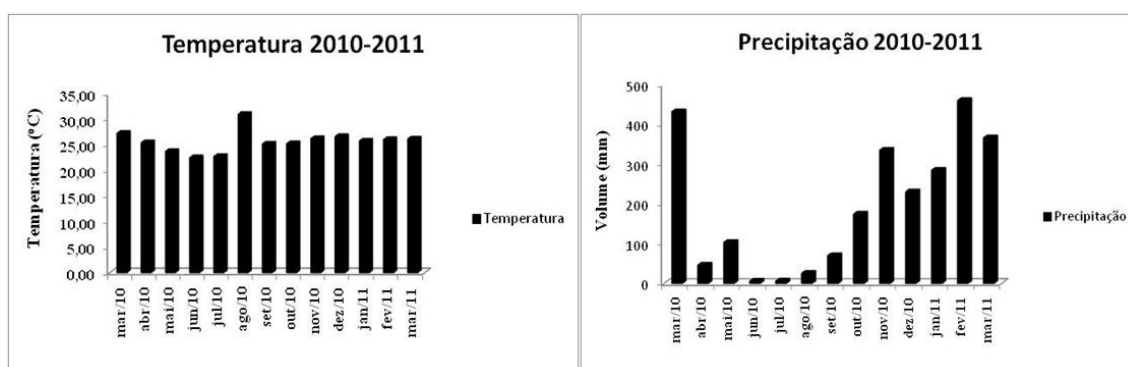
172 oócitos e peso das fêmeas de *C. macropomum* ao longo da estação
 173 reprodutiva através do software computacional *Statistica 7.0*[®] (Statsoft, 2005).

174

175 RESULTADOS

176 As temperaturas médias do ar no ano de 2010/2011 foram: 26,2; 26,6;
 177 26,2; 26,1 e 25,7°C em novembro, dezembro, janeiro, fevereiro e março,
 178 respectivamente. Os índices pluviométricos no ano de 2010-2011 foram de
 179 334,3; 229,6; 283,9; 459,1; e 365,4 mm em novembro, dezembro, janeiro,
 180 fevereiro e março, respectivamente (Figura 1).

181



182

183 **Figura 1.** Variação mensal da temperatura média do ar e da precipitação da
 184 cidade de Pimenta Bueno – Rondônia durante março de 2010 a março de 2011
 185 (Fonte: <http://www.agritempo.gov.br/agroclima/pesquisaWeb>).

186

187 Foi verificado efeito ($P > 0,05$) de período (coleta) dentro da estação para
 188 peso de oócitos liberados, índice de produtividade e taxa de fertilização (Tabela
 189 1). Apesar do período 3 (coleta – mês de dezembro) não ter diferenciado
 190 significativamente ($P > 0,05$) de alguns períodos, foi registrado os melhores
 191 parâmetros estabelecidos para a qualidade dos oócitos de *C. macropomum*.

192

Tabela 1. Parâmetros qualitativos dos oócitos de *Colossoma macropomum* durante o período reprodutivo de 2010/2011.

Período reprodutivo (coletas)	Parâmetros Qualitativos de Ovócitos			
	Peso de oócitos (g)	Índice de produção*	Taxa Fertilização (%)	Taxa Eclosão (%)
1	1101,8±124,4ab	10,38±1,41abc	67,44±1,47abc	67,12±14,25a
2	1070,0±204,9ab	13,62±1,19ab	86,30±3,41a	68,57±17,57a
3	1830,0±159,0a	16,90±0,33a	85,75±9,95ab	89,05±4,65a
4	778,00±149,8b	10,34±1,89abc	73,06±12,60abc	76,04±12,76a
5	852,0±225,0ab	10,02±2,65abc	69,00±23,60abc	71,00±21,00ab
6	981,0±276,2ab	13,51±0,85ab	23,25±23,25bc	22,95±22,95bc
7	1113,3±246,7ab	10,01±2,71abc	64,85±8,12abc	54,09±19,54ab
8	894,7±89,8ab	8,19±1,94bc	8,00±6,11c	0,00±0,00c
9	519,7±51,9b	4,98±0,49c	70,32±8,49ab	63,93±13,15a
(F; p) ⁽¹⁾	3,7967; 0,004213	0,361265; 0,931845	4,0668; 0,002778	2,13490; 0,06732

* IP=oócitos (g)/peso do animal (g) * 100

193

194

195

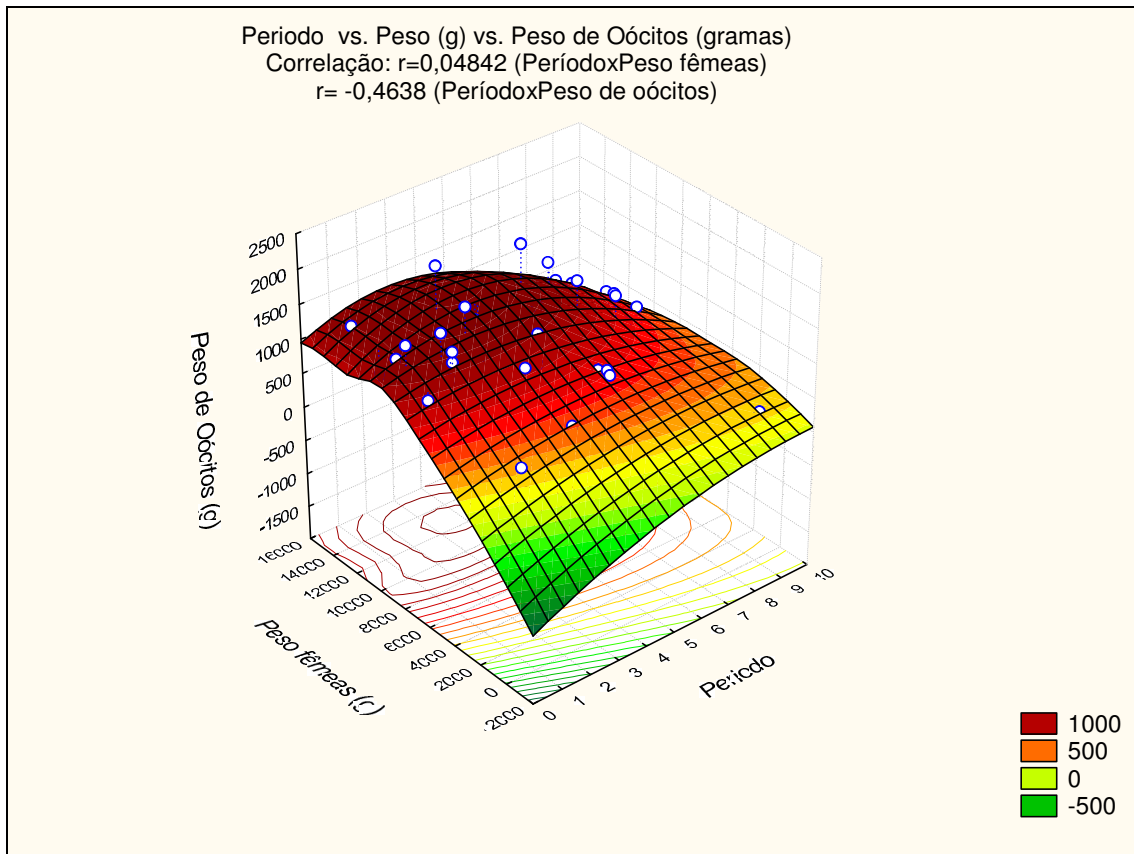
196

197

198

199

Conforme as correlações realizadas entre o período reprodutivo (coleta) e o peso das fêmeas (g) ($r = 0,0484$) e, entre o período reprodutivo (coleta) e o peso de oócitos liberados ($r = - 0,4638$), foi observado que as fêmeas que possuíam maior peso, liberavam maior peso de oócitos, ocorrendo nos primeiros períodos de coletas, nos meses de novembro, dezembro e janeiro (Figura 2).



200
 201 **Figura 2.** Correlações observadas entre o período reprodutivo (coleta), o peso
 202 das fêmeas (g) e o peso de oócitos liberados (g).
 203

204 DISCUSSÃO

205 Segundo Bobe & Labbé (2010) a qualidade de oócitos em peixes pode
 206 ser definida como a capacidade de serem fertilizados e conseqüentemente
 207 desenvolver um embrião normal. Em condições selvagens ou até mesmo na
 208 criação em cativeiro, a qualidade dos gametas de peixes podem ser altamente
 209 variável e ser influenciada significativamente por inúmeros fatores externos,
 210 além do manejo dos reprodutores e do período reprodutivo (Chambers &
 211 Waiwood, 1996), fatores genéticos e ambientais, como crescimento (Kraus al
 212 de et., 2000), temperatura (Tveiten et al., 2001), além do nível de alimentação
 213 das fêmeas (Tyler & Sumpter, 1996) e a relação de sexo dos reprodutores
 214 (Pavlidis et al., 2004).

215 Macchi et al. (2004), estudando a produção de oócitos durante a estação
 216 reprodutiva do *Merluccius hubbsi* relataram que a produção mensal de
 217 oócitos variou consideravelmente durante a estação, com um pico principal em
 218 janeiro (57% dos oócitos produzidos durante o período). Além disso, as fêmeas
 219 mais velhas (>5 anos) produziram por um período mais extenso do que os

220 indivíduos mais jovens. Neste estudo, as fêmeas de *C. macropomum*
221 desovaram de novembro a março, com um pico de peso de oócitos no mês de
222 dezembro. Além disso, a partir das correlações encontradas entre o peso das
223 fêmeas, o peso de oócitos e período reprodutivo foi possível afirmar que o
224 maior peso de oócitos foi liberado pelos animais mais pesados. Esse fato
225 ocorreu nos primeiros períodos de coletas, indicando que as fêmeas mais
226 velhas foram mais precoces.

227 Uma outra observação de Macchi et al. (2004) com o *Merluccis hubbsi*,
228 constataram que de dezembro a fevereiro o número de oócitos produzido por
229 peso-unidade da espécie não mudou. Já no mês de março a produção de
230 oócitos diminuiu consideravelmente coincidindo com aumento de atresia nas
231 gonadas. Este fato também foi observado para o *C. macropomum*, em que o
232 índice de produtividade (número de oócitos liberados/peso vivo) não mostrou
233 diferença entre os meses de novembro e dezembro, porém apresentou
234 diferença significativa entre o mês de março, provavelmente pelo aumento de
235 atresia folicular. Os mesmos autores relataram que a fecundidade do grupo de
236 peixes estudado foi correlacionada positivamente com o comprimento total,
237 peso total (sem ovários) e idade das fêmeas de *M. hubbsi*, com variação entre
238 100.000 (32 cm comprimento total) e 2.300.000 (87 cm comprimento total) de
239 oócitos hidratados.

240 Relacionadas com a idade, a variação na composição química dos
241 oócitos de fêmeas de peixes foram encontrados em alguns estudos, mas não
242 parece ser um fenômeno universal. Em contraste, o tamanho do oócito pode
243 ser previsto a partir da idade da fêmea. Durante a estação reprodutiva o
244 tamanho do oócito pode variar entre sucessivos lotes. As relações positivas
245 entre tamanho da fêmea e tamanho do oócito, com o tamanho do alevino e
246 resistência a fome e a predação, é um caminho fundamental para relações pai-
247 ovo-progênie (Kamler, 2005).

248 As taxas de fertilização e eclosão não diferiram nos primeiros períodos de
249 novembro, dezembro e janeiro, porém a partir do mês de fevereiro houve
250 decréscimo dessas taxas. O mesmo comportamento foi observado por Barbieri
251 et al. (2000) com *Salminus maxillosus* selvagem, relatando o período de
252 desova de novembro a fevereiro. Fato também observado neste estudo, como

253 a pequena variação entre as taxas de fertilização e eclosão, podendo ser
254 explicado através dos fatores abióticos, como o índice pluviométrico.

255 Segundo Lowe-McConnel (1975), os teleósteos de regiões tropicais e
256 subtropicais possuem uma estreita relação entre o período reprodutivo e as
257 estações chuvosas. Para Munro (1990), existem evidências de que a
258 temperatura pode ser utilizada como fonte de informação sobre o advento de
259 condições adequadas para a desova.

260 A temperatura é um fator preponderante para que o processo reprodutivo
261 em peixes ocorra de modo regular. Em sobrepondo o gráfico de temperatura do
262 período estudado ao longo do ano, duas situações merecem observação; a
263 primeira, que no mês de agosto, quando ainda os peixes estão sob um período
264 latência do desenvolvimento embrionário. A segunda, já no período reprodutivo
265 a temperatura média se manteve estável, com um leve declínio de novembro
266 (2010) para março de 2011. Muito embora pareça ser pequena esta variação
267 de temperatura, porém ela pode ter sido um fator que potencializou o estresse,
268 decorrido dos sistemáticos arrastos para captura dos animais nos viveiros de
269 estocagem.

270 A importância, da temperatura e do fotoperíodo na reprodução de peixe, é
271 amplamente demonstrada em muitas espécies de peixes (Munro, 1990;
272 Bromage et al., 2001). Papadaki et al. (2008), estudando a qualidade dos
273 gametas de *Diplodus puntazzo*, observaram a ocorrência da desova entre as
274 temperaturas de 19 a 21°C, com a temperatura ótima de 21°C. Quando a
275 temperatura começou a cair, a desova também sofreu um decréscimo.

276 Mesmo em cativeiro, várias espécies de peixes possuem um
277 comportamento reprodutivo semelhante à natureza, os fatores abióticos como
278 temperatura da água e do ar, índices pluviométrico, influenciam
279 significativamente as mudanças na produção de gametas ao longo da estação
280 reprodutiva. Segundo Winters et al. (1993), dos ambientes físicos, a
281 temperatura da água do mar influencia a média do número e do tamanho de
282 oócitos produzidos em peixes. Já Querol et al. (2002), estudando *L.*
283 *platymetopon* e Melo et al. (1995) com *L. anus* observaram que de um modo
284 geral, as condições crescentes de temperatura estão ligadas ao período de
285 maior atividade reprodutiva, influenciando diretamente na maturação gonadal.

286 Aprofundamento nas pesquisas nesta área e repetição de avaliação dos
287 parâmetros quali-quantitativos dos oócitos de *C. macropomum*, em novas
288 estações reprodutivas, são necessários. Além de observações de novos
289 parâmetros como tamanho do oócito, quantidade de ácidos graxos nos oócitos,
290 número de oócitos/g de desova, ajudariam a explicar melhor a interação entre
291 os eventos biológicos com eventos ambientais.

292

293 **CONCLUSÕES**

294 Os parâmetros qualitativos dos oócitos de *C. macropomum* variaram
295 durante a estação reprodutiva, em peso de oócitos, índice de produtividade e
296 taxa de fertilização. Os melhores resultados foram observados nos períodos de
297 novembro, dezembro e janeiro, indicando melhor época para se realizar a
298 reprodução da espécie.

299

300 **AGRADECIMENTOS**

301 À piscicultura Boa Esperança (Pimenta Bueno-RO) e projeto Aquabrazil
302 (Embrapa), pela parceria na execução deste estudo.

303

304 **REFERÊNCIAS**

- 305 ALMATAR, S.M.; BAILEY, R.S. Variation in the fecundity and egg weight of
306 herring *Clupea harengus* L.: Part I. Studies in the Firth of Clyde and northern
307 North Sea. J. Cons. Int. Explor. Mer., v.45, p.113–124, 1989.
- 308 BARBIERI, G.; SALLES, F.A.; CESTAROLLI, M.A. Influência dos fatores
309 abióticos na reprodução do dourado, *Salminus maxillosus* e do curimatá
310 *Prochilodus lineatus* do Rio Mogi Guaçu (Cachoeira de Emas,
311 Pirassununga/SP). Acta Limnol. Bras., v.12, p.85-91, 2000.
- 312 BAXTER, I.G. Fecundities of winter–spring and summer– autumn herring
313 spawners. J. Cons. Int. Explor. Mer., v.25, p.73–80, 1959.
- 314 BOBE, J.; LABBÉ, C. Egg and sperm quality in fish. General Comp. Endoc.,
315 v.165, p.535–548, 2010.
- 316 BORGHETTI, N.R.B.; OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J.R. Aqüicultura: uma
317 visão geral sobre a produção de organismos aquáticos no Brasil e no mundo.
318 Curitiba: Grupo Integrado de Aqüicultura e Estudos Ambientais, p.128, 2003.
- 319 BROMAGE N; PORTER M.; RANDALL C. The environmental regulation of
320 maturation in farmed finfish with special reference to the role of photoperiod and
321 melatonin. Aquaculture, v.197, p.63-98, 2001.

- 322 BROMAGE, N.R. Broodstock management and seed quality general
323 considerations. In: BROMAGE, N.R.; ROBERTS, R.J. (eds.) Broodstock
324 Management and Egg and Larval Quality. Blackwell Science, Oxford, 1995.
- 325 BROMAGE, N.R.; ROBERTS, R.J. (eds) Broodstock Management and Egg and
326 Larval Quality. Blackwell Science Ltd., Oxford, 1995.
- 327 BROOKS, S.; TYLER, C.R.; SUMPTER, J.P. Egg quality in fish: what makes a
328 good egg? *Revi. Fish Biol. Fish.*, v.7, p.387–416, 1997.
- 329 BURD, A.C.; HOWLETT, G.J. Fecundity studies on North Sea herring. *J. Cons.*
330 *Int. Explor. Mer.*, v.35, p.107–120, 1974.
- 331 CAMPBELL, P.M.; POTTINGER, T.G.; SUMPTER, J.P. Stress reduces the
332 quality of gametes produced by rainbow trout. *Biol. Reprod.*, v.47, p.1140–1150,
333 1992.
- 334 CARRILLO, M.; ZANUY, S.; OYEN, F.; CERDA, J.; NAVAS, J.M.; RAMOS, J.
335 Some criteria of the quality of the progeny as indicators of physiological
336 broodstock fitness. In: Basurco, B. (Ed.), *Cahiers Options Me´diterrane ´ennes*,
337 vol. 47. Mediterranean Marine Aquaculture Finfish Species Diversification.
338 CIHEAM, Zaragoza, Spain, pp. 61– 74, 2000.
- 339 CHAMBERS, R.C; WAIWOOD, K.G. Maternal and seasonal differences in egg
340 sizes and spawning characteristics of captive Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Can.*
341 *J. Fish. Aquat. Sci.*, v.53, p.1986–2003, 1996.
- 342 CHRISTIANSEN, R.; TORRISSEN, O.J. Effects of dietary astaxanthin
343 supplementation on fertilization and egg survival in Atlantic salmon (*Salmo salar*
344 L.). *Aquaculture*, v.153, p.51– 62 1997.
- 345 HAY, D.E.; BRETT, J.R.; BILINSKI, E.; SMITH, D.T.; DONALDSON, E.M.;
346 HUNTER, G.A.; SOLMIE, A.V. Experimental impoundments of prespawning
347 Pacific herring *Clupea harengus pallasii*: effects of feeding and density on
348 maturation, growth, and proximate analysis. *Can. J. Fish. Aquatic Sci.*, v.45,
349 p.388–398, 1988.
- 350 HETTLER, W. Spawning and rearing Atlantic menhaden. *Prog. Fish Culture*,
351 v.43, p.80–84, 1981.
- 352 HORWOOD, J.W.; GREER WALKER, M.; WITTHAMES, P. The effect of
353 feeding levels on the fecundity of plaice *Pleuronectes platessa*. *J. Mar. Biol.*
354 *Ass.*, v.69, p.81–92, 1989.
- 355 KAMLER, E. Early life history of fish. In: Chapman and Hall Fish and Fisheries
356 Series. Chapman & Hall, London, 1992.
- 357 KAMLER, E. Parent–egg–progeny relationships in teleost fishes: an energetic
358 perspective. *Rev. Fish Biol. Fish.*, v.15, p.399–421, 2005.
- 359 KELLY, K.H.; STEVENSON, D.K. Fecundity of Atlantic herring *Clupea harengus*
360 from three spawning areas in the northern Gulf of Maine, 1969 and 1982. *J. N-*
361 *W Atl. Fish. Sci.*, v.6, p.149–155, 1985.
- 362 KJORSVIK, E.; MANGOR-JENSEN, A.; HOLMEFJORD, I. Egg quality in fishes.
363 *Advan. Marine Biol.* v.26, p.71–113, 1990.
- 364 KRAUS, G.; MÜLLER, A.; TRELLA, K.; KÖSTER, F.W. Fecundity of Baltic
365 cod:temporal and spatial variation. *J. Fish Biol.*, v.56, p.1327–1341, 2000.

- 366 LAINE, P.; RAJASILTA, M. Changes in the reproductive properties of Baltic
367 herring females during the spawning season. *Fish. Research*, v.36, p.67–73,
368 1998.
- 369 LOPERA-BARRERO, N. M.; RIBEIRO, R. P.; POVH, J. A. Produção de
370 organismos aquáticos: uma visão no Brasil e no mundo. Guaíba, RS:
371 Agrolivros, 320 p, 2011.
- 372 LOWE-MCCONNEL, R.H. Fish communities in tropical freshwater. Longman,
373 London, 1975.
- 374 MACCHI, G.J.; PÁJARO, M.; EHRLICH, M. Seasonal egg production pattern of
375 the Patagonian stock of Argentine hake (*Merluccius hubbsi*). *Fish. Research*,
376 v.67, p.25–38, 2004.
- 377 MELO, J.F. DE.; QUEROL, M.V. Dados preliminares sobre biologia e
378 reprodução de cascudo viola *Loricariichthys anus* (Pisces, Loricariidae) na
379 região Uruguaiana, RS, Brasil. *Hifen*, v.19, p.34-37, 1995.
- 380 MESSIEH, S.N. Fecundity studies on Atlantic herring from the southern Gulf of
381 St. Lawrence and along the Nova Scotia Coast. *Trans. Am. Fish. Soc.*, v.105,
382 p.384–394, 1976.
- 383 MUNRO, A.D. Tropical freshwater fish. In. MUNRO, A.D.; SCOTT, A.P. & LAM,
384 T.J. Reproductive seasonality in teleosts: environmental influences. CRC Press,
385 p.145-239, 1990.
- 386 PAPADAKI, M.; PAPADOPOULOU, M.; SIGGELAKI, I.; MYLONAS, C. C. Egg
387 and sperm production and quality of sharpsnout sea bream (*Diplodus puntazzo*)
388 in captivity. *Aquaculture*, v.276, p.187–197, 2008.
- 389 PAVLIDIS, M.; GREENWOOD, L.; SCOTT, A.P. The role of sex ratio on
390 spawning performance and on the free and conjugated sex steroids released
391 into the water by common dentex (*Dentex dentex*) broodstock. *Gen. Comp.*
392 *Endoc.*, v.138, p.255–262, 2004.
- 393 QUEROL, M.V.M., QUEROL, E.; GOMES, N.N.A. Fator de condição Gonadal,
394 índice Hepatossomático e Recrutamento como Indicadores do período de
395 reprodução de *Loricariichthys platymetopon* (Osteichthyes, Loricariidae) Bacia
396 do Rio Uruguai Médio, Sul do Brasil. *Iheringia*, v.92, p.79-84, 2002.
- 397 ROMAGOSA, E.; PAIVA, P.; GODINHO, H.M. Desenvolvimento dos ovócitos
398 de *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1987) (= *Colossoma mitrei* Berg, 1985)
399 em condições de cultivo intensivo. *Ciê. Cult.*, v.63, p.60-64, 1988.
- 400 SINCLAIR, M.; TREMBLEY, M.J. Timing of spawning of Atlantic herring
401 *Clupea harengus harengus*, populations and the match–mismatch theory. *Can.*
402 *J. Fish. Aquatic Sci.*, v.41, p.1055–1065, 1985.
- 403 SOLIMAN, A.K.; JAUNCEY, K.; ROBERTS, R.J. The effect of varying forms of
404 dietary ascorbic acid on the nutrition of juvenile tilapias (*Oreochromis niloticus*).
405 *Aquaculture*, v.52, p.1-10, 1986.
- 406 STEFFENS, W. Principles of fish nutrition. Chichester: Ellis Harwood, 1989.
- 407 TVEITEN, H.; SOLEVAG, S.; JOHNSEN, H. Holding temperature during the
408 breeding season influences final maturation and egg quality in common wolffish.
409 *J. Fish Biol.*, v.58, 2001.

- 410 TYLER, C.R.; SUMPTER, J.P. Oocyte growth and development in teleosts.
411 Rev. Fish Biol. Fish., v.6, p.218–287, 1996.
- 412 URBINATI, E.C.; GONÇALVES, F.D. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In:
413 BALDISSEROTO, B. GOMES, L.C. **Espécies nativas para a piscicultura no**
414 **Brasil**. Santa Maria: UFSM, 2005. p. 225-246.
- 415 WATANABE, T. Importance of the study of broodstock nutrition for further
416 development of aquaculture. In: COWEY, C.B.; MACKIE, A.M.; BELL, J.G.
417 Eds., Nutrition and Feeding in Fish. Academic Press, London, 1985. p.395–
418 414.
- 419 WINTERS, G.H.; WHEELER, J.P.; STANSBURY, D. Variability in the
420 reproductive output of spring-spawning herring in the northwest Atlantic. ICES
421 J. Mar. Sci., v.50, p.15–25, 1993.
- 422 WOYNAROVICH, E.; HORVÁTH, L. The artificial propagation of warm-water
423 finfish: a manual for extension. Rome: FAO, 1980.

CAPÍTULO IV

Avaliação do perfil proteico do plasma seminal com a qualidade do sêmen de *Colossoma macropomum* congelado

(Trabalho nas normas da Revista Animal Reproduction Science)

1 **Avaliação do perfil proteico do plasma seminal com a qualidade do sêmen de**
2 ***Colossoma macropomum* congelado**

3 **Evaluation of the protein outline of the seminal plasma with the quality of the**
4 **frozen semen of *Colossoma macropomum***

5 **Perfil proteico do plasma seminal**

6
7 **Resumo:** Objetivando analisar a associação entre a presença de proteínas no
8 plasma seminal do *C. macropomum* com indicadores de qualidade seminal pós-
9 descongelamento. Utilizaram 27 machos e 6 fêmeas de *C. macropomum*. O sêmen foi
10 criopreservado com diluidor à base de Beltsville Thawing Solution (BTS) com 8%
11 DMSO. Uma amostra de 200 µL de sêmen de cada animal foi diluída em 800 µL de
12 BTS, e centrifugada em 800 rpm, e somente o sobrenadante foi criopreservado para
13 posterior análise do perfil proteico do plasma seminal, através da eletroforese
14 unidimensional (SDS-PAGE). Decorridos 15 dias da criopreservação, uma palheta com
15 sêmen criopreservado foi descongelado para análise dos parâmetros quali-quantitativos.
16 Considerando todas as coletas, o SDS-PAGE identificou 15 bandas proteicas no plasma
17 seminal do *C. macropomum*. Quando se avaliou a interação (presença ou ausência) das
18 proteínas encontradas no plasma seminal, com os parâmetros espermáticos pós-
19 descongelamento, observou-se grande influência da presença das proteínas na qualidade
20 espermática. A maioria das proteínas encontradas no plasma seminal do *C.*
21 *macropomum* influenciou ($P < 0,05$) a motilidade progressiva do sêmen congelado com
22 DMSO. Em consequência, observou-se maior taxa de fertilização ($P < 0,05$) com a
23 presença das proteínas 12, 34, 44, 85 e 90 kDa. As proteínas do plasma seminal de *C.*
24 *macropomum* influenciaram na qualidade espermática após descongelamento, podendo

25 ser utilizadas como indicadores para a qualidade espermática após descongelamento,
26 principalmente as proteínas com peso molecular ≤ 50 kDa.

27 **Palavras-chave:** criopreservação; motilidade espermática; proteínas; taxa de
28 fertilização.

29

30 **Abstract:** Aiming to analyze the association among the presence of proteins in the
31 seminal plasma of the *C. macropomum* as an indicator of seminal quality post-thawing.
32 27 males and 6 females of *C. macropomum* were used. The semen was cryopreserved,
33 using Beltsville Thawing Solution (BTS) with 8% DMSO. A sample of 200 μ L of
34 semen of each animal, was diluted in 800 μ L of BTS, and centrifuged in 800 rpm, and
35 only the supernatant it was cryopreserved to subsequent analysis of the protein profile
36 of the seminal plasma, through the unidimensional electrophoresis (SDS-PAGE). After
37 15 days of the cryopreservation, a "pallet" with cryopreserved semen was thawed for
38 analysis of the quali-quantitative parameters. Considering all the collections, SDS-
39 PAGE identified 15 protein bands in the seminal plasma of the *C. macropomum*. When
40 the interaction was evaluated (presence or absence) of the proteins found in the seminal
41 plasma, with the spermatic parameters post-thawing, great influence of the proteins
42 presence was observed for sperm quality. Most of the proteins found in the seminal
43 plasma of the *C. macropomum* influenced ($P < 0.05$) the progressive motility of the
44 frozen semen with DMSO. In consequence, a larger fertilization rate was observed (P
45 < 0.05) with the presence of the proteins 12, 34, 44, 85 and 90 kDa. The proteins of the
46 seminal plasma of *C. macropomum* influenced the sperm quality post thawing, as well
47 as they can be used as indicators for the sperm quality post-thawing, mainly the proteins
48 with molecular weight ≤ 50 kDa.

49 **Key words:** cryopreservation; spermatic motility; proteins; fertilization rate.

50 **Introdução**

51

52 A preservação de gametas é considerada uma importante ferramenta para
53 laboratórios de produção de alevinos, pois, haverá economia na manutenção dos
54 reprodutores e prevenção de perdas de linhagens geneticamente melhoradas. Ainda,
55 facilitará no transporte de material genético entre laboratórios, dentro e fora do país e
56 maior cuidado na prevenção de transmissão de doenças, permitindo a introdução de
57 novas linhagens com risco mínimo de patógenos, nos peixes cultivados (Tiersch, 1995).

58 Considerando o efeito do processo de congelamento sobre a qualidade do sêmen,
59 torna-se importante estudar técnicas que identifiquem variações na resposta ao
60 congelamento entre diferentes machos e que permitam desenvolver testes para detectar
61 o seu potencial de congelabilidade. Nesse contexto, a composição proteica do plasma
62 seminal deve ser considerada como um fator importante a influenciar a fertilidade do
63 macho (Autiero et al., 1991; Strzeýek et al., 2005), já que em tilápias (*Oreochromis*
64 *niloticus*) foi identificada uma glicoproteína no plasma seminal com alto peso molecular
65 (120 kDa) como fator imobilizante dos espermatozoides (Mochida et al., 1999; Mochida
66 et al., 2002). Algumas dessas proteínas podem se constituir em marcadores bioquímicos
67 que permitam identificar indivíduos com maior ou menor potencial de fertilidade e
68 congelabilidade do sêmen (Autiero et al., 1991; Strzeýek et al., 2002; Jobim et al., 2004;
69 Zilli et al., 2005; Asadpour et al., 2007).

70 O plasma seminal, na maioria dos teleósteos, é um produto sintetizado nos
71 testículos e nos ductos espermáticos (Lahnsteiner et al., 1994), considerando que muitas
72 espécies não apresentam glândulas acessórias. Alguns componentes do plasma seminal
73 não são secretados, mas sim podem ser originados de células espermáticas em
74 decomposição (Ciereszko et al., 2000). O plasma seminal de peixes teleósteos tem

75 grande importância na fisiologia espermática. Sua composição mineral inibe a
76 motilidade espermática dentro dos ductos espermáticos e provêm um meio isotônico e
77 equilibrado para os espermatozoides (Morisawa & Suzuki, 1980; Cosson et al., 1999),
78 além de monossacarídeos e lipídios para recursos energéticos dos espermatozoides
79 (Lahnsteiner et al., 1994). De acordo com Loir et al. (1990), o constituinte orgânico em
80 maior abundância no fluido seminal de peixes teleósteos são as proteínas. Estudos
81 recentes ressaltam a importância das proteínas do plasma para os espermatozoides. Por
82 exemplo, em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) em que os espermatozoides foram
83 armazenados em solução salina semelhante a composição do fluido seminal, as taxas de
84 motilidade e velocidade natatória, que poderiam ser ativadas, aumentaram quando a
85 solução de armazenamento continha proteínas do plasma seminal, indicando que estas
86 estabilizam e viabilizam os espermatozoides (Lahnsteiner et al., 2004).

87 A composição molecular do plasma seminal possui características inerentes a cada
88 espécie, podendo diferir entre os tipos e a atuação das proteínas espermáticas. O plasma
89 seminal dos bovinos possui a família das proteínas designadas de BSP-A1/-A2 e BSP-
90 A3 (15-17 kDa), BSP-30 (28-30 kDa) (Manjunath, 1984), e FMP, relacionadas à
91 motilidade progressiva (37,5kDa). Em equinos, as proteínas HSP-1 (22-25 kDa), HSP-2
92 (25 kDa, pI 6,5-6,9), HSP-7 (14 kDa) e HSP-12 kDa pertencem à família das
93 espermadésinas, e a SP-1 possui correlação positiva com a fertilidade (Töpfer-Petersen
94 et al., 2004).

95 O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é a espécie endêmica mais produzida no
96 Brasil (Borghetti et al., 2003), sendo muito apreciado por seu sabor e considerado como
97 importante fonte de proteína animal, principalmente pelas comunidades tradicionais da
98 Amazônia (Menezes et al., 2008). Hoje o tambaqui é a principal espécie de importância
99 comercial da Amazônia, sendo uma das criações mais presentes em todo o Estado

100 Brasileiro. O estudo foi realizado para analisar a associação entre a presença de
101 proteínas do plasma seminal do *C. macropomum* com indicadores de qualidade seminal
102 pós-descongelamento.

103

104 **Material e métodos**

105 *Local*

106 O projeto foi executado em uma piscicultura comercial localizada em Pimenta
107 Bueno, Rondônia-Brasil (11°41'46 0,95 "S e 61°13'47.50" O), pelos Grupos de
108 Pesquisa: PeixeGen da Universidade Estadual de Maringá (UEM), *Aquam* da
109 Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e Laboratório de Patologia da
110 UFPEL, durante a estação reprodutiva do *C. macropomum* de janeiro a fevereiro de
111 2010 (30 dias).

112

113 *Animais e experimento*

114 Utilizaram 27 machos (6.4 ± 0.4 Kg e 4 ± 2 anos) e seis fêmeas (8.3 ± 0.5 Kg e
115 6 ± 2 anos) de tambaqui (*C. macropomum*). Os animais foram mantidos em viveiros, sob
116 condições ambientais, sendo alimentados com ração comercial com 36% de proteína
117 bruta e 2.900 kcal de energia digestível/kg de ração. Foram induzidos a reprodução com
118 extrato de hipófise de carpa de acordo com a posologia utilizada para espécies
119 reofílicas, sendo para fêmea 5,5 mg/kg de peso vivo, aplicando 10% na primeira
120 administração e o restante 12 horas após, e para macho 2,5 mg/kg peso vivo em dose
121 única, coincidindo com a segunda aplicação das fêmeas (Woynarovich & Horváth,
122 1980).

123

124 *Colheita e Análise de Sêmen*

125 Sete horas após a indução hormonal, o sêmen foi colhido em tubo cônico de 15
126 mL (um para cada animal), registrando-se o volume coletado, sendo evitada a
127 contaminação com fezes e/ou urina (Billard et al., 1995). Imediatamente após a colheita,
128 procedeu-se as avaliações seminais. Os parâmetros avaliados foram realizados conforme
129 Galo et al. (2011):

130 *Motilidade espermática:* foi observada em um microscópio ótico (40X), diluindo
131 20 µL de sêmen em 400 µL de água destilada em uma lâmina sob lamínula de
132 microscopia ótica, classificado com escore de 0 a 100%.

133 *Tempo de motilidade:* um cronômetro foi acionado quando se colocou 20 µL de
134 sêmen em contato com 400 µL de água destilada para análise da motilidade
135 espermática. Marcou-se o tempo decorrido até que o último espermatozoide parou de se
136 mover no campo ótico observado (40X).

137 A partir da diluição de 1:1000, sêmen:formol-salina tamponada, extensões foram
138 produzidas e coradas pelo método de Rosa de Bengala (Streit Jr. et al., 2004), contando
139 100 espermatozoides/extensão/animal em microscópio óptico de contraste de fase
140 (40X). Anormalidades consideradas primárias foram: cauda quebrada, enrolada e
141 degenerada, e as secundárias: cabeça solta, cauda dobrada e solta.

142

143 *Criopreservação de sêmen*

144 Após as avaliações espermáticas do sêmen fresco, foi criopreservado em solução
145 diluidora à base de Beltsville Thawing Solution BTS (Pursel & Johnson 1975). A
146 solução crioprotetora foi composta por BTS com 8% de Dimetil-Sulfóxido (DMSO)
147 (Varela Jr. et al., 2012). O sêmen e a solução crioprotetora foram homogeneizados, na
148 proporção de 1:4 (sêmen/solução), envasado em palhetas de 0,25 mL identificadas, e em
149 seguida alocados no botijão dry shipper (Taylor-Wharton, modelo CP 300 dry shipper),

150 para o resfriamento prévio. Decorridas 24 horas no dry shipper, foram transferidas para
151 botijão de nitrogênio líquido (MVE, modelo CP-34) (Taitson et al., 2008),
152 permanecendo estocadas por 15 dias.

153

154 *Descongelamento e análise do sêmen criopreservado*

155 Uma palheta com sêmen criopreservado foi descongelado por imersão em
156 banho-maria (45°C/5s) (Streit Jr. et al., 2006), para as análises da motilidade
157 espermática, tempo de motilidade, morfologia dos espermatozoides (Galo et al., 2011),
158 funcionalidade mitocondrial, integridade de DNA, da membrana espermática e
159 viabilidade celular (Varela Jr. et al., 2012).

160 A funcionalidade mitocondrial foi realizada através da coloração fluorescente
161 Rhodamine 123, juntando 10 µL de sêmen descongelado com 40 µL de solução de
162 trabalho de Rhodamina 123 (13µM), incubado a 20°C/10 min (Varela et al., 2012). A
163 integridade do DNA foi avaliada através da sonda acridine orange, adicionando-se 45 µL
164 de sêmen descongelado em 50 µL TNE (0,01 M Tris-HCl; 0,15 M NaCl; 0,001 M
165 EDTA; pH 7,2) e após 30 segundos, adicionou-se 200 µL de Triton solution (1X).
166 Passados 30 segundos, adicionou-se 50 µL de Acridine Orange (2 mg por mL em água
167 deionizada) e após 5 minutos foi avaliado, não ultrapassando 1 minuto de exposição da
168 lâmina montada (Varela Jr. et al., 2012).

169 Por sondas fluorescentes de diacetato de carboxifluoresceína – (CFDA) e iodeto
170 de propídio – (PI), foi obtida a integridade de membrana dos espermatozoides,
171 colocando 10 µL de sêmen descongelado e 40 µL de solução de trabalho, incubada a
172 20°C/10 min (Varela Jr. et al., 2012). As avaliações de funcionalidade de mitocôndria,
173 integridade de DNA e de membrana foram realizadas em microscópio de
174 epifluorescência (Olympus® BX 51, América INC, São Paulo - Brasil), obtido com 1

175 μL de solução com espermatozoides em lâmina de microscopia sob lamínula, avaliando
176 200 células/amostra. As taxas foram expressas através do percentual entre células
177 íntegras/funcionais sobre o total de células avaliadas.

178 A viabilidade celular foi obtida com os corantes histoquímicos eosina- nigrosina,
179 sendo o protocolo adaptado de Morisson et al. (1997). Uma fração de 10 μL de sêmen
180 diluído em BTS foi acrescida de 10 μL de solução de coloração (1,6 g de Eosina Y e 6 g
181 de nigrosina em BTS), homogeneizado e após dois minutos produzido o esfregaço. Com
182 a secagem das lâminas os espermatozoides foram observados em campo claro (BX41
183 Olympus®), com objetiva de imersão em óleo (100x), sendo os espermatozoides mortos
184 os corados em vermelho.

185

186 *Taxa de fertilização e eclosão*

187 Para avaliar a taxa de fertilização do sêmen criopreservado dos 27 animais, as
188 amostras de sêmen foram divididas em dois lotes. O primeiro lote, correspondente a 10
189 animais, foi usado para fertilizar os oócitos de 3 fêmeas, e o segundo lote relativo a 17
190 animais fertilizou os oócitos de 3 novas fêmeas, totalizando 30 combinações (sêmen x
191 oócitos) referente ao primeiro lote, e 51 combinações (sêmen x oócitos) no segundo
192 lote. Para cada alíquota de 2 g de oócitos uma palheta de 0,25 mL foi utilizada, sendo
193 homogeneizados, ativados e hidratados com oito mL de água. Outras duas alíquotas de
194 oócitos foram fertilizadas com sêmen fresco, coletado de outros dois machos no
195 momento da execução do teste (controle com sêmen fresco), totalizando 83
196 combinações. Das amostras com sêmen fresco foram utilizados 50 μL para que o
197 número de células espermáticas/oócito fosse similar aos tratamentos congelados.

198 Após a fertilização, os ovos foram depositados em incubadoras de três litros,
199 individualizadas para cada macho (sêmen x oócitos), e decorridos seis horas de

200 incubação ($T = 28 \pm 1^\circ\text{C}$), uma alíquota de ovos de cada incubadora foi retirada e
201 contabilizada a taxa de fertilização. Esta operação foi realizada três vezes,
202 contabilizando 100 ovos/amostra e assim a média correspondeu a *taxa de fertilização*.
203 Decorridos 12 horas da fertilização na temperatura média da água de $28 \pm 1^\circ\text{C}$, realizou-
204 se a contagem visual da *taxa de eclosão*, sendo contabilizados todos as larvas e ovos
205 gorados para determinar o percentual.

206

207 *Análise de proteínas*

208 Uma amostra de 200 μL de sêmen de cada animal foi diluída em 800 μL de BTS,
209 centrifugada em 800 rpm (rotação/minuto), e o resíduo (espermatozoides) foi descartado
210 e somente o sobrenadante (plasma seminal – proteínas) foi criopreservado em
211 nitrogênio líquido. Após a descongelação, o sobrenadante, foi novamente centrifugado a
212 10.000 x g/ 10 min, para a obtenção somente do plasma. Do plasma, retirou-se 10 μL e
213 adicionou-se 30 μL de H_2O deionizada e 20 μL de tampão de amostra, constituído de:
214 20% de Glicerol; 10% Tris-HCl 0,6173 M, pH 6,8 (Gibco-Invitrogen, Grand Island,
215 NY- USA); 2% β -Mercaptoetanol (Sigma Chemical 202 Company, St. Louis, MO -
216 USA); 20% Dodecil Sulfato de Sódio a 10% – SDS (Fisher Scientific, Suwanee, GA -
217 USA); 2,5 mg de Azul de Bromofenol (Synth, Diadema, SP - Brasil); e água
218 deionizada. Posteriormente, as amostras foram aquecidas a 100°C / 10 min, para
219 desnaturação das proteínas. A eletroforese unidimensional (SDS-PAGE) foi realizada
220 com o sistema BIORAD Mini-Protean 3 Cell® (Bio-Rad Laboratories, Califórnia,
221 USA), segundo Laemmli (1970), em géis de poliacrilamida (Gibco-Invitrogen, Grand
222 Island, NY - USA) concentrados a 8 e 15% (Manásková & Jonáková, 2008), e foi
223 utilizado o marcador molecular BenchMark Protein Ladder® (Gibco-Invitrogen, Grand
224 Island, NY - USA). Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue (Bio-Rad

225 Laboratories, Califórnia, USA)/20 minutos (Syntin et al., 1996). O processo de
226 descoramento dos géis foi feito em solução descorante constituída por 40% Metanol
227 (Synth, Diadema, SP - Brasil), 10% ácido acético glacial (Synth, Diadema, SP - Brasil)
228 e 50% água deionizada, por 1 h, em banho-maria, a 75°C. A análise foi baseada na
229 visualização e distinção das bandas proteicas formadas durante a eletroforese. Os dados
230 obtidos da eletroforese foram analisados pelo *software* TotalLab TL100®, v. 2006
231 (Nonlinear Dynamics, UK).

232

233 *Análise ultraestrutural dos espermatozoides – Microscopia eletrônica de transmissão*

234 Amostra de sêmen (fresco e congelado) de cada animal foi fixada em
235 glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato (0,1M; pH 7,2) e pós-fixadas em tetróxido de
236 ósmio a 1% em tampão fosfato (0,1M; pH 7,2) por 3 horas. Após desidratação, o
237 material foi incluído em araldite (Durcupan ACM, Fluka, Sigma-Aldrich, St. Louis,
238 USA) e na sequência, seções de 0,5 µm foram coradas com azul de toluidina para
239 escolha dos campos. A seguir seções de 50 a 70 nm foram contrastadas em acetato de
240 uranila e citrato de chumbo para posterior análise e fotodocumentação em microscópio
241 eletrônico de transmissão, marca CM100 (Eindhoven, The Netherlands).

242

243 *Análise Estatística*

244 Foi realizada uma análise de normalidade através do Teste de Shapiro-Wilk para
245 todas as variáveis, sendo que todas se comportaram de forma paramétrica. Assim,
246 procedeu-se uma análise de variância (ANOVA) com posterior comparação entre as
247 médias, utilizando o Teste de Tukey. Todas as análises estatísticas foram conduzidas
248 através do *software* Statistix 8.0® (2003).

249

250 **Resultados**

251

252 Os parâmetros espermáticos médios registrados para o sêmen “*in natura*” e
 253 criopreservado com DMSO do *C. macropomum* estão sumarizados na Tabela 1.

254

255 Tabela 1. Parâmetros seminais do *Colossoma macropomum* “*in natura*” e
 256 criopreservado.

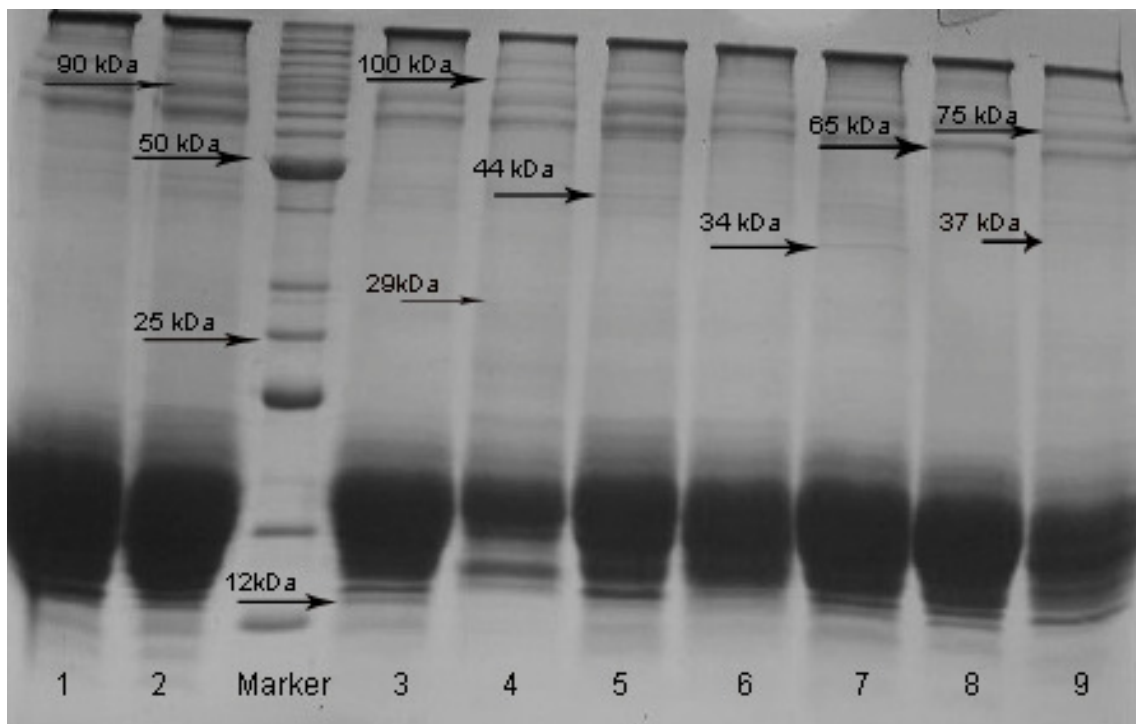
Parâmetros	"In natura"			Criopreservado		
	Média	Mínimo	Máximo	Média	Mínimo	Máximo
Motilidade espermática (%)	87,50±12,25	70,00	100,00	14,40±9,15	0,00	35,00
Tempo de motilidade (seg)	50,75±81,90	39,00	60,00	30,60±10,71	0,00	49,00
SPZ normais (%)	31,90±1,72	30,00	34,00	22,23±1,72	30,00	34,00
Anormalidades totais (%)	68,12±1,72	66,00	70,00	77,77±9,07	52,00	95,00
Anormalidades primárias (%)	50,00±2,72	47,00	54,00	55,76±10,25	28,00	71,00
Anormalidades secundárias (%)	18,12±2,58	16,00	23,00	22,01±7,90	13,00	48,00
Taxa de fertilização (%)	87,67±15,81	52,90	98,10	26,73±13,57	3,50	54,70
Taxa de eclosão (%)	83,25±23,60	40,4	100	27,65±16,76	2,10	69,60
Integridade de DNA (%)	-	-	-	95,43±3,96	80,00	99,00
Integridade de membrana (%)	-	-	-	55,18±18,39	12,00	98,00
Funcionalidade mitocondrial (%)	-	-	-	53,83±30,01	9,00	100,00
Viabilidade celular (%)	-	-	-	19,22±16,91	0,00	58,00

257 Médias ± EPM (erro padrão); Seg- segundos; SPZ – espermatozoides;

258

259 Considerando todas as coletas, o SDS-PAGE identificou 11 bandas proteicas, no
 260 gel de poliacrilamida 8% (12, 25, 29, 34, 37, 44, 50, 65, 75, 90 e 100 kDa) e 4 bandas
 261 no gel de poliacrilamida 15% (40, 70, 78 e 85 kDa), totalizando 15 bandas no plasma
 262 seminal do tambaqui *C. macropomum* (Fig. 1).

263



264
 265 Fig. 1. Eletroforese de gel de poliacrilamida (8% SDS-PAGE corado com Coomassie
 266 blue) de plasma seminal de *Colossoma macropomum* mostrando 9 animais (com peso
 267 molecular de 12 a 100 kDa).
 268

269 Quando se avaliou a interação (presença ou ausência) das proteínas encontradas
 270 no plasma seminal com os parâmetros espermáticos do *C. macropomum* congelado com
 271 DMSO, observou-se influência da presença das proteínas para a qualidade espermática
 272 (Tabela 2 e 3).

273 Tabela 2. Interação da presença ou ausência das proteínas no plasma seminal corridas em gel de poliacrilamida 8% sobre os parâmetros
274 espermáticos do *Colossoma macropomum* congelado.

Parâmetros		Proteínas - Gel com concentração de 8%										
		12 Kda	25 Kda	29 Kda	34 Kda	37 Kda	44 Kda	50 Kda	65 Kda	75 Kda	90 Kda	100 Kda
Motilidade progressiva (%)	presença	18,5±1,7 A	17,2±1,6 A	17,9±1,6 A	17,9±1,6 A	13,6	20,5±1,9 A	15,8±1,5 A	13,3	16,2±1,5 A	14,8	13,7
	ausência	9,1±1,5 B	8,0±1,7 B	9,0±1,7 B	9,0±1,7 B	14,7	9,7±1,3 B	9,2±2,1 B	15,5	6,0±1,9 B	10,0	14,5
Tempo de motilidade (seg)	presença	32,8	31,6	32,6	33,4±1,6 A	29,6	33,4	30,8	30,2	33,6±1,2 A	29,8	36,7
	ausência	27,7	28,3	27,4	26,3±3,0 B	31,1	28,5	29,8	31,0	19,8±4,6 B	39,5	29,3
Taxa de fertilização (%)	presença	30,5±2,4 A	28,9	28,7	30,4±2,2 A	23,6	31,8±2,9 A	28,0	27,6	26,2	28,5±2,0 A	23,0
	ausência	21,2±3,3 B	20,9	23,2	20,2±3,6 B	28,2	22,5±2,6 B	22,5	25,8	28,9	9,3±4,3 B	27,6
Taxa de eclosão (%)	presença	32,2±3,4 A	30,7±3,2 A	30,4	31,2	25,3	31,8	29,9	29,8	28,4	29,2±2,6 A	28,4
	ausência	21,1± 3,2 B	19,4±2,8 B	22,9	21,4	28,7	24,2	19,9	25,5	24,0	12,2±4,3 B	27,5
Espermatozóides normais (%)	presença	24,5±2,0 A	22,4	24,4±1,8 A	24,1	24,4	24,5	22,4	22,6	23,8±1,4 A	22,2	25,3
	ausência	19,0±1,5 B	21,8	18,4±1,6 B	19,0	21,2	20,3	21,8	21,8	15,0±2,8 B	23,0	21,6
Anormalidade espermática (%)	presença	75,5±2,0 B	77,6	75,6±1,8 B	75,9	75,6	75,5	77,6	77,4	76,2±1,4 B	77,8	74,7
	ausência	81,0±1,5 A	78,2	81,6±1,6 A	81,0	78,8	69,7	78,2	78,1	85,0±2,9 A	77,0	78,4
Integridade de membrana (%)	presença	50,8	48,2±3,0 B	48,1±3,2 B	54,2	43,9±5,4 B	51,1	51,0±3,8 B	55,2	51,2±3,3 B	57,6±3,7 A	39,7±9,3 B
	ausência	61,4	70,1±8,3 A	67,6±7,6 A	56,9	60,5±4,7 A	58,6	69,4±9,8 A	55,2	73,0±3,3 A	31,0 ±19 B	58,6±4,0 A
Funcionalidade mitocondrial (%)	presença	45,0	41,3±6,1 B	42,6±6,8 B	48,6	47,1	43,3	47,7±7,0 B	55,0	52,7	53,8	34,0
	ausência	65,3	82,4±8,0 A	71,3±9,7 A	62,0	56,7	61,9	75,8±9,8 A	52,5	57,8	54,5	58,0
Integridade de DNA (%)	presença	96,3	96,1	96,3	96,4	96,5	96,6	95,2	94,8	95,4	96,2±0,4 A	91,0±5,5 B
	ausência	94,2	94,0	94,2	93,9	95,0	94,6	96,2	96,2	95,6	80,0±0,1 B	96,2±0,5 A
Viabilidade celular (%)	presença	13,8	13,6±3,5 B	14,8	16,9	22,7	12,1	13,7±3,1 B	16,3	19,2	19,1	20,2
	ausência	26,3	32,1±6,3 A	26,1	22,8	18,6	24,7	39,2±6,2 A	22,3	19,4	20,0	19,0

Médias ± EPM (erro padrão) com letras diferentes na coluna diferem por P<0,05; seg - segundos;

277 Tabela 3. Interação da presença ou ausência das proteínas encontradas no plasma
 278 seminal corridas em gel de poliacrilamida 15% sobre os parâmetros
 279 espermáticos do *Colossoma macropomum* congelado.

Parâmetros		Proteínas - Gel com concentração de 15%			
		40 Kda	70 Kda	78 Kda	85 Kda
Motilidade progressiva (%)	presença	17,5	15,0	13,4	15,0
	ausência	13,7	14,2	19,0	13,3
Tempo de motilidade (seg)	presença	30,5	32,8	30,2	31,3
	ausência	30,6	30,0	32,7	29,2
Taxa de fertilização (%)	presença	31,6	32,2	26,8	29,5±2,3 A
	ausência	25,6	25,1	26,4	20,7±3,8 B
Taxa de eclosão (%)	presença	38,8±3,5 A	35,9	27,5	30,1
	ausência	25,1±2,8 B	25,2	28,5	22,5
Espermatozoides normais (%)	presença	20,5	18,8	21,3	21,5
	ausência	22,6	23,2	26,5	23,7
Anormalidade espermática (%)	presença	79,5	81,2	78,7	78,5
	ausência	77,4	76,8	73,5	76,3
Integridade de membrana (%)	presença	50,5	55,4	54,2	54,5
	ausência	56,2	53,9	61,0	56,4
Funcionalidade mitocondrial (%)	presença	48,7	50,2	56,0	55,3
	ausência	54,9	54,8	43,5	51,0
Integridade de DNA (%)	presença	96,5	96,4	95,8	95,1
	ausência	95,2	95,1	93,3	96,2
Viabilidade celular (%)	presença	14,5	23,0	21,4	19,9
	ausência	20,2	18,2	9,0	17,9

280 Médias ± EPM (erro padrão) com letras diferentes na coluna diferem por P<0,05; seg – segundos;

281
 282
 283 A maioria das proteínas do plasma seminal do *C. macropomum* influenciou
 284 (P<0,05) positivamente a motilidade progressiva do sêmen congelado com DMSO
 285 (Tabela 2). Em consequência, observou-se uma maior taxa de fertilização com a
 286 presença das proteínas: 12, 34, 44, 85 e 90 kDa. A taxa de eclosão foi melhor (P<0,05)
 287 com a presença das proteínas 12, 25, 40 e 90 kDa.

288 A porcentagem de espermatozoides normais (%) em sêmen descongelado de *C.*
 289 *macropomum* foi maior (P<0,05) com a presença das proteínas 12, 29 e 75 kDa no
 290 plasma seminal deste animal, refletindo na porcentagem de anormalidades espermática
 291 totais.

292 Já para integridade de DNA, a presença das proteínas de maior peso, 90 e 100
293 kDa foram as únicas com interação dos parâmetros seminais pós-descongelamento. A
294 presença da proteína 90 kDa produziu uma maior ($P<0,05$) taxa de integridade de DNA,
295 ao contrário do observado com a presença da proteína 100 kDa. Nos parâmetros
296 espermáticos de integridade da membrana (%) e funcionalidade mitocondrial (%) foram
297 registrados porcentagem maior ($P<0,05$) com a ausência das proteínas: 25, 29, 37, 50,
298 75 e 100 kDa. A ausência das proteínas 25 e 50 kDa influenciaram positivamente a
299 viabilidade celular dos espermatozoides.

300 A presença da proteína 12 kDa influenciou ($P<0,05$) a motilidade progressiva,
301 porcentagem de espermatozoides normais e anormais, e conseqüentemente a taxa de
302 fertilização e eclosão. A interação do parâmetro tempo de motilidade (seg) observou-se
303 apenas com as proteínas 34 e 75 kDa ($P<0,05$). Já as proteínas 65, 70 e 78 kDa não
304 influenciaram ($P>0,05$) nos parâmetros do sêmen criopreservado de *C. macropomum*.

305 Nenhuma proteína foi observada em todas as amostras de plasma seminal. Apenas
306 a proteína 40 kDa foi notada em 81,5% das amostras. Porém, a proteína 90 kDa foi
307 ressaltada somente em quatro amostras (14,8%) (Tab. 4).

308

309

310

311

312

313

314

315

316

317 Tabela 4. Distribuição de frequência das bandas proteicas detectadas através de SDS-
318 PAGE, no plasma seminal de *Collossoma macropomum*.

Bandas	Peso Molecular (kDa)	Frequência de Bandas em 27 amostras (tambaqui)
1	12	40,7 (11)
2	25	33,3 (9)
3	29	40,7 (11)
4	34	40,7 (11)
5	37	66,7 (18)
6	40	81,5 (22)
7	44	59,3 (16)
8	50	18,5 (5)
9	65	44,4 (12)
10	70	77,8 (21)
11	75	18,5 (5)
12	78	22,2 (6)
13	85	40,7 (11)
14	90	14,8 (4)
15	100	77,8 (21)

319 Amostras entre parênteses – número de animais que apresentam aquela proteína;

320

321 **Discussão**

322

323 Em recentes anos, inúmeras proteínas do plasma seminal são identificadas e
324 caracterizadas (Moreau et al., 1999), e diversas associadas com a fertilidade em várias
325 espécies (Ayyagari et al., 1987; Kraus et al., 2001). A identificação das proteínas do
326 plasma seminal tem mérito considerável, pois podem ser usadas para predizer a
327 fertilidade, tanto para aumentar como prevenir (preservativo) (Killian, et al., 1993).

328 Correlação entre proteínas do plasma seminal e fertilidade de machos já foi
329 informado para algumas espécies de animais domésticos como touro (Killian et al.,
330 1993), carneiro (Jobim al et., 2005), bode (Villemure et al., 2003), equinos e suínos
331 (Calvete et al., 1997). A presença de fatores de proteína no plasma seminal, foi descrita
332 para algumas espécies de peixe também, tal como *Oreochromis niloticus* (Mochida et
333 al., 2002), *Oncorhynchus mykiss* (Loir et al., 1990; Lahnsteiner et al., 2004; Lahnsteiner,
334 2006); *Cyprinus carpio* (Kowalski et al., 2003). Em alguns estudos (Mochida et al.,
335 1999; Lahnsteiner et al., 2004; Lahnsteiner, 2006), os fatores de proteína identificados

336 foram associados a parâmetros de qualidade de esperma. Porém, uma pequena
337 informação sobre proteínas do plasma seminal está disponível para peixes nativos
338 brasileiros (Campos et al., 2006).

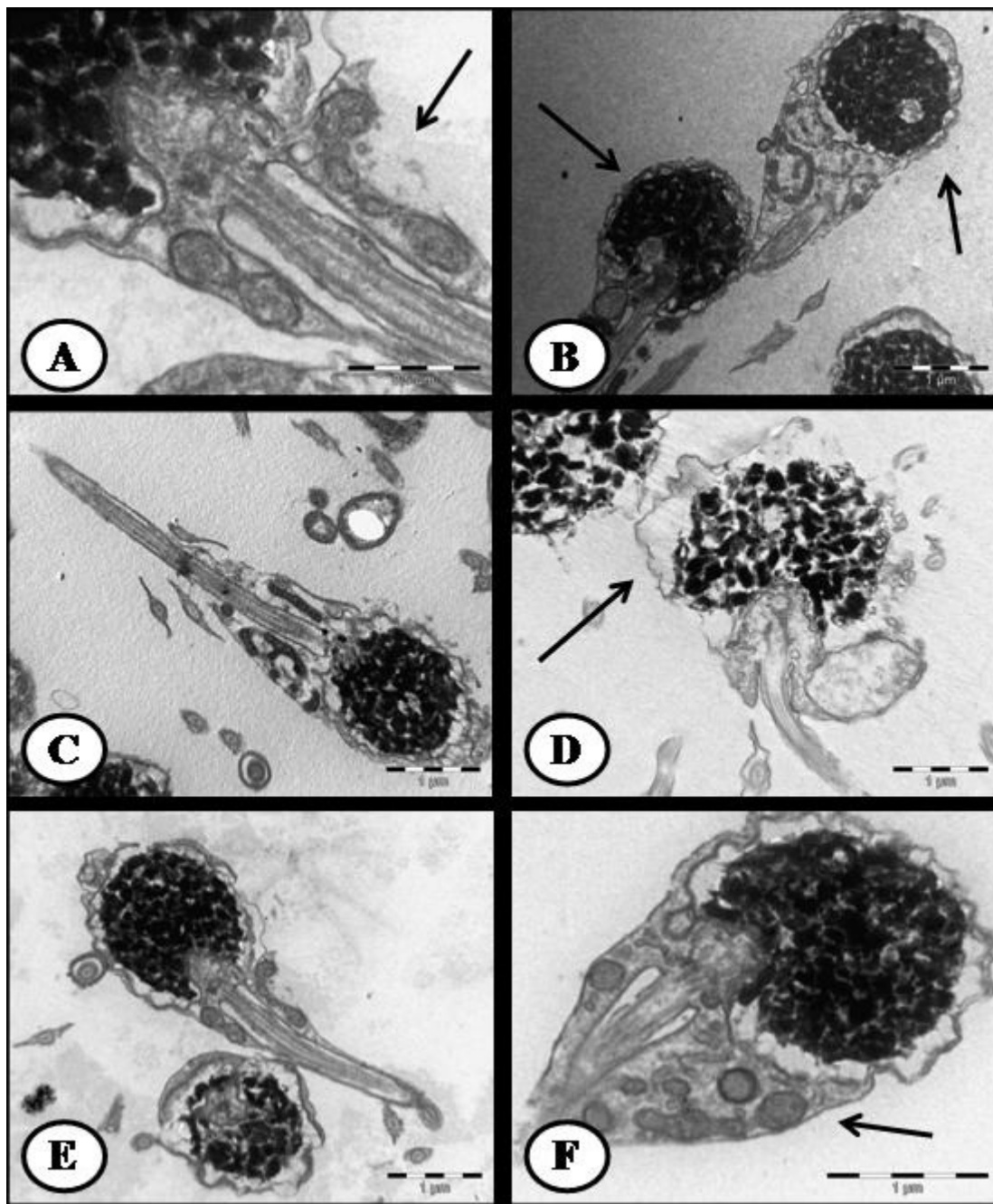
339 No presente estudo, a maioria das proteínas com peso molecular igual ou <50 kDa
340 (12, 25, 29, 34, 44 e 50 kDa) esteve associada com a melhora na motilidade progressiva,
341 ou seja, com a presença das proteínas ocorreram maiores taxas de motilidade
342 espermática no sêmen pós-descongelamento de *C. macropomum*. Fato relatado por
343 Lahnsteiner et al. (2004) que observaram no estudo com *Oncorhynchus mykiss*, que no
344 meio diluidor contendo PPS (proteínas do plasma seminal) com peso molecular <50
345 kDa, ocorreram maiores taxas de motilidade e velocidade espermática em relação ao
346 diluidor contendo proteínas de >50 kDa. Em búfalos, Asadpour et al. (2007)
347 descreveram variação semelhante no conteúdo proteico do plasma seminal, relatando
348 que uma proteína com peso molecular de 24,5 kDa seria relacionada com maior
349 motilidade progressiva. No sêmen de *C. macropomum* a proteína 12 kDa foi a com
350 maior ($P<0,05$) interação dos parâmetros de qualidade seminal. Jobim et al. (2003)
351 observaram que as proteínas <15 kDa, estão envolvidas na manutenção da motilidade
352 espermática. Assim como em equinos, a presença de PSPs com peso molecular aparente
353 de 19,6 e 15,3 kDa, estariam relacionada ao aumento da motilidade progressiva do
354 sêmen, tanto *in natura*, quanto após incubação pós-congelamento (Frazer et al., 1996).

355 Souza et al. (2007) estudando a correlação das características do sêmen canino
356 com as proteínas do plasma seminal, notaram uma correlação positiva ($r=0,55$ e $r=0,59$)
357 das bandas 58,6 e 67 kDa, com a porcentagem de espermatozoides normais. Já
358 Asadpour et al. (2007) relataram também que em búfalos, uma proteína com 45 kDa,
359 associa-se com a morfologia espermática anormal, após o descongelamento.

360 Foram encontradas no presente estudo três proteínas associadas com a morfologia
361 espermática (12, 29 e 75 kDa), em que a presença dessas proteínas, no sêmen após
362 descongelamento, está associada com a menor taxa de anormalidades espermáticas
363 totais, conseqüentemente um maior percentual de espermatozoides normais. Porém,
364 observou-se que na ausência das proteínas 29 e 75 kDa apresentaram maior taxa de
365 integridade de membrana e funcionalidade mitocondrial. Apesar da presença destas
366 proteínas favorecerem a porcentagem de espermatozoides normais, sua ausência obteve
367 um maior percentual de membrana íntegra dos espermatozoides. Em bovinos existem
368 proteínas do plasma seminal (BSPs) que participam do sequestro dos lipídios
369 desestruturando a membrana e aumentando sua fluidez, ou seja, se associam à
370 membrana dos espermatozoides no momento da ejaculação, induzindo o efluxo de
371 colesterol e fosfolipídios da membrana espermática, que pode induzir a desestabilização
372 da mesma, diminuindo sua estabilidade frente aos processos de criopreservação de
373 sêmen utilizados atualmente (Therien et al., 1999). Porém a proteína em si não é ruim
374 para o restante dos parâmetros seminais.

375 A frequência das proteínas, 29 e 75 kDa, nas amostras de sêmen analisadas, foi de
376 40,7 e 18,5%, respectivamente. Observando assim 55,18% de espermatozoides com
377 membrana íntegra e 53,83% de espermatozoides com funcionalidade mitocondrial no
378 sêmen de *C. macropomum* após o descongelamento (Fig. 2).

379



380
 381 **Fig. 2** - Ilustrações de morfologias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão de
 382 espermatozoides de *Collossoma macropomum*. (A) e (E) membrana rompida na peça
 383 intermediária; (B) e (C) membrana da cabeça íntegra; (D) membranas rompidas na
 384 cabeça e na peça intermediária; (F) mitocôndria íntegra.

385
 386 Bianchi et al. (2008), estudando a associação do plasma seminal com a
 387 integridade de membrana plasmática (IMP) de espermatozoides suínos pós-
 388 descongelamento, detectaram que uma banda de 26,58 kDa esteve associada a baixa
 389 IMP. Deste modo os autores sugeriram que 88% das amostras que apresentavam IMP
 390 $\geq 55\%$, a banda de 26 kDa estava ausente. Assim como Corcini et al. (2012) relataram

391 que a presença da banda 100 kDa, no plasma seminal de suínos, foi associada com a
392 redução da integridade de membrana do sêmen pré-congelação e redução da motilidade
393 pós-congelação. Neste estudo, a presença das bandas 25 e 100 kDa representaram uma
394 redução ($P < 0,05$) da integridade da membrana no sêmen pós-descongelamento. As
395 bandas 29, 37, 50, e 75 kDa, foram associadas a baixa integridade de membrana, em que
396 a ausência dessas proteínas apresentavam integridade $>58\%$. A proteína 100 kDa
397 também esteve neste estudo associada com a redução da integridade de DNA.

398 Bianchi et al. (2008) informaram que em bancos de dados *in silico* foi encontrado
399 um grupo proteico com peso molecular de aproximadamente 26 kDa chamado
400 *Sialoproteínas*, que tem por função a inibição da aglutinação das cabeças dos
401 espermatozoides. Conforme Strzeýek et al. (2002), a deficiência desse grupo pode
402 comprometer o potencial espermático de fertilização. Usando eletroforese
403 bidimensional (2DPAGE), Flowers (2001) demonstrou a importância biológica das
404 proteínas 26 kDa e 55 kDa no plasma seminal de suínos, relacionadas com altas taxas
405 de parição, em torno de 86%. Killian et al. (1993) associaram quatro proteínas do
406 plasma seminal com a fertilidade de touros, sendo que duas proteínas (26 kDa e 55 kDa)
407 foram detectadas em touros de alta fertilidade. A proteína encontrada no presente
408 estudo, 25 kDa, foi a que esteve associada com a taxa de eclosão, além das proteínas 40
409 e 90 kDa. A proteína 90 kDa esteve associada com a integridade de DNA. Asadpour et
410 al. (2007) relataram que em búfalos a proteína com 55 kDa estava associada com a
411 viabilidade do sêmen *in natura*. As proteínas, neste estudo, que apresentaram
412 associação com a viabilidade celular do sêmen pós-descongelamento foram as de 25 e
413 50 kDa.

414 Estudos mais detalhados sobre a função das PSPs ainda são necessários, para
415 elucidar não apenas as implicações dos efeitos individuais, como também a influência

416 de outros fatores, como estação do ano, nutrição e idade. A identificação de potenciais
417 marcadores relacionados a parâmetros de fertilidade seria importante na seleção de
418 reprodutores para programas de fertilização artificial com sêmen congelado e formação
419 de bancos de germoplasma de animais selecionados.

420

421 **Conclusão**

422 As proteínas do plasma seminal de *C. macropomum* influenciaram na qualidade
423 espermática após descongelamento, podendo ser utilizadas como indicadores para a
424 qualidade espermática, principalmente, as proteínas com peso molecular ≤ 50 kDa, como
425 as proteínas 12, 25, 29, 34, 40, 44 e 50 kDa.

426

427 **Referências**

- 428 Asadpour, R., Alavi-Shoushtari, S.M., Asri Rezaii, S., Ansari, M.H.KH., 2007. SDS-
429 polyacrylamide gel electrophoresis of buffalo bulls seminal plasma proteins and their
430 relation with semen freezability. *Anim. Reprod. Sci.* 102, 308–313.
- 431 Autiero, M., Sansone, G., Abrescia, P., 1991. Relative ratios of lactoferrin, albumin, and
432 acid phosphatase seminal levels as sperm quality markers in fertile and infertile men. *J.*
433 *Androl.* 12, 91-200.
- 434 Ayyagari, R.R., Fazleabas, A.T., Dawood, M.Y., 1987. Seminal plasma proteins of
435 fertile and infertile men analyzed by two-dimensional electrophoresis. *Am. J. Obstet.*
436 *Gynecol.* 157, 1528–33.
- 437 Bianchi, I., Collares, T., Campos, V.F., Cavalcanti, P.V., Kaefer, C., Corrêa, E.K.,
438 Dellagostin, O.A., Lucia, Jr. T., Deschamps, J.C., Corrêa, M.N., 2008. Fator do plasma
439 seminal associado à integridade de membrana de espermatozoides suínos pós-
440 descongelamento. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 60, 384-388.
- 441 Billard, R., Cosson, J., Perchee, J., Linhart, O., 1995. Biology of sperm and artificial
442 reproduction in carp. *Aquaculture* 129, 95-112.
- 443 Borghetti, N.R.B., Ostrensky, A., Borghetti, J.R., 2003. *Aqüicultura: uma visão geral*
444 *sobre a produção de organismos aquáticos no Brasil e no mundo.* Curitiba: Grupo
445 Integrado de Aqüicultura e Estudos Ambientais, pp.128.
- 446 Calvete, J., Raida, M., Gentzel, M., Urbanke, C., Sanz, L., Topfer-Petersen, E., 1997.
447 Isolation and characterization of heparin- and phosphorylcholine-binding proteins of
448 boar and stallion seminal plasma. Primary structure of porcine pB1. *FEBS Lett.* 407,
449 201–206.

- 450 Campos, V.F., Cavalcanti, P.V., Kaefer, C., Silva, E.S., Seixas, F.K., Amaral, M.G.,
451 Lucia Jr., T., Deschamps, J.C, Collares, T. 2006. Comparação entre proteínas presentes
452 no plasma seminal de jundiás (*Rhamdia quelen*) cultivados e selvagens. XV Congresso
453 de Iniciação Científica – VIII Encontro de Pós-graduação, UFPEL.
- 454 Ciereszko, A., Glogowski, J., Dabrowski, K., 2000. Biochemical characteristics of
455 seminal plasma and spermatozoa of freshwater fishes. In: Cryopreservation in Aquatic
456 Species. Tiersch, T.R. and Mazik, P.M., (Eds). World Aquaculture Society, Baton
457 Rouge, Louisiana. pp 20-48.
- 458 Corcini, C.D., Varela Jr., A.S., Pigozzo, R., et al., 2012. Pre-freezing and post-thawing
459 quality of boar sperm for distinct portions of the ejaculate and as a function of protein
460 bands present in seminal plasma. *Livestock Sci.* 145, 28–33.
- 461 Cosson, J., Billard, R., Cibert, C., Dréanno, C., 1999. Ionic factors regulating the
462 motility of fish sperm in: *The Male Gamete* 16, 161-186.
- 463 Flowers, W.L., 2001. Relationship between seminal plasma proteins and boar fertility.
464 Raleigh, NC: Annual swine news, pp.1-4.
- 465 Frazer, G.S., Bucci, D.M., Brooks, C.L., 1996. Two-dimensional polyacrylamide gel
466 electrophoresis of bovine semen after cryopreservation in halfmillilitre straws.
467 *Theriogenology* 46, 1103-1115.
- 468 Galo, J. M., Streit-Jr, D. P., Sirol, R. N., Ribeiro, R. P, Digmayer, M., Andrade, V. X. L.
469 & Ebert, A.R. 2011. Spermatic abnormalities of piracanjuba *Brycon orbignyanus*
470 (Valenciennes, 1849) after cryopreservation. *Brazilian Journal Biology*, 71: 1-7.
- 471 Harrison, R.A.P., VICKERS, S.E., 1990. Use of fluorescent probes to assess membrane
472 integrity in mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 88, 343-352.
- 473 HE, S., WOODS, L.C., 2004. Effects of dimethyl sulfoxide and glycine on
474 cryopreservation induced damage of plasma membrane and mitochondria to striped bass
475 (*Morone saxatilis*) sperm. *Cryobiology* 48, 254–262.
- 476 Jobim, M.I.M., Oberts, E.R., Salbego, C.G., Souza, D.O., Wald, V.B., Mattos, R.C.,
477 2003. Proteínas de baixo peso molecular do plasma seminal bovino relacionadas com a
478 congelabilidade do sêmen através de eletroforese bidimensional em gel de
479 poliacrilamida. *Acta Sci. Vet.* 31, 21- 30.
- 480 Jobim, M.I.M., Oberst, E.R., Salbego, C.G., Souza, D.O., Wald, V.B., Tramontina, F.,
481 Mattos, R.C., 2004. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine
482 seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. *Theriogenology* 61,
483 255–266.
- 484 Jobim, M.I.M., Oberst, E.R., Salbego, C.G., Wald, V.B., Horn, A.P., Mattos, R.C., 2005.
485 BSP A1/A2 like proteins in RAM seminal plasma. *Theriogenology* 63, 2053–2062.
- 486 Killian, G.J., Chapman, D.A., Rogowski, L.A., 1993. Fertility-associated proteins in
487 Holstein bull seminal plasma. *Biol. Reprod.* 49, 1202–1207.
- 488 Kowalski, R., Glogowski, J., Kucharczyk, D., Goryczko, K., Dobosz, S., Ciereszko, A.,
489 2003. Proteolytic activity and electrophoretic profiles of proteases from seminal plasma
490 of teleosts. *J. Fish Biol.* 63, 1008-1019.
- 491 Kraus, M., Ticha, M., Jona´kova´, V. 2011. Heparin-binding proteins of human seminal
492 plasma homologous with boar spermadhesins. *J. Reprod. Immunol.* 51, 131–44.

- 493 Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head
494 bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- 495 Lahnstainer, F., 2006. Characterization of plasma proteins stabilizing the sperm viability
496 in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Anim. Reprod. Sci.* 97, 151-164.
- 497 Lahnsteiner, F., Mansour, N., Berger, B., 2004. Seminal plasma proteins prolong the
498 viability of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Theriogenology* 62, 801-
499 808.
- 500 Lahnsteiner, F., Patzner R., Weismann, T., 1994. The testicular main duct and the
501 spermatic duct in some cyprinid fishes II. Composition of the seminal fluid. *J. Fish Biol.*
502 44, 459-467.
- 503 Loir, M., Labbé, C., Maise, G., Pinson, A., Boulard, G., Mourot, B., Chambeyron, F.,
504 1990. Proteins of seminal fluid and spermatozoa of rainbow trout (*Oncorhynchus*
505 *mykiss*): partial characterization and variations. *J. Fish Phys. Bioch.* 8, 485-495.
- 506 Maňásková, P., Jonáková, V., 2008. Localization of porcine seminal plasma (PSP)
507 proteins in the boar reproductive tract and spermatozoa. *J. Reprod. Immunol.* 78, 40–48.
- 508 Manjunath, P., 1984. Gonadotropin release stimulatory and inhibitory proteins in Bull
509 seminal plasma. In: Sairam, M.R., Atkinson, L.E. (Eds.) *Gonadal proteins and peptides*
510 *and their biological significance*. Singapore: World Scientific, pp.49-61.
- 511 Menezes, J.T.B., Queiroz, L.J., Doria, C.R.C., Menezes Jr., J.B., 2008. Avaliação
512 espermática pós-descongelamento em tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier,
513 1818). *Acta Amazônica* 38, 365-368.
- 514 Mochida, K., Kondo, T., Matsubara, T., Adachi, S., Yamauchi, K., 1999. A high
515 molecular weight glycoprotein in seminal plasma is a sperm immobilizing factor in the
516 teleost Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Dev. Growth Differ.* 41, 619-627.
- 517 Mochida, K., Matsubara, T., Andoh, T., Ura, K., Adachi, S., Yamauchi, K., 2002. A
518 novel seminal plasma glycoprotein of a teleost, the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*),
519 contains a partial von Willebrand factor type D domain and a zona pellucida-like
520 domain. *Mol. Reprod. Dev.* 62, 57-68.
- 521 Moreau R, Manjunath P., 1999. Characterization of lipid efflux particles generated by
522 seminal phospholipid-binding proteins. *Bioch. Biophys. Acta* 1438, 175–84.
- 523 Morisawa, M., Suzuki, K., 1980. Osmolality and potassium ion: Their roles in initiation
524 of sperm motility in teleosts. *Science* 210, 1145-1147.
- 525 Morrison, S.J., Shah, N.M., Anderson, D.J., 1997. Regulatory mechanisms in stem cell
526 biology. *Cell* 88, 287–298.
- 527 Pursel, V.G., Johnson, L.A., 1975. Freezing of boar spermatozoa: Fertilizing capacity
528 with concentrated semen and a new thawing procedure. *J. Anim. Sci.* 40, 99-102.
- 529 Souza, F.F., Barreto, C.S., Lopes, M.D., 2007. Characteristics of seminal plasma
530 proteins and their correlation with canine semen analysis. *Theriogenology* 68, 100-106.
- 531 Statistix ®. Statistix for Windows User's manual. Tallahassee: Analytical software;
532 2003.
- 533 Streit Jr., D.P., Benites, C., Moraes, G.V., Ribeiro, R.P., Sakaguti, E.S., Caldieri, R.F.,
534 2006. Sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) criopreservado com diluentes
535 utilizados para sêmen de suínos. *Ciênc. Anim. Bras.* 7, 289-297.

- 536 Streit Jr., D.P., Moraes, G.V., Ribeiro, R.P., Povh, J.A., Souza, E.D., Oliveira, C.A. F.,
537 2004. Avaliação de diferentes técnicas para coloração de sêmen de peixes. Arquivos de
538 Ciência Veterinárias e Zoologia da Unipar 7, 157-162.
- 539 Strzeżek, J., Saiz-Cidoncha, F., Wysocki, P., Tyskiewicz, A., Jastrzebski., 2002.
540 Seminal plasma proteins as markers of biological value of boar semen. Anim. Scie. Pap
541 Rep. 22, 255 – 266.
- 542 Strzeżek, J., Wysocki, P., Kordan, W., Kuklinska, M., Mogielnicka, M., Soliwoda, D.,
543 Fraser, L., 2005. Proteomics of boar seminal plasma – current studies and possibility of
544 their application in biotechnology of animal reproduction. Reprod. Biol. 5, 279-290.
- 545 Syntin, P., Dacheux, F., Druart, X. 1996. Characterization and identification of proteins
546 secreted in the various regions of the adult boar epididymis. Biology of reproduct. 55,
547 956-974.
- 548 Taitson P.F., Chami E., Godinho H.P., 2008. Gene banking of the neotropical fish
549 *Leporinus obtusidens* (Valenciennes, 1836): A protocol to freeze its sperm in the field.
550 Anim R Anim Reprod. Sci. 105, 283–291.
- 551 Thérien, I., Moreau, R., Manjunath, P. 1999. Bovine seminal plasma phospholipid-
552 binding proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm. Biol. Reprod.
553 61,590-598.
- 554 Tiersch, T., 1995. Cryopreservation of fish sperm: Laboratory, hatchery and field
555 studies of twenty species. in July Goetz, F.W. and Thomas, P. (Eds.) Proceedings of the
556 Fish International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. University of
557 Texas At Austin – Austin, Texas pp. 2-8.
- 558 Töpfer-Petersen, E., Ekhlasi-Hundrieser, M., Kirchhoff, C., Leeb, T., Sieme, H. 2004.
559 The role of stallion seminal proteins in fertilization. Animal reprod. science, 89, 159-
560 170.
- 561 Varela Jr., A.S., Corcini, C.D., Gheller, S.M.M., Jardim, R.D., Lucia Jr., T., Streit Jr.,
562 D.P., Figueiredo, M.R.C. 2012. Use of amides as cryoprotectants in extenders for frozen
563 sperm of tambaqui, *Colossoma macropomum*. Theriogenology, 78, 244-251.
- 564 Villemure, M., Lazure, C., Manjunath, P., 2003. Isolation and characterization of
565 gelatin-binding proteins from goat seminal plasma. Reprod. Biol. Endocrinol. 1, 39–50.
- 566 Woynarovich, E.; Horváth, L. The artificial propagation of warm-water finfishes: a
567 manual for extension. Rome: FAO, 1980.
- 568 Zilli, L., Schiavone, R., Zonno, V., Rossano, R., Storelli, C., Vilella, S., 2005. Effect of
569 cryopreservation on sea bass sperm proteins. Biol. Reprod. 72, 1262–1267.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em conclusão, os parâmetros qualitativos do sêmen e oócitos de *C. macropomum* criados em cativeiros apresentaram mudanças durante a estação reprodutiva. As mudanças nos parâmetros qualitativos do sêmen estão associadas aos processos de envelhecimento dos espermatozoides no final da estação reprodutiva, levando a redução das taxas de fertilização e eclosão. Como observado, o melhor momento para a realização da reprodução e criopreservação do sêmen, são os primeiros dois meses do período de espermição. Já a quantidade de oócitos, índice de produção e taxa de fertilização, foram observados melhores resultados no meio do período reprodutivo (dezembro e janeiro), indicando uma melhor época para se realizar a reprodução da espécie. As proteínas do plasma seminal de *C. macropomum* apresentam influência na qualidade espermática pós-descongelamento, assim como podem ser utilizadas como indicadores para a qualidade espermática após descongelamento, principalmente as proteínas com peso molecular ≤ 50 kDa, como as proteínas 12, 25, 29, 34, 40, 44 e 50 kDa.