EFEITO DA VITAMINA E E DA GLUTATIONA REDUZIDA NA CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN DE CURIMBA (*Prochilodus lineatus*)

DANIELLA APARECIDA DE JESUS PAULA

2010

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

DANIELLA APARECIDA DE JESUS PAULA

EFEITO DA VITAMINA E E DA GLUTATIONA REDUZIDA NA CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN DE CURIMBA (*Prochilodus Lineatus*)

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal, para a obtenção do título de "Mestre".

Orientador

Prof. Luis David Solis Murgas

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2010

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

Paula, Daniella Aparecida de Jesus.
Efeito da vitamina E e da glutationa reduzida na criopreservação do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus)* / Daniella Aparecida de Jesus Paula. – Lavras : UFLA, 2010.
53 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.
Orientador: Luis David Solis Murgas.
Bibliografia.

1. Peixes. 2. Reprodução. 3. Antioxidantes. 4. Preservação. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 639.375

DANIELLA APARECIDA DE JESUS PAULA

EFEITO DA VITAMINA E E DA GLUTATIONA REDUZIDA NA CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN DE CURIMBA (*Prochilodus Lineatus*)

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal, para a obtenção do título de "Mestre".

APROVADA em 26 de fevereiro

Prof[a]. Elissandra Ulbricht Winkaler UFRB

Prof. Jerry Borges UFLA

Prof. Luciano José Pereira UFLA

Prof. Luis David Solis Murgas
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

Deus,

Sempre presente em minha vida

A meus pais,

Antônio Carlos de Paula e Regina Aparecida de Jesus Paula

A meus irmãos,

Marcela Aparecida de Paula e Raphael Antônio de Paula

Ao meu namorado,

Vinicius Pacífico de Oliveira Guedes

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Zootecnia, pela oportunidade.

Ao Prof. Luis David Solis Murgas, pela orientação, amizade e oportunidade a mim concedida.

Às Prof[as]. Priscila Vieira Rosa e Elissandra Ulbricht Winkaler, pela co-orientação, apoio e amizade.

Ao Prof. Jerry Borges, pela ajuda na elaboração deste trabalho, pelas sugestões e apoio.

Ao Prof. Luciano José Pereira, pela participação na banca de defesa, pelas sugestões e apoio.

À Prof[a]. Paula Adriane Perez Ribeiro pela amizade e pela atenção em todos os momentos.

A meu namorado Vinícius, sempre a meu lado, pela dedicação, compreensão e amor.

A meus pais, pela oportunidade, carinho e incentivo nos momentos em que precisei. Não há palavras para expressar minha gratidão a vocês.

Aos amigos de pós-graduação, Antônio Carlos Silveira Gonçalves, Fernando Souza Mendonça de Lima, Galileu Crovato Veras, Marinez Moraes de Oliveira e Raquel de Andrade Mello pela amizade e companheirismo.

Em especial às minhas amigas Estefânia de Souza Andrade, Gilmara Junqueira Machado Pereira e Viviane de Oliveira Felizardo, pela amizade e ajuda na execução e compreensão das análises.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo apoio financeiro.

Ao NAQUA, Núcleo de Estudos em Aquacultura pela experiência, aprendizado e pelos amigos ali conquistados.

À Estação Ambiental de Itutinga, da Companhia Energética de Minas Gerais (EAI-CEMIG), nas pessoas Sr. Oscar e Sr. Darli, que forneceram apoio para a realização das coletas e aos funcionários Gilson e Jailson pela colaboração e apoio.

Aos funcionários do Departamento de Medicina Veterinária, Wiliam e Marcos, pelo apoio e dedicação em vários momentos durante o meu curso de mestrado.

Aos funcionários da Estação de Piscicultura da Universidade Federal de Lavras, Eleci e José Roberto, pelo apoio e dedicação.

Enfim, a todos que, de algum modo, contribuíram para realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

DANIELLA APARECIDA DE JESUS PAULA, filha de Antônio Carlos de Paula e Regina Aparecida de Jesus Paula, nasceu em Lavras, Sul de Minas Gerais.

Em julho de 2008, obteve o título de Zootecnista pela Universidade Federal de Lavras.

Em agosto do mesmo ano, iniciou o curso de Mestrado em Zootecnia pelo Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras, submetendo-se ao exame final de Dissertação no dia 26 de fevereiro de 2010, para obtenção do título de “Mestre”.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	i
LISTA DE FIGURAS	ii
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	2
3 REVISÃO DE LITERATURA	3
3.1 Espécie *Prochilodus lineatus*	3
3.2 Criopreservação de sêmen	5
3.3 Concentração espermática	8
3.4 Motilidade espermática	10
3.5 Morfologia espermática	11
3.6 Antioxidantes	12
3.6.1 Glutationa (GSH)	13
3.6.2 Vitamina E	14
4 MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1 Locais de seleção dos reprodutores e das análises de sêmen	17
4.2 Indução e coleta de sêmen *in natura*	17
4.3 Avaliação do sêmen *in natura*	18
4.4 Avaliação da concentração espermática	19
4.5 Teste de toxicidade das soluções	19
4.6 Congelamento do sêmen	20
4.7 Descongelamento do sêmen	21
4.8 Avaliação da morfologia espermática	21
4.9 Análise estatística	23

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 25
5.1 Teste de toxicidade 25
5.2 Avaliação do sêmen *in natura* 26
5.3 Avaliação das características seminais após o descongelamento 28
5.3.1 Motilidade espermática 28
5.3.2 Duração espermática 32
5.4 Análise morfológica do sêmen 34
6 CONCLUSÕES 36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 37
ANEXOS 48

LISTA DE TABELAS

		Página
TABELA 1	Classificação das diferentes soluções comumente utilizadas como crioprotetores na criopreservação.....	7
TABELA 2	Concentração espermática de diferentes espécies de peixes tropicais	9
TABELA 3	Tratamentos utilizados no congelamento de sêmen de curimba	20
TABELA 4	Características das anomalias morfológicas maiores avaliadas no sêmen de curimba	22
TABELA 5	Características das anomalias morfológicas menores avaliadas no sêmen de curimba	23
TABELA 6	Média e desvio padrão da motilidade espermática (taxa em % e duração em segundos) do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) submetido ao teste de toxicidade diluído em diferentes antioxidantes	25
TABELA 7	Características do sêmen *in natura* de curimba utilizado no experimento de criopreservação com diferentes antioxidantes	27
TABELA 8	Média e desvio padrão da taxa de motilidade espermática do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) congelado em diferentes antioxidantes e utilizando água e bicarbonato como ativadores durante o descongelamento	29
TABELA 9	Média e desvio padrão da duração do sêmen de curimba(*Prochilodus lineatus*) congelado em diferentes antioxidantes utilizando água e bicarbonato como ativadores durante o descongelamento	32
TABELA 10	Média e desvio padrão das anomalias morfológicas espermáticas (%) do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) criopreservado em diferentes antioxidantes....	35

LISTA DE FIGURAS

Página

FIGURA 1 Exemplar de curimba (*Prochilodus lineatus*) 04

FIGURA 2 Representação estrutural da molécula de glutationa reduzida 13

FIGURA 3 Mecanismo de ação de proteção antioxidante da glutationa por inativação do peróxido de hidrogênio 14

FIGURA 4 Representação estrutural da molécula estrutural da vitamina E (α-tocoferol) 15

FIGURA 5 Mecanismo de ação da vitamina E na membrana plasmática 16

FIGURA 6 Duração da motilidade espermática com ativadores, água e bicarbonato 34

RESUMO

PAULA, Daniella Aparecida de Jesus. **Efeito da vitamina E e da glutationa reduzida na criopreservação do sêmen de curimba (*Prochilodus Lineatus*).** 2010. 53 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.[1]

O uso de antioxidantes na criopreservação de sêmen tem sido muito difundido e seu efeito benéfico foi encontrado em várias espécies de mamíferos, porém ainda desconhecido em peixes. O presente estudo foi conduzido na piracema de 2009/2010, com o objetivo de avaliar a toxicidade e o efeito da adição dos antioxidantes vitamina E e glutationa reduzida, em soluções crioprotetoras e ativadoras ao sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*), antes e após o congelamento em nitrogênio (-196 ºC). As amostras de sêmen de sete reprodutores foram coletadas, analisadas quanto à sua qualidade (taxa e duração espermáticas), diluídas em sete tratamentos compostos por soluções crioprotetoras (1:4), metanol (10%) e lactose (15%) nas concentrações dos antioxidantes (50; 100 e 250 µM de vitamina E; 0,5; 1,0 e 1,5 mM de glutationa reduzida e uma solução sem antioxidante). Os ativadores utilizados foram a água destilada e o bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$) a 1%. Uma parte do sêmen diluído foi congelada enquanto a fração restante foi mantida em repouso e avaliada após 10 minutos para o teste de toxicidade. Após quatro dias, as amostras foram descongeladas em água (60°C, 8”) e então foram avaliadas a taxa e duração espermática, alterações morfológicas após o descongelamento e o melhor ativador durante o descongelamento. Os resultados das análises indicaram que os antioxidantes vitamina E e glutationa foram pouco tóxicos para o sêmen de curimba, proporcionando elevadas taxas de motilidade e duração espermática. O melhor ativador para a sêmen de curimba após o descongelamento, relacionado a estas soluções crioprotetoras, foi o bicarbonato de sódio a 1% ($P<0,05$). Não foram observadas diferenças significativas dos tratamentos sobre a taxa e duração da motilidade espermática durante o teste de toxicidade e no descongelamento do sêmen, assim como na análise morfológica espermática após o descongelamento ($P>0,05$). Deste modo, os antioxidantes vitamina E glutationa reduzida não exerceram efeito na qualidade do sêmen criopreservado de curimba.

[1]Comitê Orientador: Luis David Solis Murgas – UFLA (Orientador), Priscila Vieira Rosa – UFLA, Elissandra Ulbricht Winkaler – UFRB.

ABSTRACT

PAULA, Daniella Aparecida de Jesus. **Effect of vitamin E and reduced glutathione in sperm cryopreservation of curimba (*Prochilodus Lineatus*).** 2010. 53 p. Dissertation (Master in Animal Science) – Universidade Federal de Lavras Lavras[1]

The use of antioxidants in semen cryopreservation has been widespread and their beneficial effects were found in several species of mammals. However, their effects are still unknown in fish. This study was conducted at spawning season of 2009/2010 in order to evaluate the toxicity and the effects of antioxidants vitamin E and reduced glutathione addition in cryoprotective and activating solutions of the curimba´s semen (*Prochilodus lineatus*) before and after nitrogen freezing (-196oC). The semen samples were collected from seven breeders and quality analyses were conducted (spermatic rate and duration) according to seven dilution treatments composed by cryprotective solutions of methanol (10%) and lactose (15%), in concentrations (50; 100 and 250 µM of E vitamin; 0,5; 1,0 and 1,5 mM of reduced glutathione). Distilled water and sodium bicarbonate (NaHCO3) were used to activate the semen samples. A diluted semen sample was frozen and the remaining fraction was analyzed after 10 minutes for toxicity test. After four days, the stored samples were thawed at water (60°C, 8s) and the rate and duration of sperm motility were evaluated. Morphological changes after thawing and the best activating solution during thawing were considered as well. The results of analyses indicated that the antioxidants vitamin E and reduced glutathione were wispy toxics to curimba´s semen, providing elevated spermatic motility and delayed sperm activity. The best activating solution was the sodium bicarbonate of 1% ($P<0,05$). Significant differences of treatments on the spermatic rate and duration of motility during the toxicity test and semen thawing were not observed ($P> 0.05$). Similar results were found for sperm morphological analysis after thawing. In conclusion, the antioxidants vitamin E and reduced glutathione did not alter semen quality of curimba.

[1]Guidence Commitee: Luis David Solis Murgas – UFLA (Orientador), Priscila Vieira Rosa – UFLA, Elissandra Ulbricht Winkaler – UFRB.

1 INTRODUÇÃO

O armazenamento de sêmen de peixes envolve tanto questões ambientais quanto econômicas. Alguns fatores como a pesca predatória, a sobre-pesca, a captura em períodos de desova, a construção de hidrelétricas, o desmatamento da mata ciliar e a poluição culminam na descaracterização e no desaparecimento do habitat aquático natural levando ao decréscimo nos estoques de peixes migratórios. Por isso, a criopreservação torna-se importante nos programas de melhoramento genético e na formação de bancos para manutenção dos recursos genéticos de espécies ameaçadas de extinção. Além disso, a preservação de sêmen facilita a troca de material genético, diminui os custos com a manutenção de reprodutores, reduz problemas de assíncrona da maturidade gonadal, dentre outras.

Contudo, durante os processos de congelamento e descongelamento do sêmen podem ocorrer danos celulares devido à mudança na temperatura do botijão de nitrogênio, formação de cristais de gelo, injúrias oxidativas, alterações na membrana do espermatozóide, lesões no DNA, estresse osmótico, além da toxicidade dos crioprotetores.

Existem alguns mecanismos de proteção contra o estresse oxidativo através de substâncias antioxidantes, como vitaminas, minerais e enzimas, dentre outras. A vitamina E pode ser empregada na redução dos danos causados pela alta concentração de radicais livres, fornecendo proteção ao DNA espermático e às membranas celulares contra a peroxidação através da doação de hidrogênio e é regenerada pela vitamina C e pelo beta-caroteno. A glutationa reduzida, por sua vez, participa de mecanismos antioxidantes, como substrato da enzima glutationa peroxidase, enzima esta muito importante durante este processo antioxidante da célula.

Alguns trabalhos realizados, principalmente em mamíferos, utilizando a vitamina E e glutationa reduzida indicam efeitos benéficos para a criopreservação de sêmen. Entretanto, seus efeitos no sêmen de peixes são desconhecidos.

Tendo em vista que a vitamina E e a glutationa reduzida oferecem proteção às células espermáticas, desenvolver métodos que sejam capazes de minimizar danos durante os processos de criopreservação de sêmen, possibilitando o aumento da eficácia dos protocolos de congelamento, é uma das tecnologias atuais empregadas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o efeito do acréscimo de antioxidantes vitamina E e glutationa reduzida na solução crioprotetora constituída por metanol e lactose durante a criopreservação do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*).

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a toxicidade da solução crioprotetora, constituída por metanol e lactose antes do congelamento do sêmen;
- Avaliar a eficiência da solução crioprotetora sobre o congelamento;
- Determinar o melhor ativador do sêmen após o descongelamento, em associação com esta solução crioprotetora;
- Caracterizar as principais alterações morfológicas causadas nos espermatozóides pelo congelamento e descongelamento.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Espécies *Prochilodus lineatus*

Reino: Animalia;

Filo: Chordata;

Classe: Actinopterygii;

Ordem: Characiformes

Família: Prochilodontidae

Subfamília: Prochilodontinae

Gênero: *Prochilodus*

Espécie: *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836)

A curimba também é popularmente conhecida como curimatã, corimba, curimbatá, papa-terra e grumatã. Esta espécie (FIGURA 1) possui corpo fusiforme e comprido, com escamas relativamente grandes podendo atingir peso de até 6 Kg. Os principais representantes deste gênero estão amplamente distribuídos nos rios sul-americanos.

A curimba possui hábito alimentar iliófago, ou seja, alimenta-se de detritos, tanto na fase jovem como na adulta. A principal característica da família Prochilodontidae é a boca protrátil em forma de ventosa, com lábios carnosos, sobre os quais estão implantados numerosos dentes diminutos dispostos em fileiras. Por possuir estas características, promove a limpeza do fundo dos rios e dos tanques onde são estocados. É considerada uma espécie reofílica, realizando migrações em massa até as áreas de desova no período de reprodução, de novembro a janeiro. O seu desenvolvimento inicial ocorre em lagoas marginais de águas mais lentas (Companhia Energética de Minas Gerais - CEMIG/CETEC, 2000).

FIGURA 1 Exemplar de curimba (*Prochilodus lineatus*)

No entanto, esta espécie tem sido uma das espécies mais afetadas pela poluição dos rios e pelas construções de represas hidrelétricas, com interferência no seu comportamento reprodutivo e, consequentemente, redução dos estoques pesqueiros (Hatanaka et al., 2006). De acordo com o IBAMA, a curimba está entre as espécies mais utilizadas na aqüicultura continental das regiões do Brasil e representou 1.525,0 toneladas (14,76%) da pesca extrativista de peixes de água doce de Minas Gerais no ano de 2007. (Brasil, 2007).

A curimba, dentre os peixes nativos, apresenta um bom desempenho para a piscicultura, devido à alta rusticidade para manejo, boa fertilidade e rápido crescimento no cultivo intensivo, o que a coloca entre as espécies de maior valor econômico (Galdioli et al., 2000), além de não apresentar dificuldades ao tratamento hormonal (Freitas et al., 2002), fato imprescindível para a sua criação em cativeiro. É considerada uma das espécies mais abundantes e importantes da região Sul e Sudeste do Brasil, sendo bastante

utilizada na alimentação humana. Nas regiões Norte e Nordeste, é importante na pesca comercial, artesanal e de subsistência, sendo sua carne bem apreciada pela culinária (Maia et al., 1999).

A procriação desta espécie é de grande importância, pois suas larvas podem ser utilizadas como alimento de larvas espécies de carnívoras importantes comercialmente como, por exemplo, o dourado (*Salminus maxillosus* = *Salminus brasiliensis*), a piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) e o jaú (*Zungaro jahu*). Além disso, a curimba é muito utilizada por usinas hidrelétricas em programas de repovoamento de reservatórios e constitui-se em uma espécie-modelo no desenvolvimento de pesquisas em biotecnologia reprodutiva, devido à sua elevada prolificidade e facilidade de manejo.

Devido à importância ecológica, biológica e econômica dessa espécie, são necessários estudos em criopreservação de sêmen de curimba, buscando métodos eficazes para que sejam testadas substâncias que aperfeiçoem o uso da tecnologia em pisciculturas.

3.2 Criopreservação de sêmen

A preservação de sêmen de peixes resume-se em dois métodos distintos. O resfriamento e a criopreservação. No primeiro método, os espermatozóides são estocados em curto prazo por horas ou dias, em temperatura de refrigeração próxima a 4ºC. No segundo método, por sua vez, o sêmen é preservado por prazos mais longos através do congelamento em nitrogênio líquido (–196ºC), onde a viabilidade dos gametas pode manter-se por tempo indefinido. O congelamento de sêmen visa manter a viabilidade espermática por um longo período, podendo o sêmen ser utilizado posteriormente para fertilizações. Esta técnica facilita o manejo, pois dispensa a presença do macho durante a fecundação e aumenta a eficiência da reprodução artificial nas estações de

piscicultura. Além disso, ela permite a manutenção de bancos genéticos, inclusive de espécies ameaçadas de extinção (Oliveira et al., 2007).

Vários cuidados são importantes para o sucesso do congelamento tais como a adição de diluidores e crioprotetores ao sêmen. Os diluidores compostos por sais ou carboidratos agem mantendo a viabilidade dos espermatozóides durante o processo de redução de temperatura. Um diluidor muito utilizado é o BTS (do termo em inglês, *Beltsville Thawing Solution*, Minitub®). O BTS, empregado inicialmente em pesquisas com sêmen suíno, apresenta bons resultados para a crioproteção de sêmen de peixes (Murgas et al., 2004; Miliorini et al., 2005).

Os crioprotetores são substâncias químicas adicionadas ao meio diluidor e que protegem os espermatozóides contra as injúrias causadas pelo congelamento e descongelamento (Squires et al., 1999). Estas soluções devem ter uma baixa toxicidade e apresentar uma elevada solubilidade em água. Além disso, não devem ativar o sêmen e, principalmente, devem ser capazes de manter a integridade do esperma para que este possa ser ativado posteriormente, após a homogeneização em água ou soluções salinas (Maria, 2005).

Os crioprotetores podem ser classificados em intracelulares ou solúveis e em extracelulares ou insolúveis (TABELA 1). Os intracelulares atuam reduzindo o ponto crioscópio intracelular, ou seja, diminuindo a formação de microcristais de gelo intracelulares (Watson, 1995). O dimetilsulfóxido (DMSO), o glicerol, o metanol, o etilenoglicol, o propilenoglicol e o propanodiol são os crioprotetores intracelulares mais utilizados.

Os crioprotetores extracelulares, por sua vez, protegem as células espermáticas durante o congelamento, sem que penetrem em seu interior, pois atuam principalmente na estabilização da membrana (Watson, 1995). A gema de ovo, o leite desnatado e a sacarose são exemplos de crioprotetores extracelulares comumente utilizados.

TABELA 1 Classificação das principais soluções utilizadas como crioprotetores na criopreservação de sêmen

Crioprotetores intracelulares	**Crioprotetores extracelulares**
Dimetilsulfóxido	Sacarose
Glicerol	Gema de ovo
Metanol	Leite desnatado
Etilenoglicol	Soro
Propilenoglicol	Água de coco
Propanodiol	Glicose

A combinação de crioprotetores confere uma maior proteção do que seu uso isolado (Dalimata & Graham, 1997). Porém, segundo Watson (2000), o espermatozóide é uma célula sensível aos efeitos tóxicos dos crioprotetores, tornando inviável o uso de alguns componentes comumente utilizados para a criopreservação de outras células. Porisso é necessária uma avaliação da toxicidade dos criprotetores e de seus efeitos sobre as células espermáticas.

Pesquisas sobre a criopreservação de sêmen de piracanjuba (Maria, 2005), de pirapitinga (Oliveira et al., 2007) e de piau-açu (Ribeiro & Godinho, 2003), por exemplo, empregaram metodologias eficazes para a preservação do sêmen destas espécies. Apesar de terem sido descritos protocolos para o congelamento do sêmen de curimba (Carolsfeld et al., 2003; Murgas et al., 2007; Orfão, 2006), mais trabalhos são necessários para aprimorar as técnicas de criopreservação dessa espécie buscando-se, assim, otimizar recursos temporais e financeiros.

3.3 Concentração espermática

Segundo Godinho (2007), a concentração espermática (número de espermatozóides/volume de sêmen) expressa a qualidade do sêmen e é uma variável dependente da espécie e do próprio indivíduo. Considerada um parâmetro importante na conservação de sêmen, pois com sua definição é possível aproveitar ao máximo o material fecundante e, consequentemente, obter um melhor resultado durante a fecundação.

Várias pesquisas têm sido realizadas para determinação das concentrações espermáticas de algumas espécies (TABELA 2). Contudo, esses estudos indicam que há valores diferentes de concentração espermática entre espécies e mesmo em uma única espécie, pois a concentração pode variar de acordo com o estágio na maturação gonadal (Silva et al., 2009) e com o método hormonal utilizado para indução (Streit Júnior, 2004; Rurangwa et al., 2004).

Miliorini (2006), encontrou de 31,30 a 37,30 espermatozóides x 10^9/mL, Silva et al. (2009), observaram de 28 a 48 espermatozóides x 10^9/mL, Viveiros et al. (2009) encontraram uma concentração média de 16,8 (± 12,9) espermatozóides x 10^9/mL, ambos trabalhando com curimba e utilizando extrato bruto de hipófise de carpa para a indução.

TABELA 2 Concentração espermática de diferentes espécies de peixes tropicais

Família, nome popular e científico	**Concentração espermática (sptz x10^9/ml)**	**Autores**
Família Characidae		
Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)	8,21 10,0 - 14,0	Murgas et. al. (2004) Bedore (1999)
Dourado (*Salminus maxillosus*)	13,13 6,20	Streit et al. (2008) Viveiros et al. (2009)
Pacu-caranha (*Piaractus mesopotamicus*)	13,89	Maria et. al. (2004)
Pirapitinga (*Brycon nattereri*)	30,00	Oliveira et al. (2007)
Matrinxã (*Brycon cephalus*)	9,6	Silveira (2000)
Piabanha (*Brycon insignis*)	24,4 - 25,1	Andrade-Talmelli et. al. (2001)
Tambaqui (*Colossoma macropomum*)	39,00	Menezes et. al. (2008)
Família Anostomidae		
Piapara (*Leporinus obtusidens*)	6,625 - 52,250	Murgas et. al. (1999)
Piau-açu (*Leporinus macrocephalus*)	3,5 a 7,6	Oliveira et al. (2004)
Família Prochilodontidae		
Curimba (*Prochilodus lineatus*)	31,30 - 37,30	Miliorini (2006)
(*Prochilodus scrofa*)	13,3 – 20,5	Godinho & Cóser (1995)
Família Pilelodontidae		
Surubim (*Pseudoplatystoma coruscans*)	8,0 – 16,0	Godinho & Cóser (1995)
Bagre (*Rhamdia hilarii*)	63,5	Kavamoto & Silveira (1986)

3.4 Motilidade Espermática

De acordo com Stoss (1983), a motilidade espermática é fundamental na qualidade do sêmen. A determinação da motilidade espermática é realizada através de uma análise qualitativa ao microscópio óptico, calculando-se a sua duração desde sua ativação até cessar a movimentação dos espermatozóides (Billard, 1986). A porcentagem média de espermatozóides móveis calculada pode ainda ser determinada em uma escala qualitativa de 0-5 (Miliorini et al., 2002) e através de pacotes computacionais especializados, como o CASA, do inglês *Computer-assisted Sperm Analysis,* Análise de Sêmen assistida por Computador (Dreanno et al., 1998, Bilodeau et al., 2002). Entretanto, apesar das outras técnicas, a avaliação da motilidade ao microscópio é bastante prática, possui um baixo custo e pode ser realizada facilmente por uma pessoa treinada.

Em peixes, os espermatozóides são imóveis enquanto estão presentes nas gônadas e no ducto espermático, e sua motilidade é ativada após um contato com um meio com osmolaridade diferente como a água. Além da osmolaridade, acredita-se que, a temperatura, o pH e os íons presentes no meio afetem a motilidade espermática (Alavi & Cosson, 2005, 2006).

A diferença entre a baixa osmolaridade da água, em comparação com a do plasma seminal é essencial para a ativação da motilidade dos espermatozóides de peixes de água doce (Takai & Morisawa, 1995). Nos peixes marinhos, por sua vez, a motilidade espermática é iniciada após contato com a água do mar, que possui uma osmolaridade mais elevada do que a do plasma seminal (Takai & Morisawa, 1995). A motilidade espermática dos salmonídeos, por ex., é ativada principalmente devido à hiperpolarização da membrana espermática causada pelo efluxo de K^+ (Kho et al., 2001).

Segundo Billard & Cosson (1992), a duração da motilidade do sêmen de teleósteos de água doce de fertilização externa é bastante reduzida. Esta baixa capacidade de motilidade do espermatozóide é causada, em parte, pela

diminuição do estoque de energia durante o período de migração espermática, pois a fosforilização oxidativa mitocondrial, que é essencial para a produção de energia durante a locomoção, não é suficiente para sustentar o armazenamento de ATP endógeno (Cosson et al., 1999).

A energia para a motilidade e para o metabolismo basal do espermatozóide é derivada da quebra de nutrientes exógenos e endógenos na presença ou na ausência de oxigênio. Como os recursos energéticos dos espermatozóides dos peixes são limitados, um aumento na velocidade associada a um aumento da temperatura na solução de motilidade leva a uma menor duração da motilidade e o inverso também parece ser verdadeiro (Stoss, 1983).

3.5 Morfologia Espermática

As anormalidades morfológicas do sêmen são uma das causas associadas com a diminuição da motilidade e, consequentemente, com a redução da fertilização. O aumento no número das anomalias morfológicas espermáticas pode levar a uma diminuição do vigor espermático e é, por isso, um fator importante na avaliação da qualidade do sêmen (Cosson et al., 1999).

Marques (2001) comenta que o grau de anormalidades espermáticas pode interferir no potencial dos espermatozóides durante a fecundação. O processo de congelamento leva a muitas dessas anormalidades morfológicas e, mesmo os espermatozóides com motilidade evidente podem ser incapazes de penetrar nos ovócitos e gerar o desenvolvimento embrionário.

Outros fatores podem levar a defeitos morfológicos nos espermatozóides causando anomalias primárias que são representadas por flagelo dobrado, cabeça isolada, gotas citoplasmáticas proximais e distais. Estas anomalias acontecem durante a espermatogênese em decorrência de eventos que acometem os reprodutores, tais como: restrição alimentar, estresse ambiental, enfermidades, consanguinidade entre outros. As anomalias secundárias, como

macrocefalia, microcefalia, flagelo quebrado, enrolado e degenerado estão relacionadas a procedimentos de manejo durante a coleta do sêmen e a confecção das lâminas para avaliação de anomalias (Herman et al., 1994).

Um estudo realizado com sêmen de pacu (*P. mesopotamicus*) revelou que houve uma redução no percentual de espermatozóides normais, na motilidade, no vigor espermático e um aumento no percentual de anomalias primárias devido ao congelamento (Streit Júnior et al., 2009). Em um estudo com sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) foi observado que as anomalias espermáticas mais frequentes foram cauda dobrada, enrolada e solta (Kavamoto et al., 1999).

3.6 Antioxidantes

Os radicais livres e outras espécies de oxigênio reativo (EROs) são gerados por todas as células aeróbicas, sendo definidos como "qualquer átomo ou molécula que possui um ou mais elétrons não pareados" (Halliwell, 1992).

Existem hipóteses que afirmam que as EROs estariam envolvidas com a diminuição da qualidade de sêmen dos animais. As pesquisas iniciais datam de mais de 70 anos, quando MacLeod 1943 (apud Aitken & Baker, 2006), estudando os espermatozóides humanos, descobriu que a incubação em concentrações elevadas de oxigênio levava à toxicidade e causava rápida perda de motilidade espermática. Porém, quando se adiciona a enzima catalase, com capacidade antioxidante, era conferida uma proteção aos espermatozóides

As membranas celulares e intracelulares são consideradas suscetíveis ao ataque de radicais livres devido à grande quantidade de ácidos graxos polinsaturados presentes nas mesmas. Estes lipídios as tornam sensíveis à peroxidação lipídica (LPO) e causam perda de função e morte espermática (Bilodeu et al., 2002).

Para minimizar os efeitos negativos das EROs, os peixes e outros vertebrados utilizam um sistema de defesa antioxidante, enzimático e não enzimático (Jos et al., 2005). O sistema enzimático com capacidade antioxidante e desintoxicante no sêmen é composto por glutationa reduzida (GSH), glutationa peroxidase, catalase, superóxido dismutase, metais quelantes (transferrina, lactoferrina e ceruloplasmina) e o não enzimático é composto, principalmente, por vitamina E e ácido ascórbico, considerados mecanismos de defesa eficientes contra a peroxidação lipídica (Aitken, 1995).

A elevada presença de ácidos graxos polinsaturados na membrana plasmática do espermatozóide confere a fluidez necessária para que este participe dos eventos de fusão de membranas associados com a fertilização. No caso do espermatozóide que sofre LPO, essa fluidez diminui e, portanto, a capacidade de fertilização também (Aitken, 1995).

3.6.1 Glutationa (GSH)

A glutationa (FIGURA 2) está presente em todas as células vivas aeróbicas e é a molécula que contém o grupo tiol (-SH), mais abundante no meio intracelular, encontrado na faixa milimolar na maioria das células (Storey, 1996). Ela é considerada a primeira linha de defesa das células contra as EROs, e possui várias outras funções, por ex., substrato de enzimas antioxidantes como a glutationa peroxidase (GPx) e a glutationa S-transferase (GST), reativando as enzimas inibidas pelo estresse oxidativo e regenerando a vitamina E (Dickinson & Forman, 2002).

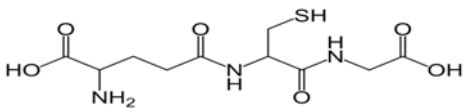

FIGURA 2 Representação estrutural da molécula de glutationa reduzida

A glutationa atua de forma indireta desintoxicando compostos através de associação em reações catalisadas pela GST ou, diretamente, como na reação catalisada pela GPx (FIGURA 3) para inativação do peróxido de hidrogênio formado a partir do radical livre (Nordberg & Arnér, 2001). Além disso, ela protege a célula da lesão resultante da exposição a íons ferro, oxigênio hiperbárico, ozona, radiação e luz ultravioleta, participa da desintoxicação de agentes químicos e da eliminação de produtos da LPO (Ferreira & Matsubara, 1997).

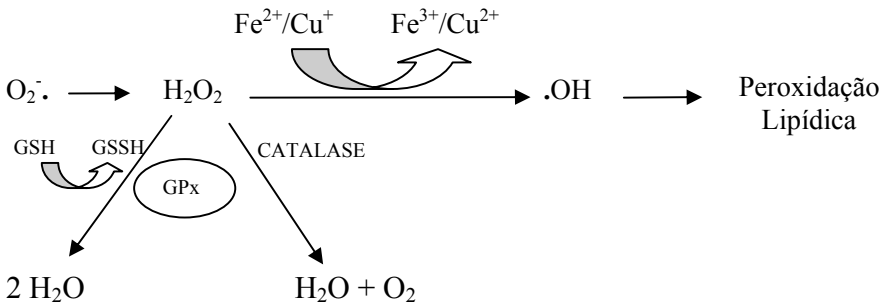

FIGURA 3 Mecanismo de ação de proteção antioxidante da glutationa por inativação do peróxido de hidrogênio.
Fonte: Barros, 2007

3.6.2 Vitamina E

A vitamina E ou α-tocoferol (FIGURA 4) é uma vitamina lipossolúvel presente nas membranas biológicas. São conhecidos oito formas, 4 tocoferóis (α-T, β-T, γ-T, δ-T) e 4 tocotrienóis (α-T3, β-T3, γ-T3, δ-T3), que possuem atividade da vitamina E. Porém, a α-tocoferol é a molécula com maior atividade de vitamina E e o removedor mais potente de EROs (Devlin, 2007).

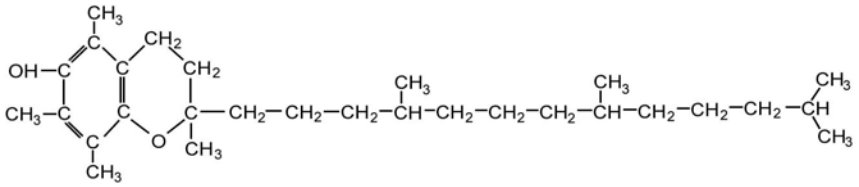

FIGURA 4 Representação estrutural da molécula de vitamina E (α-tocoferol)

A principal função da vitamina E é ajudar a proteger a estrutura da célula, os componentes intracelulares e as enzimas de degradação. Por isso ela é considerada um poderoso antioxidante que interrompe a oxidação dos ácidos graxos altamente insaturados nas membranas dos tecidos, principalmente as membranas celulares (Devlin, 2007).

O grupo hidroxila da vitamina E reage com elétrons desemparelhados (FIGURA 5), podendo assim, reduzir radicais peroxila (Nordberg & Arnér, 2001). De acordo com Jain et al. (2000), uma elevada concentração de vitamina E é eficiente para reduzir as concentrações de radicais livres no meio intracelular, levando em eritrócitos humanos a preservação de enzimas antioxidantes, como a glutationa e a catalase, na sua forma reduzida, e mantendo alta atividade de ambas as enzimas no meio intracelular.

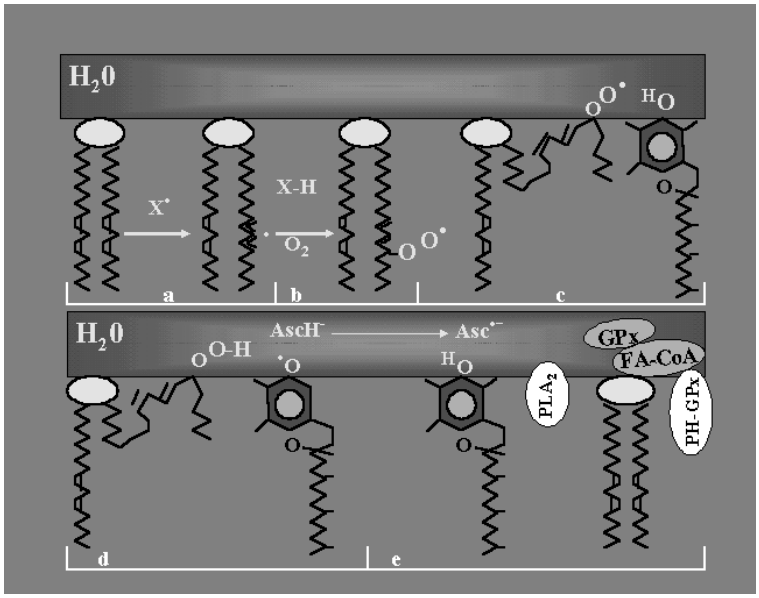

FIGURA 5 Mecanismo de ação da vitamina E na membrana plasmática. a) cadeia de ácidos graxos polinsaturados sob ação do radical livre; b) formação de um novo radical livre; c) desestruturação da membrana plasmática que assume nova configuração (micela invertida); d) efeito antioxidante da vitamina E (doação do hidrogênio); e) reestruturação da membrana plasmática; reciclagem da vitamina E pela ação da vitamina C.
Fonte: Buettner (1993) apud por Borges (2008)

A vitamina E é considerada o mais importante, porém, não o único inibidor da reação em cadeia da peroxidação lipídica nas células animais (Halliwell & Gutteridge, 1999). Devido às suas propriedades benéficas, a investigação sobre o papel antioxidante da vitamina E tem sido frequentemente reportado para várias espécies (Donelly et al., 1999; Ball et al. 2001).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção dos reprodutores e análises do sêmen

O experimento foi conduzido na Estação Ambiental de Itutinga da Companhia Energética de Minas Gerais (EAI-CEMIG), localizada na cidade de Itutinga, Minas Gerais (- 21° 17' 53" Latitude e 44° 39' 28" Longitude), durante a piracema de 2009/2010, nos meses de dezembro e janeiro.

A EAI-CEMIG localiza-se nas proximidades da Usina Hidrelétrica de Camargos, no médio Rio Grande, entre os Municípios de Madre Deus de Minas e Itutinga.

Foram utilizados sete machos de curimba (*Prochilodus lineatus*) da própria estação de piscicultura, com pesos variando de 1,2 a 2 Kg e 6 animais para o teste de toxicidade variando de 1 a 1,8 Kg . Foram selecionados os machos com a papila urogenital hiperêmica (avermelhada) e que, sob leve massagem abdominal, liberavam sêmen.

As análises de descongelamento e de morfologia do sêmen foram realizadas no Laboratório do Setor de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Lavras, Lavras, sul de Minas Gerais.

4.2 Indução e coleta de sêmen

Os machos selecionados, após a biometria, receberam tratamento com doses do hormônio acetato de buserelina, um análogo de GnRH (Hormônio liberador das gonadotrofinas), para induzir a espermiação. As doses iniciais e definitivas utilizadas do hormônio foram de 0,25 e 0,75 mL por Kg de peixe, aplicadas através de injeções intramusculares próximas à base da nadadeira dorsal em intervalos de 12 horas entre cada aplicação.

Os animais foram mantidos em aquários de alvenaria no laboratório EAI e o sêmen foi coletado após 24 horas contadas a partir da dose inicial.

As papilas urogenitais foram limpas e secas com toalhas de papel para se evitar contaminação por fezes, urina, água e sangue. Em seguida, foram realizadas massagens manuais delicadas na parede celomática, em sentido crânio-caudal e procedeu-se a coleta do sêmen em tubos graduados para a determinação do volume do sêmen.

4.3 Avaliações do sêmen *in natura*

Após a determinação do volume do sêmen, duas alíquotas de 10 µL foram separadas de cada animal. Essas amostras foram visualizadas em microscópio óptico de luz, em aumento de 100 dioptrias, para se avaliar a motilidade espermática. Para isso, cada alíquota foi homogeneizada com 40 µL de cada um dos ativadores: água destilada e bicarbonato de sódio (na concentração de 1%) conforme indicado na literatura (Miliorini, 2006; Murgas et al., 2001), e avaliada a porcentagem média de espermatozóides móveis em três campos escolhidos aleatoriamente. Determinou-se também a duração da motilidade espermática após a homogeneização, com ambos ativadores até que restassem cerca de 10% dos espermatozóides móveis em cada campo.

Para se determinar a concentração e morfologia espermáticas foi coletada uma alíquota de 10 µL do sêmen *in natura* de cada peixe, diluída em 990 µL de solução formol citrato (constituída de 2,9 g de citrato de sódio, 4 mL de formaldeído 35% e água destilada, q.s.p. 100 mL).

4.4 Avaliação da concentração espermática

Para determinar a concentração espermática, o sêmen diluído em formol citrato anteriormente reservado, foi novamente diluído na proporção de 10 µL de amostra para 990 µL de formol citrato resultando em uma nova diluição (1 sêmen:10^4 µL de formol citrato). A concentração foi então estimada com a utilização de uma câmara de Neubauer e o valor obtido foi multiplicado pelo fator de correção 50.000, sendo então estimada a quantidade de células por mm^3 pela seguinte fórmula:

CE = *N* x *FC*; onde:
CE é a concentração espermática (espermatozóides por mm^3);
N é o número de células contadas na câmara de Neubauer.
e o fator de correção (*FC*) é dado por:

FC = (*q* x *fd*) / *d*;
em que:

q = 5, e representa a razão entre o número total de quadrículos da câmara de Neubauer (25) e o número de quadrículos contados (5);
fd é o fator de diluição da alíquota de sêmen (= 10^4);
d é a profundidade entre a lamínula e a câmara de Neubauer (= 0,1 mm).

4.5 Teste de toxicidade das soluções e concentrações de antioxidantes

Para se avaliar a toxicidade das soluções, o metanol (10%) e a lactose (15%) contendo a vitamina E nas concentrações 50, 100 e 250 µM e glutationa reduzida nas concentrações 0,5; 1,0 e 1,5 mM, foram misturadas em tubos de ensaio, cuidadosamente, na proporção de 1:4 (1 sêmen:4 solução) no sêmen *in natura* após análise prévia de suas condições. As soluções foram deixadas em

repouso por cerca de10 minutos. As amostras foram então ativadas com água destilada e determinada a motilidade espermática de forma similar à empregada no sêmen *in natura*.

4.6 Congelamento do sêmen

Foram utilizadas para o congelamento de sêmen amostras que apresentaram motilidade espermática acima de 85%. O sêmen foi diluído em tubos de ensaio na proporção de 1:4 (sêmen : solução crioprotetora com diferentes antioxidantes). A solução crioprotetora constituída por metanol (10%) e lactose (15%) mais os antioxidantes nas respectivas concentrações estão apresentadas na TABELA 3 e foram determinadas conforme encontrado na literatura (Barros, 2007; Monteiro et al., 2009).

TABELA 3 Tratamentos utilizados no congelamento de sêmen de curimba

Tratamento	Antioxidante	Concentração
1	Vitamina E	50 µM
2	Vitamina E	100 µM
3	Vitamina E	250 µM
4	Glutationa Reduzida	0,5 mM
5	Glutationa Reduzida	1,0 mM
6	Glutationa Reduzida	1,5 mM
Controle	-	-

Foram utilizados os antioxidantes Glutationa reduzida (Sigma Aldrich®) e a vitamina E (tocoferol acetato) da Adisseo Brasil Nutrição Animal Ltda.

O sêmen diluído nas diferentes soluções foi envasado em palhetas de 0,5 mL (n=2 palhetas). Estas foram vedadas com massa cirúrgica estéril e acondicionadas em raques, que foram então, armazenadas e resfriadas em vapor de nitrogênio líquido (Taylor-Wharton, modelo CP 300, *dry shipper*)

Após 24 horas, as raques foram transferidas para o botijão de nitrogênio líquido (Cryometal, modelo DS-18), sendo armazenadas durante 4 dias.

4.7 Descongelamento do sêmen

As duas palhetas de cada tratamento foram descongeladas individualmente em banho-maria com temperatura de 60°C através de sua imersão em água durante 8 segundos. Em seguida, as palhetas foram secas com papel toalha para evitar contato do sêmen com a água e tiveram suas extremidades com a massa cirúrgica eliminadas. O sêmen foi, então, depositado em uma placa de Petri. Uma alíquota de 10 µL de sêmen foi avaliada sob microscopia óptica (100x) para verificar-se ausência de ativação. Posteriormente, o sêmen foi ativado com a homogeneização em 40 µL de água ou bicarbonato de sódio (concentração de 1%).

A taxa de motilidade espermática foi avaliada através da porcentagem média de espermatozóides móveis em três campos aleatórios. A duração da motilidade espermática, em segundos, foi avaliada desde a homogeneização em água ou bicarbonato de sódio (concentração de 1%) até o momento em que cerca de 10% dos espermatozóides em cada campo fossem estimados ainda com motilidade.

4.8 Avaliação da morfologia espermática

Após o descongelamento do sêmen e a avaliação da taxa e a duração da motilidade espermática, uma amostra de 10 µL de sêmen descongelado foi coletada e adicionada a 990 µL de formol citrato para análise morfológica espermática dos reprodutores.

Uma alíquota de 10 µL da solução foi coletada e foram contados, em diversos campos de toda a lâmina, no mesmo sentido intercalado para todas as amostras, 100 espermatozóides e suas respectivas anomalias morfológicas, em

um aumento de 1000 dioptrias. Foi utilizado o microscópio óptico de contraste de fase, com iluminação episcópica (Motic BA 300®).

Foram analisadas, nos espermatozóides, as regiões da cabeça, da peça intermediária e da cauda, sendo consideradas as seguintes anomalias (TABELA 4).

TABELA 4 Características das anomalias morfológicas maiores avaliadas no sêmen de curimba

Porção	**Anomalia Morfológica**	**Características**
Cabeça	Macrocefalia	Cabeça gigante, contorno e formas anormais.
	Microcefalia	Cabeça pequena, contorno e formas anormais.
	Degenerada	Cabeça com contorno irregular e ou degenerações cromatínica ou vacuolar
Peça intermediária	Degenerada	Alterações na espessura, densidade, difração e comprimento na peça intermediária, envolvidos no contorno e inserção à cabeça.
Cauda	Fraturada	Fratura e retenção da cauda
	Fortemente enrolada	Dobras e enovelamento da cauda sobre si ou sobre a cabeça.
	Degenerada	Rompimento na extensão da cauda a partir da peça intermediária.

Fonte: Miliorini (2006)

As anomalias morfológicas que foram consideradas menores estão apresentadas na TABELA 5.

TABELA 5 Características das anomalias morfológicas menores avaliadas no sêmen de curimba

Porção	Anomalia morfológica	Características
Cabeça	Isolada normal	Cabeça sem cauda, mas, com características normais
Peça intermediária	Gota proximal	Presença de gota ao longo da peça intermediária
Cauda	Dobrada	Dobradura da cauda em vários graus sem envolvimento de si mesma ou da cabeça
	Gota distal	Presença de gota ao longo da cauda

Fonte: Miliorini (2006)

4.9 Análise estatística

Foi adotado o delineamento experimental em blocos casualizados (DBC), com repetição nos tratamentos, com 7 blocos e 2 repetições por bloco. Os tratamentos foram dispostos em uma estrutura fatorial 2x3x2+1 (antioxidantes, concentrações, ativadores, e controle sem o antioxidante). O controle local, para extrair o efeito dos animais (blocos) do resíduo, foi aplicado para os diferentes reprodutores (peso). O modelo adotado foi o seguinte:

$Yijkm = \mu + \alpha i + \beta j + \delta k + \delta(m+m^2)km + (\alpha\delta)ik + (\alpha\delta)jk(m+m^2) + eijkm$, em que:

Yijkm = valor observado para o sêmen diluído no antioxidante k, nas doses m, acrescido no ativador j e no bloco i;

μ = constante inerente a cada parcela;

αi = efeito do bloco (i= 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7);

βj = efeito do ativador (j= 1, 2);

δk = efeito do antioxidante (k = 1, 2);

δk (m+m^2) = efeito das doses (m= 1, 2) nos diferentes antioxidantes;
$(\beta\delta)jk$ = efeito da interação entre o ativador k e o antioxidante i;
$(\beta\delta)jk$(m+m^2) = efeito da interação entre o ativador j e o antioxidante k dentro das duas doses;
eijkm = erro experimental referente a cada observação, que tem por hipótese distribuição normal, com média zero e variância σ^2.

Para o teste de toxicidade foi adotado o mesmo delineamento experimental em blocos casualizados (DBC), com repetição nos tratamentos. Esta análise teve, porém, duas exceções. Foram utilizados 6 blocos com 1 repetição por bloco. Os tratamentos foram dispostos em uma estrutura fatorial 2x3+1 (antioxidantes, concentrações, e controle sem antioxidante).

As variáveis foram avaliadas quanto à homogeneidade da variância e normalidade dos resíduos, antes de serem analisadas. As variáveis que não apresentaram distribuição normal foram transformadas em raiz quadrada ou elevada à (-1) para sua normalização e para demonstração dos dados convertidas novamente. As médias da análise do sêmen *in natura* foram submetidas à correlação de Pearson para avaliar correlações entre as variáveis estudadas.

Os resultados conseguidos foram submetidos à análise de variância utilizando-se o pacote computacional R (R Development Core Team, 2003). As médias calculadas, quando significativas, foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Teste de Toxicidade

As médias obtidas nos testes de toxicidade estão apresentadas na TABELA 6. Não houve diferença significativa para a vitamina E e para a glutationa reduzida das interações, concentrações e as doses avaliadas para a taxa de motilidade e duração da motilidade espermáticas (P>0,05), que difere da literatura para outras espécies (Askari et al., 1994; Monteiro et al., 2009; Bilodeau et al., 2001). Esses resultados divergentes podem ser devidos a diferenças no tamanho amostral, na técnica, nas concentrações utilizadas, dentre outros.

O uso do metanol e lactose com os diferentes antioxidantes, quando ativado com água destilada foi pouco tóxico para o sêmen de curimba, alcançando médias consideradas altas para a motilidade e duração espermáticas.

TABELA 6 Média e desvio padrão da motilidade espermática (taxa em % e duração em segundos) do sêmen de curimba (*P. lineatus*) submetido ao teste de toxicidade utilizando diferentes antioxidantes

Tratamentos	**Variáveis**	
	Taxa (%)	**Duração (s)**
Controle	94,17 ± 1,10	128 ± 5,65
1	90,83 ± 1,27	218 ± 69,30
2	93,33 ± 0,50	85 ± 4,75
3	96,67 ± 2,86	88 ± 22,63
4	94,17 ± 1,10	95 ± 17,68
5	89,17 ± 2,44	116 ± 2,83
6	90,00 ± 1,85	116 ± 2,83

Em experimentos ainda não publicados, o mesmo teste de toxicidade foi aplicado anteriormente em um *pool* do sêmen de tilápia (*Oreochromis niloticus*), utilizando-se o crioprotetor composto por glicose, leite em pó e metanol e sendo obtidas taxas de 90 e 100% de motilidade espermática e 328 e 632 segundos para duração da motilidade espermática para a vitamina E (50µM) e glutationa reduzida (1,0 mM) respectivamente (Murgas et al., dados não publicados).

A criopreservação de sêmen com antioxidantes vitamina E e glutationa reduzida não afeta a qualidade do sêmen, pois vários autores criopreservaram sêmen de curimba com uma taxa de motilidade mínima de 80% (Orfão, 2006; Maria, 2005; Oliveira 2006; Paulino, 2009). Neste trabalho, não houve taxas inferiores a este valor para o sêmen criopreservado e submetido ao teste de toxicidade com metanol, lactose, vitamina E e glutationa reduzida, indicando que esses antioxidantes podem ser pouco tóxicos ao sêmen de curimba.

5.2 Avaliação do sêmen *in natura*

Na TABELA 7 estão representadas as médias do peso corporal e das características do sêmen *in natura* dos peixes utilizados nos experimentos. Não houve correlação (P>0,05) entre nenhuma das variáveis analisadas.

A determinação das características espermáticas é de fundamental importância para se conhecer a qualidade do material fecundante em uma reprodução artificial (Marques, 2001; Bedore, 1999). Foi observada uma média de 36,4 x 10^9 espermatozóides/mL de sêmen (TABELA 6) utilizando o hormônio Conceptal®, um análogo do GnRH, muito empregado em mamíferos. A alta concentração de espermatozóides observada (36,4 x 10^9 ± 2,67) pode estar relacionada com a utilização do hormônio Conceptal. Em relação à concentração de espermatozóides, observa-se um número elevado em comparação com tratamentos que utilizaram extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC) e gonadotropina coriônica humana (hCG). Orfão (2006) obteve 18,3 x

10^9 espermatozóides/mL para mesma espécie quando utilizou extrato bruto de hipófise de carpa, Kavamoto (1997) encontrou em *Prochilodus scrofa* 26,18 x 10^6 espermatozóides/mm^3, após tratamento hormonal com hCG. Outro fator que pode ter influenciado na concentração espermática, além do indutor, seria o fato de que os reprodutores encontravam-se quase do meio para o final da piracema. De acordo com Silva et al. (2009), a época do período reprodutivo influenciou positivamente na concentração espermática de curimba, sendo maior no mês de janeiro.

TABELA 7 Características do sêmen *in natura* de curimba utilizado no experimento de criopreservação com diferentes antioxidantes

Peixes	Peso (Kg)	Volume (mL)	Concentração de sêmen*	Motilidade (%)	Ativador
1	1,6	3,0	38,9	100 100	Água Bicarbonato
2	1,6	9,0	35,2	100 100	Água Bicarbonato
3	1,9	4,0	37,8	100 100	Água Bicarbonato
4	1,5	5,4	31,15	95 100	Água Bicarbonato
5	1,8	6,2	38,7	95 100	Água Bicarbonato
6	2,0	10,8	36,3	100 100	Água Bicarbonato
7	1,2	10,0	36,8	100 100	Água Bicarbonato
Médias	1,66	6,91	36,4	99,3	
DP	0,27	3,04	2,67	1,81	

*(espermatozóides x 10^9/mL)

O volume seminal médio obtido neste trabalho de foi 6,91 (± 3,04) mL. Esse valor foi superior ao obtido por Orfão (2006) de 2,4 mL e ao encontrado

por Pereira (2006) de 2,62 mL, que observaram a indução espermática com extrato bruto de hipófise de carpa em *P. lineatus*. Segundo Donaldson & Hunter (1983), peixes que recebem tratamentos hormonais apropriados apresentam sêmen mais fluido, com aumento do volume e da qualidade.

Méndez & Rodriguez, (1989) obtiveram sucesso na indução da maturação final e desova de peixes migratórios brasileiros com o acetato de buserelina. Porém, em um estudo avaliando a ação do acetato de buserelina em desova de matrinxã (*Brycon cephalus*), Ramos et al. (1997) obtiveram taxas significativamente inferiores ao EBHC.

5.3 Avaliação das características seminais após descongelamento

5.3.1 Motilidade espermática

Não houve efeito da interação, dos antioxidantes, das doses e dos ativadores sobre a motilidade espermática de curimba (P>0,05). Os valores médios de motilidade espermática observadas são mostrados na TABELA 8. Cabe ressaltar que todos os tratamentos e o grupo controle apresentaram médias consideradas satisfatórias em um protocolo de criopreservação.

A taxa de motilidade para os ativadores água e bicarbonato variaram de 65,71 ± 2,78 a 75,71 ± 9,84 e 65 ± 0,42 a 76,43 ± 6,39 respectivamente. Esse resultado sem efeito dos tratamentos sobre as variáveis analisadas difere de alguns trabalhos que usaram os mesmos antioxidantes em diferentes espécies de mamíferos

TABELA 8 Média e desvio padrão da taxa de motilidade espermática do sêmen de curimba (*P. lineatus)* congelado em diferentes antioxidantes e utilizando água e bicarbonato como ativadores durante o descongelamento

Antioxidantes	Ativadores	
	Água	Bicarbonato
Controle	65,71 ± 2,78	67,86 ± 2,45
1	70,00 ± 5,81	70,71 ± 4,46
2	76,86 ± 4,30	65,00 ± 0,42
3	72,14 ± 7,33	74,29 ± 6,99
4	67,86 ± 4,80	76,43 ± 6,39
5	67,14 ± 3,70	64,29 ± 0,08
6	75,71 ± 9,89	70,00 ± 3,96

Não foi observada diferença significativa (P>0,05)

Barros (2007) observou que o sêmen de gato-do-mato-pequeno (*Leopardo tigrinus*), por ex., resfriado em concentrações de glutationa reduzida 0; 0,5; 1,0; 1,5 μM apresentou motilidades espermáticas de 32,52 ± 5,53%; 29,24 ± 5,80%; 27,59 ± 5,35%; 27,33 ± 5,20% respectivamente. Contudo, essas médias não foram diferentes estatisticamente (P>0,05). Askari et al. (1994) avaliando sêmen de humanos congelado com 10 mM de vitamina E (40,04% ± 3,82), obtiveram diferenças significativas (p<0,02) na taxa de motilidade do sêmen em relação ao grupo controle sem vitamina E (36,12% ± 10,91). Monteiro et al. (2009), trabalhando com sêmen canino obtiveram valores mais elevados de motilidade espermática em 60 e 90 minutos pós-descongelamento com concentrações de glutationa 5 mM.

Segundo Bilodeau et al. (2001), houve uma maior elevação da motilidade espermática ao se adicionar glutationa redutase e glutationa peroxidase ao sêmen de bovinos antes do congelamento.

Uma possível explicação, para efeitos positivos do uso de glutationa para ruminantes, pode ser uma relação maior de ácidos graxos insaturados/saturados nas membranas dos espermatozóides em comparação com as de outros animais. Essa maior relação confere à membrana dos ruminantes uma maior susceptibilidade aos danos causados pela peroxidação lipídica através de EROs. Esse processo leva à perda de integridade acrossomal e prejudica a função e a motilidade dos espermatozóides (Alvarez & Storey, 1995). Uma liberação controlada e espontânea do oxigênio molecular leva à formação de baixas concentrações de EROs e mantém a capacidade fertilizante e capacitação acrossômica dos espermatozóides (Alvarez & Moraes, 2006).

Outra possível explicação para os efeitos diferenciados dos antioxidantes nos mamíferos e nos os peixes é que os últimos possuem espermatozóide morfologicamente diferenciado e uma motilidade espermática menos duradoura (Billard & Cosson, 1992). Apesar dos espermatozóides de peixes serem morfologicamente subdivididos em cabeça, peça intermediária e cauda (Nagahama, 1983), em muitos grupos, o acrossoma, estrutura que ocorre em todos os outros grupos de vertebrados, encontra-se ausente nos peixes. Porém, nesse grupo, o acrossoma é substituído pela micrópila, um orifício no cório do ovo onde ocorre a penetração do espermatozóide (Cosson et al., 1999).

Os espermatozóides de mamíferos não possuem habilidade para fecundar os oócitos imediatamente após a ejaculação, mesmo estando móveis e apresentando uma morfologia aparentemente normal (Austin, 1951). Os espermatozóides alcançam *in vivo* esta capacidade fecundante (capacitação espermática) no trato genital feminino. Os peixes, por sua vez, possuem espermatozóides imóveis nas gônadas masculinas e, em muitas espécies, no plasma seminal. Contudo, durante a reprodução, a motilidade é iniciada depois da liberação dos espermatozóides no ambiente aquoso. Assim, os

espermatozóides possuirão capacidade fertilizante imediatamente desde que a osmolaridade da água ou do meio sejam favoráveis (Takai & Morisawa, 1995)

O processo de congelamento/descongelamento resulta na destruição parcial de alguns dos sistemas de enzimas que estão envolvidas na neutralização de EROs (Storey & Alvarez, 1992). É provável que este conjunto de enzimas danificadas pela produção de EROs esteja presente no acrossoma dos mamíferos, o que explicaria o maior efeito dos antioxidantes nesses animais e não nas espécies de peixes.

Por outro lado, é possível que a menor duração da motilidade espermática, em relação a outros vertebrados, não tenha sido suficiente para produzir radicais livres que poderiam ser inativados pela ação dos antioxidantes testados. Cabe ainda ressaltar que existe a possibilidade de que as concentrações utilizadas não tenham sido suficientes ou demasiadas em alguns casos para se obter diferenças significativas entre os tratamentos, sendo necessários estudos posteriores para uma melhor definição.

Nas condições em que o experimento foi conduzido foram obtidas médias acima de 65,71% para taxa de motilidade. De acordo com Carolsfeld et al. (2003), o metanol (a 10%) e o leite em pó (a 15%) juntos são crioprotetores que apresentam bons resultados para piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). A eficiência da lactose na criopreservação do sêmen de curimba mostrou-se bastante satisfatória, pois as amostras de sêmen descongeladas apresentaram motilidade elevada. Os resultados são similares aos encontrados por Miliorini (2006), que utilizou metanol em concentrações que variaram de 5 a 12,5% em associação com BTS e obteve uma motilidade média de 68% (± 1,9; n=160).

O BTS é constituído por carboidratos e sais (79,9 g de glicose; 12,71 g de citrato de sódio; 2,65 g de ácido etilenodiaminotetracético; 2,65 g de carbonato ácido de sódio; 159 g de cloreto de potássio e 0,50 g de sulfato de gentamicina) que dão proteção e nutrição ao espermatozóide durante sua

ativação. Seu uso foi inicialmente realizado em ensaios na preservação de espermatozóides de curimba por Franciscatto et al. (2002). Posteriormente, o BTS foi utilizado em sêmen de pacu (*P. mesopotamicus*) (Miliorini et al., 2002), de piapara (*L. obtusidens*) (Murgas et al., 2003), com sêmen resfriado de piracanjuba (Murgas et al., 2004), com sêmen de dourado (*S. brasilien*sis) (Viveiros et al., 2009), com sêmen de pirapitinga (*B. nattereri*) (Oliveira et al., 2007) e com experimentos de criopreservação de curimba (Orfão, 2006; Maria, 2005; Miliorini, 2006; Miliorini et al., 2007). Provavelmente o uso isolado da lactose, um carboidrato constituído por glicose e galactose, supriu o efeito benéfico do BTS na criopreservação de sêmen de curimba, através da estabilização da camada lipídica da membrana plasmática durante o congelamento associada à presença de glicose (Gwo, 1994).

5.3.2 Duração da motilidade

Não houve efeito entre as interações dos antioxidantes ou das doses sobre a motilidade espermática de curimba (P>0,05). As médias de duração da motilidade espermática são mostradas na TABELA 9.

TABELA 9 Média e desvio padrão da duração espermática do sêmen de curimba (*P. lineatus*) congelado em diferentes antioxidantes e utilizando água e bicarbonato como ativadores durante o descongelamento

Tratamentos	Duração (s)
Controle	207 ± 2,61
1	192 ± 7,80
2	224 ± 14,63
3	200 ± 2,34
4	197 ± 4,46
5	196 ± 5,17
6	208 ± 2,34

Não foi observada diferença significativa (P>0,05)

A duração da motilidade espermática variou de 192 a 224 segundos, sendo superior aos valores que foram encontrados para curimba por Miliorini (2006), e que se manteve por 24 a 88 segundos. Contudo, os resultados obtidos foram inferiores ao encontrado por Cóser et al. (1984), que observaram uma motilidade de 612 segundos para esta espécie.

Os ativadores água e bicarbonato apresentaram um efeito significativo sobre a duração da motilidade espermática (FIGURA 6) ($p<0,05$). Como ocorre na maioria dos peixes de água doce, a duração é curta devido à ineficiência da mitocôndria em suprir a demanda elevada de energia do flagelo (Billard, 1992). Porém, se a ativação da motilidade for realizada com uma solução de bicarbonato de sódio a 1% (Stein & Bayrle, 1978), o período de motilidade dos espermatozóides é aumentado.

Esse efeito positivo do bicarbonato tem sido comprovado por alguns autores. Murgas et al. (2001) verificaram que a utilização de bicarbonato (a 0,5 e 1,0%) aumentou a duração e as taxas de motilidade espermática para piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). Kavamoto et al. (1987) observaram que a mobilidade das células espermáticas de *Salmo irideus* Gibbons ativado com bicarbonato a 1%, atingiu valor médio de 90,65% e mantiveram-se móveis por cerca de 1 minuto. Miliorini (2006) obteve as melhores taxas de motilidade em bicarbonato 1% como ativador associado com o diluidor DMSO.

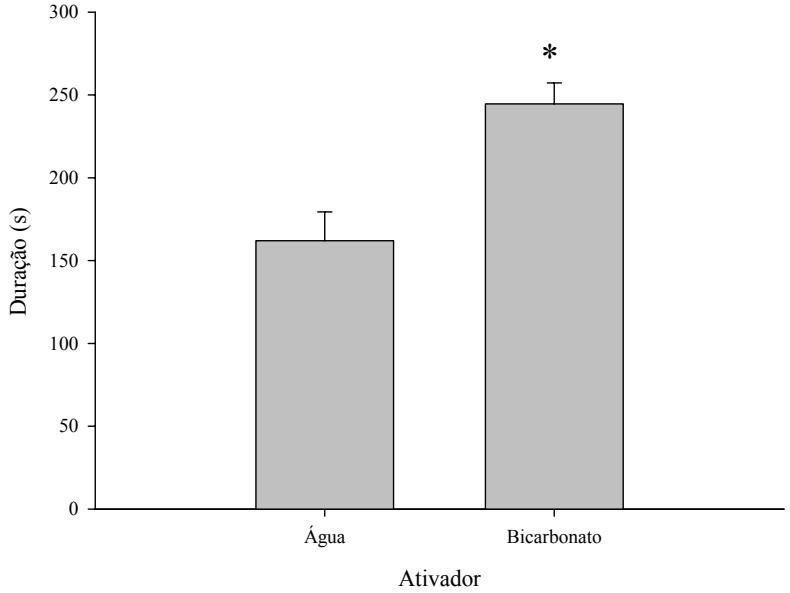

FIGURA 6 Duração da motilidade espermática com ativadores água e bicarbonato. *Indica diferença significativa (P<0,05)

5.4 Análise morfológica do sêmen

As interações, os antioxidantes, as doses e os ativadores não exerceram efeito (P>0,05) sobre as anomalias morfológicas espermáticas no sêmen de curimba (TABELA 10).

Índices de espermatozóides com anormalidades acima de 30% são inapropriados para inseminação artificial de bovinos e equinos. Índices de 20% são inapropriados à inseminação artificial de suínos. Portanto, mesmo sem efeito significativo dos tratamentos, o sêmen apresentou médias menores que 30% (Colégio Brasileiro de Reprodução Animal - CBRA, 1998). As anomalias morfológicas maiores e totais foram inferiores às encontradas por Miliorini (2006) e as anomalias morfológicas menores foram superiores que as encontradas pelo mesmo autor para curimba sem uso de antioxidantes.

TABELA 10 Média e desvio padrão das anomalias morfológicas espermáticas (%) do sêmen de curimba (*P. lineatus*) criopreservado em diferentes antioxidantes

Tratamentos	**Anomalias morfológicas (%)**		
	Maiores	**Menores**	**Totais**
Controle	14,43 ± 2,48	8,00 ± 0,86	22,43 ± 1,58
1	16,43 ± 1,07	7,86 ± 0,76	24,29 ± 0,27
2	19,00 ± 0,75	7,43 ± 0,46	26,43 ± 1,25
3	15,86 ± 1,46	5,29 ± 1,05	21,14 ± 2,50
4	18,29 ± 0,25	6,00 ± 0,55	24,29 ± 0,27
5	21,57 ± 2,57	6,71 ± 0,05	28,00 ± 2,35
6	20,00 ± 1,46	6,14 ± 0,45	26,14 ± 1,04

Não foi observada diferença significativa (P>0,05)

As anomalias morfológicas menores ocorreram possivelmente durante a espermatogênese devido a fatores que acometem os reprodutores, como por ex., estresse ambiental e enfermidades. Anomalias morfológicas maiores, por sua vez, estariam relacionadas ao manejo durante a coleta do sêmen e a avaliação de anomalias morfológicas em microscopia óptica (Herman et al., 1994).

Como não houve diferença significativa entre os tratamentos e o grupo controle, possivelmente as causas de anomalias são influenciadas pelos fatores citados por estes autores, limitando-se aos danos causados pelos processos de espermatogênese e descongelamento. E provavelmente a produção de EROs não estaria envolvida nestes danos. Contudo, para uma afirmação confiável sobre o efeito da produção de EROs nas anomalias espermáticas seria necessária uma análise de integridade da membrana plasmática associada a estas análises morfológicas. Assim, nos cercaríamos de todos os prováveis efeitos causados sobre o espermatozóide. Estudos posteriores são necessários para a uma melhor compreensão dos resultados.

6 CONCLUSÕES

Nas condições em que este experimento foi realizado pôde-se concluir que:

- A solução crioprotetora constituída por metanol e lactose juntamente com os antioxidantes glutationa e vitamina E não causou toxicidade para o sêmen de curimba (*P. lineatus*);
- Os antioxidantes glutationa e vitamina E não exerceram efeito na qualidade do sêmen criopreservado de curimba;
- O melhor ativador para o sêmen de curimba após o descongelamento, relacionado com a solução crioprotetora constituída por metanol, lactose e os antioxidantes foi o bicarbonato de sódio;
- O congelamento e descongelamento com metanol e lactose associado aos antioxidantes causam baixas taxas de anomalias morfológicas espermáticas no sêmen de curimba.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AITKEN, R. J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction, Fertility and Development**, Melbourne, v. 7, n. 4, p. 659-668, Aug. 1995.

AITKEN, R. J.; BAKER, M. A. Oxidative stress, sperm survival and fertility control. **Molecular and Cellular Endocrinology**, New York, v. 250, n. 1/2, p. 66-69, May 2006.

ALAVI, S. M. H.; COSSON, J. Sperm motility in fishes: (I) effects of temperature and pH, a review. **Cell Biology Internatinal**, Dordrecht, v. 29, n. 2, p. 101-110, Feb. 2005.

ALAVI, S. M. H.; COSSON, J. Sperm motility in fishes: (II) effects of ions and osmolality, a review. **Cell Biology Internatinal**, Dordrecht, v. 30, n. 1, p. 1-14, Jan. 2006.

ALVAREZ, C. A.; MORAES, G. V. Efeitos da selenometionina e da vitamina C sobre o sêmen. **SaBios:** revista de saúde e biologia, Campo Mourão, v. 1, n. 1, p.42-51, jan. 2006.

ALVAREZ, J. G.; STOREY, B. T. Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. **Reproduction, Fertility and Development**, Melbourne, v. 7, n. 4, p. 871-891, Aug. 1995.

ANDRADE-TALMELLI, E. F.; KAVAMOTO, E. T.; FENERICH-VERANI, N. Características seminais da piabanha, *Brycon insignis* (Steindachner, 1876), após estimulação hormonal. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 149-154, jul. 2001.

ASKARI, H. A.; CHECK, J. H.; PEYMER, N.; BOLLENDORF, A. Effect of natural antioxidants tocopherol and ascorbic acids in maintenance of sperm activity during freeze-thaw process. **Archives of Andrology**, New York, v. 3, n. 1, p. 11-15, Jan. 1994.

AUSTIN, C. R. Observations on the penetration of the sperminto the mammalian egg. **Australian Journal of Science Research**, Sydney, v. 167, n. 4250, p. 581-596, Apr. 1951.

BALL, B. A.; MEDINA, V.; GRAVANCE, C. G.; BAUMBE, J. Effects of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5ºC. **Theriogenology,** Stoneham, v. 56, n. 4, p. 577-589, Sept. 2001.

BARROS, P. M. H. **Estresse oxidativo e integridade do DNA em sêmen resfriado de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*) (SCHREBER, 1775).** 2007. 120p. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Universidade de São Paulo, São Paulo.

BEDORE, A. G. **Características e criopreservação 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. Reproduction in rainbow trout: sex differentiation dynamics of gametogenesis, biology and preservation of gametes. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 100, n. 1/3, p. 263-298, Jan. 1992.

BILLARD, R. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. **Reproduction Nutrition Development:** anciennement annales de biologie, biochimie, biophysique, Paris, v. 2, n. 5, p.877-920, Sept./Oct. 1986.

BILLARD, R.; COSSON, M. P. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. **The Journal of Experimental Zoology,** New York, v. 261, n. 2, p. 122-13, Feb. 1992.

BILODEU, J. F.; BLANCHETTE, S.; GAGNON, C. Thiols prevent H_2O_2-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. **Theriogenology,** Stoneham, v. 56, n. 3, p. 275-286, Mar. 2001.

BILODEU, J. F.; BLANCHETE, S.; CORMIER, N.; SIRAD, M. A. Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris exyender: protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. **Theriogenology**, Stoneham, v. 57, n. 3, p. 1105-1122, Feb. 2002.

BORGES, J. C. **Efeito da utilização de antioxidante no diluidor para a criopreservação de sêmen bovino avaliado através de testes complementares, inseminação artificial e fecundação *in vitro***. 2008. 70 p. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Estatística da pesca 2007**: grandes regiões e unidades da federação. Brasília: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, 2007. 151 p.

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

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal.** 2. ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49 p.

COMPANHIA ENERGÉTICA DE MINAS GERAIS. Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais. **Guia ilustrado de peixes da bacia do Rio Grande**. Belo Horizonte: CEMIG/CETEC, 2000. 144 p.

CÓSER, A. M. L.; GODINHO, H.; RIBEIRO, D. Cryogenic preservation of spermatozoa from *Prochilodus scrofa* and *Salminus maxillosus*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 37, n. 4, p. 387-390, Apr. 1984.

COSSON, J.; BILLARD, R.; CIBERT, C.; DREANNO, C.; SUQUET, M. Ionic factors regulating the motility of fish sperm. In: GAGNON, C. (Ed.). **The male gamete:** from basic to clinical applications. Paris: Cache Rive, 1999. p. 161-86.

DALIMATA, A. M.; GRAHAM, J. K. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methyl celulose. **Theriogenology**, Stoneham, v. 48, n. 5, p. 831-841, Oct. 1997.

DEVLIN, T. M. **Manual de bioquímica com correlações clínicas**. 6. ed. São Paulo: E. Blucher, 2007. 1186 p.

DICKINSON, D. A.; FORMAN, H. J. Cellular glutathione and thiols metabolism. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 64, n. 5, p. 1019-1026, Sept. 2002.

DONALDSON, E. M.; HUNTER, G. Induced final maturation ovulation and spermiation in cultured fish. ln: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J.; DONALDSON, E. M. (Ed.). **Fish Physiology**. New York: Academic, 1983. p. 351-403.

DONNELY, F. T.; MCCLURE, N.; LEWIS, S. F. M. Antioxidant supplementation in vitro does not improve human sperm motility. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v. 72, n. 3, p. 484-486, Mar. 1999.

DREANNO, C.; SUQUET, M.; DESBRUYERES, E.; COSSON, J.; LE DELLIOU, H.; BILLARD, R. Effect of urine on semen quality in Turbot, *Psetta maxima*. **Aquaculture**, Stoneham, v. 169, n. 3-4, p. 247-262, Dec. 1998.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira,** São Paulo, v. 43, n. 1, p. 1-16, jan. 1997.

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 o resfriamento à 4ºC. **Revista Brasileira de Reprodução Animal,** Belo Horizonte, v. 26, n. 3, p. 213-215, jul./set. 2002.

FREITAS, R. T. F.; FREATO, T. A.; SANTOS, V. B. Espécies cultivadas. In: MURGAS, L. D. S.; VIVEIROS, A. T. M.; MARIA, A. N.; FREITAS, R. T. F.; FREATO, T. A.; SANTOS, V. B. **Reprodução/espécies para piscicultura**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2002.p. 17-28.

GALDIOLI, E. M.; HAYASHI, C.; SOARES, C. M.; FURUYA, V. R. B.; FARIA, A. C. E. A. de. Substituição da proteína do farelo de soja pela proteína do farelo de canola em rações para alevinos de curimbatá (*Prochilodus lineatus* V.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 31, n. 2, p. 552-559, mar./abr. 2000.

GODINHO, H. P. Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 31, n. 3, p. 351-360, jul./set. 2007.

GODINHO, H. P.; CÓSER, A. M. L. Bases morfofuncionais de espermatogêneses e criopreservação de sêmen de peixes. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 11., 1995. **Anais...** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1995. p. 16-25.

GWO, J. C. Cryopreservation of yellowfin seabream (*Acanthopagrus latus*) spermatozoa (Teleost, Perciformes, Sparidae). **Theriogenology**, Stoneham, v. 41, n. 5, p. 989-1004, July 1994.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. **Journal of Neurochemistry**, Oxford, v. 59, n. 5, p. 1609-1623, Nov. 1992.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 3. ed. Oxford: University, 1999. 936 p.

HATANAKA, T.; HENRIQUE-SILVA, F.; GALETTI JÚNIOR, P. M. Population substructuring in a migratory freshwater fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae) from San Francisco River. **Genetica**, Dordrecht, v. 126, n. 1/2, p. 513-517, Jan. 2006.

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.

JAIN, S. K.; MCVIE, R.; SMITH, T.; Vitamin e supplementation restores glutathione and malondialdehyde to normal concentrations in erythrocytes of Type 1 Diabetic children. **Diabetes Care**, Alexandria, v. 23, n. 9, p. 1389-1394, Sept. 2000.

JOS, A.; PICHARDO, S.; PRIETO, A. I.; REPETTO, G.; VA´ZQUEZ, C. M.; MORENO, I.; CAMEAN, A. M. Toxic cyanobacterial cells containing microcystins induce oxidative stress in exposed tilapia fish (*Oreochromis sp*.) under laboratory conditions. **Aquatic Toxicology,** Amsterdam, v. 72, n. 2, p. 261-271, Feb. 2005.

KAVAMOTO, E. T.; BARNABE, V. H.; CAMPOS, B. E. S. de; ANDRADETALMELLI, E. F. de. Anormalidades morfológicas nos espermatozóides do curimbatá, *Prochilodus lineatus* (Steindachner, 1881) (Osteichthyes, Characiformes, Prochilodontidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 61-66, jan.1999.

KAVAMOTO, E. T.; FOGLI DA SILVEIRA, W. Características físicas, químicas e miscroscópicas de sêmen do Bagre, *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840) em condições de campo. **Boletim do Instituto de Pesca,** São Paulo, v. 13, n. 1, p. 95-100, jan. 1986.

KAVAMOTO, E. T.; SILVEIRA, W. S. da. Produção espermática do curimbatá *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881. **Boletim do Instituto de Pesca,** São Paulo, v. 24, n. 2, p.73-78, jul. 1997.

KAVAMOTO, E. T.; SILVEIRA, W. F. da; RIGOLINO, M. G.; TABATA, Y. A.; CAMPOS, B. E. S. Produção espermática e teste de fertilização do sêmen de truta arco-íris, *Salmo irideus* Gibbons, no primeiro ciclo reprodutivo. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 14, n. 1, p. 51-62, jan. 1987.

KHO, K. H.; TANIMOTO, S.; INABA, K.; OKA, Y.; MORISAWA, M. Transmembrane cell signaling for the initiation of trout sperm motility: roles of ion channels and membrane hyperpolarization for cyclic AMP synthesis. **Zoological Sciences**, Ottawa, v. 18, p. 919 -928, Sept./Oct. 2001.

MAIA, E. L.; OLIVEIRA, C. C. S.; SANTIAGO, A. P.; CUNHA, F. E. A.; HOLANDA, F. C. A. F.; SOUSA, J. A. Composição química e classes de lipídios em peixe de água doce Curimatã comum, *Prochilodus cearensis*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 19, n. 3, p. 433-437, set./dez. 1999.

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.

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

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. 191-194, jan./fev. 2004.

MÉNDEZ, A.; RODRIGUEZ, J. A. Reproducción inducida en cachama (*Piaractus brachypomus* Cuvier) com buserrelina (Conceptal). **Siall**, Bogotá, v. 6, p. 7-11, 1989.

MENEZES, J. T. B.; QUEIROZ, L. J.; DORIA, C. R. C.; MENEZES JR, J. B. Avaliação espermática pós-descongelamento em tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). **Acta Amazônica**, Manaus, v. 38, n. 2, p. 365-368, abr. 2008.

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 Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

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 REPRODUÇÃP ANIMAL, 16., 2005, Goiânia. **Resumos...** Goiânia: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2005. CD-ROM.

MILIORINI, A. B.; MURGAS, L. D. S.; PEREIRA, G. J. M.; SILVA, J. M. A.; DRUMOND, M. M.; FELIZARDO, V. O. O dimetilsulfóxido proporciona as maiores escalas de valorização da motilidade do sêmen descongelado de curimba (*Prochilodus lineatus)*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PRODUÇÃO DE PEIXES NATIVOS DE ÁGUA DOCE, 2007, Dourados. **Anais...** Dourados: Embrapa, 2007. CD-ROM.

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

MONTEIRO, J. C.; GONÇALVES, J. S. A.; RODRIGUES, J. A.; LUCIO, C. F.; SILVA, L. C. G.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. A.; VANNUCCHI, C. I. Influence of Ascorbic Acid and Glutathione Antioxidants on Frozen-Thawed Canine Semen. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 44, p. 359-362, 2009. Supplement 2.

MURGAS, L. D. S.; GUALHANONE, A.; SILVA, M. O. B.; MELLO, C. B.; FREITAS, R. T. F.; ZANGERONIMO, M. G. Calidad seminal del pez piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) post-descongelación. **Anales de Veterinária de Murcia**, Murcia, v. 17, p. 3-10, Dec. 2001.

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

MURGAS, L. D. S.; MILIORINI, A. B.; FREITAS, 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**, Viçosa, MG, v. 36, n. 3, p. 526-531, maio/jun. 2007.

MURGAS, L. D. S.; MILIORINI, A. B.; SILVA, M. O. B. Viabilidade do sêmen de piapara (*Leporinus obtusidens*) resfriado a 4°C, empregando-se diferentes diluidores. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, 12., 2002, Goiânia. **Anais…** Jaboticabal: AQUABIO, 2003. CD-ROM.

MURGAS, L. D. S.; SILVA, M. O. B.; MELLO, C. B. M.; KABEYA, D. M.; SANTANA, G. M. Avaliação quantitativa e qualitativa do sêmen de piaparas (*Leporinus obtusidens*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 23, n. 3, p. 246-248, jul./set. 1999.

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. p. 233-275.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 31, n. 11, p. 1287-1312, Nov. 2001.

OLIVEIRA, A. V. **Resfriamento e criopreservação do sêmen de dourado *Salminus maxillosus* e de pirapitinga *Brycon nattereri***. 2006. 96 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

OLIVEIRA, A. V.; VIVEIROS, A. T. M.; MARIA, A. N.; FREITAS, R. T. F.; IZAÚ, Z. A. Sucesso do resfriamento e congelamento de sêmen de pirapitinga *Brycon nattereri*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia,** Belo Horizonte, v. 59, n. 6, p.1509-1515, nov./dez. 2007.

OLIVEIRA, A. V.; VIVERIOS, A. T. M.; MORAES, G. F.; MARIA, A. N.; ORFÃO L. H.; SOUZA, G. A. Estudo comparativo das características seminais e de soluções diluidoras de sêmen durante o resfriamento, de piau-açu (*Leporinus macrocephalus*) e piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). In: CONGRESSO DOS PÓS-GRADUANDOS DA UFLA, 13., 2004, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2004. CD-ROM.

ORFÃO, L. H. **Resfriamento e criopreservação de sêmen de curimba *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836)**. 2006. 86 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

PAULINO, M. S. **Criopreservação de sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*)**: técnicas para o descongelamento, 2009. 77 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

PEREIRA, G. J. M. **Utilização de gonadotropina coriônica equina e/ou extrato bruto de hipófise de carpa na indução da reprodução de curimba (*Prochilodus lineatus*).** 2006. 61 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R:** a language and environment for statistical computing: version 2.10.1. Viena: Foundation for Statistical Computing, 2003. Disponível em: <http://cran. r-project.org/doc/manuals/ refman.pdf.>. Acesso em: 15 out. 2009.

RAMOS, R. O.; RAMOS, S. M.; MENDONÇA, J. O. J. Utilização de análogos do LHRH na indução do matrinchã, *Brycon cephalus.* **Boletim Técnico CEPTA**, Pirassununga, v. 10, p. 1-7, jun. 1997.

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.

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

SILVA, J. M. A.; MURGAS, L. D. S.; FELIZARDO, V. O.; PEREIRA, G. J. M.; NAVARRO, R. D.; MELLO, R. A. Características seminais e índices reprodutivos de curimba (*Prochilodus lineatus*) em diferentes períodos reprodutivos. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, São Paulo, v. 10, n. 3, p. 668-677, jul./set. 2009.

SILVEIRA, A. N. **Caracterização espermática, preservação criogênica do sêmen e fertilidade do matrinxã, *Brycon cephalus* (Günter, 1860) (Teleostei; Characidae)**. 2000. 45 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

SQUIRES, E. L.; PICKETT, B. W.; GRAHAM, J. K.; VANDERWALL, D. K.; McCUE, P. M.; BRUEMMER, J. E. **Cooled and frozen stallion semen.** Fort Collins: Colorado State, 1999. 80p.

STEIN, H.; BAYRLE, H. Cryopreservation of the sperm of some freshwater teleosts. **Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique**, Paris, v. 8, n. 4, p. 1073-1076, Oct./Dec. 1978.

STOREY, B. T.; ALVAREZ, J. G. Perioxidative damage to cryopreserved sperm is consequent to partial inactivation by superonide dismutase induced by Freeze-thaw process. **Journal Andrology Abstract**, Lawrence, v. 13, n. 1, p. 18-3, Jan./Feb. 1992.

STOREY, K. B. Oxidative stress: animal adaptations in nature. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 29, n. 12, p. 1715-1733, Dec. 1996.

STOSS, J. Fish gamete preservation and spermatozoan physiology. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J.; DONALDSON, E. M. (Ed.). **Fish physiology**. New York: Academic, 1983. p. 305-350.

STREIT JÚNIOR, D. P.; MORAES, G. V.; RIBEIRO, R. P.; SAKAGUTI, E. S.; SOUZA, E. D.; POVH, J. A.; CAÇADOR, W. Comparação do sêmen de Curimbá (*Prochilodus lineatus*) induzido por extrato de hipófise de frango, coelho ou carpa. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 41, n. 1, p. 147-153, jun. 2004.

STREIT JÚNIOR, D. P.; OLIVEIRA, A. C.; RIBEIRO, R. P.; SIROL, R. N.; MORAES, G. V.; GALO, J. M.; DIGMAYER, M. Motilidade, vigor e anomalias morfológicas seminal *in natura* e pós criopreservação de *Piaractus mesopotamicus*. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 35, n. 2, p. 159-167, jul. 2009.

STREIT JÚNIOR, D. P.; SIROL, R. N.; RIBEIRO, R. P.; MORAES, G. V.; GALO, J. M.; DIGMAYER, M. Parâmetros qualitativos do sêmen de dourado (*Salminus maxillosus*) em cativeiro**. Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 34, n. 3, p. 337-344, dez. 2008.

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

VIVEIROS, A. T. M.; OLIVEIRA, A. V.; MARIA, A. N.; ORFÃO, L. H.; SOUZA, J. C. Sensibilidade dos espermatozóides de dourado (*Salminus brasiliensis*) a diferentes soluções crioprotetoras. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia,** Belo Horizonte, v. 61, n. 4, p. 883-889, jul./ago. 2009.

VIVEIROS, A. T. M.; ORFÃO, L. H.; MARIA, A. N.; ALLAMAN, I. B. A simple, inexpensive and successful freezing method for curimba *Prochilodus lineatus* (Characiformes) semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 112, n. 1, p. 293-300, June 2009.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 60/61, n. 1, p. 481-492, June 2000.

WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of their post-thawing function. **Reproduction, Fertility and Development**, Melbourne, v. 7, n. 3, p. 871-891, July/Sept. 1995.

ANEXOS

Página

ANEXO A

TABELA 1A Análise de variância do efeito da adição de soluções crioprotetoras com diferentes antioxidantes sobre taxa de motilidade espermática (%) avaliada no teste de toxicidade (variável tranformada "duração^-1") 50

TABELA 2 A Análise de variância do efeito da adição de soluções crioprotetoras com diferentes antioxidantes sobre duração da motilidade espermática (s) avaliada no teste de toxicidade (variável tranformada raiz quadrada)..... 50

ANEXO B

TABELA 1 B Análise de variância do efeito da adição de soluções crioprotetoras com diferentes antioxidantes sobre a duração (s) espermática (variável transformada em raiz quadrada) do sêmen descongelado de curimba .. 51

TABELA 2 B Análise de variância do efeito da adição de soluções crioprotetoras com diferentes antioxidantes sobre a taxa (%) de motilidade espermática do sêmen descongelado de curimba..... 52

ANEXO C

TABELA 1C Análise de variância do efeito da adição de soluções crioprotetoras com diferentes antioxidantes sobre as anomalias morfológicas espermáticas totais (%) do sêmen descongelado de curimba..... 52

TABELA 2C Análise de variância do efeito da adição de soluções crioprotetoras com diferentes antioxidantes sobre as anomalias morfológicas espermáticas maiores (%) do sêmen descongelado de curimba 53

TABELA 3 C Análise de variância do efeito da adição de soluções crioprotetoras com diferentes antioxidantes sobre as anomalias morfológicas espermáticas menores (%) do sêmen descongelado de curimba 53

ANEXOS

ANEXO A

TABELA 1A Análise de variância do efeito da adição de soluções crioprotetoras com diferentes antioxidantes sobre taxa de motilidade espermática (%) avaliada no teste de toxicidade (variável tranformada "duração^-1").

Fontes de variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr (>F)
Bloco	5	0.0005	1.1087	6.8402	0.0002
Antioxidante (Ax)	2	0.0000	8.5210	0.5257	0.5965
Ax x Fatorial	1	0.0000	2.0800	0.0128	0.9105
Ax: Adicional	1	0.0000	1.6834	1.0386	0.3163
Ax x Dose	2	0.0000	4.3930	0.2710	0.7644
Ax x I(dose^2)	2	0.0000	3.2550	0.2008	0.8191
Resíduo	30	0.0004	1.6208		

CV = 34,14 %

TABELA 2A Análise de variância do efeito da adição de soluções crioprotetoras com diferentes antioxidantes sobre duração da motilidade espermática (s) avaliada no teste de toxicidade (variável transformada raiz quadrada).

Fontes de variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr (>F)
Bloco	5	7.0747	1.4149	14.9790	2.1610
Antioxidante (Ax)	2	0.2058	0.1029	1.0892	0.3494
Ax x Fatorial	1	0.1544	0.1544	1.6349	0.2108
Ax: Adicional	1	0.0513	0.0513	0.5435	0.4667
Ax x Dose	2	0.4417	0.2209	2.3381	0.1139
Ax x I(dose^2)	2	0.1116	0.0558	0.5907	0.5602
Resíduo	30	2.8338	0.0945		

CV = 3,20%

ANEXO B

TABELA 1B Análise de variância do efeito da adição de soluções crioprotetoras com diferentes antioxidantes sobre a duração (s) espermática (variável transformada em raiz quadrada) do sêmen descongelado de curimba.

Fontes de variação	**GL**	**SQ**	**QM**	**Fc**	**Pr (>F)**
Bloco	6	187,78	31,3	4,2062	0,0006
Ativador (At)	1	501,61	501,61	67,4142	4,5514
Antioxidante (Ax)	2	2,59	1,3	0,1743	0,8402
Ax x fatorial	1	2,29	2,29	0,3076	0,5798
Ax x adicional	1	0,31	0,31	0,0410	0,8398
At x Ax	2	9,4	4,7	0,6313	0,5330
At x Ax x dose	4	6,82	1,71	0,2293	0,9217
At x Ax x I (dose^2)	4	24,87	6,22	0,8357	0,5042
Resíduo	176	1309,57	7,44		

CV = 19,64%

TABELA 2B Análise de variância do efeito da adição de soluções crioprotetoras com diferentes antioxidantes sobre a taxa (%) de motilidade espermática do sêmen descongelado de curimba.

Fontes de variação	**GL**	**SQ**	**QM**	**Fc**	**Pr (>F)**
Bloco	6	32,072	5,3453	4,3799	0,0004
Ativador (At)	1	0,036	0,0361	0,0296	0,8636
Antioxidante (Ax)	2	0,973	0,4865	0,3987	0,6718
Ax x fatorial	1	0,049	0,0495	0,0405	0,8407
Ax x adicional	1	0,924	0,9236	0,7568	0,3855
At x Ax	2	0,098	0,0489	0,0401	0,9607
At x Ax x dose	4	5,693	1,4234	1,1663	0,3273
At x Ax x I(dose^2)	4	3,428	0,8569	0,7022	0,5914
Resíduo	176	214,789	1,2204		

CV = 13,3%

ANEXO C

TABELA 1C Análise de variância do efeito de soluções crioprotetoras com diferentes antioxidantes sobre as anomalias morfológicas espermáticas totais (%) do sêmen descongelado de curimba.

Fontes de variação	**GL**	**SQ**	**QM**	**Fc**	**Pr (>F)**
Bloco	6	721,35	120,224	2,4361	0,0444
Antioxidante (Ax)	2	91,54	45,769	0,9274	0,4048
Ax x Fatorial	1	50,38	50,381	1,0209	0,3191
Ax: Adicional	1	41,16	41,156	0,8339	0,3672
Ax x Dose	2	96,73	48,366	0,9800	0,3851
Ax x I(dose^2)	2	50,51	25,253	0,5117	0,6038
Resíduo	36	1776,65	49,351		

CV = 28,47%

TABELA 2C Análise de variância do efeito da adição de soluções crioprotetoras com diferentes antioxidantes sobre as anomalias morfológicas espermáticas maiores (%)do sêmen descongelado de curimba.

Fontes de variação	**GL**	**SQ**	**QM**	**Fc**	**Pr (>F)**
Bloco	6	461,96	76,993	1,7158	0,1455
Antioxidante (Ax)	2	186,34	93,17	2,0763	0,1402
Ax x Fatorial	1	85,71	85,714	1,9101	0,1755
Ax: Adicional	1	100,63	100,626	2,2424	0,143
Ax x Dose	2	49,33	24,663	0,5496	0,5819
Ax x I(dose^2)	2	27,72	13,861	0,3089	0,7362
Resíduo	36	1615,47	44,874		

CV = 37,34%

TABELA 3C Análise de variância do efeito da adição de soluções crioprotetoras com diferentes antioxidantes sobre as anomalias morfológicas espermáticas menores (%) do sêmen descongelado de curimba.

Fontes de variação	**GL**	**SQ**	**QM**	**Fc**	**Pr (>F)**
Bloco	6	241,96	40,327	2,7688	0,0257
Antioxidante (Ax)	2	15,67	7,837	0,5381	0,5885
Ax x Fatorial	1	3,43	3,429	0,2354	0,6305
Ax: Adicional	1	12,24	12,245	0,8407	0,3653
Ax x Dose	2	8,79	4,396	0,3018	0,7413
Ax x I(dose^2)	2	19,78	9,89	0,6791	0,5135
Resíduo	36	524,33	14,565		

CV = 56,33%

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