



**MANEJO REPRODUTIVO DA
PIRACANJUBA (*Brycon orbignyanus*):
CONGELAMENTO DE SÊMEN E TAXAS DE
FERTILIDADE**

VIVIANE DE OLIVEIRA FELIZARDO

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

VIVIANE DE OLIVEIRA FELIZARDO

**MANEJO REPRODUTIVO DA PIRACANJUBA (*Brycon orbignyanus*):
CONGELAMENTO DE SÊMEN E TAXAS
DE FERTILIDADE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do curso de Mestrado em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinária, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Prof. Dr. Luis David Solis Murgas

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2008

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Felizardo, Viviane de Oliveira.

Manejo reprodutivo da piracanjuba (*Brycon orbignyanus*): congelamento de sêmen e taxas de fertilidade / Viviane de Oliveira Felizardo. -- Lavras : UFLA, 2008.

84 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2008.

Orientador: Luis David Solis Murgas.

Bibliografia.

1. Peixe. 2. Piracanjuba. 3. Reprodução. 4. Criopreservação. 5. Gametas. 6. Fertilização. 7. Água. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 639.3752

VIVIANE DE OLIVEIRA FELIZARDO

**MANEJO REPRODUTIVO DA PIRACANJUBA (*Brycon orbignyanus*):
CONGELAMENTO DE SÊMEN E TAXAS
DE FERTILIDADE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do curso de Mestrado em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinária, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 18 de fevereiro de 2008

Prof. Dr. Paulo dos Santos Pompeu	DBI/UFLA
Prof. Dr. Márcio Gilberto Zangeronimo	UNIFENAS
Prof ^ª . Dr ^ª . Cristina Delarete Drummond	DMV/UFLA

Prof. Dr. Luis David Solis Murgas
UFLA (Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

“ Levanta-te, resplandece, porque vem a tua luz, e a glória do SENHOR vai nascendo sobre ti; porque eis que as trevas cobriram a terra, e a escuridão os povos; mas sobre ti o SENHOR virá surgindo, e a sua glória se verá sobre ti.”

(IS 60. 1,2)

Dedico este trabalho a Deus, por estar comigo em cada passo dessa caminhada e que nos momentos de fraqueza foi o meu refúgio e me restaurou com Sua força.

Aos meus pais, Sirlei de Souza Felizardo e Maria Aparecida de Oliveira Felizardo, que souberam compreender a minha ausência em muitos momentos e estiveram sempre na retaguarda me apoiando.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS por todos os momentos que tem proporcionado em minha vida, por ter me sustentado de pé diante as dificuldades.

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Departamento de Medicina Veterinária, pelo acolhimento.

À Fundação O BOTICARIO de Proteção à Natureza, pelo apoio financeiro para realização deste trabalho.

Ao professor Luis David Solis Murgas, pela orientação, confiança e apoio.

À Companhia Energética de Minas Gerais que possibilitou a execução do projeto e a toda a equipe da Estação Ambiental de Itutinga - Gilson Antônio Azarias, Jailson Maximiano, Darly Querino de Assis e Oscar Moura pela cooperação.

Ao funcionário do Laboratório de Fisiologia e Farmacologia do DMV/UFLA, Willian César Cortez por estar sempre prestativo, pela ajuda concedida e pelos momentos de descontração.

Aos professores Paulo dos Santos Pompeu, Cristina Delarete Drummond e Márcio G. Zangeronimo por se disponibilizarem a fazerem parte da banca.

Ao meu namorado Ederland, pelo apoio e carinho.

Aos meus queridos amigos Valdirene, Maria Candida, Andréia, Isabel Cristina e Cláudia por sempre me apoiarem e torcerem pelo meu sucesso.

Aos colegas Mariana Drummond de Andrade, Juliana Milan de A. Silva, Camila C. Abreu, Aline F. S. de Carvalho, Daniel Okamura, Aléssio B. Miliorini, Gilmara J. M. Pereira, Estefânia Andrade, Michele Sampaio e Guilherme Oberlender por auxiliarem na execução do projeto.

Enfim, a todos que contribuíram para minha formação e para execução desse projeto,

MUITO OBRIGADA...

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	iii
RESUMO GERAL.....	iv
ABSTRACT.....	vi

CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO.....	2
2 OBJETIVOS.....	4
2.1 Geral.....	4
2.2 Específicos.....	4
3 REFERÊNCIAL TEÓRICO.....	5
3.1 Espécie estudada.....	5
3.2 Impotância da reprodução induzida.....	7
3.3 Sêmen e morfologia dos espermatozoides.....	7
3.4 Motilidade espermática.....	9
3.5 Relação sêmen ovócito.....	10
3.6 Congelamento do sêmen.....	12
3.7 Diluidor e diluição do sêmen de peixe.....	14
3.8 Crioprotetores	15
3.8.1 Crioprotetor intracelular.....	15
3.8.2 Crioprotetor extracelular.....	17
3.9 Descongelamento de sêmen.....	17
3.10 Volume de água utilizado na ativação dos gametas.....	19
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	21

CAPÍTULO 2 Avaliação da eficiência de diferentes soluções crioprotetoras no congelamento de sêmen de piracanjuba *Brycon orbignyianus*

1 RESUMO.....	30
2 ABSTRACT.....	31
3 INTRODUÇÃO.....	32
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	34
4.1 Local, período e seleção de reprodutores.....	34
4.2 Coleta e avaliação do sêmen.....	34
4.3 Diluição e criopreservação do sêmen.....	35
4.4 Descongelamento e avaliação do sêmen.....	36
4.5 Avaliação morfológica do sêmen pós-descongelamento.....	36
4.6 Análise estatística dos dados.....	37
4.6.1 Porcentagem e duração da motilidade pré e pós-congelamento..	37
4.6.2 Alterações morfológicas.....	38
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
5.1 Motilidade espermática pré e pós-congelamento.....	39
5.2 Avaliação morfológica dos espermatozóides.....	42
6 CONCLUSÃO	46
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

CAPÍTULO 3 Dose inseminante utilizada na fertilização artificial de ovócito de piracanjuba *Brycon orbignyianus*

1 RESUMO.....	51
2 ABSTRACT.....	52
3 INTRODUÇÃO.....	53
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	55
4.1 Local, período e seleção de reprodutores.....	55
4.2 Indução hormonal e coleta de gametas.....	55
4.3 Fertilização.....	56
4.4 Avaliação da concentração espermática.....	57
4.5 Análise estatística.....	58

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
6 CONCLUSÃO.....	65
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66

CAPÍTULO 4 Fertilização de ovócitos de piracanjuba (*Brycon orbignyana*) utilizando diferentes volumes de água na ativação

1 RESUMO.....	70
2 ABSTRACT.....	71
3 INTRODUÇÃO.....	72
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	73
4.1 Local, período e seleção de reprodutores.....	73
4.2 Coleta e fertilização dos gametas.....	73
4.3 Avaliação da concentração espermática.....	75
4.4 Análise estatística.....	75
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	77
6 CONCLUSÃO.....	79
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80
ANEXOS.....	82

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

TABELA1. Concentrações de DMSO utilizada na criopreservação de sêmen em espécies de peixes.....	16
---	----

CAPÍTULO 2

TABELA 1. Composição dos diluidores utilizados na criopreservação de sêmen de piracanjuba	36
---	----

TABELA 2. Valores médios de motilidade (%) do sêmen pré e pós-congelamento (erro padrão), em função dos tratamentos estudados.....	40
--	----

TABELA 3. Valores médios de duração da motilidade (erro padrão), em segundos, em função dos tratamentos estudados.....	41
--	----

TABELA 4. Valores médios de porcentagem total de alterações na morfologia dos espermatozoides, em função dos tratamentos estudados.....	42
---	----

TABELA 5. Valores médios (erro padrão) de porcentagem de alterações na morfologia da cabeça (CAB) dos espermatozoides, em função dos tratamentos estudados.....	44
---	----

TABELA 6. Valores médios de porcentagem de alterações na morfologia da peça intermediária (PI) dos espermatozoides, em função dos tratamentos estudados.....	45
--	----

TABELA 7. Valores médios porcentagem de alterações na morfologia da cauda (CD) dos espermatozoides, em função dos tratamentos estudados.....	45
--	----

CAPÍTULO 3

TABELA 1. Descrição dos tratamentos efetuados, quantidade de ovócito(g)/volume de sêmen (μL).....	56
TABELA 2. Dados e características seminais dos machos utilizados na fertilização de ovócitos de piracanjuba.....	60
TABELA 3. Valores médios de porcentagem de ovos viáveis (erro padrão) em função dos tratamentos estudados-fertilização.....	61
TABELA 4. Número médio de espermatozóides/ovócito encontrado em cada tratamento utilizado.....	61
TABELA 5. Valores médios de porcentagem de eclosão (erro padrão) em função dos tratamentos estudados.....	64

CAPÍTULO 4

TABELA 1. Descrição dos tratamentos efetuados volume de água/quantidade de gametas [ovócito (g)/volume de sêmen (μL)].....	74
TABELA 2. Valores médios de porcentagem de ovos viáveis (erro padrão) em função dos tratamentos estudados – taxa de fertilização.....	77

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

FIGURA 1 Exemplar adulto de piracanjuba *Brycon orbignyanus* 5

RESUMO GERAL

FELIZARDO, Viviane de Oliveira. **Manejo reprodutivo da piracanjuba (*Brycon orbignyanus*):** congelamento de sêmen e taxas de fertilidade. 2008. 84p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

Este experimento tem como objetivo a aplicação da biotecnologia sobre o manejo reprodutivo da piracanjuba visando o aperfeiçoamento das técnicas de congelamento do sêmen; avaliar a melhor dose de espermatozóide a ser utilizada na fertilização de ovócitos; e verificar a influência de diferentes volumes de água utilizados como ativador dos espermatozóides na fertilização. O trabalho foi realizado na Estação de Piscicultura da CEMIG em Itutinga e no DMV-UFLA no período de piracema 2006/2007/2008. Foram avaliados o efeito de duas soluções crioprotetoras intracelulares (DMSO e metanol) e duas soluções extracelulares (gema de ovo e lactose), na criopreservação do sêmen de reprodutores de piracanjuba, tendo como parâmetros de avaliação a taxa e duração da motilidade e morfologia espermática; o melhor volume de sêmen (10, 20, 30 e 40 μ L) a ser utilizado na fertilização de ovócitos na reprodução induzida de piracanjuba; e o efeito do uso de diferentes volumes de água (5, 10, 20 e 40 mL) como solução ativadora dos espermatozóides sobre as taxas de fertilização artificial de ovócitos. Todas as variáveis dos experimentos foram analisadas com o auxílio do programa *Statistical Analysis System* (SAS, 1999). Não se observou nenhuma diferença ($P>0,05$) entre os crioprotetores testados. As relações sêmen/ovócitos testadas não alteraram ($P>0,05$) as taxas de fertilização e eclosão. As relações de volume de água testadas não alteraram as taxas de fertilidade ($P>0,05$). No protocolo de criopreservação de sêmen de piracanjuba pode se utilizar soluções contendo DMSO ou metanol como crioprotetores internos e gema de ovo ou lactose como crioprotetores externos. Para que haja uma exploração sustentável no processo de reprodução induzida

¹ Comitê Orientador: Prof. Luis David Solis Murgas – UFLA (Orientador), Prof. Márcio Gilberto Zangeronimo - UNIFENAS, Prof. Paulo dos Santos Pompeu – UFLA (Co-orientadores).

de piracanjuba, sugere-se a utilização de $10,4 \times 10^5$ espermatozoides/ovócitos e a ativação com cinco mL de água do tanque onde se encontra o reprodutor.

Palavras-chave: criopreservação, gametas, fertilização, água.

ABSTRACT

FELIZARDO, Viviane de Oliveira. **Reproduction management of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*):** semen freezing and fertility rates. 2008. 84p. Dissertation (Masters in Veterinary Science) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.¹

This experiment has as an objective the application of biotechnology on the reproductive management of the piracanjuba seeking to improve the piracanjuba semen freezing techniques; to evaluate the best spermatoid dose to be used in ovocyte fertilization and to verify the influence of different water volumes used to activate the spermatoids in the fertilization. The work was accomplished at the CEMIG Fish Farming Station in Itutinga and in DMV-UFLA during the spawning periods of 2006/2007/2008. The effect of 2 intracellular cryoprotector solutions was evaluated (DMSO and methanol) and 2 extracellular solutions (egg yolk and lactose), in the cryopreservation of the piracanjuba reproducer semen, having as evaluation parameters the rate and duration of the mobility and spermatic morphology; the the best semen volume to be used (10, 20, 30 and 40 μ L) in the fertilization of ovocytes in the induced reproduction of piracanjuba and; the effect of the use of different volumes of water (5, 10, 20 and 40 mL) as a spermatoids activating solution on the artificial fertilization rates of the ovocytes. All the experimental variables were analyzed using the *Statistical Analysis System* (SAS, 1999) program. No statistical difference ($P>0.05$) was observed among the used cryoprotectors tested. The semen/ovocyte relationship tested did not alter ($P>0,05$) the fertilization and hatching rates. The relationship of water volumes tested did not alter the fertility rate ($P>0.05$). In the piracanjuba semen cryopreservation protocol solutions containing DMSO or methanol can be as internal cryoprotectors and egg yolk or lactose as external cryoprotectors. In order to have a sustainable exploration in the induced reproduction of piracanjuba, the utilization of 10.4×10^5 spermatoids/ovocytes and the activation with 5 mL of water from the reproductor tank is suggested.

Key words: cryopreservation, gametes, fertilization, water.

¹ Orientation Committee: Prof. Luis David Solis Murgas – UFLA (Advisor), Prof. Márcio Gilberto Zangeronimo - UNIFENAS, Prof. Paulo dos Santos Pompeu – UFLA (Co-advisor).

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

As construções de barragens hidrelétricas têm provocado danos à biodiversidade aquática, especialmente em peixes migratórios, que são prejudicados pelas barragens em diversas fases de sua vida, desde ovos e larvas até adultos para reprodução.

Medidas reparadoras para a perda de espécies de peixes têm sido realizadas no Brasil, através da introdução artificial de peixes em ambientes aquáticos, chamadas peixamentos. No entanto, atualmente, tais medidas raras vezes são realizadas com o objetivo de recuperar populações de peixes que estão em perigo real de extinção, sendo realizado apenas como cumprimento da legislação ou aumento da produção pesqueira. Esta visão errada dos peixamentos leva à introdução de espécies exóticas que comprometem as espécies nativas, seja com predação ou até mesmo liberação de agentes causadores de doenças que antes não existia ali.

O peixamento é uma prática importante a ser realizada para reintrodução da piracanjuba (*Brycon orbignyanus*), que se encontra na lista de espécies ameaçadas de extinção, com alto risco de desaparecimento na natureza em futuro próximo. Segundo relatos de pescadores, a piracanjuba não era encontrada há muitos anos no Alto Rio Grande, sendo atualmente já capturada, devido aos peixamentos que têm sido realizados na região.

Em cativeiro a piracanjuba não se reproduz naturalmente, sendo necessário realizar o processo de reprodução induzida, por meio de aplicação hormonal para a liberação dos gametas.

Estudos visando a otimização do uso de reprodutores e de técnicas que permitam a máxima eficiência do processo de reprodução induzida vêm sendo desenvolvidos para muitas espécies nativas. Para que ocorra a máxima utilização dos gametas disponíveis é necessário o conhecimento de alguns fatores

envolvidos na reprodução e na biotecnologia da espécie como, a criopreservação, a correta relação espermatozóide/ovócito e o volume adequado de água a ser utilizado na ativação dos gametas.

A criopreservação permite o armazenamento dos gametas em nitrogênio líquido, a -196°C , mantendo-se, assim, a viabilidade dos gametas por tempo indefinido. Dessa forma, os gametas podem ser criopreservados para serem utilizados em reproduções futuras, possibilitando limitar o estoque de machos na piscicultura intensiva, propiciando a exploração mais racional de reprodutores geneticamente selecionados e redução nos custos de produção.

O conhecimento da correta relação sêmen/ovócito é necessário para que não haja desperdício de sêmen. Isto significa fertilizar o maior número de ovócitos com a menor quantidade de espermatozoides sem que haja perda de sua eficiência, visto que altas taxas de fertilização podem ser alcançadas dentro de um amplo intervalo de doses inseminantes.

O volume de água/volume de gametas a ser empregado no método de fertilização deve receber atenção especial, isto porque quando o volume de água é muito baixo pode comprometer negativamente a ativação dos espermatozoides, devido à inadequada concentração osmótica do meio. E volumes elevados de água podem impedir o encontro do espermatozóide e a micrópila, devido à diluição excessiva do meio.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Aperfeiçoamento dos protocolos de reprodução induzida da piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) visando sua exploração sustentável e repovoamento de mananciais naturais.

2.2 Específicos

- ✓ Comparação de crioprotetores utilizados no congelamento de sêmen visando uma melhoria dos protocolos de reprodução induzida de piracanjuba;
- ✓ Avaliar a eficiência de soluções diluidoras associadas à crioprotetores na motilidade e viabilidade espermática após congelamento;
- ✓ Definir relação entre volume de sêmen e número de ovócitos utilizados na reprodução induzida de piracanjuba;
- ✓ Avaliar o efeito de diferentes volumes de água utilizados na ativação dos gametas durante o processo de fertilização.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Espécie estudada

Ordem: Characiformes

Família: Characidae

Gênero: *Brycon*

Espécie: *Brycon orbignyanus*

Nome popular: piracanjuba

A piracanjuba, *Brycon orbignyanus* Valenciennes, 1849 (Figura 1) é uma espécie reofílica encontrada na bacia do Paraná-Uruguai, principalmente nos rios Grande e Paraná (Vaz et al., 2000). Apresenta rápido crescimento, podendo atingir até 80 centímetros de comprimento corporal e 10 quilogramas de massa e a carne, além de convidativo aspecto, apresenta finíssimo sabor (Freato, 2005). É uma espécie arisca, mas muito apreciada na pesca esportiva, motivo pelo qual tem sido muito procurada para o povoamento de tanques em pesque-pagues. pague.



FIGURA 1. Exemplar adulto de piracanjuba *Brycon orbignyanus*

É uma espécie onívora, alimentando-se eventualmente de peixes e insetos. O macho reproduz-se a partir de dois anos de idade, com 20 cm de comprimento, apresentando como característica sexual secundária aspereza na nadadeira anal, resultante de pequenas espículas que aparecem na época da reprodução. Já a fêmea, se reproduz a partir do terceiro ano de idade, com 25 cm de comprimento (Vaz et al., 2000).

A piracanjuba apresenta coloração alaranjada e cauda avermelhada com uma faixa preta iniciada no pedúnculo caudal. Esta espécie é sensível a mudanças na dinâmica da água, tendo sua sobrevivência ameaçada pela escassez de alimento alóctone, esperada pela redução imposta pelo represamento na proporção entre as áreas terrestres com vegetação e lâmina de água (Cecílio et al., 1997).

As grandes barragens constituem barreira intransponível na rota migratória desses peixes (Bedore et al., 1999). Essa interrupção no ciclo natural da espécie interfere diretamente no processo reprodutivo, podendo, assim, levar à extinção das espécies nativas da região. Além disto, o segmento do rio abaixo da barragem torna-se regulável para atender às necessidades de geração de energia elétrica, atenuando a ocorrência de grandes cheias em planícies antes alagáveis. Dessa forma, esses habitats não podem mais cumprir seu papel de maternidade e berçário para os peixes de piracema.

Apesar da criação de espécies nativas como a piracanjuba ainda ser muito pequena (Silva, 2007), existe um grande interesse na utilização deste briconídeo para o repovoamento de reservatórios hidrelétricos e pisciculturas comerciais. O desenvolvimento da piscicultura com espécies nativas é de grande interesse para a conservação da biodiversidade e se constitui prioridade do IBAMA (Conte et al., 1995). As técnicas de cultivo estão sendo desenvolvidas ou melhoradas para que sua produção tenha o rendimento adequado para o piscicultor (Silva, 2007).

A reprodução em cativeiro da piracanjuba tem se mostrado difícil, devido à perda de reprodutores, provavelmente pelo estresse de manejo, que é identificado pela grande descamação, seguida de morte (Ganeco & Nakaghi, 2003).

3.2 Importância da reprodução induzida

A reprodução da maioria dos peixes é sazonal, estando geralmente sincronizada com fatores ambientais que se adequam às necessidades metabólicas dos reprodutores de tal forma que incremente a viabilidade dos gametas e favoreçam o desenvolvimento inicial da prole (Murgas et al., 2003; Oyakama et al., 2006).

A migração das espécies reofilicas significa um deslocamento de centenas de quilômetros que afeta toda a fisiologia desses peixes, desencadeando processos essenciais para o preparo da reprodução. Nos viveiros de piscicultura, a privação deste comportamento migratório impede que esses peixes atinjam o preparo. Com isso, se faz necessária a indução hormonal da desova (Murgas et al., 2003), a fim de que os peixes completem seu ciclo reprodutivo no momento desejado e em condições controladas (Woynarovich, 1989). No entanto, é necessário o aprimoramento das técnicas de reprodução induzida da piracanjuba, a fim de suprir as necessidades que a espécie exige para obtenção de maiores números de larvas e alevinos de boa qualidade.

3.3 Sêmen e morfologia dos espermatozóides

As características seminais são muito variadas entre as espécies de peixes e a sua avaliação é de grande importância para o estabelecimento da fertilização artificial. Para a descrição de um perfil espermático são analisadas características físicas do sêmen (volume, motilidade, vigor e concentração) e as características morfológicas dos espermatozóides (Routray et al., 2007). É

importante o conhecimento desses valores para que se possa avaliar a qualidade do sêmen coletado e, com isso, otimizar sua utilização no processo de fertilização artificial (Viveiros, 2005).

O volume de sêmen e a concentração espermática encontrados nos peixes são bastante variáveis entre as diversas espécies e mesmo dentro de uma mesma espécie, devido à estação do ano, clima, período de repouso sexual e ao método de coleta. Além disso, o tamanho dos reprodutores está intimamente relacionado ao volume de sêmen obtido na coleta (Shimoda, 1999; Silva, 2007).

A composição bioquímica do plasma seminal varia amplamente entre as espécies e entre indivíduos da mesma espécie, relacionando-se às diferentes concentrações de proteínas, lipídios (Lahnsteiner et al., 1996), açúcares e ácidos, responsáveis pelo metabolismo das células espermáticas. A osmolaridade do plasma seminal de espécies de água doce e salgada oscila em torno de 300 a 350 mOsm litro (Morisawa & Susuki, 1980).

Segundo Nagahama (1983), os espermatozoides de peixes podem ser morfológicamente divididos em cabeça, peça intermediária e cauda. Na maioria dos grupos de peixes falta o acrossoma, que ocorre em todos os outros grupos de vertebrados. Todavia, a carência do acrossoma é compensada pela presença da micrópila no ovócito, que facilita a entrada do espermatozoide (Cosson et al., 1999). A peça intermediária consiste de uma bainha mitocondrial disposta em hélice responsável pela geração de energia necessária à propulsão mótil dos espermatozoides (Hafez, 2004).

A cabeça e a cauda dos espermatozoides de *Brycon orbignyanus* apresentam as seguintes características morfológicas: cabeça arredondada destituída de vesícula acrossomal, peça intermediária longa apresentando um colar de mitocôndria na porção anterior, cauda ou flagelo longo com axonema básico (Aires, 1998).

Alterações fisiológicas ou patológicas nos espermatozóides podem ocorrer após o aumento ou a diminuição da osmolaridade do meio que os circunda. Espermatozóides de teleósteos marinhos, quando expostos a uma solução hipotônica, apresentaram intumescência do núcleo, rompimento da membrana plasmática, desaparecimento de mitocôndrias, perda da membrana plasmática flagelar e espiralização, ruptura ou aderência dos axonemas, cujas modificações são limitantes à duração da motilidade espermática (Marques, 2001). Segundo Herman et al. (1994), as patologias primárias (flagelo dobrado, cabeça isolada, gotas citoplasmáticas proximal e distal) ocorrem durante a espermatogênese em decorrência de causas que acometem os reprodutores, tais como enfermidades, consangüinidade, restrição alimentar e estresse ambiental. Por outro lado, as patologias secundárias (flagelo quebrado, enrolado, degenerado, macrocefalia, microcefalia) estariam relacionadas aos procedimentos de manejo durante a coleta do sêmen.

A avaliação morfológica dos espermatozóides de peixes pode auxiliar na caracterização de amostras seminais, fazendo inferência sobre seu potencial fertilizante ou de amostras congeladas de sêmen e explicando insucessos de reprodutores tidos como aptos após análises convencionais de motilidade espermática (Miliorini, 2006).

3.4 Motilidade espermática

Os espermatozóides de peixes são imóveis nos testículos. Durante a reprodução natural a motilidade é induzida depois da liberação dos espermatozóides do trato genital do macho dentro do ambiente aquoso em que os espermatozóides encontram os componentes solúveis da água do meio externo, principalmente íons (Cosson, 2004). A osmolaridade isotônica ao plasma seminal suprime a motilidade espermática em teleósteos marinhos e de água doce. Quando o sêmen é exposto à hipertonicidade da água salgada ou

hipotonicidade da água doce, respectivamente, induz à iniciação da motilidade espermática (Takai & Morisawa, 1995). Em salmonídeos e ciprinídeos de água doce a redução da concentração de potássio ou osmolaridade do ambiente ao redor dos espermatozóides liberados em água doce afeta diretamente o flagelo e regula a iniciação da motilidade espermática (Morisawa et al., 1983). O fluido seminal é rico em muitos nutrientes e íons, alguns dos quais são importantes na manutenção da qualidade espermática quando estocados no estado imóvel no trato genital.

Carolsfeld & Harvey (1999) e Godinho (2000) relatam que a motilidade espermática é um dos principais parâmetros a serem considerados na análise da qualidade do sêmen de peixes. Para tanto, deve-se levar em conta que a motilidade espermática é influenciada por inúmeros fatores como temperatura, estado nutricional, estado sanitário, condições de análise, soluções ativadoras empregadas e espécie estudada.

A diminuição da capacidade de natação dos espermatozóides é originada, em parte, pela diminuição do estoque de energia ocorrida durante o período de motilidade (Billard, 1990; Cosson et al., 1999). A duração da motilidade espermática em peixes de água doce é muito curta e muito variada entre as espécies: 30-40 segundos a 20°C em carpa (Billard et al., 1995) e 486 segundos a 26°C em pacu (*Piaractus mesopotamicus*; Maria et al., 2004). Para piracanjuba, Murgas et al. (2004) obtiveram duração de motilidade variando de 36 a 113 segundos para o sêmen *in natura*.

3.5 Relação sêmen ovócito

O sucesso de programas economicamente produtivos de inseminação artificial depende da máxima utilização dos gametas disponíveis, o que significa fertilizar o maior número de ovócitos com a menor quantidade de espermatozóides (Billard et al., 1996).

Nas pisciculturas não há um protocolo definido em relação à quantidade de sêmen a ser utilizado na fertilização dos ovócitos para muitas espécies de peixes nativos. Com os procedimentos que são adotados atualmente pode haver grande perda de ovócitos ou sêmen, visto que altas concentrações de espermatozóides podem ser um pré-requisito para a fecundação (Rurangwa et al., 2004).

Além de outros fatores, o conhecimento da correta relação espermatozóide/ovócito apresenta também grande importância para o desenvolvimento de programas de criopreservação de sêmen e/ou ovócitos (Denniston et al., 2000), destinados tanto para fins de conservação da biodiversidade da espécie como para o uso em programas de melhoramento genético em pisciculturas.

O teste de fertilização constitui o método que melhor permite avaliar a qualidade seminal (Ribeiro, 2001), sendo seu resultado expresso em percentagem de ovos que atingem a fase de fechamento do blastóporo.

Estudos têm sido realizados no Brasil para determinar a razão ótima de espermatozóides por ovócito em espécies de peixes. Bombardelli et al. (2006) trabalhando com *Rhamdia quelen* observou um efeito linear positivo na taxa de fertilização até a dose de $8,94 \times 10^4$ de espermatozóide/ovócito e, acima deste valor a taxa de fertilização permaneceu constante. Para a piabanha (*Brycon insignis*), Shimoda et al. (2007) observaram o mesmo efeito. No curimatá (*Prochilodus lineatus*, Souza et al. (2007) observaram altas taxas de fertilização dentro de um amplo intervalo de dose inseminante.

É importante observar que a concentração espermática torna-se uma característica relativamente importante quando se fertilizam ovos com um volume constante de sêmen, analisando a capacidade de fertilização de diferentes amostras de sêmen (Rurangwa et al., 2004).

A concentração de espermatozóides no fluido seminal tem sido usada para avaliar a qualidade espermática em peixes. O cálculo da concentração espermática mais utilizado e apropriado é o número de espermatozóides por mL de sêmen, podendo ser complementado pelo volume total. No sêmen de peixe a contagem de espermatozóides é feita através de uma câmara hematimétrica (Maria, 2005). Sêmen altamente concentrado nem sempre oferece elevada motilidade ou altas taxas de fertilização (Geffen & Evans, 2000).

3.6 Congelamento do sêmen

A criopreservação é definida como a preservação ou armazenamento de material vivo ou morto em nitrogênio líquido a uma temperatura de -196°C , por um período de tempo sem afetar a natureza geral do material (Routray et al., 2007). Esta tem sido uma importante técnica na aquicultura que tem contribuído com a preservação, a longo prazo, do sêmen para reprodução artificial de muitas espécies de peixes, embora as taxas de fertilização sejam inferiores às do sêmen *in natura*. A criopreservação tem sido testada para várias espécies como, por exemplo, o dourado *Salminus maxillosus* (Carolsfeld et al., 2003; Coser et al., 1984); a piracanjuba (Bedore, 1999; Carolsfeld et al., 2003; Maria et al., 2006); o bagre africano *Clarias gariepinus* (Viveiros et al., 2000); o matrinxã *Brycon orthotaenia* (Silveira, 2000); o curimatá *Prochilodus lineatus* (Cruz, 2001; Miliorini, 2006; Murgas et al., 2007); e a tilápia-nilótica *Oreochromis niloticus* (Amorim, 2002).

Cada peixe tem características espécie-específicas e cada um destas tem uma variação no crioprotocolo, sendo necessário obter resultado ótimo para cada espécie. O tempo de coleta do sêmen é relevante para o sucesso da criopreservação (Routray et al., 2007).

Bancos de sêmen de peixes são arquivos de materiais genéticos congelados utilizados em piscicultura e em programas de conservação de

espécies ameaçadas. Dentre as aplicações de bancos de sêmen em piscicultura, incluem-se: a) utilização de número adequado de machos na produção massal de alevinos com o propósito de evitar ou reduzir endogenia; b) eliminação de problema de assincronia reprodutiva entre machos e fêmeas; c) facilidade no estabelecimento de programas de melhoramento genético; e) redução de custos relativos à manutenção do plantel de reprodutores machos; f) maior segurança quanto à sanidade do plantel (Ribeiro & Godinho, 2003); e g) oportunidade de transporte de gametas sem perda da viabilidade (Miliorini et al., 2005).

Durante o processo de congelamento a suspensão de espermatozoides atinge temperaturas abaixo do ponto de congelamento do meio (super resfriamento) antes que haja a formação de cristais. No início da formação desses cristais no meio extracelular ocorre troca de água para manter o equilíbrio entre o meio extracelular e o intracelular. Isto ocasiona a desidratação da célula, cuja severidade pode promover desnaturação das macromoléculas e encolhimento excessivo da célula até ocorrer um colapso da membrana (Medeiros et al., 2002). Desta maneira, é necessário colocar os espermatozoides no vapor de nitrogênio líquido antes de serem congelados, para que os espermatozoides sofram um resfriamento gradativo, de forma que as estruturas não sejam muito danificadas, embora o aspecto da cromatina seja consideravelmente modificado (Billard, 1983).

Outro fator importante para se obter bons resultados com sêmen criopreservado consiste no acondicionamento do sêmen diluído em recipiente adequado. Geralmente, o procedimento envolve o envasamento do sêmen diluído em palhetas, que têm sido utilizadas em diferentes capacidades (0,25 mL; 0,5 mL; 1,0 mL; 1,2 mL; 2,5 mL e 5 mL). Segundo Lahnsteiner et al. (1997), a taxa de fertilização realizada com palheta de 1,2 mL foi semelhante à palheta de 0,5 mL para salmonídeos, usando baixa temperatura de congelamento e alta temperatura de descongelamento. A palheta de 5 mL resultou no sucesso

da fertilização de somente 40% do sêmen controle fresco. As palhetas de 0,5 mL são as mais utilizadas entre os pesquisadores no congelamento de sêmen de peixes. Palhetas de 0,25 mL acondicionam pequeno volume de sêmen e palhetas muito calibrosas não proporcionam um descongelamento uniforme, ou seja, a superfície descongela mais rapidamente que a porção central (Carolsfeld & Harvey, 1999).

A taxa de motilidade espermática também é fator importante a ser avaliado antes do congelamento. Cosson et al. (1999) sugerem que uma taxa de motilidade espermática mínima de 90% é adequada para se processar o congelamento do sêmen de peixes e, segundo Cruz (2001), o período de tempo de congelamento não influencia a qualidade do sêmen se este for mantido à temperatura de -196°C.

3.7 Diluidor e diluição do sêmen de peixe

O sêmen de peixe, ao ser congelado, necessita previamente de diluição em soluções contendo diluidor(es) e crioprotetor(es), que são utilizados para prevenir as crioinjúrias dos espermatozóides e a iniciação da motilidade.

Diluidores são soluções de sais ou de carboidratos, que ajudam a manter a viabilidade das células durante a refrigeração. As condições exigidas de um diluidor é que: seja isotônico (que não ative a motilidade espermática); seja estável ao longo do armazenamento; tenha condutividade térmica elevada, permitindo a rápida transferência de temperatura do meio externo para os espermatozóides; seja estéril e também carreador de crioprotetores. É importante que a motilidade dos espermatozóides não seja ativada antes do congelamento e nem durante o descongelamento, pois a mesma pode exaurir a reserva energética necessária à fertilização (Legendre & Billard, 1980).

O diluidor Beltsville Thawing Solution (BTS-Minitub[®]), normalmente utilizado para o resfriamento do sêmen suíno, tem sido empregado no

resfriamento e congelamento do sêmen de peixes como o pacu *Piaractus mesopotamicus* (Miliorini et al., 2002), o curimba *Prochilodus scrofa* (Franciscatto et al., 2002; Murgas et al., 2007) e a piracanjuba (Murgas et al., 2002; Murgas et al., 2004; Maria et al., 2006). Estes trabalhos são pioneiros na adequação do diluidor BTS ao sêmen de espécies de peixes migradores.

As proporções de diluição do sêmen variam entre espécies e mesmo entre pesquisadores. Assim, Carolsfeld et al. (2003) utilizaram uma diluição de 1:3 (sêmen/diluidor) para curimatá, pacu, dourado, piapara, surubim e piracanjuba; Bedore (1999) e Maria (2005) utilizaram 1:4 para piracanjuba; Silveira (2000) utilizou 1:4 para matrinxã; Ribeiro et al. (2003) utilizaram 1:8 para piau-açú; e Viveiros et al. (2000) utilizaram 1:10 para bagre africano.

3.8 Crioprotetores

Os crioprotetores devem ser adicionados ao meio diluidor para que haja uma proteção do espermatozóide durante o congelamento e o descongelamento. Os crioprotetores impedem as criolesões, mas quando usados em concentrações elevadas podem se tornar tóxicos aos espermatozoides. Estas substâncias devem possuir como propriedades: baixa toxicidade para as células e alta solubilidade em água. Podem ser classificadas como intracelulares ou permeáveis e extracelulares ou impermeáveis (Maria, 2005).

A associação entre crioprotetores intracelulares e extracelulares é conveniente e indicada por Carolsfeld & Harvey (1999) e por Godinho (2000).

3.8.1 Crioprotetor intracelular

O crioprotetor intracelular é uma substância química que retira a água da célula e diminui a temperatura na qual o interior da célula é congelado, interferindo também na formação de cristais de gelo por outras formas desconhecidas. Entre os crioprotetores intracelulares mais utilizados podem ser

citados dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol, metanol e etilenoglicol. O DMSO, em concentrações variadas, tem sido usado na criopreservação de sêmen em algumas espécies de peixes (Tabela 1).

TABELA1. Concentrações de DMSO utilizadas na criopreservação de sêmen em espécies de peixes

Espécie	Autor(es)	Concentrações de DMSO %
Surubim (<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>) Curimbatá (<i>Prochilodus lineatus</i>) Pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>) Dourado (<i>Salminus maxillosus</i>) Piapara (<i>Leporinus elongatus</i>) Piracanjuba (<i>Brycon orbignyanus</i>)	Carolsfeld et al. (2003)	10
Piracanjuba	Maria et al.(2006)	10
<i>Danio rerio</i>	Yang et al. (2007)	8
Curimba (<i>Prochilodus lineatus</i>)	Murgas et al. (2007)	10
Curimba	Miliorini (2006)	5; 7,5; 10 e 12,5

O metanol é o crioprotetor intracelular mais permeável à membrana, porém, é o que apresenta maior toxicidade dentro de seu grupo (Bedore, 1999), sendo utilizado em concentrações que variam de 5 a 20% na preservação de sêmen de bagre africano (Viveiros, 2002), pacu (Murgas et al., 2005), piracanjuba (Carolsfeld et al., 2003; Maria et al., 2006) e curimba (Miliorini, 2006; Murgas et al., 2007).

Murgas et al. (2007) constataram que a associação entre BTS e quaisquer crioprotetores internos utilizados (DMSO ou metanol, a 10%) proporcionaram taxas de fertilização para o sêmen descongelado de curimba similares às do sêmen *in natura*.

A proteção proporcionada pelos crioprotetores internos se dá sobre as enzimas lábeis e sobre a estabilidade das proteínas em soluções aquosas não congeladas. A adição destas substâncias ao sêmen estende a tolerância dos espermatozóides a baixas taxas de congelamento.

3.8.2 Crioprotetores extracelular

Os crioprotetores extracelulares funcionam de forma diferente do intracelular: ao invés de entrarem na célula, eles recobrem a superfície celular e estabilizam a membrana, ajudando, portanto, a minimizar e reparar os possíveis danos celulares causados pelo processo de congelamento. A gema de ovo e o leite em pó desnatado são os crioprotetores extracelulares mais comuns (Carolsfeld & Harvey, 1999). A gema de ovo tem sido utilizada como crioprotetor extracelular em algumas espécies de peixes na proporção que varia de 5% em piracanjuba (Maria et al., 2006) a 10% testado em várias espécies de peixes migratórios por Carolsfeld et al. (2003). Neste mesmo trabalho utilizou-se também leite em pó como crioprotetor externo, numa proporção que varia de 5-15%.

Maria et al. (2006), trabalhando com sêmen criopreservado de piracanjuba, testando a adição da gema de ovo como crioprotetor externo, observaram aumento na taxa de motilidade em relação àquele onde não foi utilizada gema de ovo como crioprotetor.

3.9 Descongelamento de sêmen

Enquanto o congelamento envolve a perda de água e a desidratação celular, o descongelamento envolve uma reidratação das células, ocorrendo um influxo de água para seu interior (Holt, 2000).

A maioria das células suporta um descongelamento rápido, mesmo que ela não se hidrate totalmente. A rapidez no descongelamento é necessária para

evitar a recristalização, ou seja, o reagrupamento de pequenos cristais de gelo, formando grandes cristais, letais para a célula (Leung, 1991). As taxas de descongelamento mais bem sucedidas são aquelas que envolvem altas temperaturas e reduzido intervalo de exposição (Scott & Baynes, 1980). Em geral, o descongelamento sob temperaturas entre 50°C e 60°C propicia excelentes resultados (Maria, 2005). Entretanto, cuidados com o superaquecimento devem ser assegurados, segundo este autor.

As palhetas normalmente são descongeladas por imersão em banho-maria (Amorim, 2002; Maria et al., 2006). O sêmen congelado, ao ser retirado do botijão de nitrogênio líquido, deve ser agitado em banho-maria por poucos segundos para descongelamento uniforme (Cruz, 2001). Com palhetas mais calibrosas, este processo se torna inviável porque o descongelamento não é uniforme, ou seja, a superfície descongela mais rápido que a porção central.

Deve-se aquecer a palheta apenas o tempo suficiente para iniciar o descongelamento do conteúdo, de modo que a temperatura da palheta continue a subir mesmo depois de ter sido removida da água quente, completando, assim, o processo de descongelamento (Carolsfeld & Harvey, 1999) e evitando a morte dos espermatozoides.

A taxa de descongelamento de imersão em banho-maria a 60°C por oito segundos foi utilizada no processo de descongelamento de sêmen de piracanjuba por Maria et al. (2006) e de curimba por Murgas et al. (2007). Murgas et al. (2003) avaliaram o efeito de duas condições de descongelamento na duração da motilidade do sêmen de piracanjuba e observaram que o descongelamento feito em imersão em água a 50°C por 10 segundos não foi diferente ao realizado a 60°C por 5 segundos. Os espermatozoides de peixes são células com relativa resistência às variações de temperaturas e suas membranas plasmáticas apresentam elevada hidrossolubilidade. E os meios intra e extracelulares, em interação com os crioprotetores utilizados, apresentam refratariedade à formação

de cristais de gelo em um intervalo térmico compreendido entre 30°C e 60°C (Miliorini, 2006).

O ativador utilizado na ativação espermática após o descongelamento pode influenciar a taxa de motilidade do sêmen. Maria et al. (2006) utilizaram NaCl 50 mM na proporção de 1:5 como solução ativadora do sêmen criopreservado de piracanjuba, apresentando taxas de eclosão próximas de zero. Quando se utilizou como ativador espermático a água do tanque em que os reprodutores estavam, constataram altas taxas de eclosão. Miliorini (2006) observou a influência da solução ativadora na motilidade espermática no sêmen criopreservado de curimba, sendo ativado na proporção 1:6, e observou também que o bicarbonato de sódio 60 mM apresentou taxas e duração da motilidade superiores em relação ao sêmen que é ativado com água destilada. No entanto, a utilização de bicarbonato de sódio como ativador na fertilização, proporcionou uma diminuição significativa na taxa de fertilização em relação ao uso de água como ativador em sêmen criopreservado de curimba, podendo sugerir que o bicarbonato causa danos aos espermatozóides, que prejudicam a fertilização.

3.10 Volume de água utilizado na ativação dos gametas

O volume de água a ser utilizada na ativação dos gametas para fertilização pode limitar os resultados. O volume de água/volume de gametas a ser empregado no método de fertilização deve receber atenção especial. Isto porque quando o volume de água é muito baixo pode comprometer negativamente a ativação dos espermatozóides, devido à inadequada concentração osmótica do meio. Por outro lado, volumes elevados podem impedir o encontro do espermatozóide e a micrópila, devido à diluição excessiva do meio (Chereguini et al., 1999; Bombardelli et al., 2006). Existem poucos trabalhos avaliando o volume de água na fertilização de gametas das espécies

teleósteos, talvez por falta de conhecimento da importância do volume de água adequado a ser utilizado.

Sykora et al. (2007a) verificaram que elevadas diluições do meio proporcionaram maiores tempos de ativação espermática. Além disso, quantidade insuficiente de solução ativadora pode causar obstrução da micropila pelo muco ovariano ou pelo contato com outro óvulo (Zaniboni Filho & Weingartnes, 2007).

Sykora et al. (2007b) observaram relação diretamente proporcional entre as taxas de fertilização e os volumes crescentes de água até a relação 9,89 mL de água/mL de ovócito não hidratado em jundiá cinza (*Rhamdia quelen*). A partir desta relação, as taxas de fertilização permaneceram constantes em função do aumento das relações de volume de água. Sanches et al. (2007) também observaram um modelo linear na relação de volume de água/volume de ovócito utilizado na fertilização de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Contudo, os autores recomendam o uso do menor volume onde se alcançou o máximo desempenho em taxas de fertilização dos ovócitos para que haja maior praticidade na realização do processo de fertilização artificial dos ovócitos.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIRES, E. D. **Características morfológicas e histológicas da via espermática da piracanjuba, *Brycon orbignyanus* (Pisces: Teleóstei)**. 1998. 69 p. Tese (Doutorado em ciências biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.

AMORIM, V. M. C. **Criopreservação de sêmen de tilápia-nilótica (*Oreochromis niloticus*), variedade chitralada**. 2002. 64 p. Dissertação (Mestrado em Zoologia) – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Belo Horizonte.

BEDORE, A. G. **Características e conservação do sêmen de Pacu-caranha (*Piaractus mesopotamicus*) e de Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)**. 1999. 53 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

BILLARD, R. Artificial insemination in fish. In: LAMMING, G. E. (Org.). **Marshall's physiology of reproduction**. 4.thed. Endinburgh: Churchill Livingstone, 1990. Chap. 9, p. 870-887.

BILLARD, R. Ultrastructure of trout spermatozoa: changes after dilution and deepfreezing. **Cell Tissue Research**, New York, v. 228, n.2, p. 205-218, 1983.

BILLARD, R.; COSSON, J.; CRIM, L. W.; SUQUET, M. Sperm physiology and quality. In: BROMAGE, N.R.; ROBERTS, R.J. (Ed.). **Broodstock management and egg and larval quality**. London: Blackwell Science, 1996. p. 25-52.

BILLARD, R.; COSSON, J.; PERCHEC, J.; LINHART, O. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 129, n.1/4, p. 95-112, Jan. 1995.

BOMBARDELLI, R. A.; MORSCHBACHER, E. F.; CAMPAGNOLO, R.; SANCHES, E. A.; SYPERRECK, M. A. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá cinza, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimardm, 1824). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 4, p. 1251-1257, 2006.

CAROLSFELD, J.; GODINHO, H. G.; ZANIBONI FILHO, E.; HARVEY, B. J. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. **Journal Fish Biology**, Oxford, v. 63, n. 2, p. 472-489, Aug. 2003.

CAROLSFELD, J.; HARVEY, B. J. **Conservação de recursos genéticos em peixes: teoria e prática**. Curso de treinamento brasileiro. Tradução de H. P. Godinho. Victoria, Canadá: World Fisheries Trust, 1999. p. 47. Apostila.

CECILIO, B. E.; AGOSTINHO A. A. Estrutura das populações de peixes do reservatório de segredo. In: AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C. (Ed.). **Reservatório de segredo: bases ecológicas para o manejo**. Maringa, EDUEM, 1997. p. 113-139.

CHEREGUINI, O.; DE LA BANDA, I. G.; RASINES, I.; FERNANDEZ, A. Artificial fertilization in turbot, *Scophthalmus maximus*, (L.): different methods and determination of the optimal sperm-egg ratio. **Aquaculture Research**, v. 30, p. 319-324, 1999.

CONTE, L.; BOZANO, G. L. N.; FERRAZ DE LIMA, J. A. Influência do sistema de alimentação no crescimento da piracanjuba, *Brycon orbignyanus*, em gaiolas. **Boletim Técnico do CEPTA**, v. 8, p. 49-59, 1995.

COSER, A. M. L.; GODINHO, H. P.; RIBEIRO, D. Cryogenic preservation of spermatozoa from *Prochilodus scofra* and *Salminu maxillosus*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 37, n. 4, p. 387-390, 1984.

COSSON, J. The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa. **Aquaculture International**, Dordrecht, v. 12, n. 1, p. 69-85, 2004.

COSSON, J.; BILLARD, R.; CIBERT, C.; DRÉANNO, C.; SUQUET, M. Ionic factors controlling the motility of fish sperm. In: GAGNON, C. (Ed.). **The male gamete: from basic science to clinical applications**. Viena: Cache River, 1999. Chap. 16, p. 162-186.

CRUZ, V. L. B. **Criopreservação do sêmen de curimatá (*Prochilodus lineatus*)**. 2001. 60 p. Dissertação (Mestrado em zoologia de vertebrados) – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte.

DENNISTON, R. S.; MICHELET, S.; GODKE, R. A. Principles of Cryopreservation. In: TIERSCH, T. R.; MAZIK, P. M. (Ed.). **Cryopreservation in aquatic species**. Morgantown: The World Aquaculture Society, 2000. p. 59-74.

FRANCISCATTO, R. T.; MURGAS, L. D. S.; MILIORINI, A. B. SILVA, M. O. B. ; LOGATO, P. V. R. Qualidade do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) e taxa de fertilidade após resfriamento a 4°C. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Viçosa, v. 26, n. 3, p. 213-215, 2002.

FREATO, T. A. **Morfometria, rendimento no processamento e inter-relações na avaliação de carcaça de piracanjuba, *Brycon orbignyanus* (VALENCIENNES, 1849)**. 2005. 102 p. Dissertação (Mestrado em zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

GANECO, L. N.; NAKAGHI, L. S. O. Morfologia da micrópila e da superfície dos ovócitos de piracanjuba, *Brycon orbignyanus* (Osteichthyes, Characidae), sob microscopia eletrônica de varredura. **Acta Scientiarum: biological sciences**, Maringá, v. 25, n. 1, p. 227-231, Jan./June 2003.

GEFFEN, A. J.; EVANS, J. P. Sperm traits and fertilization success of male and Sex reversed female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 182, n. 1/2, p. 61-72, Feb. 2000.

GODINHO, H. P. Criopreservação de sêmen de peixes. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 21, n. 203, p. 16-20, mar./abr. 2000.

HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. 7.ed. São Paulo: Manole, 2004. 513 p.

HERMAN, H. A.; MITCHELL, J. R.; DOAK, G. A. **The artificial insemination and embryo transfer of dairy and beef cattle**. Illinois: Interstate, 1994. 392 p.

HOLT, W. V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, Woburn, v. 53, n. 1, p. 47-58, Jan. 2000.

LAHNSTEINER, F.; BERGER, B.; WEISMANN, T.; PATZNER, R. A. Motility of spermatozoa of *Alburnus alburnus* (Cyprinidae) and its relationship to seminal plasma composition and sperm metabolism. **Fish Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 15, n. 2, p. 167-179, Apr. 1996.

LAHNSTEINER, F.; WEISMANN, T.; PATZNER, R. A. Methanol as cryoprotectant and the suitability of 1,2 and 5 ml straws for cryopreservation of semen from salmonid fishes. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 28, n. 6, p. 471-479, June 1997.

LEGENBRE, M.; BILLARD, R. Cryopreservation of rainbow trout sperm by deep-freezing. **Reproduction Nutrition Development**, Paris, v. 20, n. 6, p. 1859-1868, 1980.

LEUNG, L. K. P.; JAMIESON, B. G. M. Live preservation of fish gametes. In: JAMIESON, B. G. M. (Ed.). **Fish evolution and systematics: evidence from spermatozoa**. Cambridge: Cambridge University, 1991. Cap. 19, p. 230-244.

MARIA, A. N. **Diluidores e crioprotetores no resfriamento e congelamento do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)**. 2005. 71 p. Dissertação (Mestrado em zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MARIA, A. N.; VIVEIROS, A. T. M.; FREITAS, R. T. F.; OLIVEIRA, A. V. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. **Aquaculture**, v. 260, p. 298-306, 2006.

MARIA, A. N.; MURGAS, L. D. S.; SILVA, M. O. B.; MILIORINI, A. B.; FRANCISCATTO, R. T.; LOGATO, P. V. R. Influência da adição de iodeto de potássio e citrato de sódio na qualidade do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus* – Holmberg, 1887). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 1, p. 191-195, jan./fev. 2004.

MARQUES, S. **Preservação a curto prazo do sêmen de teleósteos neotropicais de água doce**. 2001. 83 p. Dissertação (Mestrado em Zoologia) – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte.

MEDEIROS, C. M. O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A. T. D.; RODRIGUES, J. L. Current status of sperm criopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, Woburn, v. 57, p. 327-344, Jan. 2002.

MILIORINI, A. B. **Ativadores e concentrações de metanol e dimetilsulfóxido na qualidade do sêmen criopreservado de curimba (*Prochilodus lineatus*)**. 2006. 99 p. Dissertação (mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MILIORINI, A. B.; MURGAS, L. D. S.; PEREIRA, G. J. M. Taxas de fertilização do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) após congelamento. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16., 2005, Goiânia, Goiás. **Resumos...** Goiânia, Goiás: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2005.

MILIORINI, A. B.; MURGAS, L. D. S.; VIVEIROS, A. T. M.; VIVEIROS, A. T. M.; FRANCISCATTO, R. T.; SILVA, M. O. B.; MARIA, A. N. Resfriamento do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) a 4°C, utilizando diferentes concentrações de dimetilsulfóxido. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Viçosa, v.26, n.3, p. 209-211, 2002.

MORISAWA, M.; OKUNO, M.; SUZUKI, K.; MORISAWA, S.; ISHIDA, K. Initiation of sperm motility in teleosts. **Journal Submicroscope Cytology**, Tokyo, v. 15, n. 1, p. 61-65, Jan. 1983.

MORISAWA, M.; SUZUKI, K. Osmolarity and potassium ion: their roles in initiation of sperm motility in teleosts. **Science**, Washington, v. 210, n. 4474, p. 1145-1147, 1980.

MURGAS, L. D. S.; MILIORINI, A. B.; FRANCISCATTO, R. T.; MARIA, A. N. Viabilidade espermática do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) resfriado a 4° C. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 6, p. 1361-1365, 2004.

MURGAS, L. D. S.; MILIORINI, A. B.; FREITAS, R. T. F.; PEREIRA, G. J. M. Criopreservação do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) mediante adição de diferentes diluidores, ativadores e crioprotetores. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 3, p. 526-531, 2007.

MURGAS, L. D. S.; MILIORINI, A. B.; PEREIRA, G. J. M. Qualidade do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) transportado e resfriado a 4°C durante 6 horas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16., 2005, Goiânia. **Resumos...** Goiânia, GO: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2005.

MURGAS, L. D. S.; SILVA, M. O. B.; FRANCISCATTO, R. T.; MILIORINI, A. B.; MARIA, A. N.; OLIVEIRA, S. L.; LOGATO, P. V. R.; FIALHO, E. T. Viabilidade espermática do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) resfriado à 4°C. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 39., 2002, Recife. **Anais...** Recife: SBZ, 2002. 1 CD-ROM.

MURGAS, L. D. S.; VIVEIROS, A. T. M.; MARIA, A. N.; FREITAS, R. T. F.; FREATO, T. A.; SANTOS, V. B. **Reprodução/espécies próprias para a piscicultura**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2003. p. 28. (Curso Lato Sensu. Qualificação Profissional).

NAGAHAMA, Y. The functional morphology of teleost gonads. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J.; DONALDSON, E. M. (Ed.). **Fish physiology**. New York: Academic, 1983. v. 9, p. 233-275.

OYAKAMA, O. T.; AKAMA, A.; MAUTARI, K. C.; NOLASCO, J. C. **Peixes de riachos da Mata Atlântica nas Unidades de Conservação do vale do rio Ribeira de Iguapé no Estado de São Paulo**. São Paulo: Neotrópica, 2006. 201 p.

RIBEIRO, R. I. M. A. **Criopreservação do sêmen do piau-açu *Leporinus macrocephalus* (Garavello e Britski, 1998)**. 2001. 65p. Dissertação (Mestrado em biologia celular) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

RIBEIRO, R. I. M. A.; GODINHO, H. P. Criopreservação do sêmen testicular do teleósteo piau-açu *Leporinus macrocephalus*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 55, n. 1, p. 75-79, Jan./Fev. 2003.

ROUTRAY, P.; VERMA, D. K.; SARKAR, SARANGI, S. K. N. Recent advances in carp seed production and milt cryopreservation. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 33, n. 4, p. 413-427, Dec. 2007.

RURANGWA, E.; KIME, D. E.; OLLEVIERA, F.; NASH, J. P. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 234, n. 1/4, p. 1-28, May 2004.

SANCHES, E. A.; BAGGIO, D. M.; BOMBARDELLI, R. A.; SOUZA, B. E.; PIANA, P. A.; VIDAL, E. Fertilização artificial de ovócitos de pacu *piaractus mesopotamicus* por meio de diferentes volumes de água. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PRODUÇÃO DE PEIXES NATIVOS DE ÁGUA DOCE, 1., 2007, Dourados. **Anais...** Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2007. CD-ROM.

SCOTT, A. P.; BAYNES, S. M. A. Review of the biology, handling and storage of salmonid spermatozoa. **Journal of fish Biology**, London, v. 17, n. 6, p. 707-739, July 1980.

SHIMODA, E. **Caracterização física, química e microscópica do sêmen do pacu *Piaractus mesopotamicus*** Holmberg, 1887. 1999. 61 p. Dissertação (Mestrado em produção animal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ.

SHIMODA, E.; ANDRADE, D. R.; VIDAL JÚNIOR, M. V.; GODINHO, H. P.; YASUI, G. S. Determinação da razão ótima de espermatozóides por ovócitos de piabanha *Brycon insignis* (pisces - characidae). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 4, p. 877-882, 2007.

SILVA, J. M. A. **Características reprodutivas de curimba (*Prochilodus lineatus*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)**. 2007. 75 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SILVEIRA, A. N. **Caracterização espermática, preservação criogênica do sêmen e fertilidade do matrinxã (*Brycon cefálios*)**. 2000. 45 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.

SOUZA, B. E.; SANCHES, E. A.; BAGGIO, D. M.; ROMAGOSA, E.; BOMBARDELLI, R. A.; PIANA, P. A.; VIDAL, E. Interação entre a relação de espermatozóide:ovócito e o volume de água empregados na fertilização artificial de ovócitos de curimatá (*Prochilodus lineatus*) In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PRODUÇÃO DE PEIXES NATIVOS DE ÁGUA DOCE, 1., 2007, Dourados. **Anais...** Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste. 2007. CD-ROM.

SYKORA, R. M.; SANCHES, E. A.; BAGGIO, D. M.; SOUZA, B. E.; BOMBARDELLI, R. A.; VIDAL, E. Efeito da relação volume de sêmen:volume de água sobre o tempo de ativação espermática em jundiá cinza (*Rhamdia quelen*). In: CONGRESSO NACIONAL DE ENGENHARIA DE PESCA, ENGENHARIA QUÍMICA E QUÍMICA, 1., 2007, Toledo, **Anais...** Toledo, PR: Centro de Engenharias e Ciências Exatas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná Campus Toledo, 2007a. CD ROM.

SYKORA, R. M.; BAGGIO, D. M.; SANCHES, E. A.; BOMBARDELLI, R. A.; SOUZA, B. E.; VIDAL, E. Estudo de parâmetros influentes no método de fertilização artificial de ovócitos de jundiá cinza (*Rhamdia quelen*): relação entre volume de água e volume de ovócitos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PRODUÇÃO DE PEIXES NATIVOS DE ÁGUA DOCE, 1., 2007, Dourados. **Anais...** Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste. 2007b. 1 CD-ROM.

TAKAI, H.; MORISAWA, M. Change in intracellular K⁺ concentration caused by external osmolality change regulates sperm motility of marine and freshwater teleosts. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 108, n. 3, p. 1175-1181, Mar. 1995.

VAZ, M. M.; TORQUATO, V. C.; BARBOSA, N. D. C. **Guia ilustrado de peixes da bacia do rio Grande**. Belo Horizonte: CEMIG/CETEC, 2000. 144 p.

VIVEIROS, A. T. M. . Criopreservação de sêmen de peixes. In: XVI Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 2005, Goiânia. **Anais...** XVI Congresso Brasileiro de Reprodução Animal. 2005. CD.

VIVEIROS, A. T. M. **Semen collection and preservation in African catfish, *Clarias gariepinus***. 2002. 143 p. Thesis (PhD) – Wageningen University, Wageningen.

VIVEIROS, A. T. M.; SO, N.; KOMEN, J. Sperm Cryopreservation of African catfish (*Clarias gariepinus*) Cryoprotectants, Freezing Rates and Sperm: Egg Dilution Ratio. **Theriogenology**, New York, v. 54, n. 9, p. 1305-1308, Dec. 2000.

WOYNAROVICH, E. **Propagação artificial de peixes de águas tropicais: manual de extensão**. Brasília: FAO/CODEVASF/CNPQ, 225 p. 1989.

YANG, H.; CARMICHAEL, C.; VARGA, Z. M.; TIERSCH, T. R. Development of a simplified and standardized protocol with potential for high-throughput for sperm cryopreservation in zebrafish *Danio rerio*. **Theriogenology**, v. 68, p. 128-136, 2007.

ZANIBONI FILHO, E.; WEINGARTNER, M. Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 3, p. 367-373, 2007.

CAPÍTULO 2

Avaliação da eficiência de diferentes soluções crioprotetoras no congelamento de sêmen de piracanjuba *Brycon orbignyanus*.

1 RESUMO

FELIZARDO, Viviane de Oliveira. Avaliação da eficiência de diferentes soluções crioprotetoras no congelamento de sêmen de piracanjuba *Brycon orbignyianus*. In: _____. **Manejo reprodutivo da piracanjuba (*Brycon orbignyianus*)**: congelamento de sêmen e taxas de fertilidade. 2008. Cap. 2, p. 29-49. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

O trabalho foi realizado na Estação de Piscicultura da CEMIG em Itutinga e no DMV-UFLA, com objetivo de avaliar os efeitos de duas soluções crioprotetoras intracelular (DMSO e metanol) e duas soluções extracelulares (gema de ovo e lactose) sobre as características seminais pré e pós-congelamento de piracanjuba. Cinco machos do plantel de reprodutores da CEMIG foram induzidos à espermiacção, utilizando extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC). As amostras de sêmen coletadas de cada animal foram diluídas nas soluções crioprotetoras, na proporção de 1:4, acondicionadas em palhetas de 0,5 mL e colocadas em botijão de nitrogênio líquido. As palhetas foram descongeladas por imersão em banho-maria a 60° C, durante 5 segundos. Para taxa e duração da motilidade pré e pós-congelamento os tratamentos foram arranjados segundo um esquema fatorial 2 x 2 x 2. Para alterações morfológicas foram arranjados segundo um esquema fatorial 2 x 2. As médias foram analisadas pelo teste t student, com o auxílio do programa SAS. Não houve diferença (P>0,05) na taxa e duração da motilidade do sêmen pós-descongelamento e análise morfológica entre os diluidores testados. O sêmen de piracanjuba pode ser congelado com soluções contendo DMSO e Metanol como crioprotetores intracelulares e gema de ovo e lactose como crioprotetores extracelulares.

Palavras-chave: criopreservação, dimetilsulfóxido, metanol, gema de ovo e lactose.

¹ Comitê Orientador: Prof. Luis David Solis Murgas – UFLA (Orientador), Prof. Márcio Gilberto Zangeronimo - UNIFENAS, Prof. Paulo dos Santos Pompeu – UFLA (Co-orientadores).

2 ABSTRACT

FELIZARDO, Viviane de Oliveira. Evaluation of the efficiency of different cryoprotector solutions in the freezing of piracanjuba *Brycon orbignyanus* semen. In: _____. **Reproduction management of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*): semen freezing and fertility rates 2008**. Cap. 2, p. 29-49. Dissertation (Masters in Veterinary Science) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.¹

The work was accomplished in the CEMIG Fish Farming Station in Itutinga and in DMV-UFLA, with objective of evaluating the effects of two intracellular cryoprotector solutions (DMSO and metanol) and two extracellular solutions (egg yolk and lactose), on the pre and post-freezing seminal characteristics of piracanjuba. Five males from the CEMIG reproducer stock were induced to spermiation, using crude carp hypophysis extract (CHE). The collected semen samples of each animal were diluted in cryoprotector solutions, in the proportion of 1:4, conditioned in 0.5 mL straws and put in a liquid nitrogen tank. The straws were thawed by immersion in a double boiler (bain marie) at 60° C, for 5 seconds. (For the pre and post-freezing rate and duration of mobility the treatments were arranged in a 2 x 2 x 2 factorial scheme. For morphologic alterations, they were arranged in a 2 x 2 factorial scheme. The averages were analyzed by the t-test student, using the SAS program). There was no significant difference (P>0.05) in the rate and duration of the mobility of the semen post-freezing and morphologic analysis among the tested dilutors. The piracanjuba semen can be frozen with solutions containing DMSO and Methanol as intracellular cryoprotectors and egg yolk and lactose as extracellular cryoprotectors.

Key words: cryopreservation, dimetilsulfóxido, methanol, egg yolk, lactose.

¹ Orientation Committee: Prof. Luis David Solis Murgas – UFLA (Advisor), Prof. Márcio Gilberto Zangeronimo - UNIFENAS, Prof. Paulo dos Santos Pompeu – UFLA (Co-advisor).

3 INTRODUÇÃO

A piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) é uma espécie reofílica encontrada principalmente nos rios Grande e Paraná (Castagnolli, 1992). O macho se reproduz a partir de dois anos de idade, com 20 cm de comprimento, já a fêmea se reproduz a partir do terceiro ano de idade, com 25 cm de comprimento. Esta espécie está desaparecendo de seu habitat natural devido ao desmatamento das margens e assoreamento dos rios (Vaz et al., 2000). A piracanjuba em ambientes de águas paradas não consegue se reproduzir naturalmente, sendo necessária a realização da indução hormonal.

O desenvolvimento de técnicas de reprodução induzida tem como objetivo a obtenção de maior número de alevinos para posterior recuperação da população natural e a conservação em locais de risco para a sua sobrevivência. A rotina de reprodução induzida com sêmen fresco ou congelado revela a possibilidade de limitar o estoque de machos na piscicultura intensiva, propiciando a exploração mais racional de reprodutores geneticamente selecionados e redução nos custos de produção (Silveira et al., 1988).

O sêmen pode ser congelado através do processo de criopreservação, que é uma técnica que envolve procedimentos que permitem o armazenamento de espermatozoides de peixes em nitrogênio líquido, mantendo-se a viabilidade dos gametas por tempo indefinido (Mins et al., 2000).

Durante o processo de criopreservação é necessária a incorporação de soluções diluidoras ao sêmen, para proporcionar meio osmótico e nutricional adequado aos espermatozoides. Estes diluidores consistem de soluções de sais ou de carboidratos, que ajudam a manter a viabilidade das células durante o resfriamento. Um bom diluidor deve ser isotônico, não ativar a motilidade espermática, que geralmente é ativado quando em contato com água, deve ser

estável ao longo do armazenamento, estéril e também carreador de crioprotetores (Maria et al., 2006).

O diluidor BTS (Beltsville Thawing Solution) tem sido normalmente utilizado para o resfriamento do sêmen suíno. Ele tem obtido bons resultados no resfriamento do sêmen de peixes como o pacu *Piaractus mesopotamicus* (Miliorini et al., 2002), a curimba *Prochilodus scrofa* (Franciscatto et al., 2002) e a própria piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Murgas et al., 2004).

Juntamente com o diluidor é necessário o uso de um crioprotetor, para que haja uma proteção do espermatozóide durante o congelamento e o descongelamento (Squires et al., 1999). Estes crioprotetores devem possuir como propriedades uma baixa toxicidade para as células e alta solubilidade em água. Os crioprotetores podem ser classificados como intracelulares ou permeáveis e extracelulares ou impermeáveis.

O crioprotetor intracelular é uma substância química que retira a água da célula durante o processo de congelamento do sêmen, interferindo também na formação de cristais de gelo por outras formas desconhecidas. Entre os crioprotetores intracelulares mais utilizados podem ser citados dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol, metanol e etilenoglicol. Os crioprotetores extracelulares funcionam de forma diferente: ao invés de entrarem na célula, eles recobrem a superfície celular e estabilizam a membrana, ajudando, portanto, a minimizar e reparar os possíveis danos celulares causados pelo processo de congelamento. A gema de ovo e o leite em pó desnatado são os crioprotetores extracelulares mais comuns (Carolsfeld & Harvey, 1999).

Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos de diferentes soluções crioprotetoras associadas ao BTS, sobre as características seminais pré e pós-congelamento de piracanjuba.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local, período e seleção de reprodutores

O experimento foi realizado na Estação de Piscicultura da Companhia Energética de Minas Gerais – CEMIG, em Itutinga, durante o período de piracema nos meses de dezembro de 2006 a janeiro de 2007. Avaliações da taxa e duração da motilidade pré-congelamento foram realizadas no laboratório da CEMIG e as análises morfológicas, de taxa e duração da motilidade pós-congelamento foram realizadas no laboratório de Fisiologia e Farmacologia do DMV/UFLA.

Os reprodutores de piracanjuba foram capturados com redes de arrasto, em tanques de terra. Foram selecionados oito machos com peso médio de 1400 g, que liberaram pequena quantidade de sêmen sob leve massagem sobre a parede da cavidade celomática, sendo assim considerados aptos à reprodução. Após a captura, cada animal foi individualmente pesado, marcado e colocado em aquários de 1000 L, dotados de aeração com troca constante de água. Os reprodutores foram submetidos ao tratamento hormonal para indução da espermiacção, aplicando-se uma dose única de 1 mg de extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC) por kilo de peixe (mg/kg). A dose foi aplicada via injeção intramuscular próximo à base da nadadeira dorsal, conforme protocolo utilizado na CEMIG. Após 196 horas *graus* foi realizada espermiacção e coleta do sêmen (Silva, 2007).

4.2 Coleta e avaliação do sêmen

Antes de se proceder à coleta do sêmen, a papila urogenital foi limpa e enxugada com papel toalha, para que não houvesse ativação dos gametas. Posteriormente, foi realizada massagem sobre a parede celomática do animal sentido crânio-caudal, evitando-se a contaminação do sêmen com fezes, urina,

sangue ou água. Amostras de sêmen foram coletadas em tubos graduados estéreis.

Uma alíquota de 10 μ L de sêmen *in natura* de cada animal foi colocada em uma lâmina histológica de vidro e, a seguir, homogeneizada com 40 μ L de água destilada (Miliorini, 2006). Foi avaliada a motilidade espermática em microscópio óptico de luz, sob aumento de 100 vezes e estimada a percentagem média de espermatozoides móveis observados em três campos. A duração da motilidade espermática foi estimada desde a homogeneização com água destilada até que somente 10% dos espermatozoides se encontrassem móveis. Somente amostras de sêmen de cinco machos que apresentaram motilidade superior a 85% foram utilizadas para criopreservação.

4.3 Diluição e criopreservação do sêmen

Uma amostra de sêmen de cada animal foi diluída em quatro soluções crioprotetoras diferentes (Tabela 1), na proporção de 1:4 (sêmen/solução crioprotetora) (Maria, 2005).

O sêmen diluído foi envasado em palhetas de 0,5 mL, sendo três palhetas por tratamento, que foram vedadas com massa cirúrgica estéril, acondicionadas em raques e colocadas em botijão de vapor de nitrogênio líquido (Taylor-Warton, modelo CP 300, “dry shipper”) para resfriamento. Após 24 horas, as amostras foram transferidas para o botijão de armazenamento (Cryometal, modelo DS-18) e mantidas por cinco dias até o descongelamento.

TABELA 1. Composição dos diluidores utilizados na criopreservação de sêmen de piracanjuba

Crioprotetor	Substâncias	%Diluidores	Diluentes			
			D1	D2	D3	D4
Intracelular	DMSO		8		8	
	Metanol			8		8
Extracelular	Gema de ovo		5	5		
	Lactose				5	5
	BTS		5	5	5	5

¹O volume é complementado para 100 mL com água destilada.

4.4 Descongelamento e avaliação do sêmen

O descongelamento foi realizado por imersão em banho-maria a 60° C, durante oito segundos (Maria, 2005; Miliorini, 2006), sendo descongelada individualmente uma palheta por tratamento. As palhetas foram agitadas durante o procedimento. Após sua retirada da água, elas foram enxugadas com papel toalha, sendo cortada a extremidade com a massa cirúrgica. O sêmen foi depositado em tubo de ensaio estéril e, após ser diluído e descongelado, foi avaliado quanto à porcentagem e duração da motilidade utilizando o mesmo processo que foi usado para avaliação do sêmen *in natura* diluído.

4.5 Avaliação morfológica do sêmen pós-descongelamento

Após o descongelamento das palhetas, uma alíquota de 10 µL foi diluída em 990 µL de solução de formol citrato. Em seguida uma fração de 10 µL foi depositada entre lâmina histológica e lamínula. As análises morfológicas do sêmen descongelado foram realizadas em microscópio óptico de contraste de fase (aumento 1000x em objetiva de imersão). Foram examinados 100 espermatozóides de cada tratamento, focalizados em diversos campos ao longo

da lâmina. Foram avaliadas patologias de cabeça (macrocefalia, microcefalia e isolada), peça intermediária e cauda (enrolada, quebrada e isolada).

4.6 Análise estatística dos dados

4.6.1 Porcentagem e duração da motilidade pré e pós-congelamento

O experimento foi instalado segundo um delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições. Os tratamentos estavam arranjados segundo um esquema fatorial 2 x 2 x 2 (duas condições “pré e pós-congelamento”, dois crioprotetores intracelulares e dois crioprotetores extracelulares). As médias foram comparadas pelo teste F após aplicação do teste de normalidade.

$$y_{ijkl} = \mu + c_i + a_j + b_k + ca_{ij} + cb_{ik} + ab_{jk} + cab_{ijk} + \varepsilon_{ijkl},$$

em que:

y_{ijkl} é o valor da variável dependente na l-ésima repetição que recebeu o i-ésimo nível da condição de congelamento, com o j-ésimo crioprotetor intracelular e k-ésimo crioprotetor extracelular, com l=1, ..., 5;

μ é uma constante inerente a cada observação; c_i é o efeito da i-ésima condição de congelamento, com i= 1, 2;

a_j é o efeito do j-ésimo crioprotetor intracelular, com j= 1, 2;

b_k é o efeito do k-ésimo crioprotetor extracelular, com k= 1, 2;

ca_{ij} é o efeito da interação entre a i-ésima condição de congelamento e j-ésimo crioprotetor intracelular;

cb_{ik} é o efeito da interação entre a i-ésima condição de congelamento e k-ésimo crioprotetor extracelular;

ab_{jk} é o efeito entre o j-ésimo crioprotetor intracelular e k-ésimo crioprotetor extracelular;

cab_{ijk} é o efeito da interação entre a i-ésima condição de congelamento, j-ésimo crioprotetor intracelular e k-ésimo crioprotetor extracelular;

ε_{ijkl} é o erro experimental independente com distribuição normal de média zero e variância constante σ_e^2 .

4.6.2 Alterações morfológicas

O experimento foi instalado segundo um delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições. Os tratamentos estavam arranjados segundo um esquema fatorial 2 x 2 (dois crioprotetores intracelulares e dois crioprotetores extracelulares). O modelo estatístico que descreve as observações é dado por:

$$y_{ijk} = \mu + a_i + b_j + ab_{ij} + \varepsilon_{ijk},$$

em que:

y_{ijk} é o valor da variável dependente na k-ésima repetição que recebeu o i-ésimo crioprotetor intracelular e j-ésimo crioprotetor extracelular, com k=1, ..., 5;

μ é uma constante inerente a cada observação;

a_i é o efeito do i-ésimo crioprotetor intracelular, com i= 1, 2;

b_j é o efeito do j-ésimo crioprotetor extracelular, com j= 1, 2;

ab_{ij} é o efeito entre o i-ésimo crioprotetor intracelular e j-ésimo crioprotetor extracelular;

ε_{ijk} é o erro experimental independente com distribuição normal de média zero e variância constante σ_e^2 .

Todas as variáveis dos experimentos foram analisadas com o auxílio do programa *Statistical Analysis System* (SAS, 1999). Antes de todas as análises, as variáveis foram investigadas quanto à homogeneidade da variância e à normalidade dos resíduos. As médias dos crioprotetores utilizados foram comparadas pelo teste de *t student* a 5%.5

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Motilidade espermática pré e pós-congelamento

Os valores médios da taxa de motilidade do sêmen de piracanjuba pré e pós-congelamento em diferentes soluções crioprotetoras estão representados na Tabela 2. Não houve diferença ($P>0,05$) na taxa de motilidade entre as soluções contendo os diferentes crioprotetores, ou seja, todas as soluções crioprotetoras utilizadas possibilitaram taxas de motilidade espermática semelhantes. Miliorini (2006), em seu trabalho com curimba, observou que a adição de DMSO 10% ou metanol 10% como crioprotetor intracelular não influenciou na taxa de motilidade espermática, sendo o sêmen avaliado após um período de congelamento igual ou superior a uma hora.

Maria et al. (2006) verificaram que a criopreservação de sêmen de piracanjuba em soluções contendo gema de ovo 5% com DMSO 10% ou metanol 10% produziram motilidade superior ao sêmen criopreservado sem o acréscimo de gema de ovo. Eles obtiveram uma taxa de motilidade média de 11%, quando combinaram DMSO e gema de ovo. Esse resultado é inferior ao encontrado neste trabalho que alcançou uma taxa média de motilidade de 28%. Silva (2000) utilizou DMSO 10% e gema de ovo como crioprotetores para o sêmen de curimba. Apesar da taxa de motilidade pré-congelamento ter sido superior a 80% após 2 horas de congelamento, o sêmen foi descongelado e obteve taxa de motilidade nula.

TABELA 2. Valores médios de motilidade (%) do sêmen pré e pós-congelamento (erro padrão), em função dos tratamentos estudados

Condições	Crioprotetor extracelular	Crioprotetor intracelular	
		DMSO	Metanol
Pré-congelamento	Gema	85,00 (4,88)	86,00 (4,88)
	Lactose	94,00	88,00
	Média ¹	89,50 (3,46) A	87,00 (3,46) A
Pós-congelamento	Gema	28,00 (4,88)	22,50 (5,47)
	Lactose	28,00	30,00 (4,88)
	Média	28,00 (3,46) B	26,25 (3,67) B

¹ Médias seguidas de letras diferentes, na coluna, diferem entre si pelo teste *t student* a 5%.

A quantidade de crioprotetor extracelular (gema de ovo e lactose) utilizada neste experimento, de 5% para ambos, pode ter sido insuficiente para alcançar total eficiência na proteção do espermatozóide após o congelamento. Carolsfeld et al. (2003), avaliando o sêmen pós-congelamento de piracanjuba, quando utilizou DMSO 10% e gema de ovo 10% na criopreservação, obtiveram uma taxa média de motilidade de 70% e quando combinaram metanol 10% e de leite em pó 15% obtiveram taxa de motilidade média de 90%. Por outro lado, estes mesmos autores, para o surubim, verificaram que o sêmen que estava criopreservado em soluções contendo DMSO combinado com gema de ovo ou leite em pó, não apresentou nenhuma taxa de motilidade após o congelamento. Isto mostra que, para cada espécie, é necessário um protocolo de diluição e criopreservação diferente.

A taxa de motilidade do sêmen pós-congelamento diminuiu significativamente ($P < 0,05$) em relação ao sêmen pré-congelado. Martinez & Ekwall (1998) afirmam que os processos de congelamento e descongelamento provocam uma grande mortalidade dos espermatozóides, além de danificarem as estruturas celulares (membrana celular, peça intermediária e flagelo), podendo incapacitá-los para a fertilização.

A taxa de motilidade do sêmen *in natura* diluído variou de 85 a 94%. Maria et al. (2006) obtiveram taxa de motilidade para a mesma espécie acima de 87%, quando avaliaram imediatamente após a diluição. Após 48 horas à diluição e resfriamento obtiveram uma taxa variando de 0 a 17%. Este resultado é inferior aos encontrados neste experimento (22,5 a 30%).

Com relação à duração da motilidade, os crioprotetores utilizados não influenciaram ($P>0,05$) esta variável (Tabela 3). Da mesma forma, Murgas et al. (2007) observaram não haver diferença na duração da motilidade de sêmen criopreservado de curimba, onde as soluções crioprotetoras continham DMSO ou metanol como crioprotetores intracelulares.

O tempo de duração da motilidade do sêmen de piracanjuba variou de 73,2 a 91 segundos para o sêmen diluído fresco e de 50,5 a 69,6 segundos para o sêmen diluído descongelado. Para mesma espécie, Murgas et al. (2004) obtiveram uma oscilação da duração da motilidade espermática de 36 a 113 segundos do sêmen *in natura*.

TABELA 3. Valores médios de duração da motilidade (erro padrão), em segundos, em função dos tratamentos estudados

Condições	Crioprotetor extracelular	Crioprotetor intracelular	
		DMSO	Metanol
Pré-congelamento	Gema	87,6 (11,6)	91,0 (11,6)
	Lactose	76,6	73,2
	Média ¹	82,1 (8,2) A	82,1 (8,2) A
Pós-congelamento	Gema	63,2 (11,6)	50,5 (12,9)
	Lactose	69,6	66,2
	Média	66,4 (8,2) B	58,3 (8,7) B

¹Médias seguidas de letras diferentes, na coluna, diferem entre si pelo teste *t student* a 5%.

Murgas et al. (2003) tiveram média de duração da motilidade de 47,16 segundo com sêmen diluído em soluções contendo DMSO 10% e gema de ovo 5%. A duração da motilidade do sêmen de piracanjuba diferiu nas duas condições avaliadas, pré e pós-congelamento ($P < 0,05$). Murgas et al. (2007) observaram comportamento semelhante no sêmen criopreservado de curimba que continham em sua solução crioprotetora DMSO ou metanol.

Cosson et al. (1999) comentam que a duração da motilidade espermática em peixes teleósteos de água doce é muito curta e variada entre as espécies. Entretanto, cabe descobrir qual a duração mínima necessária à obtenção de índices reprodutivos satisfatórios.

5.2 Avaliação morfológica dos espermatozoides

Não foi verificada diferença ($P > 0,05$) entre nenhum dos crioprotetores utilizados (Tabela 4). Miliorini (2006) não observou diferença significativa nas patologias do sêmen de curimba quando criopreservados em soluções contendo DMSO ou metanol.

TABELA 4. Valores médios de porcentagem total de alterações na morfologia dos espermatozoides, em função dos tratamentos estudados

Crioprotetores intracelulares	Crioprotetores extracelulares		Médias ¹ (erro-padrão)
	Gema	Lactose	
DMSO	22,80 (2,92)	18,60 (2,92)	20,70 (2,07) _a
Metanol	26,00	23,40	24,70 _a
Médias (erro-padrão)	24,40 (2,07) _A	21,00 (2,07) _A	22,7
Sêmen <i>in natura</i>	8,00		

¹Médias seguidas de letras minúsculas iguais, na coluna e maiúsculas na linha, não diferem entre si pelo teste *t student* a 5%.

A porcentagem média de patologias totais encontradas no sêmen *in natura* (8%) é inferior às encontradas por Moraes et al. (2004) e Murgas et al. (1998), que constataram uma ocorrência de 9,54% e 40,2% de patologias totais no sêmen *in natura* de curimba, respectivamente. Bombardelli et al. (2006) encontraram 32,1% de alterações morfológicas em sêmen *in natura* de *Rhamdia quelen*.

No presente trabalho, o uso de DMSO permitiu a ocorrência de 20,7% de patologias totais. Miliorini (2006) obteve 27% de patologias totais em sêmen congelado de curimba utilizando DMSO 7,5%.

As patologias espermáticas podem ser influenciadas pelo período de reprodução e pela temperatura. Temperatura abaixo de 21°C não favorece a espermatogênese (Silva, 2007). Neste trabalho, a temperatura média observada durante o experimento foi de 28°C. O tempo gasto entre a aplicação hormonal e a coleta do sêmen também pode influenciar negativamente, quando as células são coletadas após o período de “pico” da reprodução, possibilitando a ocorrência de maiores números de espermatozóides com anormalidades (Kavamoto et al., 1999).

O processo de congelamento causou aumento na porcentagem de anormalidades totais nos espermatozóides em relação ao sêmen *in natura*. Essa diferença era esperada, visto que o congelamento induz a muitas anormalidades morfológicas (Miliorini, 2006).

O Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, CBRA (1998) recomenda não utilizar, na inseminação artificial ou monta natural de mamíferos, sêmen com índice de espermatozóides com anormalidades acima de 30% em bovinos e eqüinos e de 20% em ovinos e suínos. Moraes et al. (2004) registraram índices de espermatozóides de curimba com anormalidades que atingiram valores em torno de 40,2%. Este valor pode ser considerado elevado se comparado aos

aceitáveis para mamíferos. No entanto, em peixes, essas referências ainda não foram estabelecidas.

Da mesma forma, não houve diferença ($P>0,05$) na porcentagem de alterações morfológicas da cabeça dos espermatozoides entre as soluções contendo os diferentes crioprotetores (Tabela 5).

TABELA 5. Valores médios (erro padrão) de porcentagem de alterações na morfologia da cabeça (CAB) dos espermatozoides, em função dos tratamentos estudados

Crioprotetores intracelulares	Crioprotetores extracelulares		Médias ¹
	Gema	Lactose	
DMSO	6,40 (1,67)	3,40 (1,67)	4,90 (1,19) a
Metanol	6,00	4,60	5,30 a
Médias (erro-padrão)	6,20 (1,19) A	4,00 (1,19) A	5,1
Sêmen <i>in natura</i>	3,2		

¹Médias seguidas de letras minúsculas iguais, na coluna e maiúsculas na linha, não diferem entre si pelo teste *t student* a 5%.

Foi verificada média em alterações morfológicas de cabeça de 4,9% e 5,3% nas amostras acrescidas de DMSO e metanol, respectivamente. Estes resultados são inferiores às médias encontradas em sêmen de curimba por Miliorini (2006), que encontrou patologias de cabeça de 24,7% e 15,4% em amostras acrescidas de DMSO e metanol.

Na porcentagem de alterações morfológicas de peça intermediária dos espermatozoides entre as soluções contendo os diferentes crioprotetores nenhuma diferença ($P<0,05$) foi observada (Tabela 6). Esta patologia é, provavelmente, conseqüência da desestabilização das membranas lipoprotéicas das células espermáticas, sobretudo das mitocôndrias, por influência do congelamento (Miliorini, 2006).

TABELA 6. Valores médios de porcentagem de alterações na morfologia da peça intermediária (PI) dos espermatozóides, em função dos tratamentos estudados.

Crioprotetores intracelulares	Crioprotetores extracelulares		Médias ¹ (erro-padrão)
	Gema	Lactose	
DMSO	4,40 (0,71)	4,00	4,20 (0,50) a
Metanol	3,40	4,00	3,70 a
Médias (erro-padrão)	3,90 (0,50) A	4,00 A	3,95
Sêmen <i>in natura</i>	2,2		

¹ Médias seguidas de letras minúsculas iguais, na coluna e maiúsculas na linha, não diferem entre si pelo teste *t student* a 5%.

Por outro lado, foi observada diferença ($P < 0,05$) na porcentagem de alterações morfológicas de cauda dos espermatozóides entre crioprotetores intracelulares (Tabela 7).

O uso DMSO como crioprotetor intracelular do sêmen de piracanjuba reduziu significativamente as alterações morfológicas de cauda em relação ao uso do metanol. Miliorini (2006) constatou, para o sêmen criopreservado de curimba, que o uso de DMSO reduziu a ocorrência de defeitos na cauda. A diminuição desses defeitos pode refletir em taxas de fertilização e eclosão superiores, desconsiderando os fatores relativos aos ovócitos.

TABELA 7. Valores médios porcentagem de alterações na morfologia da cauda (CD) dos espermatozóides, em função dos tratamentos estudados

Crioprotetores intracelulares	Crioprotetores extracelulares		Médias ¹ (erro-padrão)
	Gema	Lactose	
DMSO	8,40 (2,38)	11,20	9,80 (1,68) b
Metanol	16,60	14,80	15,70 (1,68) a
Médias (erro-padrão)	12,50 (1,68)	13,00	12,75
Sêmen <i>in natura</i>	2,6		

¹ Médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna, não diferem entre si pelo teste *t student* a 5%.

6 CONCLUSÃO

O sêmen de piracanjuba pode ser congelado em soluções contendo DMSO 8% e metanol 8% como crioprotetores intracelulares e gema de ovo 5% e lactose 5% como crioprotetores extracelulares.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOMBARDELLI, R. A.; MORSCHBACHER, E. F.; CAMPAGNOLO, R.; SANCHES, E. A.; SYPPERRECK, M. A. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá cinza, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimardm, 1824). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 4, p. 1251-1257, 2006.
- CAROLSFELD, J.; GODINHO, H. G.; ZANIBONI FILHO, E.; HARVEY, B. J. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. **Journal Fish biology**, Oxford, v. 63, n. 2, p. 472-489, Aug. 2003.
- CAROLSFELD, J.; HARVEY, B. J. **Conservação de recursos genéticos em peixes: teoria e prática**. Curso de treinamento brasileiro. Tradução de H. P. Godinho. Victoria, Canada: World fisheries Trust, 1999. p. 47. Apostila.
- CASTAGNOLLI, N. **Piscicultura de água doce**. Jaboticabal: FUNEP, 1992. 189p.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal**. 2.ed. Belo Horizonte, 1998. 49p.
- COSSON, J.; BILLARD, R.; CIBERT, C.; DRÉANNO, C.; SUQUET, M. Ionic factors controlling the motility of fish sperm. In: GAGNON, C. (Ed.). **The male gamete: from basic science to clinical applications**. Viena: Cache River, 1999. Chap. 16, p. 162-186.
- FRANCISCATTO, R. T.; MURGAS, L. D. S.; MILIORINI, A. B. SILVA, M. O. B. ; LOGATO, P. V. R. Qualidade do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) e taxa de fertilidade após resfriamento a 4°C. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Viçosa, v. 26, n. 3, p. 213-215, 2002.
- KAVAMOTO, E. T.; BARNABE, V. H.; CAMPOS, B. E. S. de; ANDRADE-TALMELLI, E. F. de. Anormalidades morfológicas nos espermatozoides do curimatá, *Prochilodus scrofa* (Steidachner, 1881) (osteichthyes, characiformes, prochilodontidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v.25, p.61-66, 1999.

MARIA, A. N. **Diluidores e crioprotetores no resfriamento e congelamento do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)**. 2005. 71 p. Dissertação (Mestrado em zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MARIA, A. N.; VIVEIROS, A. T. M.; FREITAS, R. T. F.; OLIVEIRA, A. V. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. **Aquaculture**, v. 260, p. 298-306, 2006.

MARTINEZ, H. R.; EKWALL, H. Electron microscopy in the assesment of cryopreserved spermatozoa viability. **The Americas Microscopy and Analysis**, p.11-13, May 1998.

MILIORINI, A. B. **Ativadores e concentrações de metanol e dimetilsulfóxido na qualidade do sêmen criopreservado de curimba (*Prochilodus lineatus*)**. 2006. 99 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

MILIORINI, A. B.; MURGAS, L. D. S.; VIVEIROS, A. T. M.; VIVEIROS, A. T. M. ; FRANCISCATTO, R. T. ; SILVA, M. O. B. ; MARIA, A. N. Resfriamento do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) a 4°C, utilizando diferentes concentrações de dimetilsulfóxido. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Viçosa, v.26, n.3, p. 209-211, 2002.

MINS, S. D.; TSVETKOVA, L. I.; BROWN, G. G. Cryopreservation of sperm of sturgeon and paddlefish. In: TIERSCH, T.R.; MAZIK, P.M. (Ed.). **Cryopreservation in aquatic species**. Baton Rouge: World Aquaculture Society, 2000. p.123-129.

MORAES, G. V.; STREIT JR., D. P.; RIBEIRO, R. P.; SAKAGUTI, E. S.; SOUZA, E. D.; POVH, J. A. Ação de diferentes indutores reprodutivos hormonais no aparecimento de anormalidades morfológicas em espermatozóides de piavuçu (*Leporinus macrocephalus*), curimbatá (*Prochilodus lineatus*) e carpa comum (*Cyprinus carpio*). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v.30, n.2, p. 109-116, 2004.

MURGAS, L. D. S.; BARBOSA, M. O.; MELLO, C. B. Características seminais de curimba (*prochilodus lineatus*) capturadas no rio Grande In: CONGRESSO SULAMERICANO DE AQUICULTURA, 1., 1998, Recife. **Anais...** Aquicultura Brasil. Recife: 1998. p. 274.

MURGAS, L. D. S.; MILIORINI, A. B.; FRANCISCATTO, R. T.; MARIA, A. N. Viabilidade espermática do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) resfriado a 4° C. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 6, p. 1361-1365, 2004.

MURGAS, L. D. S.; MILIORINI, A. B.; FREITAS, R. T. F.; PEREIRA, G. J. M. Criopreservação do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) mediante adição de diferentes diluidores, ativadores e crioprotetores. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 3, p. 526-531, 2007.

MURGAS, L. D. S.; VIVEIROS, A. T. M.; MARIA, A. N.; FREITAS, R. T. F.; FREATO, T. A.; SANTOS, V. B. **Reprodução/espécies próprias para a piscicultura**. Lavras: UFLA/FAEPE. 2003. p. 28. (Curso Lato Sensu. Qualificação Profissional).

SAS INSTITUTE. **SAS Procedures guide for computers**. 6 ed. Cary, NC, v.3, 373p. 1999.

SILVA, E. B. **Avaliação comparativa da utilização do sêmen criopreservado e fresco na fertilização dos óvulos de curimatá *Prochilodus lineatus***. 2000 Dissertação (Mestrado em aquicultura) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

SILVA, J. M. A. **Características reprodutivas de curimba (*Prochilodus lineatus*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)**. 2007. 75 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SILVEIRA F. DA, W.; KAVAMOTO, E. T.; RIGOLINO, M. G. et al. Fertilidade do sêmen de truta arco-íris, *Salmo irideus* gibbons, em diferentes concentrações de espermatozóides por óvulo. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.15, n.1, p.51-54, 1988.

VAZ, M. M.; TORQUATO, V. C.; BARBOSA, N. D. C. **Guia ilustrado de peixes da Bacia do Rio Grande**. Belo Horizonte: CEMIG/CETEC, 2000. 144 p.

CAPÍTULO 3

**Dose inseminante utilizada na fertilização artificial de ovócito de
piracanjuba *Brycon orbignyanus*.**

1 RESUMO

FELIZARDO, Viviane de Oliveira. Dose inseminante utilizada na fertilização artificial de ovócito de piracanjuba *Brycon orbignyanus*. In: _____. **Manejo reprodutivo da piracanjuba (*Brycon orbignyanus*):** congelamento de sêmen e taxas de fertilidade 2008. Cap. 3, p.50-68. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

O objetivo do presente estudo foi determinar a relação entre o número de espermatozóide/ovócitos fertilizados na reprodução induzida de piracanjuba. Foram utilizados três casais de piracanjuba selecionados dos tanques de reprodutores da Estação Ambiental de Itutinga (EAI – CEMIG), no período de piracema 2006/2007. Os reprodutores selecionados receberam aplicação de hormônio extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC) para obtenção dos gametas. Adotaram-se quatro tratamentos diferentes para a fertilização, sendo que 0,1 grama de ovócitos foi fertilizado com quatro volumes diferentes de sêmen (10µl, 20µl, 30µl e 40µl). As amostras foram ativadas com 5 mL de água do próprio tanque e, em seguida, levadas para as incubadoras experimentais de 1 litro, arranjadas dentro de um tanque de 1000 litros. As incubadoras possuíam renovação constante de água, à temperatura de 28°C. Após oito horas, analisou-se a taxa de fertilização (ovos viáveis) e 16 horas após a fertilização avaliou-se a taxa de eclosão dos ovos. O experimento foi instalado segundo um delineamento em blocos casualizados com quatro tratamentos e três repetições. As médias foram comparadas pelo teste de tukey a 5%. As relações sêmen/ovócitos testadas não alteraram as taxas de fertilização e eclosão ($P>0,05$). O número de espermatozóides/ovócitos variando de $10,4 \times 10^5$ a $41,6 \times 10^5$ foi eficiente para obtenção de boas taxas de fertilidade.

Palavras-chave: reprodução, gametas, peixes, taxas de eclosão.

¹Comitê Orientador: Prof. Luis David Solis Murgas – UFLA (Orientador), Prof. Márcio Gilberto Zangeronimo - UNIFENAS, Prof. Paulo dos Santos Pompeu – UFLA (Co-orientadores).

2 ABSTRACT

FELIZARDO, Viviane de Oliveira. Inseminating dose used in the artificial fertilization of piracanjuba ovocyte (*Brycon orbignyanus*). In: _____ . **Reproduction management of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)**: semen freezing and fertility rates. 2008. Cap. 3, p. 50-68. Dissertation (Masters in Veterinary Science) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.⁵

Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

The objective of the present study was to determine the relationship between semen volume and number of ovocytes fertilized in the induced reproduction of piracanjuba. Three pair of selected piracanjuba from the reproducer tanks of the Itutinga Environmental Station (EAI-CEMIG) were used, in the 2006/2007 migratory spawning period. The selected reproducers received an application of crude carp hypophysis hormone extract (CHE) for the obtaining of the gametes. Four different treatments were adopted for the fertilization, 0.1 gram of ovocytes being fertilized with four different volumes of semen (10µl, 20µl, 30µl and 40µl). The samples were activated with 5 mL of water from the same tank, and soon afterwards, taken to the 1 liter experimental incubators, arranged inside a 1000 liter tank. The incubators possessed constant water renewal, at a temperature of 28°C. After eight hours, the fertilization rate was analyzed (viable eggs) and 16 hours after the fertilization the hatching rate of the eggs was evaluated. The experiment was installed according to a random block layout with four treatments and three repetitions. The averages were compared by the Tukey Test at 5%. The semen/ovocyte relationships tested didn't alter the hatching rates ($P>0.05$). The number of spermatozoa /ovocytes varying from 10.4×10^5 to 41.6×10^5 were efficient to obtain good fertility rates.

Key words: reproduction, gametes, fish, hatching rate.

⁵ Orientation Committee: Prof. Luis David Solis Murgas – UFLA (Advisor), Prof. Márcio Gilberto Zangeronimo - UNIFENAS, Prof. Paulo dos Santos Pompeu – UFLA (Co-advisor).

3 INTRODUÇÃO

A piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) é uma espécie reofílica originária da bacia do Paraná-Uruguai, principalmente dos rios Grande e Paraná (Castagnolli, 1992). Apresenta rápido crescimento, podendo atingir até 80 centímetros de comprimento corporal e 10 quilogramas. É uma espécie onívora, alimentando-se, eventualmente, de peixes, frutos e insetos. O macho reproduz-se a partir de dois anos de idade, com 20 cm de comprimento. Já a fêmea se reproduz a partir do terceiro ano de idade, com 25 cm de comprimento (Vaz et al., 2000). Apresenta um grande interesse comercial, devido aos bons índices zootécnicos e qualidade de carne, contribuindo, assim, para a pesca predatória desta espécie e, conseqüentemente, a redução dos estoques naturais.

A construção de barragens hidroelétricas também é outro fator que tem contribuído com a diminuição dos exemplares dessa espécie, pois ela interrompe o ciclo natural de reprodução dos peixes de piracema (Vaz et al., 2000). Como medida reparadora, a prática de peixamentos tem sido adotada para recuperação de estoques pesqueiros que, no caso da piracanjuba, tem sido eficiente, visto que, até poucos anos atrás, a espécie já não era mais encontrada no Alto Rio Grande, sendo, agora capturada por pescadores da região devido à sua soltura em peixamentos.

O desenvolvimento de técnicas de reprodução induzida tem colaborado com a prevenção da extinção da piracanjuba, através da obtenção de alevinos para posterior recuperação da população natural da espécie e a conservação em locais de risco para a sua sobrevivência (Murgas et al. 2004).

O sucesso de programas economicamente produtivos de inseminação artificial depende da máxima utilização dos gametas disponíveis, o que significa fertilizar o maior número de ovócitos com a menor quantidade de espermatozóides (Silveira et al., 1988; Billard et al., 1996).

O conhecimento da correta relação espermatozóide/ovócito apresenta grande importância para o desenvolvimento de programas de criopreservação de sêmen e/ou ovócitos, destinados tanto para fins de conservação da biodiversidade da espécie como para o uso em programas de melhoramento genético em pisciculturas (Denniston et al., 2000).

A razão ótima de espermatozoides por ovócito foi estudada em outras espécies como a piabanha *Brycon Insignis* (Shimoda et al., 2007), *Rhamdia quelen* (Bombardelli e al., 2006) e curimatá *Prochilodus lineatus* (Souza et al., 2007). A obtenção da quantidade de espermatozoides para fertilizar uma determinada massa de ovócitos é importante na rotina de reprodução artificial, por permitir a otimização do sêmen, reduzindo o número de reprodutores e a área e gastos demandados para manutenção destes animais. Além disso, seria evitada a utilização de menor quantidade de sêmen do que o necessário, o que poderia implicar em menores percentuais de fertilização (Shimoda et al., 2007).

Este trabalho teve como objetivo determinar a relação entre número de espermatozoides/ovócitos utilizados na reprodução induzida de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local, período e seleção de reprodutores

O experimento foi realizado na Estação de Piscicultura da Companhia Energética de Minas Gerais – CEMIG, em Itutinga, durante o período de piracema nos meses de dezembro de 2006 a janeiro de 2007 e em dias diferentes.

Foram utilizados reprodutores oriundos do plantel da estação da CEMIG. A média de peso das fêmeas foi de 1650 g e para os machos 1400 g, que foram capturados com auxílio de redes de arrasto. Foram selecionados três casais de piracanjuba aptos à reprodução de acordo com as seguintes características externas: para as fêmeas foi a presença de orifício genital avermelhado e cavidade celomática abaulada; para os machos, foram selecionados aqueles que liberavam sêmen sob pequena compressão na parede celomática.

4.2 Indução hormonal e coleta de gametas

Os animais selecionados foram individualmente pesados, marcados e separados por sexo em dois aquários, dotados de aeração e com troca constante de água. Para a indução de liberação de gametas, aplicou-se injeção intramuscular de extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC) por kg de peso corporal. Nas fêmeas foi aplicada uma dose prévia de 0,5 mg e doze horas após a primeira aplicação foi aplicada uma segunda dose de 5 mg EBHC/kg. Para os machos foi ministrada uma dose única de 1 mg/kg de EBHC na hora em que as fêmeas receberam a segunda dose, conforme protocolo utilizado na piscicultura da CEMIG.

Aproximadamente 196 horas após a aplicação do hormônio, foi realizada a coleta de gametas a seco (enxugando as genitálias e regiões adjacentes dos reprodutores), mediante massagem na região ventral do animal sentido crânio-caudal. O sêmen foi coletado em tubos de ensaio esterilizados e a

desova em béquer limpos e secos. Logo após a coleta, foi verificada a ausência de contaminantes como fezes, urina ou sangue no sêmen. Uma alíquota de sêmen foi coletada para se estimar a concentração espermática. Foram coletados dados dos machos utilizados na fertilização, como peso corporal e motilidade do sêmen *in natura*.

4.3 Fertilização

Do material coletado de cada fêmea foram separadas 12 amostras de 0,1 g de ovócito cada, acondicionados em copos plásticos de 50 mL. As amostras foram fertilizadas com quatro volumes diferentes de sêmen (Tabela 1), sendo realizadas três repetições para cada dose. Foi coletado 0,1 g de ovócito para estimar o número de ovócitos. Posteriormente à mistura do sêmen e ovócitos a seco, os gametas foram ativados com 5 mL de água do próprio tanque onde estavam os reprodutores, com uma temperatura de 28°C. Após a fertilização, os ovos foram encaminhados para incubadoras experimentais de PVC, com capacidade de um litro, localizadas dentro de uma caixa de 1000 litros contendo água corrente constante. A temperatura da água dos tanques se manteve constante em média de 28°C.

TABELA 1. Descrição dos tratamentos efetuados, quantidade de ovócito(g)/volume de sêmen (μL)

Tratamento	Quantidade ovócitos (g)	Volume de sêmen (μL)
1	0,1	10
2	0,1	20
3	0,1	30
4	0,1	40

As taxas de fertilização foram avaliadas oito horas após a ativação dos gametas, realizando a avaliação de todos os ovos em microscópio estereoscópico binocular. A taxa de fertilização foi estimada usando a fórmula empregada por Silva (2007): $TF = [E / (E+I)] \times 100$; onde:

TF: taxa de fertilização;

E: número de embriões viáveis;

I: número de ovos inviáveis.

A taxa de eclosão das larvas foi avaliada 16 horas após a ativação dos gametas. Foram contadas todas as larvas em microscópio estereoscópico binocular. A taxa de eclosão foi estimada utilizando a fórmula:

$$TE = LA / TF \times 100$$

Em que:

TE: taxa de eclosão;

LA: número de larvas;

TF: taxa de fertilização.

4.4 Avaliação da concentração espermática

A avaliação da concentração espermática foi realizada no laboratório de Fisiologia e Farmacologia do DMV/UFLA, com o auxílio de câmara hematómica tipo Neubauer. Uma alíquota de 10 μL de sêmen foi acrescentado a 990 μL de solução de formol citrato (2,9 g de citrato de sódio, 4 mL de solução comercial de formaldeído 35% e água destilada q.s.p. 100 mL). Dessa diluição foi retirado 10 μL e rediluído em 990 μL de solução de formol citrato, resultando em uma diluição final de 1:10⁴. Uma alíquota de sêmen diluído foi colocada na câmara de Neubauer ao microscópio óptico e o valor obtido foi multiplicado pelo fator de correção 50.000, encontrando-se, assim, a quantidade de células por mm^3 . A transformação em espermatozoides/mL foi realizada multiplicando-se os valores encontrados por 10³.

O número de espermatozoides/ovócito foi estimado da seguinte forma:

$EO = ET / O$, onde:

EO: número de espermatozoides por ovócito;

ET: número total de espermatozoides para cada tratamento;

O: número de ovócitos em 0,1 g.

Onde,

$ET = E/1000 \times DT$;

E: espermatozoides por mL (divide por 1000 para se encontrar o valor em μL);

DT: dose do tratamento.

4.5 Análise estatística

O experimento foi instalado segundo um delineamento em blocos casualizados com quatro tratamentos (10, 20, 30 e 40) e três repetições. O modelo estatístico que descreve as observações é dado por:

$$y_{ijk} = \mu + t_i + b_j + tb_{ij} + \varepsilon_{ijk},$$

em que:

y_{ijk} é o valor da variável dependente na k-ésima repetição do j-ésimo casal que recebeu a i-ésima diluição, com $k=1, 2, 3$;

μ é uma constante inerente a cada observação; t_i é o efeito da i-ésima diluição, com $i = 1, \dots, 4$;

b_j é o efeito do j-ésimo casal considerado como bloco, com $j = 1, 2, 3$;

tb_{ij} é o efeito da interação da i-ésima diluição com o j-ésimo casal, considerado erro experimental;

ε_{ijk} considerado erro amostral, considerado aleatório, normalmente distribuído, com média zero e variância σ_ε^2 .

Todas as variáveis dos experimentos foram analisadas com o auxílio do programa *Statistical Analysis System* (SAS, 1999). Antes de todas as análises, as variáveis foram investigadas quanto à homogeneidade da variância e à normalidade dos resíduos.

As médias dos volumes de sêmen utilizados foram comparados pelo teste de tukey a 5%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados e características seminais dos três machos utilizados na fertilização de ovócitos de piracanjuba estão apresentados na Tabela 2. A concentração espermática média avaliada dos reprodutores foi de $10,4 \times 10^9$ espermatozóides/mL (variando de 7,3 a $13,6 \times 10^9$ - Tabela 2). Este resultado é superior ao encontrado por Maria et al. (2006) para a mesma espécie, que obtiveram uma média de concentração espermática de $5,4 \times 10^9$ espermatozóides/mL; Murgas et al. (2004) encontraram média de $8,21 \pm 2,26 \times 10^9$ espermatozóides/mL. A média de ovócitos encontrados em 0,1 g de material colhido das fêmeas foi de 100 ovócitos.

TABELA 2. Dados e características seminais dos machos utilizados na fertilização de ovócitos de piracanjuba

Animal	Data de Fertil.	Motil.(%)	Peso (g)	Conc.sptz/mL ($\times 10^9$)
1	07/12/06	100	1500	7,3
2	17/12/06	100	1300	13,6
3	11/01/07	100	1500	10,3

Fertil. Fertilidade; motil. Motilidade; conc. Concentração; sptz. Espermatozóides.

A taxa de fertilidade média não apresentou efeito significativo ($P > 0,05$) entre os tratamentos (Tabela 3), sugerindo que o número de espermatozóides/ovócitos variando de $10,4 \times 10^5$ a $41,6 \times 10^5$ (Tabela 4) é eficiente para obtenção de boas taxas de fertilidade e, ainda, que altas taxas de fertilização possam ser obtidas dentro um amplo intervalo de doses inseminantes.

TABELA 3. Valores médios de porcentagem de ovos viáveis (erro padrão) em função dos tratamentos estudados - fertilização

Diluições	Blocos ¹			Médias ¹
	C1	C2	C3	
10	38,98 (5,58) b	87,00 a	48,84 a	58,27 (6,18)a
20	45,03 ab	90,66 a	37,86 a	57,85 a
30	50,34ab	76,96 a	38,08 a	55,12 a
40	69,75 a	84,88 a	32,70 a	62,44 a
Médias ²	51,02 (5,35) B	84,87 A	39,37 B	

¹ Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula, na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. C – casal.

TABELA 4. Número médio de espermatozóides/ovócito encontrados em cada tratamento utilizado

Tratamentos (μ L de sêmen)	Nº de sptz/ovócito ¹ ($\times 10^5$)
10	10,4
20	20,8
30	31,2
40	41,6

¹ sptz. Espermatozóides

Efeito semelhante foi observado por Tvedt et al. (2001), que avaliando doses de sêmen na taxa de fertilização de *Atlantic halibu*, não evidenciaram efeito das doses inseminantes no intervalo de 9×10^5 a 5×10^8 espermatozóides/ovócito.

Shimoda et al. (2007), avaliando a melhor proporção espermatozóide/ovócito para piabanha (*Brycon insignis*), onde os tratamentos variavam de $8,6 \times 10^4$ a $43,3 \times 10^4$ espermatozóides/ovócito, observaram que as taxas médias de fertilização aumentaram gradativamente até a proporção de $34,6 \times 10^4$ espermatozóides/ovócito. Quando a proporção foi aumentada para $43,3 \times$

10^4 , a percentagem de ovócitos fertilizados permaneceu praticamente a mesma, concluindo haver uma tendência de estabilização.

Bombardelli et al. (2006), trabalhando com cinco concentrações diferentes de sêmen de *Rhamdia quelen*, obtiveram efeito entre os tratamentos ($P < 0,05$), sugerindo um comportamento linear positivo para taxa de fertilização até a dose de $8,94 \times 10^4$ de espermatozóides/ovócito. Estes autores verificaram ainda um *plateau*, ou seja, o aumento da concentração de espermatozóides acima deste valor não apresentou efeito sobre esta taxa, permanecendo constantes.

Souza et al. (2007) observaram que as relações de espermatozóide/ovócito que proporcionaram as melhores taxas de fertilização para o curimatá foram de $1 \times 10^{5,5}$ a $1 \times 10^{6,5}$. Rana & McAndrew (1989) verificaram que doses inseminantes ideais para Turbot (*Scopthalmus maximus*) foram aquelas acima de 9×10^3 espermatozóides/ovócito. Para carpa comum (*Ciprinus carpio*), Chereguini et al. (1999) recomendam doses de $8,49 \times 10^3$ a $23,67 \times 10^3$ espermatozóides/ovócito.

Embora mesmo não havendo sido encontrada diferença ($P > 0,05$) entre os tratamentos quando se avaliou a média geral, pôde-se observar o efeito dos tratamentos no casal 1, onde, o volume de 40 μL apresentou maior eficiência significativa ($P < 0,05$) na taxa de fertilização em relação ao volume de 10 μL . Este fato pode ser explicado pela influência da concentração espermática (7,3 – Tabela 2), que foi a menor em relação às demais, necessitando assim de uma dose maior de sêmen para se obter máxima eficiência. Silva (2007) afirma que a concentração espermática é influenciada pelo período de reprodução em que o macho espermeia. Em curimba este autor relata que, ao final do ano reprodutivo em janeiro, os machos de curimba apresentaram o sêmen com maior concentração de espermatozóides por mm^3 . Estes estudos ainda não foram realizados para a piracanjuba, mas sugere um comportamento semelhante, onde há um período ótimo para reprodução.

A taxa de fertilização obtida pelos técnicos da piscicultura da CEMIG que utilizaram o casal 3 na reprodução, foi de 45%, sendo neste experimento o casal que apresentou as menores taxas de fertilidade e eclosão em relação aos demais (Tabela 3 e 5). A análise prévia do sêmen *in natura* indicou que este estava em ótimas condições (motilidade 100%) para ser utilizado na fertilização dos ovócitos. Este fato leva a pressupor que as taxas de fertilização e eclosão obtidas podem ter sido influenciadas pela qualidade da desova, visto que a extrusão dos ovócitos foi dificultada nesta fêmea.

Baldisserotto (2002) relata que as características utilizadas para seleção dos reprodutores aptos à reprodução são genéricas para a maioria dos teleósteos e podem promover a seleção de reprodutores que já passaram do período ótimo para a indução de reprodução, resultando numa menor viabilidade dos ovos.

É provável que o tempo de motilidade espermática influencie as taxas de fertilidade em piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) por ser bastante reduzido (de 36 a 113 segundos) (Murgas et al., 2004), quando comparado a outras espécies, como o Turbot (1 a 17 min ; Chereguini et al., 1999). Neste experimento todos os procedimentos foram executados em menor tempo possível para se evitar que o tempo gasto com a manipulação dos gametas masculinos e femininos viesse a influenciar os resultados negativamente. Huergo (2004) em estudo com triploidia em *Rhamdia quelen*, no qual foram testados dois controles de fertilização, um antes e outro após os tratamentos, verificou diminuição de 74 para 55% nas taxas de fertilização ao longo do tempo.

A taxa de eclosão não apresentou diferença ($P > 0,05$) entre os tratamentos estudados, mostrando que os volumes de sêmen utilizados são eficientes na obtenção de larvas de piracanjuba (Tabela 5).

O casal 2 foi o que apresentou as melhores taxas de fertilização e eclosão ($P < 0,05$). Estes resultados parecem estar relacionados à concentração espermática apresentada pelo sêmen utilizado na fertilização, que foi a maior

entre os animais utilizados neste experimento. Isto nos leva a sugerir que sêmen com concentrações mais elevadas proporcionam uma maior taxa de fertilização.

A capacidade de fertilização dos peixes pode variar entre espécimes, pois vários fatores podem interferir no processo, entre eles, o tamanho e qualidade do ovócito, o tempo de motilidade espermática e a distância percorrida pelos espermatozoides. Cada reprodutor deve ter seus gametas analisados para determinar seu potencial ótimo de fertilização (Suquet et al., 1995).

TABELA 5. Valores médios de porcentagem de eclosão (erro padrão) em função dos tratamentos estudados

Diluições	Blocos ¹			Médias ¹
	C1	C2	C3	
10	59,37 (8,06)	87,92	37,91	61,73 (3,49)
20	75,94	82,51	32,12	63,52
30	66,06	84,59	27,58	59,41
40	82,94	92,87	39,05	71,62
Médias	71,08(3,03) B	86,97 A	34,16 C	

¹ Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey com um nível nominal de significância de 5%.

6 CONCLUSÃO

Para que haja um maior proveito de gametas na reprodução induzida de piracanjuba é aconselhável a utilização de $10,4 \times 10^5$ de espermatozoides/ovócito.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de peixe aplicada à piscicultura**. Santa Maria: UFSM, 2002. 212 p.
- BILLARD, R.; COSSON, J.; CRIM, L. W.; SUQUET, M. Sperm physiology and quality. In: BROMAGE, N. R.; ROBERTS, R. J. (Ed.). **Broodstock management and egg and larval quality**. London: Blackwell Science, 1996. p. 25-52.
- BOMBARDELLI, R. A.; MORSCHBACHER, E. F.; CAMPAGNOLO, R.; SANCHES, E. A.; SYPERRECK, M. A. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá cinza, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 4, p. 1251-1257, 2006.
- CASTAGNOLLI, N. **Piscicultura de água doce**. Jaboticabal: FINEP, 1992. 189 p.
- CHEREGUINI, O.; DE LA BANDA, I. G.; RASINES, I.; FERNANDEZ, A. Artificial fertilization in turbot, *Scophthalmus maximus*, (L.): different methods and determination of the optimal sperm-egg ratio. **Aquaculture Research**, v. 30, p. 319-324, 1999.
- DENNISTON, R. S.; MICHELET, S.; GODKE, R. A. Principles of Cryopreservation. In: TIERSCH, T. R.; MAZIK, P. M. (Ed.). **Cryopreservation in aquatic species**. Morgantown: The World Aquaculture Society, 2000. p.59-74.
- HUERGO, G. P. C. M. **Indução à triploidia no jundiá *Rhamdia quelen*, Quoy & Gaimard, 1824) através do choque de pressão hidrostática**. 2004. 42p. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- MARIA, A. N.; VIVEIROS, A. T. M.; FREITAS, R. T. F.; OLIVEIRA, A. V. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. **Aquaculture**, v. 260, p. 298-306, 2006.

MURGAS, L. D. S.; MILIORINI, A. B.; FRANCISCATTO, R. T.; MARIA, A. N. Viabilidade espermática do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) resfriado a 4° C. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 6, p. 1361-1365, 2004.

RANA, K. J.; MCANDREW, B. J. The viability of cryopreserved tilapia spermatozoa. **Aquaculture**, v.76, n.3-4, p.335-345, 1989.

SAS Institute. **SAS Procedures guide for computers**. 6 ed. Cary, NC, 1999. v.3, 373p.

SHIMODA, E.; ANDRADE, D. R.; VIDAL JÚNIOR, M. V.; GODINHO, H. P.; YASUI, G. S. Determinação da razão ótima de espermatozoides por ovócitos de piabanha *Brycon insignis* (pisces - characidae). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 4, p. 877-882, 2007.

SILVA, J. M. A. **Características reprodutivas de curimba (*Prochilodus lineatus*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)**. 2007. 75 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SILVEIRA F. DA, W.; KAVAMOTO, E. T.; RIGOLINO, M. G. TABATA, Y. A. Fertilidade do sêmen de truta arco-íris, *Salmo irideus* gibbons, em diferentes concentrações de espermatozoides por óvulo. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.15, n.1, p.51-54, 1988.

SOUZA, B. E.; SANCHES, E. A.; BAGGIO, D. M.; ROMAGOSA, E.; BOMBARDELLI, R. A.; PIANA, P. A.; VIDAL, E. Interação entre a relação de espermatozoide. ovócito e o volume de água empregados na fertilização artificial de ovócitos de curimatá (*Prochilodus lineatus*) In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PRODUÇÃO DE PEIXES NATIVOS DE ÁGUA DOCE, 1., 2007, Dourados. **Anais...** Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste. 2007. CD-ROM.

SUQUET, M.; BILLARD, R.; COSSON, J. NORMANT, Y. & FAUVEL, C. Artificial insemination in turbot (*Scophthalmus maximus*) : determination of the optimal sperm to egg ratio and time of gamete contact. **Aquaculture**, v.133, p. 83-90, 1995.

TVEDT, H. B.; BENFEY, T. J.; MARTIN-ROBICHAUD, D. J.; POWER, J.
The relationship between sperm density, spermatocrit, sperm motility and
fertilization success in Atlantic halibut, *hippoglossus hippoglossus*.
Aquaculture, v.194, p.191-200, 2001.

VAZ, M. M.; TORQUATO, V. C.; BARBOSA, N. D. C. **Guia ilustrado de
peixes da bacia do rio Grande**. Belo Horizonte: CEMIG/CETEC, 2000. 144 p.

CAPÍTULO 4

Fertilização de ovócitos de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) utilizando diferentes volumes de água na ativação

1 RESUMO

FELIZARDO, Viviane de Oliveira. Fertilização de ovócitos de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) utilizando diferentes volumes de água na ativação dos espermatozóides. In: _____. **Manejo reprodutivo da piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)**: congelamento de sêmen e taxas de fertilidade. 2008. Cap. 4, p. 69-81. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

O presente experimento foi realizado com o objetivo de avaliar os efeitos do uso de diferentes volumes de água como solução ativadora dos espermatozóides sobre as taxas de fertilização artificial de ovócitos de piracanjuba. Foram utilizados quatro casais de piracanjuba selecionados dos tanques de reprodutores da Estação Ambiental de Itutinga - MG (EAI – CEMIG), no período de piracema de 2007/2008. Os animais receberam indução hormonal de extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC), para obtenção dos gametas. Os gametas foram coletados a seco, mediante massagem sentido crânio-caudal nos animais. Amostras de 0,1 g de ovócito de cada fêmea foram fertilizados com 10 μ L de sêmen, sendo utilizado para ativação dos gametas, quatro doses diferentes de água do tanque (5, 10, 20 e 40 mL de água) com duas repetições para cada amostra. Após a ativação, os ovos foram encaminhados para incubadoras experimentais de 1 litro, arranjadas dentro de um tanque de 1000 litros, com renovação constante de água, à temperatura média de 28°C. Após oito horas, analisou-se a taxa de fertilização (ovos viáveis). O experimento foi instalado segundo um delineamento em blocos casualizados com quatro tratamentos e duas repetições. As médias foram comparadas pelo teste de tukey a 5%. Os volumes de água testados não alteraram as taxas de fertilidade ($P>0,05$). Recomenda-se o uso de 5 mL de água para ativação dos espermatozóides, para que haja praticidade durante a realização do processo.

Palavras -chave: reprodução induzida, gametas, peixes.

¹Comitê Orientador: Prof. Luis David Solis Murgas – UFLA (Orientador), Prof. Márcio Gilberto Zangeronimo - UNIFENAS, Prof. Paulo dos Santos Pompeu – UFLA (Co-orientadores).

2 ABSTRACT

FELIZARDO, Viviane de Oliveira. Fertilization of ovocytes of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) using different volumes of water in the activation of the spermatozoa. In: _____. **Reproduction management of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)**: semen freezing and fertility rates. 2008. Cap. 2, p. 69-81. Dissertation (Masters in Veterinary Science) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.⁶

The present experiment was accomplished with the objective of evaluating the effects of the use of different volumes of water as an activating solution for the spermatozoa on the rates of artificial fertilization of piracanjuba ovocytes. Four couples of selected piracanjuba from the Itutinga Environmental Station reproducer tanks were used - MG (EAI-CEMIG), in the migratory spawning period of 2007/2008. The animals received hormonal induction of crude carp hypophysis extract (CHE), for obtaining of the gametes. The gametes were dry collected, via cranial-caudal massage of the animals. Ovocyte samples of 0.1 g from each female were fertilized with 10µl of semen, using four different tank water doses (5, 10, 20 and 40 ml) for gamete activation, doing two repetitions for each sample. After activation the eggs were placed 1 liter experimental incubators, arranged inside a 1000 liter tank, with constant water renewal, at an average temperature of 28°C. After eight hours, the fertilization rate was analyzed (viable eggs). The experiment was installed according to a random block layout with four treatments and two repetitions. The averages were compared by the Tukey Test at 5%. The volumes of water tested didn't alter the fertility rates ($P>0.05$). The use of 5 ml of water is recommended for activation of the spermatozoa, so that there is practicality during the accomplishment of the process.

Key words: induced reproduction, gametes, fish.

⁶ Orientation Committee: Prof. Luis David Solis Murgas – UFLA (Advisor), Prof. Márcio Gilberto Zangeronimo - UNIFENAS, Prof. Paulo dos Santos Pompeu – UFLA (Co-advisor).

3 INTRODUÇÃO

A piracanjuba, *Brycon orbignyanus*, é uma espécie teleósteo encontrada nas bacias dos rios Grande, Paranaíba e Paraguai (Godoy, 1975). É uma espécie de peixe migratória e, devido às modificações ambientais provocadas pelo homem, a população dessa espécie está desaparecendo, constando na lista de espécies em extinção em Minas Gerais/Brasil (Vaz et al., 2000). A piracanjuba tem demonstrado características satisfatórias para o cultivo quanto aos seus rendimentos no processamento, quando comparadas a outras espécies cultivadas (Freato, 2005). Para sua reprodução em cativeiro é necessária a indução hormonal para liberação de gametas.

As técnicas de reprodução artificial empregadas nas pisciculturas para as espécies nativas brasileiras incluem um processo rudimentar e de certa forma empírico, através da mistura da água com a massa de esperma e ovócitos secos, a qual pode apresentar limitações quanto à obtenção dos resultados. Tais limitações podem estar relacionadas aos métodos de fertilização, dentre os quais o estudo das relações volume de água/quantidade de gametas empregadas deve receber atenção especial.

Relações muito baixas entre volume de água/quantidade de gametas podem comprometer negativamente a ativação dos espermatozóides, devido à inadequada concentração osmótica do meio. Por outro lado, relações elevadas podem impedir o encontro do espermatozóide e a micrópila, devido à diluição excessiva do meio (Chereguini et al., 1999). Deste modo, para se obter melhores taxas de fertilização dos ovócitos, a quantidade de solução ativadora precisa ser bem dimensionada (Zaniboni-Filho & Weingartner, 2007).

O presente trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar os efeitos do emprego de diferentes volumes de água como solução ativadora dos espermatozóides sobre as taxas de fertilização de ovócitos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local, período e seleção de reprodutores

O experimento foi realizado na Estação de Piscicultura da Companhia Energética de Minas Gerais – CEMIG, em Itutinga, durante o período de piracema nos meses de dezembro de 2007 a janeiro de 2008.

Foram utilizados reprodutores oriundos do plantel da estação da CEMIG. A média de peso das fêmeas foi de 1800 g e para os machos 1100 g, que foram capturados com auxílio de redes de arrasto. Foram selecionados quatro casais de piracanjuba aptos à reprodução de acordo com características externa, que, para as fêmeas, era presença de orifício genital avermelhado e cavidade celomática abaulada e, para os machos, foram selecionados aqueles que liberavam sêmen sob pequena compressão na parede celomática.

Os animais selecionados foram individualmente pesados, marcados e separados por sexo em dois aquários, dotados de aeração e com troca constante de água, a uma temperatura de aproximadamente 28°C.

Para a indução de liberação de gametas, aplicou-se injeção intramuscular de extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC) por kg de peso corporal. Nas fêmeas se aplicou uma dose prévia de 0,5 mg, doze horas após a primeira aplicação, foi aplicada uma segunda dose de 5 mg EBHC/kg. Para os machos foi ministrada uma dose única de 1 mg/kg de EBHC na hora em que as fêmeas receberam a segunda dose, conforme protocolo empregado pelos técnicos da CEMIG.

4.2 Coleta e fertilização dos gametas

Aproximadamente 196 horas após a aplicação do hormônio foi realizada a coleta de gametas a seco (enxugando as genitálias e regiões adjacentes dos reprodutores), mediante massagem na região ventral do animal sentido crânio-caudal. O sêmen foi coletado em tubos de ensaio esterilizados e a

desova em béquer, limpos e secos. Logo após a coleta foi verificada a ausência de contaminantes como fezes, urina ou sangue no sêmen. Uma alíquota de sêmen foi coletada para se estimar a concentração espermática.

Do material coletado de cada fêmea foram separadas 8 amostras de 0,1 g de ovócito cada, acondicionados em copos plásticos de 100 mL. As amostras foram fertilizadas com 10 µL de sêmen. O sêmen *in natura* foi avaliado quanto a sua motilidade, mediante ativação com água e verificada motilidade acima de 98% antes de ser utilizado. Os gametas foram ativados com quatro volumes diferentes de água do tanque (Tabela 1) em que estavam os reprodutores, sendo realizadas duas repetições para cada volume. A temperatura da água dos tanques se manteve constante em média de 28°C.

TABELA 1. Descrição dos tratamentos efetuados volume de água/quantidade de gametas [ovócito (g)/volume de sêmen (µL)]

Tratamento	Quantidade ovócitos (g)	Volume de sêmen (µL)	Volume de água (mL)
1	0,1	10	5
2	0,1	10	10
3	0,1	10	20
4	0,1	10	40

Após a fertilização, os ovos foram encaminhados para incubadoras experimentais de PVC, com capacidade de um litro, localizadas dentro de uma caixa de 1000 litros contendo água corrente constante.

As taxas de fertilização foram avaliadas oito horas após a ativação dos gametas, realizando a avaliação de todos os ovos em microscópio estereoscópico binocular. A taxa de fertilização foi estimada usando a fórmula:

$$TF = [E / (E+I)] \times 100; \text{ onde:}$$

TF: taxa de fertilização;

E: número de embriões viáveis;

I: número de ovos inviáveis.

Poucos trabalhos têm relatado o volume ideal de água a ser utilizado na fertilização induzida de espécies de peixes. A maioria dos trabalhos que já foram realizados utilizam “mL” como medida de ovócito, porém neste trabalho optou-se em utilizar “g” como medida de ovócito, visto que a medida utilizada na piscicultura da CEMIG é o peso da desova em “g”.

4.3 Avaliação da concentração espermática

A avaliação da concentração espermática foi realizada no laboratório de Fisiologia e Farmacologia do DMV/UFLA.

A concentração espermática foi estimada com o auxílio de câmara hematómica tipo Neubauer. Uma alíquota de 10 µl de sêmen foi acrescentado a 990 µl de solução de formol citrato (2,9 g de citrato de sódio, 4 mL de solução comercial de formaldeído 35% e água destilada 100 mL). Desta diluição foi retirado 10 µl e rediluído em 990 µl de solução de formol citrato, resultando em uma diluição final de 1 :10⁴. Uma alíquota de 10 µL de sêmen diluído foi colocada na câmara de Neubauer ao microscópio óptico e o valor obtido foi multiplicado pelo fator de correção 50.000, encontrando-se assim, a quantidade de células por mm³. A transformação em espermatozoides/mL foi realizada multiplicando-se os valores encontrados por 10³.

4.4 Análise estatística

O experimento foi instalado segundo um delineamento em blocos casualizado com tratamentos (4 diluições) e duas repetições dentro do bloco. O modelo estatístico que descreve as observações é dado por:

$$y_{ijk} = \mu + t_i + b_j + tb_{ij} + \varepsilon_{ijk},$$

em que:

y_{ijk} é o valor da variável dependente na k-ésima repetição do j-ésimo casal que recebeu a i-ésima diluição, com $k=1, 2, 3$;

μ é uma constante inerente a cada observação; t_i é o efeito da i-ésima diluição, com $i = 1, \dots, 4$;

b_j é o efeito do j-ésimo casal considerado como bloco, com $j = 1, 2, 3$;

tb_{ij} é o efeito da interação da i-ésima diluição com o j-ésimo casal, considerado erro experimental;

ε_{ijk} considerado erro amostral, considerado aleatório, normalmente distribuído, com média zero e variância σ_ε^2 .

Todas as variáveis dos experimentos foram analisadas com o auxílio do programa *Statistical Analysis System* (SAS INSTITUTE, 1999). Antes de todas as análises, as variáveis foram investigadas quanto à homogeneidade da variância e à normalidade dos resíduos.

As médias dos volumes de água utilizados na ativação dos gametas foram comparadas pelo teste de Tukey a 5%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração espermática média avaliada dos reprodutores foi de $9,6 \times 10^9$ espermatozoides/mL. Este resultado é superior ao encontrado por Maria et al. (2006), que para a mesma espécie, obtiveram uma média de concentração espermática de $5,4 \times 10^9$ espermatozoides/mL. Murgas et al. (2004) encontraram média de $8,21 \pm 2,26 \times 10^9$ espermatozoides/mL.

O volume de água utilizado como ativador no processo de fertilização de piracanjuba não influenciou ($P > 0,05$) as taxas de fertilização (Tabela 2). Sanches et al. (2007) sugerem o emprego de volumes de água entre 11,67 e 60 mL de água/mL de ovócito não hidratado como solução ativadora na fertilização de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), proporcionando um máximo desempenho em termos de taxas de fertilização dos ovócitos de $70 \pm 10\%$. Dessa forma é possível observar que altas taxas de fertilização podem ser alcançadas dentro de um amplo intervalo de volumes de água utilizados na ativação. Souza et al. (2007) conseguiram valores ideais de água de 60 a 100 mL de água/2 mL de ovócitos para curimatá (*Prochilodus lineatus*).

TABELA 2. Valores médios de porcentagem de ovos viáveis (erro padrão) em função dos tratamentos estudados – taxa de fertilização

Diluições	Blocos ¹				Médias
	C1	C2	C3	C4	
5	69,35(5,78)	48,35	22,50	79,80	55,00(2,20)
10	64,20	43,50	17,05	79,95	51,17
20	57,25	39,85	16,60	71,65	46,33
40	60,00	49,20	18,07	63,00	47,56
Médias ¹	62,70(2,20)B	45,22C	18,55D	73,60A	

¹ Médias seguidas de mesma letra maiúscula, na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Chereguinei et al. (1999) sugerem que o excessivo volume de água pode diluir excessivamente o meio, impedindo o espermatozóide de alcançar a micrópila, durante o curto período de tempo de ativação que os mesmos adquirem, que para piracanjuba é de 36 a 113 segundos (Murgas et al., 2004).

Por outro lado, Sykora et al. (2007a) verificaram que elevadas diluições do meio proporcionaram maiores tempos de ativação espermática. Além disso, quantidades insuficientes de solução ativadora podem prejudicar o processo de fertilização por não propiciar um meio adequado para o encontro dos gametas (Chereguinei et al., 1999) e causar a obstrução da micrópila pelo muco ovariano ou pelo contato de outro ovócito (Zaniboni-Filho e Weingartner, 2007).

Sykora et al. (2007b) avaliaram volumes de água (variando de 0,5 a 60 mL) na ativação da fertilização de jundiá cinza (*Rhamdia quelen*) e verificaram uma relação diretamente proporcional entre as taxas de fertilização e os volumes crescentes de água até a relação 9,89 mL de água/mL de ovócito não hidratado, com máximo desempenho teórico em termos de taxas de fertilização de 61,61%. A partir dessa relação volume de água/mL de ovócitos não hidratados, os resultados apresentaram um comportamento de “plateau”, ou seja, as taxas de fertilização permanecem constantes em função do aumento das relações de volume de água.

Maria (2005) utilizou 10 mL de água na ativação da mistura de 0,1 g de ovócito de piracanjuba acrescentado com 100 µL de sêmen congelado com o diluidor BTS (Beltsville Thawing Solution) e M III (Merck III), obtendo uma taxa de eclosão de 60±20 e 40±18, respectivamente.

6 CONCLUSÃO

Na fertilização induzida de piracanjuba recomenda-se o uso de 5 mL de água para ativação dos espermatozoides, que é o menor volume com máxima eficiência, para que haja praticidade durante a realização do processo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHEREGUINI, O.; DE LA BANDA, I. G.; RASINES, I. et al. Artificial fertilization in turbot, *Scophthalmus maximus*, (L.): different methods and determination of the optimal sperm-egg ratio. **Aquaculture Research**, v.30, p.319-324, 1999.
- FREATO, T. A. **Morfometria, rendimento no processamento e inter-relações na avaliação de carcaça de piracanjuba, *Brycon orbignyanus* (VALENCIENNES, 1849)**. 2005. 102 p. Dissertação (Mestrado em zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- GODOY, M. P. de. **Peixes do Brasil**. Subordem Characoidei – Bacia do Rio Mogi Guassu. Piracicaba: Franciscana, 1975. 309 p.
- MARIA, A. N. **Diluidores e crioprotetores no resfriamento e congelamento do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)**. 2005. 71 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- MARIA, A. N.; VIVEIROS, A. T. M.; FREITAS, R. T. F.; OLIVEIRA, A. V. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. **Aquaculture**, v. 260, p. 298-306. 2006.
- MURGAS, L. D. S.; MILIORINI, A. B.; FRANCISCATTO, R. T.; MARIA, A. N. Viabilidade espermática do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) resfriado a 4° C. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 6, p. 1361-1365, 2004.
- SANCHES, E. A.; BAGGIO, D. M.; BOMBARDELLI, R. A.; SOUZA, B. E.; PIANA, P. A.; VIDAL, E. Fertilização artificial de ovócitos de pacu *piaractus mesopotamicus* por meio de diferentes volumes de água. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PRODUÇÃO DE PEIXES NATIVOS DE ÁGUA DOCE, 1., 2007, Dourados. **Anais...** Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste. 2007. CD-ROM.
- SAS INSTITUTE. **SAS Procedures guide for computers**. 6 ed. Cary, NC, 1999. v.3, 373p.

SOUZA, B. E.; SANCHES, E. A.; BAGGIO, D. M.; ROMAGOSA, E.; BOMBARDELLI, R. A.; PIANA, P. A.; VIDAL, E. Interação entre a relação de espermatozóide.ovócito e o volume de água empregados na fertilização artificial de ovócitos de curimatá (*Prochilodus lineatus*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PRODUÇÃO DE PEIXES NATIVOS DE ÁGUA DOCE, 1., 2007, Dourados. **Anais...** Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste. 2007. CD-ROM

SYKORA, R. M.; BAGGIO, D. M.; SANCHES, E. A.; BOMBARDELLI, R. A.; SOUZA, B. E.; VIDAL, E. Estudo de parâmetros influentes no método de fertilização artificial de ovócitos de jundiá cinza (*Rhamdia quelen*): relação entre volume de água e volume de ovócitos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PRODUÇÃO DE PEIXES NATIVOS DE ÁGUA DOCE, 1., 2007, Dourados. **Anais...** Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2007b. 1 CD-ROM.

SYKORA, R. M.; SANCHES, E. A.; BAGGIO, D. M.; SOUZA, B. E.; BOMBARDELLI, R. A.; VIDAL, E. Efeito da relação volume de sêmen:volume de água sobre o tempo de ativação espermática em jundiá cinza (*Rhamdia quelen*). In: CONGRESSO NACIONAL DE ENGENHARIA DE PESCA, ENGENHARIA QUÍMICA E QUÍMICA, 1., 2007, Toledo, **Anais...** Toledo: Centro de Engenharias e Ciências Exatas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná Campus Toledo. 2007a. CD ROM.

VAZ, M. M.; TORQUATO, V. C.; BARBOSA, N. D. C. **Guia ilustrado de peixes da bacia do rio Grande**. Belo Horizonte: CEMIG/CETEC, 2000. 144 p.

ZANIBONI FILHO, E.; WEINGARTNER, M. Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 3, p. 367-373, 2007.

ANEXOS

TABELA 1	Resumo da análise de variância para motilidade (MOT), em porcentagem, e duração de motilidade (DUR), em segundos, em função dos tratamentos estudados	83
TABELA 2	Resumo da análise de variância para porcentagem de alterações na morfologia da cabeça (CAB), peça intermediária (PI) e cauda (CD) dos espermatozoides, em função dos tratamentos estudados.....	83
TABELA 3	Resumo da análise de variância para porcentagem total de alterações na morfologia dos espermatozoides, em função dos tratamentos estudados	84
TABELA 4	Resumo da análise de variância para porcentagem de ovos viáveis (OV) e eclosão (EC) segundo os tratamentos estudados.....	84
TABELA 5	Resumo da análise de variância para porcentagem de ovos viáveis (OV) segundo os tratamentos estudados.....	84

ANEXOS

TABELA 1 – Resumo da análise de variância para motilidade (MOT), em porcentagem, e duração de motilidade (DUR), em segundos, em função dos tratamentos estudados

Fonte de variação	Gl	Quadrado médio (p-valor)	
		MOT	DUR
Congelamento (C)	1	36,230,4545 (p<0,0001)	3772,8545 (p=0,0245)
Interno (I)	1	43,7878 (p=0,5494)	157,0969 (p=0,6328)
Externo (E)	1	207,4242 (p=0,1974)	27,2060 (p=0,8422)
C x I	1	1,3636 (p=0,9156)	157,0969 (p=0,6328)
C x E	1	7,4242 (p=0,8048)	1570,1878 (p=0,1372)
I x E	1	0,1515 (p=0,9718)	3,7878 (p=0,9407)
C x I x E	1	127,4242 (p=0,3098)	157,0969 (p=0,6328)
Erro	31	119,5161	674,6129
CV (%)		18,65	35,68
Pr < W		0,0523	0,9840

TABELA 2 – Resumo da análise de variância para porcentagem de alterações na morfologia da cabeça (CAB), peça intermediária (PI) e cauda (CD) dos espermatozoides, em função dos tratamentos estudados

Fonte de variação	Gl	Quadrado médio (p-valor)		
		CAB	PI	CD
Interno (I)	1	0,800 (p=0,8156)	1,250 (p=0,4918)	174,050(p=0,0245)
Externo (E)	1	24,200 (p=0,2106)	0,050 (p=0,8898)	1,250(p=0,8360)
I x E	1	3,200 (p=0,6417)	1,250 (p=0,4918)	26,450(p=0,3476)
Erro	16	14,225	2,525	28,250
CV (%)		50,52	40,23	41,68
Pr < W		0,0591	0,2368	0,9484

TABELA 3 – Resumo da análise de variância para porcentagem total de alterações na morfologia dos espermatozoides, em função dos tratamentos estudados

Fonte de variação	Gl	Quadrado médio (p-valor)	
		Total	
Interno (I)	1	80,0000 (p=0,1894)	
Externo (E)	1	57,8000 (p=0,2610)	
I x E	1	3,2000 (p=0,7875)	
Erro	16	42,5750	
CV (%)		28,74	
Pr < W		0,0536	

TABELA 4 – Resumo da análise de variância para porcentagem de ovos viáveis (OV) e eclosão (EC), segundo os tratamentos estudados

Fonte de variação	gl	Quadrado médio (p-valor)	
		OV	EC
Diluições (D)	3	82,2076 (p=0,8663)	253,4427 (p=0,1765)
Bloco (B)	2	6,704,8496 (p=0,0024)	8808,3697 (p<0,0001)
¹ Erro Experimental	6	344,1756 (p=0,0098)	109,8958 (p=0,7545)
Erro Amostral	24	93,4364	194,7840
CV (%)		16,54	21,78
Pr < W		0,9745	0,2925

¹Erro experimental considerado como a interação entre bloco e diluições

TABELA 5 – Resumo da análise de variância para porcentagem de ovos viáveis (OV) segundo os tratamentos estudados

Fonte de variação	Gl	Quadrado médio (p-valor)	
		OV	
Diluições (D)	3	121,8933 (p=0,0799)	
Bloco	3	4612,8988 (p<0,0001)	
¹ Erro experimental	9	38,8595 (p=0,7932)	
Erro amostral	16	66,7568	
CV (%)		16,33	
Pr < W		0,3497	

¹Erro experimental considerado como a interação entre bloco e diluições

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)