

**ATIVADORES E CONCENTRAÇÕES DE METANOL E  
DIMETILSULFÓXIDO NA QUALIDADE DO SÊMEN  
CRIOPRESERVADO DE CURIMBA (*Prochilodus lineatus*)**

**ALÉSSIO BATISTA MILIORINI**

**2006**

**ALÉSSIO BATISTA MILIORINI**

**ATIVADORES E CONCENTRAÇÕES DE METANOL E  
DIMETILSULFÓXIDO NA QUALIDADE DO SÊMEN  
CRIOPRESERVADO DE CURIMBA (*Prochilodus lineatus*)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de "Mestre".

**Orientador**  
**Prof. Dr. Luis David Solis Murgas**

**LAVRAS**  
**MINAS GERAIS - BRASIL**  
**2006**

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

Miliorini, Aléssio Batista

Ativadores e concentrações de metanol e dimetilsulfóxido na  
qualidade do sêmen criopreservado de curimba (*Prochilodus lineatus*) /  
Aléssio Batista Miliorini. -- Lavras : UFLA, 2006.

99 p. : il.

Orientador: Luis David Solis Murgas

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Curimba. 2. Sêmen. 3. Criopreservação. I. Universidade Federal de  
Lavras. II. Título.

CDD-639.375

**ALÉSSIO BATISTA MILIORINI**

**ATIVADORES E CONCENTRAÇÕES DE METANOL E  
DIMETILSULFÓXIDO NA QUALIDADE DO SÊMEN  
CRIOPRESERVADO DE CURIMBA (*Prochilodus lineatus*)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de "Mestre".

**APROVADA em 4 de agosto de 2006.**

Prof. Dr. Antonio Ilson Gomes de Oliveira - UFLA

Profa. Dra. Priscila Vieira Rosa Logato - UFLA

Prof. Dr. Oswaldo Pinto Ribeiro Filho - UFV

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

**LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL**

*A Deus,*

*por meus dons, por seu Amor infinito e misericordioso.*

*Aos meus pais, João e Regina,*

*por sua simplicidade em me apoiar, por sua severidade em me disciplinar  
e pelo grande Amor em me ensinar.*

*À minha esposa, Raquel,*

*por seu carinho, companheirismo e incentivo.*

*A todos aqueles que, de alguma forma, colaboraram para a  
concretização deste curso e deste trabalho.*

### **DEDICO**

Aos meus queridos avós, João, Conceição, Antônio, Aristotelina e Elpídia,  
pessoas muito amadas que lembrarei para sempre.

### **OFEREÇO**

“Pensa como os sábios, mas fala como as pessoas simples” (Aristóteles), pois  
“somente é útil o conhecimento que nos torna melhores” (Sócrates).  
“Não há nada de nobre em sermos superiores ao próximo. A verdadeira nobreza  
consiste em sermos superiores ao que éramos antes”.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, pela excelência na educação superior, em especial ao Departamento de Medicina Veterinária, pelo acolhimento.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

Especial agradecimento ao amigo e professor Dr. Luis David Solis Murgas, exemplo de pesquisador e de dedicação ao ensino, pelo apoio, sabedoria e confiança.

Ao Prof. Dr. Antonio Ilson Gomes de Oliveira, pela colaboração nas análises estatísticas, pela amizade e pelos conhecimentos transmitidos, expresso meus agradecimentos.

Às colegas Gilmara Junqueira Machado Pereira, Juliana Milan de Aquino Silva, Daniele de Lima, Ana Luísa Neves Alvarenga e Micaela Guidotti, por toda a ajuda concedida.

À Companhia Energética de Minas Gerais (CEMIG) e a toda equipe da Estação Ambiental de Itutinga, Gilson Antônio Azarias, Darly Quirino de Assis, Jaílson Maximiano, André Ferreira da Silva, Rodney Resende e, em especial, aos Drs. Newton José Schimit Prado e Oscar Moura, pela fundamental cooperação.

Ao Núcleo de Estudos em Aqüicultura do Departamento de Zootecnia da UFLA (NAQUA), em nome da Profa. Dra. Priscila Vieira Rosa Logato e ao Departamento de Ciência do Solo da UFLA, em nome da Profa. Dra. Fátima Maria de Souza Moreira, por todo o apoio dispensado.

Enfim, a todos que contribuíram para minha formação, e a DEUS, que a todos observa e de todos cuida em cada momento de nossa jornada, **agradeço**.

## **BIOGRAFIA**

ALÉSSIO BATISTA MILIORINI, filho de João Batista Miliorini e Aparecida Regina da Silva Miliorini, nasceu no município de Lavras, Sul do estado de Minas Gerais.

Em julho de 2005, colou grau em Medicina Veterinária, pela Universidade Federal de Lavras.

Em agosto do mesmo ano, iniciou o Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras, tendo defendido dissertação em 4 de agosto de 2006.

## SUMARIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>01</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>03</b>
2.1 Objetivo geral .....	03
2.2 Objetivos específicos .....	03
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>04</b>
3.1 Curimba ( <i>Prochilodus lineatus</i> ).....	04
3.2 Biologia seminal de peixes .....	07
3.2.1 Metabolismo espermático e plasma seminal.....	08
3.2.2 Motilidade espermática de peixes.....	09
3.2.3 Morfologia espermática .....	12
3.3 Soluções diluidoras e proporções de diluição do sêmen de peixes.....	15
3.4 Soluções crioprotetoras do sêmen de peixes.....	17
3.5 Soluções ativadoras da motilidade espermática de peixes.....	20
3.6 Congelamento do sêmen de peixes .....	21
3.7 Descongelamento do sêmen de peixes.....	24
3.8 Capacidade de fertilização do sêmen <i>in natura</i> e do sêmen descongelado...25	
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>28</b>
4.1 Local, reprodutores, manejo alimentar e seleção.....	28
4.2 Hipofiseação dos reprodutores .....	29
4.3 Coleta e avaliação do sêmen <i>in natura</i> .....	29
4.4 Determinação da concentração espermática .....	30
4.5 Avaliação da toxicidade das diferentes soluções crioprotetoras antes do congelamento do sêmen.....	31
4.6 Congelamento e descongelamento do sêmen .....	32
4.7 Análise morfológica do sêmen .....	33
4.7.1 Patologias maiores .....	35
4.7.2 Patologias menores .....	37
4.8 Capacidade de fertilização espermática após o descongelamento .....	37
4.9 Delineamento experimental e análise estatística.....	39



<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>43</b>
5.1 Avaliação da toxicidade das diferentes soluções crioprotetoras antes do congelamento .....	43
5.2 Motilidade espermática após o descongelamento .....	47
5.3 Morfologia espermática após o descongelamento .....	57
5.4 Capacidade de fertilização do sêmen descongelado .....	70
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>75</b>
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>76</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>77</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>90</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b>	Classificação dos crioprotetores quanto à permeabilidade sobre a membrana celular.....	17
<b>TABELA 2</b>	Soluções crioprotetoras utilizadas como tratamentos do sêmen de curimba.....	31
<b>TABELA 3</b>	Patologias dos espermatozoides examinadas no sêmen <i>in natura</i> de curimba.....	34
<b>TABELA 4</b>	Hierarquia das patologias espermáticas examinadas no sêmen descongelado de curimba.....	35
<b>TABELA 5</b>	Médias de motilidade (%) do sêmen de curimba após a diluição em diferentes soluções crioprotetoras e a adição de diferentes ativadores.....	43
<b>TABELA 6</b>	Médias da duração (segundos) da motilidade do sêmen de curimba após a diluição em diferentes soluções crioprotetoras e a adição de diferentes ativadores.....	46
<b>TABELA 7</b>	Médias de motilidade (%) do sêmen de curimba após o descongelamento.....	48
<b>TABELA 8</b>	Médias de motilidade (0-5) do sêmen de curimba após o descongelamento.....	51
<b>TABELA 9</b>	Médias da duração (segundos) da motilidade do sêmen de curimba após o descongelamento.....	53
<b>TABELA 10</b>	Médias das patologias (%) do sêmen de curimba após o descongelamento.....	58
<b>TABELA 11</b>	Médias das patologias de cauda fortemente enrolada e cauda degenerada (%) do sêmen descongelado de curimba em relação ao crioprotetor utilizado.....	60
<b>TABELA 12</b>	Médias de fertilização (%) do sêmen de curimba após o descongelamento.....	70

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b>	Exemplar adulto de curimba ( <i>Prochilodus lineatus</i> ).....	05
<b>FIGURA 2</b>	Sucessão de eventos desencadeadores da motilidade espermática em espécies de água doce. Modificado de Cosson (2004).....	11
<b>FIGURA 3</b>	Seqüência de campos observados durante a análise morfológica do sêmen de curimba. As setas indicam o sentido da avaliação.....	34
<b>FIGURA 4</b>	Regressão das médias de motilidade (%) do sêmen de curimba diluído em soluções com concentrações crescentes de crioprotetores.....	45
<b>FIGURA 5</b>	Regressão das médias de motilidade (%) do sêmen de curimba após o descongelamento, segundo as concentrações de crioprotetores.....	50
<b>FIGURA 6</b>	Regressão das médias de motilidade (0-5) do sêmen de curimba após o descongelamento, segundo as concentrações de crioprotetores.....	52
<b>FIGURA 7</b>	Regressão das médias da duração (segundos) da motilidade do sêmen de curimba após o descongelamento, segundo as concentrações de metanol...	55
<b>FIGURA 8</b>	Regressão das médias da duração (segundos) da motilidade do sêmen de curimba após o descongelamento, segundo as concentrações de DMSO....	56
<b>FIGURA 9</b>	Regressão das médias das patologias totais (%) do sêmen de curimba, após o descongelamento, segundo as concentrações de crioprotetores.....	59
<b>FIGURA 10</b>	Médias das patologias maiores (%) do sêmen de curimba. (A) Sêmen <i>in natura</i> . (B) Patologias maiores (total). (C) Cabeça degenerada. (D) Macrocefalia. Os traçados se referem ao erro padrão da média.....	61

<b>FIGURA 11</b>	Médias das patologias maiores (%) do sêmen de curimba. (A) Cauda fortemente enrolada. (B) Cauda fraturada. (C) Cauda degenerada. (D) PID. Os traçados se referem ao erro padrão da média.....	62
<b>FIGURA 12</b>	Médias das patologias menores (%) do sêmen de curimba. (A) Sêmen <i>in natura</i> . (B) Patologias menores (total). (C) Cabeça isolada. (D) Cauda dobrada. Os traçados se referem ao erro padrão da média.....	63
<b>FIGURA 13</b>	Patologias espermáticas maiores. <b>A.</b> Cabeças degeneradas; <b>B.</b> Cabeças degeneradas e cauda fortemente dobrada; <b>C.</b> Cabeça e peça intermediária degeneradas; <b>D.</b> Cauda fraturada; <b>E.</b> Cauda degenerada; <b>F.</b> Cauda fortemente enrolada.....	65
<b>FIGURA 14</b>	Patologias espermáticas maiores. <b>A.</b> Cabeça com contorno anormal (degenerada) e peça intermediária degenerada (PID); <b>B.</b> Cabeça isolada com contorno anormal (degenerada); <b>C</b> e <b>D.</b> Peças intermediárias degeneradas; <b>E.</b> Cauda degenerada; <b>F.</b> Cauda fortemente enrolada.....	66
<b>FIGURA 15</b>	Patologias espermáticas menores. <b>A.</b> Cabeça isolada e com contorno normal; <b>B.</b> Gota citoplasmática proximal; <b>C</b> e <b>D.</b> Gotas citoplasmáticas distais; <b>E.</b> Caudas dobradas; <b>F.</b> Cauda enrolada distalmente.....	67
<b>FIGURA 16</b>	Médias de motilidade (%), duração (segundos) e fertilização (%) do sêmen de curimba, antes e após o congelamento, acrescido de concentrações crescentes de (A) metanol e de (B) DMSO.....	72

## RESUMO

MILIORINI, Aléssio Batista. **Ativadores e concentrações de metanol e dimetilsulfóxido na qualidade do sêmen criopreservado de curimba (*Prochilodus lineatus*)**. 2006. 99 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.<sup>1</sup>

O estudo foi conduzido entre novembro de 2005 e janeiro de 2006, a fim de comparar a toxicidade e o efeito da adição de soluções crioprotetoras e ativadoras ao sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*), antes e após o congelamento. O sêmen de 10 reprodutores foi analisado e diluído em oito soluções crioprotetoras (1:4), compostas por metanol ou dimetilsulfóxido (DMSO), nas concentrações de 5%, 7,5%, 10% e 12,5% (v:v). Os ativadores utilizados foram a água destilada e o carbonato ácido de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) a 1% (v:v). Uma parte do sêmen diluído foi congelada enquanto a fração restante foi mantida em repouso e avaliada após 10 minutos. Para o congelamento, as amostras diluídas foram envasadas em palhetas de 0,5 ml e colocadas em botijão de vapor de  $\text{N}_2$ , permanecendo por 24 horas até serem submergidas em  $\text{N}_2$  líquido por 4 dias. O descongelamento ocorreu em água a 60°C, por 8 segundos. A concentração estimada de 7,84% de DMSO e a ativação por  $\text{NaHCO}_3$  1% foram menos tóxicas aos espermatozoides de curimba, propiciando as maiores taxas ( $P<0,01$ ) e durações da motilidade espermática ( $P<0,05$ ). A maior taxa de motilidade após o descongelamento pode ser obtida ( $P<0,01$ ) a uma concentração de crioprotetor de 8,79%, enquanto metanol ( $P<0,01$ ) e DMSO ( $P<0,05$ ), nas concentrações de 12,5% e 8,37%, respectivamente, podem proporcionar maiores durações da motilidade após o congelamento. Amostras com DMSO apresentaram a menor ( $P<0,05$ ) porcentagem de caudas fraturada e degenerada. Houve uma redução linear ( $P<0,05$ ) de 1,19% no índice de patologias totais com o aumento na concentração de crioprotetor. Maiores ( $P<0,05$ ) taxas de fertilização foram obtidas nas amostras com metanol em relação àquelas com DMSO e o tipo de ativador não influenciou a fertilização. Considerando a variabilidade da análise de fertilização, o DMSO a 8,5% proporciona proteção adequada às células espermáticas de curimba pré e pós-congelamento, sendo recomendada sua utilização na rotina de estações de piscicultura juntamente com a ativação do sêmen por  $\text{NaHCO}_3$  1%.

---

<sup>1</sup> Comitê Orientador: Prof. Luis David Solis Murgas - UFLA (Orientador), Prof. Antonio Ison Gomes de Oliveira - UFLA, Profa. Priscila Vieira Rosa Logato - UFLA.

## ABSTRACT

MILIORINI, Aléssio Batista. **Activators and concentrations of methanol and dimethyl sulphoxide in quality of cryopreserved sperm of curimba *Prochilodus lineatus***. 2006. 99 p. Dissertation (Master in Veterinary Science) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.<sup>1</sup>

This trial was carried out from November 2005 to January 2006, in order to compare toxicity and the effect of the addition of cryoprotectant and activator solutions to curimba *Prochilodus lineatus* semen, before and after freezing. Semen samples of 10 breeders were analyzed and diluted in eight cryoprotectants solutions (1:4). These were composed for methanol or dimethyl sulphoxide (DMSO) in 5%, 7.5%, 10% and 12.5% (v:v) concentrations. Activators evaluated were distilled water and 1% Sodium bicarbonate (NaHCO<sub>3</sub>). A part of the diluted semen was frozen while the remaining fraction was maintained in rest and evaluated after 10 minutes. For freezing, leftover diluted semen was stored in 0.5 ml straws and placed in a dry shipper for 24 hours. Afterwards, they were immersed in liquid N<sub>2</sub> where remained for 4 days. Milt samples were thawed by immersion in hot water bath (60°C) for 8 seconds. The DMSO estimated concentration of 7.84% and the activation for NaHCO<sub>3</sub> 1% were less toxicant to the curimba spermatozoids, propitiating the largest rates (P<0.01) and durations of their motility (P<0.05). The largest motility rate after thawing can be obtained (P<0.01) to 8.79% mean cryoprotectant concentration, while methanol (P<0.01) and DMSO (P<0.05), in the concentrations of 12.5% and 8.37%, respectively, can provide larger durations of the motility after freezing. Samples with DMSO incited the smallest (P<0.05) percentage of fractured and degenerate tail. There was a linear reduction (P<0.05) of 1.19% in the percentage of total pathologies with the increase in the cryoprotectant concentration. Larger (P<0.05) fertilization rates were obtained in the samples with methanol in relation to those with DMSO and the activator type did not influence it. Considering the variability of the fertilization analysis, 8.5% DMSO provides appropriate protection to the spermatic cells of curimba before and after freezing, being recommended its use in the routine of fish farming stations together semen activation for NaHCO<sub>3</sub> 1%.

---

<sup>1</sup> Guidance Committee: Prof. Luis David Solis Murgas - UFLA (Major Professor), Prof. Antonio Ilson Gomes de Oliveira - UFLA, Profa. Priscila Vieira Rosa Logato - UFLA.

## 1 INTRODUÇÃO

A preocupação e o interesse no desenvolvimento de técnicas cada vez mais apuradas de criopreservação de espermatozoides de peixes vão ao encontro das questões econômicas e ecológicas atuais. As grandes barragens hidrelétricas constituem obstáculo à rota migratória dos peixes de piracema e acabam por reduzir ou eliminar sua eficiência reprodutiva, pois também causam modificação do curso natural dos rios, transformando-os em uma sucessão de lagos artificiais com a perda quase que completa de seu caráter fluvial. Muitas espécies necessitam das inundações para ter acesso a lagoas para procriação e desenvolvimento de larvas e alevinos que, por sua vez, são particularmente sensíveis aos efeitos deletérios também causados pela urbanização, pela agricultura e pela introdução de espécies exóticas. Outras razões, apontadas por Godinho (2000) como responsáveis pelo declínio dos estoques de peixes de piracema, incluem a pesca predatória e a sobrepesca, a captura em períodos de desova, a poluição e o desmatamento da mata ciliar, que precipitam a descaracterização e o desaparecimento do hábitat aquático natural.

A capacidade técnica de preservação de gametas e embriões de peixes e de invertebrados aquáticos tem se expandido rapidamente nos últimos anos, impulsionada, primariamente, pela indústria aqüícola e pela exigência social. A criopreservação é importante no controle reprodutivo de muitos animais e sua aplicação em peixes está em amplo desenvolvimento (Bedore, 1999). Esta técnica envolve procedimentos que permitem o armazenamento de espermatozoides em nitrogênio líquido, mantendo-se a viabilidade dos gametas por tempo indefinido. Dessa maneira, a criopreservação é fundamental na rotina da reprodução induzida e na melhoria genética das espécies de peixe, aumentando as chances de se desenvolverem pesquisas, sobretudo no campo

genético, sendo indicada para minimizar a assincronia na maturação dos gametas e facilitar o seu transporte. A reprodução artificial com sêmen fresco ou descongelado revela, ainda, a possibilidade de limitar o estoque de machos na piscicultura intensiva, propiciando uma exploração mais racional de reprodutores geneticamente selecionados e uma redução dos custos de produção.

Ressalta-se, entretanto, que existem problemas ao se definirem protocolos específicos de criopreservação do sêmen para cada espécie, uma vez que mesmo as espécies que coabitam nossas bacias hidrográficas, tendem a apresentar diferentes sensibilidades de seus espermatozóides à redução na temperatura e ao contato com soluções crioprotetoras.

A curimba (*Prochilodus lineatus*) é uma das espécies de peixes de água doce com maior significado na piscicultura comercial (Cerqueira & Fernandes, 2002), sendo muito apreciada na culinária dos estados da região nordeste do Brasil (Maia et al., 1999). Um dos principais aspectos que estimulam o desenvolvimento de biotécnicas que auxiliem na procriação da espécie é o fato de que suas larvas são muito bem utilizadas como alimento de espécies carnívoras na fase larval, além de servir como espécie-modelo no desenvolvimento de pesquisas em biotecnologia reprodutiva, dadas sua elevada prolificidade e facilidade de manejo.



## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Este trabalho teve como objetivo geral desenvolver um protocolo de criopreservação, em longo prazo, do sêmen de curimba.

### **2.2 Objetivos específicos**

Especificamente, buscou-se:

- avaliar a toxicidade de diferentes soluções crioprotetoras antes do congelamento;
- avaliar a eficiência de diferentes soluções crioprotetoras sobre a motilidade espermática após o descongelamento;
- comparar soluções ativadoras da motilidade dos espermatozóides de curimba antes e após o congelamento;
- avaliar o efeito protetor das soluções crioprotetoras testadas sobre o percentual de células espermáticas com anormalidades morfológicas após o descongelamento;
- analisar a capacidade de fertilização do sêmen descongelado;
- comparar diferentes escalas de valorização da motilidade espermática de peixes.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Curimba (*Prochilodus lineatus*)

Reino: Animalia;

Filo: Chordata;

Classe: Actinopterygii;

Ordem: Characiformes;

Família: Prochilodontidae;

Subfamília: Prochilodontinae;

Gênero: *Prochilodus*;

Espécie: *Prochilodus lineatus*, Valenciennes, 1836.

Nomes populares: curimba, curimbatá, curimatã, corimba, corimbatá, papa-terra e grumatã (Brasil) e sábalo (Argentina, Bolívia, Paraguai e Uruguai).

Os membros da família Prochilodontidae apresentam larga distribuição geográfica em toda a América do Sul, sendo encontrados nas bacias Amazônica, do Orenoco, das Guianas, do Nordeste brasileiro (por exemplo, na do rio São Francisco), do Paraná, Uruguai e Paraguai, do Leste brasileiro (por exemplo, na do rio Paraíba do Sul) e da Patagônia (Reis et al., 2003).

A curimba (Figura 1) possui corpo alto, alongado, comprimido e cabeça larga, podendo atingir mais de 74 cm de comprimento corporal (Sverlij et al., 1993) e peso corporal superior a 6 kg (Cruz, 2001). A boca é circular e possui lábios móveis providos de numerosos denticulos diminutos, dispostos em duas séries. As nadadeiras anal, ventrais e caudal, são escamadas na base e são cinza-amareladas e sem machas, nos adultos. Possui linha lateral completa e as escamas dos machos são ásperas na borda exposta, sobretudo na época

reprodutiva (CEMIG/CETEC, 2000). A curimba prefere os ambientes lóticos, em locais de águas mais lentas, mas pode ser encontrada em habitats como os cursos naturais de rios e águas com turbidez de reduzida à elevada (Reis et al., 2003).



**FIGURA 1.** Exemplar adulto de curimba (*Prochilodus lineatus*).

A espécie realiza migração em massa rio acima, na época da reprodução, que ocorre de novembro a janeiro (CEMIG/CETEC, 2000). Machos e fêmeas são muito semelhantes externamente, contudo, os machos atingem a competência reprodutiva aos dois anos (cerca de 24 cm de comprimento corporal), em média, enquanto as fêmeas o fazem aos três anos, quando apresentam um comprimento corporal médio de 31 cm.

É um peixe iliófago, tanto nas fases jovens como na fase adulta, alimentando-se, no fundo da coluna de água, de organismos bentônicos e microrganismos de decomposição (Logato, 2000). A prevalência desses recursos em águas tropicais pode contribuir para a elevada ocorrência da curimba na bacia do rio Paraná, onde responde por cerca de 60% de toda a ictiomassa existente (Bonetto, 1994).

Como consequência do seu hábito alimentar, a curimba exerce importante função no fluxo de energia dentro dos sistemas aquáticos que habita (Jepsen et al., 1997; Winemiller, 1996). A utilização da espécie na rotina

reprodutiva em sistemas de consorciação tem se mostrado muito importante na larvicultura de espécies carnívoras nessa fase do desenvolvimento, como a piracanjuba (*Brycon orbignyanus*), o dourado (*Salminus brasiliensis*) e o jaú (*Zungaro jahu*) (Murgas et al., 2003a). Alguns estudos têm demonstrado que as larvas de dourado possuem predileção por larvas de curimba no início da alimentação exógena (Schultz, 2003). Para Vega-Orellana et al. (2006), a curimba apresenta elevada taxa de sobrevivência e possui tamanho apropriado à alimentação de larvas de dourado à eclosão.

A curimba é um dos peixes de maior importância na piscicultura comercial (Cerqueira & Fernandes, 2002), sendo sua carne muito apreciada, sobretudo nos estados do nordeste do Brasil (Maia et al., 1999). Muitos prochilodontídeos são importantes ainda para pisciculturas de subsistência, de maneira que, segundo Sverlij et al. (1993), a pesca de curimba constitui 40% de todo recurso advindo do rio Paraná, 86% do potencial ictiológico do rio da Prata e 95% do rio Uruguai. Entretanto, é possível que esses dados estejam superestimados em relação aos dias atuais, tendo em vista o crescente número de barragens e a elevada deterioração limnológica pelas quais nossas reservas hidrobiológicas foram submetidas no decorrer da última década.

Segundo o Ministério do Meio Ambiente (2005), a curimba é uma das principais espécies de peixes utilizadas na aquicultura continental nacional e sua pesca foi responsável por 14,48% (1.277,5 toneladas) de toda a produção extrativista de peixes do estado de Minas Gerais em 2004, sendo, inclusive, a espécie mais visada por esta categoria de mercado.

Como outrora sugerido, e também em decorrência de seu hábito alimentar, a curimba tem sido apontada como altamente susceptível à alteração da qualidade da água, o que comprometeria a sobrevivência da espécie (Da Silva et al., 2004; Martinez et al., 2004; Mazon & Fernandes, 1999). Além da

construção de hidrelétricas e do desaparecimento do habitat natural, a urbanização, a atividade agrícola desmedida, a sobrepesca, a captura em períodos de desova e a introdução de espécies exóticas representam as principais causas para o declínio dos estoques de peixes de piracema (Carolsfeld et al., 2003a).

Existe, dessa maneira, expressivo interesse no repovoamento de rios e de reservatórios de usinas hidrelétricas, além do empenho na criação paralela da curimba com espécies carnívoras na fase larval. A importância social da espécie em certas regiões do Brasil e a estabilidade dos ecossistemas aquáticos tropicais nos quais a curimba habita são outros fatores que fundamentam a conservação da biodiversidade deste prochilodontídeo.

### **3.2 Biologia seminal de peixes**

Estudos de biologia do sêmen de peixes foram iniciados no século XIX. Várias características da biologia seminal de peixes foram rapidamente identificadas: a imobilidade do espermatozóide no sêmen *in natura*, a curta duração do seu desenvolvimento após sua ativação e a necessidade de diluição em um meio hiposmótico para a iniciação do movimento espermático (Billard & Cosson, 1992).

Segundo Bedore (1999), a motilidade espermática não deve ser tomada como indicativo da qualidade seminal isoladamente. Outras características, portanto, devem ser consideradas na caracterização da qualidade espermática. Dentre elas, destacam-se a motilidade espermática e a taxa de fertilização (Rana, 1995), a concentração espermática (Bedore 1999; Cruz, 2001; Marques, 2001) e a análise morfológica do sêmen (Kavamoto et al., 1999; Moraes et al., 2004).

### 3.2.1 Metabolismo espermático e plasma seminal

Sabe-se que o metabolismo basal dos espermatozóides e a energia necessária à motilidade espermática são derivados do catabolismo de nutrientes exógenos e endógenos, de maneira aeróbica ou anaeróbica (Stoss, 1983). Nas espécies de peixes de fecundação interna, os espermatozóides são hábeis na obtenção de energia a partir da realização da glicólise em processos anaeróbicos, com possibilidade de haver metabolização de açúcares ovarianos como substratos (Gardiner 1978, citado por Leung & Jamieson, 1991). Entretanto, a atividade glicolítica de espermatozóides de peixes de fecundação externa é muito limitada, sobretudo no metabolismo oxidativo (Harvey & Kelley, 1984), reduzindo a validade do acréscimo de substratos energéticos exógenos ao plasma seminal.

A composição bioquímica do plasma seminal varia amplamente entre as espécies e entre indivíduos da mesma espécie, relacionando-se às diferentes concentrações de proteínas, enzimas, lipídeos (Lahnsteiner et al., 1996; Perchec et al., 1993), açúcares e ácidos (Piironen & Hyvärinen, 1983), responsáveis pelo metabolismo das células espermáticas. A osmolaridade do plasma seminal de espécies de água doce e salgada oscila em torno de 300 mOsm litro<sup>-1</sup> a 350 mOsm litro<sup>-1</sup> (Morisawa & Susuki, 1980).

O trifosfato de adenosina (ATP), segundo Billard et al. (1995), é a maior fonte de energia durante o curto período de motilidade dos espermatozóides de carpa (*Cyprinus carpio*), porém, é hidrolisado rapidamente na fase ativa da motilidade. Segundo Gwo (1995), a mitocôndria é o reservatório endógeno de fonte de energia para a motilidade de espermatozóides de peixes ovulíparos. A motilidade dos espermatozóides em peixes marinhos, de acordo com o autor, está diretamente relacionada à presença das mitocôndrias na peça intermediária.

Uma vez que 50%-80% das moléculas de ATP armazenadas sejam consumidas, a motilidade do sêmen de carpa é interrompida e não é compensada pela síntese de novas moléculas, cuja ocorrência é pouco significativa e de pequena contribuição para a motilidade (Billard et al., 1995). Entretanto, Cosson (2004) observou que espermatozóides que perderam a motilidade, após algum tempo, têm restaurada sua capacidade de motilidade, sugerindo uma resposta à reposição dos estoques de ATP por meio da via oxidativa do metabolismo mitocondrial. Cosson et al. (1999), por sua vez, afirmam que a diminuição das reservas intracelulares de ATP responde parcialmente e não integralmente à redução da capacidade de movimentação dos espermatozóides. Para Bedore (1999), após o término da glicólise, as células espermáticas utilizam exclusivamente triglicerídeos para a obtenção de energia.

### **3.2.2 Motilidade espermática de peixes**

Conforme Carolsfeld & Harvey (1999) e Godinho (2000), a motilidade espermática é um dos principais parâmetros a serem considerados na análise da qualidade do sêmen de peixes. Para tanto, deve-se levar em conta que a motilidade espermática é influenciada por inúmeros fatores como temperatura, estado nutricional, estado sanitário, condições de análise, soluções ativadoras empregadas, espécie estudada e, segundo Rana (1995), um dos principais moderadores da motilidade espermática é o progresso da época reprodutiva em que os machos de piracema se encontram.

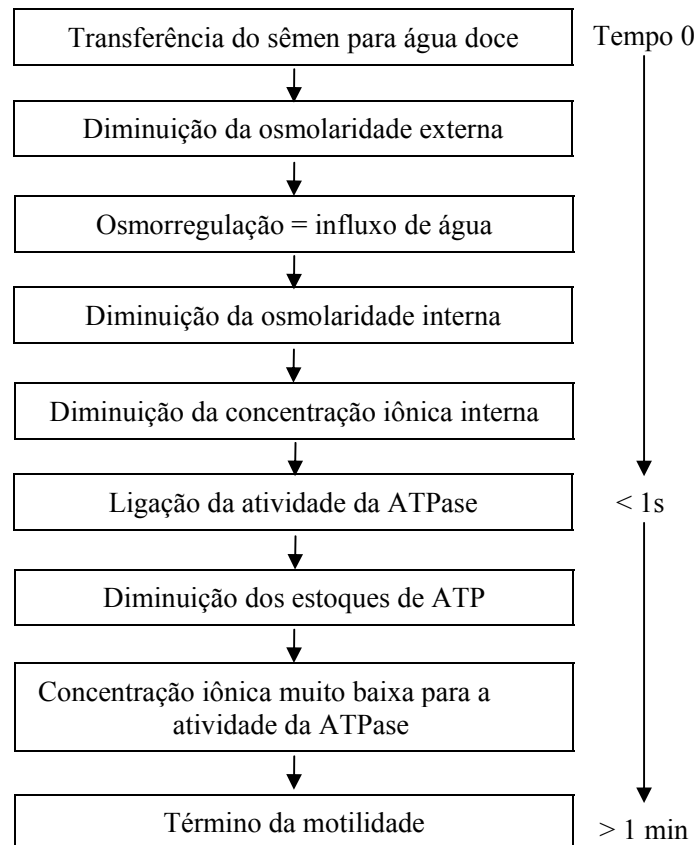
Os espermatozóides de peixes são imóveis nos testículos e no plasma seminal de espécies de água doce. A motilidade é ativada quando o meio em que os espermatozóides se encontram se torna hiposmótico, como a água do ambiente externo (Cosson, 2004). A motilidade dos espermatozóides de salmonídeos é suprimida pelo  $K^+$  seminal contido no ducto espermático e é

iniciada pela redução da sua concentração na água doce onde ele é liberado (Morisawa et al., 1983). Com a diminuição da concentração externa de íons  $K^+$ , ocorre o efluxo deste cátion para o meio extracelular, estimulando a abertura de canais de  $Ca^{++}$  e seu influxo para o interior da célula espermática. O aumento da concentração intracelular de  $Ca^{++}$  participa decisivamente na iniciação da motilidade (Cosson, 2004). Fatores, como o pH ou outros íons presentes, podem polarizar a membrana celular e estimular a motilidade dos espermatozóides dos peixes (Morisawa et al., 1999). Como descrito por Takai & Morisawa (1995), a isosmolaridade do meio impede a ativação da motilidade espermática; diferentemente de teleósteos dulcícolas, é a hiperosmolaridade da solução em redor dos espermatozóides que proporciona a ativação da motilidade espermática em teleósteos de água salgada (Bedore, 1999).

A duração da motilidade do sêmen de teleósteos de água doce de fertilização externa é bastante reduzida - entre 1 e 2 minutos (Billard & Cosson, 1992) e muito variável entre as espécies. As durações médias da motilidade do sêmen *in natura* de curimba podem variar entre 612 segundos (Cóser et al., 1984) e 43 segundos (Franciscatto et al., 2002).

Na Figura 2 estão relacionados os eventos possíveis desencadeados na exposição espermática ao meio hiposmótico que culminam com a ativação da motilidade espermática. Pelo esquema, pode-se verificar que a síntese de ATP está condicionada à atividade da enzima ATPase que, por sua vez, depende da concentração osmolar do meio intracelular. Uma reduzida osmolaridade interna ativa a enzima, porém, à medida que a osmolaridade continua diminuindo, a atividade ATPásica também é depletada e, juntamente com a redução dos estoques de ATP, resulta em extinção da motilidade espermática. De acordo com Perchee-Poupard et al. (1997), em ambiente hiposmótico, o volume citoplasmático das células espermáticas de espécies de água doce pode aumentar em até três vezes, em resposta ao influxo de água.





**FIGURA 2.** Sucessão de eventos desencadeadores da motilidade espermática em espécies de água doce. Modificado de Cosson (2004).

A temperatura influencia decisivamente a duração da motilidade das células espermáticas (Billard et al., 1995), uma vez que os complexos enzimáticos, com destaque para a enzima ATPase, são termossensíveis e possuem velocidades catalíticas ótimas em intervalos específicos de temperatura. Assim, Billard et al. (1995) observaram uma duração, para a motilidade espermática, igual a 30-40 segundos, a 20°C, em carpa, e Maria et al. (2004) 486 segundos, a 26°C, em pacu (*Piaractus mesopotmicus*). Por sua vez, Miliorini et al. (2005) observaram uma duração de até 184 segundos para o

sêmen descongelado de curimba, a 25°C. Da mesma maneira que afeta a duração da motilidade espermática, a temperatura também pode interferir na taxa deste parâmetro. Billard & Cosson (1992) observaram aumento na percentagem de espermatozóides móveis de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) à medida que a temperatura da lâmina histológica aumentava durante a análise.

Algumas técnicas computadorizadas já foram desenvolvidas a fim de se estimar a motilidade espermática de bagre africano (*Clarias gariepinus*) (Kime et al., 1996), carpa (Christ et al., 1996) e *Cottus gobio* (Lahnsteiner et al., 1997). Essas técnicas não são utilizadas freqüentemente devido à dificuldade de análise imposta pelo curto período de duração da motilidade espermática de peixes. Outros métodos, contudo, são rotineiramente empregados, embora acarretem um grau de subjetividade elevado. Dentre eles, destacam-se a qualificação em escala de 0-5 (Bedore, 1999; Cosson, 2004; Fauvel et al., 1999; Silveira, 2000), cujo objetivo é reduzir o efeito da subjetividade da escala porcentual (Cruz, 2001; Miliorini et al., 2002).

### **3.2.3 Morfologia espermática**

Os principais tipos de espermatozóides de peixes incluem os de fecundação externa e os espermatozóides de fecundação interna, com ou sem acrossoma, uniflagelados ou biflagelados (Jamieson & Leung, 1991). Os espermatozóides de peixes apresentam pouca variação estrutural entre as espécies (Jamieson, 1991), reflexo da evolução de mais de 550 milhões de anos (Janvier, 1999).

Assim como os espermatozóides de vertebrados, os espermatozóides de peixes podem ser divididos morfológicamente em cabeça, peça intermediária e cauda (Nagahama, 1983). A cabeça dos espermatozóides de peixes é, na maioria dos grupos, destituída de acrossoma, o que é compensado pela presença da

micrópila no córion do oócito (Cosson et al., 1999). A cauda, ou flagelo, pode ainda ser subdivida em colo e peças intermediária, principal e terminal, assim como ocorre para os espermatozóides de mamíferos domésticos. O colo, ou peça de conexão, representa a inserção do corpo basal do flagelo à cabeça. A peça intermediária consiste de uma bainha mitocondrial disposta em hélice responsável pela geração de energia necessária à propulsão mótil dos espermatozóides (Hafez, 2004).

O espermatozóide de curimba apresenta uma cabeça arredondada (Alexandrino et al., 1985), ligeiramente ovóide e carente de vesícula acrossômica (Borges Filho, 1987). Assim como para outros teleósteos tropicais, a cabeça do espermatozóide de curimba possui núcleo pequeno, redondo ou ovóide com diâmetro variando de 2  $\mu\text{m}$  a 3  $\mu\text{m}$ . Apresentam dois centríolos; o centríolo proximal é geralmente em ângulo reto ao centríolo distal, que forma o corpo basal do flagelo. O flagelo contém um axonema com nove microtúbulos duplos periféricos e um par de microtúbulos centrais (Marques, 2001). O flagelo é extenso em relação àquele dos espermatozóides de mamíferos domésticos, sendo a peça intermediária muito extensa (cerca de 1  $\mu\text{m}$  de comprimento; Marques, 2001), em proporção ao comprimento total do flagelo.

Alterações ultra-estruturais no espermatozóide ocorrem após o aumento ou a diminuição da osmolaridade do meio que os circunda. Estas alterações podem ser fisiológicas ou patológicas. Espermatozóides de teleósteos marinhos apresentaram intumescência do núcleo, rompimento da membrana plasmática, desaparecimento de mitocôndrias, perda da membrana plasmática flagelar e espiralização, ruptura ou aderência dos axonemas quando expostos a uma solução hipotônica. Marques (2001) classifica estas modificações como limitantes da duração da motilidade espermática.

Outros fatores podem conduzir a defeitos morfológicos em espermatozoides. Segundo Herman et al. (1994), as patologias primárias (flagelo dobrado, cabeça isolada, gotas citoplasmáticas proximal e distal) ocorrem durante a espermatogênese em decorrência de causas que acometem os reprodutores, tais como enfermidades, consangüinidade, restrição alimentar, e estresse ambiental entre outros. Por outro lado, as patologias secundárias (flagelo quebrado, enrolado, degenerado, macrocefalia, microcefalia) estariam relacionadas aos procedimentos de manejo durante a coleta do sêmen e a confecção das lâminas para avaliação de patologias (Herman et al., 1994).

Billard et al. (1977) mostraram que o sêmen de *Dicentrarchus labrax* não apresenta características constantes durante todo o período de espermição, sendo sua qualidade afetada pelo processo de envelhecimento das células, que se apresenta mais intenso no período posterior ao “pico” de reprodução (Billard & Takashima, 1983).

O estudo morfológico das células espermáticas e sua relação com a infertilidade dos machos alcançaram maior importância com o advento da inseminação artificial em mamíferos, especialmente na espécie bovina (Kavamoto et al., 1999). Em mamíferos domésticos, as patologias primárias se referem às enfermidades testiculares, enquanto que as patologias espermáticas secundárias se relacionam aos problemas de origem epididimária (Chenoweth, 2005).

O Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998) recomenda não utilizar, na inseminação artificial ou monta natural de mamíferos, sêmen com índices de espermatozoides com anormalidade acima de 30%, em bovinos e eqüinos e de 20%, em ovinos e suínos. Moraes et al. (2004) registraram índices de espermatozoides de curimba com anormalidades que atingiram valores em torno de 40,2%, com a utilização de extrato bruto de hipófise de carpa. Este

valor pode ser julgado elevado, se comparado aos considerados aceitáveis para mamíferos, porém, em peixes, essas referências ainda não foram estabelecidas.

Taddei et al. (2001) e Yao et al. (2000) sugerem que os exames morfológicos dos espermatozoides de peixes devem ser incorporados à rotina de avaliação do sêmen após a criopreservação. Todavia, pesquisas relativas a técnicas práticas e simples para a verificação de anormalidades em espermatozoides de peixes autóctones brasileiros são raras (Kavamoto et al., 1999). A avaliação morfológica dos espermatozoides de peixes pode auxiliar na caracterização de amostras seminais, fazendo inferência ao seu potencial fertilizante ou de amostras congeladas de sêmen, e explicando insucessos de reprodutores tidos como aptos após análises convencionais de motilidade espermática.

### **3.3 Soluções diluidoras e proporções de diluição do sêmen de peixes**

Os diluidores são soluções de sais ou de carboidratos adicionados ao sêmen cuja função é manter a viabilidade das células espermáticas durante a redução da temperatura. As condições mínimas requeridas de um diluidor adequado são: isotonicidade, para que não haja ativação prévia da motilidade espermática; estabilidade, pois suas características físico-químicas não devem ser alteradas durante o contato com o sêmen; condutividade térmica elevada, permitindo a rápida transferência de temperatura do meio externo para os espermatozoides; esterilidade, ou seja, não devem veicular microrganismos potencialmente nocivos às células espermáticas e, finalmente, servir de carreador de crioprotetores. É importante que a motilidade dos espermatozoides não seja ativada antes do congelamento e nem durante o descongelamento, pois esta motilidade pode exaurir a reserva energética necessária à fertilização (Legendre & Billard, 1980).

Diluidores desenvolvidos para sêmen de mamíferos têm sido empregados com êxito em espécies de peixes. Resultados expressivos têm sido obtidos com o diluidor *Beltsville Thawing Solution* (BTS, Minitüb®), normalmente acrescido ao sêmen suíno durante seu resfriamento e descongelamento (Murgas et al., 2001b). A concentração do diluidor BTS utilizada foi de 4,5%, nos estudos de Miliorini et al. (2005), na diluição do sêmen de curimba. Miliorini et al. (2004) utilizaram o mesmo diluidor na concentração de 5% para o sêmen de curimba, obtendo resultados expressivos. Outras espécies também tiveram o sêmen diluído com BTS, na mesma concentração, tais como pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (Miliorini et al., 2002; Murgas et al., 2004), piapara (*Leporinus obtusidens*) (Murgas et al., 2003b) e piracanjuba (Murgas et al., 2004). Estes trabalhos são pioneiros na adequação do diluidor BTS ao sêmen de espécies de peixes migradoras.

Uma simples solução de glicose a 5% como veículo de crioprotetores propiciou resultados excelentes para sêmen de salmonídeos (Harvey & Carolsfeld, 1993). Outros diluidores, como Kurokura (Kurokura et al., 1984) e NaCl, têm sido experimentados em sêmen de espécies nativas, como o piau-açu (*Leporinus macrocephalus*) (Moraes, 2004) e piracanjuba (Bedore, 1999; Maria, 2005), respectivamente.

A proporção da diluição, embora variável entre pesquisadores, é um detalhe metodológico importante porque pode significar um melhor aproveitamento do sêmen, na caracterização de uma possível “dose fertilizante”, como ocorre para ejaculados de mamíferos. Em peixes, esta variação também ocorre. Enquanto Cóser et al. (1987) utilizaram uma taxa de diluição sêmen:diluidor de 1,0:4,5 para pacu, Harvey & Kelley (1988) diluíram o sêmen na proporção de 1:1 para tilápia (*Oreochromis niloticus*), Bedore (1999), 1:4 para pacu-caranha (*P. mesopotamicus*) e piracanjuba, Ribeiro & Godinho (2003), 1:8 para piau-açu e Miliorini et al. (2005), 1:4 para curimba.

### 3.4 Soluções crioprotetoras do sêmen de peixes

A criopreservação de células adquiriu impulso quando pesquisas relataram que o glicerol possui a capacidade de protegê-las contra efeitos deletérios do congelamento (Cruz, 2001). A partir de então, várias outras substâncias vêm sendo testadas com tal propósito (Godinho, 2000).

Soluções crioprotetoras são, portanto, substâncias acrescidas ao meio diluidor do sêmen com a finalidade de proteger os espermatozóides durante o congelamento e o descongelamento. Os crioprotetores impedem as criolesões, mas, quando usados em concentrações elevadas, podem se tornar tóxicos aos espermatozóides. Dentre as características desejáveis em um crioprotetor, destacam-se a reduzida toxicidade e a alta solubilidade em água (Maria, 2005).

Os crioprotetores, como representado na Tabela 1, podem ser classificados em intracelulares (ou solúveis) ou extracelulares (ou não solúveis). O determinante são as propriedades físico-químicas (principalmente o peso molecular) e a interação existente entre a substância e a membrana citoplasmática.

**TABELA 1.** Classificação dos crioprotetores quanto à permeabilidade sobre a membrana celular.

<b>Crioprotetores intracelulares (solúveis)</b>	<b>Crioprotetores extracelulares (não solúveis)</b>
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Glicose
Glicerol	Sacarose
Metanol	Gema de ovo
Etilenoglicol	Leite desnatado
Propilenoglicol	Soro
Propanodiol	Água de coco

Fonte: Cruz (2001).

Os crioprotetores intracelulares evitam ou, pelo menos, diminuem a formação de microcristais de gelo intracelulares, enquanto os crioprotetores extracelulares atuam estabilizando e reparando externamente a membrana celular. Os alvos da proteção proporcionada pelos crioprotetores intracelulares são as enzimas lábeis (por exemplo, a catalase) e a estabilidade das proteínas em soluções aquosas (Maria, 2005). Segundo Chao (1991), há um grande risco, porém, na utilização de crioprotetores internos porque estes podem, alternativamente, promover a desnaturação protéica, sobretudo sob elevadas temperaturas, causando uma toxicidade nos sistemas enzimáticos e, por conseguinte, celulares. Isso ocorre, principalmente, quando as concentrações de crioprotetores internos são muito elevadas (Cruz, 2001). De acordo com Simeone (1998), os crioprotetores internos mais efetivos são aqueles que permeiam a membrana celular rapidamente.

Aparentemente, determinados crioprotetores agem melhor em determinadas espécies do que em outras. A seleção do crioprotetor mais adequado a ser utilizado pela primeira vez em uma espécie deve ser feita em testes de tentativa e erro (Bedore, 1999). Como exemplo de diferença interespecífica, cita-se o estudo de Carolsfeld et al. (2003b), que constataram uma adequação do sêmen descongelado de várias espécies (inclusive da curimba) à diluição por meio contendo DMSO 10% e glicose 5%, mas uma toxicidade exacerbada do sêmen de surubim (*Pseudoplatystoma corruscans*) ao mesmo diluidor.

A associação entre crioprotetores intracelulares e extracelulares é conveniente e indicada por Carolsfeld & Harvey (1999) e por Godinho (2000). Miliorini et al. (2005) constataram que a associação entre BTS, que apresenta em sua constituição glicose em uma concentração de 3% após a diluição, e quaisquer crioprotetores internos utilizados (DMSO ou metanol, a 10%) proporcionaram taxas de fertilização para o sêmen descongelado de curimba



similares às do sêmen *in natura*. A associação de DMSO 10%, glicose 5% e gema de ovo 10% tem sido utilizada com sucesso na criopreservação de sêmen de curimba (Kavamoto et al., 1989; Silva, 2000), embora estudos preliminares com preservação a curto prazo nessa espécie utilizando gema de ovo 10% não tenham sido bem sucedidos.

O metanol, segundo Bedore (1999), é tido como o crioprotetor intracelular mais permeável à membrana, porém, é aquele que apresenta a maior toxicidade dentro de seu grupo, exceto para espermatozóides de tilápia (Harvey, 1983). Em estudos preliminares, Miliorini et al. verificaram que a utilização de glicerol, propanodiol e etilenoglicol se mostrou tóxica e tornou o sêmen de curimba impróprio ao congelamento.

Concentrações de DMSO de 5%, 10% e 15% foram menos tóxicas que o propanodiol e o etilenoglicol, nas mesmas concentrações (Cruz, 2001). Alguns autores, entretanto, se referem ao DMSO como tóxico em concentrações superiores a 5% (Leung, 1987, citado por Bedore, 1999), sobretudo quando o tempo de equilíbrio é extenso. Contrariamente, Viveiros (2002) verificou taxas de eclosão semelhantes entre ovos oriundos da fecundação por sêmen *in natura* e descongelado de bagre africano, utilizando concentrações de metanol e DMSO de até 20,0%. Para Leung & Jamieson (1991), a possível toxicidade do DMSO pode ser suprimida pela adição de amidos.

Em trabalhos com sêmen de pacu (Murgas et al., 2005) e de curimba (Miliorini et al., 2005), uma concentração de 10% de DMSO proporcionou os resultados mais expressivos, tanto para o resfriamento como para o congelamento de sêmen, respectivamente, quando comparadas a outras concentrações e ao metanol. Segundo Leung & Jamieson (1991), Ritar (1999) e Wayman et al. (1998) o DMSO é um dos melhores crioprotetores para espécies marinhas, enquanto Bedore (1999) e Fogli da Silveira et al. (1990) fazem referência a espécies dulcícolas.

Segundo Bedore (1999), a carência de estudos bioquímicos acerca da motilidade dos espermatozoides de teleósteos brasileiros dificulta a determinação de soluções crioprotetoras mais eficientes na recuperação da motilidade após o descongelamento.

### **3.5 Soluções ativadoras da motilidade espermática de peixes**

A determinação da solução adequada à ativação da motilidade espermática, sem comprometer a qualidade seminal, torna-se uma questão importante em trabalhos de criopreservação em peixes (Bedore, 1999). Além deste aspecto, três outros fatores devem ser considerados conjuntamente durante a ativação da motilidade espermática: a concentração da solução ativadora, a proporção ativador:sêmen e a característica seminal que se deseja avaliar.

Entre as soluções ativadoras mais empregadas pelos pesquisadores, podem ser destacadas a água destilada e, em diferentes concentrações, o carbonato ácido de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) (Fogli da Silveira et al., 1990; Miliorini et al., 2005), o cloreto de potássio (Lanhsteiner et al., 1995; Ravinder et al., 1997) e até mesmo a uréia (Carolsfeld et al., 2003b).

O  $\text{NaCl}$ , na concentração de 50 mM, promoveu resultados consistentemente superiores aos obtidos com  $\text{NaHCO}_3$  1% na ativação da motilidade espermática de pacu e piracanjuba (Bedore, 1999). Já Murgas et al. (2005) constataram taxas de motilidade para o  $\text{NaHCO}_3$  1% e  $\text{NaCl}$  60 mM superiores às induzidas pelas mesmas soluções na metade daquelas concentrações, sugerindo um efeito benéfico de soluções com maior osmolaridade para o sêmen de pacu. Cóser et al. (1984) sugerem o  $\text{NaHCO}_3$  1% como ativador de eleição para o sêmen de curimba descongelado, assim como Cruz (2001) faz a mesma referência para a taxa e a duração da motilidade espermática. Silveira (2000) observou que a solução de  $\text{NaHCO}_3$  1% favoreceu

satisfatoriamente a taxa de motilidade do sêmen de matrinxã (*Brycon cephalus*), porém, os oócitos, durante a fertilização, se aglutinaram no fundo do recipiente e a taxa de eclosão foi nula.

O mesmo efeito foi verificado por Miliorini et al. (2005), para a duração da motilidade, em que as soluções de NaHCO<sub>3</sub> 60 mM e NaCl propiciaram resultados superiores aos da água destilada, em amostras de sêmen de curimba após a diluição com solução crioprotetora (pré-congelamento) e após o congelamento. Entretanto, não notaram diferenças significativas entre as soluções ativadoras citadas para o sêmen *in natura*.

A razão sêmen:ativador é outro aspecto que varia significativamente entre espécies e, mesmo, entre pesquisadores (Cruz, 2001) e representa uma dificuldade em relação à estimativa da motilidade espermática. Muitas vezes, alguns espermatozóides encontram-se imóveis e em diluições subseqüentes apresentam movimento. Uma diluição relativamente alta (1:1000) é necessária ao início simultâneo da motilidade em 100% das células espermáticas (30 µl -50 µl de solução para ativar cerca de 2 µl de sêmen) (Bedore, 1999). Em baixas diluições, somente alguns espermatozóides são ativados, enquanto outros têm sua ativação tardia. Este fenômeno deve-se à diluição insuficiente ou à mistura inadequada da solução ativadora com o sêmen, segundo a autora.

### **3.6 Congelamento do sêmen de peixes**

A criopreservação envolve procedimentos que permitem o armazenamento de espermatozóides em nitrogênio líquido, a uma temperatura aproximada de -196°C, mantendo-se a viabilidade dos gametas por tempo indefinido. Mins et al. (2000) verificaram que a percentagem de espermatozóides móveis, contidos no sêmen criopreservado de esturjão, não diminuiu ao longo de cinco anos de armazenamento.

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

Quando o sêmen é colocado diretamente no nitrogênio líquido, a membrana plasmática e a peça intermediária podem desaparecer inteiramente. Por outro lado, quando o sêmen é colocado no vapor de nitrogênio líquido, os espermatozoides sofrem um congelamento gradual e as estruturas membranosas não são muito alteradas, apesar de o aspecto da cromatina ser consideravelmente modificado (Billard, 1983).

A formação de microcristais de gelo é deletéria aos espermatozoides por duas razões principais: a osmoconcentração e a elevação da temperatura intracitoplasmática. Com a desidratação pela retenção de água nos cristais, o meio extracelular torna-se progressivamente mais concentrado e há uma osmoconcentração também em regiões dentro do citoplasma. A osmoconcentração extracelular, segundo Medeiros et al. (2002), ocasiona efluxo de água e intensificação da concentração osmótica interna, o que promove desnaturação das macromoléculas e crenação celular, podendo haver total colapso da membrana celular.

O processo de cristalização resulta, ainda, em elevação momentânea da temperatura, o que é prejudicial às células espermáticas. Em temperaturas em torno de 5°C, a água intra e extracelular permanece super-resfriada e não se

cristaliza. Entre  $-5^{\circ}\text{C}$  e  $-10^{\circ}\text{C}$ , microcristais de gelo começam a se formar no meio extracelular e o processo de desidratação se inicia. Os maiores prejuízos conhecidos na estrutura do espermatozóide ocorrem no intervalo crítico entre  $0^{\circ}\text{C}$  e  $-40^{\circ}\text{C}$  (Leung, 1991). A finalidade do processo de congelamento em nitrogênio líquido é fazer com que a suspensão de células espermáticas atinja temperaturas abaixo do ponto de congelamento do meio (super-resfriamento), antes que haja a formação de microcristais de gelo nos meios intra e extracelular.

O sucesso do congelamento de sêmen com nitrogênio líquido exige que as taxas de resfriamento estejam situadas entre  $10^{\circ}\text{C}$  e  $50^{\circ}\text{C min}^{-1}$  (Harvey & Carolsfeld, 1993). Cruz (2001) congelou sêmen de curimba à taxa de  $17,9-52,9^{\circ}\text{C min}^{-1}$ . A utilização de botijões contendo exclusivamente vapor de nitrogênio líquido, como os utilizados por Harvey & Carolsfeld (1999), assegura taxas de resfriamento compreendidas dentro deste intervalo. Resultados satisfatórios com esta metodologia encontram-se disponíveis na literatura (Aoki et al., 1997; Cruz, 2001; Serralheiro et al., 1999). Nesses trabalhos, a colocação das amostras de sêmen em vapor de nitrogênio se mostrou eficaz na conservação de sua qualidade.

Outro aspecto importante na transferência de temperatura é o tipo de recipiente de envasamento do sêmen. Geralmente, são utilizadas palhetas de 0,25 ml, 0,5 ml, 1,0 ml, 1,2 ml, 2,5 ml e 5,0 ml de capacidade. A taxa de fertilização com palheta de 1,2 ml foi semelhante àquela com palheta de 0,5 ml para salmonídeos e a de 0,5 ml resultou em uma fertilização 40% inferior em relação ao sêmen fresco (Lahnesteiner et al., 1997). As palhetas de 0,5 ml são as mais utilizadas entre os pesquisadores no congelamento de sêmen de peixes. Palhetas de 0,25 ml acondicionam pequeno volume de sêmen e palhetas muito calibrosas não proporcionam um descongelamento uniforme, ou seja, a superfície descongela mais rapidamente que a porção central (Carolsfeld & Harvey, 1999).

Espermatozoides de várias espécies de peixes são congelados com sucesso, embora, muitas vezes, as taxas de fertilização sejam inferiores às obtidas com sêmen *in natura*. Leung & Jamielson (1991), em revisão sobre criopreservação de gametas, listam mais de 50 espécies de peixes cujos espermatozoides já foram criopreservados.

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

### **3.7 Descongelamento do sêmen de peixes**

Enquanto o congelamento envolve a desidratação celular, o descongelamento envolve uma reidratação das células, ocorrendo influxo de água para o interior do citoplasma (Holt, 2000). A maioria das células suporta um descongelamento rápido, mesmo que não se hidrate totalmente (Bedore, 1999).

O descongelamento rápido tem sido utilizado como medida importante na prevenção de recristalização de gelo intracelular, letal para as células (Leung, 1991). As taxas de descongelamento mais bem sucedidas são aquelas que envolvem altas temperaturas e reduzido intervalo de tempo de exposição (Scott & Baynes, 1980). Em geral, o descongelamento sob temperaturas entre 50°C e 60°C resulta em excelentes resultados (Maria, 2005) entretanto, cuidados com o superaquecimento devem ser assegurados.

As palhetas, normalmente, são descongeladas por imersão em água aquecida (Amorim, 2002; Murgas et al., 2001a;). Existe uma numerosa variação com relação à taxa de descongelamento. Cruz (2001), no descongelamento de

palhetas de 0,5 ml de sêmen de curimba, utilizou banho-maria à temperatura de 33°C, por 14 segundos, obtendo aceitáveis taxas e durações de motilidade do sêmen de curimba pós-descongelamento. Miliorini et al. (2005), por sua vez, utilizaram uma taxa de descongelamento de 60°C, por 8 segundos, após estudos preliminares a temperaturas inferiores e tempos de exposição mais duradouros. Outros estudos utilizaram taxas distintas, como 25°C por 30 segundos (Lanhesteiner et al., 1997), para o sêmen de salmonídeos; 40°C por 5 segundos (Horvath & Urbányi, 2000), para o sêmen de bagre africano e 60°C por 5 segundos (Murgas et al., 2001a), para o sêmen de piracanjuba. Carolsfeld et al. (2003b) compararam o método usual de descongelamento à ativação direta do sêmen ainda congelado à temperatura ambiente e não constatararm diferenças entre os procedimentos quanto à eclodibilidade de ovócitos fecundados por sêmen de algumas espécies de peixes brasileiros.

### **3.8 Capacidade de fertilização do sêmen *in natura* e do sêmen descongelado**

A técnica de fertilização artificial de gametas de peixes representa um enorme avanço em programas comerciais e de repovoamento de rios. Ela apresenta várias vantagens, dentre as quais se sobressaem o aproveitamento de gametas e o maior número de ovos férteis e de embriões viáveis. Com isso, o sêmen extruído de um único macho pode fertilizar até cinco fêmeas (Billard, 1990).

O número de espermatozoides de peixes necessários para fertilizar um oócito é relativamente elevado e dependente da espécie, variando até mesmo entre indivíduos. De acordo com Billard & Cosson (1992), a distância que um espermatozoide pode percorrer é menor do que todo o diâmetro de um oócito.

A obtenção de elevadas taxas de fertilização é limitada por dois fatores primordiais, sendo eles a duração da motilidade espermática e o tempo de

abertura da micrópila. Quando altas taxas de fertilização são obtidas usando-se uma proporção relativamente baixa de espermatozóides por oócito, significa que, dentre outros aspectos, a espécie possui alta capacidade de fertilização (Rurangwa et al., 1998).

A metodologia empregada por Poole & Dillane (1998), com sêmen de truta marrom (*Salmo trutta*), envolveu a fertilização de 200-400 oócitos por um volume de 0,01 ml de sêmen. Já Fogli da Silveira et al. (1988), diante das condições experimentais no processo de fertilização de truta (*Salmo irideus*), concluíram que 200 mil espermatozóides foi o número mínimo necessário à fecundação de um oócito com uma taxa de fertilização considerada ótima. O número mínimo de espermatozóides por oócito, para espécies de teleósteos de águas tropicais, é pouco estudado, talvez pela não aplicação da biotecnologia de congelamento na rotina de estações de piscicultura e ou relativa abundância de exemplares de algumas espécies em certas regiões do país.

Em seu estudo, Marques (2001) observou que as taxas de fertilização variaram de acordo com as incubadoras para as quais os oócitos foram transferidos após a fertilização com sêmen de curimba resfriado em gelo. Nas incubadoras com capacidade para 20 litros, obteve-se 38% de fertilização, enquanto que, nas incubadoras de 60 litros, a taxa de fertilização máxima foi de 90%. Para amostras de sêmen de curimba congelado, Miliorini et al. (2005) verificaram uma taxa de fertilização de 78%, quando se utilizaram incubadoras de 20 L a uma temperatura estável de 28°C, observando (dados não publicados) uma relevante redução nos valores obtidos para as incubadoras de 2 litros.

Para Marques (2001), uma taxa de motilidade espermática mínima com a qual se poderiam ter aplicações práticas e que credenciaria uma amostra seminal a fertilizar oócitos sadios é de 30% para o sêmen de piapara (*L. elongatus*) e de piau-três-pintas (*Leporinus friderici*). O grau de patologias espermáticas pode



interferir decisivamente no potencial fertilizante dos espermatozoides. Sabe-se que o congelamento induz a muitas dessas anormalidades morfológicas, e, mesmo espermatozoides com motilidade evidente podem ser incapazes de penetrar um ócito ou de levar a termo o desenvolvimento embrionário.

Ciereszko & Dabrowski (1994) e Rana & MacAndrew (1989) se referem à taxa de fertilização como sendo a confirmação da manutenção da viabilidade do sêmen preservado, todavia, resta a incerteza se este parâmetro deve ser avaliado isoladamente, uma vez que a homogeneidade das condições de fertilização constitui requisito imprescindível à sua validação.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Local, reprodutores, manejo alimentar e seleção

O estudo foi conduzido durante a piracema, entre os meses de novembro de 2005 e janeiro de 2006. No período, foram registrados os seguintes dados climatológicos médios fornecidos pelo Sistema de Telemetria Hidrometeorológica da Companhia Energética de Minas Gerais (STH-CEMIG): índice pluviométrico médio de 4,1 mm, temperatura média do ar entre 17,4°C e 25,0°C e umidade relativa atmosférica média variando entre 66,3% e 100%.

Foram utilizados 10 machos de curimba ao longo do experimento, com pesos corporais que variaram de 600 a 2.000 g (Anexo A) e que foram capturados do rio Grande há cerca de dois anos. Os animais foram mantidos em viveiros de terra da Estação Ambiental de Itutinga, da Companhia Energética de Minas Gerais (EAI-CEMIG), município de Itutinga, Sul do estado de Minas Gerais. Os reprodutores foram alimentados *ad libitum* com ração extrusada de oito mm de diâmetro com 28% de proteína bruta (ração comercial), entre os meses de março e agosto. Durante o período reprodutivo (entre os meses de setembro e fevereiro), os animais foram alimentados com ração extrusada de mesmo diâmetro e contendo 32% de proteína bruta. O sistema de alimentação incluiu uma frequência de três arraçoamentos diários.

Com o auxílio de redes de arrasto, foram selecionados os reprodutores com a papila urogenital hiperêmica e que liberaram sêmen sob delicada massagem sobre a parede da cavidade celomática. Esses animais foram transportados para aquários de alvenaria (volume útil de 2.000 litros) localizados no Laboratório de Piscicultura da EAI-CEMIG, sendo mantidos a uma densidade de 6 animais por aquário. O nível de oxigênio dissolvido foi monitorado e a temperatura da água foi mantida em torno de 28°C.

## **4.2 Hipofiseação dos reprodutores**

Cada reprodutor foi pesado e submetido ao tratamento hormonal com extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC) em duas dosagens, para indução à espermiacção. As doses prévia e definitiva consistiram de injeções intramusculares de 0,5 e 5,0 mg de EBHC kg<sup>-1</sup> de peso corporal, respectivamente, próximo à base da nadadeira dorsal, conforme metodologia adotada por Miliorini et al. (2005). Observou-se um intervalo de 12 horas entre as aplicações e o tempo entre a dose definitiva e a coleta de sêmen oscilou em torno de oito horas.

## **4.3 Coleta e avaliação do sêmen *in natura***

Antes da coleta do sêmen, a papila urogenital e as superfícies circunjacentes foram limpas e enxugadas com toalha de papel. Em seguida, foram realizadas massagens manuais delicadas sobre a parede celomática, na região da nadadeira anal, no sentido crânio-caudal. Durante a coleta, evitou-se a contaminação do sêmen por fezes, urina, sangue ou água. As amostras de sêmen foram coletadas em tubos de ensaio graduados estéreis, mantidos à temperatura ambiente (em torno de 23°C) e protegidos da entrada de luz por papel opaco.

Uma alíquota de 10 µl de sêmen *in natura* de cada animal foi depositada sobre uma lâmina histológica de vidro e, a seguir, homogeneizada com 40 µl de água destilada. A motilidade espermática foi observada em microscópio óptico de luz, sob aumento de 100 dioptrias e estimada em percentagem média de espermatozoides móveis observados em três campos. A duração da motilidade espermática foi estimada desde a homogeneização com água destilada até que somente 10% dos espermatozoides do campo se encontrassem móveis.

Uma alíquota do sêmen *in natura* foi coletada para análise de concentração e de morfologia espermáticas. Foram utilizadas somente as amostras com taxa de motilidade espermática igual a 100% e que não demonstraram ativação prévia da motilidade.

#### 4.4 Determinação da concentração espermática

A concentração espermática foi estimada por meio da utilização de uma câmara de Neubauer. Para tanto, uma alíquota de 10 µl de sêmen foi diluída em 990 µl de solução de formol-citrato (2,9 g de citrato de sódio, 4 ml de solução comercial de formaldeído 35% e água destilada q.s.p. 100 ml). Em seguida, foram tomados 10 µl da amostra diluída e procedida nova diluição em 990 µl de solução de formol-citrato, resultando em uma diluição final de 1:10<sup>4</sup> (sêmen:formol-citrato). A concentração espermática foi estimada pela fórmula:

$$CE = N \times FC;$$

em que:

*CE* é a concentração espermática (espermatozóides por mm<sup>3</sup>);

*N* é o número de células contadas na câmara de Neubauer.

e o fator de correção (*FC*) é dado por:

$$FC = (q \times fd) / d;$$

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<sup>4</sup>);

*d* é a profundidade entre a laminula e a câmara de Neubauer (= 0,1 mm).

#### 4.5 Avaliação da toxicidade das diferentes soluções crioprotetoras antes do congelamento do sêmen

Após a análise inicial, o sêmen *in natura* de oito reprodutores (Anexo A) foi distribuído igualmente entre oito tubos de ensaio estéreis. Seguiu-se a diluição lenta e gradativa das alíquotas por oito soluções crioprotetoras, na proporção de uma parte de sêmen para quatro partes de solução. As soluções foram compostas por dois crioprotetores, metanol e dimetilsulfóxido (DMSO), em quatro concentrações (volume:volume - v:v) crescentes cada um: 5%, 7,5%, 10% e 12,5%, conforme detalhado na Tabela 2. A solução diluidora (base) para cada crioprotetor consistiu de BTS (79,90 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) na concentração final (massa:volume - m:v) de 5%.

**TABELA 2.** Soluções crioprotetoras utilizadas como tratamentos do sêmen de curimba.

<b>Tratamento</b>	<b>BTS *</b> <b>(% m:v)</b>	<b>Crioprotetor</b>	<b>Concentração</b> <b>(% v:v)</b>
A <sub>1</sub>	5,0	Metanol	5,0
A <sub>2</sub>	5,0	Metanol	7,5
A <sub>3</sub>	5,0	Metanol	10,0
A <sub>4</sub>	5,0	Metanol	12,5
B <sub>1</sub>	5,0	DMSO	5,0
B <sub>2</sub>	5,0	DMSO	7,5
B <sub>3</sub>	5,0	DMSO	10,0
B <sub>4</sub>	5,0	DMSO	12,5

\* *Belltsville Thawing Solution*, Minitüb do Brasil - LTDA.

Todas as soluções crioprotetoras foram preparadas com uma hora de antecedência da diluição para que houvesse a estabilização dos crioprotetores e término das reações exotérmicas prejudiciais às células espermáticas.

Uma parte do sêmen diluído foi congelada, enquanto a fração restante foi deixada em repouso por 10 minutos, à temperatura ambiente e protegida da luz. Decorrido este período, as amostras diluídas foram ativadas por água destilada ou solução de carbonato ácido de sódio 1% (m:v) - NaHCO<sub>3</sub> 1%, tendo sua motilidade estimada à semelhança do sêmen *in natura*.

#### **4.6 Congelamento e descongelamento do sêmen**

Imediatamente após a diluição pelas soluções crioprotetoras, as amostras foram envasadas em palhetas de 0,5 ml (três palhetas por tratamento) que, por sua vez, foram vedadas com massa cirúrgica estéril. Em seguida, as palhetas foram acondicionadas em raques de polietileno e colocadas em botijão de vapor de nitrogênio líquido (Taylor-Wharton, modelo CP 300, tipo *dry shipper*) para resfriamento. Após 24 horas, as raques foram transferidas para um botijão de armazenamento (Cryometal, modelo DS-18) e congeladas, permanecendo submersas em nitrogênio líquido por quatro dias. O descongelamento ocorreu no Laboratório do Setor de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, Sul de Minas Gerais.

Foram descongeladas duas palhetas por tratamento e individualmente, por imersão em água (banho-maria) a 60°C, durante oito segundos, sendo as palhetas agitadas durante todo o procedimento. Estas foram enxugadas com toalha de papel, tendo descartada a extremidade com massa cirúrgica e o sêmen foi depositado em um tubo de ensaio estéril. Uma alíquota de 10 µl de sêmen descongelado foi depositada sobre uma lâmina histológica previamente focalizada em microscópio óptico sob aumento de 100 dioptrias. Após

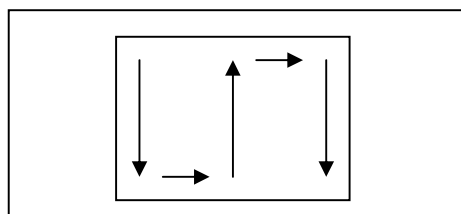
confirmação da ausência de ativação, a amostra foi ativada mediante homogeneização com 40 µl de água destilada ou solução de NaHCO<sub>3</sub> 1%.

Foram comparadas duas escalas de valorização da motilidade do sêmen descongelado, uma quantitativa e outra qualitativa. Pela escala quantitativa, a motilidade espermática foi estimada em função da percentagem média de espermatozoides móveis observados em três campos. A escala qualitativa, proposta por Maggese et al. (1984), foi atribuída simultaneamente à escala quantitativa e correlacionou as porcentagens de motilidade em categorias de 0 a 5, em que: 0 - nenhum espermatozoide móvel; 1 - motilidade de 1-20%; 2 - motilidade de 21%-40%; 3 - motilidade de 41%-60%; 4 - motilidade de 61%-80% e 5 - motilidade de 81%-100%. A duração (em segundos) da motilidade espermática também foi estimada desde a homogeneização com o ativador até que somente 10% dos espermatozoides do campo se encontrassem móveis.

#### **4.7 Análise morfológica do sêmen**

Foram utilizadas amostras de sêmen descongelado de sete animais utilizados no congelamento e outros dois animais que também tiveram seu sêmen congelado pelos protocolos testados, mas que não foram incluídos nos ensaios anteriores. As análises morfológicas do sêmen descongelado foram realizadas em microscópio óptico composto, com iluminação episcópica fluorescente (Nikon, modelo OPTIPHOT-2), no Laboratório de Microbiologia do Solo do Departamento de Ciência do Solo da UFLA.

Uma alíquota de 10 µl de sêmen descongelado foi diluída em 990 µl de solução de formol-citrato. A seguir, uma fração de 10 µl da amostra fixada foi depositada em lâmina histológica e coberta por lamínula. O exame consistiu da observação da morfopatologia de 100 espermatozoides focalizados em diversos campos ao longo de toda a lâmina conforme esquematizado na Figura 3.



**FIGURA 3.** Seqüência de campos observados durante a análise morfológica do sêmen de curimba. As setas indicam o sentido da avaliação.

Sob um aumento de 1.000 dioptrias, foram investigadas as patologias de cabeça, de peça intermediária e do restante da cauda (peças principal e terminal), conforme resumido na Tabela 3.

**TABELA 3.** Patologias dos espermatozóides examinadas no sêmen *in natura* de curimba.

<b>Porção acometida</b>	<b>Patologias maiores</b>	<b>Patologias menores</b>
Cabeça	Macrocefalia	Isolada normal
	Microcefalia	
	Degenerada	
Peça intermediária	Degenerada (PID)	Gota proximal
Restante da cauda	Fraturada	Dobrada Gota distal
	Fortemente enrolada	
	Degenerada	

Quando os espermatozóides apresentaram patologias maiores e menores simultaneamente, foram consideradas as patologias maiores e, quando dois tipos de patologias de mesma categoria ocorreram simultaneamente, aquela de maior implicação sobre a fertilização foi considerada (Tabela 4).



**TABELA 4.** Hierarquia das patologias espermáticas examinadas no sêmen descongelado de curimba.

<b>Tipo de patologia</b>	<b>Ordem decrescente de sobreposição das patologias</b>	
<b>Patologias maiores</b>	1º. Cabeça degenerada 2º. PID 3º. Cauda degenerada	4º. Cauda fraturada 5º. Cauda enrolada 6º. Macro(micro)cefalia
<b>Patologias menores</b>	1º. Cabeça isolada normal 2º. Gota proximal	3º. Gota distal 4º. Cauda dobrada

Em virtude do pequeno número de ocorrências de gotas citoplasmáticas nos espermatozóides, as patologias de gotas citoplasmáticas proximal e distal foram desconsideradas na análise dos dados.

#### **4.7.1 Patologias maiores**

##### **a) Macrocefalia e microcefalia**

A macrocefalia foi observada naqueles espermatozóides que apresentavam cabeça gigante, com contorno e forma anormais, sem aparente degeneração cromatínica ou vacuolar.

Espermatozóides com cabeça de tamanho reduzido, com contorno e forma anormais, sem degeneração cromatínica ou vacuolar aparentes foram considerados microcefálicos.

#### **b) Cabeça degenerada**

Espermatozóides com cabeça de tamanho e forma normais, mas que apresentavam contorno irregular e ou degenerações cromatínica ou vacuolar aparentes foram considerados possuidores de cabeça degenerada.

#### **c) Peça intermediária degenerada (PID)**

A PID consistiu das alterações em espessura (terço médio da peça intermediária), densidade, difração e comprimento da peça intermediária, envolvendo seu contorno e sua inserção à cabeça (colo).

#### **d) Cauda fraturada**

Células espermáticas com fratura e retenção da cauda foram classificadas como espermatozóides com cauda fraturada.

#### **e) Cauda fortemente enrolada**

A patologia de cauda fortemente enrolada consistiu da dobradura e enovelamento da cauda sobre si mesma ou sobre a cabeça. Foram considerados somente os enovelamentos que pudessem comprometer intensamente a motilidade espermática (sobre a cabeça ou com grande extensão da cauda acometida), sendo desconsiderados enovelamentos distais discretos.

#### **f) Cauda degenerada**

Espermatozóides que apresentaram descontinuidade da cauda a partir da peça intermediária foram considerados possuidores de cauda degenerada.

#### **4.7.2 Patologias menores**

##### **a) Cabeça isolada normal**

Cabeças observadas sem cauda, porém sem qualquer alteração de cabeça foram caracterizadas como cabeça isolada normal.

##### **b) Cauda dobrada**

A patologia de cauda dobrada significou a dobradura da cauda, em diversos graus, sem envolver a si mesma ou a cabeça.

#### **4.8 Capacidade de fertilização espermática após o descongelamento**

Uma palheta de cada tratamento foi descongelada sete dias após o congelamento, seguindo a mesma metodologia citada anteriormente e a motilidade espermática (%) avaliada. Foram selecionadas as palhetas de quatro reprodutores (tanto os reprodutores como as palhetas foram selecionados aleatoriamente). O sêmen *in natura* desses machos foi utilizado para a fertilização de oócitos, a fim de se estabelecer um controle para o sêmen.

Uma alíquota de 100 µl de cada palheta foi misturada a 0,1 g de oócitos (aproximadamente 130 oócitos) de duas fêmeas (1.200 g e 1.800 g de peso corporal). Neste trabalho, foi utilizada uma relação média de 5,26 (desvio padrão de 1,08) x 10<sup>9</sup> espermatozóides por grama de oócitos, o que equivale a, aproximadamente, 4,36 (desvio padrão de 0,83) x 10<sup>6</sup> células espermáticas por oócito, valor cerca de dez vezes o utilizado para a fertilização do sêmen *in natura*.

Antes de sua fertilização, entretanto, os oócitos recém-extraídos foram avaliados sob microscópio estereoscópio binocular (Olympus, modelo SZ-40) para a observação da migração do núcleo, sendo utilizadas as desovas que apresentassem elevada proporção de oócitos com núcleo periférico e aspecto homogêneo. Ambas as fêmeas utilizadas tiveram seus oócitos fertilizados com o sêmen *in natura* de machos de comprovada qualidade espermática, a fim de se estabelecer um controle para as fêmeas.

A fertilização foi iniciada pela adição de 10 ml da solução ativadora, sendo testadas a água destilada e a solução de NaHCO<sub>3</sub> 1%. O procedimento (“pré-incubação”) durou dois minutos e envolveu a agitação delicada da mistura “sêmen-oócitos”, sendo aclimatada gradualmente à temperatura da água de incubação.

Os ovos foram, então, transferidos para incubadoras experimentais de policloreto de vinila (PVC) de 1.200 ml de capacidade, acondicionadas em caixas de água de 1.000 litros com sistema de circulação de água constante. A incubação se manteve sob temperatura entre 24°C e 26°C e a taxa de fertilização foi verificada de 7 horas a 8 horas após seu início. Para a estimação da taxa de fertilização, foram realizadas duas amostragens individuais em cada incubadora e contados cerca de 100 ovos em estereoscópio binocular. Foi considerada a taxa de fertilização média entre cada amostragem, segundo a fórmula:

$$\text{Taxa de fertilização} = [E / (E + i)] \times 100;$$

em que:

*E* é o número de embriões viáveis;

*i* é o número de ovos inviáveis.

#### 4.9 Delineamento experimental e análise estatística

Utilizaram-se delineamentos diferentes. O teste de toxicidade e o congelamento do sêmen foram conduzidos em delineamento de blocos casualizados (DBC) com repetição dos tratamentos, sendo quatro blocos e duas repetições por bloco. Os tratamentos foram dispostos em uma estrutura fatorial 2 x 4 x 2 (crioprotetores, concentrações e ativadores) e o controle local (blocos) foi exercido sobre os pesos dos diferentes reprodutores (Tabela 1A).

O modelo estatístico utilizado foi o seguinte:

$$y_{ijkm} = \mu + C_i + N_j + A_k + B_m + (CN)_{ij} + (CA)_{ik} + (NA)_{jk} + (CNA)_{ijk} + e_{ijkm}$$

em que:

$y_{ijkm}$  é a observação obtida para o sêmen diluído pelo crioprotetor  $i$ , na concentração  $j$  e acrescido do ativador  $k$ , no bloco  $m$ ;

$\mu$  é a constante associada a cada observação;

$C_i$  é o efeito do crioprotetor  $i$ , sendo  $i = 1, 2$ ;

$N_j$  é o efeito da concentração  $j$  de crioprotetor, sendo  $j = 1, 2, 3, 4$ ;

$A_k$  é o efeito do ativador  $k$ , sendo  $k = 1, 2$ ;

$B_m$  é o efeito do bloco  $m$ , sendo  $m = 1, 2, 3, 4$ ;

$(CN)_{ij}$  é o efeito da interação entre o crioprotetor  $i$  e a concentração  $j$ ;

$(CA)_{ik}$  é o efeito da interação entre o crioprotetor  $i$  e o ativador  $k$ ;

$(NA)_{jk}$  é o efeito da interação entre a concentração  $j$  e o ativador  $k$ ;

$(CNA)_{ijk}$  é o efeito da interação entre o crioprotetor  $i$ , a concentração  $j$  e o ativador  $k$ ;

$e_{ijkm}$  é o erro associado a cada observação, considerado normal e independentemente distribuído com média 0 e variância  $\sigma^2$ .

A análise morfológica do sêmen foi também conduzida em um DBC com repetição dos tratamentos, sendo três blocos e três repetições por bloco. Os tratamentos foram dispostos em uma estrutura fatorial 2 x 4 (crioprotetores e concentrações) e o controle local também foi exercido sobre os pesos dos reprodutores (Tabela 2A).

O modelo estatístico utilizado foi o seguinte:

$$y_{ijk} = \mu + C_i + N_j + B_k + (CN)_{ij} + e_{ijk}$$

em que:

$y_{ijk}$  é a percentagem de patologia obtida para o sêmen diluído pelo crioprotetor  $i$ , na concentração  $j$ , no bloco  $k$ ;

$\mu$  é a constante associada a cada observação;

$C_i$  é o efeito do crioprotetor  $i$ , sendo  $i = 1, 2$ ;

$N_j$  é o efeito da concentração  $j$  de crioprotetor, sendo  $j = 1, 2, 3, 4$ ;

$B_k$  é o efeito do bloco  $k$ , sendo  $k = 1, 2, 3$ ;

$(CN)_{ij}$  é o efeito da interação entre o crioprotetor  $i$  e a concentração  $j$ ;

$e_{ijk}$  é o erro associado à percentagem de patologia obtida para o sêmen diluído pelo crioprotetor  $i$ , na concentração  $j$ , no bloco  $k$ , considerado normal e independentemente distribuído com média 0 e variância  $\sigma^2$ .

A análise da capacidade fertilizante do sêmen descongelado foi conduzida em um delineamento inteiramente casualizado (DIC). Os tratamentos foram dispostos em uma estrutura fatorial 2 x 4 x 2 (crioprotetores, concentrações e ativadores).

O modelo estatístico utilizado foi o seguinte:

$$y_{ijk} = \mu + C_i + N_j + A_k + (CN)_{ij} + (CA)_{ik} + (NA)_{jk} + (CNA)_{ijk} + e_{ijk}$$

em que:

$y_{ijk}$  é a taxa de fertilização obtida para o sêmen diluído pelo crioprotetor  $i$ , na concentração  $j$  e acrescido do ativador  $k$ .

$\mu$  é a constante associada a cada observação;

$C_i$  é o efeito do crioprotetor  $i$ , sendo  $i = 1, 2$ ;

$N_j$  é o efeito da concentração  $j$  de crioprotetor, sendo  $j = 1, 2, 3, 4$ ;

$A_k$  é o efeito do ativador  $k$ , sendo  $k = 1, 2$ ;

$(CN)_{ij}$  é o efeito da interação entre o crioprotetor  $i$  e a concentração  $j$ ;

$(CA)_{ik}$  é o efeito da interação entre o crioprotetor  $i$  e o ativador  $k$ ;

$(NA)_{jk}$  é o efeito da interação entre a concentração  $j$  e o ativador  $k$ ;

$(CNA)_{ijk}$  é o efeito da interação entre o crioprotetor  $i$ , a concentração  $j$  e o ativador  $k$ ;

$e_{ijk}$  é o erro associado à taxa de fertilização obtida para o sêmen diluído pelo crioprotetor  $i$ , na concentração  $j$  e acrescido do ativador  $k$ , considerado normal e independentemente distribuído com média 0 e variância  $\sigma^2$ .

Todas as variáveis foram analisadas com o auxílio dos programas *Statistical Analysis System* (SAS, 1995) e Sistema de Análise de Variância (SISVAR) (Ferreira, 2004).

Antes de todas as análises, as variáveis foram investigadas quanto à homogeneidade da variância e à normalidade dos resíduos. Aquelas cujos resíduos não apresentaram distribuição normal foram transformadas em  $\log_{10}x$  para sua normalização, sendo as médias posteriormente convertidas em seu antilogaritmo para apresentação dos resultados. Nas características em que não se conseguiu obter normalidade residual, utilizou-se o teste não-paramétrico de Wilcoxon para comparar as médias.

Quando significativas, as médias das concentrações de crioprotetores foram submetidas à análise de regressão.



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Avaliação da toxicidade das diferentes soluções crioprotetoras antes do congelamento

Os valores médios de motilidade das amostras de sêmen submetidas à análise de toxicidade estão representados na Tabela 5. Não houve interação significativa entre a concentração e os crioprotetores utilizados, entretanto, foi possível estabelecer um comportamento quadrático ( $P < 0,05$ ) da concentração (Figura 4), independentemente do tipo de crioprotetor.

**TABELA 5.** Médias de motilidade (%) do sêmen de curimba após a diluição em diferentes soluções crioprotetoras e a adição de diferentes ativadores.

Crioprotetores	Concentrações (% v:v)				Médias dos criop.	Ativadores	
	5,0	7,5	10,0	12,5		Água	NaHCO <sub>3</sub>
Metanol	84 (1,0)	87	88	78	84 (1,0)	88 (1,0) <sup>Aa</sup>	81 <sup>Bb</sup>
DMSO	88	90	88	83	87	85 <sup>Ba</sup>	90 <sup>Aa</sup>
<b>Médias dos ativadores</b>						86 (1,0)	86
<b>Médias das concentrações<sup>1</sup></b>		86 (1,0)	89	88	81	86 (1,0)	

<sup>A,B</sup> Médias seguidas de letras distintas, nas linhas, diferem entre si, pelo teste F ( $P < 0,05$ ).

<sup>a,b</sup> Médias seguidas de letras distintas, nas colunas, diferem entre si, pelo teste F ( $P < 0,01$ ).

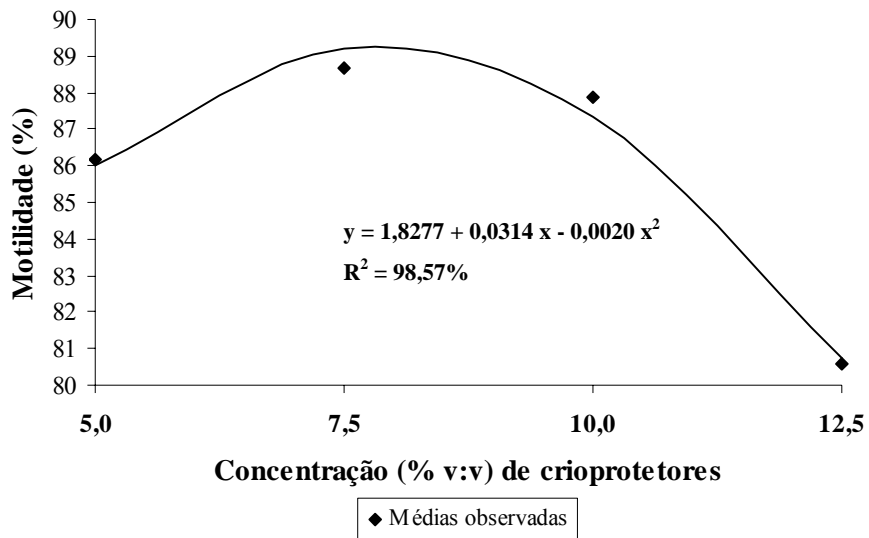
<sup>1</sup> Efeito quadrático da concentração de crioprotetores ( $P < 0,05$ ).

Valores entre parênteses referem-se ao erro padrão da média.

O acréscimo de DMSO e a ativação concomitante por  $\text{NaHCO}_3$  1% se mostraram menos ( $P < 0,01$ ) tóxicos ao sêmen de curimba, alcançando 90% de motilidade média. Por outro lado, as amostras acrescidas de metanol apresentaram as maiores ( $P < 0,01$ ) taxas médias de motilidade quando a ativação foi procedida pela água destilada.

Miliorini et al. (2004) verificaram que o DMSO apresentou toxicidade para o sêmen de curimba semelhante ao metanol e ao etilenoglicol na concentração de 10%, após 6 horas de resfriamento, a 4°C. Entretanto, o DMSO propiciou uma redução na motilidade superior ( $P < 0,05$ ) ao metanol nas 42 horas seguintes. Segundo Bedore (1999), concentrações ou períodos de estabilização elevados de DMSO podem provocar redução significativa na qualidade do sêmen de peixes.

De acordo com a Figura 4, concentrações superiores a 7,84% promoveram redução na motilidade espermática, cujo valor médio máximo estimado foi de 89,3%, a exemplo do verificado por Cruz (2001), que estimou valores de 70% e 62% de motilidade para o sêmen de curimba diluído em meio contendo DMSO em concentrações de 5% e 10%, respectivamente.



**FIGURA 4.** Regressão das médias de motilidade (%) do sêmen de curimba diluído em soluções com concentrações crescentes de crioprotetores.

Na Tabela 6 são apresentadas as médias das durações da motilidade para o sêmen de curimba submetido à análise de toxicidade. O DMSO foi superior ( $P < 0,05$ ) ao metanol quando a ativação foi realizada por  $\text{NaHCO}_3$  1% e, neste caso, a ativação por  $\text{NaHCO}_3$  1% proporcionou o menor ( $P < 0,01$ ) efeito tóxico em relação à água destilada, alcançando 146 segundos.

**TABELA 6.** Médias da duração (segundos) da motilidade do sêmen de curimba após a diluição em diferentes soluções crioprotetoras e a adição de diferentes ativadores.

Crioprotetores	Concentrações (% v:v)				Médias dos criop.	Ativadores	
	5,0	7,5	10,0	12,5		Água	NaHCO <sub>3</sub>
Metanol	73 (1,2)	75	64	54	66 (1,0)	43 (1,1) <sup>Ba</sup>	101 <sup>Ab</sup>
DMSO	75	83	67	70	73	37 <sup>Ba</sup>	146 <sup>Aa</sup>
<b>Médias dos ativadores</b>						40 (1,1)	122
<b>Médias das concentrações</b>		74 (1,1)	79	66	61	70 (1,1)	

<sup>A,B</sup> Médias seguidas de letras distintas, nas linhas, diferem entre si, pelo teste F (P<0,01).

<sup>a,b</sup> Médias seguidas de letras distintas, nas colunas, diferem entre si, pelo teste F (P<0,05).

Valores entre parênteses referem-se ao erro padrão da média.

Cruz (2001) também verificou que as amostras acrescidas de DMSO apresentaram durações médias da motilidade superiores àquelas acrescidas de etilenoglicol e propanodiol, sendo a concentração de 15% (104 segundos) a menos tóxica quando comparada às concentrações de 5% (67 segundos) e 10% (84 segundos). Este comportamento não foi verificado neste ensaio de toxicidade devido a não significância da concentração de crioprotetor sobre a duração da motilidade espermática de curimba, mas foi para as amostras descongeladas.

O NaHCO<sub>3</sub> tem sido utilizado com sucesso na ativação da motilidade do sêmen de peixes. Miliorini et al. (2002) e Murgas et al. (2003b), observaram que amostras de sêmen de pacu e de piapara (*L. obtusidens*), respectivamente, ativadas com NaHCO<sub>3</sub> 1% e acrescidas de DMSO 10%, apresentaram taxas e durações médias da motilidade superiores àquelas ativadas por água destilada e acrescidas de DMSO 5%. Amostras de sêmen de peixes de água doce ativadas

por concentrações inferiores de  $\text{NaHCO}_3$  parecem não responder com a mesma qualidade de movimentação, como observado por Miliorini et al. (2005) e Murgas et al. (2005).

Alguns ensaios de criotoxicidade, como o empregado por Cruz (2001) e Ribeiro & Godinho (2003), podem não avaliar o real efeito dos crioprotetores sobre as células espermáticas. Nesses trabalhos, a solução crioprotetora foi adicionada diretamente ao sêmen na lâmina histológica, sem haver um período de equilíbrio entre o sêmen e as soluções. Em outros estudos, como o de Maria (2005), o sêmen foi resfriado a  $4^\circ\text{C}$  e mantido diluído pelas soluções crioprotetoras por até 48 horas. Como os procedimentos que antecedem o congelamento do sêmen de peixes geralmente despendem pouco tempo, o período de estabilização entre o crioprotetor e o sêmen (10 minutos) empregado no presente estudo certamente favoreceu a manutenção da qualidade seminal de curimba, permitindo o congelamento de amostras com viabilidade assegurada.

## **5.2 Motilidade espermática após o descongelamento**

Não houve interação entre os crioprotetores e as concentrações utilizadas e nem entre os crioprotetores e os ativadores. Na Tabela 7, são apresentados as porcentagens médias para a motilidade espermática após o descongelamento. As amostras do sêmen de curimba exibiram motilidades elevadas após o descongelamento, sobretudo aquelas acrescidas de DMSO, cujo valor médio (77%) foi superior ( $P < 0,01$ ) ao proporcionado pelo metanol (68%). A solução de  $\text{NaHCO}_3$  1% propiciou as mais altas ( $P < 0,01$ ) taxas de motilidade, a exemplo dos resultados de Cruz (2001). Uma solução de  $\text{NaCl}$  50 mM proporcionou menor desorganização da estrutura do flagelo espermático de carpa que a água destilada e a mudança osmótica foi suficiente para iniciar uma motilidade mais duradoura (Billard et al., 1995).

**TABELA 7.** Médias de motilidade (%) do sêmen de curimba após o descongelamento.

Crioprotetores	Concentrações (% v:v)				Médias dos criop. <sup>1</sup>	Ativadores				
	5,0	7,5	10,0	12,5		Água	NaHCO <sub>3</sub>			
Metanol	63 (3,8)	70	74	67	68 (1,9) <sup>B</sup>	59 (2,7)	78			
DMSO	76	78	85	69	77 <sup>A</sup>	72	82			
<b>Médias dos ativadores <sup>2</sup></b>						66 (1,9) <sup>b</sup>	80 <sup>a</sup>			
<b>Médias das concentrações <sup>3</sup></b>						69 (2,7)	74	80	68	73 (1,3)

<sup>1</sup> Médias seguidas de letras distintas diferem entre si, pelo teste F (P<0,01).

<sup>2</sup> Médias seguidas de letras distintas diferem entre si, pelo teste F (P<0,01).

<sup>3</sup> Efeito quadrático da concentração de crioprotetores (P<0,05).

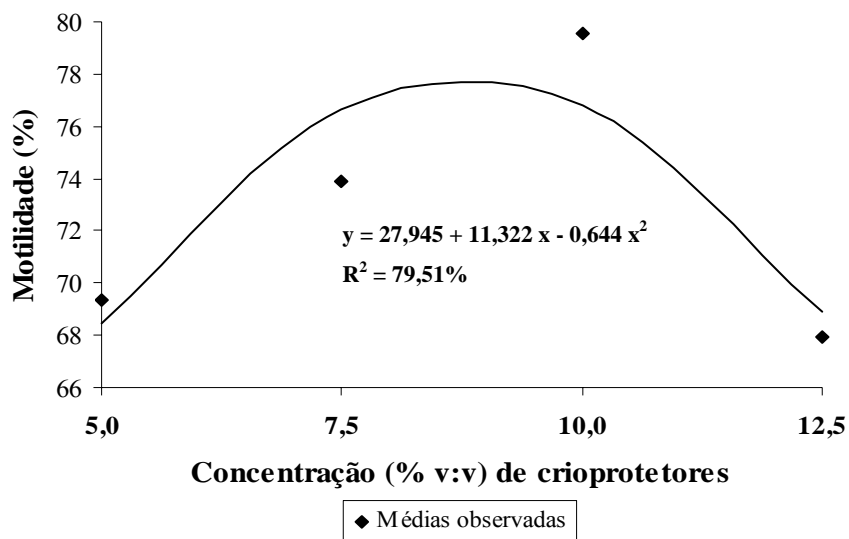
Valores entre parênteses referem-se ao erro padrão da média.

A associação de DMSO 10%, glicose 5% e gema de ovo 10% tem sido utilizada com sucesso na criopreservação do sêmen de curimba (Kavamoto et al., 1989 e Silva, 2000). Em ensaios preliminares, entretanto, Miliorini verificou que a utilização de gema de ovo se mostrou tóxica ao sêmen pós-descongelamento de curimba, quando comparada à incorporação de BTS. O diluidor BTS foi utilizado, pela primeira vez, em ensaios com preservação de espermatozóides de peixes nos trabalhos de Franciscatto et al. (2002), com sêmen de curimba; de Miliorini et al. (2002), com sêmen de pacu e de Murgas et al. (2003b), com sêmen de piapara (*L. obtusidens*). Dadas sua eficiência na preservação qualitativa do sêmen de peixes e a preservação da imobilidade dos espermatozóides, vários autores (Maria, 2005; Miliorini et al., 2004, 2005; Murgas et al., 2003b, 2004, 2005 e Oliveira, 2006) passaram a empregá-lo em trabalhos posteriores.

De acordo com Cosson et al. (1999), a fosforilação oxidativa mitocondrial é altamente requerida para produzir energia durante o batimento flagelar dos espermatozóides e a insuficiência de ATP é uma das principais causas da redução da motilidade espermática. Lahnsteiner et al. (1993) verificaram que o espermatozóide de truta arco-íris utiliza triglicerídeos e glicose como fontes primárias de energia. É provável que o sêmen de curimba apresente metabolismo semelhante e que a concentração de glicose exógena empregada neste estudo (3%, após a diluição do sêmen) tenha sido suficiente para suprir as necessidades metabólicas das células espermáticas.

Embora os procedimentos experimentais sejam conduzidos com o máximo de higiene e anti-sepsia, dificilmente consegue-se eximir o sêmen de alguma contaminação. A gentamicina é um aminoglicosídeo bactericida amplamente empregado contra este grupo de bactérias (Rang et al., 1997). A concentração final calculada de sulfato de gentamicina nas amostras de sêmen do presente trabalho ( $250 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) foi a mesma empregada por Maria (2005). Segundo o autor, após quatro dias de resfriamento a  $4^{\circ}\text{C}$ , a sua incorporação promoveu uma taxa de motilidade superior aos diluidores que não possuíam o fármaco, embora testes de quantificação e identificação de microrganismos não tenham sido realizados.

Houve resposta quadrática ( $P < 0,01$ ) da motilidade do sêmen descongelado às concentrações de crioprotetores. Como pode ser inferido a partir do estudo de regressão apresentado na Figura 5, uma concentração média de crioprotetor de 8,79% pode proporcionar uma média de motilidade máxima de 77,7% para o sêmen de curimba após o descongelamento. Não ocorreu, entretanto, interação significativa entre o tipo de crioprotetor e sua concentração.



**FIGURA 5.** Regressão das médias de motilidade (%) do sêmen de curimba após o descongelamento, segundo as concentrações de crioprotetores.

A análise qualitativa da motilidade do sêmen descongelado (Tabela 8) apresentou resultados semelhantes aos apresentados na Tabela 7 para a escala quantitativa, evidenciando não existirem diferenças entre o tipo de valorização subjetiva, desde que ela seja criteriosa e realizada pelo mesmo avaliador.

Também não foi observada interação significativa entre o crioprotetor e o ativador empregados, nem entre o crioprotetor e a concentração empregada. Individualmente, a adição de DMSO e a ativação da motilidade por  $\text{NaHCO}_3$  1% proporcionaram escalas médias de motilidade correspondentes a 4,1 e 4,3, respectivamente, sendo superiores ( $P < 0,05$ ), nessa ordem, ao metanol (3,6) e à água destilada (3,8).



**TABELA 8.** Médias de motilidade (0-5) do sêmen de curimba após o descongelamento.

Crioprotetores	Concentrações (% v:v)				Médias dos criop. <sup>1</sup>	Ativadores	
	5,0	7,5	10,0	12,5		Água	NaHCO <sub>3</sub>
Metanol	3,5 (0,2)	3,9	4,1	3,7	3,8 (0,1) <sup>B</sup>	3,3 (0,1)	4,2
DMSO	4,0	4,2	4,6	3,7	4,1 <sup>A</sup>	3,8	4,4
<b>Médias dos ativadores<sup>2</sup></b>						3,6 (1,9) <sup>b</sup>	4,3 <sup>a</sup>
<b>Médias das concentrações<sup>3</sup></b>		3,8 (0,1)	4,0	4,2	3,7	4,0 (0,1)	

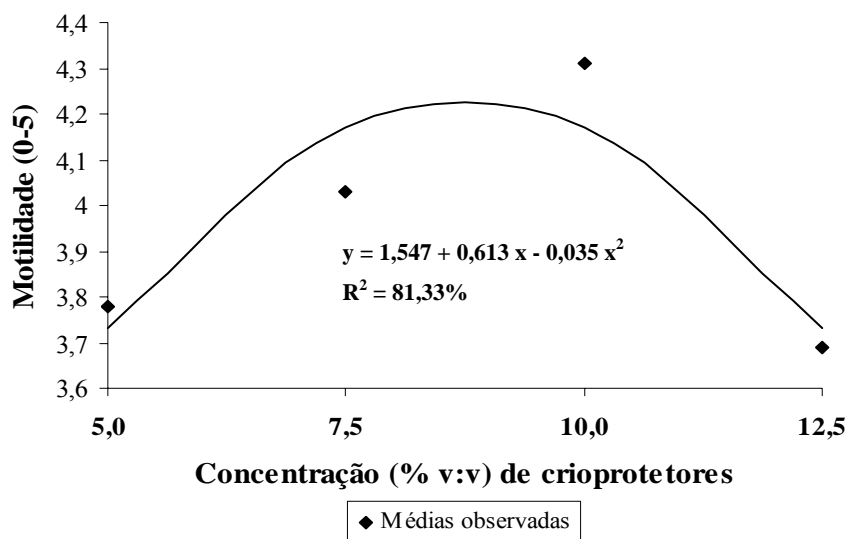
<sup>1</sup>Médias seguidas de letras distintas diferem entre si, pelo teste F (P<0,05).

<sup>2</sup>Médias seguidas de letras distintas diferem entre si, pelo teste F (P<0,05).

<sup>3</sup>Efeito quadrático da concentração de crioprotetores (P<0,01).

Valores entre parênteses referem-se ao erro padrão da média.

A análise de regressão da escala qualitativa da motilidade do sêmen de curimba (Figura 6) também apresentou um comportamento quadrático (P<0,01), em que uma concentração de crioprotetor de 8,76% é capaz de proporcionar uma motilidade máxima de grau 4,2. Esta concentração predita é praticamente igual à estimada para a motilidade em escala quantitativa (8,79%) e corrobora a similaridade entre as escalas.



**FIGURA 6.** Regressão das médias de motilidade (0-5) do sêmen de curimba após o descongelamento, segundo as concentrações de crioprotetores.

Os resultados para a motilidade após o descongelamento confirmam que a taxa de descongelamento foi adequada ao sêmen de curimba, como em outros trabalhos (Maria, 2005; Miliorini et al., 2005). A comparação entre os resultados destes estudos e os obtidos por Cruz (2001), com uma taxa de descongelamento de 30°C por 14 segundos, sugere que os espermatozóides de peixes são células com relativa resistência a variações de temperaturas e que sua membrana citoplasmática apresenta elevada hidrossolubilidade. Pode-se inferir, ainda, que os meios intracelular e extracelular, em interação com os crioprotetores utilizados, apresentem refratariedade à formação de cristais de gelo em um intervalo térmico compreendido, ao menos, entre 30°C e 60°C.

Marques (2001) utilizou uma diluição de 200 vezes para a ativação da motilidade espermática de curimba. Segundo Billard & Cosson (1992), Billard

et al. (1993) e Cosson et al. (1999) e, nessas condições, observa-se ativação completa e homogênea do movimento dos espermatozoides. A diluição empregada neste trabalho equivaleu a 4 vezes para o sêmen *in natura* e 16 vezes para o descongelado e, ao microscópio óptico, houve ativação de todas as células espermáticas do sêmen *in natura*. Evidentemente, para se evitarem superestimulações, foi procedida a avaliação de vários campos em diferentes estratos da gota de mistura.

Os resultados para as durações médias da motilidade espermática após o descongelamento (Tabela 9) mostram que tanto ativadores como crioprotetores não interagiram estatisticamente.

**TABELA 9.** Médias da duração (segundos) da motilidade do sêmen de curimba após o descongelamento.

Crioprotetores	Concentrações (% v:v)				Médias dos criop.	Ativadores	
	5,0	7,5	10,0	12,5		Água	NaHCO <sub>3</sub>
Metanol	40 (1,1)	43	47	53	45 (1,0)	29 (1,1) <sup>Ba</sup>	72 <sup>Ab</sup>
DMSO	48	54	62	38	50	25 <sup>Ba</sup>	99 <sup>Aa</sup>
<b>Médias dos ativadores</b>						27 (1,1)	84
<b>Médias das concentrações<sup>1</sup></b>		43 (1,1)	48	54	45	48 (1,0)	

<sup>A,B</sup> Médias seguidas de letras distintas, nas linhas, diferem entre si, pelo teste F (P<0,01).

<sup>a,b</sup> Médias seguidas de letras distintas, nas colunas, diferem entre si, pelo teste F (P<0,01).

<sup>1</sup> Efeito linear da concentração de metanol (P<0,05) e efeito quadrático da concentração de DMSO (P<0,01).

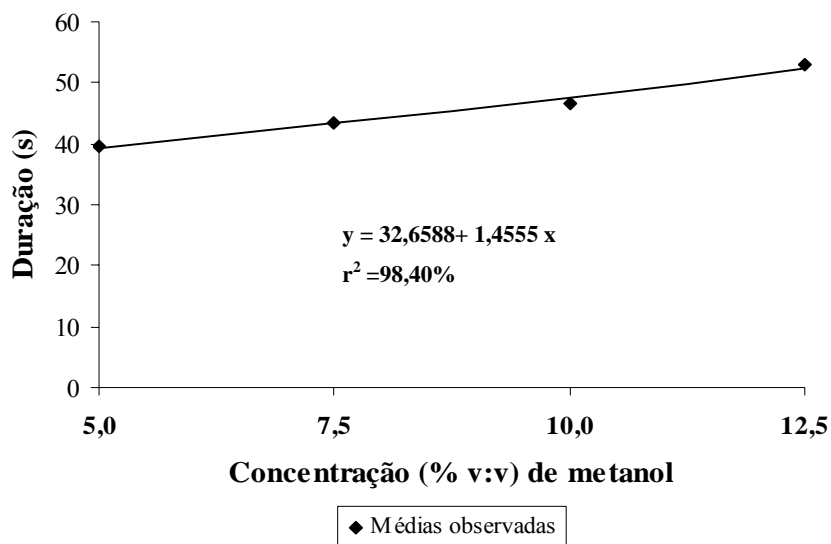
Valores entre parênteses referem-se ao erro padrão da média.

O DMSO, como crioprotetor e o NaHCO<sub>3</sub> 1%, como ativador, propiciaram as maiores durações para a motilidade pós-congelamento (99 segundos), quando utilizados concomitantemente (P<0,01).

Comparando-se os resultados das Tabelas 6 e 9, pode-se constatar que o congelamento pouco afetou a duração da motilidade espermática. Considerando-se as durações de motilidade do sêmen *in natura* (Anexo A), pode-se inferir que o acréscimo de glicose contida no diluidor BTS favoreceu o metabolismo energético das células espermáticas.

Ainda em relação aos resultados apresentados na Tabela 9, foi obtida uma interação (P<0,01) entre a concentração e o tipo de crioprotetor empregado em relação à duração da motilidade do sêmen de curimba após o descongelamento. As concentrações de metanol e de DMSO apresentaram comportamentos linear (Figura 7) e quadrático (Figura 8), respectivamente.

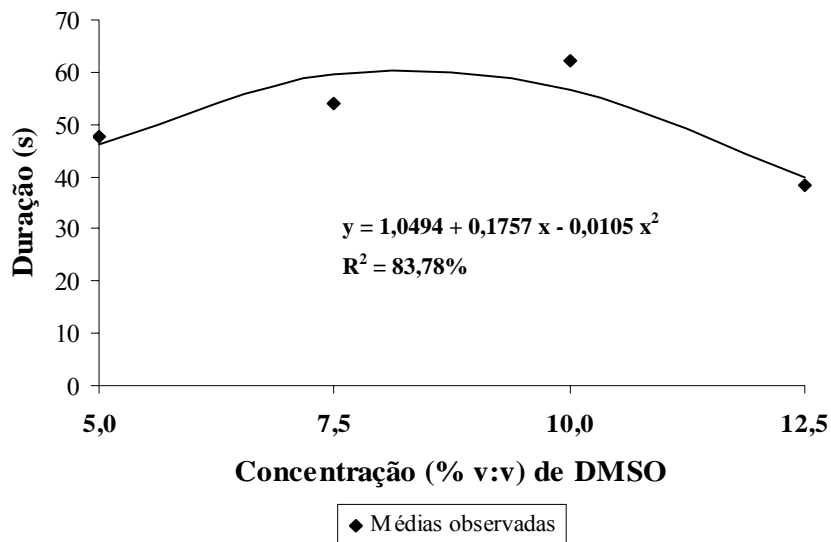
Como evidenciado na Figura 7, à medida que se elevou a concentração de metanol, houve um aumento (P<0,05) correspondente na duração da motilidade espermática de curimba pós-congelamento, dentro dos limites das concentrações estudadas, sendo que, com a adição de uma concentração de 12,5%, a duração média esperada é de 50,9 segundos e, para cada incremento de 1% de crioprotetor, corresponde um aumento esperado na duração da motilidade de 1,45 s.



**FIGURA 7.** Regressão das médias da duração (segundos) da motilidade do sêmen de curimba após o descongelamento, segundo as concentrações de metanol.

O gráfico da Figura 8 representa a duração da motilidade espermática pós-congelamento em função da concentração de DMSO empregada, segundo a qual, a concentração de 8,37% pode proporcionar ( $P < 0,05$ ) uma duração média máxima esperada de 60,9 segundos.

O metanol e o DMSO, nas concentrações de 12,5% e 8,37%, respectivamente, podem ter exercido uma melhor proteção sobre as membranas do sistema mitocondrial, diminuindo os danos durante o congelamento e ou descongelamento e promovendo uma extensão do tempo de batimento flagelar.



**FIGURA 8.** Regressão das médias da duração (segundos) da motilidade do sêmen de curimba após o descongelamento, segundo as concentrações de DMSO.

Cosson et al. (1999) e Legendre et al. (1996) comentam que a duração da motilidade espermática em peixes teleósteos de água doce é muito curta e muito variada entre as espécies. Entretanto, cabe descobrir qual a duração mínima necessária à obtenção de índices reprodutivos satisfatórios.

Ensaio desta natureza são difíceis e poderiam ser conduzidos agrupando-se animais com faixas de duração semelhantes e medindo a resposta sobre taxas de fertilização e eclosão. No entanto, é mais prático e fidedigno partir do pressuposto de que a duração da motilidade do sêmen *in natura* é aquela que se adapta à biologia dos oócitos, mesmo sob condições mais controladas que as do habitat natural. Assim, as durações médias da motilidade do sêmen *in natura* de curimba estimadas por alguns autores foram de 612 segundos (Cóser et al., 1984), 152 segundos (Murgas et al., 1998), 111 segundos

(Cruz, 2001), 96 segundos (Franciscatto et al., 2002) e 43 segundos (Franciscatto et al., 2002). A variação entre esses trabalhos pode ser explicada, principalmente, pelo momento considerado como término da motilidade. Por exemplo, Murgas et al. (1998) consideraram a duração até que uma taxa de motilidade de 50% fosse alcançada, enquanto Franciscatto et al. (2002) consideraram uma taxa de motilidade de 10%. É claro que o caráter subjetivo da análise e as condições individuais dos reprodutores interferem na estimativa da duração e na taxa de motilidade espermática. Outra explicação reside no fato de que reprodutores no pico reprodutivo tendem a produzir mostras seminais com taxas e durações da motilidade mais elevadas.

### **5.3 Morfologia espermática após o descongelamento**

Não foi verificada diferença significativa entre nenhum dos crioprotetores ou entre as concentrações destes sobre as patologias menores (Tabela 10). Os dados indicam que houve uma redução linear ( $P < 0,05$ ) na ocorrência de patologias totais com o aumento da concentração dos crioprotetores, porém, sem interação entre o tipo e a concentração de crioprotetor utilizado.

A percentagem média de patologias totais observada no sêmen *in natura* (3%) foi muito inferior às observadas por Kavamoto et al. (1999) e Moraes et al. (2004) e Murgas et al. (1998), que constatararam uma ocorrência de 7,22%, 9,54% e 40,2% de patologias totais no sêmen *in natura* de curimba, respectivamente. Estes resultados confirmam que a análise morfológica dos espermatozoides de peixes também reflete variações ambientais e genéticas, além de sugerir que foram moderadas as porcentagens de patologias totais observadas no sêmen descongelado (29,5%).

**TABELA 10.** Médias das patologias (%) do sêmen de curimba após o descongelamento.

Crioprotetores	Concentrações (% v:v)	Alterações morfológicas (%)		
		Maiores <sup>1</sup>	Menores <sup>NS</sup>	Totais
Metanol	5,0	37,8 (3,8)	3,6 (0,6)	41,3 (3,8)
	7,5	28,1	2,3	30,4
	10,0	24,0	1,5	25,6
	12,5	27,0	3,2	30,2
DMSO	5,0	28,7	2,6	31,2
	7,5	24,6	2,4	27,0
	10,0	24,8	1,3	26,1
	12,5	23,2	1,1	24,3
<b>Média</b>		27,3 (1,4)	2,3 (0,2)	29,5 (1,3)
<b>Sêmen <i>in natura</i></b>		1,8 (0,8)	1,2 (0,4)	3,0 (0,8)
		Maiores	Menores	Totais <sup>2</sup>
<b>Médias dos crioprotetores</b>	5,0	33,2 (2,7)	3,1 (0,4)	36,3 (2,7)
	7,5	26,3	2,4	28,7
	10,0	24,4	1,4	25,8
	12,5	25,1	2,2	27,3

<sup>NS</sup> Efeito não significativo das concentrações de crioprotetores ( $P>0,05$ ).

<sup>1</sup> Efeito não significativo entre as concentrações de crioprotetores ( $P>0,05$ ), mas significativo sobre as patologias de cauda fortemente enrolada e degenerada ( $P<0,05$ ).

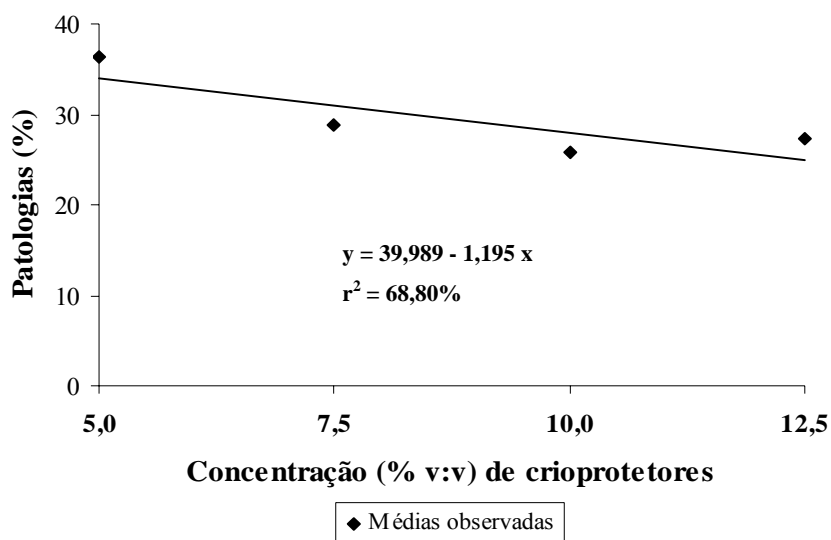
<sup>2</sup> Efeito linear da concentração de crioprotetores ( $P<0,05$ ).

Valores entre parênteses referem-se ao erro padrão da média.

O incremento na concentração de crioprotetor, dentro dos limites estudados, promoveu um efeito protetor ( $P<0,05$ ) sobre os espermatozoides, tendo a concentração de 12,5% permitido a ocorrência de somente 25% de patologias totais (Figura 9).

A metodologia empregada neste estudo ratifica que a adição dos crioprotetores estudados ao sêmen de curimba proporciona um efeito protetor sobre as características bioquímicas, refletindo nos aspectos físicos das células espermáticas após o descongelamento, em que um incremento de 1% de crioprotetores pode proporcionar uma redução de aproximadamente 1,2% de patologias totais.





**FIGURA 9.** Regressão das médias das patologias totais (%) do sêmen de curimba, após o descongelamento, segundo as concentrações de crioprotetores.

Segundo o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998), índices de espermatozoides com anormalidades acima de 30%, 30% e 20% são inapropriados à inseminação artificial de bovinos, eqüinos e suínos, respectivamente. Como a fecundação artificial em curimba envolve a utilização de uma elevada proporção entre espermatozoides e oócitos em um ambiente controlado, é provável que o percentual crítico de anormalidades espermáticas de peixes de fecundação externa oscile em torno de 50%.

Entre as patologias maiores, somente aquelas de cauda degenerada e cauda fortemente enrolada evidenciaram diferenças estatísticas, em função do crioprotetor utilizado no congelamento do sêmen de curimba. Analisando-se a Tabela 11, pode-se observar que o DMSO permitiu um número menor de patologias em ambos os casos, com 3,6% e 0,2% de patologias de cauda

fortemente enrolada e cauda degenerada, respectivamente, contra 5,5% e 0,8% observados nas amostras diluídas por meio contendo metanol ( $P < 0,05$ ). As patologias de cauda fortemente enrolada e cauda degenerada podem comprometer a fertilização, principalmente por se tratarem de defeitos maiores. A utilização de DMSO reduziu a ocorrência destes defeitos, o que pode refletir em taxas de fertilização e eclosão superiores, desconsiderando os fatores relativos aos oócitos.

**TABELA 11.** Médias das patologias de cauda fortemente enrolada e cauda degenerada (%) do sêmen descongelado de curimba em relação ao crioprotetor utilizado.

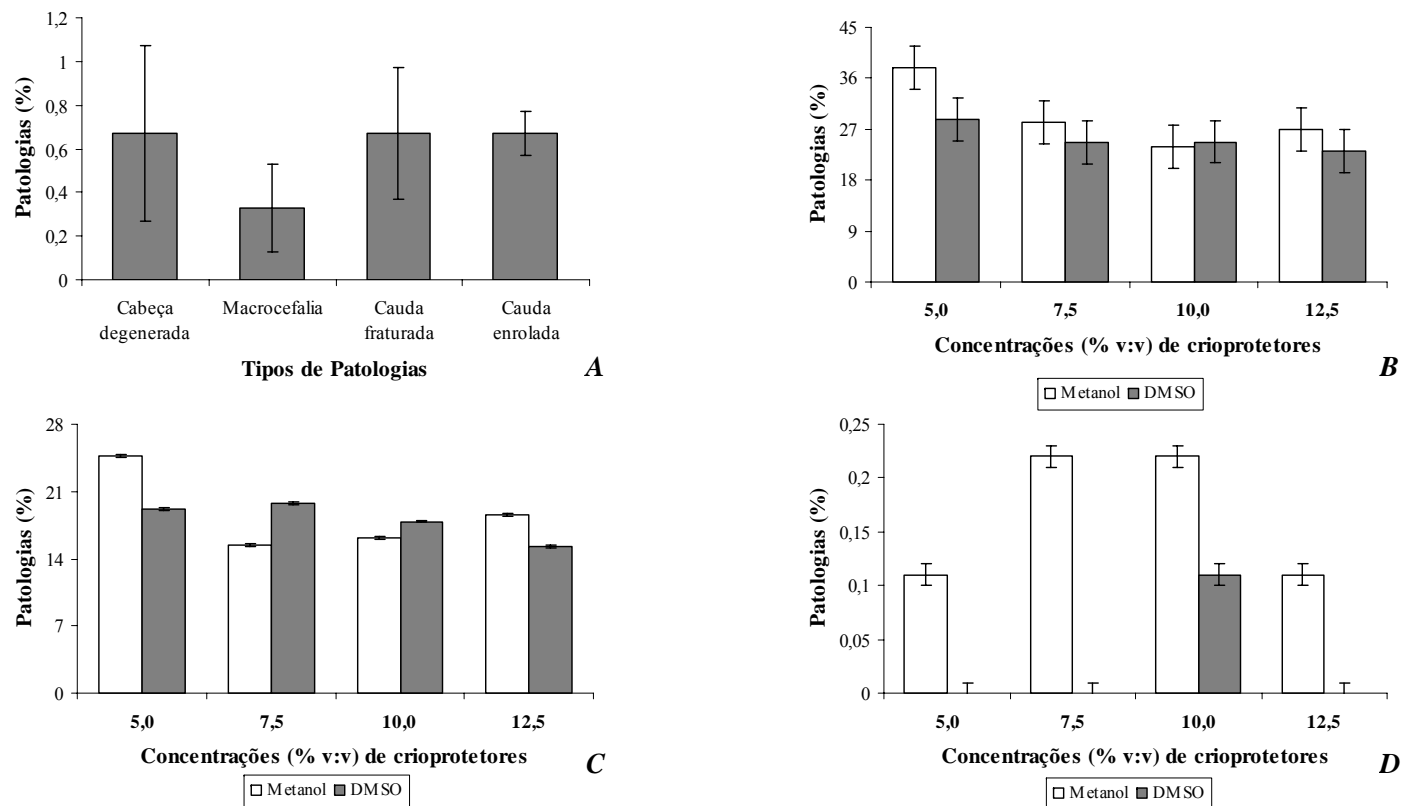
Crioprotetor	Alterações morfológicas	
	Cauda fortemente enrolada <sup>1</sup>	Cauda degenerada <sup>2</sup>
Metanol	5,5 <sup>B</sup>	0,8 <sup>B</sup>
DMSO	3,6 <sup>A</sup>	0,2 <sup>A</sup>

<sup>1</sup>Médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste F ( $P < 0,05$ ).

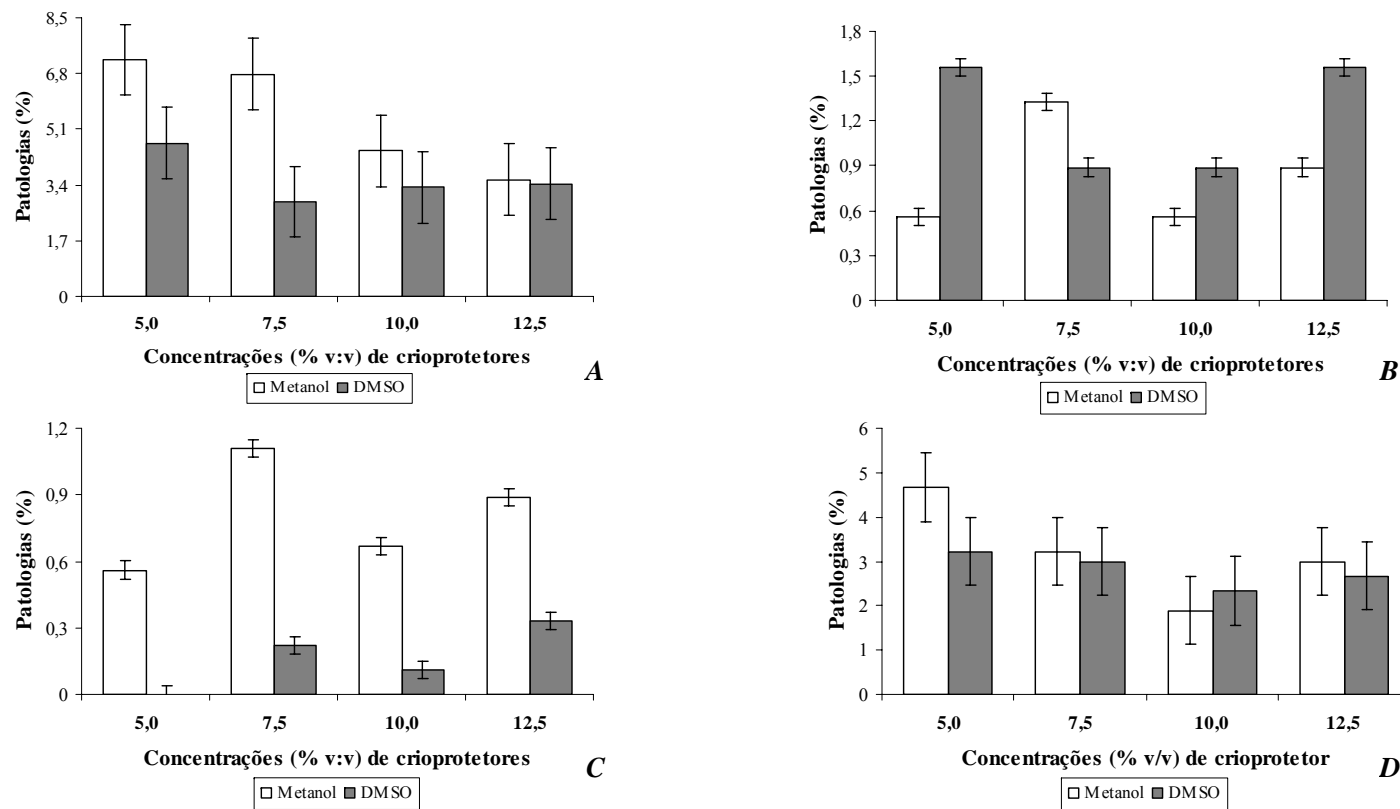
<sup>2</sup>Médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste de Wilcoxon ( $P < 0,01$ ).

Os fatores estudados não influenciaram o aparecimento das demais patologias, que foi em número reduzido. Entre elas, a patologia de cabeça degenerada foi aquela de maior frequência, tendo sido verificados 24,7% e 15,4% nas amostras acrescidas de metanol 5% e DMSO 7,5%, respectivamente.

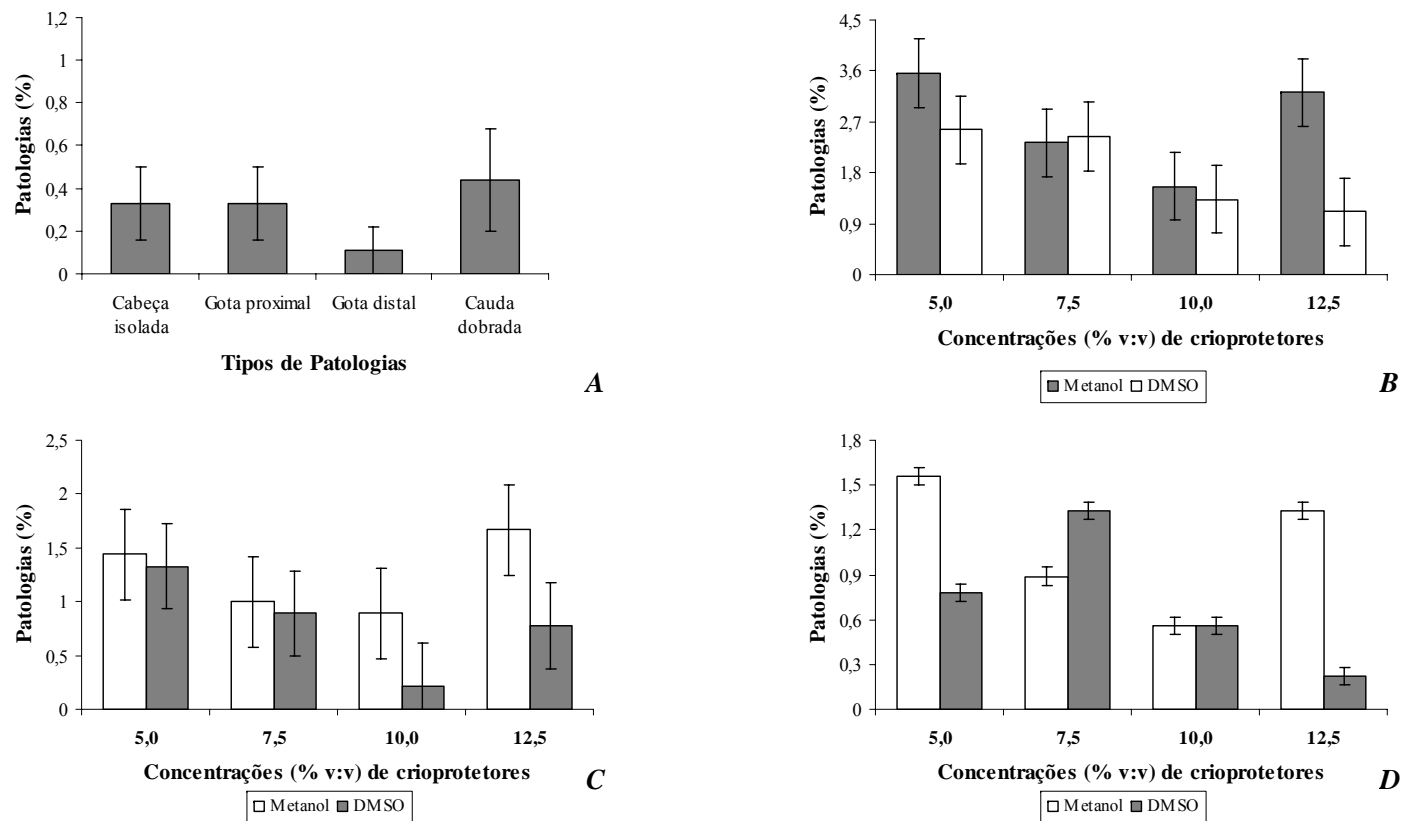
As patologias de microcefalia, cauda degenerada e PID não foram observadas no sêmen *in natura* (Figura 10A), mas o congelamento provocou o desenvolvimento das patologias de cauda degenerada e PID. As patologias maiores observadas no sêmen descongelado estão representadas pelos gráficos da Figura 10B-D e da Figura 11. Na Figura 12A estão representados os gráficos das patologias menores observadas no sêmen *in natura* e, nas Figuras 12B-D, os gráficos daquelas verificadas nos espermatozoides após o descongelamento.



**FIGURA 10.** Médias das patologias maiores (%) do sêmen de curimba. (A) Sêmen *in natura*. (B) Patologias maiores (total). (C) Cabeça degenerada. (D) Macrocefalia. Os traçados se referem ao erro padrão da média.



**FIGURA 11.** Médias das patologias maiores (%) do sêmen de curimba. (A) Cauda fortemente enrolada. (B) Cauda fraturada. (C) Cauda degenerada. (D) PID. Os traçados se referem ao erro padrão da média.



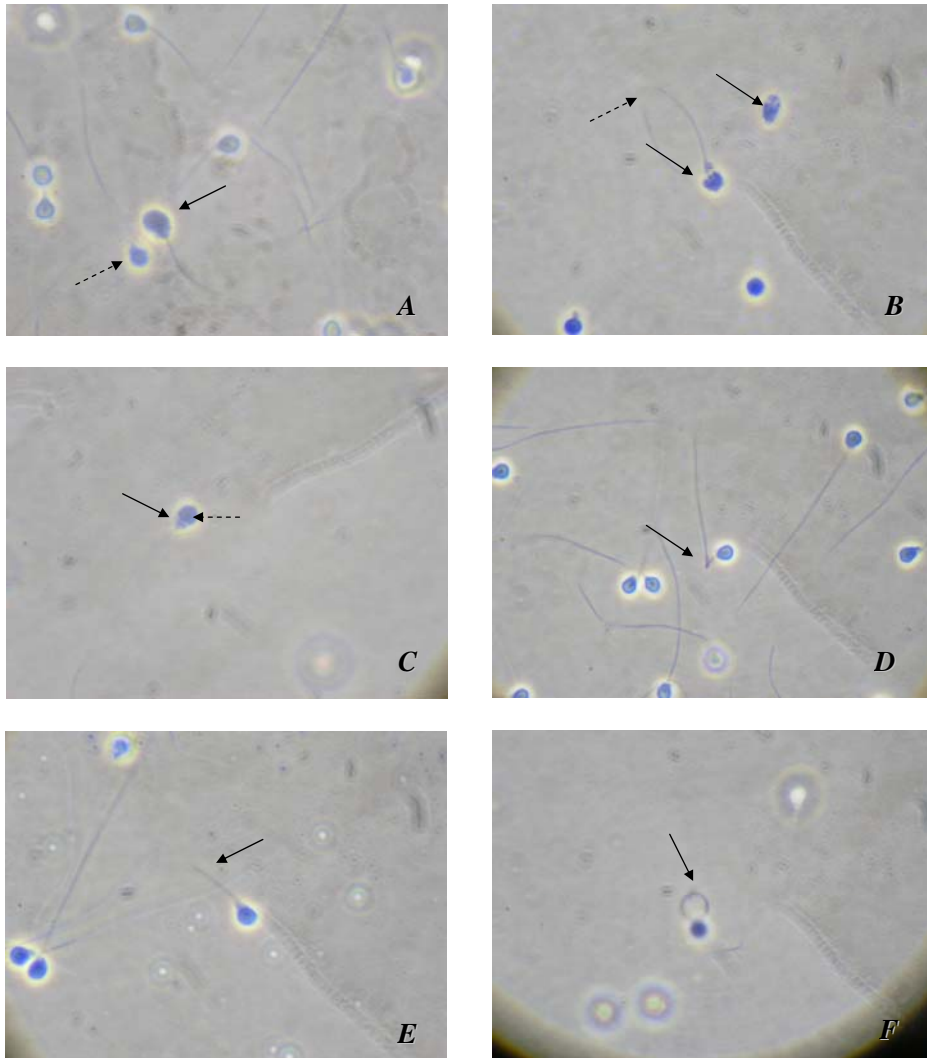
**FIGURA 12.** Médias das patologias menores (%) do sêmen de curimbatá. (A) Sêmen *in natura*. (B) Patologias menores (total). (C) Cabeça isolada. (D) Cauda dobrada. Os traçados se referem ao erro padrão da média.

Outras considerações podem ser feitas, observando-se os resultados médios das outras patologias apresentadas nos gráficos das Figuras 10, 11 e 12, levando-se em conta o segmento do espermatozóide afetado, as quais são descritas a seguir.

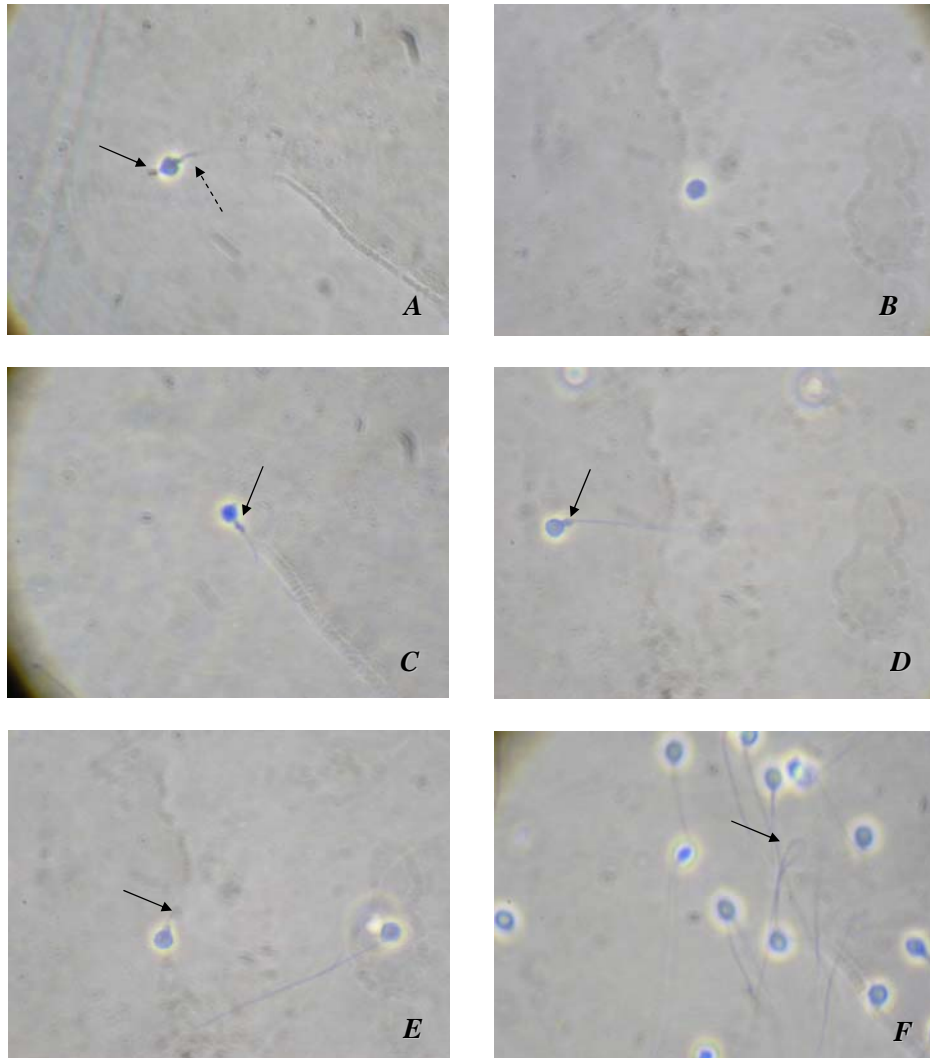
#### **a) Alterações de cabeça**

Como comentado anteriormente, a patologia de cabeça degenerada (Figuras 13A-C e 14A-B) apresentou a maior frequência entre todas as anormalidades espermáticas consideradas. A concentração de 10% dos crioprotetores testados promoveu as menores frequências de porcentagens de cabeça isolada normal (Figura 15A), com 0,89% (metanol) e 0,22% (DMSO). Esta patologia foi a mais freqüente (28,0%) entre as observadas por Kavamoto et al. (1999) no sêmen *in natura* de curimba. Segundo os autores, no momento da coleta, as células, possivelmente, se encontravam em uma fase de transição entre espermátides e espermatozóides. O reduzido percentual de cabeças isoladas, observado no gráfico da Figura 12C, reforça a hipótese de que os reprodutores se encontravam no ápice da estação reprodutiva.

Houve muita variação entre as concentrações de crioprotetores e as porcentagens de macrocefalia observadas, tendo o metanol promovido um índice mínimo de 0,11%, enquanto nenhuma das amostras acrescidas DMSO apresentou tal anormalidade. Atribui-se esta variação ao influxo de líquido para o citoplasma devido a uma possível hipotonicidade da solução de formol-citrato utilizada na fixação dos espermatozóides. Este efeito pode ser minimizado pelo tamponamento dessa solução fixadora e pela correção de sua isotonicidade.

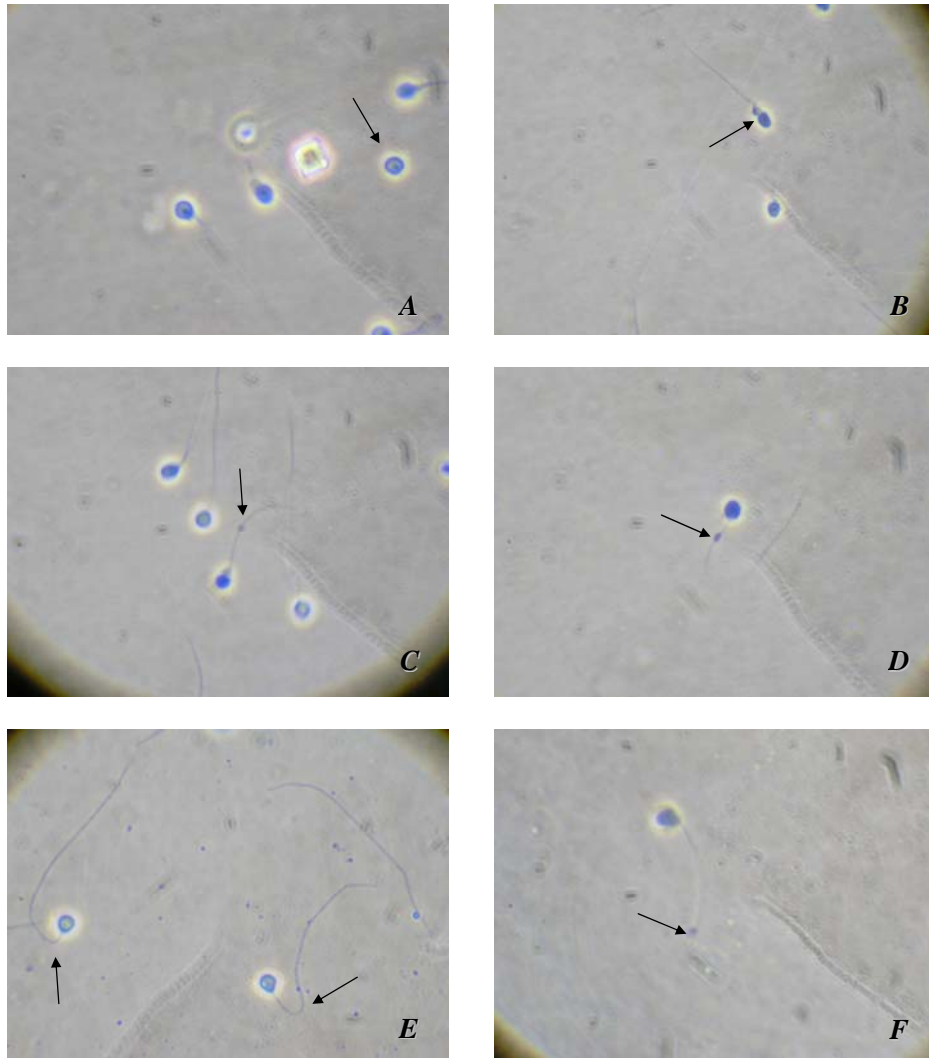


**FIGURA 13.** Patologias espermáticas maiores. *A.* Cabeças degeneradas; *B.* Cabeças degeneradas e cauda fortemente dobrada; *C.* Cabeça e peça intermediária degeneradas; *D.* Cauda fraturada; *E.* Cauda degenerada; *F.* Cauda fortemente enrolada.



**FIGURA 14.** Patologias espermáticas maiores. *A.* Cabeça com contorno anormal (degenerada) e peça intermediária degenerada (PID); *B.* Cabeça isolada com contorno anormal (degenerada); *C* e *D.* Peças intermediárias degeneradas; *E.* Cauda degenerada; *F.* Cauda fortemente enrolada.





**FIGURA 15.** Patologias espermáticas menores. *A.* Cabeça isolada e com contorno normal; *B.* Gota citoplasmática proximal; *C* e *D.* Gotas citoplasmáticas distais; *E.* Caudas dobradas; *F.* Cauda enrolada distalmente.

### **b) Alterações de peça intermediária - PID**

Com relação à ocorrência de PID (Figuras 13C, 14A, 14C e 14D), a elevação na concentração de crioprotetores de 5% para 10% promoveu redução média de 60% (de 4,67% para 1,89%) e de 28% (de 3,22% para 2,33%) nas amostras contendo metanol e DMSO, respectivamente. Esta patologia é, provavelmente, conseqüência da desestabilização das membranas lipoprotéicas das células espermáticas, sobretudo das mitocôndrias, por influência do congelamento. Este é o primeiro relato na literatura enfocando a ocorrência de PID em espermatozóides de peixes.

### **c) Alterações de cauda**

As concentrações mais baixas de crioprotetores promoveram as menores porcentagens de cauda degenerada (Figuras 13E e 14E), equivalendo a 0,56% para as amostras contendo metanol e não sendo verificada esta patologia nas amostras acrescidas de DMSO. De acordo com os dados apresentados no gráfico da Figura 11C, é possível inferir um efeito tóxico do metanol e do DMSO superior ao seu efeito protetor sobre esse tipo de patologia, apesar de os valores médios de ambos os crioprotetores em quaisquer concentrações não comprometerem o potencial fecundante de uma amostra seminal descongelada.

Contrariamente ao observado para a patologia de cauda degenerada, os crioprotetores, na concentração de 5%, propiciaram a maior ocorrência (7,22% e 4,67% para o metanol e para o DMSO, respectivamente) de cauda fortemente enrolada (Figuras 13F e 14F). Este comportamento corrobora o efeito protetor da adição de crioprotetores sobre a estabilidade da membrana citoplasmática do espermatozóide de curimba.

O metanol e o DMSO promoveram as menores porcentagens de cauda dobrada (Figuras 13B e 15E) na concentração de 10% (0,56%), à semelhança do que ocorreu para a patologia de cabeça isolada. As anormalidades morfológicas

da peça intermediária e da cauda causam alterações progressivas na motilidade, aumentando o número de espermatozoides com movimentos circulares ou oscilatórios e, conseqüentemente, a taxa de fertilização (Moraes et al., 2004). Estes autores não verificaram a ocorrência de gotas citoplasmáticas distais no sêmen *in natura* de curimba. As amostras seminais dos reprodutores utilizados neste trabalho apresentaram valores médios de gotas proximais (Figura 15B) e distais (Figuras 15 C e 15D) inferiores a 0,1%, após o descongelamento, e, mesmo o sêmen *in natura* apresentou elevada homogeneidade entre os animais, indicando que os mesmos se encontravam em um mesmo estágio de maturação gonadal.

Os valores médios de cauda fraturada (Figura 13D), bem como das demais patologias de cauda descritas, podem ser considerados reduzidos e incapazes de comprometer a qualidade de uma amostra seminal. Percentuais elevados de anormalidades, como cauda fraturada e cabeça isolada, podem estar relacionados ao procedimento de preparação de lâminas de esfregaços (Moraes et al., 2004). Estes autores, assim como Kavamoto et al. (1999), realizaram a análise morfológica do sêmen de curimba por meio da confecção de esfregaços corados, avaliando, assim, a ocorrência de patologias primárias ou secundárias no sêmen *in natura* e constatando elevada frequência dessas patologias. Estas alterações, em contrapartida, não devem ser classificadas em defeitos primários ou secundários, mas em maiores ou menores, uma vez que peixes são destituídos de epidídimos.

O procedimento de avaliação de sêmen de mamíferos envolve a análise morfológica dos espermatozoides e é considerada fundamental à caracterização das amostras seminais (Hafez, 2004; Herman et al., 1994). Todavia, os critérios utilizados para a avaliação do sêmen de peixes tem-se baseado em exames de motilidade, concentração espermática e percentagem de espermatozoides vivos e mortos, sem considerar a ocorrência de defeitos

morfológicos nas células espermáticas (Kavamoto et al., 1999), e os exames que abordam esse parâmetro após a criopreservação restringem-se, praticamente, a mudanças ultra-estruturais nos espermatozoides de peixes (Taddei et al., 2001; Yao et al., 2000).

#### 5.4 Capacidade de fertilização do sêmen descongelado

A análise estatística dos dados médios de fertilização não detectou diferença significativa entre os ativadores, nem interação significativa entre os crioprotetores e as concentrações testadas. Entretanto, observou-se maior ( $P < 0,05$ ) taxa de fertilização nas amostras acrescidas de metanol em relação àquelas amostras acrescidas de DMSO (em média, 53% maiores). Os resultados estão resumidos na Tabela 12.

**TABELA 12.** Médias de fertilização (%) do sêmen de curimba após o descongelamento.

Crioprotetores	Concentrações (% v:v)				Médias dos criop. <sup>1</sup>	Ativadores	
	5,0	7,5	10,0	12,5		Água	NaHCO <sub>3</sub>
Metanol	36,9	27,8	35,2	32,7	33,1 (4,2) <sup>A</sup>	45,5	19,8
DMSO	22,3	17,1	15,7	7,1	15,6 <sup>B</sup>	4,9	9,9
<b>Médias dos ativadores</b>						30,0	18,7
<b>Médias das concentrações</b>		29,6	22,4	25,4	20,0	24,4	

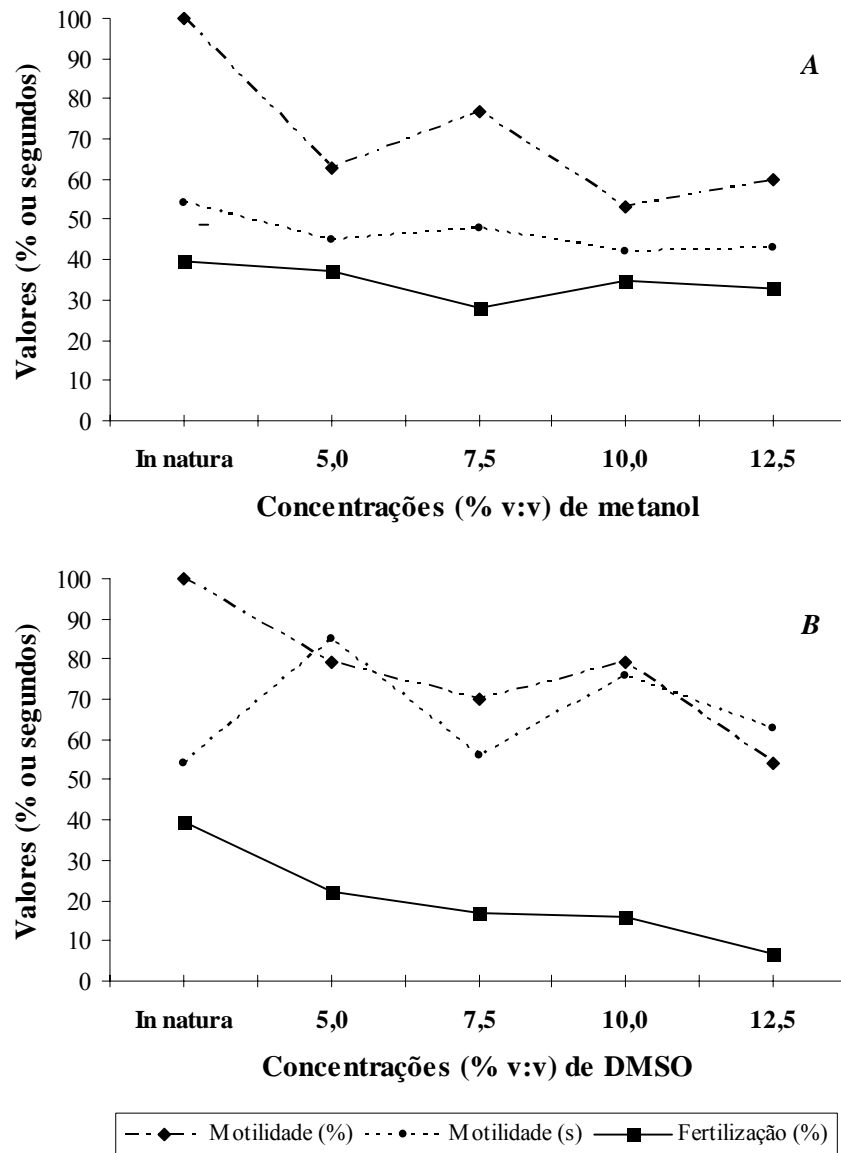
<sup>1</sup>Médias seguidas de letras distintas diferem entre si, pelo teste F ( $P < 0,01$ ). Valores entre parênteses referem-se ao erro padrão da média.

As taxas de motilidade espermática e as taxas de fertilização oscilaram pouco e, aparentemente, apresentaram uma relação direta entre si, sobretudo para as amostras acrescidas de DMSO. De acordo com os gráficos da Figura 16, o sêmen *in natura* apresentou taxa de fertilização reduzida em relação à taxa de motilidade, evidenciando, provavelmente, uma influência da qualidade dos oócitos sobre a fecundação e ou sobre o desenvolvimento embrionário inicial.

Comportamento semelhante, porém, menos acentuado, foi observado para as amostras descongeladas acrescidas de metanol. Uma vez que o metanol proporcionou as maiores durações médias da motilidade espermática pós-descongelamento (Figura 16B), pode-se supor que as taxas de fertilização também superiores sejam devido à prolongada capacidade de movimentação das células espermáticas, tendo em vista a maior probabilidade de penetração em micrópilas ainda patentes.

Segundo Cóser et al. (1987), as taxas de fertilização para o sêmen descongelado são, em geral, mais baixas que aquelas obtidas a partir do sêmen *in natura*. Assim, Kavamoto et al. (1989) já haviam obtido taxas de fertilização de 78% com o sêmen descongelado e 92% com o sêmen de curimba *in natura*, enquanto Cóser et al. (1992) obtiveram taxas de fertilização para o sêmen descongelado de curimatã-pacu (*Prochilodus marggravii*) de até 84% em relação àquela a partir de amostras de sêmen fresco.

Analisando os gráficos A e B da Figura 16 e, somando-se aos resultados controversos encontrados pelos diferentes autores supracitados, verifica-se uma influência significativa de fatores ambientais sobre a taxa de fertilização da curimba, sobretudo a qualidade dos oócitos utilizados, tendo em vista os excelentes resultados de motilidade espermática encontrados após o descongelamento.



**FIGURA 16.** Médias de motilidade (%), duração (segundos) e fertilização (%) do sêmen de curimba, antes e após o congelamento, acrescido de concentrações crescentes de (A) metanol e de (B) DMSO.

Silva (2000), em seu estudo de criopreservação do sêmen de curimba, obteve taxas de fertilização do sêmen *in natura* e descongelado semelhantes (49% e 56%, respectivamente), a exemplo do verificado no presente estudo, em que as taxas médias de fertilização do sêmen descongelado foram semelhantes às observadas para o sêmen *in natura* (40%), porém inferiores às das amostras em relação às fêmeas utilizadas (76%). Portanto, é possível inferir que houve manutenção da capacidade fertilizante do sêmen pós-congelamento e que a taxa de fertilização foi influenciada decisivamente pelas fêmeas utilizadas neste estudo.

As porcentagens reduzidas de patologias morfológicas observadas no sêmen após o descongelamento favoreceram a manutenção das taxas de fertilização do sêmen descongelado (em comparação às verificadas para o sêmen *in natura*). Embora o DMSO tenha promovido um menor índice de patologias totais, as porcentagens observadas nas amostras acrescidas de metanol foram também reduzidas e não influenciaram a taxa de fertilização, tendo em vista o efeito compensatório promovido pela elevada relação entre espermatozóides e oócitos.

A taxa de fertilização é uma variável muito importante na avaliação de protocolos reprodutivos em peixes, porém, torna-se ideal a realização de estudos relacionando também a eclodibilidade e a taxa de sobrevivência de larvas oriundas da fertilização de oócitos por células espermáticas criopreservadas. Oliveira (2006) constatou taxas de eclosão semelhantes entre oócitos fertilizados por sêmen de dourado *in natura* e criopreservado. O autor não avaliou, contudo, o percentual de sobrevivência das larvas eclodidas ou o percentual de larvas com alterações físicas. Além da redução na taxa de eclosão, as anormalidades morfológicas dos espermatozóides poderiam propiciar o aparecimento de alterações estruturais de larvas recém-eclodidas, comprometendo sua sobrevivência.

Silveira (2000) propôs um efeito tóxico do  $\text{NaHCO}_3$  sobre os oócitos de *B. cephalus*. Isso não foi verificado no presente trabalho, uma vez que não foi detectada diferença significativa entre os ativadores testados. A aglutinação dos oócitos no fundo do recipiente provocada pelo  $\text{NaHCO}_3$  1% não comprometeu a qualidade da fertilização, sendo desfeita, no presente estudo, pela homogeneização mais severa do precipitado. Cruz (2001) concluiu que, além de atóxico, o  $\text{NaHCO}_3$  proporcionou taxas de fertilização do sêmen de curimba superiores às das amostras ativadas por água destilada, água corrente e soluções salinas de  $\text{NaCl}$ . Estes resultados, provavelmente, se devem à maior proporção de espermatozoides móveis e ou à maior duração da motilidade espermática proporcionada pela solução de  $\text{NaHCO}_3$ .



## **6 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A definição da metodologia ideal de criopreservação deve envolver a utilização de amostras de sêmen descongeladas na rotina das estações de piscicultura, propiciando a obtenção de dados zootécnicos com elevado número de repetições em uma mesma época reprodutiva e entre diferentes épocas. Decerto, as condições de cada estação de piscicultura estabelecem uma interação entre a unidade produtiva e a biotecnologia empregada na criopreservação seminal.

O conhecimento do número de patologias totais, bem como das proporções ideais de espermatozóides vivos e mortos e de espermatozóides por oócito, representará um importante avanço rumo ao conhecimento e ao estabelecimento de doses mínimas de amostras de sêmen capazes de produzir taxas de fertilização, eclodibilidade e sobrevivência de larvas satisfatórias e com elevada repetibilidade.

Seguindo o exemplo da comercialização de doses inseminantes de valiosos reprodutores de algumas espécies de mamíferos, a determinação de “doses fertilizantes” de sêmen de peixes com elevada qualidade pode originar um novo tipo de mercado e representar um profundo incremento no melhoramento genético de espécies criadas intensivamente.

## 7 CONCLUSÕES

Sob as condições em que este experimento foi realizado, pode-se concluir que:

- o protocolo de criopreservação do sêmen de curimba deve envolver a utilização de dimetilsulfóxido, na concentração de 8,5%, como solução crioprotetora;
- o  $\text{NaHCO}_3$  1% deve ser utilizado como solução ativadora da motilidade dos espermatozoides de curimba após o descongelamento;
- a taxa de fertilização não deve ser considerada isoladamente na caracterização da qualidade pós-congelamento do sêmen de peixes;
- podem ser utilizadas tanto a escala porcentual como a quantitativa na valorização da motilidade do sêmen de peixes.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDRINO, A. C.; PHAN, M. T.; PINHEIRO, E. F. G. Caracterização macroscópica e microscópica das gônadas do curimbatá *Prochilodus scrofa*, (Steindachner, 1881) durante o ciclo reprodutivo. **Boletim de zoologia da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 9, p. 159-75, 1985.
- AMORIM, V. M. C. **Criopreservação de sêmen de tilápia-nilótica (*Oreochromis niloticus*), variedade chitralada**. 2002, 64 p. Dissertação (Mestrado em Zoologia) - Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- AOKI, K.; OKAMOTO, M.; TATSUMI, K.; ISHIKAWA, Y. Cryopreservation of medaka spermatozoa. **Zoological Science**, Tokyo, v. 14, n. 4, p. 641-644, Aug. 1997.
- BEDORE, A. G. **Características 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. Artificial insemination in fish. In: LAMING, G. E. (Org.). **Marshall's physiology of reproduction**. 4. ed. Endinburg, London, Melbourne and New York: Churchill Livingstone, 1990. Chap. 9, p. 870-887.
- BILLARD, R. Ultrastructure of trout spermatozoa: changes after dilution and deep-freezing. **Cell Tissue Research**, New York, v. 228, n. 2, p. 205-218, 1983.
- 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.
- BILLARD, R.; COSSON, J.; LAURENCE, W. C. Motility and aged halibut sperm. **Aquatic Living Resources**, Monteuge, v. 6, n. 1, p. 67-75, 1993.
- BILLARD, R.; COSSON, J.; PERCHEC, J.; LINHART, O. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 29, n. 1/4, p. 95-112, Jan. 1995.
- BILLARD, R.; DUPON, J.; BARNABE, G. Diminution de la motilité et de la durée de conservation du sperme de *Dicentrarchus labrax* L. (poisson

téléosteen) pendant la période de spermiation. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 11, n. 4, p. 363-367, 1977.

BILLARD, R.; TAKASHIMA, F. Resorption of spermatozoa in the sperm duct of rainbow trout during the post-spawning period. **Bulletin Japanese Society Scientific Fisheries**, Tokyo, v. 49, n. 3, p. 387-392, 1983.

BOITANO, S.; OMOTO, C. K. Trout sperm swimming patterns: role of intracellular  $Ca^{2+}$ . **Cell Motility and the Cytoskeleton**, New York, v. 21, n. 1, p. 74-82, 1992.

BONETTO, A. A. Austral rivers of South America. In: MARGALEF, R. (Ed.). **Limnology now: a paradigm of planetary problems**. New York: Elsevier Science, 1994. p. 425-472.

BORGES FILHO, O. F. **Caracterização dos estádios de maturação e correlação com avaliações histoquímico-enzimáticas e ultraestruturais das células endócrinas testiculares, durante o ciclo reprodutivo de *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881**. 1987. 234 p. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, São Paulo.

BRASIL. Ministério Do Meio Ambiente. Instituto Brasileiro Do Meio Ambiente E Dos Recursos Naturais Renováveis. **Estatística da Pesca 2004: Grandes regiões e Unidades da Federação**. Brasília, 2005. 136 p.

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

CAROLSFELD, J.; HARVEY, B. **Conservação de recursos energéticos de peixes: teoria e prática**. Curso de treinamento Brasileiro. Victoria, Canadá: World Fisheries Trust, 1999.

CAROLSFELD, J.; HARVEY, B.; BAER, A. (Ed.). **Migratory fishes of South America: biology, social importance and conservation status**. New York: World Bank and Ottawa, 2003a. IDRC (in press).

CERQUEIRA, C. C. C.; FERNANDES, M. N. Gill tissue recovery after copper exposure and blood parameter responses in the tropical fish *Prochilodus scrofa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, v. 52, n. 2, p. 83-91, June 2002.

CHAO, N. H. **Fish sperm cryopreservation in Taiwan: technology advancement and extension efforts.** Taiwan: Department of Aquaculture, Taiwan Fishery Research Institute, 1991. p. 31. (Paper on International Symposium on Reproductive Biology in Aquaculture).

CHENOWETH, P. J. Genetic sperm defects. **Theriogenology**, New York, v. 64, n. 3, p. 457-468, Aug. 2005.

CHRIST, S. A.; TOTH, G. P.; MCCARTHY, H. W.; TORSELLA, J. A.; SMITH, M. K. Monthly variations in sperm motility in common carp assessed using computer-assisted sperm analysis (CASA). **Journal of Fish Biology**, London, v. 48, n. 6, p. 1210-1222, June 1996.

CIERESZKO, A.; DABROWSKI, K. Relationship between biochemical constituents of fish semen and fertility: the effect of short-term storage. **Fish Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 12, n. 5, p. 357-367, 1994.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL - CBRA. **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, p. 387-390, 1984.

CÓSER, A. M. L.; GODINHO, H.; SATO, Y.; CARDOSO, E. L. Capacidade de Fertilização do semen de *Prochilodus marggravii* (curimatã-pacu) congelados sob forma de "pellets". In: ENCONTRO ANNUAL DE AQUICULTURA, 10., 1992, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte, 1992. p. 56-59.

CÓSER, A. M. L.; GODINHO, H.; TORQUATO, V. C. Criopreservação do sêmen do peixe piau *Leporinus silvestrii* (Boulanger, 1902). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 39, n. 1, p. 37-42, fev. 1987.

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

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

CRUZ, V. L. B. **Criopreservação de sêmen de curimatá (*Prochilodus lineatus =scrofa*) (Characiformes, Prochilodontidae)**. 2001. 59 p. Dissertação (Mestrado em Zoologia) - Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Da SILVA, M. E. F.; SILVA, J. A.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J. C.; MEIRELLES, N. C. A new method to purify hepatic CYP1A of *Prochilodus scrofa*, a Brazilian freshwater fish. **Comparative Biochemistry and Physiology, C Toxicology & Pharmacology**, New York, v. 138, p. 67-74, May 2004.

FERREIRA, D. F. **Sistema de Análise de Variância (Sisvar)**. ver 4.6 (Build 61). Lavras: UFLA. Departamento de Ciências Exatas da UFLA, 2004.

FAUVEL, C.; SAVOYE, O.; DREANNO, C.; COSSON, J.; SUQUET, M. Characteristics of sperm of captive seabass in relation to its fertilization potential. **Journal of fish Biology**, London, v. 54, n. 2, p. 356-369, Feb. 1999.

FOGLI DA SILVEIRA, W. F.; KAVAMOTO, E. T.; CESTAROLLI, M. A.; GODINHO, H. P.; RAMOS, S. M.; SILVEIRA, A. N. Avaliação espermática, preservação criogênica e fertilidade do sêmen do pacu, *Piaractus mesopotamicus* (HOLMBERG, 1887), proveniente de reprodução induzida. **Boletim Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 17, p. 1-13, 1990. Único.

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

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 4°C. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 26, n. 3, p. 213-215, jul./set. 2002.

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

GWO, J. Ultrastructural study of osmolality effect on spermatozoa of three marine teleosts. **Tissue & Cell**, Edinburgh, v. 27, n. 5, p. 491-497, Oct. 1995.

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

HARVEY, B. Cryopreservation of *Sarotherodon mossambicus* spermatozoa. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 32, p. 313-320, 1983.

HARVEY, B.; CAROLSFELD, J. Preservation of sperm. In: HARVEY, B.; CAROLSFELD, J. (Ed.) **Induced breeding in tropical fish culture**. Ottawa, Ontario: International Development Research Centre, 1993. Chap. 7, p. 119-130.

HARVEY, B.; KELLEY, R. N. Chilled storage of *Sarotherodon mossambicus* milt. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 36, p. 85-95, 1984.

HARVEY, B. J.; KELLEY, R. N. Practical methods for chilled and frozen storage of tilapia spermatozoa. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TILAPIA IN AQUACULTURE, 2., 1988, Bangkok, Manila. **Proceeding...** Bangkok: Departament of fisheries, and International Center for Living Aquatic Resources Management, 1988. p. 623.

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

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

HORVÁTH, Á.; URBÁNYI, B. The effect of cryoprotectants on the motility and fertilizing capacity of cryopreserved African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell 1822) sperm. **Aquaculture Research**, Oxford, v.31, n. 3, p.317-324, Mar. 2000.

JAMIESON, B. G. M. **Fish evolution and systematics: evidence from spermatozoa**. Cambridge: Cambridge University Press, 1991. 139 p.

JAMIESON, B. G. M.; LEUNG, L. K. P. Introduction to fish spermatozoa and the micropyle. In: JAMIESON, B. G. M. (Ed.) **Fish evolution and systematics: evidence from spermatozoa**. Cambridge: Cambridge University Press, 1991. Cap. 5, p. 56-72.

JANVIER, P. Catching the first fish. **Nature**, London, v. 402, n. 6758, p. 21-22, Nov. 1999.

JEPSEN, D. B.; WINEMILLER, K. O.; TAPHORN, D. C. Temporal patterns of resource partitioning among *Cichla* species in a Venezuelan blackwater river. **Journal of Fish Biology**, London, v. 51, n. 6, p. 1085-1108, Dec. 1997.

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

KAVAMOTO, E. T.; FOGLI DA SILVEIRA, W.; GODINHO, H. M.; ROMAGOSA, E. Fertilização em *Prochilodus scrofa*, Steinndacher, 1882, com sêmen criopreservado em nitrogênio líquido. In: CONGRESSO PAULISTA DE MEDICINA VETERINÁRIA, 1.; CONFERÊNCIA ANUAL DA SPMV, 44., 1989, São Paulo. **Resumo...** São Paulo: SPMV, 1989. p. 83.

KIME, D. E.; EBRAHIMI, M.; NYSTEN, K.; ROELANTS, I.; RURANGWA, E.; MOORE, H.; OLLEVIER, F. Use of computer assisted sperm analysis (CASA) for monitoring the effects of pollution on sperm quality of fish; application to the effects of heavy metals. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 36, n. 3/4, p. 223-237, Dec. 1996.

KUROKURA, H.; HIRANO, R.; TOMITA, M.; IWAHASHI, M. Cryopreservation of carp sperm. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 31, n. 3, p. 245-258, 1984.

LAHNSTEINER, F.; PATZNER, R. A.; WEISMANN, T. Energy resources of spermatozoa of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Pisces, Teleostei). **Reproduction Nutrition Development**, Paris, v. 33, n. 4, p. 349-360, 1993.

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

LAHNSTEINER, F.; BERGER, B.; WEISMANN, T.; PATZNER, R. A. Sperm structure and motility of the freshwater teleost *Cottus gobio*. **Journal of Fish Biology**, London, v. 50, n. 3, p. 564-574, Mar. 1997.



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

LEGENDRE, M.; LINHART, O.; BILLARD, R. Spawning and management of gametes, fertilized eggs and embryos in Siluroidei. **Aquatic Living Resources**, Montrouge, v. 9, p. 59-80, 1996. Especial.

LEUNG, L. K. P. Principles of biological cryopreservation. In: JAMIESON, B. G. M. (Ed.). **Fish evolution and systematics: evidence from spermatozoa**. Cambridge University Press, Cambridge, 1991. Cap. 19, p. 230-244.

LEUNG, L. K. P.; JAMIESON, B. G. M. Live preservation of fish gametes. In: JAMIESON, B. G. M. (Ed.). **Fish evolution and systematics: evidence from spermatozoa**. Cambridge: Cambridge University Press, 1991. Cap. 20, p. 245-295.

LOGATO, P. V. R. **Nutrição e alimentação de peixes de água doce**. Viçosa: Aprenda Fácil, 2000. 128 p.

MAGGESE, M. C.; CUKIER, M.; CUSSAC, V. E. Morphological changes, fertilizing ability and motility of *Rhamdia sapo* (Pisces, Pimelodidae) sperm induced by media of different salinities. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 44, n. 4, p. 541-546, dez. 1984.

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, Sept./Dec. 1999.

MARIA, A. N. **Diluidores e crioprotetores no resfriamento e congelamento do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)**. 2005. 73 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras. Lavras, MG.

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). **Ciências e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 1, p. 191-195, jan./fev. 2004.

- MARQUES, S. **Preservação a curto prazo do sêmen de Teleósteos Neotropicais de água doce**. 2001. 83 p. Dissertação (Mestrado em Zoologia) - Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- MARTINEZ, C. B. R.; NAGAE, M. Y.; ZAIA, C. T. B. V.; ZAIA, D. A. M. Morphological and physiological acute effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Brazilian Journal of Biology**, Rio de Janeiro, v. 64, n. 4, p. 797-807, Nov. 2004.
- MAZON, A.; FERNANDES, M. N. Toxicity and differential tissue accumulation of copper in the tropical freshwater fish *P. scrofa* (Prochilodontidae). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 63, n. 6, p. 794-804, Dec. 1999.
- MEDEIROS, C. M. O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A. T. D.; RODRIGUES, J. L. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, Woburn, v. 57, n.1, p. 327-344, Jan. 2002.
- MILIORINI, A. B.; MURGAS, L. D. S.; PEREIRA, G. J. M. Taxas de fertilização do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) após congelamento. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16., 2005, Goiânia, Goiás. **Resumos...** Goiânia, Goiás: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2005.
- MILIORINI, A. B.; MURGAS, L. D. S.; VIVEIROS, A. T. M.; FRANCISCATTO, R. T.; SILVA, M. O. B.; MARIA, A. N. Resfriamento do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) à 4°C, utilizando diferentes concentrações de dimetilsulfóxido. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 26, n. 3, p. 209-211, jul./set. 2002.
- MILIORINI, A. B.; MURGAS, L. D. S.; VIVEIROS, A. T. M.; MARIA, A. N.; OLIVEIRA, A. V.; ORFÃO, L. H. The effects of cryoprotectants and activators on sperm motility of curimba (*Prochilodus lineatus*). In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION-ICAR, 15., 2004, Porto Seguro, Bahia, Brasil **Abstracts...** Porto Seguro, Bahia, Brazil: Brazil College of Animal Reproduction/ ICAR, 2004. Abst. 523.
- MINS, S. D.; TSVETKOVA, L. I.; BROWN, G. G. Cryopreservation of sperm of sturgeon and paddlefish. In: TIERSCH, T. R.; MAZIK, P. M. (Ed.) **Cryopreservation in Aquatic Species**. Louisiana: World Aquaculture Society, Baton Rouge, 2000. p.123-129.

MORAES, G. F. **Resfriamento e congelamento do sêmen de piau-açú (*Leporinus macrocephalus*)**. 2004. 68 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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

MORISAWA, M.; ODA, S.; YOSHIDA, M.; TAKAI, H. Transmembrane signal transduction for the regulation of sperm motility in fishes and ascidians. In: GAGNON, C. (Ed.) **The male gamete: from basic knowledge to clinical applications**. Vienna. USA: CACHE River Press, 1999. p. 149-160.

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

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

MURGAS, L. D. S.; GUALHANONE, A.; SILVA, M. O. B.; MELLO, C. B.; FREITAS, R. T. F.; ZANGERÔNIMO, M. G. Calidad seminal del pez piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) post-descongelación. **Revista Anales de Veterinária**, Murcia, v. 17, n. 1, p. 3-10, 2001a.

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

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

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, Goiás, Brasil. **Anais...** Jaboticabal, São Paulo, Brasil: Associação Brasileira de Aqüicultura e Biologia Aquática/AQUABIO, 2003b.

MURGAS, L. D. S.; SELLÉS, E.; GADEA, J.; RUIZ, S. Crioconservación espermática en la espécie porcina: estudio de dos sistemas de congelación con semen heterospermico. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 10., 2001, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: ABRAVES, 2001b.

MURGAS, L. D. S.; SILVA, M. O. B.; MELLO, C. B. M.; SANTANA, G. M.; KABEYA, D. M. Características seminais de curimbas (*Prochilodus lineatus*) capturadas no rio Grande e pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: RESUMOS DO AQUICULTURA BRASIL'98. Recife. p. 274.

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

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

OLIVEIRA, A. V. **Resfriamento e criopreservação do sêmen de dourado *Salminus maxillosus* e de pirapitinga *Brycon nattereri***. 2006. 94 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PERCHEC-POUPARD, G.; COSSON, J.; ANDRÉ, F.; BILLARD, R. La motilité des spermatozoids de truite (*Oncorhynchus mykiss*) et de carpe (*Cyprinus carpio*). **Journal of Applied Ichthyology**, Berlin, v. 9, n. 3/4, p. 129-149, Nov. 1993.

PERCHEC-POUPARD, G.; GATTI, J. L.; COSSON, J.; JEULIN, C.; FIERVILLE, F.; BILLARD, R. Effects of extracellular environment on the osmotic signal transduction involved in activation of motility of carp spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 110, n. 2, p. 315-327, July 1997.

PIIRONEN, J.; HYVÄRINEN, H. Composition of the milt of some teleost fishes. **Journal of Fish Biology**, London, v. 22, n. 3, p. 351-361, 1983.

POOLE, W. R.; DILLANE, M. G. Estimation of sperm concentration of wild and reconditioned brown trout, *Salmo trutta* L. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 29, n. 6, p. 439-445, June 1998.

RANA, K. Preservation of gametes. In: BROMAGE, N. R.; ROBERTS, R. J. (Ed.). **Broodstock management and egg and larval quality**. London: Blackwell Science, 1995. p. 53-75.

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

RANG, H. P; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. 692 p.

RAVINDER, K.; NASARUNDDIN, K.; MAJUMDAR, K. C.; SHIVAJI, S. Computerized analysis of motility, motility patterns and motility parameters of spermatozoa of carp following short-term storage of semen. **Journal of Fish Biology**, London, v. 50, n. 6, p. 1309-1328, June 1997.

REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS Jr., C. J. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. 742 p.

RIBEIRO, R. I. M. A.; GODINHO, H. P. Criopreservação do semen Testicular do teleosteo “piauí-açu” *Leporinus macrocephalus*. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 55, n. 1, p. 75-79, fev. 2003.

RITAR, A. J. Artificial insemination with cryopreserved semen from striped trumpeter (*Latris lineate*). **Aquaculture Research**, Amsterdam, v. 180, n. 1/2, p. 177-187, Oct. 1999.

RURANGWA, E.; ROELANIS, L.; HUYSKENS, G.; EBR5AHIMI, M.; KIME, D. E.; OLLEVIER, F. The minimum effective spermatozoa:egg ratio for artificial insemination and the effects of mercury on sperm motility and fertilization ability in *Clarias gariepinus*. **Journal of Fish Biology**, London, v. 53, n. 2, p. 402-413, Aug. 1998.

SAS. SAS/STAT Software. **Guide for personal computers**. Cary, New York, 1995.

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

SERRALHEIRO, P. C. S.; FOGLI DA SILVEIRA, W.; GODINHO, H.; OLIVEIRA, I. R. O uso de três soluções diluidoras em sêmen de tainha - *Mugil platanus*, Gunther, 1880, resfriado em container de vapor de nitrogênio. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE ICTIOLOGIA, 13., 1999, São Carlos. **Anais...** São Carlos, 1999. p. 508.

SCHÜLTZ, J. H. **Avaliação de diferentes tipos de alimentos e fotoperíodos no crescimento e sobrevivência de pós-larvas de dourado, *Salminus brasiliensis* (Pisces, Characidae)**. 2003. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) - Universidade Federal de Santa Catarina. Departamento de Aqüicultura, Florianópolis.

SILVA, E. B. **Avaliação comparativa da utilização do sêmen criopreservado e fresco na fertilização dos óvulos de curimatã *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836)**. 2000. 49 p. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis.

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

SIMEONE, F. P. **Cryopreservation manual**. New York: Nalge Nunc International Corporation, 1998. p. 8.

STOSS, J. Fish gamete preservation and spermatozoa physiology. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J.; DONALDSON, E. M. (Ed.). **Fish physiology**. London: B. Academic Press, 1983. v. 9, cap. 6, p. 305-350.

SVERLIJ, S.; ROS, A.; ORTI, G. Sinopsis de los datos biológicos y pesqueros del Sabalo *Prochilodus lineatus*. **FAO Sinopsis sobre la pesca**, Rome, v. 154, p. 1-64, 1993.

TADDEI, A. R.; BARBATO, F.; ABELLI, L.; CANESE, S.; MORETTI, F.; RANA, K. J.; FAUSTO, A. M.; MAZZINI, M. Is cryopreservation a homogeneous process? Ultrastructure and motility of untreated, prefreezing, and postthawed spermatozoa of *Diplodus puntazzo* (Cetti). **Cryobiology**, San Diego, v. 42, n. 4, p. 244-255, June 2001.

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

VEGA-ÓRELLANA, O. M.; FRACALOSSO, D. M.; SUGAI, J. K. Dourado (*Salminus brasiliensis*) larviculture: weaning and ontogenic development of digestive proteinases. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 252, n. 2/4, p. 484-493, Mar. 2006.

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

YAO, Z.; CRIM, L. W.; RICHARDSON, G. F.; EMERSON, C. J. Motility, fertility and ultrastructural changes of ocean pout (*Macrozoarces americanus* L.) sperm after cryopreservation. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 181, n. 3/4, p. 361-375, Jan. 2000.

WAYMAN, W. R.; THOMAS, R. G.; TIERSCH, T. R. Refrigerated storage and cryopreserved sperm of red drum, *Sciaenops ocellatus* L. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 29, n. 4, p. 267-273, Apr. 1998.

WINEMILLER, K. O. Factors driving spatial and temporal variation in aquatic floodplain food webs. In: POLIS, F. A.; WINEMILLER, K. O. (Ed.). **Food webs: integration of patterns and dynamics**. New York: Chapman and Hall, 1996. p. 298-312.

## ANEXOS

ANEXO A		Página
<b>TABELA 1A</b>	Taxa e duração da motilidade e concentração do sêmen <i>in natura</i> dos reprodutores de curimba utilizados na avaliação da toxicidade de soluções crioprotetoras e no descongelamento.....	92
<b>TABELA 2A</b>	Taxa e duração da motilidade e concentração do sêmen <i>in natura</i> dos reprodutores de curimba utilizados na análise morfológica após o descongelamento.....	92
ANEXO B		
<b>TABELA 1B</b>	Análise de variância do efeito da adição de diferentes soluções crioprotetoras sobre a motilidade (%) espermática (variável transformada em $\log_{10}x$ ).....	93
<b>TABELA 2B</b>	Análise de regressão do efeito das diferentes concentrações de crioprotetores sobre a motilidade (%) espermática (variável transformada em $\log_{10}x$ ).....	93
<b>TABELA 3B</b>	Análise de variância do efeito da adição das diferentes soluções crioprotetoras sobre a duração (segundos) da motilidade espermática (variável transformada em $\log_{10}x$ )..	94
<b>TABELA 4B</b>	Análise de variância do efeito do congelamento sobre a motilidade (%) espermática.....	94
<b>TABELA 5B</b>	Análise de regressão do efeito das diferentes concentrações de soluções crioprotetoras sobre a motilidade (%) do sêmen descongelado.....	95
<b>TABELA 6B</b>	Análise de variância do efeito do congelamento sobre a motilidade (0-5) espermática.....	95
<b>TABELA 7B</b>	Análise de regressão do efeito das diferentes concentrações de soluções crioprotetoras sobre a motilidade (0-5) do sêmen descongelado.....	95



**TABELA 8B** Análise de variância do efeito do congelamento sobre a duração (segundos) da motilidade (variável transformada em  $\log_{10}x$ )..... 96

**TABELA 9B** Análise de regressão do efeito das diferentes concentrações de DMSO sobre a duração (segundos) da motilidade do sêmen descongelado (variável transformada em  $\log_{10}x$ )..... 96

**TABELA 10B** Análise de regressão do efeito das diferentes concentrações de metanol sobre a duração (segundos) da motilidade do sêmen descongelado (variável transformada em  $\log_{10}x$ )..... 96

**ANEXO C**

**TABELA 1C** Análise de variância do efeito do congelamento sobre as patologias totais (%) observadas nos espermatozoides..... 97

**TABELA 2C** Análise de regressão do efeito das concentrações de soluções crioprotetoras sobre as patologias totais (%) observadas nos espermatozoides..... 97

**TABELA 3C** Análise de variância do efeito do congelamento sobre as patologias menores (%) observadas nos espermatozoides.... 97

**TABELA 4C** Análise de variância do efeito do congelamento sobre as patologias maiores (%) observadas nos espermatozoides..... 98

**TABELA 5C** Análise de variância do efeito do congelamento sobre a patologia de cauda enrolada (%) observada nos espermatozoides..... 98

**TABELA 6C** Análise de variância do efeito do congelamento sobre a patologia de cauda degenerada (%) observada nos espermatozoides..... 98

**ANEXO D**

**TABELA 1D** Análise de variância do efeito do congelamento sobre a fertilização (%) do sêmen de curimba..... 99

## ANEXO A

**TABELA 1A.** Taxa e duração da motilidade e concentração do sêmen *in natura* dos reprodutores de curimba utilizados na avaliação da toxicidade de soluções crioprotetoras e no descongelamento.

Blocos	Peso (g)	Taxa (%)	Duração (s)	Concentração (x 10 <sup>9</sup> sptz ml <sup>-1</sup> )
1	700	100	47	27,0
	700	100	57	47,5
2	1500	100	40	34,0
	1500	100	70	41,0
3	1600	100	55	38,0
	1700	100	47	14,5
4	2000	100	55	20,0
	2000	100	66	28,5
<b>Média ± dp</b>	1463 ± 509	100 ± 0	54 ± 10	31,3 ± 10,9

dp: desvio padrão.

**TABELA 2A.** Taxa e duração da motilidade e concentração do sêmen *in natura* dos reprodutores de curimba utilizados na análise morfológica após o descongelamento.

Blocos	Peso (g)	Taxa (%)	Duração (s)	Concentração (x 10 <sup>9</sup> sptz ml <sup>-1</sup> )
1	600	100	68	70,0
	700	100	47	27,0
	700	100	57	47,5
2	1500	100	40	34,0
	1600	100	55	38,0
	1700	100	47	14,5
3	1900	100	47	56,0
	2000	100	55	20,0
	2000	100	66	28,5
<b>Média ± dp</b>	1411 ± 584	100 ± 0	57 ± 9	37,3 ± 17,8

dp: desvio padrão.

## ANEXO B

**TABELA 1B.** Análise de variância do efeito da adição de diferentes soluções crioprotetoras sobre a motilidade (%) espermática (variável transformada em  $\log_{10}X$ ).

<b>Causas de variação</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Quadrado médio</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
BLOCO	3	0,00992	0,0453
CRIOPROTETOR (C)	1	0,00676	0,1721
CONCENTRAÇÃO (N)	3	0,01006	0,0431
ATIVADOR (A)	1	0,00007	0,8900
C*N	3	0,00140	0,7600
C*A	1	0,03168	0,0036
C / Água destilada	(1)	0,00449	0,2652
C / NaHCO <sub>3</sub> 1%	(1)	0,03414	0,0026
A / Metanol	(1)	0,01692	0,0319
A / DMSO	(1)	0,01478	0,0447
N*A	3	0,00191	0,6601
C*N*A	3	0,00446	0,2968
Resíduo	102	0,00358	
CV (%)	3,1		

**TABELA 2B.** Análise de regressão do efeito das diferentes concentrações de crioprotetores sobre a motilidade (%) espermática (variável transformada em  $\log_{10}X$ ).

<b>Causas de variação</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Quadrado médio</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
b1	1	0,01268	0,0620
b2	1	0,01890	0,0230
Desvio	1	0,00046	0,7210
Resíduo	102	0,00357	

**TABELA 3B.** Análise de variância do efeito da adição das diferentes soluções crioprotetoras sobre a duração (segundos) da motilidade espermática (variável transformada em  $\log_{10}x$ ).

<b>Causas de variação</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Quadrado médio</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
BLOCO	3	0,20404	0,0848
CRIOPROTETOR (C)	1	0,07002	0,3797
CONCENTRAÇÃO (N)	3	0,08102	0,4437
ATIVADOR (A)	1	7,52600	0,0000
C*N	3	0,01748	0,9005
C*A	1	0,39294	0,0390
C / Água destilada	(1)	0,06561	0,3951
C / NaHCO <sub>3</sub> 1%	(1)	0,39734	0,0379
A / Metanol	(1)	2,23980	0,0000
A / DMSO	(1)	5,67913	0,0000
N*A	3	0,06596	0,5346
C*N*A	3	0,07120	0,5014
Resíduo	109	0,09001	
CV (%)	16,3		

**TABELA 4B.** Análise de variância do efeito do congelamento sobre a motilidade (%) espermática.

<b>Causas de variação</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Quadrado médio</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
BLOCO	3	1151,23698	0,0029
CRIOPROTETOR (C)	1	2320,50781	0,0020
CONCENTRAÇÃO (N)	3	869,98698	0,0132
ATIVADOR (A)	1	6398,63281	0,0000
C*N	3	146,02865	0,5980
C*A	1	508,00781	0,1421
N*A	3	402,27865	0,1648
C*N*A	3	144,98698	0,6009
Resíduo	109	232,33407	
CV (%)	20,9		

**TABELA 5B.** Análise de regressão do efeito das diferentes concentrações de soluções crioprotetoras sobre a motilidade (%) do sêmen descongelado.

<b>Causas de variação</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Quadrado médio</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
b1	1	3,16406	0,9070
b2	1	2072,07031	0,0030
Desvio	1	534,72656	0,1320
Resíduo	109	232,33407	

**TABELA 6B.** Análise de variância do efeito do congelamento sobre a motilidade (0-5) espermática.

<b>Causas de variação</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Quadrado médio</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
BLOCO	3	2,71875	0,0120
CRIOPROTETOR (C)	1	3,78125	0,0231
CONCENTRAÇÃO (N)	3	2,51042	0,0174
ATIVADOR (A)	1	16,53125	0,0000
C*N	3	0,51042	0,5438
C*A	1	0,78125	0,2971
N*A	3	1,55208	0,0945
C*N*A	3	0,38542	0,6549
Resíduo	109	0,71187	
CV (%)	21,3		

**TABELA 7B.** Análise de regressão do efeito das diferentes concentrações de soluções crioprotetoras sobre a motilidade (0-5) do sêmen descongelado.

<b>Causas de variação</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Quadrado médio</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
b1	1	0,00000	0,9970
b2	1	6,12500	0,0040
Desvio	1	1,40625	0,1630
Resíduo	109	0,71187	

**TABELA 8B.** Análise de variância do efeito do congelamento sobre a duração (segundos) da motilidade (variável transformada em  $\log_{10}X$ ).

<b>Causas de variação</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Quadrado médio</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
BLOCO	3	0,15332	0,0061
CRIOPROTETOR (C)	1	0,05390	0,2183
CONCENTRAÇÃO (N)	3	0,05290	0,2174
ATIVADOR (A)	1	7,88456	0,0000
C*N	3	0,11766	0,0218
C*A	1	0,30255	0,0041
C / Água destilada	(1)	0,05052	0,2332
C / NaHCO <sub>3</sub> 1%	(1)	0,30592	0,0039
A / Metanol	(1)	2,54906	0,0000
A / DMSO	(1)	5,63805	0,0000
N*A	3	0,06041	0,1674
C*N*A	3	0,02325	0,5776
Resíduo	109	0,03516	
CV (%)	11,2		

**TABELA 9B.** Análise de regressão do efeito das diferentes concentrações de DMSO sobre a duração (segundos) da motilidade do sêmen descongelado (variável transformada em  $\log_{10}X$ ).

<b>Causas de variação</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Quadrado médio</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
b1	1	0,03788	0,3020
b2	1	0,27760	0,0060
Desvio	1	0,06109	0,1900
Resíduo	109	0,03516	

**TABELA 10B.** Análise de regressão do efeito das diferentes concentrações de metanol sobre a duração (segundos) da motilidade do sêmen descongelado (variável transformada em  $\log_{10}X$ ).

<b>Causas de variação</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Quadrado médio</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
b1	1	0,13297	0,0540
b2	1	0,00128	0,8490
Desvio	1	0,00089	0,8740
Resíduo	109	0,03516	

## ANEXO C

**TABELA 1C.** Análise de variância do efeito do congelamento sobre as patologias totais (%) observadas nos espermatozóides.

<b>Causas de variação</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Quadrado médio</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
BLOCO	2	136,7639	0,3500
CRIOPROTETOR (C)	1	401,3889	0,0816
CONCENTRAÇÃO (N)	3	389,5370	0,0354
C*N	3	89,8333	0,5548
Resíduo	62	128,0793	
CV (%)	1,6		

**TABELA 2C.** Análise de regressão do efeito das concentrações de soluções crioprotetoras sobre as patologias totais (%) observadas nos espermatozóides.

<b>Causas de variação</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Quadrado médio</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
b1	1	804,01111	0,0150
b2	1	364,50000	0,0970
Desvio	1	0,10000	0,9780
Resíduo	62	128,07930	

**TABELA 3C.** Análise de variância do efeito do congelamento sobre as patologias menores (%) observadas nos espermatozóides.

<b>Causas de variação</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Quadrado médio</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
BLOCO	2	10,01389	0,0543
CRIOPROTETOR (C)	1	11,68056	0,0638
CONCENTRAÇÃO (N)	3	7,93982	0,0744
C*N	3	4,38426	0,2705
Resíduo	62	3,27912	
CV (%)	1,9		

**TABELA 4C.** Análise de variância do efeito do congelamento sobre as patologias maiores (%) observadas nos espermatozóides.

<b>Causas de variação</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Quadrado médio</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
BLOCO	2	88,43056	0,5179
CRIOPROTETOR (C)	1	276,12500	0,1546
CONCENTRAÇÃO (N)	3	295,60648	0,0943
C*N	3	73,75463	0,6469
Resíduo	62	132,98253	
CV (%)	1,6		

**TABELA 5C.** Análise de variância do efeito do congelamento sobre a patologia de cauda enrolada (%) observada nos espermatozóides.

<b>Causas de variação</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Quadrado médio</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
BLOCO	2	10,29167	0,3882
CRIOPROTETOR (C)	1	66,12500	0,0157
CONCENTRAÇÃO (N)	3	21,38426	0,1237
C*N	3	12,31019	0,3364
Resíduo	62	10,71102	
CV (%)	1,9		

**TABELA 6C.** Análise de variância do efeito do congelamento sobre a patologia de cauda degenerada (%) observada nos espermatozóides.

<b>Causas de variação</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Quadrado médio</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
BLOCO	2	0,03107	0,1868
CRIOPROTETOR (C)	1	0,06878	0,0553
CONCENTRAÇÃO (N)	3	0,00896	0,6855
C*N	3	0,00291	0,9222
Resíduo	62	0,01802	
CV (%)	2,5		



## ANEXO D

**TABELA 1D.** Análise de variância do efeito do congelamento sobre a fertilização (%) do sêmen de curimba.

<b>Causas de variação</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Quadrado médio</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
BLOCO	3	651,95208	0,2324
CRIOPROTETOR (C)	1	3780,00769	0,0057
CONCENTRAÇÃO (N)	3	188,69960	0,7306
ATIVADOR (A)	1	1585,20968	0,0647
C*N	3	116,79404	0,8479
C*A	1	855,91936	0,1698
N*A	3	120,65838	0,8416
C*N*A	3	445,28856	0,3946
Resíduo	35	435,58980	
CV (%)	81,1		