

# METODOLOGIAS PARA CRIOPRESERVAÇÃO E MECANISMOS DE AVALIAÇÃO DO SÊMEN DE PEIXES CHARACIFORMES

[Methodologies for cryopreservation and mechanisms of sperm evaluation in characiformes fish]

**Carmina Sandra Brito Salmito-Vanderley<sup>1\*</sup>, João Paulo Silva Pinheiro<sup>1</sup>, Priscila Silva de Almeida<sup>1</sup>, Júlia Trugilio Lopes<sup>1</sup>, Liliane Veras Leite<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Universidade Estadual do Ceará, Laboratório de Biotecnologia da Reprodução de Peixes. \*Autor para correspondência: E-mail: sandra.salmito@uece.br

**RESUMO** - A criopreservação de sêmen é uma técnica que permite o armazenamento dos gametas a longo prazo. Existem várias metodologias para obter sucesso na criopreservação de sêmen de peixes, e podem ser variáveis dependendo da espécie. O objetivo deste trabalho foi fazer um levantamento das metodologias mais utilizadas na criopreservação e os mecanismos de avaliação de sêmen de peixes Characiformes. Um dos pontos mais importantes é a utilização do diluidor, composto por diluente e crioprotetor intra e/ou extracelular, com intuito de proteger os espermatozoides contra crioinjúrias. Os principais componentes de um diluidor utilizado para Characiformes são: diluente glicose 5%; crioprotetor interno o dimetilsulfoxido ou metilglicol; e crioprotetor externo a gema de ovo. Em relação aos equipamentos utilizados para redução da temperatura, o mais utilizado é o *Dry shipper*. As formas de avaliação do sêmen mais importantes após a descongelação são: taxa de motilidade e morfologia espermática.

**Palavras-Chave:** congelamento; reprodução; espermatozoide.

**ABSTRACT** - The sperm cryopreservation is a technique that allows the storage of gametes over a long term. Several methodologies can be employed to reach a successful fish sperm cryopreservation, and they may vary depending on the species. The objective of this study was to survey the most widely used methodologies for cryopreservation of Characiformes fish sperm. One of the most important points is to use a freezing solution which is composed by an extender and an intra/extracellular cryoprotectant in order to protect the sperm against cryodamages. The main components of freezing solutions used to Characiformes are the extender glucose 5%, the internal cryoprotectant dimethylsulfoxide or methylglycol, and egg yolk as an external cryoprotectant. Regarding the equipment used to reduce the temperature, the most used is the dry shipper. The most important forms of sperm quality assessment after thawing are motility rate and sperm morphology.

**Key-words:** freezing; reproduction; sperm.

## INTRODUÇÃO

A criopreservação é uma técnica que permite o armazenamento dos gametas em nitrogênio líquido a -196 °C, mantendo-se a viabilidade estrutural e funcional dos gametas por tempo indefinido (Felizardo, 2008).

Os benefícios da criopreservação consistem em: a) fornecer subsídios para a formação de bancos de germoplasma, a fim de garantir a diversidade e a preservação do material genético de espécies de interesse econômico e ambiental; b) trocar material genético entre as explorações piscícolas, evitando o transporte de animais; c) disponibilizar sêmen em períodos menos favoráveis, evitando assim o problema de assincronia da maturação gonadal; d) economizar o sêmen, permitindo o uso do volume

total do sêmen disponível, principalmente quando é difícil obtenção e, quando grandes quantidades volume de sêmen são retiradas em cativeiro; e) viabilizar programas de hibridização utilizando peixes com a reprodução em diferentes épocas do ano (Carneiro et al., 2012; Cabrita et al., 2010, Maria, Azevedo & Carneiro, 2009; Carolsfeld et al., 2003).

Além disso, permite o transporte de material genético através de longas distâncias com baixo custo, maior segurança, preservando a integridade física do animal e evitando a propagação de doenças entre eles (Carneiro et al., 2012).

No entanto, para obter o sucesso de tal técnica é necessária a utilização e interação de diversos fatores, tais como: bom diluente, que forneça nutrientes adequados às células; crioprotetor, que

evite a formação de cristais de gelo; tempo e método de adição dos crioprotetores; método de envase; taxa de resfriamento, temperatura e tempo de descongelamento apropriados, com o objetivo de evitar choque térmico, que danifica os espermatozoides quanto à morfologia e à motilidade espermática, por exemplo (Salmito-Vanderley et al., 2012).

Por isso, observa-se na literatura a busca da padronização de protocolos espermatozoides quanto à morfologia e à motilidade espermática, por exemplo (Salmito-Vanderley et al., 2012), adequados aos parâmetros fisiológicos de cada espécie animal (Salmito-Vanderley et al., 2012; Silva & Guerra, 2011). Com isso, garante-se uma qualidade seminal pós-descongelamento e o uso do sêmen em programas de fertilização artificial obtendo melhores taxas de fertilização e eclosão. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi fazer um levantamento das metodologias mais utilizadas para a criopreservação de sêmen de peixes Characiformes.

## 1. DILUIDORES

Para que o sêmen possa ser criopreservado é necessário que seja adicionado uma solução diluidora, que é composta por um diluente, com a função de diluir e de fornecer nutrientes, e por crioprotetor intracelular e extracelular, com o intuito de permitir o armazenamento adequado e proteger os espermatozoides contra o choque térmico (Salmito-Vanderley et al., 2012; Maria & Carneiro, 2012).

As condições exigidas para que o diluidor possa atuar de forma eficaz são: isotonicidade (que não ative a motilidade espermática), estável ao longo do armazenamento, estéril e carreador de crioprotetores (Maria, 2005).

Os diluentes (Tabela 1) já utilizados no processo de criopreservação do sêmen de peixes Characiformes foram: glicose, NaCl, BTS<sup>®</sup>, água de coco, água de coco em pó (ACP<sup>®</sup>), Saad, Merck III, Ringer e Kurokura.

Já os crioprotetores irão atuar evitando a formação de cristais de gelo intracelular, diminuindo estresse osmótico por meio da reposição de água necessária para manutenção do volume celular, interagindo com íons e macromoléculas, reduzindo o ponto de congelamento da água, assim como servir como

tampão ajustando as alterações do pH (Soares & Guerra, 2009; Medeiros et al., 2002).

Eles podem ser classificados em intracelular, que é uma substância química não tóxica capaz de retirar a água da célula e diminuir a temperatura de congelamento no seu interior, impedindo a formação de cristais de gelo internamente; ou em extracelular, que revestem a célula externamente e estabilizam sua membrana, diminuindo os danos provocados pela congelamento (Carneiro, 2007). Os crioprotetores mais utilizados (tabela 1) em sêmen de peixes Characiformes foram: a) Intracelulares: Dimetilsulfóxido (DMSO), metilglicol (MG), metanol, propilenoglicol, dimetilacetamida (DMA), dimetilformamida (DMF) e metilformamida (MF); b) Extracelulares: gema de ovo e lactose.

De acordo com Watson (2000), o protocolo de criopreservação tem uma série de tensões potencialmente prejudiciais às células. Por um lado, a mudança de temperatura, que pode afetar as estruturas presentes nas membranas, como as proteínas; em segundo, as tensões osmóticas e tóxicas apresentadas pela exposição aos crioprotetores, e em terceiro, a formação de cristais de gelo e a dissolução de gelo no meio extracelular.

Logo, a fim de verificar a eficiência do protocolo utilizado, Cabrita et al. (2010) ressaltaram a importância da avaliação da qualidade do sêmen usando as ferramentas disponíveis, tais como testes de viabilidade, o teor de ATP, a análise da motilidade, a integridade do DNA entre outros. De fato, esta análise bem feita será decisiva para a seleção de amostras com um bom sêmen e para a padronização de protocolos de criopreservação adequados para cada espécie.

## 2. EQUIPAMENTOS UTILIZADOS NO PROCESSO DE CRIOPRESERVAÇÃO

Após a etapa de diluição do sêmen e envasamento do sêmen diluído em palhetas ou criotubos, o material é submetido à diminuição de temperatura, até serem finalmente mergulhados e armazenado em nitrogênio líquido (Salmito-Vanderley et al., 2012).

Pode-se observar na tabela 1 que os equipamentos utilizados para a redução da temperatura e, conseqüente, congelamento do sêmen de peixes Characiformes são o *dry shipper*, caixas térmicas de poliestireno, máquinas de congelamento programada e botijões criogênicos.

Tabela 1. Lista de alguns peixes Characiformes e os crioprotetores, os diluentes e os equipamentos utilizados no processo de criopreservação seminal.

Espécie	Crioprotetores	Diluentes	Equipamento	Autores
<i>Brycon cephalus</i>	10% DMSO, gema de ovo	“V2e”; Glicose	Caixa térmica de poliestireno	Ninhaus - Silveira et al., 2006
	10% Metilglicol	<i>Beltisville Thawing Solution</i> (BTS®)	<i>Dry shipper</i>	Viveiros et al., 2012 <sup>a</sup>
<i>Brycon insignis</i>	10% DMSO e 10% Metilglicol	glicose, 5% BTS® e 6% Merck III (M III)	<i>Dry shipper</i>	Viveiros et al., 2011 <sup>a</sup>
<i>Brycon nattereri</i>	10% DMSO e 10% Metilglicol	200mM, Saad, BTS® e glicose 277mM	<i>Dry shipper</i>	Oliveira et al., 2007
<i>Brycon opalinus</i>	10% Metilglicol	BTS®, 0,9% NaCl	<i>Dry shipper</i>	Viveiros et al., 2011b
	10% DMSO e 10% Metilglicol	NaCl e glicose	<i>Dry shipper</i>	Viveiros et al., 2012b
<i>Brycon orbignyanus</i>	10% DMSO, 10% Metanol, 10% Metilglicol, 5% Gema de ovo	NaCl 154 mM, 5% BTS® e 6% M III	<i>Dry shipper</i>	Maria et al., 2006
	DMSO e gema de ovo	Glicose	<i>Dry shipper</i>	Galo et al., 2011
	Dimetilacetamida, DMSO, metanol, propilenoglicol e etilenoglicol	-	<i>Dry shipper</i>	Menezes et al., 2008
	10% Dimetilsulfóxido e 5% e 10% gema de ovo	ACP	<i>Dry shipper</i>	Leite et al., 2011
	5% glicerol; 10% DMSO; e 2%, 5%, 8%, e 11% de Dimetilacetamida, de Metilformamida, e de dimetilformamida	BTS®	<i>Dry shipper</i>	Varela Jr. et al., 2012 <sup>a</sup>
<i>Colossoma macropomum</i>	5, 10, 15 e 20% de DMSO	BTS®	<i>Dry shipper</i>	Varela Jr. et al., 2012b
	10% DMSO, 10% Metilglicol e 10% gema de ovo	5%, 5,4%, 5,8%, 6,2% e 6,6% de solução de glicose	<i>Dry shipper</i> e Máquina de Congelação Programada (TK 4000®)	Carneiro et al., 2012
	10% DMSO, 10% Metilglicol	ACP e Ringer	Caixa térmica de poliestireno	Vieira, 2010
	10% DMSO e 10% Metilglicol	ACP e Ringer	<i>Dry shipper</i>	Melo, 2010
	10% DMSO e 10% Metilglicol	Glicose e BTS®	<i>Dry shipper</i>	Nascimento et al., 2010
	Gema de ovo, 10% de DMSO, 5% de etilenoglicol, ou 10% de metanol	Glicose	<i>Dry shipper</i>	Ramirez-Merlano et al., 2011
<i>Piaractus brachyomus</i>	10% DMSO e 10% Metilglicol	ACP, 5% Glicose e Ringer	Caixa térmica de poliestireno e <i>Dry shipper</i>	Velásquez-Medina, 2008
	20 % de gema de ovo, 10 % DMSO, 0,16g de KCl mais 10% de glicerol.	5 % glicose, Zorlesco modificado (ZOR), BTZOR (desenvolvido na UEM), Andro-Hepes, BTS	<i>Dry shipper</i>	Streit Jr. et al., 2006
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	Gema de Ovo e DMSO	Glicose	<i>Dry shipper</i>	Streit Jr. et al., 2009
	Metanol 10% e dimetilsulfóxido (DMSO) 10%	5% BTS®	<i>Dry shipper</i>	Paulino, et al., 2012.
	10% DMSO e 10% Metilglicol	0,9% NaCl, 5% glicose, 5% BTS® e 6% M III	<i>Dry shipper</i>	Viveiros et al., 2009
	10% Metilglicol	ACP e 5% de glicose	<i>Dry shipper</i>	Viveiros et al., 2010
<i>Prochilodus lineatus</i>	8% DMSO, metanol, 5% gema de ovo, lactose	5% BTS®	<i>Dry shipper</i>	Felizardo et al., 2010
	Metanol 8% , DMSO 8% e lactose 5%	BTS®	<i>Dry shipper</i>	Felizardo et al., 2011
	Metanol ou DMSO nas concentrações de 5%,7,5%,10% e 12,5%.	5% BTS®	<i>Dry shipper</i>	Miliorini et al., 2011
	DMSO	BTS®	<i>Dry shipper</i>	Navarro et al., 2014
	12% Gema de ovo; DMSO nas concentrações de 5%, 10% e 15%	5,5%, 6% e 6,5% Glicose	<i>Dry shipper</i>	Martínez, J.G.; Pardo-Carrasco, S, 2012
<i>Prochilodus magdalenae</i>	12% gema de ovo, 10% DMSO	6% glicose	Máquina de congelação programada (FreezeControl®, CryoLogic Pty. Ltd., Victoria, AU)	Martínez, J. G; Tarazona-Morales, A. M; Pardo-Carrasco, S.C., 2013
	8%, 10% e 12% de Dimetilacetamida e 12% gema de ovo	6% Glicose	<i>Dry shipper</i>	Atencio et al., 2013

Nos três primeiros equipamentos de congelamento citados, o sêmen diluído permanece por um período limitado até que seja transferido aos botijões criogênicos. Nestes, como a velocidade do

metabolismo celular é nula a -196 °C, o tempo de estocagem pode ser ilimitado em condições ideais, que compreende basicamente a manutenção do

nível de nitrogênio líquido no botijão (Carneiro, 2007).

Agora será detalhado cada um dos equipamentos utilizados no processo de resfriamento do sêmen para posterior congelamento e transferência ao botijão.

### 2.1. DRY SHIPPERs

O *dry shipper* é um equipamento de alumínio prático e seguro utilizado no processo de criopreservação, já que é fácil de ser transportado e possui em seu interior um material poroso que absorve o nitrogênio líquido e evitando assim o perigo de vazamento (Carolsfeld et al., 2003).

Esse equipamento atua liberando o nitrogênio na forma de vapor, fazendo assim que a congelamento das células espermáticas ocorra de forma gradativa, em uma taxa de congelamento de 25-40° C/min com uma estabilização gradual a -181 °C em 3 min. (Taitson, Chami & Godinho, 2008).

As palhetas ou criotubos que forem introduzidos nesse equipamento permanecem por um curto período de tempo, que pode ser de alguns minutos a poucos dias, sendo assim transferidos posteriormente, de acordo com o protocolo, para os botijões criogênicos.

O *dry shipper* já foi testado com sucesso em protocolos de criopreservação de diversas espécies de peixes Characiformes, como demonstrado na tabela 1, observando-se também que é o mais utilizado nos últimos anos na congelamento de células espermáticas.

### 2.2. MÁQUINA DE CONGELAÇÃO PROGRAMADA

No processo de criopreservação, a técnica utilizada também pode influenciar os resultados. Logo, a utilização de uma técnica padronizada, como a máquina de congelamento computadorizada, irá permitir a queda homogênea e gradual da temperatura. Há diversos modelos, em que o pesquisador programa a velocidade e a curva de refrigeração desejada.

Na literatura observa-se a utilização da máquina de congelamento programada em diversas espécies de animais, como a humana (Dohle et al., 2008) e a canina (Neves et al., 2009), existindo poucos trabalhos que a utilizam no sêmen de peixes Characiformes (tabela 1).

Além das vantagens mencionadas, os congeladores programáveis são apropriados para a congelamento de grandes quantidades de palhetas de sêmen (Soares

& Guerra, 2009) permitindo assim a utilização em larga escala na Aquicultura.

### 2.3. CAIXA TÉRMICA DE POLIESTIRENO

A caixa térmica de poliestireno, conhecida popularmente como caixa de isopor, ainda não é amplamente utilizada no processo de criopreservação de peixes Characiformes (tabela 1).

As principais vantagens da caixa de isopor são: fácil manuseio, fácil transporte e baixo custo de aquisição, sendo assim possível a utilização em locais que não há disponibilidade de tecnologias e em fazendas de criação de peixes. Entretanto, possui como desvantagens: difícil padronização das curvas de congelamento e controle da temperatura.

Tal “equipamento” é adaptado utilizando-se uma bandeja metálica, conhecida como rampa, que dista do fundo do recipiente alguns centímetros, geralmente 10 cm. Para a congelamento das amostras é adicionada uma determinada quantidade de nitrogênio líquido, que altera de acordo com a temperatura desejada, a espécie de peixe e o tipo de diluidor utilizado. Então, as amostras diluídas são suspensas na bandeja e congeladas por um período específico (Linhares, 2012).

Vieira (2010) ao criopreservar sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*) com a caixa térmica de poliestireno obteve boas taxas de motilidade espermática, o que pode sugerir a eficiência desse método em relação a outros equipamentos utilizados para a criopreservação.

Dessa forma, para verificar a eficiência do método de congelamento empregado é necessário utilizar mecanismos de avaliação da qualidade seminal pós-descongelamento, em que os principais são: avaliação da morfologia e da cinética espermática.

### 3. ANÁLISE DA MORFOLOGIA ESPERMÁTICA

Além da motilidade espermática, outro fator que influencia a taxa de fertilização do sêmen pós-descongelamento é a morfologia espermática. Estudos têm comprovado que a criopreservação pode afetar a qualidade espermática, influenciando negativamente as taxas de fertilização (Rurangwa et al., 2004).

Na análise da morfologia espermática, observam-se as patologias primárias (flagelo dobrado, cabeça isolada, gotas citoplasmáticas proximal e distal), que são decorrentes do processo de espermatogênese e as patologias secundárias (flagelo quebrado, enrolado, degenerado, macrocefalia, microcefalia), que são oriundas de

fatores ambientais ou do processo de manejo, como a coleta do sêmen ou confecção das lâminas para avaliação dessas patologias (Herman, Mitchell & Doak, 1994).

Essa análise irá auxiliar o uso de sêmen com menor quantidade de patologias, a fim de favorecer uma taxa de fertilização e eclosão mais alta, contribuindo com o aumento da produção em Aquicultura.

O padrão normal de morfoanomalias dos espermatozoides é preconizado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal para mamíferos: bovinos, equinos, ovinos e suínos, no entanto, em peixes, as referências ainda não foram estabelecidas (Miliorini, 2006).

#### 4. ANÁLISE DA MOTILIDADE ESPERMÁTICA

A motilidade espermática, representa a taxa de espermatozoides móveis, é o critério mais utilizado para avaliar a qualidade seminal após o descongelamento. Viveiros et al. (2011) relatou que a taxa de motilidade do sêmen descongelado de dourado (*Salminus brasiliensis*) revelava o número de espermatozoides com membranas intactas, demonstrando a íntima relação da motilidade com a viabilidade espermática e com a capacidade fertilizante do sêmen de peixes. Geralmente essa avaliação é feita de forma subjetiva, na qual o avaliador deve estimar uma taxa de espermatozoides móveis numa escala de 0 a 100% (Taitson et al., 2008).

Atualmente os métodos objetivos de avaliação da motilidade seminal têm sido considerados mais relevantes na pesquisa em reprodução. O *Computer Assisted Sperm Analysis* (CASA) é um sistema automático (hardware e software *Sperm Class Analyser* -SCA) utilizado para visualizar, digitalizar e analisar imagens sucessivas, fornecendo informações acuradas, precisas e significativas do movimento individual de cada célula, bem como de subpopulações de células espermáticas (Amann & Katz, 2004). Este método tem sido amplamente utilizado para examinar a qualidade do sêmen de aves e mamíferos, sendo a sua aplicação recente em estudos nos peixes (Rurangwa et al., 2001). Com o auxílio do programa é possível avaliar objetivamente a porcentagem de espermatozoides móveis (ou taxa de motilidade), além da porcentagem de espermatozoides com velocidade rápida, média ou lenta.

Usando imagens digitalizadas da trajetória de cada célula espermática, o CASA pode analisar as propriedades de trajetória e velocidade dos

espermatozoides, segundo Verstegen, Iguer-Ouada & Onclin (2002):

Velocidade curvilínea (VCL-  $\mu\text{m/s}$ ): É a velocidade da trajetória real do espermatozoide. É sempre a maior das três velocidades e serve como elemento de cálculo para a linearidade.

Velocidade linear progressiva (VSL-  $\mu\text{m/s}$ ): É a velocidade média em função da linha reta estabelecida entre o primeiro e o último ponto da trajetória do espermatozoide. É sempre a mais baixa das três velocidades.

Velocidade média da trajetória (VAP-  $\mu\text{m/s}$ ): é a velocidade da trajetória média do espermatozoide. Em casos onde a trajetória da cabeça espermática é muito regular e linear com pouco movimento lateral da cabeça, a VAP é quase a mesma que a VSL, porém com trajetórias irregulares, não lineares ou onde existe um alto grau de movimento lateral, a VAP será maior que a VSL.

Amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH -  $\mu\text{m}$ ): é a amplitude do deslocamento médio da cabeça do espermatozoide em sua trajetória real.

Frequência de batimento flagelar cruzado (BCF- Hz): É o número de vezes que a cabeça do espermatozoide cruza a direção do movimento. A BCF pode ser subestimada se existirem mais batimentos/segundo que imagens/segundo.

Retilinearidade (STR - %): É a relação percentual entre VSL e VAP. Estima a proximidade do percurso da célula a uma linha reta.

Linearidade (LIN - %): Relação percentual entre VSL e VCL, ou seja, quanto mais o espermatozoide se afasta da velocidade em linha reta, menor será sua linearidade.

Alguns estudos foram realizados em peixes utilizando o programa CASA para registrar o movimento dos espermatozoides depois do processo de conservação do sêmen de algumas espécies como catfish africano (*Clarias gariepinus*) (Rurangwa et al., 2001) e pargo japonês (*Pagrus major*) (Liu et al., 2007). Outros estudos utilizaram o CASA para avaliar a motilidade do sêmen coletado *post mortem* e depois da anestesia (truta arco íris - *Oncorhynchus mykiss*) (Dietrich et al., 2005), ou para caracterizar o movimento espermático do sêmen *in natutra* (peixe zebra, *Danio rerio*) (Wilson & Ingerman, 2007). Em Characiformes, o CASA já foi utilizado para analisar a motilidade espermática pós-descongelamento de pirapitinga (*P. brachypomus*), piabanha (*B. insignis*), curimba (*P. lineatus*) e tambaqui (*C. macropomum*), (Nascimento et al.,

2010; Melo, 2010; Shimoda, 2007; Viveiros et al., 2010; Leite et al., 2011).

Nesses estudos, os parâmetros mais avaliados são taxa de motilidade e velocidades (VCL, VSL e VAP), e vêm sendo relacionadas com a capacidade fertilizante do sêmen de peixes, principalmente a VCL (Viveiros et al., 2010; Rurangwa et al., 2001).

O CASA também pode ser utilizado para avaliação de aspectos ligados à morfologia dos espermatozoides, mais especificamente às dimensões e formato da cabeça dos espermatozoides, o que é chamado de morfometria. A análise da morfometria espermática assistida por computador, também denominada de ASMA (*Automated Sperm Morphology Analysis*), foi desenvolvida inicialmente para avaliação do sêmen humano (Monserat et al., 1995) e tem sido progressivamente adaptada a outras espécies mamíferas (Gravance et al., 1996) demonstrando níveis altos de precisão e confiança (Verstegen, Iguer-Ouada & Onclin et al., 2002). Os parâmetros referentes ao tamanho da cabeça dos espermatozoides avaliados pelo ASMA são: comprimento - C ( $\mu\text{m}$ , maior eixo da cabeça do espermatozoide); largura - L ( $\mu\text{m}$ , menor eixo da cabeça do espermatozoide); perímetro - P ( $\mu\text{m}$ , distância que circunda a cabeça do espermatozoide); e área - A ( $\mu\text{m}^2$ ). A partir dessas informações foram calculados, pelo programa, parâmetros referentes ao formato da cabeça dos espermatozoides: elipticidade (C/L); alongação (C-L/C+L); rugosidade ( $4\pi A/P^2$ ) e regularidade ( $\pi CL/4A$ ).

Em peixes, esta técnica foi utilizada para descrever mudanças na forma dos espermatozoides da enguia européia causada pela indução hormonal da espermição (Asturiano et al., 2007) e observados efeitos da taxa de diluição, crioprotetores e suplementação do meio de criopreservação, uma vez que crioprotetores e protocolos de criopreservação são conhecidos por causar danos a morfologia dos espermatozoides (Billard, 1983). Para Characiformes apenas Melo (2010) realizou tal técnica em sêmen fresco e após criopreservação de pirapitinga (*P. brachypomus*). Essa técnica permite a avaliação da morfometria de um grande número de espermatozoides de forma rápida e objetiva, sem qualquer interferência do avaliador.

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com a revisão feita nesse trabalho observa-se que os principais compostos utilizados na criopreservação do sêmen de peixes Characiformes são: o diluente glicose 5%; os crioprotetores interno dimetilsulfoxido ou metilglicol; e o crioprotetor externo gema de ovo.

Em relação aos instrumentos utilizados para a redução da temperatura, o mais utilizado é o *dry shipper*, e as formas de avaliação do sêmen mais importantes após a descongelação são: taxa de motilidade e morfologia espermática.

Além disso, observa-se que a interação do diluidor com o espermatozoide é espécie-específico, uma vez que um determinado diluidor é eficaz na congelação do sêmen de uma espécie, no entanto em outra não apresenta a mesma qualidade seminal pós-descongelação.

Logo, faz-se necessário que se adaptem protocolos para cada espécie e se realizem métodos de avaliação da qualidade seminal, a fim de se obter boas taxas de fertilização e favorecer a conservação e a produção em larga escala.

### REFERÊNCIAS

- Amann R. & Katz D.F. 2004. Reflections on CASA after 25 years. *Journal of Andrology*, 25 : 317-325.
- Asturiano J.F., Marco-Jiménez F., Peñaranda D.S., Garzón D.L., Pérez L., Vicente J.S. & Jover M. 2007. Effect of sperm cryopreservation on the european eel sperm viability and spermatozoa morphology. *Reproduction in Domestic Animals*, 42 : 162-166.
- Atencio V.J., Perez E.J., Espinosa J.A. & Pardo S.C. 2013. Evaluación de dimetilacetamida como crioprotector para la criopreservación de semen de bocachico *Prochilodus magdalenae*. *Arch. Med. Vet.*, 45 : 151-158.
- Billard R. 1983. Ultrastructure of trout spermatozoa: changes after dilution and deep-freezing. *Cell Tissue Res.*, 228 : 205-218.
- Cabrera E., Sarasquete C., Martínez-Paramo S., Robles V., Beirão J., Pérez-Cereales S. & Herráez, M.P. 2010. Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. *J. Appl. Ichthyol.*, 26 : 623-635.
- Carneiro P. C. F. 2007. Tecnologias de produções e armazenamentos de sêmen de peixes. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 31 (3) : 361-366.
- Carneiro P. C. F., Azevedo H. C., Santos J. P. & Maria A. N. 2012. Cryopreservation of tambaqui (*Colossoma macropomum*) semen: Extenders, cryoprotectants, dilution ratios and freezing methods. *Cryoletters*, 33 (5) : 285-393.
- Carolsfeld J., Harvey B., Godinho H.P. & Zaniboni-Filho E. 2003. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. *Journal of Fish Biology*, 63 : 472-481.
- Dietrich G., Kowalski R., Wojtczak M., Dobosz S., Goryczko K. & Ciereszko A. Motility parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa in relation to sequential collection of milt, time of post-mortem storage and anesthesia. 2005. *Fish Physiology and Biochemistry*, 31 : 1-9.
- Dohle, G.R.; Jungwirth, A.; Colpi, G.; Giwercman, A.; Diemer, T.; Hargreave, T.B. 2008. Guidelines on male infertility. European Association Urology.

- Felizardo V. O., Mello R. A., Murgas L. D. S., Andrade E. S., Drumond M. M. & Rosa P. V. 2010. Effect of cryopreservant combinations on the motility and morphology of curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm. *Animal Reproduction Science*, 122 (3-4) : 259-263.
- Felizardo V. O., Murgas L.D.S., Navarro R.D., Gonçalves A.C.S. & Paulino, M.S. 2011. Osmolaridade e taxa de diluição na ativação do sêmen criopreservado de curimba (*Prochilodus lineatus*). *Archivos de Zootecnia*, 60 : 1255-1262.
- Felizardo, V.O. 2008. Manejo reprodutivo da piracanjuba (*Brycon orbignyanus*): congelamento de sêmen e taxas de fertilidade. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Lavras, Lavras. 84 p.
- Galo J.M., Streit Jr. D.P., Sirol R.N., Ribeiro R.P., Digmayer M., Andrade V.X.L. & Ebert, A.R. 2011. Spermatic abnormalities of piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849) after cryopreservation. *Braz J Biol*, 71 : 693-699.
- Gravance C.G., Liu I.K.M., Davis R.O., Hughes J.P. & Casey P.J. 1996. Quantification of normal head morphometry of stallion spermatozoa. *Journal of reproduction and fertility*, 108 : 41-46.
- Herman, H.A., Mitchell, J.R., Doak, G.A. Evaluation of semen – morphology. In: Herman, H.A., Mitchell, J.R., Doak, G.A. (eds.). 1994. *The artificial insemination and embryo transfer of dairy and beef cattle*. 8. ed. Dauville: Interstate Publishers, Inc., p.85-92.
- Leite L.V., Oliveira F. C.E., Nunes L.T., Nunes J.F. & Salmito-Vanderley, C.S.B. 2011. Criopreservação de sêmen de tambaqui com ACP® adicionado de gema de ovo. *Revista Brasileira de Engenharia de Pesca*, 6 (2) : 23-29.
- Linhares F.R.A. 2012. Efeito de diferentes taxas de diluição e protocolos de congelamento sobre a cinética e morfologia de espermatozoides de carpa comum (*Cyprinus carpio*) criopreservados em água de coco em pó (ACP-104). Dissertação de mestrado, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza. 80p.
- Liu Q., Li J., Xiao Z., Ding F., Yu D. & Xu X. 2007. Use of computer-assisted sperm analysis (CASA) to evaluate the quality of cryopreserved sperm in red sea bream (*Pagrus major*). *Aquaculture*, 263 : 20-25.
- Maria A. N. & Carneiro P. C. F. 2012. Criopreservação de sêmen de peixes no Brasil: estado da arte e perspectivas futuras. *Ciência Animal*, 22 (1) : 124-131.
- Maria A. N., Azevedo H. C. & Carneiro, P. C. F. 2009. Criopreservação de sêmen de peixes no contexto do agronegócio da piscicultura. In: TAVARES-DIAS, M. (Org.). Manejo e sanidade de peixes em cultivo. Amapá: Embrapa Amapá, 1 : 47-63.
- Maria A. N., Viveiros A. T. M., Freitas R. T. F. & Oliveira A. V. 2006. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba *Brycon orbignyanus* semen, an endangered Brazilian teleost fish. *Aquaculture*, 260 (29) : 298-306.
- Maria, AN. Diluidores e crioprotetores no resfriamento e congelamento do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). 2005. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Lavras, Lavras. 84p.
- Martínez J. G., Tarazona-Morales A. M. & Pardo-Carrasco S.C. Sperm cryopreservation of freshwater fish bocachico (*Prochilodus magdalenae*) in DMSO and glucose and its effects on fertilization and hatching efficiency. 2012. *Animal Reproduction*, 9 (1) : 19-26.
- Martínez J.G. & Pardo-Carrasco, S. Effect of freezing and thawing rates on sperm motility in Bocachico *Prochilodus magdalenae* (Pisces,Characiformes). 2013. *Revista MVZ Córdoba*, 18 (1) : 3295-3303.
- Medeiros C. M. O., Forell F., Oliveira A.T.D. & Rodrigues, J.L. 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*, 57 : 327-344.
- Melo, M. A. P. 2010. Água de coco em pó (ACP-104) adicionada de crioprotetores sobre a morfometria da cabeça de espermatozoides de pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) pós descongelamento. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza. 63p.
- Menezes J.T.B., Queiroz L.J., Doria C.R.C. & Menezes Jr J. B. 2008. Avaliação espermática pós-descongelamento em tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). *Acta Amazônica*, 38 (2) : 365-368.
- Miliorini A.B., Murgas L.D.S., Rosa P.V., Oberlender G., Pereira G.J.M. & Costa, D.V. 2011. A morphological classification proposal for curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm damages after cryopreservation. *Aquaculture Research*, 42 : 177-187.
- Miliorini, A. 2006. Ativadores e concentrações de metanol e dimetilsulfóxido na qualidade do sêmen criopreservado de curimba (*Prochilodus lineatus*). Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 99p.
- Montserrat J.J., Pérez-Sánchez F., Tablado L. & Soler C. 1995. The Sperm Class Analyzer®: a new automated system for human sperm morphometry and classification. *Cont Fertil Sex*, 23 : S126.
- Nascimento A.F., Maria A.N., Pessoa N.O., Carvalho M.A.M. & Viveiros A.T.M. 2010. Out of-season sperm cryopreservation in different media of the Amazonian freshwater fish pirapitinga (*Piaractus brachypomus*). *Animal Reproduction Science*, 118 : 324-329.
- Navarro R. D., Navarro F. K. S. P., Felizardo V.O., Murgas L.D.S. & Andrade E.S. 2014. Semen quality of Curimba (*Prochilodus lineatus*) cryopreserved with vitamins. *Acta Scientiarum*, 36 (1) : 55-60.
- Neves M. M., Henry M., Clemente C.A. A. & Heneine L. G. D. 2009. Padronização de uma técnica de congelamento de sêmen em cães. *Acta Scientiae Veterinariae*, 37 (3) : 259-263.
- Ninhaus-Silveira A., Foresti F., Veríssimo-Silveira R. & Senhorini J.A. 2006. Seminal Analysis, Cryogenic Preservation, and Fertility in Matrinxã Fish, *Brycon cephalus* (Günther, 1869). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49 (4) : 651-659.
- Oliveira A. V., Viveiros A. T. M., Maria A. N., Freitas R. T. F. & Isaú Z. A. 2007. Sucesso do resfriamento e congelamento de sêmen em pirapitinga (*Brycon nattereri*). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 59 : 1509-1515.
- Paulino M.S., Murgas L.D.S., Felizardo V.O. & Freitas R.T.F. 2012. Anormalidades espermáticas de *Piaractus mesopotamicus* após descongelamento utilizando diferentes metodologias. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 64 (6) : 1591-1596.
- Ramirez-Merlano J.A., Velasco-Santamaría Y.M., Medina-Robles V.M. & Cruz-Casallas P.E. 2011. Cryopreservation effects on the sperm quality of cachama blanca *Piaractus brachypomus* (Cuvier 1818). *Aquaculture Research*, 42 (6) : 738-745.
- Rurangwa E., Kime D. E., Oliveira F. & Nash J. P. 2004. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture*, 234 (1/4) : 1-28.

- Rurangwa E., Volckaert F.A.M., Huyskens G., Kime D.E. & Ollevier F. 2001. Quality control of refrigerated and cryopreserved semen using computer-assisted sperm analysis (CASA), viable staining and standardized fertilization in African catfish (*Clarias gariepinus*). *Theriogenology*, 55 : 751-69.
- Salmito-Vanderley C.S.B., Vieira M.J.A.F., Leite L.V., Oliveira F.C.E., Linhares F.R.A., Salgueiro C.C.M. & Nunes J.F. 2012. Meios de congelamento para conservação de sêmen de peixes da família Characidae. *Ciência Animal*, 22 (1) : 255-268.
- Shimoda E., Andrade D.R., Vidal Jr. M.V., Godinho H.P. & Yasui G.S. 2007. Determinação da razão ótima de espermatozoides por ovócitos de piabanha *Brycon insignis* (pisces - characidae). *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 59 (4) : 877-882.
- Silva S.V. & Guerra M.M.P. 2011. Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 35 (4) : 370-384.
- Soares A.T. & Guerra, M.M.P. 2009. Efeitos da criopreservação sobre a viabilidade espermática. *Tecnol. Cienc. Agrop.*, 3 : 53-63.
- Streit Jr. D. P., Benites C., Moraes G. V., Ribeiro R. P., Sakaguti E. S. & Caldieri R. F. 2006. Sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) criopreservado com diluentes para sêmen de suínos. *Ciência Animal Brasileira*, 7 : 289-297.
- Streit Jr., D.P., Oliveira A.C., Ribeiro R.P., Sirol R. N., Moraes G.V., Galo J. M. & Digmayer M. 2009. Motilidade, vigor e patologias seminal in natura e pós criopreservação de *Piaractus mesopotamicus*. *Bol. Inst. Pesca*, 35 : 159-167.
- Taitson P.F., Chami E. & Godinho H.P. 2008. Gene banking of the neotropical fish *Leporinus obtusidens* (Valenciennes, 1836): A protocol to freeze its sperm in the field. *Animal Reproduction Science*, 105 : 283-291.
- Varela Jr. A. S., Corcini C. D., Streit Jr. D. P., Rizzoto G., Jardim R. D., Lucia Jr. T. & Figueiredo M. R. C. 2012b. Efeito crioprotetor de diferentes concentrações do dimetilsulfóxido no congelamento de sêmen de tambaqui *Colossoma macropomum*. *Atlântica*, 34 (2) : 129-137.
- Varela Jr. A. S., Corcini C.D., Gheller S.M.M., Jardim R.D., Lucia Jr. T., Streit Jr. D.P. & Figueiredo M.R.C. 2012a. Use of amides as cryoprotectants in extenders for frozen sperm of tambaqui, *Colossoma macropomum*. *Theriogenology*, 78 : 244-251.
- Velásquez-Medina, S. 2008. Criopreservação do sêmen de pirapitinga, *Piaractus brachypomus* (Pisces, Characidae). Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 93p.
- Verstegen J., Iguer-Ouada M. & Onclin K. 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, 57 : 149-179.
- Vieira, M.J.A.F. 2010. Caracterização do sêmen de tambaqui *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818) e criopreservação em diluente a base de água de coco em pó (ACP-104). Tese de doutorado, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza. 114 p.
- Viveiros A. T. M., Amaral T. B., Orfão L. H., Isaú Z. A., Caneppele D. & Leal M. C. 2011a. Sperm cryopreservation of tiete tetra *Brycon insignis* (Characiformes): effects of cryoprotectants, extenders, thawing temperatures and activating agents on motility features. *Aquaculture Research*, 42 : 858-865.
- Viveiros A. T. M.; Orfão L. H.; Maria A. N. & Allaman I. B. 2009. A simple, inexpensive and successful freezing method for curimba *Prochilodus lineatus* (Characiformes) semen. *Animal Reproduction Science*, 112 : 293-300.
- Viveiros A.T.M., Isaú Z.A., Caneppele D & Leal M.C. 2012a. Sperm cryopreservation affects postthaw motility, but not embryogenesis or larval growth in the Brazilian fish *Brycon insignis* (Characiformes). *Theriogenology*, 78 (4) : 803-810.
- Viveiros A.T.M., Maria A.N., Amaral T.B., Orfão L.H., Isaú Z.A. & Verissimo-Silveira R. 2011b. Spermatozoon ultrastructure and sperm cryopreservation of the Brazilian dry season spawner fish pirapitinga, *Brycon nattereri*. *Aquaculture Research*, 43 : 546-555.
- Viveiros A.T.M., Nascimento A.F., Orfão L.H. & Isaú Z.A. 2010. Motility and fertility of the subtropical freshwater fish streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) sperm cryopreserved in powdered coconut water. *Theriogenology*, 74 : 551-556.
- Viveiros A.T.M., Orfão L.H., Nascimento A.F., Corrêa F.M. & Caneppele D. 2012b. Effects of extenders, cryoprotectants and freezing methods on sperm quality of the threatened Brazilian freshwater fish pirapitinga-do-sul *Brycon opalinus* (Characiformes). *Theriogenology*, 78 : 361-368.
- Watson, P.F. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, 60/61 : 481-492.
- Wilson, J. & Ingermann, R. 2007. Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. *Theriogenology*, 67 : 661-672.