



Ultraestrutura e criopreservação de sêmen de jundiá amazônico (*Leiarius marmoratus*) em cativeiro

[Ultrastructure and sperm cryopreservation of the amazon catfish (*Leiarius marmoratus*) in captivity]

A.M. Borges, K.O. Araújo, I. Pivato, R.D. Navarro

Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária - Universidade de Brasília - Brasília, DF

RESUMO

Os objetivos do presente estudo foram analisar a ultraestrutura do espermatozoide do jundiá amazônico e avaliar a sua criopreservação com três agentes crioprotetores (metanol 10%, DMSO 10% e etilenoglicol 10%) e duas soluções ativadoras (NaCl 0,29% e NaHCO₃ 1%). Como diluente, foi utilizada uma solução de glicose a 5%, sendo o sêmen envasado em palhetas de 0,25mL e congelado em vapor de nitrogênio (botijão *dry shipper*). No sêmen fresco, o espermatozoide apresentou comprimento de 25,46±2,54µm, cabeça esférica (1,51±0,18µm), ausência de acrossoma, peça intermediária com formato cônico (0,93±0,17µm), ligeiramente assimétrica, com presença de vesículas, e flagelo único (21,48±2,45µm). O sêmen descongelado apresentou valores mais altos (P<0,05) para duração, vigor e taxa de motilidade espermática com os crioprotetores metanol 10% e DMSO 10%. A duração da motilidade espermática foi maior (P<0,05) com o ativador NaHCO₃ 1% (21-96 s). O sêmen de *Leiarius marmoratus* criopreservado com DMSO e metanol apresentou, respectivamente, 7,32±4,21% e 8,94±6,69% de taxa de motilidade. No entanto, os resultados não foram satisfatórios para estabelecer um protocolo para a espécie.

Palavras-chave: siluriforme, congelamento, espermatozoide, crioprotetor

ABSTRACT

The aims of this study were to describe the spermatozoon ultrastructure and to evaluate the sperm cryopreservation of the amazon catfish with three cryoprotectant agents (10% methanol, 10% DMSO, and 10% ethylene glycol) and two activator agents (0.29% NaCl and 1% NaHCO₃). Glucose 5% extender was used as a diluent solution and sperm loaded in 0.25 straws was frozen in nitrogen vapor (*dry shipper*). Fresh spermatozoon was 25.46±2.54µm long, the head was spherical (1.51±0.18µm) with no acrosome, the midpiece was cone shaped (0.93±0.17µm) with presence of vesicles, slightly asymmetric, and the flagellum was single (21.48±2.45µm). Post-thawed semen presented higher values (P< 0.05) for duration, vigor and sperm motility rate with cryoprotectants 10% methanol and 10% DMSO. The duration of sperm motility was longer (P< 0,05) when triggered in 1% NaHCO₃ (96-21 s). *Leiarius marmoratus* semen cryopreserved with DMSO and methanol, presented respectively 7.32±4.21% and 8.94±6.69% of motility. However, the results were not satisfactory to establish a protocol for the specie.

Keywords: siluriform, freezing, spermatozoon, cryoprotectant

INTRODUÇÃO

O jundiá amazônico (*Leiarius marmoratus*) é um peixe siluriforme da família Pimelodidae, nativo das bacias dos rios Amazonas e Orinoco. Na aquicultura, apresenta boas características zootécnicas, como qualidade da carne, rusticidade e aceitação de rações secas, e é utilizado em cruzamentos interespecíficos com

outros bagres (*Pseudoplatystoma* sp.) na produção comercial (Cruz-Casallas *et al.*, 2011; Bernardes *et al.*, 2016; Saint-Paul, 2017). Quanto à sua reprodução, é uma espécie de hábitos migratórios, sendo necessária a indução hormonal para a obtenção dos gametas em cativeiro. Uma das características dos machos é a pequena quantidade de sêmen produzida, com grande dificuldade na sua coleta (Mira-Lopez *et al.*, 2010; Viveiros, 2011; Araújo *et al.*, 2014).

Recebido em 3 de abril de 2018

Aceito em 27 de março de 2019

E-mail: adalmyr.borges@emater.df.gov.br

A criopreservação de sêmen de peixes é uma importante ferramenta tanto para o desenvolvimento de programas de melhoramento genético como para a conservação de recursos genéticos em bancos de germoplasma (Carosfeld *et al.*, 2003; Martínez-Páramo *et al.*, 2017). Existem poucos estudos sobre as características morfológicas do sêmen e sua conservação na espécie (Mira-Lopez *et al.*, 2010; Araújo *et al.*, 2014; Galo *et al.*, 2014; Navarro e Pivato, 2016). No jundiá amazônico, esse é o primeiro relato da criopreservação de sêmen e das características ultraestruturais do espermatozoide, aspectos relevantes que podem contribuir para a definição de protocolos e de padronização das etapas essenciais para que a técnica seja acessível em escala nas fazendas de criação de peixes. O desenvolvimento da técnica para o sêmen do jundiá amazônico vai auxiliar na manutenção da variabilidade genética e, ao mesmo tempo, na sincronização dos cruzamentos interespecíficos.

No congelamento dos espermatozoides, são utilizados meios contendo agentes crioprotetores permeáveis e não permeáveis à membrana celular, sendo a glicose a 5% o crioprotetor não permeável mais utilizado em peixes (Carosfeld *et al.*, 2003; Garcia *et al.*, 2016; Elliot *et al.*, 2017). Os crioprotetores permeáveis mais empregados são o metanol e o dimetilsulfóxido (DMSO), geralmente na concentração de 10%, e, em menor escala, o etilenoglicol (Viveiros, 2011; Murgas *et al.*, 2014; Asturiano *et al.*, 2017). Na avaliação da qualidade do sêmen, o uso de soluções ativadoras pode aumentar a intensidade e a duração dos movimentos, em função da redução dos impactos osmóticos (Murgas *et al.*, 2014; Viveiros *et al.*, 2016). As soluções de cloreto de sódio (NaCl a 0,29%) e bicarbonato de sódio (NaHCO₃ a 1%) são mais utilizadas, variando a sua eficiência de acordo com as espécies de peixes (Carosfeld *et al.*, 2003; Garcia *et al.*, 2016). Objetivou-se analisar a ultraestrutura e a morfometria do espermatozoide do jundiá amazônico e avaliar a sua resistência à criopreservação.

MATERIAL E MÉTODOS

A coleta de sêmen foi realizada durante o terço final da estação reprodutiva, em fevereiro de 2016, nas instalações da piscicultura Cia. do Peixe, localizada no município de Cidade Ocidental, estado de Goiás, de acordo com o

protocolo nº 147533/2015 do Comitê de Ética da Universidade de Brasília. Os machos de jundiá amazônico, com idade entre 36 e 48 meses, mantidos em viveiros de terra, foram selecionados observando-se sinais de maturação sexual, como a região ventral escurecida e a papila urogenital hiperêmica. Os animais selecionados (n= 6 machos) foram medidos, pesados e submetidos à indução hormonal com dosagem única intramuscular de 3,0mg de extrato bruto de hipófise de carpa (Danúbio Aquacultura, Brasil) por kg de peso vivo. Os machos foram mantidos em tanques, com temperatura da água de 26,5±1,0°C. Após 12 horas, a papila urogenital dos peixes foi limpa e seca, e os animais foram massageados na região ventral no sentido craniocaudal para a liberação do sêmen. A coleta do sêmen foi feita em tubos plásticos graduados, com cuidado para evitar a contaminação com água, urina e fezes. Em seguida, 5µL de sêmen de cada amostra foram colocados em lâmina e avaliados quanto à ativação prévia, em microscópio óptico (Zeiss, Alemanha), no aumento de 400 vezes. As amostras com a presença de espermatozoides móveis foram descartadas.

Para cada amostra selecionada, imediatamente após a coleta, 1µL de sêmen, adicionado de 25µL de solução de NaHCO₃ a 1%, foi colocado em lâmina de vidro, coberta com lamínula em microscópio óptico (Zeiss, Alemanha,) no aumento de 400 vezes. Foi realizada a avaliação da motilidade, do vigor espermático e da duração da motilidade. A motilidade foi calculada em percentual de espermatozoides com movimentos progressivos observados em pelo menos três campos, o vigor espermático com uma escala visual de 0 (sem movimento) a 5 (movimento rápido), e a duração da motilidade foi medida em segundos, metodologia adaptada da utilizada por Viveiros *et al.* (2012).

Na análise da morfologia e da concentração espermática, 10µL de cada amostra de sêmen fresco foram fixados em 990µL de solução de formol salina a 4%. Para o cálculo das anormalidades morfológicas, 5µL de sêmen fixado foram colocados em lâmina de vidro, com adição de 25µL do corante rosa bengala a 4%, coberta por lamínula em preparação úmida, sendo avaliados 200 espermatozoides por lâmina em microscópio óptico (Zeiss, Alemanha) no aumento de 1.000 vezes, metodologia adaptada

da que foi proposta por Miliorini *et al.* (2011). O cálculo da concentração espermática foi feito por meio da contagem das células na câmara de Neubauer (New Optics, Alemanha), expresso em número de células por mL.

Para a análise da ultraestrutura e morfometria, 50µL de cada amostra de sêmen fresco foram fixados em solução de Karnovsky com glutaraldeído a 2,5%, por 24 horas, a 4°C, pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1%, por 30 minutos, em temperatura ambiente, e desidratados em série crescente de acetona (50, 75, 90 e 100%). Uma parte das amostras passou pela secagem com dióxido de carbono líquido, em aparelho de ponto crítico (Balzers CPD-20, Liechtenstein), e foi coberta com ouro 10nm em metalizador (Balzers MED-010, Liechtenstein). O material foi observado em microscópio eletrônico de varredura (Jeol JSM-7000F, Japão) e as imagens digitais foram analisadas com o aplicativo ImageJ. Foram mensurados 25 espermatozoides de cada animal (n=150 espermatozoides) quanto aos parâmetros de comprimento e largura da cabeça, comprimento da peça intermediária, comprimento da cauda e comprimento total. A outra parte das amostras foi contrastada com ferrocianeto de potássio a 1,6% e acetato de uranila a 3%, incluída em resina Epóxi Spurr, e cortada em seções ultrafinas de 50 a 70nm em ultramicrótomo (Leica EM-UC7, Áustria). Os cortes ultrafinos foram analisados e fotografados em microscópio eletrônico de transmissão (Jeol JEM-1011, Japão).

Para o processo de congelamento, foram utilizadas as amostras de seis machos (n=6), que apresentaram taxa de motilidade acima de 70% e ausência de ativação prévia. Como meio de congelamento, foi utilizada uma solução de glicose a 5% (crioprotetor não permeável), acrescentada com três diferentes agentes crioprotetores permeáveis: dimetilsulfóxido-DMSO (Sigma, EUA), etilenoglicol-EG (Dinâmica, Brasil) e metanol-MeOH (Dinâmica, Brasil). As amostras de sêmen foram diluídas na proporção de 10% de sêmen, 80% de solução diluidora e 10% de crioprotetor (DMSO 10%, EG 10% e MeOH 10%), envasadas em palhetas plásticas de 0,25mL (Minitube, Alemanha), seladas com álcool polivinílico em pó (Minitube, Alemanha) e mantidas por 10 minutos em equilíbrio a 4°C. Na sequência, as amostras

foram congeladas em botijão de vapor de nitrogênio (CryoFarm YDH-3/50, Itália) a uma taxa de 35°C min⁻¹. Depois de 24 horas, as amostras foram transferidas para botijão de nitrogênio líquido (MVE Millennium 2000 XC-20, EUA), em temperatura de -196°C, onde foram mantidas até a análise das amostras. No total, foram congeladas 72 palhetas, sendo seis machos, três crioprotetores e quatro palhetas réplicas por tratamento.

Após 180 dias, as palhetas contendo o sêmen criopreservado foram descongeladas em banho-maria com água a 40°C, por 12 segundos. Para a avaliação das taxas de motilidade, vigor espermático e duração da motilidade do sêmen pós-descongelamento, foram utilizados dois agentes ativadores, a solução de bicarbonato de sódio (NaHCO₃ a 1%) e a solução de cloreto de sódio (NaCl a 0,29%). Para cada uma das amostras, foram utilizados os dois ativadores, na proporção de 1:25 (sêmen:ativador), repetindo-se os procedimentos feitos para o sêmen fresco. Na análise da morfologia espermática, 10µL de cada amostra de sêmen descongelado foram diluídos em 90µL de solução fixadora de formol salina a 4%, repetindo-se os mesmos procedimentos feitos para o sêmen fresco.

O delineamento experimental foi em blocos inteiramente ao acaso, em esquema fatorial. A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa SAS University Edition (SAS Institute, EUA). Todos os valores foram testados quanto à distribuição normal dos resíduos, utilizando-se o teste de Shapiro-Wilk. Os valores em porcentagem foram transformados pela raiz quadrada do arcosseno. Os valores de motilidade, duração de motilidade, morfologia e diferenças entre tratamentos (crioprotetores e ativadores) foram testados pela análise de variância (GLM) seguida pelo teste de Tukey. Os valores de vigor espermático foram testados com análise não paramétrica, por meio do teste de Friedman. Para todos os testes estatísticos, foi utilizado o nível de significância de 5%.

RESULTADOS

As características corporais e espermáticas dos machos de *Leiarius marmoratus* utilizados no experimento estão descritas na Tab. 1. As amostras de sêmen fresco apresentaram coloração branca, baixa viscosidade e pequeno volume.

Tabela 1. Peso corporal, comprimento e características do sêmen fresco em jundiá amazônico (*Leiarius marmoratus*) mantido em cativeiro

Características (n=6)	Média±desvio-padrão	Mínimo	Máximo
Peso corporal (g)	1.560±158	1.420	1.785
Comprimento total (cm)	56,8±2,1	53	59
Volume de sêmen (mL)	0,66±0,28	0,3	1,0
Concentração (células x 10 ⁹ mL ⁻¹)	2,508±2,156	1,165	6,68
Espermatozoides normais (%)	84,08±4,27	78	89
Taxa de motilidade (%)	84,22±4,91	75	90
Vigor da motilidade (0-5)	3,25±0,41	3	4
Duração de motilidade (s)	139,80±18,72	118	165

Os espermatozoides de *Leiarius marmoratus* apresentaram formato esférico e a ausência de acrossoma (Fig. 1-A e 2-A). A cabeça tinha pequeno citoplasma e núcleo de formato esférico. No interior do núcleo, a cromatina estava homogênea e densa (Fig. 2-A). A fossa nuclear estava ausente, e o complexo centriolar e o segmento inicial do flagelo estavam localizados na base do núcleo (Fig. 2-C). A peça intermediária era curta, sem canal citoplasmático verdadeiro, apresentando formato cônico e ligeiramente assimétrica, com a presença de vesículas concentradas em uma das laterais (Fig.

1-B e 2-A). As mitocôndrias eram irregulares e alongadas, em número não superior a quatro, e estavam distribuídas em forma de anel ao longo da peça intermediária (Fig. 2-A e 2-C). Foi observada cauda única, com arranjo típico de axonemas, formado por nove pares periféricos e um par central de microtúbulos. A presença de projeções de membrana laterais não foi identificada na cauda (Fig. 1-A e 2-B). Os parâmetros morfométricos mensurados de comprimento e largura da cabeça, comprimento da peça intermediária, comprimento da cauda e comprimento total estão demonstrados na Tab. 2.

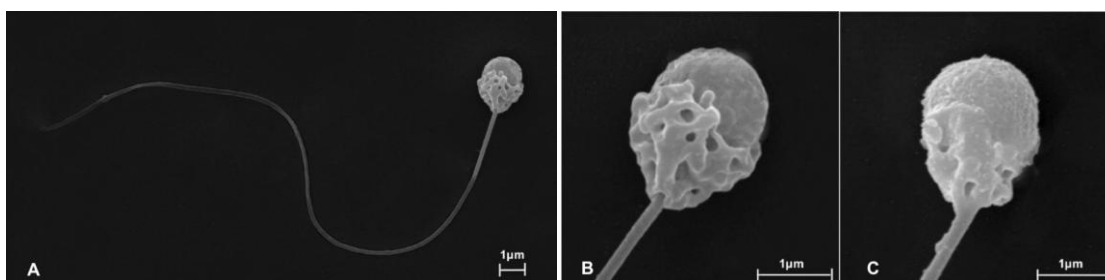


Figura 1. Espermatozoide fresco de jundiá amazônico (*Leiarius marmoratus*) em microscopia eletrônica de varredura. A- Vista geral. B- Vista frontal da peça intermediária. C- Vista lateral da peça intermediária.

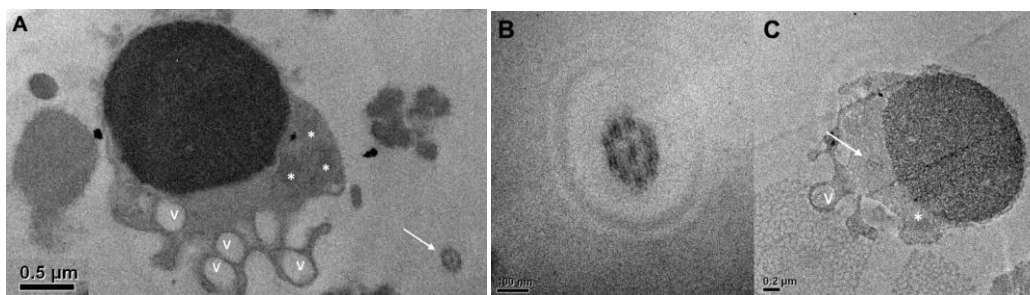


Figura 2. Espermatozoide fresco de jundiá amazônico (*Leiarius marmoratus*) em microscopia eletrônica de transmissão. A- Vista interna e detalhes da peça intermediária. B- Estrutura do flagelo com o arranjo dos axonemas. C- Base do núcleo com o início do flagelo. v- vesículas, * mitocôndrias, setas indicando os flagelos.

Tabela 2. Análise morfométrica do espermatozoide de jundiá amazônico (*Leiarius marmoratus*)

Parâmetros em μm (n=150)	Média \pm desvio-padrão
Comprimento da cabeça	1,51 \pm 0,18
Largura da cabeça	1,58 \pm 0,14
Comprimento da peça intermediária	0,93 \pm 0,17
Comprimento do flagelo	21,48 \pm 2,45
Comprimento total	25,46 \pm 2,54

Os valores das médias observadas para os parâmetros de motilidade, avaliados no sêmen descongelado, estão demonstrados na Tab. 3. Para os parâmetros de duração, vigor e taxa de motilidade espermática, os valores observados nos tratamentos que usaram os crioprotetores metanol a 10% e dimetilsulfóxido a 10% foram significativamente mais altos ($P<0,05$) quando comparados com o crioprotetor etilenoglicol a 10%. A duração da motilidade espermática observada foi significativamente maior ($P<0,05$) com a ativação com NaHCO_3 1% em comparação com a ativação com NaCl 0,29% para todos os crioprotetores.

Na avaliação morfológica, não houve diferença significativa ($P>0,05$) entre os meios de congelamento para as frequências observadas de defeitos totais, de cabeça, de peça intermediária e de cauda (Tab. 4). No entanto, as alterações morfológicas que apresentaram as maiores

frequências no sêmen descongelado foram cabeça isolada, cabeça degenerada, cauda dobrada e cauda enrolada (Fig. 3).

DISCUSSÃO

No presente estudo, os parâmetros encontrados para o sêmen fresco do jundiá amazônico após a indução hormonal (Tab. 1) estão de acordo com os dados descritos para a espécie. No entanto, os volumes obtidos, 0,3 a 1,0mL, foram menores do que os valores descritos por Mira-Lopez *et al.* (2010) e por Araújo *et al.* (2014), respectivamente, 1,59 a 2,84mL e 1,45mL. A coleta apresentou grande dificuldade, com pequenos volumes obtidos e contaminação frequente com urina. Essa característica é comum a outros siluriformes; sendo necessária, em algumas espécies, a extração dos testículos (Viveiros, 2011; Galo *et al.*, 2014; Damasceno *et al.*, 2017).

Tabela 3. Taxa, vigor e duração de motilidade em sêmen criopreservado de jundiá amazônico (*Leiarius marmoratus*) utilizando três soluções diluidoras e duas soluções ativadoras

Meios de congelamento	Soluções ativadoras	
	NaCl a 0,29%	NaHCO_3 a 1%
	<i>Taxa de motilidade (%)</i>	
Glicose 5% + MeOH 10%	8,30 \pm 5,84*	8,94 \pm 6,69*
Glicose 5% + DMSO 10%	6,86 \pm 3,55*	7,32 \pm 4,21*
Glicose 5% + EG 10%	0,65 \pm 1,53	0,85 \pm 1,81
	<i>Vigor (0-5)</i>	
Glicose 5% + MeOH 10%	1,60 \pm 0,55*	1,72 \pm 0,71*
Glicose 5% + DMSO 10%	1,45 \pm 0,63*	1,59 \pm 0,65*
Glicose 5% + EG 10%	0,20 \pm 0,38	0,25 \pm 0,50
	<i>Duração da motilidade (segundos)</i>	
Glicose 5% + MeOH 10%	87,15 \pm 25,02*	99,83 \pm 27,87*§
Glicose 5% + DMSO 10%	86,09 \pm 30,39*	96,41 \pm 33,90*§
Glicose 5% + EG 10%	14,55 \pm 25,98	21,60 \pm 38,46§

MeOH-metanol, DMSO-dimetilsulfóxido, EG-etilenoglicol; NaCl -cloreto de sódio, NaHCO_3 -bicarbonato de sódio; *diferença significativa maior na mesma coluna ($P<0,05$); § diferença significativa maior na mesma linha ($P<0,05$), pelo teste de Tukey.

Tabela 4. Morfologia espermática em sêmen criopreservado de jundiá amazônico (*Leiarius marmoratus*) utilizando três meios de congelamento

	MeOH 10%	DMSO 10%	EG 10%
	%	%	%
Normais	35,50±12,46	30,75±5,30	29,42±17,89
Defeitos totais	64,50±12,46	69,25±5,30	70,58±17,89
Defeitos cabeça	36,83±9,00	47,33±6,95	43,33±17,09
Macrocefalia	2,67±2,50	1,42±0,74	4,00±3,79
Microcefalia	3,67±2,29	7,17±3,97	2,42±1,50
Cabeça degenerada	9,50±7,40	18,25±7,49	10,17±4,89
Cabeça isolada	20,58±6,29	20,50±11,47	26,42±17,46
Defeitos peça intermediária	5,92±3,72	1,75±2,60	4,17±3,03
Peça intermediária degenerada	5,92±3,72	1,75±2,60	4,17±3,03
Defeitos cauda	21,50±5,67	20,17±7,35	23,42±8,42
Cauda fraturada	3,58±1,20	3,00±1,87	5,50±3,39
Cauda enrolada	3,83±2,09	2,50±1,18	2,83±1,51
Cauda degenerada	6,17±1,47	9,25±1,72	6,25±3,09
Cauda dobrada	7,83±2,75	5,42±4,03	8,83±6,02

MeOH-metanol, DMSO-dimetilsulfóxido, EG-etilenoglicol todos a 10% em solução de glicose a 5%. Os resultados não apresentaram diferença significativa ($P>0,05$), para os parâmetros normais e os diferentes defeitos entre os crioprotetores utilizados, pelo teste de Tukey.

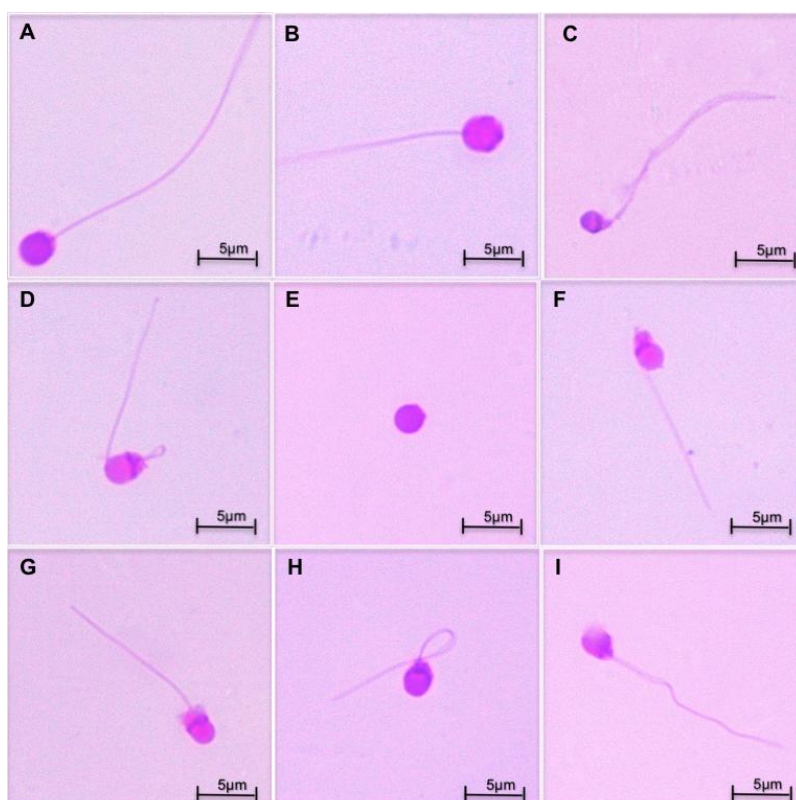


Figura 3. Anormalidades morfológicas em sêmen do jundiá amazônico pós-descongelamento: A- espermatozoide normal; B- macrocefalia; C- microcefalia e cauda degenerada; D- cauda fortemente enrolada; E- cabeça isolada; F- cauda fraturada; G- peça intermediária degenerada; H- cauda dobrada; I- cabeça e cauda degeneradas.

A concentração espermática ficou bem próxima dos valores observados por Araújo *et al.* (2014), $3,13 \times 10^9 \text{ mL}^{-1}$, e Navarro e Pivato (2016), $1,79 \times 10^9 \text{ mL}^{-1}$, e dentro da faixa mais ampla, $1,87-6,30 \times 10^9 \text{ mL}^{-1}$, registrada por Mira-López *et al.* (2010). A motilidade espermática observada no sêmen fresco de 84% foi semelhante à maioria dos relatos (Mira Lopez *et al.*, 2010; Galo *et al.*, 2014; Navarro e Pivato, 2016). Quanto à duração da motilidade, Mira-Lopez *et al.* (2010), Araújo *et al.* (2014) e Galo *et al.* (2014) observaram valores menores, entre 52 e 110 segundos, enquanto Navarro e Pivato (2016) registraram valores médios de 318 segundos. A frequência de espermatozoides com anormalidades observadas foi de 15,92%, semelhante à descrita por Araújo *et al.* (2014), de 12,57%, enquanto Galo *et al.* (2014) e Navarro e Pivato (2016) relataram frequências maiores, respectivamente, 26 e 44%.

As variações encontradas para o sêmen fresco do jundiá amazônico estão relacionadas ao baixo grau de domesticação dos reprodutores utilizados. Entre os peixes neotropicais migratórios, esse é um dos fatores que influenciam na qualidade seminal, em conjunto com o uso de indução hormonal e o período da estação reprodutiva (Viveiros, 2011; Araújo *et al.*, 2014; Murgas *et al.*, 2014; Martínez-Páramo *et al.*, 2017). Os espermatozoides dos peixes siluriformes são bem semelhantes morfologicamente, com cabeça pequena de formato esférico ou ovoide, sem acrossoma, peça intermediária de formato variável, podendo apresentar vesículas, e a cauda uni ou biflagelada (Quagio-Grassiotto e Oliveira, 2008). No presente estudo, os espermatozoides do jundiá amazônico (*Leiarius marmoratus*) apresentaram características que indicam a sua classificação como tipo “aquasperm”, sendo a cabeça arredondada com comprimento de $1,51 \mu\text{m}$ e largura de $1,58 \mu\text{m}$, sem acrossoma, e com cauda única medindo $21,48 \mu\text{m}$. Valores maiores foram descritos por Viveiros *et al.* (2012) e Murgas *et al.* (2017) para outros peixes neotropicais, respectivamente, para diâmetro da cabeça e comprimento da cauda, $2,06$ e $26,46 \mu\text{m}$ em curimatá (*Prochilodus lineatus*), $1,88$ e $27,03 \mu\text{m}$ em dourado (*Salminus brasiliensis*), $2,19$ e $26,46 \mu\text{m}$ em pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e em piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) e $2,00$ e $30,90 \mu\text{m}$ em pirapitinga (*Brycon nattereri*).

A morfologia dos espermatozoides está relacionada à estratégia reprodutiva da espécie. Nos siluriformes, Melo *et al.* (2011) demonstraram que o formato alongado está presente nos peixes de reprodução interna, enquanto os formatos arredondado ou esférico estão presentes nos peixes de reprodução externa, em ambientes pelágicos ou demersais, caso do jundiá amazônico (*Leiarius marmoratus*).

Na análise da estrutura interna, o espermatozoide do jundiá amazônico apresentou um núcleo esférico com cromatina homogênea. Foi observada também a ausência da fossa nuclear e de canais citoplasmáticos, que são características singulares dos siluriformes pimelídeos, decorrentes da espermiogênese tipo III, observada nessa família de peixes. Nesse tipo de espermiogênese, o núcleo não sofre rotação e o eixo da cauda se mantém central em relação ao núcleo, não sendo formados os canais citoplasmáticos e a fossa nuclear (Quagio-Grassiotto e Oliveira, 2008; Melo *et al.*, 2017). A peça intermediária apresentou formato cônico, com comprimento de $0,93 \mu\text{m}$, envolvendo a base da cabeça, com várias vesículas, e a presença de duas a quatro mitocôndrias dispostas em forma de anel, sendo o formato e a descrição compatíveis com os achados em peixes siluriformes (Quagio-Grassiotto e Oliveira, 2008; Melo *et al.*, 2017). Em peixes caraciformes, geralmente a peça intermediária é maior ($3,41$ a $1,61 \mu\text{m}$), sem a presença de vesículas, com número variável de mitocôndrias, sendo mais longa e de formato cilíndrico (Viveiros *et al.*, 2012; Murgas *et al.*, 2017).

Foi observada uma cauda única, sem a presença de projeções laterais de membrana, com o arranjo interno dos axonemas típico de nove pares de microtúbulos periféricos e um par central. Esse é um formato frequente observado nos peixes de água doce, embora algumas espécies apresentem alterações na membrana com a presença de anéis concêntricos, projeções laterais de membrana ou a presença de uma aleta na porção final do flagelo (Quagio-Grassiotto e Oliveira, 2008; Viveiros *et al.*, 2012; Melo *et al.*, 2017). No entanto, essas modificações de membrana não foram observadas nos espermatozoides de jundiá amazônico (*Leiarius marmoratus*).

No presente estudo, para o sêmen criopreservado, as taxas de motilidade espermática mais altas ($P < 0,05$) foram observadas com o metanol a 10% ($8,94 \pm 6,69\%$) e o DMSO a 10% ($7,32 \pm 4,21\%$), o que mostra que o etilenoglicol a 10% foi o menos eficiente na proteção dos espermatozoides. No entanto, houve uma redução da taxa de motilidade na comparação com o sêmen fresco ($84,2 \pm 4,9\%$), o que demonstra também que a solução de glicose a 5%, agindo como crioprotetor não permeável, não conseguiu atuar de maneira adequada na desidratação celular, no aumento da viscosidade do meio e na estabilização das membranas celulares antes do processo de congelamento. Por sua vez, os crioprotetores permeáveis também possuem atuação nas propriedades coligativas tanto no meio intracelular como no extracelular e também podem atuar na estabilização das membranas celulares (Garcia et al., 2016; Elliott et al., 2017).

O metanol possui menor peso molecular e permeabilidade celular mais rápida quando comparado com DMSO e etilenoglicol (Elliott et al., 2017). Em bagre africano (*Clarias gariepinus*), foi demonstrado que, em concentrações acima de 15%, o metanol foi menos tóxico do que o DMSO (Viveiros, 2011), e, em carpas comuns (*Cyprinus carpio*), o etilenoglicol apresentou melhores resultados na proteção dos espermatozoides do que o DMSO (Li et al., 2010). No entanto, o DMSO é o agente crioprotetor mais utilizado na criopreservação de sêmen de peixes de água doce, mas a escolha da combinação entre os agentes crioprotetores permeáveis e não permeáveis é bem variável (Murgas et al., 2014; Garcia et al., 2016), sendo difícil separar os efeitos tóxicos dos crioprotetores, dos seus efeitos osmóticos sobre as células (Elliott et al., 2017).

A osmolaridade e a presença de íons no ambiente aquático são os principais fatores envolvidos na ativação e na duração da motilidade e influenciam o período de fertilidade dos espermatozoides de peixes (Cosson, 2010; Viveiros et al., 2016). No estudo atual, as soluções ativadoras não apresentaram diferenças ($P > 0,05$) sobre a motilidade e o vigor do sêmen criopreservado. Mas a duração da motilidade foi mais longa ($P < 0,05$) quando as amostras foram ativadas com NaHCO_3 a 1% (21-99s), comparada com a ativação com NaCl a 0,29%

(14-87s). As diferenças observadas estão relacionadas às diferenças na osmolaridade das soluções, de 80mOsm kg^{-1} em NaCl a 0,29%, e de 220mOsm kg^{-1} em NaHCO_3 a 1%. Resultados semelhantes foram observados em sêmen de criopreservado de pirapitinga (*Brycon nattereri*), com a taxa de motilidade igual para as duas soluções, e a duração maior com NaHCO_3 a 1% (Viveiros et al., 2012). Os crioprotetores também apresentaram diferenças ($P < 0,05$) sobre a duração da motilidade, sendo esta mais longa com o metanol (87-99s) e o DMSO (86-96s) em comparação ao etilenoglicol, que apresentou a menor duração (14-21s). Apesar da diminuição observada em relação ao sêmen fresco, a duração obtida para o metanol e o DMSO é suficiente para que os espermatozoides alcancem a micrópila dos oócitos e ocorra a fecundação (Viveiros et al., 2012; Garcia et al., 2016).

No presente estudo, a análise morfológica não apresentou diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os tratamentos para defeitos de cabeça, peça intermediária e cauda, sendo mais frequentes, após a criopreservação, os defeitos observados na região da cabeça. No entanto, as anormalidades totais observadas aumentaram de 15,8% no sêmen fresco para 64,5 e 69,25% no criopreservado, respectivamente, para metanol e DMSO. Assim, ficou demonstrado que os crioprotetores utilizados conseguiram proteger apenas parcialmente as células dos danos físicos e osmóticos causados pelo processo de congelamento e descongelamento.

Em outro estudo, com o sêmen fresco de jundiá amazônico resfriado a 13°C por sete horas, o total dos defeitos passou de 27 para 37%, sendo observado que, quando os defeitos aumentaram, ocorreu a diminuição da motilidade progressiva (Galo et al., 2014). Em curimba (*Prochilodus lineatus*), com diluidores compostos por glicose e DMSO ou metanol, a quantidade de anormalidades aumentou de 3 para 29,5%, com maior quantidade de defeitos de cauda para o metanol, no entanto sem efeitos sobre a taxa de fertilização em comparação com o sêmen fresco (Miliorini et al., 2011). As variações da morfologia e motilidade espermática observadas nos trabalhos estão relacionadas às formas de ação dos crioprotetores, bem como às características de cada espécie, como o perfil lipídico da membrana celular e a resposta das

células ao estresse osmótico (Browne *et al.*, 2015; Garcia *et al.*, 2016; Elliott *et al.*, 2017).

CONCLUSÃO

Os espermatozoides do jundiá amazônico têm o mesmo padrão morfométrico e estrutural observado em peixes da família Pimelodidae, com destaque para a peça intermediária cônica levemente assimétrica e a presença de vesículas. O sêmen fresco, mesmo obtido com indução hormonal, tem concentração, motilidade, vigor e baixo número de anormalidades. A espécie em questão é pouco domesticada, e novos estudos devem ser realizados para melhorar os resultados na criopreservação, já que é uma excelente alternativa para estocar gametas para o período de fecundação das fêmeas. A criopreservação do sêmen de jundiá amazônico pode ser feita com o uso dos crioprotetores metanol ou DMSO, associados à solução de glicose a 5%, sendo indicado o ativador de NaHCO₃ a 1%.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, J.E.X.S.; STREIT JR, D.P.; RIBEIRO, J.S.A. *et al.* Ovopel and carp pituitary extract as spawning inducers in males of the amazon catfish *Leiarius marmoratus* (Gill, 1970). *Braz. Arch. Biol. Technol.*, v.57, p.882-886, 2014.
- ASTURIANO, J.F., CABRITA, E., HORVATH, A. Progress, challenges and perspectives on fish gamete cryopreservation: a mini-review. *Gen. Comp. Endocrinol.*, v.245, p.69-76, 2017.
- BERNARDES, C.L.; NAVARRO, R.D.; GUERRA-SANTOS, B.; FORTES-SILVA, R. Effects of dietary carbohydrate/lipid ratios on growth, body composition, and nutrient utilization of hybrid catfish (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *Leiarius marmoratus*). *Rev. Colomb. Cienc. Pecu.*, v.29, p.58-65, 2016.
- BROWNE, R.K.; KAUROVA, S.A.; UTESHEV, V.K. *et al.* Sperm motility of externally fertilizing fish and amphibians. *Theriogenology*, v.83, p.1-13, 2015.
- CAROSFELD, J.; GODINHO, H.P.; ZANIBONI FILHO, E., HARVEY, B.J. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. *J. Fish Biol.*, v.63, p.472-489, 2003.
- COSSON, J. Frenetic activation of fish spermatozoa flagella entails short-term motility, portending their precocious decadence. *J. Fish Biol.*, v.76, p.240-279, 2010.
- CRUZ-CASALLAS, P.E.; MEDINA-ROBLES, V.M.; VELASCO-SANTAMARÍA, Y.M. Fish farming of native species in Colombia: current situation and perspectives. *Aquacult. Res.*, v.42, p.823-831, 2011.
- DAMASCENO, D.Z.; KRAUSE, R.A.; ADAMES, M.S. *et al.* Induced spermiation of *Pimelodus britskii* (Teleostei: Pimelodidae) during the reproductive period. *Aquacult. Res.*, v.48, p.862-874, 2017.
- ELLIOTT, G.D.; WANG, S.; FULLER, B.J. Cryoprotectants: a review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures. *Cryobiology*, v.76, p.74-91, 2017.
- GALO, J.M.; STREIT JR, D.P.; POVH, J.A. *et al.* Sperm quality of the Amazon catfish *Leiarius marmoratus* (Gill, 1870) after cold storage. *Braz. J. Biol.*, v.74, p.933-938, 2014.
- GARCIA, R.F.; STREIT JR., D.P.; CABRITA, E.; GODOY, L.C. Semen Cryopreservation in Brazilian Freshwater Fish: Advances and Main Challenges, In: MARCO-JIMENEZ, F. (Ed.). *Cryopreservation in Eukaryotes*. London: InTech, 2016 p.57-73.
- LI, P.; LI, Z.H.; DZYUBA, B. *et al.* Evaluating the impacts of osmotic and oxidative stress on common carp (*Cyprinus carpio*, L.) sperm caused by cryopreservation techniques. *Biol. Reprod.*, v.83, p.852-858, 2010.
- MARTÍNEZ-PÁRAMO, S.; HORVÁTH, A.; LABBÉ, C. *et al.* Cryobanking of aquatic species. *Aquaculture*, v.472, p.156-177, 2017.
- MELO, R.M.C.; ARANTES, F.P.; SATO, Y. *et al.* Comparative morphology of the gonadal structure related to reproductive strategies in six species of neotropical catfishes (teleostei: siluriformes). *J. Morphol.*, v.272, p.525-535, 2011.
- MELO, R.M.C.; GOMES, D.D.; MOREIRA, D.P. *et al.* Comparative morphology of the reproductive system of seven species of ostariophysan fishes from the upper Das Velhas River, Brazil. *J. Morphol.*, v.278, p.170-181, 2017.

- MILIORINI, A.B.; MURGAS, L.D.S.; ROSA, P.V. *et al.* A morphological classification proposal for curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm damages after cryopreservation. *Aquacult. Res.*, v.42, p.177- 187, 2011.
- MIRA-LOPEZ, T.M.; MEDINA, R.V.M.; CRUZ, C.P.E. Evaluación de tres protocolos hormonales para la inducción de la espermiación en yaque *Leiarius marmoratus*. *Rev. Med. Vet. Zootec.*, v.15, p.2070-2077, 2010.
- MURGAS, L.D.S.; FELIZARDO, V.O.; ANDRADE, E.S. *et al.* Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory freshwater fish. In: YAMASHIRO, H. (Ed.). *Recent Advances in cryopreservation*. London: InTech, 2014. p.59-71.
- MURGAS, L.D.S.; PAULINO, M.S.; PALHARES, P.C. *et al.* Ultrastructural and morphometric analysis of gametes in neotropical teleost fishes. *J. Fish. Sci.*, v.11, p. 6-61, 2017.
- NAVARRO, R.D.; PIVATO, I. Semen characteristics of the amazonian jundiá (*Leiarius marmoratus* GILL, 1870). *Biosci. J.*, v.32, p.1552-1558, 2016.
- QUAGIO-GRASSIOTTO, I.; OLIVEIRA, C. Sperm ultrastructure and a new type of spermiogenesis in two species of Pimelodidae, with a comparative review of sperm ultrastructure in Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi). *Zool. Anzeiger*, v.247, p.55-66, 2008.
- SAINT-PAUL, U. Native fish species boosting Brazilian's aquaculture development. *Acta Fish. Aquat. Res.*, v.5, p.1-9, 2017.
- VIVEIROS, A.T.M. Current status of sperm cryopreservation in siluriform catfishes. In: TIERSCH, T.R., GREEN, C.C. (Ed.). *Cryopreservation in aquatic species*. 2.ed. Baton Rouge, Louisiana: World Aquaculture Society, 2011. p.387-397.
- VIVEIROS, A.T.M.; LEAL, M.C.; FRANÇA, T.S. *et al.* Osmolality and composition of the activating solution affects motility of fresh and frozen *Prochilodus lineatus* sperm differently. *Anim. Reprod. Sci.*, v.173, p.73-79, 2016.
- VIVEIROS, A.T.M.; MARIA, A.N.; AMARAL, T.B. *et al.* Spermatozoon ultrastructure and sperm cryopreservation of the Brazilian dry season spawner fish pirapitinga, *Brycon nattereri*. *Aquacult. Res.*, v.43, p.546-555, 2012.