

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS SEMINAIS DE PACU  
(*Piaractus mesopotamicus*) E SUA CORRELAÇÃO COM AS  
TAXAS DE FERTILIZAÇÃO, ECLOSÃO E MORFOLOGIA  
DAS LARVAS

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

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

MARINGÁ  
Estado do Paraná  
Abril – 2009

*"Não façam do amanhã o sinônimo de nunca,  
nem o ontem te seja o mesmo que nunca mais.*

*Teus passos ficaram.*

*Olhes para trás ... mas vá em frente  
pois há muitos que precisam  
que chegues para poderem seguir-te."*

*Charles Chaplin*

*Dedico este trabalho:*

*Aos meus pais, Antonio Galo e Mirian G. M Galo.*

*A minha irmã Fernanda Minardi Galo.*

*Ao meu namorado Cláudio F. Roma.*

*Pelo amor, carinho, incentivo que deram durante todos  
esses anos;  
Obrigada, por sempre acreditar em mim  
e me apoiarem;*

***Amo muito todos vocês!***

## **AGRADECIMENTOS**

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

Agradeço em especial à minha família e a família do meu namorado, 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, pela orientação constante, pelo exemplo de determinação, por todos esses anos de muita paciência, amizade e compreensão;

Ao Prof. Dr. Danilo Pedro Streit Jr., pela coorientação, pelo carinho, amizade, muita paciência e participação constante na condução deste trabalho;

À CAPES pela bolsa de estudo;

Aos professores do curso de Pós-graduação em “Zootecnia” que muito contribuíram na transmissão do conhecimento;

Agradeço a minha amiga querida, Melanie Digmayer, pela amizade, companheirismo e força no decorrer deste trabalho;

Aos meus queridos amigos, Jayme Povh, Darci C. Fornari, Nelson Lopera- Barrero, Patrícia Neves, Patrícia Gomes, Thaís Lopes, Sheila, Enio Lupchinski, Diego, Thiago e a tanto outros que me auxiliaram, a vocês agradeço pela força, amizade, disposição e colaboração;

Aos funcionários da DUKE ENERGY pela amizade e colaboração;

Aos funcionários e estagiários da Faculdade de Bandeirantes;

A todos os membros do grupo PEIXEGEN;

A todos os colegas do curso de Pós-graduação;

Ao Pós-doutorando André Ebert, pela amizade e pelas análises estatísticas;

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

Aos funcionários da Estação de Piscicultura da UEM- CODAPAR, Geraldo, Vitor e Cleiton pela colaboração e amizade;

À Estação de Hidrologia e Aquicultura da Duke Energy International- Geração Paranapanema, em Salto Grande (SP);

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!

## **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.

## ÍNDICE

	Página
TABELAS DO APÊNDICE.....	ix
FIGURAS DO APÊNDICE.....	xi
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
CAPÍTULO I.....	1
1. Introdução Geral.....	2
2. Revisão da Literatura.....	3
2.1) Espécie: pacu ( <i>Piaractus mesopotamicus</i> ).....	3
2.2) Qualidade dos Gametas Masculinos.....	5
2.2.1) Concentração espermática.....	6
2.2.2) Mecanismo de inativação dos Gametas Masculinos de Peixe.....	6
2.2.3) Motilidade, duração da motilidade e vigor espermático.....	7
2.2.4) Morfologia espermática.....	8
2.3) Parâmetro de Qualidade Seminal – Taxa de Fertilização.....	8
2.4) Fatores que levam a perda da qualidade do sêmen.....	9
2.5) Criopreservação.....	9
2.6) Anormalidades em larvas de peixes.....	11
3. Literatura Citada.....	13

OBJETIVOS GERAIS.....	19
CAPÍTULO II	
Correlações dos Parâmetros Quali-quantitativos do Sêmen de Pacu ( <i>Piaractus mesopotamicus</i> ) com a Taxa de Fertilização, Eclosão e Morfologia das Larvas.....	20
RESUMO.....	21
ABSTRACT.....	21
Introdução.....	22
Material e Métodos.....	23
Resultados e Discussão.....	27
Conclusão.....	41
Literatura Citada.....	41
CAPÍTULO III	
Avaliação da qualidade seminal de <i>Piaractus mesopotamicus</i> “in natura” e pós-criopreservação e sua correlação com as taxa de fertilização, eclosão e a morfologia das larvas.....	45
RESUMO.....	46
ABSTRACT.....	46
Introdução.....	47
Material e Métodos.....	48
Resultados e Discussão.....	53
Conclusão.....	63
Literatura Citada.....	63
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	67



## TABELAS DO APÊNDICE

		Página
CAPÍTULO II		
Tabela 1	Relação dos animais utilizados no manejo reprodutivo e volume de gametas no processo de fertilização de <i>Piaractus mesopotamicus</i> ....	25
Tabela 2	Média e desvio padrão dos parâmetros quali-quantitativos do sêmen de <i>Piaractus mesopotamicus</i> nos grupos das “fêmeas boas” e “fêmeas ruins”.....	28
Tabela 3	Média e desvio padrão dos espermatozoides normais e anormalidades espermáticas do sêmen <i>Piaractus mesopotamicus</i> nos grupos das “fêmeas boas” e “fêmeas ruins”.....	29
Tabela 4	Média e desvio padrão das taxas de fertilização e eclosão, e morfologia das larvas após a eclosão de <i>Piaractus mesopotamicus</i> , com origem nos grupos das “fêmeas boas” e “fêmeas ruins”.....	31
Tabela 5	Correlações entre motilidade progressiva com vigor espermático, anormalidades primárias e cauda enrolada baseados no coeficiente de Spearman utilizado no grupo das “fêmeas boas”.....	35
Tabela 6	Correlações entre vigor espermático com motilidade progressiva e cauda quebrada baseados no coeficiente de Spearman utilizado no grupo das “fêmeas boas”.....	36
Tabela 7	Correlações entre concentração espermática, taxa de eclosão e ovos gorados baseados no coeficiente de Spearman utilizado no grupo das “fêmeas boas”.....	37
Tabela 8	Correlação entre anormalidade primária e ovos gorados baseados no coeficiente de Spearman utilizado no grupo das “fêmeas boas”.....	37
Tabela 9	Correlações entre motilidade progressiva com vigor espermático, duração da motilidade e concentração espermática baseados no coeficiente de Spearman utilizado no grupo das “fêmeas ruins”.....	37

Tabela 10	Correlações entre duração da motilidade com motilidade progressiva, vigor espermático, cauda enrolada e concentração espermática baseados no coeficiente de Spearman utilizado no grupo das “fêmeas ruins”.....	38
Tabela 11	Correlação entre vigor espermático e cauda quebrada baseados no coeficiente de Spearman utilizado no grupo das “fêmeas ruins”.....	38
Tabela 12	Correlações entre motilidade progressiva, duração da motilidade com ovos gorados, larvas normais e não eclodidas mortas baseados no coeficiente de Spearman utilizado no grupo das “fêmeas ruins”..	39
Tabela 13	Correlação entre concentração espermática e ovos gorados baseados no coeficiente de Spearman utilizado no grupo das “fêmeas ruins”.....	40

### CAPÍTULO III

Tabela 1	Relação dos animais utilizados no manejo reprodutivo e volume de gametas no processo de fertilização de <i>Piaractus mesopotamicus</i> ....	51
Tabela 2	Média e desvio padrão da motilidade progressiva, duração da motilidade e vigor espermático do sêmen de <i>Piaractus mesopotamicus</i> “in natura” e após a descongelação.....	54
Tabela 3	Média e desvio padrão dos espermatozoides normais, anormalidades totais, primárias e secundárias do sêmen de <i>Piaractus mesopotamicus</i> “in natura” e após a descongelação.....	55
Tabela 4	Média e desvio padrão das taxas de fertilização e eclosão, ovos gorados, larvas normais, defeituosas, mortas, não eclodidas mortas e não eclodidas vivas a partir do sêmen de <i>Piaractus mesopotamicus</i> “in natura” e descongelado.....	60
Tabela 5	Correlações entre duração da motilidade com motilidade progressiva, anormalidade primária e cauda degenerada baseados no coeficiente de Spearman no sêmen “in natura” de <i>Piaractus mesopotamicus</i> .....	62
Tabela 6	Correlações entre duração da motilidade com a motilidade progressiva e cauda degenerada baseados no coeficiente de Spearman no sêmen descongelado de <i>Piaractus mesopotamicus</i> .....	62
Tabela 7	Correlação entre anormalidade primária e larva morta baseado no coeficiente de Spearman no sêmen “in natura” e descongelado de <i>Piaractus mesopotamicus</i> .....	63

## FIGURAS DO APÊNDICE

		Página
CAPÍTULO II		
Figura 1	Esquema do manejo reprodutivo de <i>P. mesopotamicus</i> , durante a fertilização dos gametas.....	25
Figura 2	Percentuais médios de anormalidades encontradas no sêmen de <i>P. mesopotamicus</i> utilizado para fertilizar os óvulos nos grupos de fêmeas consideradas “fêmeas boas” e “fêmeas ruins”. Anormalidades verificadas: cauda dobrada (Cd.dob); cauda quebrada (Cd.que); cauda solta (Cd.sol); cabeça solta (Cb.sol); cauda enrolada (Cd.enr); cauda degenerada (Cd.deg).....	30
Figura 3	Taxa de fertilização dos cruzamentos individualizado e percentuais de motilidade, espermatozoides normais e anormalidades totais dos <i>Piaractus mesopotamicus</i> utilizados no estudo.....	33
CAPÍTULO III		
Figura 1	Esquema do manejo reprodutivo do <i>Piaractus mesopotamicus</i> , durante a fertilização dos gametas.....	51
Figura 2	Percentuais médios de anormalidades encontradas no sêmen de <i>P. mesopotamicus</i> no sêmen “in natura” e descongelado. Anormalidades verificadas: cauda dobrada (CdDo); cauda quebrada (CdQb); cauda solta (CdSo); cabeça solta (CbSo); cauda degenerada (CdDe); cauda enrolada (CdEn).....	56
Figura 3	Ilustrações de morfologias observadas através da microscopia eletrônica de varredura no sêmen de <i>Piaractus mesopotamicus</i> “in natura”. (A) espermatozoide normal; (B) espermatozoides com cauda quebrada; (C) espermatozoides com cauda dobrada e quebrada; (D) espermatozoides com cauda dobrada; (E) espermatozoide com cauda e cabeça solta; (F) espermatozoide com cauda enrolada.....	57

- Figura 4 Ilustrações de morfologias observadas através da microscopia eletrônica de varredura no sêmen de *Piaractus mesopotamicus* descongelado. (A) espermatozoide com cauda enrolada; (B) espermatozoides com cauda quebrada; (C) e (D) espermatozoides com cauda degenerada..... 58
- Figura 5 Ilustrações da morfologia das larvas fertilizadas com sêmen de *Piaractus mesopotamicus* “in natura” e descongelado, observadas através da microscopia eletrônica de varredura. (A) larva normal - sêmen “in natura”; (B) larva defeituosa - sêmen “in natura”; (C) larva normal - sêmen descongelado; (D) larva defeituosa - sêmen descongelado..... 60

## RESUMO

O objetivo neste trabalho foi identificar através dos parâmetros de qualidade do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), das taxas de fertilização, eclosão e morfologia das larvas, índices que permitam certificar o animal com melhores características reprodutivas. Além de, encontrar possíveis correlações entre os parâmetros quali-quantitativo do sêmen com a taxa de fertilização, taxa de eclosão e com a morfologia larval, provenientes de óvulos fertilizados com sêmen “in natura” e congelado. Foram utilizados 42 machos e 16 fêmeas de *P. mesopotamicus* para avaliar as correlações entre os parâmetros seminais com as taxas de fertilização, eclosão e morfologia das larvas. Através da extrusão foram coletados o sêmen e os óvulos, e avaliados os parâmetros quali-quantitativos seminais, e realizada a fertilização dos óvulos. Conforme o valor da porcentagem da taxa de fertilização de cada cruzamento (machoXfêmea), as fêmeas foram classificadas como: “fêmeas boas” - com taxa de fertilização  $\geq 70\%$  e “fêmeas ruins” - com taxas de fertilização  $< 70\%$ . Os parâmetros quali-quantitativos do sêmen não apresentaram diferença estatística ( $P>0,05$ ) em relação aos grupos de fêmeas “boas e ruins”. Somente a porcentagem de cauda dobrada foi maior ( $P<0,05$ ) no sêmen que fertilizou os óvulos o grupo das “fêmeas boas”, e cauda quebrada foi maior ( $P<0,05$ ) no sêmen que fertilizou o grupo das “fêmeas ruins”. A taxa de fertilização, eclosão e porcentagem de larvas normais foram maiores ( $P<0,01$ ) no grupo das “fêmeas boas”. Já a porcentagem de ovos gorados, larvas não eclodidas vivas e não eclodidas mortas, foi maior ( $P<0,05$ ) no grupo das “fêmeas ruins”. Larvas defeituosas e mortas não diferiram ( $P>0,05$ ) entre os dois grupos. As principais correlações encontradas no grupo das “fêmeas boas” foram: motilidade progressiva com anormalidades primárias ( $r=-0,23$ ;  $P=0,07$ ). Concentração espermática com taxa de eclosão ( $r=0,25$ ;  $P=0,05$ ) e com ovos gorados ( $r=-0,34$ ;  $P=0,007$ ). As correlações encontradas no grupo das “fêmeas ruins” foram: duração da motilidade com cauda enrolada ( $r=-0,35$ ;  $P=0,04$ ) e concentração espermática ( $r=-0,67$ ;  $P<0,0001$ ); ovos gorados e concentração espermática ( $r=0,33$ ;

$P=0,05$ ). Já para o estudo da avaliação da qualidade seminal “in natura” e congelado e sua correlação com as taxas de fertilização, eclosão e morfologia das larvas, foram utilizados seis machos e seis fêmeas de *P. mesopotamicus* induzidos com extrato de hipófise de carpa. Após a avaliação dos parâmetros seminais, uma alíquota de cada amostra coletada foi criopreservada e posteriormente descongelada. No sêmen “in natura”, motilidade, vigor espermático, duração da motilidade, espermatozoides normais e anormalidades secundárias foram maiores ( $P<0,0001$ ). As médias das taxas de fertilização e eclosão, porcentagem de larvas normais e larvas defeituosas dos óvulos fertilizados com o sêmen “in natura”, foram maiores ( $P<0,0001$ ) em relação ao sêmen descongelado. Verificou-se correlação apenas entre parâmetros quali-quantitativos do sêmen “in natura” e descongelado para: duração da motilidade com espermatozoide de cauda degenerada ( $r= -0,77$ ;  $P=0,0002$ ) no sêmen “in natura” e ( $r= -0,54$ ;  $P=0,01$ ) descongelado. Não foram observadas correlações dos parâmetros quali-quantitativos do sêmen “in natura” e descongelado com a taxa de fertilização, taxa de eclosão, ovos gorados e larvas defeituosas. Quanto aos resultados deparados, conclui-se que as correlações encontradas podem auxiliar na avaliação prévia do sêmen e dos machos, pois animais com índices menores de anormalidades espermáticas possuem uma motilidade progressiva e sua duração mais elevada, possivelmente ocasionando uma maior taxa de fertilização. Além desse fato, se a qualidade dos óvulos não for boa, para que ocorra uma melhor taxa de fertilização, a qualidade do sêmen precisa apresentar bons indicadores dos parâmetros. A qualidade seminal passa a ser primordial senão utilizar óvulos de boa qualidade. A qualidade espermática foi influenciada pelo processo de congelamento, incluindo a morfologia espermática no sêmen de *P. mesopotamicus*, levando a uma alteração na taxa de fertilização e eclosão.

Palavras-chave: anormalidade espermática, congelamento, espermatozoides, parâmetros seminais, peixe, qualidade espermática

## ABSTRACT

The objective in this work was to identify through the parameters of quality of the pacu semen (*Piaractus mesopotamicus*), of the fertilization rate, hatching and morphology of the larvae, indexes that allow certifying the animal with the best reproductive characteristic. Besides, to find possible correlations among the parameters quali-quantitative of the semen with the fertilization rate, hatching rate, and with the larval morphology, coming of eggs fertilized with semen "in natura" and frozen. A total of 42 males and 16 females of *P. mesopotamicus* were used to evaluate the correlations among the seminal parameters with its rates of fertilization, hatching and morphology of the larvae. Through the extrusion the semen and the egg were collected, and appraised the seminal quali-quantitative parameters, and accomplished the fertilization of the eggs. According to the value of the percentage of the fertilization rate of each crossing (maleXfemale), the females were classified as: "good females" - with fertilization rates  $\geq 70\%$  and "bad females" - with fertilization rates  $<70\%$ . The quali-quantitative parameters of the semen didn't present statistical difference ( $P>0.05$ ) in relation to the groups of "good and bad" females. Only the percentage of bent tail was larger ( $P <0.05$ ) in the semen that fertilized the egg of the group of "good females", and broken tail was larger ( $P <0.05$ ) in the semen that fertilized the group of the "bad females". The fertilization rate, hatching and percentage of normal larvae were larger ( $P <0.01$ ) in the group of the "good females". Already the percentage of wasted eggs, larvae no emerged alive and no emerged died, it was larger ( $P <0.05$ ) in the group of "bad females". Defective and dead larvae didn't differ ( $P>0.05$ ) among the two groups. The main correlations found in the group of the "good females" were: progressive motility with primary abnormalities ( $r=-0.23$ ;  $P=0.07$ ). Spermatic concentration with hatching rate ( $r=0.25$ ;  $P=0.05$ ) and with wasted eggs ( $r=-0.34$ ;  $P=0.007$ ). The correlations found in the group of the "bad females" were: motility duration with coiled tail ( $r=-0.35$ ;  $P=0.04$ ) and spermatic concentration ( $r=-0.67$ ;  $P <0.0001$ ); wasted eggs and spermatic

concentration ( $r=0.33$ ;  $P=0.05$ ). Already for the study of the quality seminal evaluation "in natura" and frozen and its correlation with the fertilization rate, hatching and morphology of the larvae, six males and six females of *P. mesopotamicus* were used induced with extract of carp pituitary. After the evaluation of the seminal parameters, a bracket of each collected sample was cryopreserved and later thawed. In the semen "in natura", motility, spermatic vigor, duration of the motility, normal spermatozoa and secondary abnormalities were larger ( $P < 0.0001$ ). The averages of the fertilization rate and hatching, percentage of normal larvae and defective larvae of the eggs fertilized with the semen "in natura", were larger ( $P < 0.0001$ ) in relation to the thawed semen. Correlation was just verified among quali-quantitative parameters of the semen "in natura" and thawed for: duration of the motility with spermatozoa of degenerate tail ( $r = -0.77$ ;  $P=0.0002$ ) in the semen "in natura" and ( $r = -0.54$ ;  $P=0.01$ ) thawed. Correlations of the quali-quantitative parameters of the semen "in natura" were not observed and thawed with the fertilization rate, hatching rate, wasted eggs and defective larvae. As for the run across results, it is ended that the found correlations can auxiliary in the previous evaluation of the semen and of the males, because you encourage with smaller indexes of spermatics abnormalities possess a progressive motility and its higher duration, possibly causing a larger fertilization rate. Beyond of that fact, if the quality of the egg is not good, so that it causes a better fertilization rate, the quality of the semen needs to present good indicators of the parameters. The quality seminal raised the primordial being except using egg of good quality. The quality spermatic was influenced by the freezing process, including the spermatic morphology in the semen of *P. mesopotamicus*, taking the alteration in the fertilization rate and hatching.

Key Words: spermatic abnormality, freezing, spermatozoa, seminal parameters, fish, spermatic quality



# **CAPÍTULO I**

## **INTRODUÇÃO**

## 1. Introdução Geral

A pesca extrativista e a aquicultura mundial proveram aproximadamente 110 milhões de toneladas de pescado para consumo humano em 2006, possuindo um registro de 16,7 Kg/per capita de produtos de origem animal, sendo o mais alto registrado. Deste total, a aquicultura respondeu por 47%, sendo o setor de produção de alimentos de origem animal com crescimento mais elevado, especialmente nos países em desenvolvimento. Até 2030 está prevista uma produção de 150 milhões de toneladas de pescado (FAO, 2008).

O Brasil apresenta excepcionais vantagens para o desenvolvimento da aquicultura, 5.500.000 ha de reservatórios de água doce (aproximadamente 12% da água doce do planeta), clima favorável para desenvolvimento dos organismos, terras disponíveis, mão de obra relativamente barata e crescente mercado interno. A aquicultura brasileira em 2005 respondeu por 25,6% da produção total de pescado, sendo principais produtores as regiões Sul, Nordeste e Sudeste (IBAMA, 2007).

Os peixes constituem o principal grupo de organismos aquáticos cultivados, com 80-85% da produção, seguidos pelos camarões marinhos e moluscos, sendo que as espécies mais cultivadas são as tilápias, carpas e bagres (Camargo & Pouey, 2005) e ainda as espécies nativas, tambaquis, pacus e surubins (Queiroz et al., 2002). A explicação para o fato de as duas maiores produções de pescado serem de espécies exóticas, está no fato de que, as técnicas para a produção comercial já estão estabelecidas para estas espécies exóticas supracitadas no Brasil.

Apesar de ter o conhecimento de técnicas de reprodução em cativeiro, desenvolvidas em território nacional desde 1934 (Woynarovich & Horváth, 1983), as espécies nativas só apresentam números significativos quando se trata de pesca extrativa. Segundo dados do IBAMA (2007), a curimatã, a piramutaba e a dourada são as três espécies com maiores índices de produção extrativistas em território nacional. Já para as espécies cultivadas foram produzidas 114 mil toneladas de peixes exóticos e 56 mil toneladas de peixes nativos, da produção da piscicultura no Brasil. Os peixes redondos (espécies e híbridos do gênero *Piaractus* e *Colossoma*) responderam por 82% da quantidade de peixes nativos cultivados (IBAMA, 2007).

Com o avanço da piscicultura no Brasil a partir da década de 80 começaram a surgir novas técnicas de criação e também alternativas quanto às espécies de peixes nativos criadas como o pacu (*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 tornar-se um importante fornecedor de pescado mundial de água doce, a partir da criação de espécies nativas, tais como o pacu, o qual é uma das principais espécies da fauna aquática brasileira (Fonseca & Silva, 2004).

Atualmente, as pesquisas estão voltadas para o aperfeiçoamento do manejo reprodutivo e aplicação de biotecnologias nos processos reprodutivos como a criopreservação de sêmen (Streit Jr. et al, 2006), resfriamento de embriões (Streit Jr. et al, 2007), dentre outros estudos, permitindo um grande sucesso para a produção na aquicultura.

## 2. Revisão de Literatura

### 2.1. Espécie: pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (Holmberg, 1887)

O pacu *Piaractus mesopotamicus* é representante da superordem Ostariophysi, e ordem Characiformes, da família Characidae e subfamília Myleinae (Urbinati & Gonçalves, 2005). Dentre os gêneros destacam-se o *Piaractus* e a espécie *Piaractus mesopotamicus*, que era conhecida como *Colossoma mitrei*. Recebe outras denominações comuns, como caranha, pacu-caranha ou pacu-guaçu (Urbinati & Gonçalves, 2005). É originário da Bacia do rio da Prata, especificamente encontrado nos rios Paraná e Paraguai (Urbinati & Gonçalves, 2005).

Em ambientes naturais sua coloração é quase preta, passando a amarelo brilhante quando está na cabeceira dos rios para efetuar a desova (Britski, 1999). De corpo ovalado e estreito, pode atingir um metro de comprimento e chegar a pesar até 20 kg (CEMIG/CETEC, 2000). Com o dorso cinza-escuro e o ventre amarelo-dourado, na fase juvenil apresenta pintas sobre o corpo e é possuidor de dentes truncados e tricuspídeos (CEMIG/CETEC, 2000). Segundo Urbinati & Gonçalves (2005), este é um peixe onívoro, que se alimenta principalmente de folhas, frutos e sementes, embora seja uma espécie onívora, o que leva a crer que tenha habilidade especial na digestão e na absorção de alimentos, ricos em carboidratos.

O pacu apresenta o período reprodutivo de novembro a janeiro, e sua desova é total e a fertilização externa. Durante a estação seca (julho a outubro) ele realiza longa migração enquanto ocorre a maturação das gônadas (Romagosa et al., 1988; Urbinati & Gonçalves, 2005).

O tamanho médio da primeira maturação gonadal, na fêmea de pacu, é de 34 cm (comprimento total) e idade média de três anos (Urbinati & Gonçalves, 2005), podendo uma fêmea produzir, em média, 1.200 ovócitos por grama de desova (Bock & Padovani, 2000). A produção de alevinos desta espécie é significativa, podendo chegar a nove milhões de alevinos por ano (Jomori, 2001).

Segundo Teodoro & Ferraz de Lima (1986), o grau de maturação gonadal do pacu é determinado pelas seguintes características externas: fêmeas apresentam abdômen abaulado e macio e papila urogenital saliente e avermelhada e os machos fluidez de sêmen obtido por massagem abdominal suave.

Embora o pacu seja uma espécie que se adapte com grande facilidade, não se reproduz em cativeiro, a menos que seja submetida à indução hormonal (Romagosa et al., 1988). A reprodução induzida vem sendo muito estudada e existem vários relatos sobre o uso de diferentes indutores hormonais. A literatura descreve o uso de produtos naturais, como extrato de pituitária e hCG (gonadotrofina coriônica humana), e de substâncias sintéticas, como os análogos do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH ou LH-RH) e de antagonistas do hormônio bloqueador de gonadotrofinas (dopamina) (Urbinati & Gonçalves, 2005).

O extrato de pituitária é o indutor de desova mais usado no pacu, sendo que a fêmea responde adequadamente ao protocolo de aplicação de 5,5 mg/Kg, em duas doses (10% na primeira e restante na segunda), com intervalo de 12 horas entre as injeções, e o macho de 2 mg/Kg em dose única, coincidindo com a segunda dose aplicada na fêmea (Bernardino e Lima, 1999).

A pituitária é responsável pela produção de uma série de hormônios (FSH, LH, GH, TSH, ACTH, prolactina, ocitocina, ADH e outros) e também regula, direta e indiretamente, a atividade de muitas glândulas endócrinas (Frienden & Linpue, 1975). Os mesmos autores ainda citaram que a atividade secretora das células da adeno-hipófise é regulada por hormônios produzidos no hipotálamo e os hormônios secretados por ela, são distribuídos para as células através de uma via vascular específica. A adeno-hipófise possui a célula gonadotrófica que secreta hormônio folículo estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH). No macho, o FSH age nas células germinativas e nos túbulos seminíferos, sendo responsável pela espermatogênese até a fase de espermatócito secundário. Entretanto, o LH, nos machos, é responsável pela

estimulação das células de “Leydig” a produzirem andrógenos (Hafez & Hafez, 2000). A qualidade seminal de *Prochilodus lineatus*, oriunda da indução com extratos pituitário de carpa, frango e coelho, foi testada por Streit Jr. et al. (2004). Conforme os autores, o extrato de pituitária de frango apresentou eficiência semelhante ou melhor do que o tradicional extrato pituitário de carpa.

O pacu (*P. mesopotamicus*) é um peixe de grande porte que vem sendo utilizado nas pisciculturas e em programas de repovoamento de reservatórios (Maria et al., 2004). A criação dessa espécie tem sido incentivada em razão do seu bom valor comercial e da grande aceitação no mercado nacional, juntamente com a questão ambiental, visando à redução de impactos gerados pelo represamento dos rios (Vaz et al., 2000).

A importância, cada vez maior, que vem sendo atribuída à criação de peixes, torna-se imperativo aos criadores aprimorar técnicas necessárias de forma a assegurar o êxito básico e inicial da criação, como a produção de alevinos para povoamento, repovoamento e criação em piscicultura (Bock & Padovani, 2000).

## 2.2. Qualidade dos Gametas Masculinos

A determinação da qualidade do sêmen é o passo fundamental para aperfeiçoar a fertilização, através da manipulação do sêmen, seleção de reprodutores viáveis, como também pesquisas com biotecnologias tal como, armazenamento de sêmen (resfriamento ou criopreservação) (Billard et al., 2004).

Alguns estudos, sobre a qualidade de sêmen de peixe demonstram alta variação intrínseca ao animal (Dreanno et al., 1998). Dentre os diferentes parâmetros comumente avaliados como: o volume do sêmen, pH do sêmen, concentração de espermatozoides, estrutura do espermatozoide, motilidade progressiva, vigor espermático, duração da motilidade e morfologia espermática. Como listado por Rana (1995), estas variações podem ser em razão da variabilidade genética, envelhecimento do espermatozoide, sazonalidade, técnicas de coleta e avaliação (métodos subjetivos).

Em algumas espécies, como Salmão do Atlântico (*Salmo salar*) (Rana, 1995), ou na Carpa (*Cyprinus carpio*) (Billard et al., 1995b) a contaminação com urina aumentou a variabilidade da composição físico-química do plasma seminal, além de reduzir a osmolaridade e aumentar a concentração do íon potássio. Em alguns casos como no Catfish, a urina de baixa osmolaridade (<100 mOsm/Kg), se adicionada ao sêmen,

provoca um choque hiposmótico nos espermatozoides, iniciando assim sua motilidade precoce e diminuindo sua capacidade para fertilizar os óvulos (Saad & Billard, 1995).

Conforme Salisbury & Vandermark (1964), o estudo do sêmen pela determinação do volume coletado, motilidade e concentração de espermatozoides, serve de base para a diluição do material fertilizante e medem a capacidade de produção do sêmen, em cada reprodutor.

### *2.2.1. Concentração Espermática*

A concentração espermática é uma das medidas quantitativas mais importantes utilizadas na pesquisa e rotina de avaliação do sêmen de peixes de fertilização externa ou interna, para maximizar o aproveitamento do material fertilizante e para obter melhores resultados na fertilização (Fogli da Silveira et al., 1988). A concentração dos espermatozoides no sêmen é frequentemente usada para caracterizar o sêmen. Um modo preciso é contar o número de espermatozóides com a câmara de Neubauer e por espectrofotometria. Segundo Billard et al. (1993), a concentração espermática é um dos principais parâmetros para avaliar a qualidade seminal de peixes. No entanto, Maria (2005) afirmou que não é considerada uma medida específica da capacidade de fertilização do sêmen e pode variar muito dentro de determinadas espécies de peixes, num mesmo indivíduo ao longo da vida, e com o método de indução da espermiacção.

Vários são os fatores que determinam a concentração espermática do sêmen de peixes, dentre eles destacam-se a espécie (Godinho, 2007), a idade dos reprodutores (Bastardo et al., 2004) a realização de coletas seminais sucessivas (Kavamoto et al., 1997), a realização ou não de indução hormonal (Kavamoto & Fogli da Silveira, 1986), os hormônios utilizados na indução hormonal (Streit et al., 2004), a época de coleta (Borges et al., 2005) e tamanho do peixe (Glogowski et al., 1999).

Os peixes produzem quantidade variável de gametas. Em algumas espécies, o macho produz 100 bilhões de espermatozoides/ano/kg do peso corporal ou mais de  $1 \times 10^9$  espermatozoides/g de testículo/dia, sendo 10 vezes maior do que a produção relatada para mamíferos (Billard, 1990).

### *2.2.2. Mecanismo de inativação dos Gametas Masculinos de Peixe*

Grande parte das espécies de peixes, tanto de água doce como água salgada, os espermatozoides são imóveis nos testículos, mas adquirem o potencial para motilidade espermática durante transferência do testículo para o ducto espermático (Morisawa et al., 1986).

Têm sido considerados até o momento dois mecanismos que mantêm imóveis os espermatozoides no fluido seminal, em peixes de água doce. O primeiro mecanismo, observado em salmões principalmente, está baseado na concentração do íon potássio, quando sua concentração está elevada (acima de 40 mM), a motilidade é inibida, e posteriormente ativada, quando sua concentração diminui (menor de 25 mM) (Mojica, 2004). O segundo mecanismo de inibição da motilidade espermática na maioria das espécies, está baseado na diferença da osmolaridade do plasma seminal com a do meio ambiente (Billard et al., 1995a). Em geral, a motilidade espermática é induzida por pressão hipo-osmótica em água doce, e por pressão hiperosmótica em água salgada.

### 2.2.3. *Motilidade, Duração da Motilidade e Vigor Espermático*

A motilidade espermática é um fator preponderante para determinar a qualidade e capacidade de fertilização do sêmen (Billard et al., 1995a; Suquet et al., 1998; Cosson et al., 1999; Rurangwa et al., 2004). A importância da motilidade é tão preponderante que mesmo os espermatozoides sendo inférteis, os mesmos apresentam algum tipo de motilidade (Billard et al., 1995b).

A motilidade dos espermatozoides de peixe de água doce é iniciada em um meio hipo-osmótico (Morisawa, 2008), e sua duração é muito curta (aproximadamente de 30 segundos a vários minutos), e varia entre as espécies e na mesma espécie; dependendo de muitos fatores que afetam as características bioquímica, fisiológica e metabólica da respiração do reprodutor e do espermatozoide (Alavi et al., 2008). Os espermatozoides de peixes mostram diferenças entre as espécies, na iniciação (Cosson et al., 1995), duração (Billard & Cosson, 1992) e no padrão de motilidade (Ravinder et al., 1997). Vários parâmetros do meio natatório, como concentração de íon (incluindo Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>), pressão osmótica, pH, temperatura e diluição, afetam a duração da motilidade espermática de peixe (Billard et al., 1995a; Cosson et al., 1999; Cosson, 2004).

A duração da motilidade do sêmen de teleósteos de água doce de fertilização externa é bastante reduzida - entre 1 e 2 minutos (Billard & Cosson, 1992) e muito

variável entre as espécies. As durações médias da motilidade do sêmen “in natura” de curimba podem variar entre 612 segundos (Cóser et al., 1984) e 43 segundos (Franciscatto et al., 2002). Assim como para sêmen de *Piaractus mesopotamicus*, a duração da motilidade foi de 62,5 segundos (Miliorini et al., 2002) e 486,83 segundos (Maria et al., 2004).

Vários fatores interagidos na fisiologia do espermatozoide e no processo de ativação (Billard & Cosson, 1992) fazem com que ocorra uma variação entre as espécies. Esses fatores podem estar relacionados com a diminuição do estoque de energia que propicia a motilidade (Billard, 1990; Cosson et al., 1999) e com os diluentes utilizados para sua ativação. O vigor espermático, que se caracteriza pela velocidade com que os espermatozoides se movimentam é outro parâmetro essencial para uma boa avaliação dos espermatozoides de peixes (Cosson et al., 1999).

#### 2.2.4. *Morfologia Espermática*

O estudo morfológico das células espermáticas e sua relação com a infertilidade dos machos alcançaram maior importância com o advento da inseminação artificial em mamíferos, especialmente na espécie bovina (Kavamoto et al., 1999). É outro fator importante na avaliação qualitativa do sêmen, sendo que o aumento das anormalidades provoca diminuição na motilidade e no vigor espermático (Lahnsteiner et al., 1998; Cosson et al., 1999), provocando uma redução na capacidade de fecundação.

#### 2.3. *Parâmetro de Qualidade Seminal - Taxa de Fertilização*

Alguns autores relacionam a eficiência da qualidade seminal, com a taxa de fertilização, tanto em estudos de inseminação como em preservação do sêmen (Bromage & Roberts, 1995).

Ciereszko & Dabrowski (1994) trabalhando com *Oncorhynchus mykiss* encontraram correlações entre taxa de motilidade e capacidade de fertilização. Por outro lado, Lahnsteiner et al., (1998) estudando a mesma espécie, encontrou correlações entre a taxa e velocidade da motilidade com a capacidade de fertilização, informando que a velocidade da natação de  $< 5$  um/segundos (definidos como imóveis) teve uma capacidade de fertilização de aproximadamente 20%.



Conforme Alavi & Cosson (2005), a duração da motilidade, capacidade de fertilização e velocidade dos espermatozoides depende da temperatura do meio de ativação. Os recursos energéticos dos espermatozoides de peixes são limitados. Um aumento na velocidade causada pela temperatura elevada na solução de natação leva para uma curta duração da motilidade, e redução da temperatura de natação.

#### *2.4. Fatores que levam a perda de qualidade do sêmen*

A deterioração na qualidade do sêmen depende das espécies de peixes, como também da composição do diluidor e das condições de armazenamento. Todavia a redução na capacidade de fertilização pode ser corrigida pelo aumento do número de espermatozoides viáveis durante a inseminação (Saad et al., 1988).

A qualidade do sêmen produzido por reprodutores de peixes é altamente variável e depende de inúmeros fatores externos como o regime alimentar, variação da temperatura ambiente, qualidade do alimento ingerido, doenças, período reprodutivo além de fatores intrínsecos ao animal como a espécie, idade e a carga genética (Bromage, 1995). No processo reprodutivo com sêmen de peixe “in natura” ou criopreservado é fundamental que os espermatozoides apresentem boa qualidade para haver sucesso na fertilização (Billard et al., 1995a; Johnson, 2000; Rurangwa et al., 2004).

A inseminação artificial necessita de uma grande quantidade de espermatozoide de boa qualidade disponível para o momento da fertilização. Coleta e armazenamento de sêmen de boa qualidade para o uso futuro podem melhorar a conveniência da inseminação artificial e reduzir o estresse nos reprodutores machos causados pelas repetidas coletas de amostras, a qual reduz a qualidade do sêmen (Yao et al., 2000).

Para uma eficiente fertilização, além da qualidade do sêmen, o controle de outros fatores, como a água e meios ativadores utilizados no processo de fertilização, são de vital importância. Fatores físicos e químicos dos ativadores interferem na fertilização, uma vez que podem atuar sobre a viabilidade do sêmen.

#### *2.5. Criopreservação*

Criopreservação é um método efetivo para o armazenamento a longo prazo de espermatozoides, e provê o abastecimento de gametas viáveis durante o ano todo (Zhang et al., 2003). 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 refere-se a programas de melhoramento genético, pois a consanguinidade dos indivíduos resulta em uma baixa variabilidade genética na prole (Hafez, 1995; Bromage, 1995; Honeyfield & Krise, 2000), além 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).

A conservação de sêmen por longos períodos pode ter por finalidade prover a necessidade de genes para aumentar a variabilidade genética de uma determinada população. Da mesma forma que uma população natural de peixes depende da alta variabilidade genética para aumentar suas chances de adaptação ao meio onde vive e um plantel de reprodutores precisa dessa variabilidade para diminuir possíveis efeitos negativos causados por endocruzamentos e homozigoses (Carolsfeld et al., 2003).

Para o armazenamento do sêmen sob baixas temperaturas é importante que seu congelamento seja feito sem ativá-lo, sendo imprescindível evitar seu contato com a água ou mesmo a urina do peixe durante sua extração (Harvey & Carolsfeld, 1993).

Os procedimentos de congelamento necessitam do uso de meios diluentes e agentes protetores, sendo geralmente constituídos de soluções aquosas que possuam mesma osmolaridade do fluido seminal. Contudo, para não ocorrer a ativação dos espermatozoides, a solução a ser elaborada, comumente é composta com a adição de glicose para aumentar a sua pressão osmótica e evitar com isso a ativação do espermatozoide (Carneiro, 2007). 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. Resumidamente, quando misturado ao meio diluidor, o sêmen não deve estar móvel, mas a sua ativação deve continuar sendo possível com a adição de água no momento da fertilização após o armazenamento e descongelamento (Ohta & Izawa, 1996).

A composição do meio diluidor é de fundamental importância a fim de garantir a manutenção das células espermáticas de peixes durante a criopreservação (Tan-Fermin et al., 1999). Os diluidores são soluções de sais ou de carboidratos, que ajudam a manter a viabilidade das células em baixas temperaturas, sendo que um diluente criopreservativo é projetado não só para prevenir as crioinjúrias dos espermatozoides, mas também a iniciação da motilidade (Maria, 2005).

Os crioprotetores devem ser adicionados ao meio diluidor para que haja uma proteção do espermatozoide durante o congelamento e o descongelamento (Squires et al., 1999). O sucesso no armazenamento de sêmen de peixe em nitrogênio líquido tem sido alcançado em várias espécies de peixes (Melo & Godinho, 2006).

A criopreservação de sêmen de peixe está bem estabelecida e uma variedade de técnicas demonstram excelentes resultados, por consequência, bancos de genes de peixes, tem sido operados em vários países, incluindo o Brasil (Harvey, 2000).

## 2.6. *Anormalidades em Larvas de Peixes*

A presença de anormalidades morfoanatômicas em peixes, é um problema frequente e importante na produção aquícola (Takeuchi et al., 1998), devido a seu efeito negativo no desempenho biológico, na imagem e valor comercial e na produção de benefícios para a criação de peixe (Boglione et al., 1994).

Conforme Barbaro et al. (1984), os altos índices de má formação espinhal que aparecem em peixes cultivados são grandes problemas para o desenvolvimento industrial. Conforme os mesmos autores, isto é frequentemente associado com depressão do crescimento, levando a altos índices de mortalidade.

Embora na natureza a frequência das anormalidades morfoanatômicas em peixes é relativamente baixa, sua forte correlação com a poluição e outros distúrbios ambientais, requer importantes avanços no seu estudo (Von Westernhagen & Dethlefsen, 1997). Na maioria dos casos, a identificação dos fatores causadores é difícil, devido ao grande número de sintomas comumente expressados e o efeito frequentemente cooperativo, como também devido às amplas fases de desenvolvimento durante a qual eles atuam (Divanach et al., 1996).

Geralmente as deformidades morfoanatômicas nos peixes são misturas complexas de diferentes desordens no osso que incluem a má formação nas vértebras e na espinha, como lordose, escoliose dentre outras (Lall & Lewis-McCrea, 2007). Os resultados com estudos com African catfish (*Clarias gariepinus*) mostram que a taxa de eclosão de larvas com má formação em grupos fertilizados com sêmen congelado, foi superior ao grupo fertilizado com sêmen fresco (Horváth & Urbányi, 2000). Estas deformidades em larvas podem ser o resultado da toxicidade dos crioprotetores nos óvulos durante a fertilização ou dano causado no espermatozoide pelo processo de congelação e descongelação. Já Miskolezi et al. (2005), não encontraram diferença na porcentagem de larvas com má formação fertilizadas com sêmen congelado em relação ao sêmen fresco. Conforme os autores, a taxa relativamente alta de deformidades larvais pode ser atribuída à qualidade inadequada dos ovos ou as condições de criação do African catfish (*Clarias gariepinus*).

### 3. Literatura Citada

- Alavi, S.M.H.; Cosson, J. Sperm motility in fishes. I. Effects of temperature and pH: a review. **Cell Biology International**, v. 29, p.101-110, 2005.
- Alavi, S.M.H.; Psenicka, M.; Rodina, M. et al. Changes of sperm morphology, volume, density and motility and seminal plasma composition in *Barbus barbus* (Teleostei: Cyprinidae) during the reproductive season. **Aquatic Living Resources**, v.21, p.75–80, 2008.
- Barbaro, A.; Francescon, A.; Guidastrì, R. Extensive rearing in a “Valle” of the lagoon of Venice of *Sparus aurata* L. obtained by induced spawning. **Nova Thalassia**, v.6, p.281-286, 1984.
- Bastardo, H.; Guedez C.; León, M. Características del semen de trucha arco-iris de diferentes edades, bajo condiciones de cultivo en Mérida, Venezuela. **Zootecnia Tropical**, v.22, n.3, p.277-288, 2004.
- Bernardino, G.; Lima, R.V. Situação da criação de *Colossoma* e *Piaractus* no sudeste do Brasil (1988-1991). In: Bernardino, G.; Lima, R.V. **Criação de Colossoma e Piaractus no Brasil**. Brasília:Ibama, 1999, p.262-266.
- Billard, R. Artificial Insemination in Fish. In: Lamming, G.E. (Org.). **Marshall' s Physiology of Reproduction**. 4.ed. Endinburgh, London, Melbourne and New York: Churchill Livingstone, chap.9, p.870-887, 1990.
- Billard, R.; Cosson, J. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. **Journal of Experimental Zoology**, v.261, p.122– 131, 1992.
- Billard, R.; Cosson, J.; Crim, L.W. et al. Sperm Physiology and Quality in: **Broodstock Management and Egg and Larval Quality**. Eds. Bromage, N. R. and Roberts, R.J. Blackwell Science. 1995a. 424p.
- Billard, R.; Cosson, J.; Laurence, W.C. Motility of fresh and aged halibut sperm. **Aquatic Living Resources**, v.6, p.67-75, 1993.
- Billard, R.; Cosson, J.; Noveiri, S.B. et al. Cryopreservation and short-term storage of sturgeon sperm, a review. **Aquaculture**, v.236, p.1-9, 2004.
- Billard, R.; Cosson, M.P.; Perchec, G. et al. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. **Aquaculture**, v.129, p.95-112, 1995b.
- Bock, C.L.; Padovani, C.R. Considerações sobre a reprodução artificial e alevinagem de pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) em viveiros. **Acta scientiarum**, v. 22, n.2, p.495-501, 2000.
- Boglione, C.; Marino, G.; Ferreri, F. et al. Anatomical aspects for seed quality assessment in sea bass(*Dicentrarchus labrax*): hatchery and wild populations. In: Kestemont, P., Muir, J., Sevilla, F., Williot, P.(Eds). **Measures for Success**. Metrology and Instrumentation in Aquaculture Management. CEMAGREF, France, p.191–197, 1994.
- Borges, A.; Siqueira, D.R.; Jurinitz, D.F. et al. Biochemical composition of seminal plasma and annual variations in semen characteristics of jundia' *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, Pimelodidae). **Fish Physiology and Biochemistry**, v.31, p.45-53, 2005.

- Britski, H.A. **Peixes do Pantanal. Manual de identificação**. Brasília: Embrapa–SPI, 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, 1995, p.1–24.
- Camargo, S.G.O.; Pouey, J.L.O.F. Aquicultura um mercado em expansão. **Revista Brasileira de Agrociências**, v.11, p.393-396, 2005.
- Carneio, P.C.F. Tecnologias de produção e armazenamento de sêmen de peixes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.3, p.361-366, 2007.
- Carolsfeld, J.; Godinho, H.P.; Zaniboni Filho, E. et al. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. **Journal of Fish Biology**, v.63, n.2, p.472-489, 2003.
- Ciereszko, A.; Dabrowski, K. Relationship between biochemical constituents of fish semen and fertility: the effect of short-term storage. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.12, n.5, p.357-367, 1994.
- Companhia Energética de Minas Gerais; Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais. **Guia ilustrado de peixes da bacia do rio Grande**. Belo Horizonte: CEMIG/CETEC, 2000. 144p.
- Cóser, A.M.L.; Godinho, H.; Ribeiro, D. Cryogenic preservation of spermatozoa from *Prochilodus scrofa* and *Salminus maxillosus*. **Aquaculture**, v. 37, p. 387-390, 1984.
- Cosson, J. The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa. **Aquaculture International**, Dordrecht, v.12, n.1, p.69-85, 2004.
- Cosson, J.; Billard, R.; Cibert, C. et al. Ionic factors regulating the motility of fish sperm. In: GAGNON, C. (Ed.) **The male gamete: from basic science to clinical applications**. Viena: Cache River Press, Chap.16, p.162-186, 1999.
- Cosson, M.P.; Cosson, J.; Andre, F. et al. cAMP/ATP relationship in the activation of trout sperm motility—their interaction in membrane-deprived models and in live spermatozoa. **Cell Motil. Cytoskeleton**, v.14, p.424– 434, 1995.
- Divanach, P.; Boglione, C.; Menu, B. et al. Abnormalities in finfish mariculture: an overview of the problem, causes and solutions. In: Chatain, B., Saroglia, M., Sweetman, J., Lavens, P. (Eds). **Sea bass and Sea bream Culture: Problems and Prospects**. European Aquaculture Society, Oostende, Belgium, 1996, p.45–66.
- Dreanno, C.; Suquet, M.; Desbruyères, E. et al. Effect of urine on semen quality in turbot *Psetta maximal*. **Aquaculture**, v.169, p.247–262, 1998.
- FAO, 2008. **El Estado Mundial de La Pesca y La Acuicultura 2008**. Examen mundial de la pesca y la acuicultura. Roma: FAO, 2009. 218p.
- Fogli da Silveira, W.; Kavamoto, E.T.; Rigolino, M.G. et al. Fertilidade do sêmen de truta arco-íris, *Salmo irideus* gibbons, em diferentes concentrações de espermatozoides por óvulo. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.15, n.1, p.51-54, 1988.
- 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 o resfriamento à 4°C. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, n.3, p.213-215, 2002.
- Frieden, E.; Lipner, H. **Endocrinologia Bioquímica dos Vertebrados**. São Paulo: Editora Edgard Blücher. 1975. 131p.
- Glogowski, J.; Babiak, I.; Kucharczyk, D. et al. Some properties of bream *Abramis brama* L. sperm and its cryopreservation. **Aquaculture Research**, v.30, p.765-772, 1999.
- Godinho, H.P. Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.3, p.351-360, 2007.
- Hafez, E.S.E. **Reprodução animal**. São Paulo: Editora Manole, 1995, p.582.
- Hafez, E.S.E; Hafez, B. **Reproduction in farm animals**. 7.ed. Philadelphia: Lippicott Williams e Wickins, 2000. 509p.
- Harvey, B. The application of cryopreservation on fish genetic conservation. In: Tiersch, T.R., Mazik, P.M. (Eds.) **Cryopreservation in Aquatic Species**. Advances in World Aquaculture, vol. 7. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, 2000, p.332–337.
- 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.
- 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, 2000. p.49-58.
- Horváth, Á.; Urbányi, B. The effect of cryoprotectants on the motility and fertilizing capacity of cryopreserved African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) sperm. **Aquaculture Research**, v.31, p.317–324, 2000.
- IBAMA. **Estatística da pesca 2005**: Brasil, grandes regiões e unidades da federação. Brasília: IBAMA, 2007. 137p.
- Johnson, L.A. Lessons from the cryopreservation of livestock sperm In: Tiersch, T.R.; Mazik, P.M. (Ed.). **Cryopreservation in aquatic species**. Baton Rouge: World Aquaculture Society, 2000. p.381-387.
- Jomori, R.K. **Desenvolvimento, sobrevivência e aspectos econômicos da produção de alevinos de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), diretamente em viveiros ou com diferentes períodos de cultivo inicial de larvas em laboratório**. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2001. 69p. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, 2001.
- Kavamoto, E.T.; Barnabe, V.H.; Campos, B.E.S. et al. Anormalidades morfológicas nos espermatozoides do curimatá, *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881) (Osteichthyes, Characiformes, Prochilodontidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, v.25, p.61-66, 1999.

- Kavamoto, E.T.; Fogli da Silveira, W. Características físicas, químicas e microscópicas do bagre, *Rhamdia hylarri* (Valenciennes, 1840) em condições de campo. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.13, p.95-100, 1986.
- Kavamoto, E.T.; Mainardes-Pinto, C.S.R.; Andrade-Talmelli, E.F. et al. Produção espermática do curimatá *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881). **Boletim do Instituto de Pesca**, v.24, n.único, p.73-78, 1997.
- Lahnsteiner, F.; Berger, B.; Weismann, T. et al. Determination of semen quality of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by sperm motility, seminal plasma parameters, and spermatozoa metabolism. **Aquaculture**, v.163, p.163–181, 1998.
- Lall, S.P.; Lewis-McCrea, L.M. Role of nutrients in skeletal metabolism and pathology in fish — An overview. **Aquaculture**, v. 267, p.3-19, 2007.
- Maria, A.N. **Diluidores e crioprotetores no resfriamento e congelamento do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2005. 71p. (Dissertação de mestrado) - Universidade Federal de Lavras, 2005.
- 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, n.1, p.191-194, 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 São Paulo, Brazil. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v.24, p.981-985, 2002.
- Melo, F.C.S.A.; Godinho, H.P. A protocol for cryopreservation of spermatozoa of the fish *Brycon orthotaenia*. **Animal Reproduction**, v.3, n.3, p.380-385, 2006.
- Miliorini, A.B.; Murgas, L.D.S.; Viveiros, A.T.M. et al. Resfriamento do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) à 4°C, utilizando diferentes concentrações de dimetilsulfóxido. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, n.3, p.209-211, 2002.
- Miskolezi, E.; Mihálffy, S.; Várkonyi, E.P. et al. Examination of larval malformations in African catfish *Clarias gariepinus* following fertilization with cryopreserved sperm. **Aquaculture**, v.247, p.119-125, 2005.
- Mojica, C.A.P. 2004. **Análise ultraestrutural e avaliação do sêmen de peixes neotropicais, *Brycon orbignyanus*, *Rhamdia quelen* e *Brycon hylarii* (Pisces, Teleostei)**. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista Centro de Aquicultura da UNESP, 2004. 82p. (Dissertação de mestrado) - Centro de Aquicultura da UNESP, 2004.
- Morisawa, M. Adaptation and strategy for fertilization in the sperm of teleost fishes. **Journal of Applied Ichthyology**, v.24, p.359–361, 2008.
- Morisawa, S.; Morisawa, M. Acquisition of potential for sperm motility in rainbow trout and chum salmon. **Journal of Experimental Biology**, v.126, p.89–96, 1986.
- Ohta, H.; Izawa, T. Diluent for cool storage of the Japanese eel (*Anguilla japonica*) spermatozoa. **Aquaculture**, v.142, p.107-118, 1996.
- Queiroz, J.F.; Lourenço, J.N.P.; Kitamura, P.C. A EMBRAPA e a aquicultura: demandas e prioridades de pesquisa. Brasília: **Embrapa Informações Tecnológica**, 2002.



- Rana, K. Preservation of Gametes. In: Bromage, N.R. and Roberts, R.J. (Eds) **Broodstock Management and Egg and Larval Quality**. Blackwell Science. 1995. 424p.
- Ravinder, K.; Nasaruddin, K.; Majumdar, K. C. et al. Computerized analysis of motility, motility patterns and motility parameters of spermatozoa of carp following short-term storage of semen. **Journal of Fish Biology**, v.50, p.1309-1328, 1997.
- 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, n.1, p.60-63, 1988.
- 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, n.1, p.1-28, 2004.
- Saad, A.; Billard, R. Production et gestion des espermatozoides chez le poisson chat europeen *Silurus glanis*. **Aquatic Living Resources**, v.8, p.323-328, 1995.
- Saad, A.; Billard, R.; Theron, M.C. et al. Short-term preservation of carp (*Cyprinus carpio*) semen. **Aquaculture**, v.7, p.133-150, 1988.
- Salisbury, Y.G.W.; Vandermark, N.L. **Fisiología de la reproducción e inseminación artificial de los bóvidos**. Trad. D. José Maria Santiago Luque. Zaragoza, ACRIBIA, 707p. 1964.
- Squires, E.L.; Pickett, B.W.; Graham, J.K. et al. Principles of cryopreservation. In: **Cooled and frozen Stallion Semen**, cap.9, 1999.
- Streit Jr., D.P.; Benites, C.; Moraes, G.V. et al. Sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) criopreservado com diluentes utilizados para sêmen de suínos. **Ciência Animal Brasileira**, v.7, n.3, p.289-297, 2006.
- Streit Jr., D.P.; Digmayer, M.; Ribeiro, R.P. et al. Embriões de pacu submetidos a diferentes protocolos de resfriamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.8, p.1199-1202, 2007.
- Streit Jr., D.P.; Moraes, G.V.; Ribeiro, R.P. et al. Comparação do sêmen de curimbá (*Prochilodus lineatus*) induzido por extrato de hipófise de frango, coelho ou carpa, **Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science**, v.41, p.147-153, 2004.
- Suquet, M.; Dreanno, C.; Dorange, G. et al. The ageing phenomenon of turbot spermatozoa: effects on morphology, motility and concentration, intracellular ATP content, fertilization, and storage capacities. **Journal of Fish Biology**, v.52, p.31-41, 1998.
- Takeuchi, T.; Dedi, J.; Haga, Y. et al. Effect of vitamin A compounds on bonedeformity in larval Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Aquaculture**, v.169, p.155-165, 1998.
- Tan-Fermin, J.D.; Miura, T.; Adachi, S. et al. Seminal plasma composition, sperm motility, milt dilution in the Asian catfish *Clarias macrocephalus* (Günther). **Aquaculture**, v.171, n. 3-4, p.323-338, 1999.
- Teodoro, A.J.; Ferraz de Lima, J.A. Observações práticas sobre a reprodução induzida de pacu, *Colossoma macropomum* (liberação espontânea de óvulos). In: Simpósio Brasileiro de Aquicultura, 4, 1986, Cuiabá. **Resumos...** p.99-112.

- Urbinati, E.C.; Gonçalves, F.D. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) In: Baldisseroto, B.; Gomes, L. de C. (Org.). **Espécies nativas para a piscicultura no Brasil**. Santa Maria: Editora UFSM, 2005. p.225-255.
- Vaz, M.M.; Torquato, V.C.; Barbosa, N.D. de C. **Guia ilustrado de peixes da bacia do rio Grande**. Belo Horizonte: CEMIG/CETEC, 2000. 144p.
- Von Westernhagen, H.; Dethlefsen, V. The use of malformations in pelagic fish embryos for pollution assessment. **Hydrobiologia**, v. 352, p. 241–250, 1997.
- Wojnarovich, E.; Horváth, L. **A propagação artificial de peixes de águas tropicais: manual de extensão**. Brasília: Escopo. 1983. 220p.
- Yao, Z.; Crim, L.W.; Richardson, G.F. et al. Motility, fertility and ultrastructural changes of ocean pout (*Macrozoarces americanus* L.) sperm after cryopreservation. **Aquaculture**, v. 181, p. 361-375, 2000.
- 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.

## **OBJETIVOS GERAIS**

Este estudo foi realizado com o objetivo de obter índices através dos parâmetros de qualidade do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), taxas de fertilização e eclosão e o percentual de larvas sadias, que permitam certificar animais com as melhores características reprodutivas. Além disso, estabelecer referência que permitam selecionar a qualidade do sêmen a ser utilizado, seja “in natura” ou congelado.

## CAPÍTULO II

Correlações dos Parâmetros Quali-quantitativos do Sêmen de Pacu  
(*Piaractus mesopotamicus*) com a Taxa de Fertilização, Eclosão e  
Morfologia das Larvas

**Correlações dos Parâmetros Quali-quantitativos do Sêmen de Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) com a Taxa de Fertilização, Eclosão e Morfologia das Larvas**

RESUMO: No estudo foram utilizados 42 machos e 16 fêmeas de *P. mesopotamicus*. Através da extrusão foram coletados o sêmen e os óvulos, e avaliados os parâmetros quali-quantitativos seminais. Conforme o valor da porcentagem da taxa de fertilização de cada cruzamento (machoXfêmea), as fêmeas foram classificadas como: “fêmeas boas” - com taxa de fertilização  $\geq 70\%$  e “fêmeas ruins” - com taxas de fertilização  $< 70\%$ . Os parâmetros quali-quantitativos do sêmen não apresentaram diferença estatística ( $P>0,05$ ) em relação aos grupos de fêmeas. Somente a porcentagem de cauda dobrada foi maior ( $P<0,05$ ) no sêmen que fertilizou os óvulos o grupo das “fêmeas boas”, e cauda quebrada foi maior ( $P<0,05$ ) no sêmen que fertilizou o grupo das “fêmeas ruins”. A taxa de fertilização, eclosão e porcentagem de larvas normais foram maiores ( $P<0,01$ ) no grupo das “fêmeas boas”. As principais correlações encontradas no grupo das “fêmeas boas” foram: motilidade progressiva com anormalidades primárias ( $r=-0,23$ ;  $P=0,07$ ). Concentração espermática com taxa de eclosão ( $r=0,25$ ;  $P=0,05$ ) e com ovos gorados ( $r=-0,34$ ;  $P=0,007$ ). As correlações encontradas no grupo das “fêmeas ruins” foram: duração da motilidade com cauda enrolada ( $r=-0,35$ ;  $P=0,04$ ) e concentração espermática ( $r=-0,67$ ;  $P<0,0001$ ); ovos gorados e concentração espermática ( $r=0,33$ ;  $P=0,05$ ). Se a qualidade dos óvulos não for boa, para ocorrer uma melhor taxa de fertilização, conclui-se que a qualidade do sêmen precisa apresentar bons indicadores dos parâmetros.

Palavras-chave: espermatozoides, óvulos, peixe, qualidade espermática

ABSTRACT: In the study a total of 42 males and 16 females of *P. mesopotamicus* were used. Through the extrusion the semen and the egg were collected, and appraised the seminal quali-quantitative parameters. According to the percentage value of the fertilization rates of each crossing (maleXfemales), the females were classified as: "good females" - with fertilization rates  $\geq 70\%$  and "bad females" - with fertilization rates  $< 70\%$ . The quali-quantitative parameters of the semen didn't present statistical difference ( $P>0.05$ ) in relation to the groups. Only the percentage of bent tail was larger ( $P <0.05$ ) in the group of the "good females", and broken tail was larger ( $P <0.05$ ) in the group of the "bad females". The fertilization rate, hatching and percentage of normal larvae were larger ( $P <0.01$ ) in the group of the "good females". The main correlations

found in the group of the "good females" were: progressive motility with primary abnormalities ( $r = -0.23$ ;  $P=0.07$ ). Spermatic concentration with the hatching rate ( $r = 0.25$ ;  $P=0.05$ ) and with wasted eggs ( $r = -0.34$ ;  $P=0.007$ ). The correlations found in the group of the "bad females" were: motility duration with coiled tail ( $r = -0.35$ ;  $P<0,0001$ ); wasted eggs and spermatic concentration ( $r = 0.33$ ;  $P=0.05$ ). If the quality of the egg is not good, to cause a better fertilization rate, it is ended that the quality of the semen needs to present good indicators of the parameters.

Key Words: spermatozoa, egg, fish, quality spermatic

### **Introdução**

A propagação artificial de peixes é uma prática recorrente. Com isso, a piscicultura como atividade economicamente rentável, teve um incremento considerável e por consequência, cada vez mais busca-se a produção de alevinos de boa qualidade e de diferentes espécies (Pillay, 1997).

O cultivo industrial de peixes tem sido mais focalizado na produção com qualidade dos embriões e larvas, embora Rurangwa et al. (2004) tem afirmado que a qualidade do sêmen afete a produção de larvas sadias. De acordo com Bromage (1995) a condição seminal é um fator limitante e importante no desenvolvimento aquícola, podendo afetar o sucesso da fertilização e produção de ovos viáveis. Para o manejo da criação de peixes, torna-se imperativo que os criadores aprimorem-se nas técnicas necessárias de forma a assegurar o êxito básico e inicial da criação, como a produção de alevinos para povoamento, repovoamento e criação zootécnica (Bock & Padovani, 2000).

Os estudos realizados com sêmen em peixes têm demonstrado variações individuais nos parâmetros, tais como: motilidade e concentração espermática, capacidade para fertilizar e de ser armazenado. Além disso, os índices do sêmen podem variar entre machos ou mesmo no indivíduo (Rana, 1995). O sucesso da fertilização é frequentemente usado como um critério para classificar qualidade do processo reprodutivo. Mas de acordo com Kamler (2005) o que realmente determina o sucesso reprodutivo são fatores, como o número e a velocidade dos espermatozoides, além da qualidade do óvulo.

As evidências dos dados sugerem que a motilidade espermática é o determinante primário no sucesso da fertilização em espécies de peixes de fertilização externa

(Wojtczak et al., 2007). Rizzo et al. (2003) observaram em *Prochilodus marggravii*, uma correlação negativa ( $r = -0,82$ ) entre taxa de fertilização e a porcentagem de larvas deformadas, ocorrendo durante o armazenamento “in situ” (26°C). Springate et al. (1984) observaram uma alta correlação entre a taxa de fertilidade e a porcentagem de larvas deformadas, o que de acordo com estes autores, pode ser suficiente para indicar o desempenho subsequente dos embriões e larvas, através da taxa de fertilização.

O pacu (*P. mesopotamicus*) é um peixe de grande porte que vem sendo utilizado nas pisciculturas e nos repovoamentos de reservatórios (Maria et al., 2004). A criação dessa espécie tem sido incentivada em razão do seu bom valor comercial e da grande aceitação no mercado nacional, juntamente com a questão ambiental, visando à redução de impactos gerados pelo represamento dos rios (Maria et al., 2004). Embora o pacu seja uma espécie que se adapte com grande facilidade, não se reproduz em cativeiro, a menos que seja submetida à indução hormonal (Romagosa et al., 1988).

Conforme os parâmetros de qualidade do sêmen, taxas de fertilização e eclosão e o percentual de larvas saudáveis, o objetivo do estudo foi identificar índices que permitam certificar os animais com melhores características reprodutivas, e verificar possíveis correlações que apontem para qualidade destes reprodutores.

## **Material e Métodos**

### ***Local***

O trabalho foi desenvolvido na Estação de Hidrologia e Aquicultura da Duke Energy International - *Geração Paranapanema*, em Salto Grande (SP), pelos grupos de pesquisa PeixeGen da Universidade Estadual de Maringá (UEM) e *Aquam* da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

### ***Seleção dos exemplares e Indução Hormonal***

Foram utilizados 42 machos e 16 fêmeas de pacu (*P. mesopotamicus*), com idade de quatro anos a partir do plantel de reprodutores da Duke Energy. Os animais selecionados apresentavam características reprodutivas secundárias para peixes migradores; liberação de sêmen após uma leve compressão no abdômen e nas fêmeas abdômen abaulado e macio além do orifício urogenital avermelhado. Após a captura, os

animais foram estocados em aquários dentro do laboratório, pesados e marcados com “transponders” para a identificação dos mesmos.

Para induzir a liberação dos gametas, utilizou-se extrato de hipófise de carpa, como recomendado por Wonayrovich & Horváth (1983) para espécies neotropicais: 5,5 mg/Kg do peso vivo das fêmeas, dividido em duas frações, 10% na primeira aplicação e o restante 12 horas após a primeira; 2,5 mg/Kg do peso vivo dos machos em dose única, coincidindo com a segunda dose das fêmeas. A temperatura média da água foi de  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  após a indução hormonal, ocorrendo à liberação dos gametas em 10 horas.

### ***Colheita e Análise de Sêmen***

Após os animais serem envoltos em uma toalha úmida para reduzir o estresse, secou-se a região urogenital com papel toalha, aplicou-se uma massagem ântero-posterior e o sêmen liberado foi colhido em seringas de 5 mL (Billard et al., 1995). Anotou-se o volume de sêmen de cada animal e avaliou-se os parâmetros seminais: motilidade progressiva, vigor espermático, duração da motilidade, concentração de espermatozoides e morfologia espermática. As metodologias de análise do sêmen são descritas a seguir, segundo Sorensen Jr. (1979) adaptadas para o sêmen de peixe neotropical migradores.

*Motilidade progressiva e vigor espermático:* Em uma lâmina de microscopia ótica foi diluída 2  $\mu\text{L}$  de sêmen em 200  $\mu\text{L}$  de água destilada, coberto por uma lamínula e levado ao microscópio óptico com objetiva de 40X, avaliando-se por método subjetivo, ambas as variáveis. Para motilidade progressiva foi utilizado um escore de 0% a 100% e para o vigor espermático de 0 a 5 pontos, sendo os mais elevados, os melhores.

*Duração da Motilidade:* ao colocar 2  $\mu\text{L}$  de sêmen em 200  $\mu\text{L}$  de água destilada, um cronômetro foi acionado. Marcou-se o tempo decorrido até que o último espermatozoide parou de mover no campo ótico, observado na lâmina.

*Concentração de espermatozoides:* Diluiu-se na razão de 1:1000, sêmen:formol-salina tamponada em um becker, utilizando uma pipeta de precisão. Após a diluição e homogeneização da solução, preencheu-se por capilaridade a câmara de Neubauer contando-se em seguida os espermatozoides.

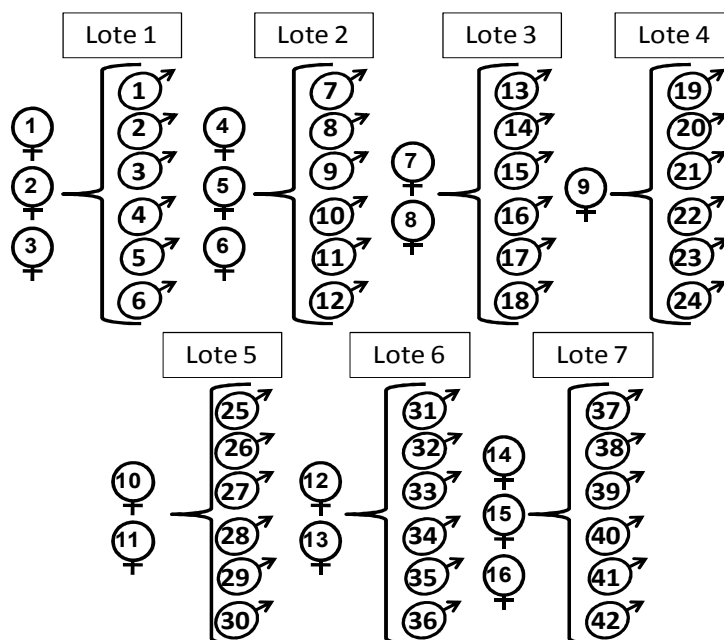
*Morfologia espermática:* Para esta análise foi produzido um esfregaço com o sêmen diluído em formol-salina tamponada, na razão de 1:1000 (sêmen/solução diluente, respectivamente). Os esfregaços foram corados pelo método de Rosa Bengala



recomendado para peixes por Streit Jr. et al. (2004), e depois de secar, levados ao microscópio óptico com objetiva de 40X, contando-se de 150 a 160 espermatozoides por esfregaço de cada animal. Anormalidades consideradas primárias: cauda quebrada, enrolada e degenerada, e anormalidades secundárias: cauda dobrada, cabeça solta e cauda solta.

### ***Manejo reprodutivo: Taxa de fertilização e eclosão***

Os animais foram divididos em sete lotes, onde nos lotes um, dois e sete continham seis machos e três fêmeas. Já nos lotes três, cinco e seis eram seis machos e duas fêmeas e no lote quatro, seis machos e uma fêmea. O esquema ilustrativo do experimento está representado na figura 1.



**Figura 1** - Esquema do manejo reprodutivo de *P. mesopotamicus*, durante a fertilização dos gametas.

Através do método reprodutivo por extrusão foi coletado o sêmen de cada animal e avaliou-se os parâmetros quali-quantitativos. Logo após, os óvulos foram coletados e preparados para a fertilização. Nem todos os cruzamentos foram fertilizados com o mesmo volume de óvulos/espermatozoides, devido aos diferentes volumes dos óvulos totais obtidos por cada fêmea (Tabela 1).

**Tabela 1** - Relação dos animais utilizados no manejo reprodutivo e volume de gametas no processo de fertilização de *P. mesopotamicus*

Machos	N <sup>o</sup> de Fêmeas	Óvulos (mL/macho)	Sêmen (mL/fêmea)	Razão SPZ/Óvulo
--------	--------------------------	----------------------	---------------------	-----------------

1 a 6	3	25	0,5	143.580
7 a 12	3	40	1,0 e 0,5	136.728
13 a 18	2	20 e 30	0,5	296.219
19 a 24	1	20	0,25	206.327
25 a 30	2	30 e 10	0,5	509.053
31 a 36	2	10	0,25	358.179
37 a 42	3	10	0,5	781.173

SPZ – espermatozoides;

Cada alíquota de óvulo foi fertilizada com o sêmen de apenas um animal. Em seguida, as alíquotas, agora com ovos, foram depositadas em incubadoras de sete litros independentes. Decorridas seis horas de incubação, a temperatura da água de  $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ , foi contabilizada a taxa de fertilização.

*Taxa de Fertilização:* Uma média foi obtida a partir da contagem de três alíquotas de cada uma das incubadoras do número de embriões viáveis e ovos gorados.

Após a obtenção da taxa de fertilização, homogeneizou-se a coluna-d'água das incubadoras de 7L e, com o auxílio de uma placa de Petri e pipeta de Pasteur selecionou-se 100 embriões viáveis destas amostras. Em seguida, transferiu-se para incubadoras de 1,5L, independente para cada combinação. Decorridos 18 horas após a fertilização com temperatura média da água de  $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ , realizou-se a mensuração da taxa de eclosão das incubadoras de 7L.

*Taxa de Eclosão:* Uma média do número de larvas eclodidas e ovos gorados foi obtida a partir da contabilização de três alíquotas de cada incubadora de 7L.

Para a obtenção da taxa de eclosão e normalidade do desenvolvimento embrionário e larval das incubadoras de 1,5L, todas as larvas e ovos gorados foram retirados para avaliação, contabilizados para determinar o percentual e classificados em:

- Larvas normais - aquelas que apresentaram movimentação regular;
- Larvas defeituosas - aquelas que não apresentaram movimentação vigorosa ao se deslocar ou apresentando deformidade na notocorda;
- Larvas mortas - embriões que se desenvolveram, eclodiram larvas, mas que estavam mortas no momento da contagem.
- Ovos gorados - foram aqueles em que os embriões não evoluíram as larvas;

→ Não eclodida viva – larvas que não saíram inteiramente do ovo, mas que estavam vivas durante a contagem.

→ Não eclodida morta – larvas que não saíram inteiramente do ovo, mas que estavam mortas durante a contagem.

### ***Análise Estatística***

Os dados foram submetidos à análise de correlação de spearman e análise de variância utilizando-se os procedimentos (corr) e (proc nopar1way) do pacote estatístico SAS, respectivamente, (SAS Institute, Cary, NC- USA).

## **Resultados e Discussão**

### ***Manejo Reprodutivo***

Conforme o valor da porcentagem da taxa de fertilização de cada cruzamento (machoXfêmea), as fêmeas foram classificadas como: “fêmeas boas” - com taxa de fertilização  $\geq 70\%$  e “fêmeas ruins” - com taxas de fertilização  $< 70\%$ . O grupo das “fêmeas boas” e “fêmeas ruins” foram compostos por 10 e seis fêmeas, respectivamente. A relação média entre espermatozoides/óvulo de todos os grupos foi de 347.323. No grupo das “fêmeas boas” e “fêmeas ruins” a relação foi de 374.424 e 328.904 espermatozoides/óvulo, respectivamente. Esta relação está de acordo com a observação de Sanches et al. (2007) que atribuíram relação LRP (Linear Response Plateau) entre as taxas de fertilização (%) e as relações de número de espermatozoides/óvulo de 4.539.080, onde ocorre um comportamento “plateau”. A partir desta relação, as taxas de fertilização apresentaram efeito inversamente proporcional às doses inseminantes. Segundo os mesmos autores, a relação de número de espermatozoides/óvulo entre 7.000 e 4.539.080 não causam efeito nas taxas de fertilização. Desse modo, a relação média para cada grupo permaneceu dentro das recomendações destes autores.

### ***Parâmetros quali-quantitativos do sêmen***

#### ***Concentração e volume espermático***

A concentração espermática média observada foi de  $16,63 \times 10^9$  espermatozoides/mL, com uma variação entre os animais, de 4,30 a  $33,75 \times 10^9$  espermatozoides/mL. No grupo de animais que fertilizou os óvulos das “fêmeas boas” a

média para a concentração espermática foi de  $16,52 \pm 7,09 \times 10^9$ , e para “fêmeas ruins” foi  $16,83 \pm 6,52 \times 10^9$  (Tabela 2) não havendo diferença ( $P > 0,05$ ) entre os dois grupos. Os valores encontrados no presente trabalho estão dentro do observado em outros estudos. Em média, Silveira et al. (1990) obtiveram uma concentração de  $28,07 \pm 8,2 \times 10^9$  espermatozoides/mL. Por outro lado, Miliorini et al. (2002) relataram  $18,62 \pm 3,31 \times 10^9$  espermatozoides/mL, em média. A justificativa para Maria et al. (2004) encontrar  $13,89 \pm 1,26 \times 10^9$  espermatozoides/mL, reside na possibilidade de estar relacionada com a época do ciclo reprodutivo na qual a coleta do sêmen foi realizada.

O volume espermático produzido em média pelos reprodutores de pacu foi de 7,35 mL. Conforme Sanches et al. (2007) e Streit Jr. et al. (2002) estudando o *P. mesopotamicus*, observaram produção seminal de 13,64 e 12,00 mL, respectivamente. No entanto tais diferenças são comumente verificadas, visto que o tamanho do indivíduo, época e metodologia de coleta influenciam diretamente nesta produção (Luz et al., 2001). Além disso, o volume de sêmen não pode ser considerado como o volume total do sêmen liberado pelo macho, uma vez que o método de colheita a partir da extrusão não garante a liberação total do sêmen presente nas gônadas (Ferreira et al., 2001).

#### *Motilidade progressiva, vigor espermático e duração da motilidade*

Nos resultados do sêmen avaliado que fertilizou os óvulos do grupo das “fêmeas boas”, a motilidade progressiva, duração da motilidade e vigor espermático, não apresentaram diferença estatística ( $P > 0,05$ ) em relação ao grupo das “fêmeas ruins” (Tabela 2).

**Tabela 2** - Média e desvio padrão dos parâmetros quali-quantitativos do sêmen de *Piaractus mesopotamicus* nos grupos das “fêmeas boas” e “fêmeas ruins”

Parâmetros	“Fêmeas Boas”		“Fêmeas Ruins”	
	Média	DP	Média	DP
Motilidade progressiva (%)	89,08	6,92	87,22	7,79
Duração da motilidade (seg)	44,98	8,18	44,64	9,99
Vigor espermático (pontos)	4,83	0,38	4,69	0,47
Concentração espermática*	$16,52 \times 10^9$	$7,09 \times 10^9$	$16,83 \times 10^9$	$6,52 \times 10^9$

DP – desvio padrão; seg – segundos; \* - (spz/mL);

Os valores dos parâmetros seminais utilizados para fertilizar os óvulos das “fêmeas boas e ruins” estiveram dentro do esperado para a espécie. Valores de 99,16% de motilidade progressiva e 62,5 segundos de duração foram verificados por Miliorini et

al. (2002) para *P. mesopotamicus*. Já Streit et al. (2006) encontraram valor para motilidade progressiva de 75,00% e vigor espermático de 3,40 pontos. Maria et al. (2004) observou valores médios da taxa de motilidade espermática e sua duração para o sêmen “in natura” de 95,00 e 486,83 segundos, respectivamente. No presente estudo, a motilidade progressiva, vigor espermático e duração da motilidade apresentaram bons valores nos dois grupos avaliados.

#### *Morfologia espermática*

O percentual de espermatozoides normais, anormalidades totais, anormalidades primárias e anormalidades secundárias não apresentaram diferenças ( $P>0,05$ ) entre os grupos (Tabela 3).

**Tabela 3** - Média e desvio padrão dos espermatozoides normais e anormalidades espermáticas do sêmen de *Piaractus mesopotamicus* nos grupos das “fêmeas boas” e “fêmeas ruins”

Parâmetros	“Fêmea Boa”		“Fêmea Ruim”	
	Média	DP	Média	DP
Espermatozoides normais (%)	47,70	6,70	49,46	7,65
Anormalidades totais (%)	52,30	6,70	50,54	7,65
Anormalidades primárias (%)	26,38	6,42	26,64	6,06
Anormalidades secundárias (%)	25,92	4,91	23,90	5,09

DP – desvio padrão;

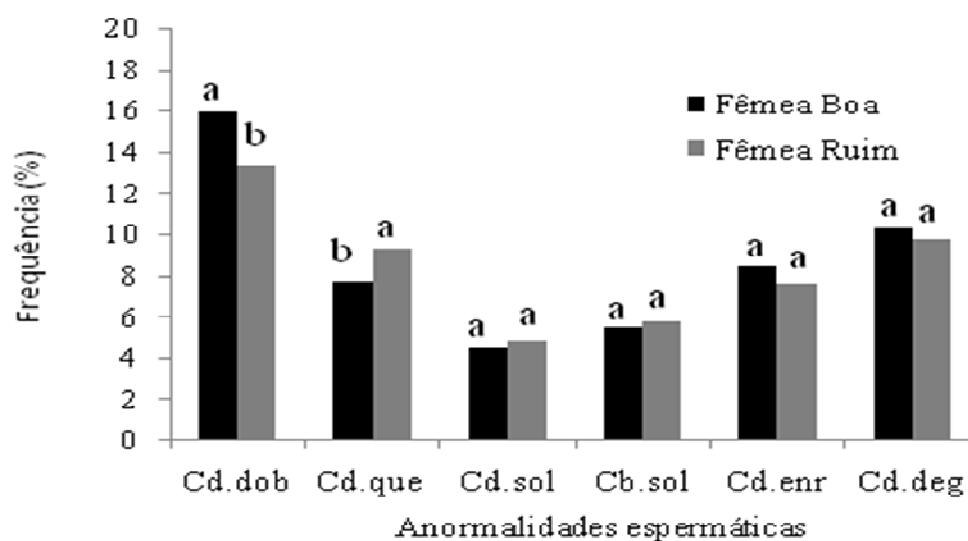
A percentagem média de anormalidades totais observada no sêmen “in natura” nos grupos foi de 52,30% “fêmeas boas” e 50,54% “fêmeas ruins”, sendo inferior às observadas por Streit et al. (2006), que encontraram 79,61% de anormalidades totais. Segundo Miliorini (2006) a análise morfológica dos espermatozoides de peixes reflete as variações ambientais e genéticas.

Quando observou-se as anormalidades separadamente, verificou-se maior incidência ( $P<0,05$ ) de cauda dobrada, anormalidade secundária, no grupo das “fêmeas boas” (15,96%) em relação ao grupo das “fêmeas ruins” (13,30%) (Figura 2). Em mamíferos, essa anormalidade está relacionada a fatores como; temperatura ambiente, alimentação do animal, problemas no ducto espermático, extrusão do sêmen, além da produção dos esfregaços (Herman et al., 1994). Já, a anormalidade de cauda quebrada (anormalidade primária) incidiu com mais frequência ( $P<0,05$ ) no sêmen utilizado para fertilizar os óvulos que deram origem às larvas das “fêmeas ruins”, de 9,26% contra 7,71% para as “fêmeas boas” (Fig. 2). Conforme Bart & Oko (1989), em mamíferos, as

anormalidades primárias originam-se dentre outros fatores, da idade avançada, de doenças infecciosas ou genéticas, da consanguinidade e do estresse dos reprodutores.

A questão maior reside no fato da incidência das alterações morfológicas verificadas no sêmen do *P. mesopotamicus* provocarem prejuízos na qualidade seminal, no que tange principalmente à motilidade progressiva e por consequência a taxa de fertilização e eclosão. No presente estudo, as anormalidades espermáticas parecem não ter influenciado a motilidade espermática, uma vez que, os grupos não diferiram entre si para este parâmetro seminal. Pois, os óvulos do grupo das fêmeas consideradas “boas”, foram fertilizados com espermatozoides que apresentaram maior porcentagem de cauda dobrada ( $P < 0,05$ ). Supondo que a referida anormalidade levaria uma diminuição da motilidade espermática, do mesmo modo como nos espermatozoides utilizados no grupo das “fêmeas ruins” que apresentou um maior índice de cauda quebrada, e também não mostrou influência na motilidade espermática. Dentre as interpretações possíveis dos resultados do presente estudo, o percentual da motilidade progressiva não parece ter sido influenciado por nenhuma anormalidade específica, como por exemplo, cauda quebrada e dobrada. Por outro lado, a taxa de fertilização sofreu influência nas “fêmeas ruins”, indo de encontro com o bom percentual de motilidade e vigor espermático para estas fêmeas.

As anormalidades de cauda enrolada, degenerada, solta e cabeça solta, não diferiram ( $P > 0,05$ ) entre os grupos (Figura 2).



**Figura 2** - Percentuais médios de anormalidades encontradas no sêmen de *P. mesopotamicus* utilizado para fertilizar os óvulos nos grupos de fêmeas consideradas “fêmeas boas” e “fêmeas ruins”. Anormalidades verificadas: cauda dobrada (Cd.dob); cauda quebrada (Cd.que); cauda solta (Cd.sol);

cabeça solta (Cb.sol); cauda enrolada (Cd.enr); cauda degenerada (Cd.deg).

### ***Taxa de fertilização, eclosão e morfologia das larvas***

As taxas de fertilização, eclosão e porcentagem de larvas normais foram maiores ( $P < 0,01$ ) no grupo das “fêmeas boas” em relação ao grupo das “fêmeas ruins”. Já as porcentagens de ovos gorados, larvas não eclodidas vivas e mortas foram maiores ( $P < 0,05$ ) no grupo das “fêmeas ruins”. Larvas defeituosas e larvas mortas não diferiram ( $P > 0,05$ ) entre os dois grupos (Tabela 4).

**Tabela 4** - Média e desvio padrão das taxas de fertilização e eclosão, e morfologia das larvas após a eclosão de *Piaractus mesopotamicus*, com origem nos grupos das “fêmeas boas” e “fêmeas ruins”

Parâmetros	“Fêmeas Boas”		“Fêmeas Ruins”	
	Média	DP	Média	DP
Taxa de fertilização (%)	90,33a	11,12	45,01b	22,22
Taxa de eclosão (%)	85,37a	14,89	36,42b	22,83
Ovos gorados (%)	2,40b	4,15	13,46a	14,56
Larvas normais (%)	50,43a	26,90	32,51b	25,63
Larvas defeituosas (%)	21,62a	14,03	24,38a	17,60
Larvas mortas (%)	20,41a	21,46	16,70a	17,79
Não eclodida viva (%)	4,58b	7,80	10,16a	13,32
Não eclodida morta (%)	0,81b	2,26	3,10a	6,47

Médias na mesma linha com a mesma letra não diferem significativamente entre si;

Neste estudo, em que no grupo das “fêmeas boas” registrou uma taxa de fertilização de 90,33% e eclosão de 85,37%, contrastou com as “fêmeas ruins”, que produziram uma taxa de fertilização de 45,01% e eclosão de 36,42%. Quando se partiu para as anormalidades seminais que acometeram os espermatozoides utilizados para fertilizar os óvulos das “fêmeas ruins”, encontrou-se um percentual significativamente maior ( $P < 0,05$ ) de espermatozoides com cauda quebrada em relação ao sêmen utilizado para “fêmeas boas. Cabe ressaltar, que no presente estudo as anormalidades, no caso os espermatozoides com cauda quebrada, não provocaram alterações na motilidade e no vigor espermático, mas de alguma maneira interferiu nas taxas de fertilização e eclosão nas “fêmeas ruins”. Já as anormalidades espermáticas de cauda dobrada, que foram encontradas em maior número no sêmen utilizado para fertilizar os óvulos das “fêmeas boas”, possivelmente tiveram pouca ou nenhuma influência na fertilização dos óvulos.

Alguns estudos sugerem a influência das alterações morfológicas como fator preponderante para a motilidade progressiva e por consequência a taxa de fertilização e

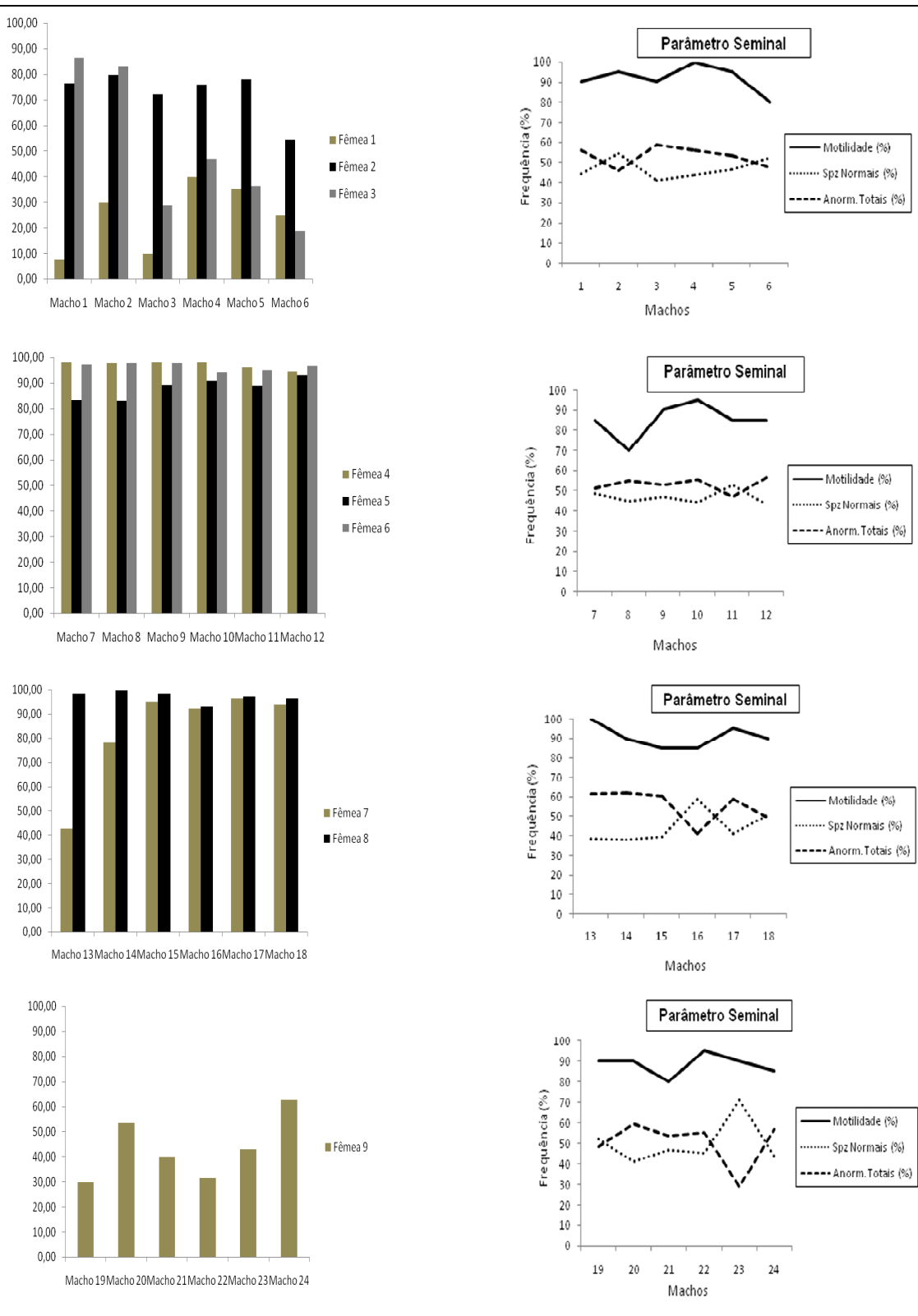
eclosão. Com curimatá (*Prochilodus lineatus*), Kavamoto et al. (1999) relacionaram as alterações morfológicas causadoras do surgimento de movimentos circulares e oscilatórios dos espermatozoides, e conseqüentemente a redução da taxa de fertilização. Este perfil, também é sugerido por Cosson et al. (1999) como o principal prejuízo causado pelas anormalidades dos espermatozoides de peixes. O que pode ser também ocasionado pela menor capacidade ou viabilidade deste sêmen fertilizar um óvulo, quando comparado com um espermatozoide normal.

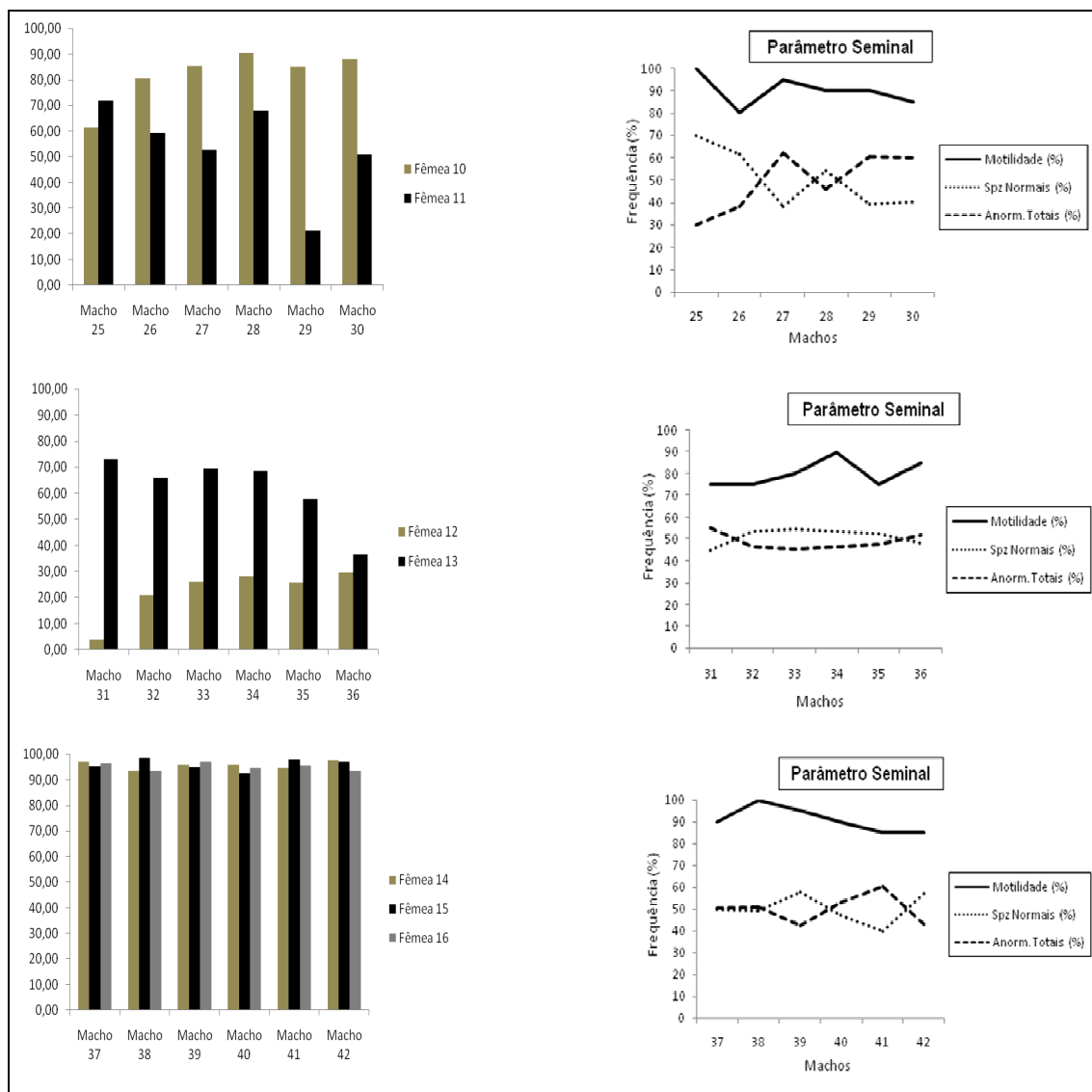
O percentual de espermatozoides normais encontrado neste estudo, não diferiu quando da sua utilização nas “fêmeas boas” (47,70%) e “fêmeas ruins” (49,46%). Quanto ao percentual de larvas normais houve diferença a partir da origem destas, “fêmeas boas” (50,43%) e “fêmeas ruins” (32,51%), estabelecer uma relação direta com a influência dos machos não ficou clara. Kamler (2005) relatou que efeitos maternos e paternos contribuem para a sobrevivência total da descendência, mas eles operam de modos diferentes e em tempos diferentes. Para o sêmen, a densidade e a motilidade do espermatozoide são decisivas, embora os efeitos paternos diminuam na ontogenia. De todo o modo, fatores principais que governam a sobrevivência embrionária (sucesso da fertilização e eclosão) diferem de fatores para qual a mortalidade das larvas vitelinas estão relacionados. A sobrevivência embrionária é afetada pela idade da fêmea, composição do óvulo, maturação do óvulo e fatores paternos como: densidade dos espermatozoides e motilidade. Em contraste, a mortalidade das larvas vitelinas depende em grande parte de atributos femininos (idade, tamanho e fecundidade) e pelo tamanho de ovo (Kamler, 2005).

#### ***Taxa de fertilização individual de cada cruzamento (machoXfêmea)***

Na Figura 3, são apresentadas as taxas de fertilização dos setes grupos. Entre os cruzamentos, verificou-se que um macho apresentando excelente qualidade seminal fertilizando uma fêmea considerada boa (taxa de fertilização alta com a maioria dos outros machos) a resposta foi sempre >70%. Conforme citado na figura três, o macho 38 (taxa de motilidade de 100%, vigor espermático de 5 pontos e anormalidade totais de 51,00%) fertilizou a fêmea 15 (considerada boa), apresentando uma taxa de fertilização de 98,57%. Se um macho bom fertilizar os óvulos de uma fêmea considerada ruim (taxa de fertilização baixa com a maioria dos machos), a taxa de fertilização será mediana para ruim (Ex: macho4Xfêmea1 – motilidade 100%, vigor 5 pontos e anormalidades totais de 56,30%, com taxa de fertilização de 39,79%).







**Figura 3** - Taxa de fertilização dos cruzamentos individualizado e percentuais de motilidade, espermatozoides normais e anormalidades totais dos *Piaractus mesopotamicus* utilizados no estudo.

Se a qualidade seminal for abaixo da média e houver cruzamento com uma fêmea “considerada boa”, a taxa de fertilização será alta. Foi o caso do macho 8 (70% motilidade, vigor espermático de 5 pontos e anormalidades totais de 55,10%) que fertilizou a fêmea 4 (considerada boa) e obteve uma taxa de fertilização de 97,77%. Já o macho 31, também com motilidade abaixo da média (75% motilidade, vigor de 4 pontos e anormalidades totais de 55,10%) com a fêmea 12 “considerada ruim” resultou em uma taxa de fertilização de 3,79%.

Segundo Rosengrave et al. (2009) estudando a composição do fluido seminal e ovariano de *Oncorhynchus tshawytscha*, e seu efeito nas características da motilidade

espermática, não observaram correlação significativa entre a composição do fluido seminal e características da motilidade. Porém, em fluido ovariano, a longevidade dos espermatozoides foi correlacionada negativamente com variação em  $[Ca^{2+}]$  e  $[Mg^{2+}]$ , enquanto a porcentagem da motilidade aumentou com a elevação da  $[Mg^{2+}]$ . Estas proveem uma possível base química para escolha do “companheiro secreto” para a fêmea, por meio da diferenciação do fluido ovariano, e sua influência no comportamento dos espermatozoides de diferentes machos, e assim o sucesso da fertilização (Rosengrave et al., 2009).

No presente estudo com o *P. mesopotamicus*, a “escolha secreta” citada por Rosengrave et al. (2009) não ocorreu, em função da reprodução artificial, ter sido de certa forma direcionada (extrusada), muito embora ao acaso. Dessa maneira pode ser justificada, por exemplo, a resposta negativa no cruzamento de alguns animais; fêmea 7 (taxa de fertilização acima de 75% para os outros cinco cruzamentos) e com o macho 13 (motilidade espermática 100%), não passou de 42,70%. Além disso, o sêmen do macho 4 utilizado nos óvulos das fêmeas 2 e 3, produziu uma taxa de fertilização menor (75,70% e 46,92%, respectivamente) em relação ao sêmen dos machos 1 (76,34% e 86,29%, respectivamente) e 2 (79,55% e 82,97%, respectivamente). Se analisar com relação à motilidade espermática e o percentual de anormalidades totais do macho 4 estes foram superiores, em relação ao macho 1 e 2. Este fato levou a hipótese de que, mesmo com boa motilidade, os espermatozoides com anormalidades foram incapazes de fertilizar. Foi o que ocorreu com o cruzamento “macho13xfêmea7” (motilidade de 100%, anormalidades totais de 61,60% e taxa de fertilização de 42,70%) e o cruzamento “macho18xfêmea7” (motilidade de 90%, anormalidades totais de 49,40% e taxa de fertilização de 93,86%) (Fig. 3).

### ***Correlações dos parâmetros quali-quantitativos do sêmen, taxa de fertilização e eclosão e morfologia das larvas***

#### ***Correlações no grupo das “fêmeas boas”***

As correlações encontradas entre os próprios parâmetros quali-quantitativos do sêmen utilizado para fertilizar os óvulos do grupo das “fêmeas boas” estão apresentadas na tabela 5 e 6.

**Tabela 5** - Correlações entre motilidade progressiva com vigor espermático, anormalidades primárias e cauda enrolada baseados no coeficiente de Spearman utilizado no grupo das “fêmeas boas”

Parâmetros Seminais	Motilidade progressiva	
	Correlações	Probabilidade
Vigor espermático	0,23	(P=0,07)
Anormalidades primárias	-0,23	(P=0,07)
Cauda enrolada	-0,28	(P=0,02)

P= probabilidade

A motilidade progressiva está diretamente relacionada com o vigor espermático. São os parâmetros que determinam a porcentagem de espermatozoides móveis (vivos) e sua intensidade de deslocamento (Tab. 5). Uma correlação negativa, entre a motilidade progressiva (Tab. 5) e o vigor espermático com alterações celulares (Tab. 6), como as anormalidades primárias (cauda enrolada e quebrada) encontradas no sêmen de *P. mesopotamicus*, pode ter provocado uma perda de qualidade destes parâmetros. As anormalidades de cauda, frequentemente estão relacionadas a perda de movimento normal dos espermatozoides. Alterações ultraestruturais no espermatozoide ocorrem após o aumento ou a diminuição da osmolaridade do meio que os circunda. Estas alterações podem ser fisiológicas ou patológicas (Miliorini, 2006). Espermatozoides de teleósteos marinhos apresentaram rompimento da membrana plasmática, desaparecimento de mitocôndrias, perda da membrana plasmática flagelar e espiralização, ruptura ou aderência dos axonemas quando expostos a uma solução hipotônica. Marques (2001) classificou estas modificações como limitantes da duração da motilidade espermática. Este fato pode ter ocorrido com os espermatozoides neste estudo, levando assim uma diminuição na motilidade e vigor espermático.

**Tabela 6** - Correlações entre vigor espermático com motilidade progressiva e cauda quebrada baseados no coeficiente de Spearman utilizado no grupo das “fêmeas boas”

Parâmetros Seminais	Vigor espermático	
	Correlações	Probabilidade
Motilidade progressiva	0,23	(P=0,07)
Cauda quebrada	-0,43	(P=0,0006)

P= probabilidade

Não foram observadas correlações dos parâmetros como: motilidade progressiva, duração da motilidade, vigor espermático, concentração espermática, espermatozoides normais, anormalidades totais e primária (cauda enrolada, degenerada, quebrada) e anormalidade secundária (cauda solta, cabeça solta e cauda dobrada) do sêmen utilizado

para fertilizar o grupo das “fêmeas boas” com taxa de fertilização, larvas normais, defeituosas, mortas, não eclodida morta e não eclodida viva.

As correlações encontradas entre os parâmetros seminais e parâmetros pós-eclosão estão apresentados nas tabelas 7 e 8.

**Tabela 7** - Correlações entre concentração espermática, taxa de eclosão e ovos gorados baseados no coeficiente de Spearman utilizado no grupo das “fêmeas boas”

Parâmetros	Concentração espermática	
	Correlações	Probabilidade
Taxa de eclosão	0,25	(P=0,05)
Ovos gorados	-0,34	(P=0,007)

P= probabilidade

Espera-se sempre uma razão ótima de espermatozoides/óvulo possuir maior capacidade para fertilização e, conseqüentemente uma maior taxa de eclosão, resultando assim em redução na porcentagem de ovos gorados (Tab. 7).

Observou-se correlação positiva entre anormalidades primárias com ovos gorados (Tabela 8). Um aumento nas anormalidades provocou uma maior porcentagem de ovos gorados, as anormalidades espermáticas causam redução na taxa de fertilização, devido à disfunção dos movimentos nos espermatozoides, impossibilitando o movimento de natação normal e com isso, ocorreu uma maior porcentagem de ovos gorados.

**Tabela 8** - Correlação entre anormalidade primária e ovos gorados baseados no coeficiente de Spearman utilizado no grupo das “fêmeas boas”

Parâmetros	Anormalidades primárias	
	Correlação	Probabilidade
Ovos gorados	0,23	(P=0,07)

P= probabilidade

#### *Correlações no grupo das “fêmeas ruins”*

As correlações encontradas entre os próprios parâmetros quali-quantitativos do sêmen utilizado para fertilizar os óvulos do grupo das “fêmeas ruins” estão apresentadas nas tabelas 9, 10 e 11.

**Tabela 9** - Correlações entre motilidade progressiva com vigor espermático, duração da motilidade e concentração espermática baseados no coeficiente de Spearman utilizado no grupo das “fêmeas ruins”

Parâmetros Seminais	Motilidade progressiva	
	Correlação	Probabilidade
Vigor espermático	0,67	(P<0,0001)

Duração da motilidade	0,61	(P<0,0001)
Concentração espermática	-0,48	(P=0,003)

P= probabilidade

A correlação positiva verificada entre a motilidade progressiva, duração da motilidade e vigor espermático (Tab. 9), possibilita inferir, que para o espermatozoide possuir um maior tempo de vida, necessariamente precisarão nadar com maior intensidade, ou seja, maior vigor e motilidade.

A correlação negativa foi obtida para a motilidade progressiva e concentração espermática (Tab. 9), assim como duração da motilidade e concentração espermática (Tab. 10). Este fato pode estar relacionado com a diluição incorreta dos espermatozoides para o processo de ativação e posterior fertilização. Segundo Billard & Cosson, (1992), a diluição é a chave da imobilidade e motilidade dos espermatozoides, pois o volume do diluente adicionado determina a dinâmica de ativação. Uma diluição relativamente alta é necessária para iniciar a motilidade simultânea de 100% dos espermatozoides. Em baixas diluições somente alguns espermatozoides são ativados e outros vêm a ser ativados progressivamente mais tarde.

A correlação negativa também foi observada para a anormalidade cauda enrolada com a duração da motilidade, sugerindo-se assim, que espermatozoides com cauda defeituosa não conseguem locomover com a mesma intensidade de um espermatozoide normal (Tab. 10).

**Tabela 10** - Correlações entre duração da motilidade com motilidade progressiva, vigor espermático, cauda enrolada e concentração espermática baseados no coeficiente de Spearman utilizado no grupo das “fêmeas ruins”

Parâmetros Seminais	Duração da Motilidade	
	Correlação	Probabilidade
Motilidade progressiva	0,61	(P<0,0001)
Vigor espermático	0,31	(P=0,06)
Cauda enrolada	-0,35	(P=0,04)
Concentração espermática	-0,67	(P<0,0001)

P= probabilidade

A correlação negativa foi verificada para a anormalidade cauda quebrada com o vigor espermático que assim, pode provocar um aumento dessa anormalidade levando uma redução do vigor (Tab. 11).

**Tabela 11** - Correlação entre vigor espermático e cauda quebrada baseados no coeficiente de Spearman utilizado no grupo das “fêmeas ruins”

Parâmetros Seminais	Vigor espermático
---------------------	-------------------

	Correlação	Probabilidade
Cauda quebrada	-0,31	(P=0,07)

P= probabilidade

As correlações encontradas entre os parâmetros seminais e parâmetros pós-eclosão estão apresentados na tabela 12 e 13.

Tabela 12 - Correlações entre motilidade progressiva, duração da motilidade com ovos gorados, larvas normais e não eclodidas mortas, baseados no coeficiente de Spearman utilizado no grupo das “fêmeas ruins”

Parâmetros	Motilidade progressiva		Duração da motilidade	
	Correlação	Probabilidade	Correlação	Probabilidade
Ovos gorados	-0,29	(P=0,08)	-0,50	(P=0,0008)
Larvas normais	0,35	(P=0,03)	0,41	(P=0,01)
Não eclodida morta	-0,34	(P=0,01)	-0,34	(P=0,04)

P= probabilidade

A motilidade progressiva e duração da motilidade apresentaram correlação negativa com ovos gorados, e correlações positivas com larvas normais (Tab. 12). Para as larvas defeituosas a correlação foi negativa com a duração da motilidade ( $r = -0,28$ ;  $P = 0,09$ ). Estes fatos implicam que a diminuição e duração da motilidade incidam em um aumento de ovos gorados devido a não fertilização dos óvulos, pela incapacitação de locomoção dos espermatozoides e tempo para fertilizar os óvulos. A obtenção de uma elevada taxa de fertilização é limitada por dois fatores primordiais, sendo eles a duração da motilidade espermática e o tempo de abertura da micrópila (Rurangwa et al., 1998). Conforme os mesmos autores, quando altas taxas de fertilização são obtidas usando-se uma proporção relativamente baixa de espermatozoides por óvulo, significa que, dentre outros aspectos, a espécie possui alta capacidade de fertilização.

Conforme Rizzo et al. (2003), trabalhando com fêmeas de *Prochilodus marginatus*, obteve uma correlação negativa ( $r = -0,82$ ) entre taxa de fertilização e larvas deformadas, durante o armazenamento “in situ” (26°C). Neste estudo não foram encontradas correlações entre larvas normais e defeituosas com a taxa de fertilização, mas com motilidade e sua duração. Conforme os dados, o grupo das “fêmeas ruins” (óvulos com qualidade inferior) necessita de melhor qualidade espermática em relação ao grupo das “fêmeas boas”. Pois a correlação entre os parâmetros seminais com larvas normais e larvas defeituosas foi notada somente no grupo das “fêmeas ruins”.

Uma correlação positiva verificada e que chamou bastante atenção ocorreu entre ovos gorados e concentração espermática (Tabela 13).

**Tabela 13** - Correlação entre concentração espermática e ovos gorados baseados no coeficiente de Spearman utilizado no grupo das “fêmeas ruins”

Parâmetros	Concentração espermática	
	Correlação	Probabilidade
Ovos gorados	0,33	(P=0,05)

P= probabilidade

Para Hart (1990) a fertilização ocorre entre um único núcleo do espermatozoide, fusionada com um núcleo do óvulo, preservando o complemento genético normal do organismo novo. Se mais do que um núcleo do espermatozoide fusionar com o núcleo do óvulo, o resultado é desastroso e usualmente letal para o desenvolvimento do zigoto. Zigotos poliespermáticos tipicamente encontram dificuldade durante a clivagem e morrem logo após a fertilização. A razão espermatozoides/óvulo quando maior que o desejado possivelmente levará a poliespermia ocasionando uma taxa maior de ovos gorados (Hart, 1990).

Apesar de não ter ocorrido diferença na razão de espermatozoides/óvulo entre os grupos, “fêmeas boas e ruins”, supõe-se que os óvulos com qualidade inferiores produziram uma maior taxa de ovos gorados, devido à poliespermia, em relação aos de qualidade superior. Sendo assim, é necessário uma menor razão de espermatozoides/óvulo para as “fêmeas ruins”. Este fato, muito embora concorde com a afirmação de Suquet et al. (1995), que relataram para *Scophthalmus maximus* a exigência de espermatozoides/óvulo varia de acordo com a qualidade dos óvulos, divergem com a conclusão dos mesmos autores que relacionam a necessidade dos grupos com óvulos com baixa viabilidade, necessitam de mais espermatozoides para obter sucesso na fertilização. Neste estudo, a qualidade inferior dos óvulos pode ter propiciado a poliespermia, levando a uma taxa maior de ovos gorados. Provavelmente os óvulos de qualidade inferior durante o mecanismo de fechamento da micrópila possuam uma falha no tempo de fechamento, ocasionando a entrada de mais de um espermatozoide.

A dificuldade de desenvolvimento do embrião fatalmente conduz morte prematura das larvas. Larva não eclodida morta correlacionou-se negativamente com a motilidade progressiva e duração da motilidade (Tab. 12). Segundo Daniels (2008) observou em humanos que, 60% dos problemas de saúde e das debilidades verificadas em neonatos tinham origem desconhecida. A pesquisadora relata que os excessos de consumo de álcool, tabaco e drogas ilícitas afetam a qualidade do esperma, e assim, ocorreriam



alterações na produção dos espermatozoides, levando a transmissão com risco e os eventuais problemas a afetar os neonatos. Neste estudo com *P. mesopotamicus*, supõe-se que a qualidade inferior do sêmen e a baixa qualidade dos óvulos, poderiam levar um aumento na porcentagem de larvas não eclodidas mortas. Assim, atribui-se que espermatozoides com baixa motilidade, juntamente com óvulos de má qualidade, levam a formação de larvas debilitadas, sem força para eclodir, ocasionando sua morte antes mesmo da eclosão.

Neste estudo não foram encontradas correlações dos parâmetros do sêmen com a taxa de fertilização e eclosão, nos dois grupos avaliados. No grupo de “fêmeas ruins”, motilidade progressiva (%) e a duração da motilidade (segundos), gerou uma correlação negativa com a porcentagem de ovos gorados, não acontecendo este fato no grupo das “fêmeas boas”. Uma hipótese sugerida para esta situação poderia estar relacionada com a baixa qualidade dos óvulos. Para ocorrer uma boa taxa de fertilização, a qualidade do sêmen (motilidade e duração da motilidade), necessariamente, precisa apresentar bons indicadores.

### Conclusão

Não houve diferença na qualidade seminal dos peixes utilizados para fertilizar os óvulos nos grupos das “fêmeas boas e ruins”, a não ser pela incidência de espermatozoides com cauda quebrada no sêmen que fertilizou os óvulos das fêmeas consideradas “ruins” que resultou em perda na taxa de fertilização e eclosão.

Quanto as correlações, se a qualidade dos óvulos não for boa, para que ocorra uma taxa melhor de fertilização, a qualidade do sêmen precisa apresentar bons indicadores dos parâmetros. A qualidade seminal passa a ser primordial se não forem utilizados óvulos de boa qualidade.

### Literatura Citada

- Barth, A.D.; Oko, R.J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames: Iowa State University, 1989. 285p.
- Billard, R.; Cosson, J.; Crim, L.W. et al. Broodstock management and seed quality-general considerations. In: Bromage, N.; Roberts, R.J. (Eds). **Broodstock management and egg larval quality**. Oxford: Blackwell Science, 1995. p.1-24.

- Billard, R.; Cosson, M. P. Some problems related to the assesment of sperm motility in freshwater fish. **The Journal of Experimental Zoology**, v.261, p.122-131, 1992.
- Bock, C.L.; Padovani, C.R. Considerações sobre a reprodução artificial e alevinagem de pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) em viveiros. **Acta scientiarum**, v.22, n.2, p.495-501, 2000.
- 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, 1995, p.1–24.
- Cosson, J.; Billard, R.; Cibert, C. et al. Ionic factors regulating the motility of fish sperm. In: Gagnon, C. (Ed.) **The male gamete: from basic science to clinical applications**. Viena: Cache River Press, 1999. p.162-186.
- Daniels, C. [2008]. Espermatozóide Drogado. Disponível em: < HTTP://www.gnosisonline.org/forum - gnosis/viewtopic.php.> Acessoem:05/02/2009.
- Ferreira, A.A.; Nuñez, A.P.O.; Luz, R.K. et al. Avaliação qualitativa e quantitativa do sêmen de jundiá, *Rhamdia quelen*. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.27, n.1, p.57-60, 2001.
- Hart, N.H. Fertilization in teleost fishes:mechanisms of sperm-egg interactions. **International Review of Cell & Molecular Biology**, n.121, p.1-66, 1990.
- Herman, H.A.; Mitchell, J.R.; Doak, G.A. **The artificial insemination and embryo transfer of diary and beef cattle**. Illinois: Interstate, 1994. 392 p.
- Kamler, E. Parent–egg–progeny relationships in teleost fishes: an energetics perspective. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v.15, p.399–421, 2005.
- Kavamoto, E.T.; Barnabe, V.H.; Campos, B.E.S. et al. Anormalidades morfológicas nos espermatozóides do curimatá, *Prochilodus lineatus* (Steindachner, 1881) (Osteichthyes, Characiformes, Prochilodontidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, v.25, p.61-66, 1999.
- Luz, R.K.; Ferreira, A.A.; Reynalte-Tajate, D.A. et al. Avaliação qualitativa e quantitativa do sêmen do suruvi, *Steindachneridion scripta* (pimelodidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, v.27, n.1, p.39-42, 2001.
- 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, n.1, p.191-194, 2004.
- Marques, S. **Preservação a curto prazo do sêmen de Teleósteos Neotropicais de água doce**. Dissertação (Mestrado em Zoologia) - Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001. 83p.
- Miliorini, A.B. **Ativadores e concentrações de metanol e dimetilsulfóxido na qualidade do sêmen criopreservado de curimba (*Prochilodus lineatus*)**. Lavras: Universidade Federal de Lavras - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, 2006. 113p. (Dissertação de mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências, 2006.
- Miliorini, A.B.; Murgas, L.D.S.; Viveiros, A.T.M. et al. Resfriamento do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) à 4°C, utilizando diferentes concentrações de dimetilsulfóxido. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, n.3, p.209-211, 2002.

- Pillay, T.V.R. Economic and social dimensions of aquaculture management. **Aquaculture Economics & Management**, v.1, n.1, p.3-11, 1997.
- Rana, K. Preservation of Gametes. In: Bromage, N.R.; Roberts, R.J. (Eds) **Broodstock Management and Egg and Larval Quality**. Blackwell Science, 1995. 424p.
- Rizzo, E.; Godinho, H.P.; Sato, Y. Short-term storage of oocytes from the neotropical teleost fish *Prochilodus marginatus*. **Theriogenology**, v.60, p.1059–1070, 2003.
- 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, n.1, p.60-63, 1988.
- Rosengrave, P.; Taylor, H.; Montgomerie, R. et al. Chemical composition of seminal and ovarian fluids of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and their effects on sperm motility traits. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.152, p.123–129, 2009.
- 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, n.1, p.1-28, 2004.
- Rurangwa, E.; Roelants, I.; Huyskens, G. et al. The minimum effective spermatozoa: egg ratio for artificial insemination and the effects of mercury on sperm motility and fertilisation ability in *Clarias gariepinus*. *Journal of Fish Biology*. v.53. p.402–413, 1998.
- Sanches, E.A.; Baggio, D.M.; Bombardelli, R.A. et al. Fertilização artificial de ovócitos de pacu *Piaractus mesopotamicus* por meio de diferentes relações espermatozoide. ovócito<sup>-1</sup>. In: Congresso Brasileiro de Produção de Peixes Nativos de Água Doce, 1., 2007, Dourados, **Anais...Dourados**, Embrapa Agropecuária Oeste, 2007. CD-ROM.
- Silveira, W.F.; Kavamoto, E.T.; Cestarolli, M.A. et al. Avaliação espermática, preservação criogênica e fertilidade do sêmen do pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), proveniente de reprodução induzida. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.17, p.1-13, 1990.
- Sorensen Jr., A.M. **A laboratory for animal reproduction**. 4.ed. Massachusetts: American Press, 1979. 153p.
- Springate, J.R.C.; Bromage, N.R.; Elliot, J.A.K. et al. The timing of ovulation and stripping and their effects on the rates of fertilization and survival to eyeing, hatch and swim-up in the rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). **Aquaculture** v.43, p.313–22, 1984.
- Streit Jr., D.P. **Extrato de hipófise de frango e de coelho como indutores gonadais de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) macho e fêmea, em comparação com extrato de hipófise de carpa**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós graduação em Zootecnia. 2002. (Dissertação de Mestrado). Programa de Pós graduação em Zootecnia, 2002.
- Streit Jr., D.P.; Benites, C.; Moraes, G.V. et al. Sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) criopreservado com diluentes utilizados para sêmen de suínos. **Ciência Animal Brasileira**, v.7, n.3, p.289-297, 2006.

- Streit Jr., D.P.; Moraes, G.V.; Ribeiro, R.P. et al. Avaliação de diferentes técnicas para coloração de sêmen de peixes. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar**, v.7, p.157-162, 2004.
- Suquet, M.; Billard, R.; Cosson, J. et al. Artificial insemination in turbot (*Scophthalmus maximus*): determination of the optimal sperm to egg ratio and time of gamete contact. **Aquaculture**, v.133, p.83-90, 1995.
- Woynarovich, E.; Horváth, L. **A propagação artificial de peixes de águas tropicais: manual de extensão**. Brasília: Escopo, 1983. 220p.

## **CAPÍTULO III**

Qualidade seminal de *Piaractus mesopotamicus* “in natura” e pós-criopreservação e sua correlação com as taxas de fertilização, eclosão e a morfologia das larvas

**Qualidade seminal de *Piaractus mesopotamicus* “in natura” e pós-criopreservação e sua correlação com as taxas de fertilização, eclosão e a morfologia das larvas**

RESUMO: No estudo foram utilizados seis machos e seis fêmeas de *Piaractus mesopotamicus* induzidos com extrato de hipófise de carpa. Através do método reprodutivo por extrusão foi coletado o sêmen de cada macho e feita a avaliação dos parâmetros quali-quantitativos, e após uma alíquota de cada amostra coletada foi criopreservada. Nos resultados do sêmen “in natura”, a motilidade progressiva, vigor espermático, duração da motilidade, espermatozoides normais e anormalidades secundárias foram maiores ( $P < 0,0001$ ), em relação ao sêmen avaliado após a descongelação. As médias das taxas de fertilização, eclosão, porcentagem de larvas normais e larvas defeituosas dos óvulos fertilizados com o sêmen “in natura”, foram maiores ( $P < 0,0001$ ). As correlações encontradas entre parâmetros quali-quantitativos do sêmen “in natura” e do sêmen congelado foram: duração da motilidade com motilidade progressiva ( $r = 0,88$ ;  $P < 0,0001$ ) e ( $r = 0,94$ ;  $P < 0,0001$ ), respectivamente. Duração da motilidade com cauda degenerada ( $r = -0,77$ ;  $P = 0,0002$ ) no sêmen “in natura” e ( $r = -0,54$ ;  $P = 0,01$ ) no sêmen congelado. Conclui-se que o processo de congelação provocou alterações nos parâmetros quali-quantitativos no sêmen de *P. mesopotamicus*. As correlações encontradas podem auxiliar na avaliação prévia do sêmen e por consequência dos machos. Pois os animais com índices menores de anormalidades espermáticas possuem uma motilidade progressiva e sua duração mais elevada, possivelmente ocasionando uma maior taxa de fertilização.

Palavras-chave: anormalidade espermática, congelação, parâmetros seminais

ABSTRACT: In the study six males and six females of *Piaractus mesopotamicus* were used induced with extract of carp pituitary. Through the reproductive method for extrusion each male's semen was collected and done to the evaluation of the quali-quantitative parameters, and after a bracket of each collected sample it was cryopreserved. In the results of the semen "in nature", the motility, spermatic vigor, duration of motility, normal spermatozoa and secondary abnormalities were larger ( $P < 0.0001$ ), in relation to the appraised semen post-thaw. The averages of the fertilization rates, hatching, percentage of normal larvae and defective larvae of the egg fertilized with the semen "in nature", they were larger ( $P < 0.0001$ ). The correlations found among

quali-quantitative parameters of the semen "in nature" and thawed were: duration of motility with the progressive motility of ( $r = 0.88$ ;  $P < 0.0001$ ) and ( $r = 0.94$ ;  $P < 0.0001$ ), respectively. Duration of motility with degenerate tail ( $r = -0.77$ ;  $P = 0.0002$ ) in the semen "in nature" and ( $r = -0.54$ ;  $P = 0.01$ ) in the frozen semen. It is ended that the freezing process provoked alterations in the quali-quantitative parameters in the semen of *P. mesopotamicus*. The found correlations can auxiliary in the previous evaluation of the semen and for consequence of the males. Because the animals with smaller indexes of spermatic abnormalities possess a progressive motility and her higher duration, possibly causing a larger fertilization rate.

Key Words: spermatic abnormality, freezing, seminal parameters

### Introdução

A preservação de gametas é considerada uma importante ferramenta para laboratórios de produção de alevinos, devido à economia na manutenção dos reprodutores e prevenção de perdas de linhagens geneticamente melhoradas. Permite ainda, otimizar o processo de transporte de material genético entre laboratórios, maior cuidado na prevenção de transmissão de doenças e a introdução de novas linhagens com risco mínimo de patógenos nos peixes cultivados (Tiersch, 1995).

O pacu (*Piaractus mesopotamicus*) é um peixe de grande porte que vem sendo utilizado nas pisciculturas e nos repovoamentos de reservatórios. A criação dessa espécie tem sido incentivada em razão do seu bom valor comercial e da grande aceitação no mercado nacional, juntamente com a questão ambiental, visando a redução de impactos gerados pelo represamento dos rios (Maria et al., 2004). Embora o pacu seja uma espécie que se adapte com grande facilidade, não se reproduz em cativeiro, a menos que seja submetida à indução hormonal (Romagosa et al., 1988).

Nos últimos anos, o cultivo e a preservação de algumas espécies nativas do Brasil, como o *Salminus maxillosus* (Streit Jr. et al., 2008), *Brycon orbignyanus* (Maria et al., 2006) e o *Piaractus mesopotamicus* (Streit Jr. et al., 2007), têm sido muito relevante, não só por sua importância econômica como também ambiental. Desse modo, a aplicação de conhecimentos básicos que resultem na obtenção de sucesso nos processos de reprodução, crescimento em cativeiro e desenvolvimento de técnicas de conservação destas espécies, torna-se necessário.

A capacidade dos espermatozoides serem congelados e descongelados depende de inúmeros fatores como; espécie, individualidade do animal e do período reprodutivo (Bromage & Roberts, 1995). Os estudos realizados sobre a qualidade do sêmen em peixes têm demonstrado variações individuais nos parâmetros, tais como: motilidade e concentração espermática além da capacidade para fertilizar e de ser armazenado (Mojica, 2004). Segundo Bromage & Roberts (1995) o sucesso da fertilização é o teste mais conclusivo para avaliar a qualidade do sêmen, sendo mais usado em estudos de reprodução artificial e preservação de sêmen.

Outro parâmetro importante na avaliação da qualidade do sêmen é a morfologia das células espermáticas. Pois, o aumento das anormalidades provoca a redução na motilidade espermática e no vigor espermático (Lahnsteiner et al., 1998; Cosson et al., 1999), podendo ocorrer assim uma diminuição da capacidade de fertilização. Todavia em peixes, os exames que abordam este parâmetro estão mais restritos a mudanças estruturais dos espermatozoides após a criopreservação (Yao et al., 2000; Taddei et al., 2001) e não enfatizam a correlação entre as morfologias espermáticas com as taxas de fertilização e eclosão e, com a morfologia das larvas.

Devido a estes fatores, no presente estudo avaliou-se os parâmetros quali-quantitativos do sêmen do pacu (*P. mesopotamicus*). Enfatizou-se a morfologia espermática e sua correlação com as taxas de fertilização, eclosão e parâmetros pós-eclosão como: a sobrevivência, eclodibilidade e morfologia das larvas. Também foi avaliada a estrutura do espermatozoide e a capacidade de fertilização, para estabelecer um protocolo de criopreservação seguro e prático.

## **Material e Métodos**

### ***Local***

O trabalho foi desenvolvido na Estação de Hidrologia e Aquicultura da Duke Energy International - *Geração Paranapanema*, em Salto Grande (SP), juntamente com os Grupos de Pesquisa PeixeGen da Universidade Estadual de Maringá (UEM), *Aquam* da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e do Complexo Central de Apoio à Pesquisa da UEM –COMCAP.

### ***Seleção dos reprodutores e indução hormonal***



Foram utilizados seis machos e seis fêmeas de pacu (*P. mesopotamicus*), com idade de quatro anos, selecionados do plantel de reprodutores da Duke Energy. Os animais selecionados apresentavam características reprodutivas secundárias para peixes migradores; liberação do sêmen com uma leve compressão no abdômen e nas fêmeas, abdômen abaulado e macio, orifício urogenital avermelhado e intumescido. Após a seleção, os reprodutores foram estocados em aquários dentro do laboratório, pesados e marcados com “transponders” para a identificação dos mesmos.

Para induzir a liberação dos gametas, utilizou-se extrato de hipófise de carpa, como recomendado por Wonayrovich & Horváth (1983) para espécies neotropicais: 5,5 mg/Kg do peso vivo das fêmeas, dividido em duas frações, 10% na primeira aplicação e o restante 12 horas após a primeira; 2,5 mg/Kg do peso vivo dos machos em dose única, coincidindo com a segunda dose das fêmeas. A temperatura média da água foi de  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  após a indução hormonal, ocorrendo à liberação dos gametas em 10 horas.

#### ***Colheita e Análise de Sêmen***

Para a colheita e análise do sêmen, os peixes foram envoltos em uma toalha úmida para reduzir o estresse e, em seguida, secou-se a região urogenital com papel toalha. Uma massagem ântero-posterior foi aplicada e o sêmen liberado, colhido em seringas de 5 mL (Billard et al., 1995). Os parâmetros avaliados foram: motilidade progressiva, vigor espermático, duração da motilidade, concentração de espermatozoides e morfologia espermática. As metodologias de análise do sêmen são descritas a seguir, segundo Sorensen Jr. (1979), adaptadas para o sêmen de peixes neotropicais migradores.

*Motilidade progressiva e vigor espermático:* Em uma lâmina de microscopia ótica foi diluída 20  $\mu\text{L}$  de sêmen em 200  $\mu\text{L}$  de água destilada, cobertos por uma lamínula e levado ao microscópio ótico com objetiva de 40X, avaliando-se por método subjetivo, ambas variáveis. Para motilidade progressiva foi utilizado um escore de 0% a 100% e para o vigor espermático de 0 a 5 pontos, sendo os mais elevados, os melhores.

*Duração da Motilidade:* ao colocar 20  $\mu\text{L}$  de sêmen em 200  $\mu\text{L}$  de água destilada, um cronômetro foi acionado. Marcou-se o tempo decorrido até que o último espermatozoide parou de mover no campo ótico, observado na lâmina.

*Concentração de espermatozoides:* Dilui-se na razão de 1:1000, sêmen:formol-salina tamponada em um becker, utilizando uma pipeta de precisão. Após a diluição e

homogeneização da solução, preencheu-se por capilaridade a câmara de Neubauer contando-se em seguida os espermatozoides.

*Morfologia espermática:* Para esta análise foi produzido um esfregaço com o sêmen diluído em formol-salina tamponada, na razão de 1:1000 (sêmen/solução diluente, respectivamente). Os esfregaços foram corados pelo método de Rosa Bengala recomendado para peixes por Streit Jr. et al. (2004), e depois de secar, levados ao microscópio óptico com objetiva de 40X, contando-se de 150 à 160 espermatozoides por esfregaço de cada animal. Anormalidades consideradas primárias: cauda quebrada, enrolada e degenerada, e anormalidades secundárias: cauda dobrada, cabeça solta e cauda solta.

### ***Criopreservação do Sêmen***

Uma alíquota de cada amostra coletada foi criopreservada. O meio diluidor utilizado para a criopreservação foi composto por 20 mL de gema de ovo fresco de galinha, 5 g de glicose e 10 mL de DMSO (dimetilsulfóxido), completados para 100 mL de água destilada, de acordo com Carolsfeld et al. (2003).

Sêmen e a solução diluidora foram misturados, na proporção de 1:3 (sêmen/solução diluidora). O sêmen+solução diluidor foi envasado em “paillettes” de 0,25 mL, esterilizados e devidamente identificados. Os “paillettes” foram submetidos ao vapor de nitrogênio, a  $-16^{\circ}\text{C}$ , em um botijão do tipo “dry shipper” (modelo DOUBLE 20). Decorridas 15 horas, os “paillettes” foram transferidos para um botijão de estoque, com nitrogênio líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ .

### ***Descongelamento do Sêmen e Análise do Sêmen Criopreservado***

Trinta e duas horas após a congelamento do sêmen foi realizada a descongelamento e análise dos parâmetros quali-quantitativos. Após a imersão dos “paillettes” a temperatura de  $45^{\circ}\text{C}$  por cinco segundos, avaliou-se; motilidade progressiva, vigor espermático, duração da motilidade e a morfologia dos espermatozoides.

### ***Taxa de fertilização, eclosão e morfologia das larvas***

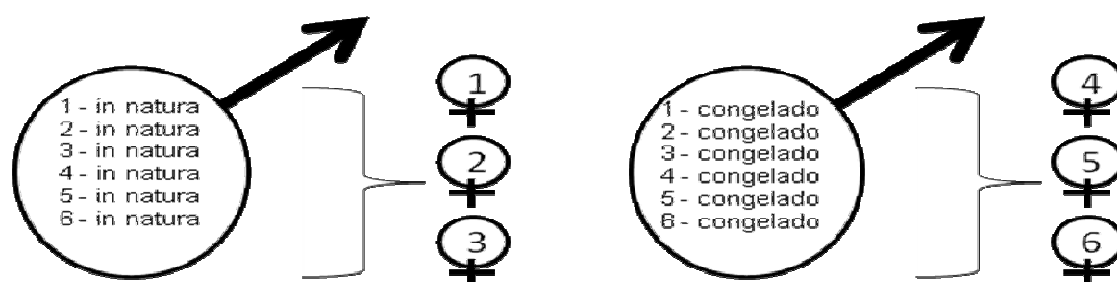
Na Tabela 1, estão relacionados, o número de fêmea utilizada por macho, volume de óvulos (mL) fertilizado por cada macho, volume (mL) de sêmen usado por cada fêmea para fertilizar seus óvulos e a razão média de espermatozoides por óvulo de cada cruzamento (machoXfêmea).

Tabela 1 - Relação dos animais utilizados no manejo reprodutivo e volume de gametas no processo de fertilização de *Piaractus mesopotamicus*

Machos	N <sup>o</sup> de Fêmeas	Óvulos (mL/macho)	Sêmen (mL)/fêmea	SPZ/Óvulo
1 a 6 ("in natura")	3	10	0,5	781.173
1 a 6 (congelado)	3	10	1,0	515.574

SPZ – espermatozóides;

Após a extrusão das fêmeas, os óvulos foram divididos em seis alíquotas iguais (mesmo número de óvulos em cada amostra) entre os seis machos. O sêmen "in natura", pré-avaliado, de cada macho, foi utilizado para fertilizar os óvulos das três fêmeas, assim como o sêmen congelado dos mesmos seis machos, fertilizou três novas fêmeas. Foram realizadas no total 18 combinações (óvuloxsêmen) para o sêmen "in natura" e 18 combinações para o sêmen congelado (Figura 1).



**Figura 1** - Esquema do manejo reprodutivo do *Piaractus mesopotamicus*, durante a fertilização dos gametas.

Cada alíquota de óvulo foi imediatamente fertilizada com o sêmen de apenas um macho, formando uma combinação "machoXfêmea". Em seguida, cada alíquota, agora com ovos foi depositada em incubadoras de sete litros, sendo cada combinação em uma incubadora individual. Decorridos sete horas de incubação a temperatura de  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  foi contabilizada a taxa de fertilização.

*Taxa de Fertilização:* Uma média foi produzida a partir da contagem de três alíquotas de cada uma das incubadoras (combinação - machoXfêmea) do número de embriões viáveis e ovos gorados.

Após a obtenção da taxa de fertilização, homogeneizou-se a coluna-d'água das incubadoras de 7 L e, com o auxílio de uma placa de Petri e pipeta de Pasteur selecionou-se 100 embriões viáveis destas amostras. Em seguida, transferiu-se para

incubadoras de 1,5 L, independente para cada combinação. Decorridos 18 horas após a fertilização com temperatura média da água de  $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ , realizou-se a mensuração da taxa de eclosão das incubadoras de 7 L.

*Taxa de Eclosão:* Uma média do número de larvas eclodidas e ovos gorados foi obtida a partir da contabilização de três alíquotas de cada incubadora de 7 L.

Para a obtenção da taxa de eclosão das incubadoras de 1,5 L, todas as larvas e ovos gorados foram retirados para avaliação, contabilizados para determinar o percentual e classificados em:

- Larvas normais - aquelas que apresentaram movimentação regular;
- Larvas defeituosas - aquelas que não apresentaram movimentação vigorosa ao se deslocar ou apresentando deformidade na notocorda;
- Larvas mortas - embriões que se desenvolveram, eclodiram larvas, mas que estavam mortas no momento da contagem.
- Ovos gorados - foram aqueles em que os embriões não evoluíram as larvas;
- Não eclodida viva – larvas que não saíram inteiramente do ovo, mas que estavam vivas durante a contagem.
- Não eclodida morta – larvas que não saíram inteiramente do ovo, mas que estavam mortas.

#### ***Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para o espermatozoide e larvas***

Foi processado o sêmen de dois machos ao acaso sendo: 1N (macho 1/sêmen “in natura”); 1C (macho 1/sêmen congelado). Uma alíquota de 1  $\mu\text{L}$  de sêmen “in natura” foi fixada em 999  $\mu\text{L}$  em solução de Glutaraldeído 2,5%, utilizando-se o tampão cacodilato 0,1M em pH 7,2 e permanecendo refrigerado a  $5^{\circ}\text{C}$  até o momento da desidratação. Para o sêmen congelado utilizou-se a mesma metodologia descrita para o sêmen “in natura”, todavia, utilizando-se uma alíquota de 50  $\mu\text{L}$  de sêmen congelado fixado em 950  $\mu\text{L}$  em solução de Glutaraldeído 2,5%. As amostras foram centrifugadas em 10.000 rpm por três minutos e lavadas com tampão cacodilato três vezes.

A desidratação ocorreu em séries crescentes de álcool, passando por concentrações de 50%, 70%, 80%, 90%, 95% durante 10 minutos cada etapa e três

banhos em álcool 100% por 10 minutos em cada concentração. A secagem foi em aparelho de Ponto Crítico BAL-TEC CPD 030 (Critical Point Dryer), utilizando CO<sub>2</sub> líquido. Os fragmentos foram montados em bases metálicas de alumínio (*stubs*) e em seguida foram metalizadas com íons ouro-paládio em Metalizador Shimadzu IC-50 Ion Coater.

Foram processadas quatro larvas ao acaso, sendo: A e C (larvas normais); B e D (larvas defeituosas). A larva “A” foi proveniente da eclosão do sêmen “in natura” do macho cinco com a fêmea três. A larva “C” foi obtida da eclosão do sêmen descongelado do macho dois com a fêmea seis e, a larva B da eclosão do sêmen “in natura” do macho dois com a fêmea um. Por fim, a larva D da eclosão do sêmen descongelado do macho seis com a fêmea dois.

As larvas foram fixadas em solução de glutaraldeído 2,5% utilizando-se o tampão cacodilato 0,1M em pH 7,2. Permaneceram refrigeradas a 5°C até o momento da desidratação e posterior secagem que ocorreu em temperatura ambiente em placas de cultura de células durante 48 horas. Os fragmentos foram montados em bases metálicas de alumínio (*stubs*) e em seguida metalizadas com íons ouro-paládio em Metalizador Shimadzu IC-50 Ion Coater.

Nos procedimentos de microscopia eletrônica, o material foi examinado e eletromicrografado em microscópio eletrônico de varredura Shimadzu SS-550 Superscan – (*Scanning Electron Microscope*) no Complexo Central de Apoio a Pesquisa (CONCAP - UEM).

### ***Análise Estatística***

Os dados foram submetidos à análise de correlação de spearman e análise de variância utilizando os procedimentos (corr) e (npar1way) do pacote estatístico SAS, respectivamente, (SAS Institute, Cary, NC- USA).

## **Resultados e Discussão**

### ***Manejo Reprodutivo***

A relação média entre espermatozoides/óvulo para o grupo de fêmeas fertilizadas com sêmen “in natura” e sêmen congelado foi de 781.173 e 515.574, respectivamente. Esta relação está de acordo com a observação de Sanches et al. (2007) que atribuíram

relação LRP (Linear Response Plateau) entre as taxas de fertilização (%) e as relações de número de espermatozoides/óvulo de 4.539.080, onde ocorre um comportamento “plateau”. A partir desta relação, as taxas de fertilização apresentaram efeito inversamente proporcional às doses inseminantes. Segundo os mesmos autores, a relação de número de espermatozoides/óvulo entre 7.000 e 4.539.080 não causam efeito nas taxas de fertilização.

### ***Parâmetros quali-quantitativos do sêmen***

#### *Concentração espermática*

A concentração espermática média observada variou de 14,35 a 28,65x10<sup>9</sup> espermatozoides/mL, com média de 21,09x10<sup>9</sup> espermatozoides/mL. O valor médio encontrado no presente trabalho, coincidiu com os registros de Silveira et al. (1990) de 28,07x10<sup>9</sup> espermatozoides/mL e Miliorini et al. (2002) de 18,62x10<sup>9</sup> espermatozoides/mL, trabalhando com a mesma espécie. Por outro lado, Maria et al. (2004) observaram uma concentração média de 13,89x10<sup>9</sup> espermatozoides/mL para o pacu, relacionando o valor ao período do ciclo reprodutivo na qual a coleta do sêmen foi realizada.

#### *Motilidade progressiva, duração da motilidade e vigor espermático*

Nos parâmetros seminais avaliados “in natura”, a motilidade progressiva, duração da motilidade e vigor espermático foram maiores (P<0,0001), em relação ao sêmen avaliado após a descongelação (Tabela 2).

**Tabela 2** - Média e desvio padrão da motilidade progressiva, duração da motilidade e vigor espermático do sêmen de *Piaractus mesopotamicus* “in natura” e após a descongelação

Parâmetros	Sêmen "in natura"		Sêmen descongelado	
	Média	DP	Média	DP
Motilidade progressiva (%)	90,83a	5,34	11,83b	7,41
Duração motilidade (seg)	42,03a	5,32	31,72b	7,11
Vigor espermático (pontos)	4,83a	0,41	3,17b	0,38

Médias na mesma linha com a mesma letra não diferem significativamente entre si; Seg – segundos;

Os valores observados neste estudo, não foram muito diferentes dos encontrados por Miliorini et al. (2002) para a mesma espécie, 99,16% de motilidade espermática, que durou média 62,50 segundos no sêmen “in natura”. No sêmen descongelado, a motilidade média de 11,83% também foi próximo do valor encontrado no sêmen de pacu descongelado, segundo Mello et al. (1998), 10%.

O índice encontrado para o vigor espermático reforça a ideia de perda de qualidade no sêmen após descongelação, pois, a redução de 4,83 para 3,17 pontos do sêmen “in natura” em relação ao descongelado, coincide com a observação de Streit Jr. et al. (2006) para a mesma espécie. Porém os valores foram diferentes, 3,40 e 2,55 pontos para o sêmen “in natura” e descongelado, respectivamente. Muito embora, tenha sido observado redução da pontuação média do vigor após a descongelação, o mesmo pode ser considerado bom, ao contrário do valor encontrado para a motilidade progressiva. Para sêmen de coelhos, Alvariño (1998) afirmou que um bom sêmen deve apresentar vigor espermático superior a 3 pontos. Em sêmen de mamíferos, os espermatozoides precisam apresentar bom vigor, pois sua intensidade vai afetar a sua capacidade de penetração no óvulo. Assim, um vigor espermático de 3,17 pontos para os espermatozoides de peixes, pode ser considerado bom, pois seu modo de fertilização difere dos mamíferos.

*Morfologia espermática: sêmen “in natura” e descongelado*

A porcentagem de espermatozoides normais foi encontrada em menor ( $P < 0,0001$ ) percentual no sêmen de *P. mesopotamicus* descongelado, em relação ao sêmen “in natura”. Isto resultou em uma maior frequência das anormalidades totais ( $P < 0,0001$ ) no sêmen criopreservado. O processo de congelamento elevou o índice de anormalidades primárias de 21,34% (“in natura”) para 46,53% (descongelado) (Tabela 3). Por outro lado, as anormalidades secundárias permaneceram maiores ( $P < 0,0001$ ) no sêmen “in natura” (28,65%) em relação ao descongelado (18,18%) (Tabela 3), provavelmente em função dos índices de anormalidades primárias. O aumento de anormalidades primárias, coincide com o relato de Streit Jr. et al. (2006) que observaram um índice de 36,15% de anormalidades primárias no sêmen “in natura” e de 49,99% após a descongelação. Os autores atribuíram este fato ao processo de congelamento, ao qual os espermatozoides foram submetidos.

**Tabela 3** - Média e desvio padrão dos espermatozoides normais, anormalidades totais, primárias e secundárias do sêmen de *Piaractus mesopotamicus* “in natura” e após a descongelação

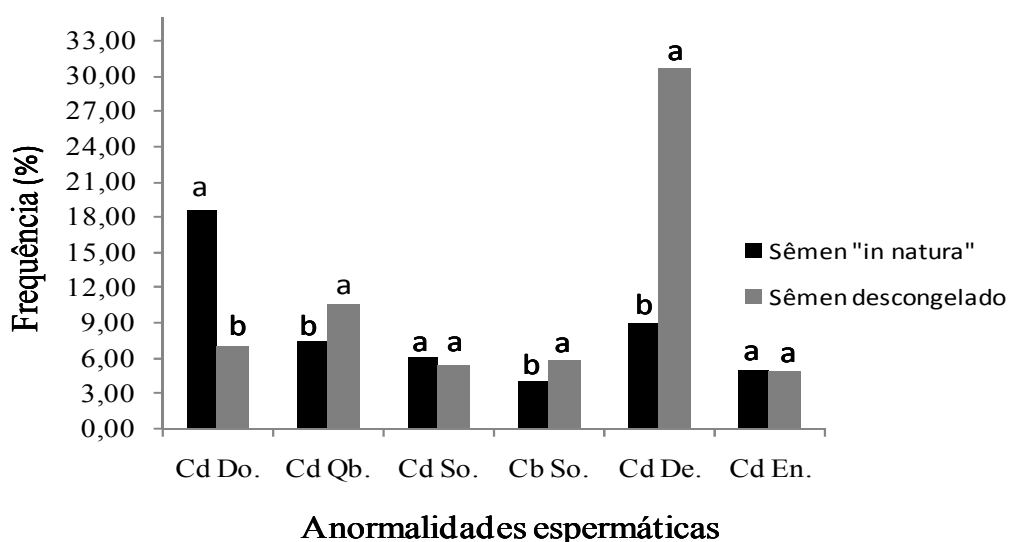
Parâmetros	Sêmen "in natura"		Sêmen descongelado	
	Média	DP	Média	DP
Espermatozoides normais (%)	50,02a	6,61	35,29b	4,48
Anormalidades totais (%)	49,99b	6,61	64,71a	4,48
Anormalidades primárias (%)	21,34b	7,65	46,53a	5,43

Anormalidades secundárias (%)	28,65a	4,42	18,18b	3,81
-------------------------------	--------	------	--------	------

Médias na mesma linha com a mesma letra não diferem significativamente entre si;

Muito embora, a frequência de anormalidades totais tenha saltado de 49,99% para 64,71%, do sêmen “in natura” (Tabela 3) em relação ao descongelado, assim como o aumento do índice de anormalidade primária, isto não permitiu inferir recomendações aceitáveis para as alterações morfológicas dos espermatozoides de peixes, por não haver parâmetros estabelecidos. Em mamíferos, as anormalidades secundárias (menos comprometedoras) em média são sempre mais elevadas que as primárias. Além disso, o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998) recomendou não utilizar índices superiores a 20% para suínos e ovinos e 30% para bovinos e equinos de patologias totais. Contudo estes parâmetros não conferem para peixes.

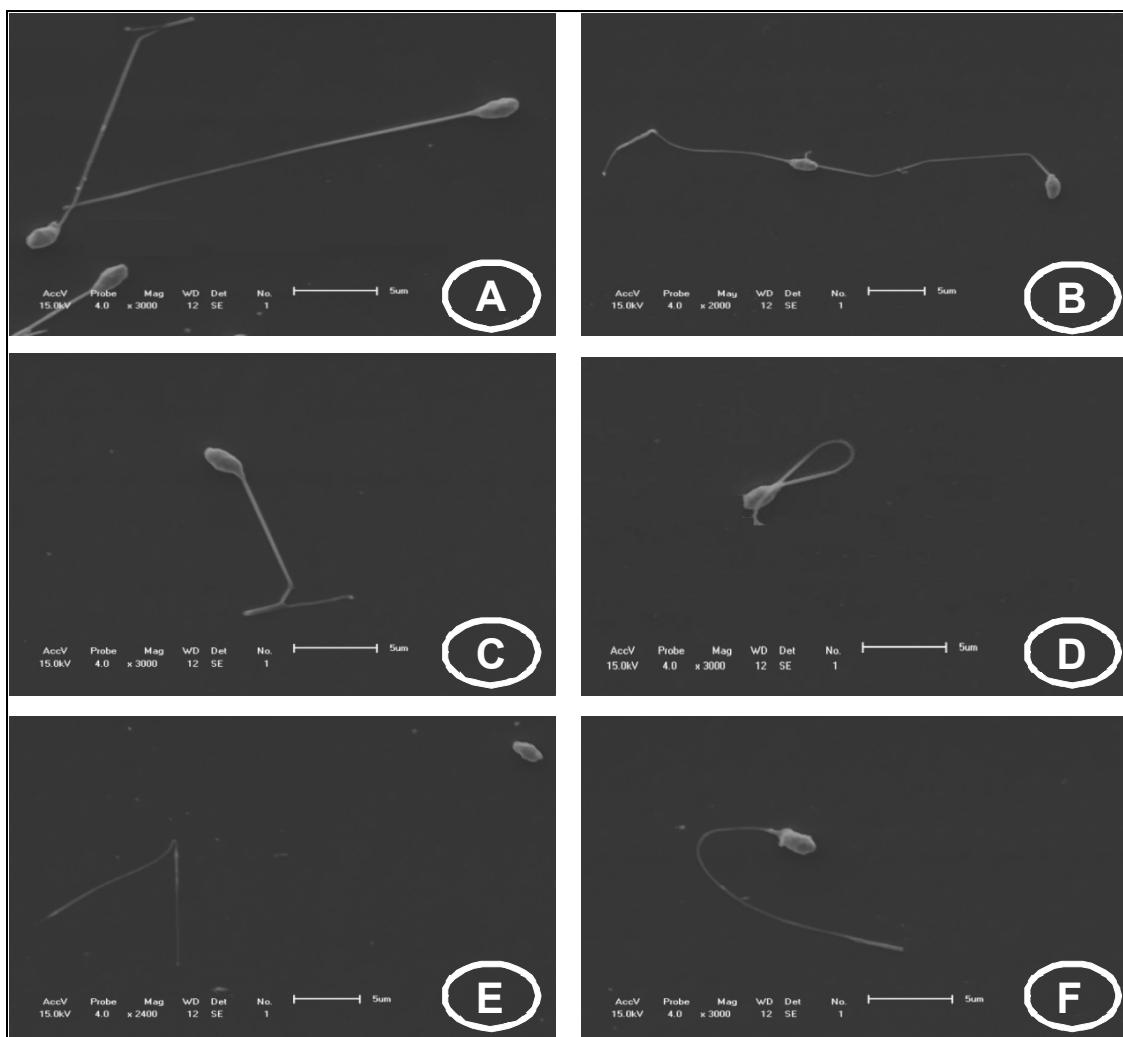
Na avaliação das morfologias espermáticas, não houve diferença ( $P < 0,05$ ) para o sêmen “in natura” e descongelado para espermatozoides com cauda enrolada (anormalidade primária) (Figura 3(F)) e solta (anormalidade secundária) (Figura 3(D)). Constatou-se que cauda degenerada (Figura 4(D)) e quebrada (anormalidade primária) (Figura 3(B)) e cabeça solta (anormalidade secundária) (Figura 3(D)) aumentaram ( $P < 0,0001$ ) no sêmen avaliado após a descongelação. Porém, anormalidade de cauda dobrada (Figura 3 (D)) foi maior no sêmen “in natura” ( $P < 0,0001$ ) em relação ao sêmen descongelado (Figura 2).



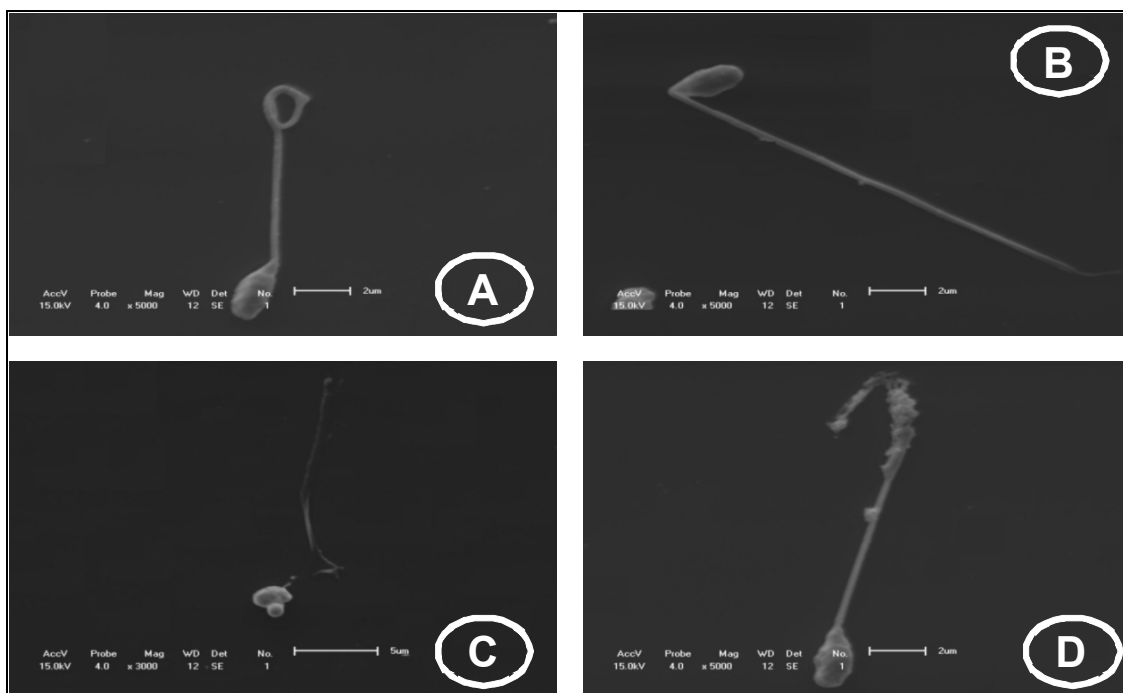
**Figura 2** - Percentuais médios de anormalidades encontradas no sêmen de *P. mesopotamicus* no sêmen “in natura” e descongelado. Anormalidades verificadas: cauda dobrada (CdDo); cauda quebrada (CdQb); cauda solta (CdSo); cabeça solta (CbSo); cauda degenerada (CdDe); cauda enrolada (CdEn).



Nas Figuras 3 e 4 são apresentadas as anormalidades espermáticas observadas no sêmen de *P. mesopotamicus* “in natura” e após a descongelação.



**Figura 3** - Ilustrações de morfologias observadas através da microscopia eletrônica de varredura no sêmen de *Piaractus mesopotamicus* “in natura”. (A) espermatozoide normal; (B) espermatozoides com cauda quebrada; (C) espermatozoides com cauda dobrada e quebrada; (D) espermatozoides com cauda dobrada; (E) espermatozoide com cauda e cabeça solta; (F) espermatozoide com cauda enrolada.



**Figura 4** - Ilustrações de morfologias observadas através da microscopia eletrônica de varredura no sêmen de *Piarractus mesopotamicus* descongelado. (A) espermatozoide com cauda enrolada; (B) espermatozoides com cauda quebrada; (C) e (D) espermatozoides com cauda degenerada.

É fato, que submeter o sêmen a um protocolo de congelação, provocará o surgimento de injúrias, ou seja, na cauda ou na cabeça dos espermatozoides. Todavia, a origem destas anormalidades é determinada pela redução da temperatura ou da exposição à solução crioprotetora. O aumento das anormalidades espermáticas, cauda quebrada e degenerada, após a descongelação do sêmen de *P. mesopotamicus*, pode ter a mesma origem que os estudos de Taddei et al. (2001) com *Diplodus puntazzo*. Os autores sugeriram que a osmorregulação celular pode ser prejudicada quando há exposição dos espermatozoides em soluções crioprotetoras, resultando primeiro no inchamento da cabeça ou da cauda do espermatozoide e em um segundo momento causar injúrias em organelas intracelulares. Este quadro, de acordo com os autores citados, pode determinar a perda de funcionalidade da mitocôndria e efusão da cromatina nuclear, resultando em espermatozoides defeituosos ou mortos. Os espermatozoides, quando submetidos à criopreservação, estão sujeitos ao estresse resultante da interação água e solução, que surge pela formação de cristais de gelo (Holt, 2000), podendo causar dano estrutural ou até mesmo a morte das células espermáticas.

A redução da motilidade progressiva após a criopreservação pode estar correlacionada as deformações estruturais durante os processos de congelamento e descongelamento dos espermatozoides. Após congelar e descongelar o sêmen, frequentemente ocorre nos espermatozoides uma dilatação severa ou perda parcial das mitocôndrias na peça intermediária e quebra da cauda (Figura 4 (B)). A perda da mitocôndria pode ocorrer devido ao inchaço da peça intermediária. Em função deste inchaço, a mitocôndria pode ser avariada ou ser empurrada para longe da peça intermediária. Estas mudanças podem afetar adversamente a função das mitocôndrias e da cauda, reduzindo assim o movimento flagelar dos espermatozoides (Zhang et al., 2003). Esta situação foi relatada por Yao et al. (2000), com sêmen de “ocean pout” (*Macrozarcus americanus*) após o processo de criopreservação e posterior descongelamento. Os autores verificaram um severo inchaço nas mitocôndrias e/ou uma desidratação do citoplasma da peça média dos espermatozoides, e concluíram então que esta alteração nas atividades das mitocôndrias gerou redução no suplemento energético da célula espermática, conseqüentemente redução do batimento flagelar e por fim a perda da motilidade progressiva. As anormalidades morfológicas da peça intermediária e cauda causam alterações progressivas na motilidade, aumentando o número de espermatozoides com movimentos circulatorios ou oscilatórios e conseqüentemente, diminuindo a taxa de fertilização (Kavamoto et al., 1999).

***Correlações dos parâmetros quali-quantitativos do sêmen, morfologia das larvas, taxas de fertilização e eclosão.***

As médias das taxas de fertilização e eclosão a partir do sêmen “in natura” foram maiores ( $P < 0,0001$ ), em relação ao sêmen avaliado após a descongelamento. A taxa de fertilização do sêmen “in natura” foi de 95,64% e do sêmen descongelado de 59,01%, com uma taxa de eclosão de 92,31% e de 37,34%, para o sêmen “in natura” e descongelado, respectivamente (Tab. 4).

Com relação à morfologia das larvas eclodidas, foi verificado um percentual menor de larvas normais oriundas do sêmen descongelado em relação ao “in natura” ( $P < 0,001$ ). Já, os ovos gorados foram verificados em um percentual mais elevado ao ser utilizado sêmen descongelado para a fertilização dos óvulos ( $P < 0,001$ ). Já o percentual de larvas defeituosas foi maior ( $P < 0,001$ ) quando utilizou-se o sêmen “in natura” para fertilizar os óvulos em relação ao sêmen descongelado. A porcentagem de larvas

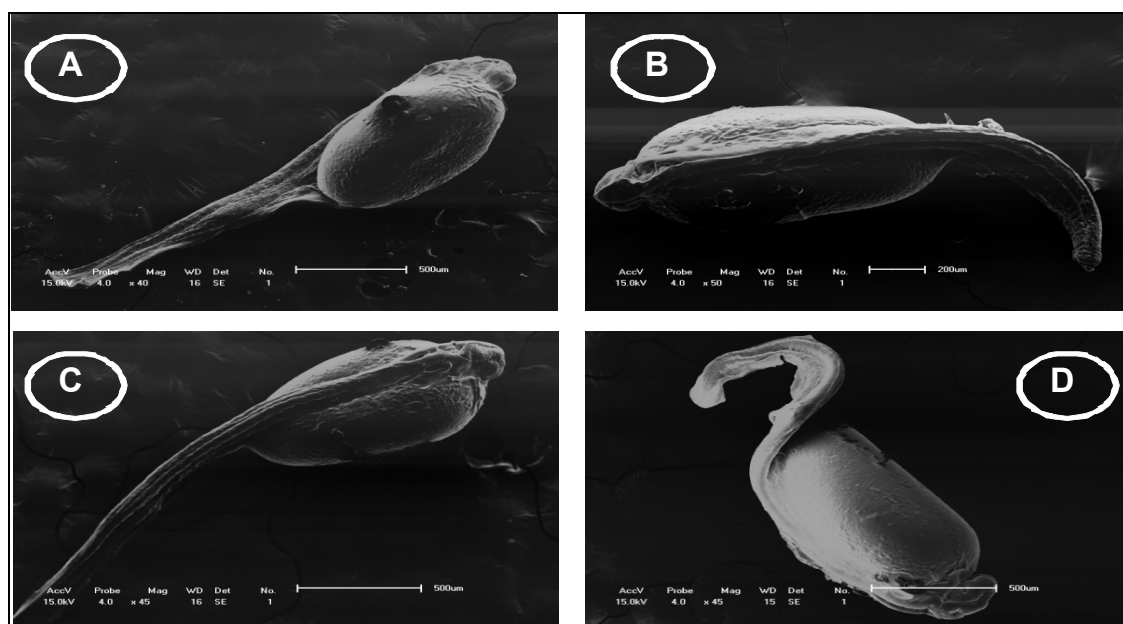
mortas, não eclodidas vivas e não eclodidas mortas, não apresentaram diferença ( $P < 0,05$ ) entre os óvulos fertilizados com o sêmen “in natura” e descongelado (Tab. 4).

**Tabela 4** - Média e desvio padrão das taxas de fertilização e eclosão, ovos gorados, larvas normais, defeituosas, mortas, não eclodidas mortas e não eclodidas vivas a partir do sêmen de *Piaractus mesopotamicus* “in natura” e descongelado

Parâmetros	Sêmen "in natura"		Sêmen descongelado	
	Média	DP	Média	DP
Taxa de fertilização (%)	95,64a	1,7	59,01b	25,69
Taxa de eclosão (%)	92,31a	7,93	37,34b	23,28
Ovos gorados (%)	0,23b	0,54	44,32a	37,22
Larvas normais (%)	52,15a	31,16	13,25b	17,15
Larvas defeituosas (%)	24,45a	16,68	8,01b	9,9
Larvas mortas (%)	18,02a	20,75	28,06a	21,65
Não eclodidas mortas (%)	3,81a	7,74	6,49a	8,95
Não eclodidas vivas (%)	1,28a	2,79	0,05a	0,23

Médias na mesma linha com a mesma letra não diferem significativamente entre si;

Na Figura 5, são apresentadas as larvas normais e defeituosas observadas no sêmen de *P. mesopotamicus* “in natura” e após a descongelação.



**Figura 5** - Ilustrações da morfologia das larvas fertilizadas com sêmen de *Piaractus mesopotamicus* “in natura” e descongelado, observadas através da microscopia eletrônica de varredura. (A) larva normal - sêmen “in natura”; (B) larva defeituosa - sêmen “in natura”; (C) larva normal - sêmen descongelado; (D) larva defeituosa - sêmen descongelado.

Na avaliação do sêmen “in natura”, a motilidade progressiva média observada foi de 90,83%, durando em média 42,03 segundos e fertilizando 95,64% dos óvulos. Porém, no sêmen avaliado após a descongelação, a taxa de fertilização caiu para 59,01%, já que a motilidade progressiva reduziu para 11,83%, com duração de 31,72 segundos. A motilidade espermática, duração da motilidade e o vigor espermático do sêmen de *P. mesopotamicus* foram afetados pelo processo de congelação. Desse modo, era natural esperar que a taxa de fertilização caísse, o que ocorreu, entretanto mantendo-se em aproximadamente 60%, suficiente para uma boa resposta de produção. Este resultado da taxa de fertilização, assemelha-se ao observado por Linhart et al. (2000) de 56,00%, quando utilizaram sêmen descongelado de *Cyprinus carpio*, porém com motilidade de 69,00%. Mesmo ocorrendo perda de qualidade nos parâmetros qualitativos após a congelação, em especial a motilidade, o fato de ainda ter ocorrido uma boa taxa de fertilização pode estar relacionado ao vigor que os espermatozoides ainda apresentavam. Certamente os espermatozoides estavam com baixa motilidade, mas com um vigor suficiente para fertilizar mais de 50% dos óvulos.

Neste estudo, a porcentagem de larvas defeituosas foi maior quando se utilizou sêmen “in natura” para fertilizar os óvulos em relação ao sêmen descongelado. Possivelmente este caso esteja relacionado com o fato do sêmen descongelado ter produzido um elevado percentual de ovos gorados, enquanto o sêmen “in natura” praticamente nada gerou. Não se pode descartar o fato do percentual mais elevado de espermatozoides com anormalidades totais no sêmen descongelado possa ter contribuído para o elevado percentual de ovos gorados e baixo percentual de larvas normais. Suquet et al. (1998) estudando a criopreservação de espermatozoides de *Psetta máxima* e Otémé et al. (1996) com *Heterobranchus longifilis*, não observaram diferença na taxa de fertilização, eclosão e porcentagem de larvas defeituosas com sêmen fresco ou congelado. Já Richardson et al. (1995) relataram que a porcentagem de larvas deformadas foi de 8% no sêmen criopreservado e de 14% no sêmen “in natura”, para *Pleuronectes ferrugineus*. Em *Clarias gariepinus* Horváth & Urbányi (2000) relataram que o uso de crioprotetores aumentou a porcentagem de larvas deformadas comparado com o grupo controle (sem crioprotetor).

As correlações encontradas entre os parâmetros quali-quantitativos do sêmen “in natura” estão apresentadas na tabela 5.

**Tabela 5** - Correlações entre duração da motilidade com motilidade progressiva, anormalidade primária e cauda degenerada baseados no coeficiente de Spearman no sêmen “in natura” de *Piaractus mesopotamicus*

Parâmetros Seminais	Duração da motilidade	
	Correlação	Probabilidade
Motilidade progressiva	0,88	(P<0,0001)
Anormalidade primária	-0,49	(P=0,04)
Cauda degenerada	-0,77	(P=0,0002)

P=probabilidade

As alterações ultraestruturais nos espermatozoides ocorrem após o aumento ou a diminuição da osmolaridade do meio que os circunda, conseqüentemente reduzindo o tempo da motilidade como ocorreu neste estudo com *P. mesopotamicus*. Espermatozoides de teleósteos marinhos apresentaram intumescência do núcleo, rompimento da membrana plasmática, desaparecimento de mitocôndrias, perda da membrana plasmática flagelar e espiralização, ruptura ou aderência dos axonemas quando expostos a uma solução hipotônica. Marques (2001) classificou estas modificações como limitantes da duração da motilidade espermática.

No sêmen congelado, as correlações encontradas entre os parâmetros quali-quantitativos do sêmen descongelado estão apresentadas na tabela 6.

**Tabela 6** - Correlações entre duração da motilidade com a motilidade progressiva e cauda degenerada baseados no coeficiente de Spearman no sêmen descongelado de *Piaractus mesopotamicus*

Parâmetros Seminais	Duração da motilidade	
	Correlação	Probabilidade
Motilidade progressiva	0,94	(P<0,0001)
Cauda degenerada	-0,54	(P=0,01)

P=probabilidade

Segundo os resultados encontrados (Tab. 6), o processo de congelação aumentou a porcentagem de cauda degenerada nos espermatozoides, causando uma redução na motilidade e duração espermática. Este fato foi comprovado por Zhang et al. (2003) ao relatarem que congelar e descongelar os espermatozoides causam mudanças na função das mitocôndrias e cauda, reduzindo assim o movimento flagelar dos espermatozoides.

Não foram observadas correlações dos parâmetros quali-quantitativos do sêmen “in natura” e descongelado com a taxa de fertilização, taxa de eclosão, ovos gorados e larvas defeituosas. As correlações encontradas para o sêmen “in natura” e descongelado com os parâmetros pós eclosão estão apresentadas na tabela 7.

**Tabela 7** - Correlação entre anormalidade primária e larva morta baseado no coeficiente de Spearman no sêmen “in natura” e descongelado de *Piaractus mesopotamicus*

Parâmetros	Sêmen "in natura"		Sêmen descongelado	
	Anormalidade primária		Anormalidade primária	
	Correlação	Probabilidade	Correlação	Probabilidade
Larva morta	0,42	(P=0,06)	0,44	(P=0,08)

P=probabilidade

Estudos com humanos desenvolvidos por Daniels (2008) descobriram que 60% dos problemas de saúde e das debilidades verificadas em neonatos tinham origem desconhecida. A pesquisadora relatou que os excessos de consumo de álcool, tabaco e drogas ilícitas afetam a qualidade do esperma, ocorrendo assim alterações na produção dos espermatozoides, levando a transmissão com risco e os eventuais problemas a afetar os neonatos. Neste estudo, supõe-se que as anormalidades espermáticas levaram um aumento na porcentagem de larvas mortas, sugerindo que espermatozoides com defeitos levaram a formação de larvas debilitadas e assim ocasionando sua morte logo após a eclosão.

### Conclusão

O processo de congelamento provocou alterações nos parâmetros quali-quantitativos, incluindo a morfologia espermática no sêmen de *Piaractus mesopotamicus*, levando a uma alteração na taxa de fertilização e eclosão, mas não na porcentagem de larvas defeituosas.

As correlações encontradas podem auxiliar na avaliação prévia do sêmen e por consequência dos machos. Pois os animais com índices menores de anormalidades espermáticas possuem uma motilidade progressiva e sua duração mais elevada, possivelmente ocasionando uma maior taxa de fertilização.

### Literatura Citada

Alvariño, J.R.M. **Inseminación artificial como base de la cunicultura industrial**. Leon: Overejo, 1998.

- Billard, R.; Cosson, J.; Crim, L.W. et al. Broodstock management and seed quality-general considerations. In: Bromage, N.; Roberts, R.J. (Eds). **Broodstock management and egg larval quality**. Oxford: Blackwell Science, 1995, p.1-24.
- Bromage N.R.; Roberts, R.J. (Eds) **Broodstock management and egg and larval quality**. Oxford: Blackwell, 1995. p.1-424.
- 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.
- Colégio Brasileiro de Reprodução Animal – CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal**. 2.ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49p.
- Cosson, J.; Billard, R.; Cibert, C. et al. Ionic factors regulating the motility of fish sperm. In: Gagnon, C. (Ed.) **The male gamete: from basic science to clinical applications**. Viena: Cache River Press, 1999. p.162-186.
- Daniels, C. [2008]. Espermatozóide Drogado. Disponível em: < HTTP://www.gnosisonline.org/forum - gnosis/viewtopic.php.> Acesso em: 05/02/2009.
- Holt, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, Londres, v.62, n.1-3, p.3-22, 2000.
- Horváth, Á., Urbányi, B. The effect of cryoprotectants on the motility and fertilizing capacity of cryopreserved African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) sperm. **Aquaculture Research**, v.31, p.317–324, 2000.
- Kavamoto, E.T.; Barnabe, V.H.; Campos, B.E.S. et al. Anormalidades morfológicas nos espermatozoides do curimatá, *Prochilodus lineatus* (Steindachner, 1881) (Osteichthyes, Characiformes, Prochilodontidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, v.25, n.1, p.61-66, 1999.
- Lahnsteiner, F.; Berger, B.; Weismann, T. et al. Determination of semen quality of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by sperm motility, seminal plasma parameters, and spermatozoa metabolism. **Aquaculture**, v.163, p.163–181, 1998.
- Linhart, O.; Rodina, M.; Cosson, J. Cryopreservation of Sperm in Common Carp *Cyprinus carpio*: Sperm Motility and Hatching Success of Embryos. **Cryobiology**, v.41, p.241–250, 2000.
- Maria, A.N.; Murgas, L.D.S.; Silva, M.O.B.; Miliorini, A.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, n.1, p.191-194, 2004.
- Maria, A.N.; Viveiros, A.T.M.; Freitas, R.T.F. et al. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. **Aquaculture**, v.260, p.298–306, 2006.
- Marques, S. **Preservação a curto prazo do sêmen de Teleósteos Neotropicais de água doce**. Dissertação (Mestrado em Zoologia) - Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001. 83p.
- Mello, C.B.M.; Murgas, L.D.S.; Silva, M.O.B. et al. Teste de fertilização de sêmen do pacu (*Piracatus mesopotamicus*), criopreservação com vários tipos de diluentes. In: Simpósio Brasileiro de Aquicultura, 10., 1998, Recife. **Resumos...** Recife: 1998. p.270.



- Miliorini, A.B.; Murgas, L.D.S.; Viveiros, A.T.M. et al. Resfriamento do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) à 4°C, utilizando diferentes concentrações de dimetilsulfóxido. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, n.3, p.209-211, 2002.
- Mojica, C.A.P. **Análise ultraestrutural e avaliação do sêmen de peixes neotropicais, *Brycon orbignyanus*, *Rhamdia quelen* e *Brycon hilarii* (Pisces, Teleostei).** Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista Centro de Aquicultura da UNESP, 2004. 82p. (Dissertação de mestrado) - Centro de Aquicultura da UNESP, 2004. 82p.
- Otémé, Z.J.; Nunez-Rodrigues, J.; Kouassi, C.K. et al. Testicular structure, spermatogenesis and sperm cryopreservation in the African clariid catfish *Heterobranchus longifilis* (Valenciennes, 1840). **Aquaculture Research**, v.27, p.805-813, 1996.
- Richardson, G.F.; Crim, L.W.; Yao, Z. et al. **Cryopreservation of yellowtail flounder (*Pleuronectes ferrugineus*) semen.** In: Proc. Ed.5 Int. Symp. Reproductive Physiology of Fish. Goetz F. W., Thomas P. (eds), Austin. 1995, 136p.
- 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, n.1, p.60-63, 1988.
- Sanches, E.A.; Baggio, D.M.; Bombardelli, R.A. et al. Fertilização artificial de ovócitos de pacu *Piaractus mesopotamicus* por meio de diferentes relações espermatozoide.ovócito<sup>-1</sup>. In: Congresso Brasileiro de Produção de Peixes Nativos de Água Doce, 1., 2007, Dourados, **Anais...Dourados**, Embrapa Agropecuária Oeste, 2007. CD-ROM.
- Silveira, W.F.; Kavamoto, E.T.; Cestarolli, M.A. et al. Avaliação espermática, preservação criogênica e fertilidade do sêmen do pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), proveniente de reprodução induzida. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.17, p.1-13, 1990.
- Sorensen Jr., A.M. **A laboratory for animal reproduction.** 4.ed. Massachusetts: American Press, 1979, p.153.
- Streit Jr., D.P.; Benites, C.; Moraes, G.V. et al. Sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) criopreservado com diluentes utilizados para sêmen de suínos. **Ciência Animal Brasileira**, v.7, n.3, p.289-297, 2006.
- Streit Jr., D.P.; Moraes, G.V.; Ribeiro, R.P. et al. Avaliação de diferentes técnicas para coloração de sêmen de peixes. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar**, v.7, p.157-162, 2004.
- Streit Jr., D.P.; Ribeiro, R.P.; Moraes, G.V. et al. Sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) submetido ao resfriamento ao longo do tempo com diferentes meios diluidores. **Revista Biociências**. Taubaté, v.13, n.3-4, p.178-187, 2007.
- Streit Jr., D.P.; Sirol, R.N.; Ribeiro, R.P. et al. Parâmetros qualitativos do sêmen de dourado (*Salminus maxillosus*) em cativeiro. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.34, n.3, p.337 – 344, 2008.
- Suquet, M.; Dreanno, C.; Petton, B. et al. Long-term effects of the cryopreservation of turbot (*Psetta maxima*) spermatozoa. **Aquatic Living Resources**, v.11, p.45-48, 1998.

- Taddei, A.R.; Barbato, F.; Abelli, L. et al. Is cryopreservation a homogeneous process? Ultrastructure and motility of untreated, prefreezing, and postthawed spermatozoa of *Diplodus puntazzo* (Cetti). **Cryobiology**, v.42, n.4, p.244-255, 2001.
- Tiersch, T. Cryopreservation of fish sperm: Laboratory, hatchery and field studies of twenty species. In July Goetz, F.W. and Thomas, P. (Eds.) **Proceedings of the Fish International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish**. University of Texas At Austin – Austin, Texas, 1995. p.2-8.
- Wojnarovich, E.; Horváth, L. **A propagação artificial de peixes de águas tropicais: manual de extensão**. Brasília: Escopo, 1983. 220p.
- Yao, Z.; Crim, L.W.; Richardson, G.F. et al. Motility, fertility and ultrastructural changes of ocean pout (*Macrozoarces americanus* L.) sperm after cryopreservation. **Aquaculture**, v.181, p.361-375, 2000.
- 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.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A qualidade espermática é influenciada pelo processo de congelamento, incluindo a morfologia espermática no sêmen de *P. mesopotamicus*, levando a uma alteração na taxa de fertilização e eclosão.

Quando separado em grupos de “fêmeas boas e ruins” conforme a taxa de fertilização apresentada, os parâmetros seminais não possuem grande influência na taxa de fertilização e eclosão. Todavia, a incidência de espermatozoides com cauda quebrada provocou uma redução na taxa de fertilização e eclosão após a utilização do sêmen que fertilizou os óvulos das fêmeas consideradas “ruins”.

Quanto às correlações encontradas, conclui-se que estas podem auxiliar na avaliação prévia do sêmen e por consequência dos machos. Animais com índices menores de anormalidades espermáticas possuem uma motilidade progressiva e sua duração mais elevada, possivelmente ocasionando uma maior taxa de fertilização. Além disso, se a qualidade dos óvulos não for boa, para que ocorra uma melhor taxa de fertilização, a qualidade do sêmen precisa apresentar bons indicadores dos parâmetros. A qualidade seminal passa a ser primordial se não utilizar óvulos de boa qualidade.