

CRIOCONSERVAÇÃO DO SÊMEN DA GAROUPA-VERDADEIRA *Epinephelus marginatus* (LOWE, 1834) (TELEOSTEI, SERRANIDAE)

Eduardo Gomes SANCHES ¹; Idili da Rocha OLIVEIRA ²; Pedro Carlos da Silva SERRALHEIRO ²

RESUMO

Este trabalho foi realizado com a finalidade de desenvolver um protocolo de crioconservação do sêmen da garoupa-verdadeira, *Epinephelus marginatus*. Em um experimento fatorial, foram analisados os efeitos de três diluentes (pH 6,1; 7,8 e 8,2), duas concentrações de dimetilsulfóxido (DMSO, 5 e 10%) e três velocidades de congelamento (110, 90 e 60°C × min⁻¹), sobre a motilidade e tempo de motilidade espermáticas. Uma amostra de 16 exemplares, com peso médio de 1.378 ± 358 g e comprimento total médio de 44,0 ± 4,0 cm, oriunda da natureza, foi mantida em tanques-rede e sexualmente invertida com metil-testosterona. O sêmen obtido foi congelado, empregando-se palhetas criogênicas em vapor de nitrogênio e, posteriormente, transferido para nitrogênio líquido. A combinação que propiciou maior taxa de motilidade e tempo de motilidade espermáticas (p < 0,05) foi proporcionada pelo emprego do diluente de pH 8,2 com DMSO (5%) e uma velocidade de congelamento de 60°C min⁻¹ (p < 0,05). Estes resultados possibilitam a implantação um de banco de sêmen da garoupa-verdadeira no Brasil, reduzindo a necessidade da adoção da inversão sexual rotineira para a reprodução da espécie.

Palavras-chave: Diluidores; crioprotetor; *Epinephelus marginatus*; reprodução; maricultura

SEMEN CRYOPRESERVATION OF DUSKY GROUPER *Epinephelus marginatus* (LOWE, 1834) (TELEOSTEI, SERRANIDAE)

ABSTRACT

This study aims at developing a protocol of semen cryopreservation of the dusky grouper *Epinephelus marginatus*. The effects of interaction between three extenders (pH 6.1 - 7.8 and 8.2), two concentrations of dimethylsulfoxide (DMSO, 5 and 10%) and three freezing speeds (110; 90 and 60 °C × min⁻¹) on the sperm motility and time of sperm motility were analyzed by means of a factorial experiment. A sample of 16 fishes (1,378 ± 358 g, 44 ± 4 cm) collected in the nature was kept in floating net cages and were sex inverted with methyl-testosterone. The semen was frozen by using cryogenic slats, in nitrogen steam and transferred, later, to liquid nitrogen. The higher sperm motility rate and time of motility (P < 0.05) was achieved by combining extender C (pH 8.2) with DMSO (5 %) and freezing speed of 60 °C min⁻¹ (P < 0.05). These results made possible the implantation of the semen bank of dusky grouper in Brazil, which reduced the need of routine sex inversions for the species reproduction.

Key words: Extender; cryoprotector; *Epinephelus marginatus*; reproduction; mariculture

Artigo Científico: Recebido em: 11/02/2008 – Aprovado em: 23/09/2009

¹ Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento do Litoral Norte, Instituto de Pesca/APTA/SAA. Rua Joaquim Lauro Monte Claro Neto, 2275 – Itaguá – CEP: 11680-000 – Ubatuba – SP – Brasil. email: esanches@pesca.sp.gov.br

² Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento do Litoral Sul, Instituto de Pesca/APTA/SAA. Av Prof. W. Besnard, s/n. – CEP: 11990-000 – Cananéia – SP – Brasil

INTRODUÇÃO

Os serranídeos (família Serranidae, subfamília Epinephelinae) compreendem 159 espécies, distribuídas em 15 gêneros (HEEMSTRA e RANDALL, 1993). Denominados genericamente por meros, chernes, garoupas e badejos, estão entre os peixes marinhos mais cultivados no Sudeste Asiático, há mais de vinte anos, devido a seu elevado valor comercial, decorrente da alta demanda de mercado, e por apresentarem, geralmente, rápido crescimento, resistência ao manejo e adaptação a sistemas intensivos de criação (CHOU e LEE, 1997).

Segundo ROCHA e COSTA (1999), o gênero *Epinephelus* apresenta onze espécies registradas para a costa brasileira. Entre elas, uma das que atinge maior tamanho é a garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834), que supera um metro de comprimento e 40 kg de peso. Considerada uma espécie importante do ponto de vista econômico e turístico (de grande interesse para a pesca artesanal e para a pesca esportiva), a garoupa-verdadeira vem sendo apontada como uma candidata para a piscicultura marinha (SANCHES *et al.*, 2006).

Segundo MARINO *et al.* (2003), desde 1995, a garoupa-verdadeira está incluída na lista de peixes ameaçados (Berne Convention, Annex 3 - Protocol for Mediterranean Biodiversity) e, de acordo com RODRIGUES FILHO *et al.* (2009), *E. marginatus* está incluída na lista vermelha da IUCN (International Union for Conservation of Nature and Natural Resources).

Como os demais membros da subfamília *Epinephelinae*, a garoupa-verdadeira é uma espécie hermafrodita protogínica, maturando sexualmente como fêmea e, em dado momento de seu desenvolvimento, sofrendo uma inversão sexual, tornando-se macho (ZABALA *et al.*, 1997).

A inversão sexual é reconhecida como uma estratégia reprodutiva de grande sucesso entre os peixes (BARREIROS, 1998). A presumida vantagem evolucionária da mudança de sexo está baseada na oportunidade reprodutiva de desovar em grupos (reduzindo a predação dos ovos, incrementando a variabilidade genética e aumentando a taxa de fertilização), sendo que nestes peixes, a mudança de sexo é sócio-demograficamente controlada onde a remoção dos

machos da população induz a inversão sexual das fêmeas dominantes (SHAPIRO, 1984).

Dada à complexidade do ciclo biológico da espécie, a obtenção de machos torna-se um problema para a realização da reprodução em cativeiro (TUCKER e FITZGERALD, 1994; SADOVY e COLIN, 1995; BARREIROS, 1998). Buscando alternativas para esse problema, diversos autores têm demonstrado a viabilidade da inversão sexual de serranídeos em cativeiro, com a utilização de andrógenos (ROBERTS e SCHLIEDER, 1983; KUO *et al.*, 1988; TANFERMIN *et al.*, 1994; QUINTIO *et al.*, 1997; SANCHES *et al.*, 2009). Nos peixes tratados, observa-se a redução na síntese do hormônio estradiol, o desenvolvimento dos testículos e produção de sêmen. Entretanto, seis meses após a interrupção da administração de andrógenos, os peixes retornam a condição de fêmeas (CHAO e CHOW, 1990), tornando o processo trabalhoso e de custo elevado.

Desde o êxito alcançado por BLAXTER (1953), na hibridização de duas populações assíncronas do arenque do Atlântico (*Clupea harengus*), utilizando espermatozoides conservados a -79°C, a importância do resfriamento como recurso para preservar gametas *ex situ*, notadamente espermatozoides, é reconhecida em mais de 200 espécies de peixes (sendo 30 espécies marinhas), contribuindo significativamente para o controle da reprodução de espécies na piscicultura moderna (GWO, 2000).

As técnicas de congelamento de sêmen são importantes nos estudos de controle da reprodução de espécies hermafroditas protogínicas e de melhoramento genético de reprodutores, por meio das técnicas clássicas de seleção ou por meio da manipulação genética (LUBZENS *et al.*, 1997).

A crioconservação do sêmen é considerada, por CLOUD *et al.* (1990), como de especial interesse para espécies ameaçadas de extinção, por possibilitar a preservação da estrutura genética da população. É, também, uma ferramenta importante para o cultivo de peixes da família Serranidae, por possibilitar a formação de bancos de sêmen e viabilizar a reprodução em condições de cativeiro (GWO, 2000; GRIER e NEIDING, 2000).

Embora possa ser uma interessante estratégia, poucos trabalhos (WITHLER e LIM, 1982; CHAO *et al.*, 1992; GWO, 1993; MIYAKI *et al.*, 2005; CABRITA *et al.*, 2009) têm focado a importância da crioconservação do sêmen de serranídeos.

O objetivo deste estudo foi desenvolver um protocolo de crioconservação do sêmen da garoupa-verdadeira, *Epinephelus marginatus*, contribuindo para viabilizar a reprodução da espécie em cativeiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi realizado no Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento do Litoral Norte - Instituto de Pesca - APTA - SAA, em Ubatuba/SP, (23°27'04"S e 45°02'48"W). Foram utilizados 16 exemplares da garoupa-verdadeira, *Epinephelus marginatus*, invertidos sexualmente pelo emprego diário do andrógeno 17-alfa-metiltestosterona (1 mg kg⁻¹), via oral, por 180 dias.

O sêmen obtido destes exemplares foi avaliado em relação ao volume, densidade, motilidade e tempo de motilidade espermáticas. Antes da coleta do sêmen, os dados de comprimento e peso de cada exemplar foram anotados. O sêmen foi extraído individualmente de cada peixe, em seringas plásticas de 1 mL graduadas (0,01 mL), envoltas em papel opaco (para evitar a incidência da luz ambiente sobre as amostras), pressionando manualmente a região abdominal compreendida entre as nadadeiras peitoral e anal, no sentido crânio-caudal. O volume contido em cada seringa foi registrado e transferido para um único frasco plástico opaco graduado (0,01 mL) de 5 mL, mantido tampado e imerso em recipiente com água na mesma temperatura (26 ± C) em que foram mantidos os reprodutores de *E. marginatus*.

A densidade espermática foi estimada após a diluição do sêmen, em duas etapas, até atingir a diluição final de 1:10⁴. Primeiro, uma alíquota de 10 µL de sêmen foi adicionada a 990 µL de solução de formol salino a 5% (5 mL de solução de formaldeído e 95 mL de água marinha a 35‰). No momento da contagem, os espermatozoides foram novamente diluídos, utilizando-se a mesma solução e mesmo fator de diluição. A contagem foi

feita em câmara de Neubauer (1 mm³), em microscópio óptico de contraste de fase (200 x).

A motilidade (porcentagem de células da amostra que apresentam movimento) e o tempo da motilidade espermáticas (duração do movimento celular, em segundos) foram estimados após a coleta de sêmen de cada exemplar. Uma alíquota de 15 µL de sêmen fresco foi depositada em lâmina de vidro e, a seguir, misturada com igual volume de água marinha 35‰ e 26°C. Na estimativa da motilidade, em microscópio óptico com contraste de fase (400 x), empregou-se a escala arbitrária, de 0 a 100%, proposta por SALISBURY e VANDEMARK (1964), onde foram considerados todos os espermatozoides que apresentaram movimento em um único campo focal, escolhido aleatoriamente, com a intensidade da luz mantida inalterada. A taxa de motilidade espermática foi estimada pelo número de espermatozoides móveis/número total de espermatozoides presentes no campo óptico.

O tempo de motilidade espermática foi cronometrado (em segundos), desde o início da homogeneização do sêmen com água marinha até que todas as células se tornassem imóveis. O tempo de motilidade celular foi aferido com a mesma amostra do sêmen preparada para observar a motilidade espermática. Somente sêmen com motilidade espermática superior a 90% foi utilizado para o desenvolvimento do experimento de crioconservação.

As soluções diluidoras do sêmen, com diferentes composições iônicas e pH, utilizaram como base a composição química da solução fisiológica para teleósteos marinhos, entretanto, foram modificadas em sua concentração iônica e tiveram seus valores de pH ajustados para 6,1; 7,8 e 8,2 e estão representadas na Tabela 1.

O sêmen colhido foi dividido, após a mistura, em volumes iguais, em nove frascos plásticos opacos, para os respectivos diluentes. Os diluentes, previamente acrescidos do crioprotetor DMSO nas concentrações de 5 e 10%, foram adicionados lentamente ao sêmen até completar a proporção de diluição de 1:4 (v/v). O tempo de equilíbrio entre o início da diluição do sêmen e o início do congelamento foi de 60 segundos.

Tabela 1. Composição química e pH das soluções diluidoras utilizadas para a crioconservação do sêmen de *Epinephelus marginatus*

	NaCl (g L ⁻¹)	KCl (g L ⁻¹)	CaCl ₂ (g L ⁻¹)	MgCl ₂ (g L ⁻¹)	NaHPO ₄ (g L ⁻¹)	NaHCO ₃ (g L ⁻¹)
Diluyente A (pH = 6,1)	7,89	1,19	0,20	0,42	-	-
Diluyente B (pH = 7,8)	6,50	3,00	0,30	-	0,20	-
Diluyente C (pH = 8,2)	7,89	1,19	0,22	0,73	0,08	0,84

Para a obtenção das diferentes velocidades, as palhetas, em réplica de três por fator, foram confeccionadas manualmente a partir de tubos de plástico criogênico, com diâmetro interno de 4 mm, utilizados rotineiramente na inseminação artificial de bovinos, de modo a conter os seguintes volumes: 0,25, 0,50, 1,00 mL. Os tubos foram cortados, em seu comprimento, mantendo inalterado seu diâmetro, em tamanhos adequados para armazenar diferentes volumes de sêmen diluído, para que, durante o resfriamento, pudessem refletir as velocidades de congelamento examinadas neste estudo. Cada palheta foi selada em uma das extremidades com tampão formado de algodão hidrófilo - álcool polivinílico em pó - algodão hidrófobo. A determinação das velocidades foi realizada previamente, antes do início deste experimento, em amostras de sêmen e diluidores, em palhetas teste, com auxílio de um par termo-elétrico. A amplitude de variação de temperatura considerada foi entre 26 °C e - 196 °C.

Após 180 dias de armazenamento em nitrogênio líquido (- 196°C), as palhetas foram descongeladas em água (26°C) para aferição da motilidade e do tempo de motilidade

espermáticas, que serviram como parâmetros na avaliação do congelamento, de acordo com a variação de cada fator no sêmen.

O experimento foi desenvolvido em um modelo fatorial, envolvendo três soluções diluidoras do sêmen (A, B, C), duas concentrações do crioprotetor dimetilsulfóxido (DMSO), 5 e 10%, e três velocidades de congelamento (110, 90 e 60°C min⁻¹). Para a análise estatística dos dados, utilizou-se o programa SAS (Statistical Analyses System), o SAS/STAT, versão 6.11 (1990). A significância das diferenças entre os tratamentos em cada experimento foram obtidas pelo método ANOVA, usando procedimentos paramétricos, com base no teste de variação múltipla de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

RESULTADOS

A produção total de sêmen, em uma única coleta, foi de 4,69 mL. Os dados obtidos da biometria dos exemplares e das características do sêmen fresco (volume, densidade, motilidade e tempo de motilidade espermáticas) estão representados na Tabela 2.

Tabela 2. Médias e desvios padrão do comprimento total (cm), peso total (g), volume de sêmen (mL), densidade (células mL⁻¹), motilidade (%) e tempo de motilidade (segundos) espermáticas de *Epinephelus marginatus*

		Características espermáticas do sêmen fresco			
Comprimento total (cm)	Peso total (g)	Volume (mL)	Densidade (x 10 ⁹ células mL ⁻¹)	Motilidade (%)	Tempo de motilidade (s)
44,5 ± 3,7	1.377,9 ± 357,7	0,36 ± 0,26	3,1 ± 0,2	100	3060 ± 600

Com 180 dias de armazenamento em nitrogênio líquido, o sêmen foi descongelado e os

valores obtidos para a motilidade do sêmen dos machos invertidos foram submetidos à ANOVA,

sendo que na avaliação da motilidade espermática média, o comportamento foi distinto entre os fatores estudados (interação entre diluente x velocidade x DMSO, $p = 0,029$). A seguir, foi aplicado o teste de Tukey, com o objetivo de obter a melhor combinação entre os fatores (Tabela 3).

Tabela 3. Médias e desvios padrão da motilidade espermática (%) do sêmen de machos invertidos de *Epinephelus marginatus* submetidos a diferentes diluentes, velocidades de congelamento e concentrações de DMSO

Diluente	Velocidade	DMSO	Média \pm dp
A (pH = 6,1)	110°C min ⁻¹	5%	41,7 \pm 5,8 c
		10%	15,0 \pm 0,0 d
	90°C min ⁻¹	5%	58,3 \pm 5,8 b
		10%	28,3 \pm 11,5 cd
	60°C min ⁻¹	5%	68,3 \pm 5,8 b
		10%	25,0 \pm 1,0 cd
B (pH = 7,8)	110°C min ⁻¹	5%	28,3 \pm 5,8 cd
		10%	15,0 \pm 0,0 d
	90°C min ⁻¹	5%	28,3 \pm 5,8 cd
		10%	15,0 \pm 0,0 d
	60°C min ⁻¹	5%	31,7 \pm 5,8 cd
		10%	15,0 \pm 0,0 d
C (pH = 8,2)	110°C min ⁻¹	5%	38,3 \pm 5,8 c
		10%	38,3 \pm 5,8 c
	90°C min ⁻¹	5%	68,3 \pm 5,8 ab
		10%	45,0 \pm 0,0 c
	60°C min ⁻¹	5%	85,0 \pm 0,0 a
		10%	55,0 \pm 0,0 bc

^{a-d} Médias e desvios padrão com diferentes sobrescritos na mesma coluna apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$)

Os resultados indicaram que o melhor valor para a motilidade média (85%) foi obtido empregando-se o diluente C (pH = 8,2), concentração do DMSO de 5% e a velocidade de congelamento de 60°C min⁻¹.

Os dados do tempo da motilidade do sêmen dos machos invertidos após a crioconservação foram submetidos à ANOVA, sendo observado que a interação entre os três fatores estudados (diluente, velocidade e DMSO), considerando-se o tempo de motilidade espermática, não foi significativa ($p = 0,294$), entretanto, foi estatisticamente significativa entre cada dois fatores ($p < 0,05$). Na Tabela 4 estão apresentados os

resultados da aplicação do teste de Tukey visando obter a melhor combinação entre os fatores.

Tabela 4. Médias e desvios padrão do tempo de motilidade espermática (segundos) do sêmen dos machos invertidos de *Epinephelus marginatus* em diferentes diluentes e velocidades de congelamento

	Velocidade de congelamento		
	110°C min ⁻¹	90°C min ⁻¹	60°C min ⁻¹
Diluente A	1708 \pm 875 cd	2652 \pm 962 ab	2465 \pm 1462 bc
Diluente B	958 \pm 655 d	1192 \pm 1043 d	1820 \pm 1668 bcd
Diluente C	2077 \pm 275 bc	2551 \pm 681 bc	3459 \pm 638 a

^{a-d} Médias e desvios padrão com diferentes sobrescritos apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$)

Os resultados demonstraram que o melhor tempo de motilidade espermática foi obtido com o diluente C (pH = 8,2) e a velocidade de congelamento de 60°C min⁻¹.

Na Tabela 5 constam os resultados da aplicação do Teste de Tukey entre os fatores diluente e concentração do crioprotetor DMSO, visando a melhor combinação entre os mesmos.

Tabela 5. Médias e desvios padrão do tempo de motilidade espermática (segundos) do sêmen de machos invertidos de *Epinephelus marginatus*, em diferentes diluentes e concentrações de DMSO

	Diluente A	Diluente B	Diluente C
5% DMSO	3165 \pm 839 a	2322 \pm 856 bc	3033 \pm 753 a
10% DMSO	1385 \pm 529 d	325 \pm 93 e	2358 \pm 713 b

^{a-e} Médias e desvios padrão com diferentes sobrescritos apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$)

Foi observado que o melhor tempo de motilidade espermática foi obtido tanto com o diluente A como com o diluente C, na concentração de 5% de DMSO.

Na Tabela 6 são apresentados os resultados da aplicação do Teste de Tukey entre os fatores velocidade de congelamento e concentração de DMSO, visando a melhor combinação entre os fatores.

Os resultados indicaram que o melhor tempo de motilidade espermática foi obtido

empregando-se uma concentração de 5% de DMSO e uma velocidade de congelamento de 60°C min⁻¹.

Tabela 6. Médias e desvios padrão do tempo de motilidade espermática (segundos) do sêmen de machos invertidos de *Epinephelus marginatus*, nas diferentes velocidades de congelamento e diferentes concentrações de DMSO

	Velocidade de congelamento		
	110°C min ⁻¹	90°C min ⁻¹	60°C min ⁻¹
5 % DMSO	2084 ± 536 ^c	2823 ± 658 ^b	3613 ± 656 ^a
10 % DMSO	1078 ± 653 ^{cd}	1440 ± 1018 ^{cd}	1549 ± 1235 ^c

^{a-d} Médias e desvios padrão com diferentes sobrescritos apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$)

DISCUSSÃO

Para SALISBURY e VANDEMARK (1964), o estudo do sêmen por meio da determinação do volume coletado, da motilidade e concentração espermáticas servem de base para a avaliação do material fecundante, além de possibilitarem a mensuração da capacidade de produção do sêmen de cada reprodutor.

Neste estudo, a densidade espermática encontrada foi de $3,1 \times 10^9$ células mL⁻¹. Este valor é ligeiramente inferior ao reportado para a espécie por SPEDICATO *et al.* (1995), de $4,7$ a $8,6 \times 10^9$ células mL⁻¹, mas dentro da variação encontrada por CABRITA *et al.* (2009), de $1,2$ a $16,6 \times 10^9$ células mL⁻¹, embora contrastem com a menor densidade obtida por KUO *et al.* (1988), em *Epinephelus fario*, de $8,0 \times 10^7$ células mL⁻¹. Entretanto, todos esses valores podem ser considerados dentro dos limites da maioria das espécies marinhas, compilados por RANA (1996), de $2,0 \times 10^6$ a $6,5 \times 10^{10}$ células mL⁻¹.

A motilidade espermática e sua duração são positivamente correlacionadas com a fertilidade do sêmen desde o início das técnicas de fertilização dos peixes (RANA, 1996).

Segundo BILLARD *et al.* (1995), a motilidade espermática é o parâmetro mais comum para avaliar a qualidade do sêmen, embora a capacidade de fertilização seja o teste conclusivo sobre essa questão. Os autores ressaltaram,

entretanto, que a capacidade de fertilização pode ser afetada por fatores independentes da qualidade do sêmen e que interagem no processo, como a qualidade dos óvulos, o que pode gerar resultados de difícil interpretação. Sobre isto, GWO (2000) afirmou que, em função da dificuldade de se obter óvulos com boa qualidade empregando-se técnicas de desova induzida, na grande maioria dos trabalhos publicados sobre crioconservação de sêmen de peixes marinhos, a avaliação da taxa de fertilização freqüentemente não é utilizada e somente a taxa de motilidade de sêmen é descrita como indicadora da qualidade do sêmen.

O sêmen de *E. marginatus*, examinado após o processo de crioconservação, mostrou uma alta porcentagem de células móveis (85%), indicando que as técnicas empregadas neste estudo foram adequadas na preservação da qualidade espermática. Os valores de motilidade, obtidos neste estudo, foram superiores aos encontrados no sêmen de *Epinephelus malabaricus* por CHAO *et al.* (1992), com valores de 40 a 60%; de *Epinephelus moara*, com 42 a 52% (MIYAKI *et al.*, 2005); de *Dicentrarchus labrax* (FAUVEL *et al.*, 1999), de *Centropomus undecimalis* (TIERSCH *et al.*, 2004), ambos com taxa de motilidade ao redor de 80%, porém, inferiores ao obtido por RILEY *et al.* (2004) com o *Lutjanus campechanus*, ao redor de 95%.

Os valores médios da duração da motilidade espermática obtidos para *E. marginatus* (3060 ± 600 segundos) foram muito superiores aos encontrados para outras espécies de peixes marinhos, ao redor de 500 segundos (BILLARD, 1978), embora tempos elevados de motilidade espermática, superiores a 4.500 segundos, tenham sido observados por CHAO *et al.* (1992) em *E. malabaricus*. O elevado tempo de motilidade espermática provavelmente deva estar relacionado ao complexo processo reprodutivo dos peixes do gênero *Epinephelus*, que formam haréns e intensas agregações reprodutivas, conforme descrição de ZABALA *et al.* (1997).

Segundo GWO (2000), quando o sêmen é exposto a temperaturas criogênicas, as características seminais são duramente afetadas, e somente podem ser preservadas se, antes do início do congelamento, o sêmen for diluído em soluções adequadas.

De acordo com FOOTE (1975), um diluente deve apresentar as seguintes funções: fornecer nutrientes como fonte de energia aos espermatozóides; proteger as células contra o efeito prejudicial do resfriamento rápido; servir de tampão para prevenir mudanças bruscas no pH, resultantes do metabolismo dos espermatozóides; manter a pressão osmótica apropriada; inibir o crescimento bacteriano; aumentar o volume do sêmen, de modo que possa ser utilizado em múltiplas fecundações; e proteger as células espermáticas durante o congelamento. LEGENDRE e BILLARD (1980) citam outras propriedades do diluente como a condutividade térmica elevada e a solubilidade ao crioprotetor.

LAHNSTEINER *et al.* (1997) reportaram uma significativa correlação entre o pH do plasma seminal e a motilidade espermática, demonstrando que o pH é uma importante característica do plasma seminal que influencia a motilidade espermática. Considerando esta questão, diversos estudos (ODA e MORISAWA, 1993; BILLARD *et al.*, 1993; LAHNSTEINER *et al.*, 1997) têm demonstrado os efeitos de íons, notadamente Na⁺, K⁺, Ca⁺², Mg⁺², na iniciação e na duração do tempo da motilidade espermática.

As três soluções iônicas empregadas neste estudo utilizaram como base a composição química da solução fisiológica para teleósteos marinhos, porém, foram modificadas em sua composição iônica e tiveram seus valores de pH ajustados para 6,1; 7,8 e 8,2, buscando-se uma melhor composição para o sêmen desta espécie. O melhor desempenho de motilidade e tempo de motilidade espermáticas foram obtidos com o uso do diluente C com pH 8,2. Estes resultados estão de acordo com os de PELETEIRO *et al.* (1996), que ressaltaram que na composição dos diluentes para peixes marinhos, o pH e a capacidade de tamponamento merecem atenção especial. Estes mesmos autores afirmaram que, diluentes com pH ajustado entre 7,8 e 8,5 (alcalinos) e adequadamente tamponados com substâncias inorgânicas, como fosfatos e/ou bicarbonatos de sódio e/ou potássio, têm proporcionado um melhor desempenho na preservação da viabilidade dos espermatozóides, ao contrário de diluentes sem capacidade de tamponamento e com pH ácido ou próximo ao neutro. Estudando a crioconservação do sêmen de *E. malabaricus*

CHAO *et al.* (1992) obtiveram sucesso utilizando um diluente tamponado para pH 8,0, demonstrando a importância deste valor de pH na manutenção das características do sêmen. Segundo GWO (2000), o emprego de diluentes tamponados tem o objetivo de impedir que os metabólitos dos espermatozóides, acumulados no decorrer do processo de congelamento, causem mudanças no pH do sêmen, causando efeitos deletérios às células espermáticas.

MAZUR (1970) afirmou que os efeitos da variação contínua da osmolaridade, nos meios intra e extracelular, sobre os espermatozóides, depende da velocidade de resfriamento empregada ao sêmen. Segundo este mesmo autor, uma velocidade relativamente baixa predisporia as células a uma perda rápida de água, com desidratação e redução do tamanho e, posteriormente, do pH. Por outro lado, uma velocidade muito rápida pode não dispor às células o tempo necessário para concluir o fluxo de água e o equilíbrio dos solutos, favorecendo, ainda, a formação de cristais de gelo em seu interior. Em estudos posteriores, MAZUR (1977) demonstrou que, durante o descongelamento, o gelo formado pode se recrystalizar formando blocos maiores que irão danificar as membranas celulares.

De acordo com SUQUET *et al.* (2000), a velocidade de congelamento para o sêmen de peixes marinhos pode variar de 8 a 99°C min⁻¹, sendo realizada em duas etapas: a primeira em vapor de nitrogênio e a segunda em nitrogênio líquido. Em nosso estudo, considerando-se a motilidade e o tempo de motilidade espermáticas, a melhor velocidade de congelamento para o sêmen de *E. marginatus* foi de 60°C min⁻¹. WITHLER e LIM (1982) obtiveram resultados adversos empregando a velocidade de 25°C min⁻¹ para sêmen de *Epinephelus tauvina*. Os resultados obtidos neste trabalho concordam com os obtidos por CHAO *et al.* (1992) que, estudando a crioconservação do sêmen de *E. malabaricus*, obtiveram os melhores resultados empregando a velocidade de congelamento de 60°C min⁻¹ e, também, com os obtidos por MIYAKI *et al.* (2005), que empregaram esta mesma velocidade na crioconservação do sêmen de *E. moara*, e por CABRITA *et al.* (2009), na crioconservação de sêmen de *E. marginatus*. Pela praticidade e maior

capacidade de armazenamento de sêmen, as palhetas de 0,50 mL (que proporcionaram velocidade de congelamento de 60°C min⁻¹) são as mais recomendadas, em detrimento às palhetas de 0,25 mL (que propiciaram a velocidade de congelamento de 90°C min⁻¹).

Os crioprotetores utilizados para o sêmen de peixes marinhos foram revisados por SUQUET *et al.* (2000) e GWO (2000). O DMSO tem sido considerado de baixa toxicidade e eficiente na ação de proteger os espermatozóides durante o resfriamento, reduzindo a formação de gelo através da diminuição do ponto de congelamento do fluido intracelular durante o processo (PELETEIRO *et al.*, 1996). Segundo CHAO e LIAO (2001), o DMSO é um dos crioprotetores mais amplamente usados no congelamento de sêmen.

Os melhores resultados para a criopreservação do sêmen dos peixes marinhos têm sido obtidos com DMSO variando de 10 a 20% (GWO, 1993; WAYMAN *et al.*, 1997; VUTHIPHANDCHAI *et al.*, 2009), embora as concentrações mais utilizadas estejam entre 7 a 10% (BILLARD *et al.*, 1995). MONGKONPUNYA *et al.* (1995) afirmaram que o incremento na concentração do DMSO provoca redução da motilidade espermática e na vitalidade dos espermatozóides. Neste trabalho, os melhores resultados foram obtidos com a concentração de 5% de DMSO para o sêmen de *E. marginatus*, similar à concentração recomendada por LEUNG (1987) para *Lates calcarifer*, mas contrastando com os resultados obtidos para outras espécies do gênero *Epinephelus*. WITHLER e LIM (1982) obtiveram resultados promissores na criopreservação do sêmen de *E. tauvina* ao utilizar 10% de DMSO. CHAO *et al.* (1992), estudando a criopreservação do sêmen de *E. malabaricus*, obtiveram os melhores resultados empregando uma concentração de 10% de DMSO. Entretanto, GWO (1993), empregando uma concentração ainda mais alta, de 20% de DMSO, afirmou ter obtido bons resultados na criopreservação do sêmen de *E. malabaricus*. Neste estudo, concentrações de DMSO superiores a 5% apresentaram um efeito deletério para os espermatozóides de *E. marginatus*, embora efeitos tóxicos do DMSO na criopreservação de sêmen de peixes marinhos somente sejam reportados na

literatura em concentrações acima de 10%. Mais estudos, em diferentes espécies de *Epinephelus*, são necessários para se obter uma visão mais clara sobre este problema.

CONCLUSÕES

Para a criopreservação do sêmen da groupave-verdadeira, *Epinephelus marginatus*, o diluente C, com pH de 8,2 utilizando uma concentração de 5% de dimetilsulfóxido (DMSO) e a velocidade de congelamento 60°C min⁻¹, proporcionada com o uso de palhetas de 0,50 mL, foi o que proporcionou os melhores resultados em promover uma ação crioprotetora para os espermatozóides.

REFERÊNCIAS

- BARREIROS, J.P. 1998 Sexual inversion in *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) (Pisces: Serranidae, Epinephelinae) nos Açores. *Revista Portuguesa de Zootecnia*, Lisboa, 5: 81-90.
- BILLARD, R., 1978 Some data on gametes preservation and artificial insemination in teleost fish. *Actes de colloques du CNEXO*, Madri, 8: 59-73.
- BILLARD, R.; COSSON, J.; CRIM, L.W. 1993 Motility of fresh and aged halibut sperm. *Aquatic Living Resources*, França, 6: 67-75.
- BILLARD, R.; COSSON, J.; PERCHEC, G.; LINHART, O. 1995 Biology of sperm and artificial reproduction in carp. *Aquaculture*, Amsterdam, 129: 95-112.
- BLAXTER, J.H.S. 1953 Sperm storage and cross-fertilization of spring and autumn spawning herring. *Nature*, London, 172 : 1189-1190.
- CABRITA, E.; ENGROLA, S.; CONCEIÇÃO, L.E.C.; POUSÃO-FERREIRA, P.; DINIS, M.T. 2009 Successful cryopreservation of sperm from sex-reversed dusky grouper, *Epinephelus marginatus*. *Aquaculture*, Amsterdam, 287: 152-157.
- CHAO, T. e CHOW, M. 1990 Effect of methyltestosterone on gonadal development of *Epinephelus tauvina* (Forsk.). *Singapore Journal of Primary Industries*, Manila, 18: 1-14.

- CHAO, N.H.; TSAI, H.P.; LIAO, I.C. 1992 Short and long-term cryopreservation of sperm and sperm suspension of the grouper, *Epinephelus malabaricus* (Bloch and Schneider). *Asian Fisheries Science*, Manila, 5: 103-116.
- CHAO, N.H. e LIAO, I.C. 2001 Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos. *Aquaculture*, Amsterdam, 197: 161-189.
- CHOU, R. e LEE, H.B. 1997 Commercial marine fish farming in Singapore. *Aquaculture Research*, Oxford, 28: 767-776.
- CLOUD, J.G.; MILLER, W.H.; LEVANDUSKI, M.J. 1990 Cryopreservation of sperm as a means to store salmonid germ plan and to transfer genes from wild fish to hatchery populations. *Progressive Fish Culturist*, Amsterdam, 52: 51-53.
- FAUVEL, C.; SAVOYE, O.; DREANNO, C.; COSSON, J.; SUQUET, M., 1999 Characteristics of sperm of captive sea bass, *Dicentrarchus labrax* in relation to its fertilization potential. *Journal of Fish Biology*, London, 54: 356-369.
- FOOTE, R.H. 1975 Semen quality from the bull to the freezer. *Theriogenology*, Amsterdam, 3: 219-228.
- GRIER, H. e NEIDING, C. 2000 Gonads and gametes of fishes. In: TIERSCH, T.R.; MAZIK, P.M. *Cryopreservation in Aquatic Species*. Baton Rouge: World Aquaculture Society. p. 1-12.
- GWO, J.C. 1993 Cryopreservation of black grouper (*Epinephelus malabaricus*) spermatozoa. *Theriogenology*, Amsterdam, 39: 1331-1342.
- GWO, J.C. 2000 Cryopreservation of sperm of some marine fishes. In: TIERSCH, T.R. and MAZIK, P.M. *Cryopreservation in Aquatic Species*. Baton Rouge: World Aquaculture Society. p. 138-160.
- HEEMSTRA, P.C.; RANDALL, J.E. 1993 FAO species catalogue. *Groupers of the world* (Family Serranidae, Subfamily Epinephelinae). Rome: FAO. 382 p.
- KUO, C.M.; TING, Y.Y.; YEH, S.L. 1988. Induced sex reversal and spawning of blue-spotted grouper *Epinephelus fario*. *Aquaculture*, Amsterdam, 74: 113-126.
- LAHNSTEINER, F., WEISMANN, T.; PATZNER, R.A. 1997 Methanol as cryoprotectant and the suitability of 1,2 ml and 5 ml strans for cryopreservation of semen from salmonid fishes. *Aquaculture Research*, Oxford, 28: 471-479.
- LEGENDRE, M. e BILLARD, R., 1980 Cryopreservation of rainbow trout sperm by deep freezing. *Reproduction, Nutrition, and Development*, London, 20: 1859-1868.
- LEUNG, L.K. 1987. Cryopreservation of spermatozoa of the barramundi, *Lates calcarifer* (Teleostei: Centropomidae). *Aquaculture*, Amsterdam, 64: 243-247
- LUBZENS, E.; DAUBE, N.; PEKARSDY, I.; MAGNUS, Y. COHEN, A. YUSEFOVICH, F.; FEIGIN, P. 1997 Carp (*Cyprinus carpio* L.) spermatozoa cryobanks: Strategies in research and application. *Aquaculture*, Amsterdam, 155: 13-30.
- MARINO, G.; PANINI, E.; LONGOBARDI, A.; MANDICH, A.; FINOIA, M.G.; ZOHAR, Y.; MYLONAS, C.C. 2003 Induction of ovulation in captive-reared dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834), with a sustained-release GnRHa implant. *Aquaculture*, Amsterdam, 219: 841-858.
- MAZUR, P. 1970 The freezing of biological systems. *Science Cryobiology*, London, 168: 939-949.
- MAZUR, P. 1977 The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology*, London, 14: 251-272.
- MIYAKI, K.; NAKANO, S.; OHTA, H.; KUROKURA, H. 2005 Cryopreservation of kelp grouper (*Epinephelus moara*) sperm using only a trehalose solution. *Fisheries Science*, London, 71: 457-458.
- MONGKONPUNYA, K., CHAIRAK, N., PUPIPAT, T.; TIERSCH, T.R. 1995 Cryopreservation of sperm of the Mekong giant catfish. *Asian Fisheries Science*, Manila, 3: 211-221.
- ODA, A. e MORISAWA, M. 1993 Rises of intracellular Ca and pH mediate the initiation of sperm motility by hyperosmolality in marine teleosts. *Cell Motil Cytoskeleton*, Montreal, 25: 171-178.

- PELETEIRO, J.B.; CHEREGUINI, O.; CAL, R.M. 1996 Preliminary results os artificial fertilization carried out with cryopreserved sperm of turbot *Scophthalmus maximus* (Linnaeus, 1758). *Informe Técnico Del Instituto Espanol de Oceanografo*, Madrid, 162: 1-13.
- QUINITIO, G.F.; CABEROY, N.D.; REYES JR, D.M. 1997 Induction of sex change in female *Epinephelus coioides* by social control. *Israel Journal of Aquaculture*, Bamidghed, 49: 77-83.
- RANA, K.J. 1996 Preservation of gametes. In: BROMAGE, N.; ROBERTS, R.J. *Broodstock management and egg larval quality*. Oxford: Blackwell Science. p.53-75.
- RILEY, K.L., HOLLADAY, C.G., CHESNEY, E.J.; TIERSCH, T.R. 2004 Cryopreservation of sperm of red snapper (*Lutjanus campechanus*). *Aquaculture*, Amsterdam, 238: 183-194.
- RODRIGUES FILHO, J.A.; SANCHES, E.G.; GARCIA, C.E.O.; PANNUTI, C.V.; SEBASTIANI, E.F.; MOREIRA, R.G. 2009 Threatened fishes of the world: *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) (Serranidae: Epinephelinae). *Environmental Biology of Fishes*, Amsterdam, 85: 345-346.
- ROBERTS, D.E. JR. e SCHLIEDER, R.A. 1983 Induced sex inversion, maturation, spawning and embriogeny of the protogynous grouper, *Mycteroperca microlepis*. *Journal of World Mariculture Society*, Baton Rouge, 14: 639-649.
- ROCHA, L.O.F. e COSTA, P.A.S. 1999 *Manual de identificação de peixes marinhos para a costa central*. REVIZEE. Rio de Janeiro: UNE-RIO. 230p.
- SADOVY, Y. e COLIN, P.L. 1995 Sexual development and sexuality in the Nassau grouper. *Journal of Fisheries Biology*, London, 46: 961-976.
- SALISBURY, G.W. e VANDEMARK, N.L. 1964 *Fisiologia de la reproduction e inseminacion artificial de los bovidos*. Zaragoza: ACRIBIA. 707 p.
- SANCHES, E.G.; OLIVEIRA, I.R.; SERRALHEIRO, P.; OSTINI, S.; TIBA, R.M. 2006 Piscicultura marinha: conquista inédita do Instituto de Pesca. *Panorama da Aqüicultura*, Rio de Janeiro, 54: 34-39.
- SANCHES, E.G.; OLIVEIRA, I.R.; SERRALHEIRO, P.C. 2009 Inversão sexual da garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus*. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, Salvador, 10: 198-209.
- SAS INSTITUTE INC. 1990 *SAS technical report*. Release 6.11. Cary: NC, 229p.
- SHAPIRO, D. 1984 Sex reversal and sociodemographic processes in coral reef fishes. In: POTTS, G. W. e WOOTTON, R. J. *Fish Reproduction: strategies and tactics*. London: Academic Press. 320p.
- SPEDICATO, M.T.; LEMBO, G.; DI MARCO, P.; MARINO, G. 1995 Preliminary results in breeding of dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834). *Cahiers Options Mediterranennes*, Roma, 16: 131-148.
- SUQUET, M.; DREANNO, C.; FAUVEL, C.; COSSON, J.; BILLARD, R. 2000 Cryopreservation of sperm in marine fish. *Aquaculture Research*, Oxford, 31: 231-243.
- TAN-FERMIN, J.D.; GARCIA, I.M.B.; CASTILLO JR, A.R. 1994 Induction of sex inversion in juvenile grouper *Epinephelus suillus*, (Valenciennes) by injections of 17-alfa-metilttestosterone. *Japanese Journal of Ichthyology*, Tokio, 40: 413-420.
- TIERSCH, T.R.; WAYMANN, W.R.; SKAPURA, D.P.; NEIDIG, C.L.; GRIER, H.J. 2004 Transport and cryopreservation of sperm of the common snook *Centropomus undecimalis* (Bloch). *Aquaculture Research*, Oxford, 35: 278-288.
- TUCKER, J.W. Jr. e FITZGERALD, W.J. 1994 Induced spawning in two Western Tropical Pacific groupers, *Plectropomus areolatus* and *Epinephelus fuscoguttatus*, in Palau. *Asian Fisheries Science*, Manila, 7: 57-62.
- VUTHIPHANDCHAI, V., CHOMPHUTHAWACH, S., NIMRAT, S. 2009 Cryopreservation of red snapper (*Lutjanus argentimaculatus*) sperm: Effect of cryoprotectants and cooling rates on sperm motility, sperm viability, and fertilization capacity. *Theriogenology*, Amsterdam, 72: 129-138.
- WAYMAN, W.R.; THOMAS, R.G.; TIERSCH, T.R. 1997 Refrigerated storage and cryopreservation of black drum (*Pogonias cromis*) spermatozoa. *Theriogenology*, Amsterdam, 47: 1519-1529.

- WITHLER, F.C. e LIM, L.C. 1982 Preliminary observations of chilled and deep-frozen storage of grouper (*Epinephelus tauvina*) sperm. *Aquaculture*, Amsterdam, 37: 389-392.
- ZABALA, M.; LOUISY, P.; GARCIA-RUBIES, A ; GRACIA, V. 1997 Social-behavioral context of reproduction in the Mediterranean dusky grouper *Epinephelus marginatus* (LOWE, 1834) (Pisces, Serranidae) in the Medes Islands Marine Reserve (NW Mediterranean, Spain). *Scientia Marina*, Madrid, 61 (1): 79-89.