

Efeito de vitaminas e aminoácidos como suplementação da solução crioprotetora para a criopreservação do sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*)*

Effect of Vitamins and Amino Acids as Cryoprotectant Solution Supplementation for the Cryopreservation of Tambaqui Semen (*Colossoma macropomum*)

Júlia Trugílio Lopes, Mayara Setúbal Oliveira-Araújo, Renata Vieira do Nascimento, Yasmim Maia Ferreira, Assis Rubens Montenegro & Carminda Sandra Brito Salmito-Vanderley

ABSTRACT

Background: The addition of antioxidant substances to a cryoprotective solution can increase its protective capacity, shielding spermatozoa from the oxidative stress caused by the seminal cryopreservation process. However, there is no record of a seminal cryopreservation protocol of tambaqui (*Colossoma macropomum*) using antioxidants as a supplement to the cryoprotective solution. Thus, the objective of this study was to evaluate the effects of adding vitamin C, vitamin E, cysteine, and/or taurine to the seminal cryopreservation of tambaqui.

Materials, Methods & Results: Pools of semen ($n = 10$) were diluted in cryoprotective solutions supplemented with: vitamin C (T1), vitamin E (T2), vitamin C + vitamin E (T3), cysteine (T4), taurine (T5), and taurine + cysteine (T6). The control treatment (T7) was not supplemented. Diluted semen was loaded in 0.5 mL straws, frozen in a dry-shipper, stored in a cryogenic cylinder, and then thawed in a water bath (45°C for eight seconds). The quality of fresh and cryopreserved semen was evaluated by measuring total motility, progressive motility, curvilinear velocity (VCL), straight line velocity (VSL), average path velocity (VAP), linearity, and straightness using a computerized system of sperm analysis. Sperm membrane integrity parameters were analyzed using eosin-nigrosin staining, sperm morphology was assessed using pink bengal staining, and motility duration was measured by a digital timer. Data were analyzed using the statistical program SAS (2002) and the results were expressed as means \pm standard error of the mean. The results showed that, in general, there was no significant increase in seminal quality when antioxidants were added to the cryoprotective solution. The T5 treatment promoted an increase ($P < 0.05$) in progressive motility when compared to T1 ($6.33 \pm 1.14\%$ and $2.98 \pm 0.88\%$, respectively). However, it did not differ significantly ($P > 0.05$) from the other treatments. Treatments T2 and T5 presented the highest values of VCL (34.74 ± 2.58 and $33.60 \pm 1.81 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$, respectively). These were higher ($P < 0.05$) than T1 ($26.31 \pm 1.64 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) but not different ($P > 0.05$) from the T7 control ($30.87 \pm 1.49 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$). The VSL and VAP results showed that T1 presented the lowest velocity (9.89 ± 1.75 and $15.06 \pm 1.92 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$, respectively) compared to the other treatments ($P < 0.05$) that did not differ from each other. Combining the two vitamins (T3) or the two amino acids (T6) was not advantageous in relation to the use of only one of these antioxidants.

Discussion: The present study reports, for the first time, results of the addition of antioxidants to the tambaqui seminal freezing medium. The addition of taurine and vitamin E, although not significantly different from the control treatment, resulted in a tendency to increase sperm kinetics. This effect may be due to the action of taurine as a regulator of Ca^{2+} transporters, which is necessary to trigger sperm activation, and to the ability of vitamin E to scavenge reactive oxygen species produced during lipid peroxidation. On the other hand, the reduced sperm quality observed when vitamin C was used may have been related to the toxicity caused by a high concentration of this vitamin. In addition, once the safe dose of antioxidants has been exceeded, the normal physiological functions of reactive oxygen species can be inhibited. Thus, it is concluded that the use of vitamin E and taurine promotes promising results of curvilinear velocity after thawing of sperm. Therefore, these treatments are recommended, as well as more tests to determine their optimal concentrations.

Keywords: fish, reproduction, antioxidant, freezing solution, spermatozoa.

Descritores: peixe, reprodução, antioxidante, solução de congelamento, espermatozoide.

<http://dx.doi.org/10.22456/1679-9216.85810>

Received: 10 April 2018

Accepted: 13 August 2018

Published: 30 September 2018

* Article based on a Dissertation submitted by the senior author in partial fulfillment of requirements for the Doctor's Degree. Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza, CE, Brazil. CORRESPONDENCE: J.T. Lopes [juliatrugilio@gmail.com - Tel.: +55 (85) 3101-9851]. Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará (UECE). Campus do Itaperi. Av. Dr. Silas Munguba n.1700. CEP 60714-903 Fortaleza, CE, Brazil.

INTRODUÇÃO

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é um peixe reofílico, nativo da bacia amazônica, cujo aumento da demanda por sua carne faz dele a espécie nativa mais cultivada no Brasil [10]. A expansão de seu cultivo tem suscitado investimentos para o desenvolvimento de biotecnologias reprodutivas, buscando tornar sua produção mais eficiente e auxiliar na manutenção dos estoques naturais. Entre essas biotecnologias, a criopreservação seminal destaca-se por permitir o transporte de gametas masculinos entre pisciculturas e instituições de pesquisa, promovendo, assim, a variabilidade genética [12].

Contudo, o processo de criopreservação pode provocar danos às células espermáticas, como formação de cristais de gelo intracelular, choque térmico e estresse oxidativo [17,25]. As espécies reativas de oxigênio resultantes desse processo podem levar à redução da motilidade e viabilidade espermáticas, limitando a capacidade fertilizante do sêmen descongelado [2]. Assim, como forma de minimizar o problema, a suplementação das soluções criodiluidoras com antioxidantes visa conferir poder antioxidante a estas, buscando melhores resultados de qualidade espermática pós-descongelamento.

Entre os antioxidantes que já apresentaram resultados positivos na criopreservação seminal de teleostes, pode-se citar as vitaminas C (ácido ascórbico) e E (α -tocoferol), e os aminoácidos cisteína e taurina [1,6,11,14,18,19]. No entanto, não existem relatos na literatura sobre a utilização de antioxidantes na criopreservação seminal de tambaqui, incluindo os supracitados. Portanto, esse estudo objetivou avaliar os efeitos da adição de vitamina C, vitamina E, cisteína e taurina sobre a qualidade do sêmen criopreservado de tambaqui.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais experimentais e coleta seminal

Os experimentos foram realizados em Fortaleza, Ceará, Brasil. Foram utilizados 30 machos de tambaqui, do Centro de Biotecnologia Aplicada à Aquicultura – Universidade Federal do Ceará, com peso médio de cinco quilogramas, que apresentaram papila urogenital hiperêmica e liberação seminal sob leve pressão abdominal. Os animais foram induzidos hormonalmente à reprodução, por aplicação, via intra-

celomática, de 2,5 mg de extrato hipofisário de carpa por quilograma de peso vivo.

Decorridas 18 h da indução, os animais foram sedados por imersão em solução de Eugenol (Sigma-Aldrich®)¹, na proporção de 1:10:10000 (Eugenol:álcool:água) até que a perda do equilíbrio do animal (ventre voltado para cima) fosse observada. O sêmen foi coletado [20] e transportado em caixas térmicas contendo gelo, até o Laboratório de Biotecnologia da Reprodução de Peixes - Universidade Estadual do Ceará, onde as amostras foram analisadas e criopreservadas.

Criopreservação e descongelamento seminal

Foram selecionadas para a criopreservação as amostras que apresentaram motilidade total igual ou superior a 80%. As amostras selecionadas foram utilizadas na formação de 10 *pools*, cada *pool* contendo amostra seminal de três animais. As amostras de sêmen *in natura* (n = 10) foram diluídas (1:9 - sêmen:diluidor) e criopreservadas em solução de 5% de Glicose (Vetec®)² e 10% de Dimetilsulfóxido (Dinâmica®)³, suplementada com 1 mM de: vitamina C (Farmafórmula®)⁴ - T1, vitamina E (Farmafórmula®)⁴ - T2, vitamina C + vitamina E - T3, cisteína (Farmafórmula®)⁴ - T4, taurina (Farmafórmula®)⁴ - T5 ou cisteína + taurina - T6. A solução não suplementada foi utilizada como controle - T7.

O sêmen diluído foi envasado em palhetas francesas de 0,5 mL e deixado em tempo de equilíbrio por 10 min, a aproximadamente 10°C. Em seguida, as palhetas foram levadas ao *dry-shipper*, onde foram congeladas em vapor de nitrogênio (-167°C) por 15 min e, posteriormente, armazenadas em botijão de nitrogênio líquido (-196°C). Quinze dias após a criopreservação, as amostras foram descongeladas por imersão em banho-maria a 45°C por 8 s. O sêmen *in natura* e as amostras descongeladas foram avaliados quanto à cinética, integridade de membrana e morfologia espermáticas, como descrito a seguir.

Análise da cinética espermática

Para avaliar a cinética espermática, foram analisados os parâmetros duração da motilidade (s), motilidade total (%), motilidade progressiva (%), velocidade curvilínea (VCL - $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$), velocidade em linha reta (VSL - $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$), velocidade média do percurso (VAP - $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$), linearidade (LIN - %) e retilinearidade (STR - %).

As análises foram feitas utilizando o sistema de análise seminal auxiliada por computador (CASA), por meio do software *Sperm Class Analyser (SCA - Microoptics®)*⁵, usando a configuração indicada para peixes. Para isso, 1 µL de sêmen foi depositado sobre câmara de Makler, ativado com 100 µL NaCl (125 mM) e submetido imediatamente às análises. Para a análise da duração da motilidade, um cronômetro foi acionado no momento da ativação e parado quando apenas 10% dos espermatozoides permanecessem móveis.

Análise da integridade de membrana espermática

A integridade das membranas espermáticas foi avaliada utilizando o método de coloração eosina-nigrosina. Para essa análise, foram confeccionadas lâminas a partir do esfregaço de 5 µL de amostra seminal corada, na proporção 1:10:10 (sêmen:eosina:nigrosina). Utilizando microscópio de luz (400x), 200 espermatozoides por lâmina foram analisados e classificados em vivos, quando permaneciam incolores, indicando membrana íntegra; ou mortos, quando corados de rosa ou vermelho, indicando membrana rompida.

Análise da morfologia espermática

Para observar a normalidade morfológica dos espermatozoides, uma alíquota de cada amostra seminal foi fixada em solução formol-citrato a 4% na proporção de 1:10 (sêmen:fixador). O sêmen fixado foi corado com rosa bengala, na proporção de 1:10 (corante:sêmen) e foram confeccionadas, por esfregaço, duas lâminas para cada amostra seminal. Em cada lâmina foram analisados 100 espermatozoides, classificados em normais, quando não detectada nenhuma anormalidade morfológica, ou anormais, quando detectadas morfoanomalias de cabeça e/ou cauda, de acordo com metodologia adaptada [16].

Análise estatística

Os dados foram inicialmente submetidos aos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett para verificação da normalidade da distribuição dos resíduos e homogeneidade de variâncias entre os tratamentos, respectivamente. Confirmado o atendimento das exigências, realizou-se análise de variância (ANOVA), executada com auxílio do procedimento GLM do Programa SAS (2002), considerando um delineamento experimental inteiramente casualizado. Quando houve necessidade, os dados passaram por transformação, para adequarem-se à análise de variância (ANOVA). Quando verifica-

das diferenças significativas, o teste de Student-Newman-Keuls (SNK) foi aplicado para comparação das médias. Diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$ e os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão das médias.

RESULTADOS

O sêmen *in natura* apresentou $94,64 \pm 1,04\%$ de espermatozoides morfológicamente normais e $98,7 \pm 0,33\%$ de integridade de membrana. A motilidade total foi de $94,03 \pm 0,90\%$ e a duração da motilidade foi de 66 ± 4 s. Para as velocidades espermáticas, foram encontradas médias de $111,56 \pm 5,03 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$, $77,21 \pm 5,74 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ e $100,61 \pm 5,27 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ para VCL, VSL e VAP, respectivamente. Os valores de motilidade progressiva, LIN e STR foram $44,43 \pm 4,57\%$, $68,65 \pm 3,19\%$ e $76,16 \pm 2,93\%$, respectivamente.

Nas Tabelas 1 e 2 estão descritos os valores referentes ao sêmen descongelado. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos para os parâmetros motilidade total, LIN, STR, duração da motilidade, morfologia normal e integridade de membrana.

Na motilidade progressiva, T1 apresentou o menor valor encontrado ($2,98 \pm 0,88\%$), sendo inferior ($P < 0,05$) aos resultados encontrados no T5 ($6,33 \pm 1,14\%$; Tabela 1). Os demais tratamentos (T2, T3, T4 e T6) não apresentaram diferença entre si, tampouco quando comparados com T1 e T5 ($P > 0,05$; Tabela 1).

Os tratamentos T2 ($34,74 \pm 2,58 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) e T5 ($33,60 \pm 1,81 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) proporcionaram os maiores valores de VCL, sendo superiores ($P < 0,05$) ao resultado encontrado para T1 ($26,31 \pm 1,64 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$). Por outro lado, os tratamentos T3, T4 e T6 não foram diferentes entre si e não diferiram dos tratamentos supracitados ($P > 0,05$), como pode ser observado na Tabela 1.

Para VSL, os tratamentos T2, T3, T4, T5, T6 e T7 foram semelhantes entre si ($P > 0,05$), com valores compreendidos entre $14,53 \pm 2,25$ e $16,93 \pm 2,85 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ (Tabela 1). No entanto, esses resultados foram superiores ($P < 0,05$) ao encontrado para T1, que obteve média de $9,89 \pm 1,75 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ (Tabela 1).

Os resultados encontrados para VAP seguiram o mesmo padrão observado para VSL, de modo que T1 ($15,06 \pm 1,92 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) foi inferior aos demais tratamentos ($P < 0,05$), que, por sua vez, não diferiram entre si ($P > 0,05$) e cujos valores variaram de $19,63 \pm 2,37$ a $23,23 \pm 2,99 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ (Tabela 1).

Com relação aos tratamentos contendo a associação de dois antioxidantes, a combinação dos aminoácidos cisteína e taurina (T6) não apresentou diferença estatística quando comparada aos tratamentos contendo apenas cisteína (T4) ou taurina (T5). Por outro lado,

a combinação das vitaminas C e E (T3) se mostrou superior quando comparada ao tratamento contendo apenas vitamina C (T1) nos parâmetros VSL ($15,13 \pm 2,15$ e $9,89 \pm 1,75 \mu\text{m.s}^{-1}$, respectivamente) e VAP ($20,61 \pm 2,31$ e $15,06 \pm 1,92 \mu\text{m.s}^{-1}$, respectivamente).

Tabela 1. Média \pm Erro Padrão da Média da Motilidade total, motilidade progressiva, velocidade curvilinear (VCL), velocidade em linha reta (VSL), velocidade média do percurso (VAP), linearidade (LIN), retilinearidade (STR) e duração da motilidade do sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*) criopreservado em meio de congelamento suplementado com vitamina C (T1), vitamina E (T2), vitamina C + vitamina E (T3), cisteína (T4), taurina (T5) ou sem suplementação (T7).

Parâmetro	Tratamentos						
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
Motilidade total (%)	37,48 \pm 2,74	40,34 \pm 3,09	38,90 \pm 1,77	34,96 \pm 2,60	42,42 \pm 2,12	44,12 \pm 2,61	40,92 \pm 3,61
Motilidade progressiva (%)	2,98 \pm 0,88 ^B	4,84 \pm 1,07 ^{AB}	5,08 \pm 1,04 ^{AB}	5,63 \pm 1,22 ^{AB}	6,33 \pm 1,14 ^A	4,46 \pm 0,78 ^{AB}	5,21 \pm 0,80 ^{AB}
VCL ($\mu\text{m.s}^{-1}$)	26,31 \pm 1,64 ^B	34,74 \pm 2,58 ^A	31,32 \pm 2,14 ^{AB}	31,19 \pm 1,91 ^{AB}	33,60 \pm 1,81 ^A	30,24 \pm 1,88 ^{AB}	30,87 \pm 1,49 ^{AB}
VSL ($\mu\text{m.s}^{-1}$)	9,89 \pm 1,75 ^B	16,93 \pm 2,85 ^A	15,13 \pm 2,15 ^A	15,63 \pm 2,17 ^A	16,63 \pm 1,47 ^A	14,53 \pm 2,25 ^A	15,05 \pm 1,32 ^A
VAP ($\mu\text{m.s}^{-1}$)	15,06 \pm 1,92 ^B	23,23 \pm 2,99 ^A	20,61 \pm 2,31 ^A	20,83 \pm 2,23 ^A	22,75 \pm 1,69 ^A	19,63 \pm 2,37 ^A	20,55 \pm 1,45 ^A
LIN (%)	35,76 \pm 4,16	45,94 \pm 5,07	46,24 \pm 3,80	48,67 \pm 5,04	49,01 \pm 2,59	46,09 \pm 4,54	48,46 \pm 3,23
STR (%)	62,76 \pm 3,41	69,21 \pm 3,86	71,07 \pm 2,55	71,80 \pm 3,52	72,67 \pm 1,72	70,23 \pm 3,28	72,55 \pm 1,83
Duração motilidade (s)	75,00 \pm 8,57	86,10 \pm 8,45	76,80 \pm 5,33	74,30 \pm 6,72	80,30 \pm 7,01	79,33 \pm 9,19	66,50 \pm 7,60

Letras maiúsculas sobrescritas (A e B) indicam diferença ($P < 0,05$) entre os tratamentos.

Tabela 2. Média \pm erro padrão da porcentagem de espermatozoides com membrana íntegra e morfologia normal do sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*) criopreservado em meio de congelação suplementado com vitamina C (T1), vitamina E (T2), vitamina C + vitamina E (T3), cisteína (T4), taurina (T5) ou sem suplementação (T7).

Tratamento	Parâmetros	
	Integridade de membrana (%)	Morfologia normal (%)
T1	61,95 \pm 4,27	85,90 \pm 3,16
T2	64,20 \pm 3,39	88,90 \pm 2,95
T3	65,85 \pm 5,04	86,89 \pm 4,11
T4	61,95 \pm 2,82	89,20 \pm 2,11
T5	67,60 \pm 2,85	89,25 \pm 1,51
T6	65,00 \pm 2,77	89,72 \pm 1,70
T7	68,56 \pm 3,34	87,44 \pm 3,33

$P > 0,05$.

DISCUSSÃO

Este é o primeiro trabalho a descrever a aplicação de antioxidantes na criopreservação seminal de *Colossoma macropomum* e seus efeitos sobre os parâmetros cinéticos, morfológicos e de integridade de membrana. Buscou-se, assim, a partir da suplementação do meio diluidor, reestabelecer a proteção contra o estresse oxidativo no sêmen de tambaqui provocado pelo processo de criopreservação.

Uma variedade de substâncias antioxidantes já foi utilizada com sucesso na criopreservação seminal de teleósteos, entre elas a vitamina C, vitamina E, taurina e cisteína [1,11,13,14,19]. Apesar de já haver registros sobre o sucesso da utilização de antioxidantes na concentração de 1 mM na criopreservação seminal de teleósteo [14], nas condições empregadas nesse estudo, os resultados encontrados nos tratamentos suplementados com as substâncias antioxidantes foram, de modo geral, similares aos encontrados para o tratamento não suplementado. O mesmo foi relatado por outros autores, que não observaram melhora nos parâmetros cinéticos e morfológicos do sêmen criopreservado após suplementação com antioxidantes, nas espécies *Dicentrarchus labrax*, *Sparus aurata* e *Prochilodus lineatus* [6,21].

Essa ausência de diferença em relação ao tratamento não suplementado pode estar relacionada à falta de afinidade entre os antioxidantes e o sêmen da espécie estudada ou à ineficácia da concentração utilizada, pois acredita-se que o efeito da suplementação seja espécie-específico e dependente do tipo de antioxidante e da concentração deste [6]. Além disso, a alta variabilidade

das amostras biológicas, mesmo após a formação dos *pools* de sêmen, pode ter contribuído para a ausência de diferença entre os tratamentos, como também foi observado por outros autores [14].

Diferindo um pouco do padrão encontrado para os demais tratamentos, os resultados obtidos com a utilização de vitamina C foram estatisticamente inferiores ao controle nos parâmetros VSL e VAP. Essas alterações na cinética espermática podem estar relacionadas a uma falta de afinidade do sêmen dessa espécie com esse antioxidante ou a um efeito tóxico provocado por uma concentração muito elevada da vitamina C, uma vez que, ultrapassada a dose de segurança, a adição de antioxidantes pode inibir funções fisiológicas das espécies reativas de oxigênio [7]. A vitamina C é conhecida por sua atuação contra espécies reativas de oxigênio e nitrogênio por meio de reações de redução, com inibição conjunta da peroxidação lipídica [4,23], e bons resultados já foram registrados a partir de sua utilização na criopreservação seminal de peixes [1,6,11,18], contudo os resultados de sua aplicação ainda são, de modo geral, controversos [22]. Assim, novas pesquisas são necessárias, a fim de verificar a possibilidade de utilização desse antioxidante para as diversas espécies de interesse.

Com relação à vitamina E, na presente pesquisa o tratamento suplementado com essa vitamina foi capaz de manter a qualidade seminal, quando observados os parâmetros cinéticos do sêmen, diferentemente do que foi observado para *Prochilodus brevis* [1]. Em relação aos parâmetros cinéticos, esse tratamento merece destaque por apresentar uma tendência de maior VCL,

em relação ao tratamento controle. Bons resultados de VCL são importantes, uma vez que este parâmetro é altamente correlacionado à taxa de fertilização [24]. O efeito protetor da vitamina E decorre da sua capacidade de quelar espécies reativas de oxigênio produzidas durante a peroxidação lipídica [9]. A performance dessa vitamina está associada, também, à composição lipídica da membrana espermática, evidenciando assim o seu efeito espécie-específico [3].

A cisteína, por sua vez, não promoveu melhoras na qualidade espermática nas condições em que foi empregada nesse estudo, embora já exista registro de sua eficiência na criopreservação seminal de peixes [19]. Esse aminoácido elimina os radicais livres através de interações químicas diretas com eles, além de ser um precursor da glutatona, capaz de gerar aumento dos níveis intracelulares desta [5]. Resultados obtidos a partir da utilização de cisteína na congelamento seminal de *Cyprinus carpio* exibiram melhora na qualidade espermática pós-descongelamento quando utilizada uma dose mínima de 2,5 mM, com melhora significativa conforme essa concentração foi aumentada [19]. Assim, é possível que a concentração utilizada no presente estudo possa ter sido insuficiente para promover uma proteção antioxidante para o sêmen dessa espécie, de modo que se observa a necessidade de novos estudos para verificar o efeito do aumento dessa concentração sobre a qualidade espermática de tambaqui.

No presente trabalho, a taurina apresentou uma tendência a elevar os valores de cinética espermática. Tais resultados podem estar relacionados à atuação da taurina na regulação de transportadores de Ca^{2+} , mostrando efeitos diferenciais na motilidade espermática, já que uma determinada concentração intracelular de Ca^{2+} é necessária para desencadear a ativação dos espermatozoides de peixes [14]. Além disso, esse aminoácido atua como um estabilizador de membrana por meio de interações diretas com fosfolípidios, podendo ser responsável pela proteção contra a peroxidação lipídica. Resultados positivos a partir da utilização de 1 mM de taurina já foram relatados na literatura [14]. Desse modo, uma vez que a concentração ideal de cada antioxidante é um fator espécie-específico, e que no presente trabalho a taurina apresentou tendência a melhores resultados de cinética espermática, acredita-se que uma dose superior à utilizada, não ultrapassando a dose de se-

gurança, poderia aumentar a capacidade antioxidante da taurina, potencializando seu poder de proteção para os espermatozoides de tambaqui.

A combinação entre duas vitaminas ou dois aminoácidos foi testada para verificar se havia ação complementar dos componentes utilizados, que pudesse promover melhores resultados de qualidade espermática de tambaqui. Entretanto, dentro das condições observadas nesse estudo, a combinação dos aminoácidos testados não elevou a qualidade seminal. Apesar de ter sido observado um aumento dos valores de VSL e VAP, a partir da associação das vitaminas em comparação ao tratamento contendo apenas vitamina C, esse aumento não foi verificado quando a associação é comparada ao tratamento contendo apenas vitamina E. Desse modo, infere-se que a melhora observada para o tratamento associado se deve apenas à presença da vitamina E, não à ação complementar das duas vitaminas. Embora para mamíferos já tenha sido observado que a adição de mais de um antioxidante ao diluidor é mais eficiente do que o uso individual deles [8], não existem trabalhos com adição combinada de antioxidantes na criopreservação seminal de teleósteos.

Apesar de não ter promovido melhora da qualidade espermática, a adição dos antioxidantes no meio de congelamento também não resultou em efeito negativo expressivo sobre os espermatozoides dessa espécie. Assim, essa pesquisa abre perspectivas para a realização de novos estudos que possam verificar os efeitos da utilização de outras concentrações dos antioxidantes testados, gerando mais conhecimento sobre esse assunto e validando a aplicação dessas substâncias na criopreservação seminal de tambaqui e de outras espécies de teleósteos.

CONCLUSÃO

A utilização de vitamina E e taurina, na concentração de 1 mM, na criopreservação seminal de tambaqui promove resultados promissores de velocidade curvilínea após a descongelamento. Uma vez que esse parâmetro está diretamente correlacionado com a taxa de fertilização, recomenda-se esses tratamentos, assim como mais testes de concentrações dos mesmos. Quanto aos parâmetros de morfologia e integridade de membrana, estes não são alterados pela utilização de vitamina C, vitamina E, cisteína e taurina no sêmen congelado e descongelado de tambaqui.

MANUFACTURERS

¹Sigma-Aldrich Co. St Louis, MO, USA.

²Vetec Química Fina Ltda. Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

³Dinâmica Química Contemporânea Ltda. Diadema, SP, Brazil.

⁴Farmafórmula®. Fortaleza, CE, Brazil.

⁵Microptics. Barcelona, Spain.

Funding. Bolsa de estudos concedida pela Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Ethical approval. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo comitê de ética para uso de animais da Universidade Estadual do Ceará (UECE), com o seguinte número de protocolo 6498820/2015.

Declaration of interest. The authors report no conflict interest. The authors alone are responsible for the content and writing of paper.

REFERENCES

- 1 Almeida-Monteiro P.S., Oliveira-Araújo M.S., Pinheiro R.R.P., Lopes J.T., Ferreira Y.M., Montenegro A.R., Melo-Maciel M.A.P. & Salmito-Vanderley C.S.B. 2017. Influence of vitamins C and E on the quality of cryopreserved semen *Prochilodus brevis* (Prochilodontidae, Teleostei). *Semina: Ciências Agrárias*. 38(4): 2669-2680.
- 2 Ball B.A. 2008. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. *Animal Reproduction Science*. 107: 260-267.
- 3 Ball B.B. & Vo A.T. 2002. Detection of lipid peroxidation in equine spermatozoa based upon the lipophilic fluorescent dye C11-BODIPY581/591. *Journal of Andrology*. 23: 259-269.
- 4 Barreiros A.L.B.S., David J.M. & David J.P. 2006. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*. 29(1): 113-123.
- 5 Bilodeau J.F., Blanchette S., Gagnon C. & Sirard M.A. 2001. Thiols prevent H₂O₂-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology*. 56: 275-286.
- 6 Cabrita E., Ma S., Diogo P., Martínez-Páramo S., Sarasquete C. & Dinis M.T. 2011. The influence of certain aminoacids and vitamins on post-thaw fish sperm motility, viability and DNA fragmentation. *Animal Reproduction Science*. 125: 189-195.
- 7 Carvalho O.F., Ferreira J.D.J., Silveira N.A. & Freneau G.E. 2002. Efeito oxidativo do óxido nítrico e infertilidade no macho. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 38(1): 33-38.
- 8 Ekici A., Baran A., Yamaner G., Özdaş Ö.B., Sandal A.İ., Güven E. & Baltacı M.A. 2012. Effects of different doses of taurine in the glucose-based extender during cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) semen. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 26(4): 3113-3115.
- 9 Ferreira A.L.A. & Matsubara J.S. 1997. Radicais livres: Conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 43(1): 61-68.
- 10 Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). 2015. Produção da Pecuária Municipal. v.43. Rio de Janeiro: IBGE, 47p.
- 11 Kutluyer F., Kayim M., Oğretmen F., Buyukleblebici S. & Tuncer P.B. 2014. Cryopreservation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* spermatozoa: Effects of extender supplemented with different antioxidants on sperm motility, velocity and fertility. *Cryobiology*. 69: 462-466.
- 12 Maria A.N., Azevedo H.C. & Carneiro P.C.F. 2011. Protocolo para Criopreservação do Sêmen de Tambaqui (*Colossoma macropomum*). Comunicado Técnico. Brasília: EMBRAPA. 1678-1937.
- 13 Martínez-Páramo S., Diogo P., Dinis M.T., Herráez M.P., Sarasquete C. & Cabrita E. 2012. Incorporation of ascorbic acid and α -tocopherol to the extender media to enhance antioxidant system of cryopreserved sea bass sperm. *Theriogenology*. 77: 1129-1136.
- 14 Martínez-Páramo S., Diogo P., Dinis M.T., Soares F., Sarasquete C. & Cabrita E. 2013. Effect of two sulfur-containing amino acids, taurine and hypotaurine, in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) sperm cryopreservation. *Cryobiology*. 66: 333-338.
- 15 Metwally M.A.A. & Fouad I.M. 2009. Effects of l-ascorbic acid on sperm viability in male grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Global Veterinaria*. 3: 132-136.

- 16 Miliorini A.B., Murgas L.D.S., Rosa P.V., Oberlender G., Pereira G.J.M. & Costa D.V. 2011. Morphological classification proposal for curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm damages after cryopreservation. *Aquaculture Research*. 42(2): 177-187.
- 17 Murgas L.D.S., Felizardo V.O., Andrade E.S., Ferreira M.R., Paula D.A.J. & Carvalho A.F.S. 2014. Cryopreservation of Sperm in Brazilian Migratory Freshwater Fish. In: Yamashiro H. (Ed). *Recent Advances in Cryopreservation*. Viena: InTech, pp.59-72.
- 18 Navarro R.D., Navarro F.K.S.P., Felizardo V.O., Murgas L.D.S. & Andrade E.S. 2014. Semen quality of Curimba (*Prochilodus lineatus*) cryopreserved with vitamins. *Acta Scientiarum: Technology*. 36(1): 55-60.
- 19 Ögretmen F., Inanan B.E., Kutluyer F. & Kayim M. 2015. Effect of semen extender supplementation with cysteine on postthaw sperm quality, DNA damage, and fertilizing ability in the common carp (*Cyprinus carpio*). *Theriogenology*. 83(9): 1548-1552.
- 20 Oliveira M.S., Almeida-Monteiro P.S., Nunes L.T., Linhares F.R.A., Pinheiro J.P.S., Pinheiro R.R.R., Ferreira F.O., Campello C.C. & Salmito-Vanderley C.S.B. 2016. Cryopreservation of tambaqui semen using a dry shipper and a programmed freezing machine. *Semina: Ciências Agrárias*. 37(4): 2167-2180
- 21 Paula D.A.J., Andrade E.S., Murgas L.D.S., Felizardo V.O., Winkaler E.U., Zeviani W. & Freitas R.T.F. 2012. Vitamin E and reduced glutathione in *Prochilodus lineatus* (curimba) semen cryopreservation (Characiformes: Prochilodontidae). *Neotropical Ichthyology*. 10(3): 661-665.
- 22 Silva E.C.B. & Guerra M.M.P. 2012. Terapias antioxidantes na criopreservação espermática. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*. 107: 143-149.
- 23 Vasconcelos S.M.L., Goulart M.O.F., Moura J.B.F., Manfredini V., Benfato M.S. & Kubota L.T. 2007. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Química Nova*. 30(5): 1323-1338.
- 24 Viveiros A.T.M., Nascimento A.F., Orfão L.H. & Isaú Z.A. 2010. Motility and fertility of the subtropical freshwater fish streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) sperm cryopreserved in powdered coconut water. *Theriogenology*. 74: 551-556.
- 25 Watson P.F. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and assessment of their post-thawing function. *Reproduction Fertility and Development*. 7: 871-891.