

**RESFRIAMENTO E CONGELAMENTO DO
SÊMEN DE PIAU-AÇU *Leporinus macrocephalus***

GILSON FERREIRA DE MORAES

**LAVRAS-MG
2004**

GILSON FERREIRA DE MORAES

**RESFRIAMENTO E CONGELAMENTO DO SÊMEN DE
PIAU-AÇU *Leporinus macrocephalus*.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Curso de Mestrado em Zootecnia, área de concentração em Aqüicultura, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora

Profa. PhD Ana Tereza de Mendonça Viveiros

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2004

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de
Processos Técnicos da**

Biblioteca Central da UFLA

Moraes, Gilson Ferreira de

Resfriamento e congelamento do sêmen de piau-açu
Leporinus

Macrocephalus / Gilson Ferreira de Moraes. -- Lavras :
UFLA, 2004.

68 p. : il.

Orientadora: Ana Tereza de Mendonça Viveiros.
Dissertação (Mestrado) – UFLA.
Bibliografia.

1. Piscicultura. 2. Reprodução. 3. Sêmen. 4. Preservação. I. Universidade
Federal de Lavras. II. Título.

CDD-639.375

GILSON FERREIRA DE MORAES

**RESFRIAMENTO E CONGELAMENTO DO SÊMEN DE
PIAU-AÇU *Leporinus macrocephalus*.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Curso de Mestrado em Zootecnia, área de concentração em Aqüicultura, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 18 de fevereiro de 2004

Prof. Dr. Luis David Solis Murgas UFLA

Profa. Dra. Priscila Vieira Rosa Logato UFLA

Prof. PhD Hugo Pereira Godinho PUC-MG.

Profa. PhD Ana Tereza de Mendonça Viveiros
UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

*A meus pais, “in memoriam”, em especial à
minha mãe, por ter me apoiado tanto no
início desta carreira durante a graduação. E
a meu filho pelo tempo que o privei de
minha companhia para realizar este
trabalho.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Profa .PhD Ana Tereza de Mendonça Viveiros, pela orientação e apoio.

À direção da Escola Agrotécnica Federal de Machado (E.A.F.M.), pela minha liberação para este estudo e disponibilização de suas instalações, equipamento e transporte para que se realizasse este trabalho.

Ao Prof. Dr. Luis David Solis Murgas, por disponibilizar o Laboratório de Fisiologia e Farmacologia.

Ao Prof. Dr. Rilke Tadeu Fonseca Freitas e ao Prof. Dr. Daniel Furtado, pela ajuda estatística durante a elaboração do projeto.

À minha amiga Martha Janeth Prieto Guevara, pelo apoio e companheirismo desde os primeiros momentos deste curso, assim como pela participação em todas a fases desta pesquisa.

À minha irmã, Juveli Morais e minha cunhada, Roselene N. Morais, pela ajuda, apoio e o grande carinho dispensado a mim e a meu filho, em todos os momentos deste trabalho.

Aos colegas Alexandre Nizio Maria, Alexmiliano V. Oliveira e Aléssio B. Miliorini, pela ajuda recebida.

A Paulo Antônio Maciel e José Benedito Inácio, pela ajuda na realização dos trabalho na Escola Agrotecnica Federal de Machado.

À empresa Minitub do Brasil, pela doação das palhetas usadas no experimento de congelamento de sêmen.

A todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADO!!

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT.....	v
1 INTRODUÇÃO	01
2 OBJETIVOS	03
2.1 Objetivo geral.....	03
2.2 Objetivos específicos	03
3 REVISÃO DE LITERATURA.	04
3.1 <i>Leporinus macrocephalus</i>	04
3.2 Biologia reprodutiva dos peixes	05
3.3 Reprodução em cativeiro.....	08
3.4 Preservação de sêmen de peixe	09
3.4.1 Soluções ativadoras da motilidade espermática e diluidores de sêmen ...	10
3.4.2 Agentes crioprotetores	12
3.4.3 Resfriamento do sêmen	14
3.4.4 Congelamento de sêmen	15
3.4.5 Descongelamento	17
4 MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1 Local do estudo	18
4.2 Origem, captura e seleção dos reprodutores.....	18
4.3 Tratamento hormonal e coleta do sêmen.....	21
4.4 Características seminais.	21
4.5 Experimento I - Soluções ativadoras da motilidade espermática e diluidores de sêmen de sêmen durante o resfriamento.....	23

4.6 Experimento II - Crioprotetores durante o resfriamento	25
4.7 Experimento III - Congelamento do sêmen.....	26
4.8 Análise estatística.....	28
5 RESULTADOS.....	32
5.1 Características seminais.....	32
5.2 Experimento I - Soluções ativadoras da motilidade espermática e diluidores de sêmen durante o resfriamento.....	34
5.3 Experimento II - Uso de crioprotetores durante o resfriamento.....	38
5.4 Experimento III - Congelamento do sêmen.....	43
6 DISCUSSÃO.....	44
6.1 Características seminais.....	44
6.2 Soluções ativadoras da motilidade espermática.....	45
6.3 Diluidores do sêmen durante o resfriamento.....	47
6.4 Agentes crioprotetores.....	48
6.5 Congelamento do sêmen.....	50
7 CONCLUSÕES.....	53
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIA.....	54
ANEXOS.....	61

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Soluções de NaCl como ativadoras e diluidoras no sêmen dos peixes de espécies nativas.....	11
TABELA 2	Sêmen in natura preservado a temperaturas entre 0,5°C e 2,9°C	15
TABELA 3	Concentração espermática e volume de sêmen, por faixa de peso de piau-açu, observados nesse estudo.....	32
TABELA 4	Coefficiente de correlação das características seminais de piau-açu em relação ao peso corporal ($n=47$).....	33
TABELA 5	Efeitos de soluções de NaCl e NaHCO ₃ em diferentes concentrações sobre a taxa de motilidade espermática expressa em porcentagem (média + desvio padrão) do sêmen fresco de piau-açu	35
TABELA 6	Efeito de ativadores sobre a taxa de motilidade espermática expressa em porcentagem (Média ± desvio padrão) no sêmen fresco de piau-açu.....	37
TABELA 7	Motilidade espermática expressa em porcentagem (média ± desvio padrão), do sêmen de piau-açu, diluído em diferentes soluções e incubado a 5°C - 8°C por até 48 horas.....	39
TABELA 8	Taxa de motilidade espermática expressa em porcentagem (média ± desvio padrão) do sêmen de piau-açu, incubado entre 5°C - 8 °C, com diluidores acrescidos de 10% de crioprotetor por até 48 horas.....	40

TABELA 9	Taxa de motilidade espermática expressa em porcentagem (média \pm desvio padrão) do sêmen de piau-açu, incubado entre 5°C - 8°C com diluidores acrescidos de um crioprotetor por até 48 horas.....	42
TABELA 10	Taxa de motilidade espermática expressa em porcentagem (Média \pm desvio padrão) do sêmen de piau-açu, criopreservado em diferentes soluções crioprotetoras.....	43

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Exemplar adulto de piau-açu <i>Leporinus macrocephalus</i>	04
FIGURA 2	Diagrama do eixo hipotalâmico – hipofisário – gonadal em peixes teleósteos. ¹ hormônio liberador de gonadotropina ² hormônio luteinizante ³ hormônio foilículo esimulante.....	06
FIGURA 3	Escola Agrotecnica Federal de Machado. A . Vista parcial da Estação de Piscicultura; B. Laboratório de reprodução, caixas de contenção dos reprodutores.....	20
FIGURA 4	A. Coleta do sêmen; B. Material utilizado para avaliar a motilidade espermática.....	22
FIGURA 5	A. Envasamento do sêmen; B. Tipo de raque usadas; C. Resfriamento de paletas no botijão de vapor de nitrogênio.....	27
FIGURA 6	Espermatozoides de piau-açu observados em microscópio de contraste de fase, ocular 100x.....	33
FIGURA 7	Comportamento da motilidade espermática após ativação em soluções de NaCl e NaHCO ₃ em diferentes concentrações no sêmen de piau - açu.....	36

RESUMO

MORAES, Gilson Ferreira. **Resfriamento e congelamento do sêmen de piau-açu *Leporinus macrocephalus***. 2004. 68 p. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo de preservação de sêmen do piau-açu (*Leporinus macrocephalus*) através do processo de resfriamento e congelamento. Os trabalhos foram realizados na Escola Agrotécnica Federal de Machado, Machado-MG. A taxa de motilidade espermática foi usada como medida para avaliar a qualidade do sêmen. No experimento I foram avaliadas diversas soluções diluidoras e ativadoras da motilidade espermática comumente usadas em peixe, além de soluções de NaCl e NaHCO₃ em concentrações entre 25 e 200 mM. No experimento II foram testados DMSO, etilenoglicol, glicerol e metanol como agentes crioprotetores durante o resfriamento do sêmen. No experimento III amostras de sêmen foram congeladas após diluição em Kurokura (NaCl 128,4 mM, KCl 2,7 mM, CaCl₂ 1,4 mM, NaHCO₃ 2,4 mM) e NaCl 200 mM associados a 5 e 10% de etilenoglicol e Kurokura associado a 5, 10 e 15% de metanol. A melhor solução ativadora da motilidade espermática foi NaCl 25 mM. Soluções salinas de kurokura, NaCl 200 mM e Ginsburg fish Ringer (NaCl 123,2 mM, KCl 3,75 mM, CaCl₂ 3,0 mM, NaHCO₃ 2,65 mM) mantiveram a viabilidade espermática durante 48 horas de resfriamento. Taxas de motilidade acima de 80% foram obtidas nas amostras diluídas em Kurokura associado ou não ao metanol. Todas as amostras de sêmen congelado apresentaram baixas taxas de motilidade após o descongelamento. A maior taxa de motilidade (8%) foi observada em amostras diluídas em Kurokura com 5% de metanol. Sêmen de piau-açu diluído em solução de Kurokura associada ou não ao metanol, mantém alta taxa de motilidade espermática após resfriamento por 48 horas. As baixas taxas de motilidade espermática encontradas no sêmen após descongelamento, mostram a necessidade de realização de novos testes com outros diluidores e crioprotetores.

* Comitê Orientador: Ana Tereza Mendonça Viveiros - UFLA (Orientadora), Priscila Rosa Vieira Logato – UFLA, Luis David Solis Murgas - UFLA

ABSTRACT

MORAES, Gilson Ferreira. **Semen cool storage and cryopreservation of piau-açu *Leporinus macrocephalus***. 2004. 68 p. MSc Thesis (Aquaculture) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

The aim of this research was to develop a cool storage and cryopreservation protocol for piau-açu (*Leporinus macrocephalus*) semen. Sperm motility rate was used to access sperm quality after treatments. On experiment I, several solutions commonly used as extenders or sperm motility activators of fish semen, and NaCl and NaHCO₃ at 25 and 200 mM were tested. On experiment II, DMSO, ethylene glycol, glycerol and methanol were tested as cryoprotectants during cool storage. On experiment III, semen samples were frozen after dilution on Kurokura solution (NaCl 128,4 mM, KCl 2,7 mM, CaCl₂ 1,4 mM, NaHCO₃ 2,4 mM) or NaCl 200 mM combined with 5 or 10% ethylene glycol, and Kurokura combined with 5, 10 or 15% methanol. NaCl 25 mM induced the highest motility rate and was used as sperm activator afterwards. Kurokura solution, NaCl 200 mM and Ginsburg fish Ringer (NaCl 123,2 mM, KCl 3,75 mM, CaCl₂ 3,0 mM, NaHCO₃ 2,65 mM) maintained sperm viability during 48 hours of cooling storage. Semen diluted on Kurokura combined or not with methanol produced motility rates above 80% after activation. All frozen-thawed semen samples showed very low motility rates. The highest motility rate (8%) was obtained with samples diluted in Kurokura solution and 5% methanol. Piau-açu semen diluted in Kurokura solution maintain high sperm motility after 48-hour cooling. Due to the very low sperm motility after thawing, it is necessary to further investigate the effect of other cryoprotectants and extenders on cryopreservation of piau-açu semen.

* Comitê Orientador: Ana Tereza Mendonça Viveiros - UFLA (Orientadora),
Priscila Rosa Vieira Logato – UFLA, Luis David Solis Murgas - UFLA

1 INTRODUÇÃO

A constante intervenção do homem no ambiente natural influencia diretamente o hábitat de algumas espécies de peixes, principalmente aquelas que realizam migrações durante o período reprodutivo, conhecidas por espécies de piracema. A construção de grandes barragens, a poluição das águas, a pesca predatória e a preferência do consumidor por algumas espécies têm proporcionado um declínio das populações de peixes nos ambientes naturais. Nesse contexto, a preservação de material genético em espécies nativas por congelamento assume um papel importante. Além disso, o desenvolvimento de técnicas de preservação de sêmen proporciona melhoria no manejo reprodutivo, pois a reprodução artificial de peixe em cativeiro, principalmente as espécies de piracema, não é tarefa fácil, já que, em cativeiro, estes peixes não sofrem os estímulos ambientais necessários para a sua reprodução.

A preservação de sêmen apresenta aplicações práticas e científicas. No meio prático, a preservação de sêmen pode melhorar o aproveitamento das instalações dentro das estações de reprodução, reduzindo o estoque de machos, eliminando a assincronia no amadurecimento dos gametas entre machos e fêmeas durante o período reprodutivo e auxiliando a recuperação de espécie silvestres ameaçadas de extinção. No meio científico, pode-se citar o fornecimento de material genético para identificação de populações, permitindo estudos de melhoramento genético e facilitando trocas e transportes de material genético entre instituições atuantes na área.

O resfriamento de sêmen é uma técnica de preservação relativamente simples, feito por meio de refrigeração a 4°C – 8°C, por períodos que variam de dias até a algumas semanas.

A criopreservação, por outro lado, é uma técnica bastante complexa e refinada e, embora conserve o sêmen a -196°C por tempo indeterminado, é a

técnica que mais causa danos aos espermatozoides, como excessiva desidratação e o rompimento da membrana, causado pela formação de cristais de gelo nos meios intra e extracelular.

A escolha do método de conservação do sêmen (resfriamento ou criopreservação), do diluente e do crioprotetor depende da sensibilidade espermática àqueles agentes químicos, do uso destinado ao sêmen e do equipamento disponível. Após o término da preservação, os espermatozoides devem ter integridade das membranas, apresentar uma boa motilidade e ter capacidade de fecundação.

O piau-açu (*Leporinus macrocephalus*) foi escolhido para este estudo por se tratar de uma espécie nativa de grande interesse comercial que, quando mantida em cativeiro, apresenta problemas reprodutivos, tais como a baixa produção de sêmen nos meses de piracema e a assincronia na maturação gonadal entre machos e fêmeas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver um protocolo de preservação de sêmen do piau-açu (*Leporinus macrocephalus*) a curto prazo, através do processo de resfriamento e, a longo prazo, através do processo de congelamento.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar o sêmen quanto à concentração espermática, volume obtido através de massagem abdominal e características macroscópicas como coloração e viscosidade;
- avaliar soluções diluidoras do sêmen e ativadoras da motilidade espermática;
- avaliar os efeitos dos crioprotetores durante os processos de resfriamento e congelamento.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 *Leporinus macrocephalus*

Família: Anostomidae ;

Subfamília: Characiformes;

Gênero: *Leporinus* (SPIX, 1829)

Espécie: *Leporinus macrocephalus* (Garavello & Britisk , 1988)

Nome popular: *Piau-açu, Piaussu, Piauçu, Piavuçu.*



FIGURA 1. Exemplar adulto de piau-açu *Leporinus macrocephalus*

Originário da Bacia do Rio Paraguai, o piau-açu tem como características corporais a boca grande e terminal não prostrátil, corpo curto, grosso e coberto de escamas. A coloração é cinza-escuro, principalmente por causa da borda lateral escura das escamas e o abdome é amarelo. Indivíduos de menor porte (até 25 cm) apresentam três manchas verticais alongadas no flanco, que não aparecem em indivíduos maiores (acima de 40 cm). O piau apresenta nadadeiras dorsal, adiposa, peitoral, abdominal, anal e caudal, podendo alcançar 50cm de

comprimento e até 6kg de peso vivo (Garavello & Britski, 1988). É um peixe que possui hábito alimentar onívoro, alimenta-se de vegetais, raízes, frutas, insetos e eventualmente de moluscos, além de adaptar-se muito bem à ração (Castagnolli,1992). Realiza piracema e sua reprodução ocorre entre os meses outubro e janeiro, apresentando desova total com ovos demersais não aderentes. Em situação de cativeiro, apresenta pouca produção de sêmen. É uma espécie explorada em cativeiro com o objetivo de produção de carne e para a pesca esportiva (Amaral, 1998).

3.2 Biologia reprodutiva dos peixes

Os peixes, assim como os demais organismos vivos, devem se adaptar ao ambiente se pretendem sobreviver e prosperar. O ponto vital neste esforço de sobrevivência é a capacidade de se reproduzir repetidamente e com êxito durante sua vida, acrescentando uma grande prole à população. Nesse sentido, diversas adaptações podem ser observadas em diferentes espécies de peixes, como idade da primeira maturação sexual, época de reprodução, local de reprodução e cuidados parentais.

Em peixes, assim como em aves e mamíferos, todo o mecanismo endócrino do eixo hipotálamo-hipófise-gônada, tem relação direta com os fatores ambientais. Nos peixes, os fatores, como temperatura, fotoperíodo, chuvas, qualidade da água, disponibilidade de alimento e possibilidade de realizar migrações, desencadeiam o mecanismo endócrino do eixo hipotálamo-hipófise-gônada, como está descrito na Figura 2.

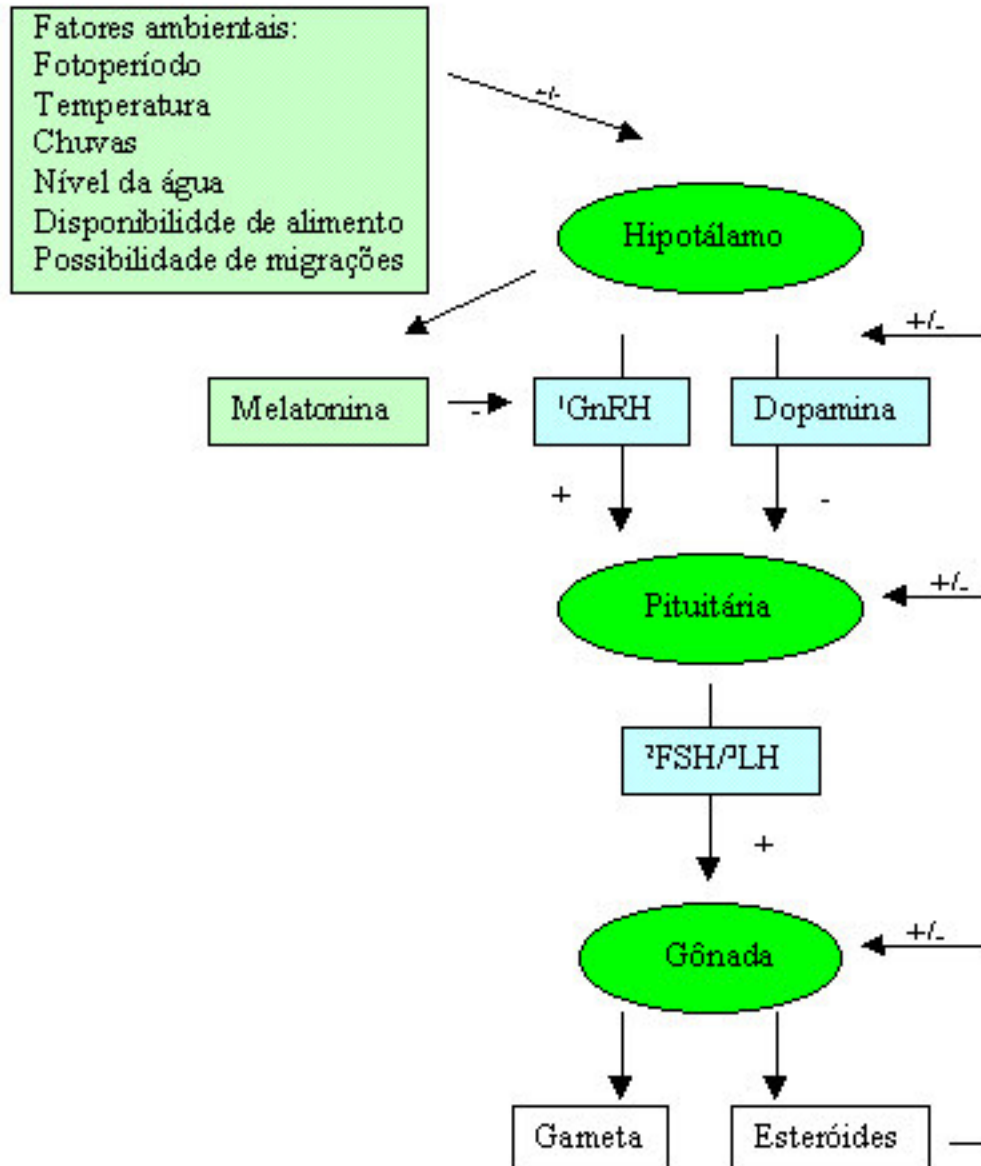


FIGURA 2. Diagrama do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, em peixes teleósteos. ¹ hormônio liberador de gonadotropina; ² hormônio luteinizante; ³ hormônio folículo estimulante. Adaptado de Viveiros, 2002.

Os fatores ambientais estimulam o hipotálamo por meio de órgãos sensoriais ligados ao sistema nervoso. Se a intensidade dos estímulos for suficiente para eliminar o efeito inibitório da dopamina, o hipotálamo libera o hormônio liberador de gonadotropina (GnRH) que vai estimular a hipófise a liberar o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo estimulante (FSH). As gonadas, uma vez estimuladas pelo LH e FSH, passam a liberar hormônio ligado à maturação final dos gametas $17\alpha, 20\beta$ dihidroxi 4-pregnen 3-ona ($17\alpha, 20\beta$ P4) responsável pela migração nuclear e pela hidratação do citoplasma dos ovócitos. No estágio seguinte, a ovulação é caracterizada pelo desprendimento do ovócito do folículo para o lúmen do ovário, sob o controle do hormônio prostaglandina (Woynarovich & Horváth, 1989; Sallum, 1999)

No caso dos machos, o sistema endócrino do eixo hipotalamo-hipófise-gônada funciona da mesma forma que nas fêmeas; entretanto os hormônios produzidos pelas gonadas são outros. Ao serem estimuladas pelo LH, as células de Leydig presentes nos testículos produzem testosterona, que estimula a espermatogonia a dividir-se em espermatócitos dentro das células de Sertoli. As células de Leydig ainda produzem o 11-ketotestosterona, que é responsável pelo início do processo da liberação dos espermatozoides no lúmen do testículo e produzem o $17\alpha, 20\beta$ P4, que induz à produção do fluido seminal no ducto espermático e acelera a espermição (Sallum, 1999).

3.3 Reprodução em cativeiro

As espécies de peixes que se reproduzem em águas paradas podem eventualmente se reproduzir em cativeiro sem a intervenção do homem. Já as espécies que necessitam de realizar migrações, como os peixes de piracema, apresentam deficiências orgânicas com respeito à reprodução, quando em cativeiro. Nas fêmeas, os ovócitos se desenvolvem, mas há um fracasso na maturação final, ovulação e desova. Nos machos, podem reduzir a produção e a qualidade dos espermatozóides. Estes problemas reprodutivos estão relacionados com a ausência de estímulos ambientais como chuvas, realizar migrações e disponibilidade de alimentos que são necessários para estimular o hipotálamo a liberar o GnRH (Woynarovich & Horváth, 1989; Sallum, 1999).

Para induzir artificialmente as respostas metabólicas provocadas pelos estímulos ambientais, são utilizados hormônios que atuam diretamente no sistema hipotalâmico-hipofisário-gonadal. Vários produtos têm sido utilizados para este fim: injeções de extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC), gonadotropina coriônica humana (hCG), GnRH e seus análogos, que podem também ser utilizados em conjunto com antagonistas da dopamina, como exemplo: pimozida e domperidone. A indução hormonal aumenta a quantidade de hormônio no organismo do peixe, suprindo as deficiências de fatores ambientais, desencadeando o processo reprodutivo, chegando à maturação final dos ovócitos (Zohar, 2001).

Os machos mantidos em cativeiro produzem pequeno volume de sêmen, muitas vezes com baixa qualidade dos espermatozóides, inadequados para o processo de fertilização artificial. O tratamento hormonal produz um aumento passageiro no plasma seminal e pequeno incremento na produção de espermatozóides, resultando na produção de um sêmen mais diluído, com baixo espermatócrito. A diluição do sêmen é um efeito desejável, pois a alta

concentração de espermatozóides faz com que o sêmen fique muito viscoso, dificultando sua homogeneização na água e, conseqüentemente, diminuindo sua capacidade de fertilização (Takashima et al., 1984).

Em espécies nativas, como pacu-caranha (*Piaractus mesopotamicus*) o tratamento com EBHC associado ao GnRH atuou efetivamente e aumentou o volume do sêmen em 6 vezes e o número de espermatozóides extruídos em 4,5 vezes. Efeito semelhante foi observado em machos de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) quando se usou EBHC, proporcionando um aumento no volume de duas vezes e no número de espermatozóides de 1,8 vez, quando comparado ao sêmen de peixes não tratados (Bedore, 1999). Ribeiro (2003) usou com sucesso para piau-açu (*Leporinus macrocephalus*), dose única de busarelina (GnRHa) 0,5 ml por kg de PV, 12 horas antes da coleta. Reidel (2002) obteve sucesso na extração do sêmen de machos de piau-açu, aplicando dose única de 2 mg kg⁻¹ de PV de EBHC 7 horas antes da coleta, mantendo a temperatura da água em 25°C.

3.4 Preservação de sêmen de peixe

O resfriamento e o congelamento são métodos usados na preservação de sêmen de peixe. No resfriamento, o sêmen é preservado por um período curto, dias ou até semanas, estocado a baixas temperaturas de 4°C a 5 °C. Já no congelamento, o sêmen é estocado à temperatura de -196°C, por um período indeterminado (Harvey & Kelley, 1988). Tanto no processo de resfriamento como no de congelamento, é necessário que se dilua o sêmen a ser preservado, facilitando assim o contato dos espermatozóides com oxigênio, no caso do resfriamento e com os crioprotetores, no caso do congelamento. Após o sêmen ter sido preservado, os espermatozóides devem ser ativados com uma solução

ativadora no momento de sua utilização. Portanto, é fundamental determinar soluções diluidoras do sêmen e ativadoras dos espermatozoides.

3.4.1 Soluções ativadoras da motilidade espermática e diluidores de sêmen

Solução diluidora é aquela que apenas dilui o sêmen, mantendo os espermatozoides imóveis durante o armazenamento, enquanto que as soluções ativadoras promovem a ativação da motilidade dos espermatozoides. Há substâncias que podem ser ativadoras ou diluidoras, alterando apenas suas concentrações, como, por exemplo o NaHCO_3 e NaCl .

No sêmen de curimatã-pacu *Prochilodus marggravii*, as melhores taxas de motilidade em soluções de NaCl foram obtidas em baixas concentrações, entre 25 e 75 mM, considerando que também bons resultados foram obtidos em água (Bedore et al., 1997). Soluções de NaCl com concentrações de 200 mM e 150 mM não ativam os espermatozoides, enquanto que, em concentrações de 100 mM a 25 mM, as taxas de motilidade crescem gradativamente, mas são inferiores quando comparadas com água destilada para o sêmen de curimatã (Cruz, 2001). Testando o efeito de soluções de NaCl em diferentes concentrações no sêmen de pacu e piracanjuba, observou-se que os espermatozoides em concentrações de 150 mM ou maiores, permanecem imóveis, e em concentrações entre 25 mM e 75 mM, apresentaram as mais altas taxas de ativação dos espermatozoides (Bedore et al., 1999).

Em bagre africano (*Clarias gariepinus*), a motilidade espermática caiu parcialmente em solução de NaCl entre 50 mM e 100 mM e, em soluções com concentrações acima de 200 mM, a motilidade foi totalmente inibida (Mansour et al., 2002). A solução ativadora de NaHCO_3 119 mM produziu resultados

significativamente superiores a NaCl 25 mM e água destilada, quando testadas em sêmen criopreservados com os crioprotetores DMSO, dimetilacetamida e propilenoglicol, na espécie piau-açu (*L. macrocephalus*; Ribeiro, 2003).

A solução de NaHCO₃ 119 mM pode ser usada satisfatoriamente como ativadora dos espermatozóides dos peixes após o descongelamento. No entanto, quando se faz a fertilização, os ovos se aglutinam no fundo do recipiente, fazendo com que a taxa de eclosão seja zero (Silveira, 2000).

Marques (2001), trabalhando com espécies nativas, testou soluções de NaCl como ativadoras e diluidoras dos espermatozóides, avaliando a porcentagem de motilidade e a duração da motilidade espermática, como pode ser visto na Tabela 1.

TABELA 1. Soluções de NaCl como ativadoras e diluidoras no sêmen de peixes dos espécies nativas

Espécie	Sol. ativadora	Sol. Diluidora
	NaCl (mM)	NaCl (mM)
Matrinchã <i>Brycon lundii</i>	50	150
Piracanjuba <i>Brycon orbignyanus</i>	50	150
Pacu-caranha <i>Piaractus mesopotamicus</i>	50	200
Piapara <i>Leporinus elongatus</i>	25	150
Piau-três-pintas <i>Leporinus frederici</i>	50	150
Curimatá <i>Prochilodus lineatus</i>	50	100 e 150
Curimatá-pacu <i>Piaractus maggravii</i>	50	200
Surubim <i>Pseudoplatystoma coruscans</i>	75	100 e 150

Fonte: Adaptado de Marques 2001

No sêmen de piracanjuba (*B. orbignyanus*), o diluidor composto por água de coco, dimetilsulfóxido (DMSO) 10% e gema de ovo 5% apresentou

melhor resultado em relação ao diluidor contendo glicose 5%, DMSO 10% e gema de ovo 5%. Como solução ativadora, após o descongelamento, o NaHCO₃ 119 mM demonstrou melhor resultado em relação a NaHCO₃ 0,5% e água destilada (Murgas et al., 2001). A preservação do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) resfriado a 4°C, usando o diluidor de sêmen de suino BTS (beltsville thawing solution), apresentou melhor motilidade após 168 horas, quando se acrescentou KI 0,16% ao diluidor, do que quando se acrescentou citrato de sódio 1,28% (Franciscatto et al., 2002).

Uma solução diluente não deve ativar os espermatozoides e deve ser utilizada no processo de criopreservação para facilitar o contato do crioprotetor com a célula espermática, fazendo com que este atinja o interior dos espermatozoides rapidamente (Carolsfeld & Harvey, 1999).

O sêmen de enguia (*Anguilla japonica*) demonstra uma tendência de aumento da motilidade quando se eleva o pH para básico, atingindo um ponto máximo em pH de 9,2, usando-se um diluidor à base de NaHCO₃ em pH, variando de 6,2 até 10,2, foi observado motilidade espermática entre 0 até 136,6%, respectivamente, quando comparados ao controle (Tanaka et al., 2002).

3.4.2 Agentes crioprotetores

Existem dois grupos de crioprotetores: os permeáveis e os impermeáveis. Os crioprotetores permeáveis, também chamados intracelulares são capazes de passar pela membrana celular e entrar para o interior das células, podendo-se citar como exemplos o DMSO, o glicerol e o metanol. Os crioprotetores impermeáveis diminuem a velocidade da formação de gelo da água intracelular, reduzindo o efeito da mudanças do volume da célula.

O grupo dos crioprotetores impermeáveis, também chamados de extracelulares, atravessam a membrana celular, como, por exemplo, açúcares (sacarose e glicose) e proteínas (gema de ovo, leite desnatado, soro e outros). Os crioprotetores impermeáveis têm habilidade de abaixar o ponto de congelamento do meio extracelular. Combinando crioprotetores impermeáveis com os permeáveis ocorre uma proteção mais completa da célula. A escolha de um crioprotetor está associada à toxicidade, permeabilidade na membrana celular e solubilidade na água durante o congelamento (Jamieson & Leung, 1991).

Dentre os crioprotetores usados na criopreservação do sêmen de peixe, o metanol é o mais permeável, sendo eficiente em algumas espécies de peixes e tóxico em outras (Harvey & Carolsfeld, 1993). O metanol é eficiente na criopreservação dos espermatozóides de tilápia (Harvey, 1983), salmonídeos (Lahnsteiner et al., 1997), bagre africano (*C. gariepinus*; Viveiros et al., 2000), bitterling japonês (*Tanakia limbata*; Oiita et al., 2001); piracanjuba *B. orbignyanus* e surubim *P. Coruscans* (Carolsfeld et al., 2003). Já em espécies como dourado (*S. maxillosus*; Carolsfeld et al., 2003) e pacu (*P. mesopotamicus*; Bedore, 1989), não foi obtido bons resultados com o metanol como crioprotetor.

A permeabilidade dos crioprotetores pela membrana dos espermatozóides é inversamente proporcional ao seu peso molecular. Em baixas temperaturas, o DMSO continua permeável, isso pode ser usado para minimizar sua toxicidade (Renard et al., 1984). O DMSO e o polietilenoglicol em consórcio como crioprotetores é uma combinação extremamente tóxica, porque induz à fusão da membrana dos espermatozóides (Ashwood-Smith, 1986).

O DMSO 10% e DMA (dimetilacetamida) 10% apresentaram resultados significativamente superiores ao glicerol 20% no processo de criopreservação do sêmen de *Salvelinus alpinus* em palhetas de 1,7 mL (Richardson et al., 2000). No bagre africano (*C. gariepinus*), o DMSO, nas concentrações de 5% e 10%, não teve efeito tóxico sobre a qualidade do sêmen na taxa de fertilização. Já nas

concentrações de 15% e 20%, os níveis de eclosão caíram gradativamente (Lock, 2000).

No sêmen de piau-açu (*Leporinus macrocephalus*) foi testada a toxicidade dos crioprotetores DMSO, DMA, propilenoglicol e metanol. Foi observado que o incremento das concentrações de crioprotetores resulta na redução das respectivas taxas de motilidade. A redução da taxa de motilidade foi observada quando houve aumento de 5% para 10% de etilenoglicol, propilenoglicol e metanol, assim como no aumento de 10% para 15% de DMSO e DMA (Ribeiro et al., 2003).

3.4.3 Resfriamento do sêmen

Por ser um método bastante simples de preservação de sêmen, o resfriamento pode ser utilizado nas estações de reprodução de peixe com sucesso, podendo ser usado para solucionar vários problemas de manejo reprodutivo, tais como baixa produção de sêmen e assincronia na maturação gonadal entre machos e fêmeas.

Várias técnicas são usadas no processo de resfriamento. O sêmen de curimatã-pacu (*P. marggravii*) foi conservado em geladeira, estocado em seringas de 1ml e permaneceu com motilidade de 50%, após 24 horas da coleta, para peixes que foram tratados com E.B.H.C., enquanto que em sêmen de peixes não tratados, após 24 horas a motilidade foi quase nula (Bedore et al., 1997). No sêmen de pacu (*P. mesopotamicus*), as maiores taxas de motilidade espermática observadas em 72 e 96 horas, foi no sêmen resfriado a 4°C com o diluidor 10% DMSO, 5% BTS e 0,16% de KCl em relação ao sêmen diluído com o mesmo diluidor acrescido de 5% de DMSO (Miliorini et al., 2002).

O sêmen de espécies nativas apresentando motilidade inicial de 80%, foi preservado por algumas horas, mantidos em baixas temperaturas sem o uso de diluidores, com pode ser visto na Tabela 2.

TABELA 2. Sêmen “in natura” preservado a temperaturas entre 0,5° C a 2,9 ° C

Espécie	Tempo de Preservação (horas)	Taxa de motilidade (%)
Matrinchã (<i>B. lundii</i>)	14	10
Piracanjuba (<i>B. orbignyanus</i>)	12	25
Piapara (<i>L. elongatus</i>)	8	30,5
Surubim (<i>P. Coruscans</i>)	18	25
Curimatá-pacu (<i>P. maggravii</i>)	12	42
Curimbatá (<i>P. lineatus</i>)	20	24
Piau-três-pintas (<i>L. frederic</i>)	7	34
Pacu-caranha (<i>P. mesopotamicus</i>)	20	40

Marques (2001)

3.4.4 Congelamento de sêmen

O sêmen de peixe a ser congelado necessita ser previamente diluído em soluções contendo diluidor(es) e crioprotetor(es). Os diluidores fazem com que o crioprotetor atinja o interior dos espermatozóides rapidamente, ao facilitar o seu contato com a célula espermática (Carolsfeld & Harvey, 1999). As proporções de diluição variam entre espécies e mesmo entre pesquisadores. Assim, Coser et al. (1984) utilizaram a diluição de 1:4 (sêmen : diluente) para curimbatá; Coser et al. (1987) 1:4,5 para pacu; Harvey & Kelley (1988) 1:1 para tilápia; Babiak et al. (1997) 1:3 para carpa comum e Bedore (1999) 1:4 para pacu-caranha e piracanjuba.

O congelamento deve ser feito em uma velocidade ótima, em que não se mantenha o equilíbrio osmótico, saindo uma pequena quantidade de água da célula. A água remanescente dentro da célula se vitrifica e forma pequenos cristais de gelo tolerável a um rápido processo de descongelamento, evitando a recristalização. A baixa velocidade de congelamento causa excessiva perda de água da célula para o meio externo, pelo aumento da concentração de soluto extracelular, causando desidratação e morte da célula. Caso o congelamento seja muito rápido, não haverá tempo suficiente para a célula perder água para o meio externo, permanecendo grande quantidade de água intracelular, formando grandes cristais de gelo (Meryman et al., 1977; Ashwood-Smith, 1986).

O ponto de congelamento de uma solução está linearmente relacionado com a concentração de soluto: quanto mais soluto, menor será a temperatura de congelamento. A relação entre a concentração de soluto e o ponto de congelamento ocorre até chegar a baixas temperaturas -100°C a -120°C , não mostrando influência da pressão atmosférica. O ponto máximo de concentração de soluto para o congelamento é estabelecido como ponto eutético (Jamieson, 1991).

O contato direto do sêmen com o nitrogênio líquido provoca lesões na membrana plasmática e peça intermediária do espermatozóide. Já no vapor nitrogênio líquido, os espermatozóides sofrem um congelamento gradativo de forma que as estruturas não são muito danificadas, embora o aspecto da cromatina seja consideravelmente modificado (Billard, 1983). Os maiores prejuízos conhecidos na estrutura dos espermatozóides com relação ao congelamento e descongelamento ocorrem na temperatura crítica entre 0°C e -40°C . De forma geral, a remoção de calor e a adição de crioprotetor são as causas de prejuízos. Já de uma forma mais detalhada, pode-se citar o choque de frio, os efeitos do pH, gelo intracelular e extracelular, soluto, volume e toxicidade dos crioprotetores (Jamieson, 1991).

A temperatura do sêmen deve ser levada rapidamente até -50°C , porém entre -50 a -80°C deve ser em uma velocidade um pouco mais lenta. A partir deste momento, o sêmen pode ser transferido para nitrogênio líquido e a temperatura levada a -196°C (Horvarth & Caroslsfeld, 1993). Em contraste, Viveiros et al. (2000) usaram três etapas no congelamento do sêmen de bagre africano (*C. gariepinus*). Primeiramente o sêmen foi resfriado a $-5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ entre 5°C a -40°C . O sêmen permaneceu 5 minutos a -40°C , depois foi mergulhado em nitrogênio líquido (-196°C). Caroslsfeld et al. (2003), congelando sêmen de espécies tropicais, levaram a temperatura de 28°C para 8°C em 1 minuto e em seguida, fizeram um rápido congelamento até -150°C a $-45^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e uma estabilização mais gradual até -196°C .

Cruz (2001), realizando teste de velocidade de congelamento em botijão de vapor de nitrogênio líquido (CP 300 Taylor-Wharton), observou que a taxa de resfriamento, medida entre 0 e -60°C , oscila entre 17,9 e $52,9^{\circ}\text{C}/\text{min}$, atingindo -190°C após 7 min, usando como embalagem paletas de 0,5 ml.

3.4.5 Descongelamento

A velocidade de congelamento é, teoricamente, semelhante à velocidade de descongelamento. A maioria das células suporta um descongelamento rápido, mesmo que ela não se hidrate totalmente, exceto para embriões de mamíferos. A rapidez no descongelamento é necessária para evitar a recristalização, ou seja, o agrupamento de pequenos cristais de gelo em grandes cristais de gelo, letal para a célula (Jamieson, 1991).

Há uma variação entre a opinião de diversos autores a respeito do tempo e da temperatura da água para descongelar o sêmen estocado em palheta de 0,5 ml por meio de banho-maria. Richardson et al (2000) descongelaram sêmen de

Salvelinus alpinus a 4°C por 30 segundos; Horvarth & Urbányi (2000) usaram no sêmen de bagre-africano (*C. gariepinus*) 40°C por 5 segundos; Murgas et al (2001) usaram para o sêmen de piracanjuba (*B. orbignyanus*), 60°C por 5 segundos; já Ribeiro (2003) descongelou o sêmen de piau-açu (*L. macrocephalus*) a 30°C por 6 segundos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local do estudo

O presente trabalho foi realizado entre os meses de outubro de 2003 e janeiro de 2004, no Setor de Piscicultura da Escola Agrotécnica Federal de Machado, Machado, MG (E.A.F.M.)(Figura 2A). O município possui uma topografia montanhosa, sua altitude máxima atinge 1.310 metros e a mínima 835 metros, estando a sede do município a 871 metros. A temperatura média anual é de 21,2°C, com média máxima de 27° e média mínima de 14,2°; o índice pluviométrico no ano de 2001 foi de 1.824 mm. Machado situa-se na Bacia do Rio Grande, fazendo parte das terras alagadas pela represa de Furnas. Seu complexo hídrico é formado pelos rios Dourado, Machado, São Tomé e Sapucaí, além dos córregos de Coroado, Jacutinga e Ouvidor.

4.2 Origem, captura e seleção dos reprodutores

Machos de piau-açu (*Leporinus macrocephalus*) foram capturados em viveiros de terra com 300 a 3000 m² e transferidos para viveiros de alvenaria de 100 m² e 1 m de profundidade (Figura 3A). Os peixes foram selecionados observando-se eliminação de sêmen em resposta a massagem manual na parede celomática e emissão de grunidos, seguindo os procedimentos descritos para esta espécie por Sato (1999) e Ribeiro (2003).

Após a seleção, os peixes foram levados ao laboratório de reprodução da E.A.F.M., onde foram pesados, identificados e mantidos 3 peixes por caixa de 500 L (Figura 3B). A água foi mantida a 25°C, com uma vazão em torno de 3

L/min. Após a extrusão do sêmen, os reprodutores receberam tratamento anti-séptico e foram devolvidos aos viveiros de alvenaria.



FIGURA 3. Escola Agrotecnica Federal de Machado. **A** . Vista parcial da Estação de Piscicultura; **B**. Laboratório de reprodução, caixas de contenção dos reprodutores.

4.3 Tratamento hormonal e coleta do sêmen

Os machos receberam uma injeção de EBHC, na dose de 0,5 mg/kg de peso corporal, 12 horas antes da coleta do sêmen, de acordo com o manejo de rotina da estação.

A coleta foi feita após limpar e enxugar a papila urogenital com toalha de papel. Para isso foram feitas massagens manuais na parede celomática, no sentido crânio-caudal, tomando cuidado para que não ocorresse contaminação do sêmen com fezes, urina, sangue ou mesmo água do tanque. O sêmen foi coletado em seringas graduadas e mantidas em banho de gelo (Figura 4A).

4.4 Características seminais

As seguintes características macroscópica do sêmen foram analisadas: coloração, volume e viscosidade. Para a certificação de que o sêmen coletado não estava contaminado, uma gota de sêmen foi levada ao microscópio óptico (400X) e observada a motilidade espermática (Figura 4B). A ausência de motilidade espontânea demonstra a não contaminação do sêmen.

O volume seminal foi medido no momento da coleta, com auxílio de seringas de 1 ml. A concentração espermática foi determinada em câmara de Neubauer, após diluição de 1:1000 em solução formol-salina (formol 6% e NaCl 0,9%) (Hancock, 1957). O valor obtido foi multiplicado pelo fator de correção 50000, obtendo-se o número de espermatozoides/mm³ de sêmen.

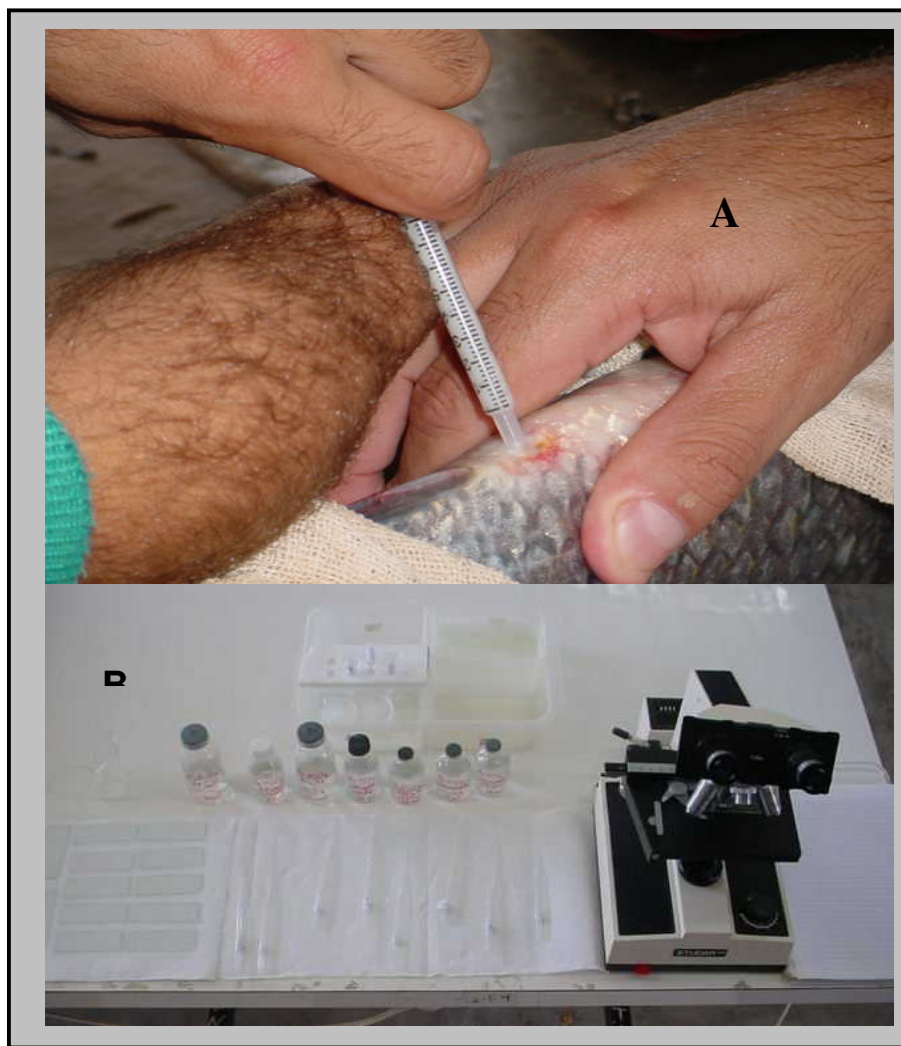


FIGURA 4. A. Coleta do sêmen; B. Material utilizado para avaliar a motilidade espermática.

4.5 Experimento I – Soluções ativadoras da motilidade espermática e diluidores de sêmen durante o resfriamento

Experimento Ia - Neste experimento foram avaliadas soluções de NaCl e NaHCO₃ em diferentes concentrações: 25, 50, 75, 100, 125, 150 e 200 mM. O objetivo foi determinar a concentração que induz às maiores taxas de motilidade espermática, assim como a concentração que dilui o sêmen sem ativar a motilidade espermática, para cada uma das soluções.

Foi utilizado o sêmen de três diferentes peixes. De cada peixe foram feitas três observações para cada tratamento. As amostras de 1µL de sêmen foram colocadas em lâmina histológica previamente focalizada no microscópio óptico em 400X (Figura 4B). Neste momento, as amostras receberam as soluções a serem testadas, na proporção de 1:5 (sêmen: solução).

A taxa de motilidade dos espermatozoides, isto é, porcentagem de espermatozoides móveis em relação ao total observado, foi estimada em cada uma destas soluções. A duração da motilidade foi observada até dois minutos após a ativação.

Experimento Ib - O objetivo desse experimento foi avaliar várias soluções tidas como ativadoras da motilidade espermática.

Foram testadas as seguintes soluções: NaHCO₃ 50 e 75 mM, NaCl 25 mM, água destilada e água “in natura”. Foi utilizado sêmen de três peixes e de cada peixe foram feitas três observações para cada tratamento. Os testes de motilidade foram feitos seguindo-se a mesma metodologia do experimento Ia.

Experimento Ic - Este experimento teve como objetivo avaliar soluções tidas com diluidoras do sêmen. Foi observado motilidade espermática no sêmen diluído em várias soluções. Assim um grupo maior de solução foi

testado como diluidora, dividindo o experimento em duas fases. Ainda, foi observado que o pool de sêmen apresentou grande queda na taxa de motilidade, em relação ao sêmen analisado individualmente. Assim, nos experimentos seguintes, optou-se por testar os diluidores no sêmen de cada peixe individualmente.

Primeira fase - foram testadas as seguintes soluções como diluidoras do sêmen :

- a) NaCl 200 mM; (pH 7,5 ; 399,84 mOsm/L)
- b) NaHCO₃ 150 mM; (pH 7,5 ; 300 mOsm/L)
- c) NaHCO₃ 200 mM; (pH 7,5; 400 mOsm/L)
- d) Ohta (Ohta and Izawa, 1996) : NaCl 143,3 mM, KCl 15,2 mM, CaCl₂ 1,3 mM, MgCl₂ 1,6 mM, (pH 8,2)
- e) Kurokura (Kurokura et al, 1984) : NaCl 128,4 mM, KCl 2,7 mM, CaCl₂ 1,4 mM, NaHCO₃ 2,4 mM, (pH 7,6)

Segunda fase - Foram testadas as seguintes soluções como diluidoras do sêmen :

- a) Ginsburg fish Ringer I (G.F.R.I) (Adaptado de Ginsburg, 1963): NaCl 138,88 mM, KCl 4,19 mM, CaCl₂ 3,37 mM; NaHCO₃ 2,97 mM, pH 7,6
- b) Ginsburg fish Ringer II (G.F.R.II) (Viveiros et al, 2000): NaCl 123,2 mM, KCl 3,75 mM, CaCl₂ 3,0 mM, NaHCO₃ 2,65 mM, pH 7,6
- c) Ginsburg fish Ringer III (G.F.R.III) (Ginsburg, 1963): NaCl 111,11 mM, KCl 3,35 mM, CaCl₂ 2,70 mM, NaHCO₃ 2,38 mM, pH 7,6
- d) Extender II (Verreth, 1999): NaCl 76,92 mM; KCl 83,15mM; MgCl₂·6H₂O 0,787 mM; CaCl₂ 1,49 mM, NaHCO₃ 2,38 mM, pH 7,8; 283mOsm/L.

Em cada fase foi usado o sêmen de três peixes. Uma alíquota de sêmen foi diluída 1:6 (sêmen : diluidor) e mantida em geladeira a temperatura entre 5°C e 8 °C. A taxa de motilidade foi avaliada 0; 0,5; 1; 2; 12; 24 e 48 horas após a diluição, seguindo-se a metodologia do experimento Ia, proporcionando uma diluição final de 1:42 (sêmen:solução diluidora+ativadora).

4.6 Experimento II – Crioprotetores durante o resfriamento

Experimento IIa – Foi feito inicialmente uma avaliação dos crioprotetores mais usados no sêmen de peixe : DMSO, etilenoglicol, glicerol e o metanol. Cada crioprotetor foi adicionado na concentração de 10% a cada um dos três diferentes diluidores : NaCl 200 mM, Kurokura e Ginsburg fish Ringer II (Experimento Ic).

Utilizou-se o sêmen de três peixes. Uma alíquota de sêmen foi diluída 1:6 (sêmen : diluidor + crioprotetor) e mantida em geladeira, sob temperatura de 5°C a 8 °C. A taxa de motilidade foi avaliada 0;0,5; 1; 24 e 48 horas após a diluição, seguindo-se a metodologia do experimento Ia.

Experimento IIb – Foram testados metanol e etilenoglicol nas concentrações de 5, 10 e 15% associados aos diluidores NaCl 200 mM e Kurokura.

Foi utilizado o sêmen de três peixes. Uma alíquota de sêmen foi diluída 1:10 (sêmen: diluidor+crioprotetor) e mantida em geladeira, sob temperatura de 4°C a 8°C. A taxa de motilidade foi avaliada 0;0,5; 1; 24 e 48 horas após a diluição, seguindo-se a metodologia do experimento Ia.

4.7. Experimento III - Congelamento do sêmen

Tendo como base o experimento IIb, foram tomadas as combinações diluidor + crioprotetor que proporcionaram as maiores taxas de motilidade espermática após 30 minutos de incubação, pressupondo que o tempo de manipulação do sêmen até iniciar o congelamento não ultrapasse esse período.

Devido ao pouco volume de sêmen obtido dos dois peixes utilizados, foi necessário fazer uma diluição maior, na proporção de 1:100 (sêmen:diluidor+crioprotetor). As soluções crioprotetoras testadas foram NaCl 200 mM com 5% e 10% de metanol, Kurokura com 5%, 10% e 15% de metanol e Kurokura com 5% e 10% de etilenoglicol.

O sêmen diluído foi envasado em palhetas de 0,5 mL numeradas, (gentilmente doadas pela Minitub do Brasil), vedadas com esferas plásticas (Figura 5A), acondicionadas em raques (Figura 5B), levando em torno de 2 minutos até serem transferidas para o botijão de vapor de nitrogênio líquido (Taylor-Warton, modelo CP 300) (Figura 5C). Decorridos 10 minutos de exposição no vapor, as raques foram transferidas para botijão de nitrogênio líquido (M.V.E., modelo Volta 34).

A temperatura interna do botijão de vapor de nitrogênio líquido foi medida introduzindo-se a ponta do sensor de um termômetro digital (Figura 4C) dentro de uma paleta de 0,5 mL vazia e então colocada dentro do botijão na mesma posição em que foram colocadas posteriormente as palhetas preenchidas com sêmen diluído. Foi medido o tempo que a palheta levou para se estabilizar em -176°C, a partir da temperatura ambiente de aproximadamente 23°C.

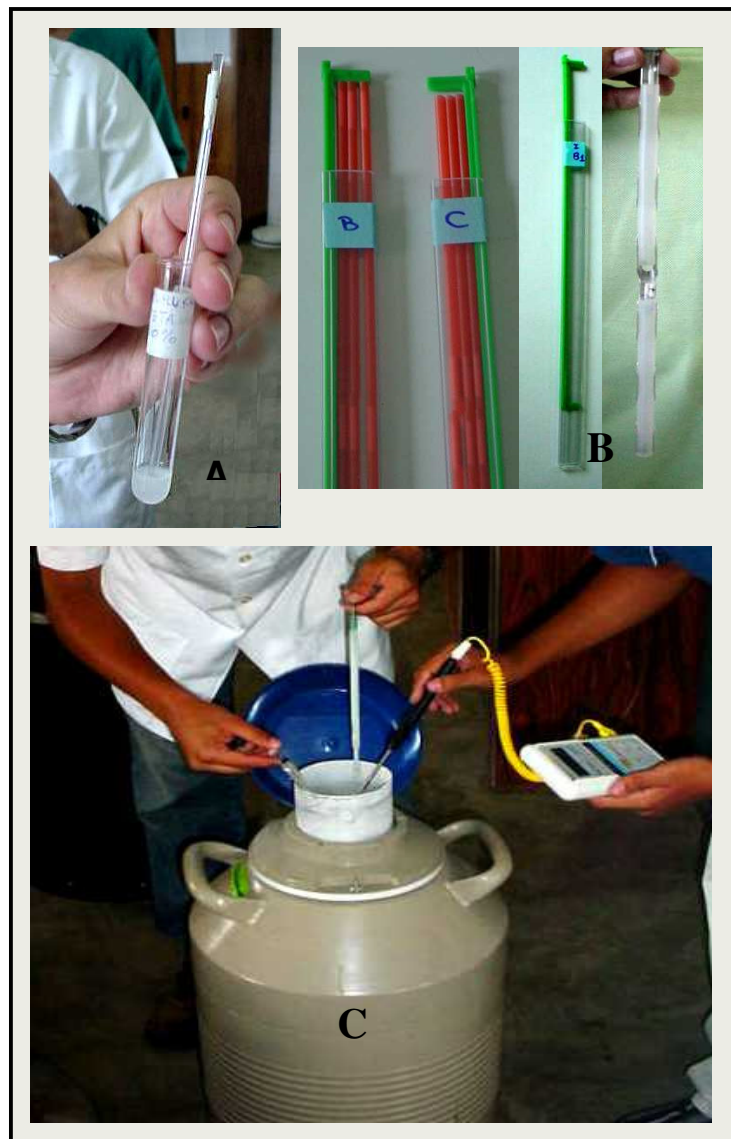


FIGURA 5. A. Evasamento do sêmen; B. Tipo de raque usadas; C. Resfriamento de paletas no botijão de vapor de nitrogênio.

Após 2 horas mantidas em nitrogênio líquido, as palhetas foram descongeladas em banho-maria a 60°C, por 8 segundos com base em resultados preliminares. Após o descongelamento, a palheta foi enxugada, a extremidade que estava vedada com esfera foi cortada e o sêmen depositado em placa de petri, à temperatura ambiente.

Do sêmen descongelado foram retiradas amostras de 1µL colocadas em lâmina e então levadas ao microscópio para realizar a leitura da motilidade. Foi usada a solução de NaCl 25 mM para ativar os espermatozóides.

4.8 Análise estatística

Características seminais

A análise de volume de sêmen e de concentração espermática foi feita em relação ao peso dos doadores. Para isso, foi aplicado um teste de correlação de Pearson, com o objetivo de se determinar uma possível correlação entre as variáveis peso do doador, concentração espermática e volume de sêmen.

Experimento Ia e Ib - Foi usado um delineamento em bloco inteiramente casualizado (DBC), em que o bloco controla a variação entre o sêmen dos diferentes peixes. As médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, 5% de significância.

O modelo estatístico utilizado foi o seguinte:

$$y_{ij} = \mu + A_i + B_j + e_{ij}$$

em que:

y_{ij} = valor observado no tratamento i no bloco j ;

μ = constante associada a todas as observações;

A_i = efeito do tratamento i , (Exp Ia com $i = 7$ e Exp.Ib com $i = 5$)

B_j = efeito do bloco j , com $j=1,2,3$;

e_{ij} = erro experimental associado a y_{ij} .

Experimento Ic (1º e 2º fase) e experimento IIa – Foi utilizado um DBC com parcela subdividida, usando no experimento Ic, o diluidor como parcela e o tempo na subparcela. No experimento IIa o diluidor +10% de crioprotetor foi analisado como parcela e o tempo na subparcela. O uso do bloco serviu para controlar a variação entre sêmen dos diferentes peixes. As médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de significância de.

O seguinte modelo estatístico foi utilizado:

$$y_{ijk} = \mu + D_i + B_j + e_{ij} + T_k + DT_{ik} + e_{k(ij)}$$

em que:

y_{ijk} = observação referente à subparcela k , da parcela i , no bloco j ;

μ = constante associada a todas as observações;

D_i = efeito do tratamento i , (Exp.Ic: 1º fase $i = 6$; 2º fase $i = 5$ e Exp.IIa $i = 13$)

B_j = efeito do bloco j , com $j=1,2,3$;

e_{ij} = erro experimental associado à parcela i dentro do bloco j ;

T_k = efeito do tempo k , (Exp.Ic: 1º e 2º fase com $k = 7$; Exp.IIa com $k = 5$)

DT_{ik} = efeito da interação do diluidor i com o tempo k ;

$e_{k(ij)}$ = erro associado às observações na subparcela k , dentro da parcela i do bloco j .

Experimento IIb– Para testar diluidores associados a diferentes porcentagens de crioprotetores, foi usado um DBC com um fatorial na parcela (2 diluidores X 2 crioprotetores) subdividida no tempo (5), em que o bloco controla a variação entre o sêmen dos diferentes peixes.

O modelo estatístico utilizado foi:

$$Y_{kij} = \mu + D_i + C_l + B_j + (DC)_{il} + e_{(il)j} + T_k + e_{k(j)} + (TD)_{ki} + (TC)_{kl} + (TDC)_{kil} + e_{kil(j)}$$

em que:

y_{ijk} = observação referente ao tempo k, do diluidor i, no crioprotetor l, no bloco j;

μ = constante associada a todas as observações;

D_i = efeito do diluidor i, com $i = 1, 2$;

C_l = efeito do crioprotetor l, com $l = 1, 2$;

B_j = efeito do bloco j, com $j = 1, 2, 3$;

$(DC)_{il}$ = efeito da interação crioprotetor i com o diluidor l, na parcela;

$e_{(il)j}$ = erro experimental associado à parcela il dentro do bloco j.

T_k = efeito do tempo k, com $k = 1, 2, \dots, 5$;

e_{kj} = erro experimental associado a observação do tempo k no bloco j;

$(TD)_{ki}$ = efeito da interação do tempo k com o diluidor i;

$(TC)_{kl}$ = efeito da interação do tempo k com o crioprotetor l da diluição;

$(TDC)_{kil}$ = efeito da interação do tempo k com o diluidor i com o crioprotetor l;

$e_{kil(j)}$ = erro associado às observações na subparcela k, dentro da parcela i do bloco j (Y_{kij}).

Experimento III - Congelamento do sêmen

Para o teste de congelamento, foi feito um delineamento inteiramente casualizado (DIC), com três repetições. As médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

O modelo estatístico utilizado foi:

$$y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$

em que:

y_{ij} = valor observado no tratamento i no bloco j ;

μ = constante associada a todas as observações;

T_i = efeito do tratamento i , com $i = 1, 2, 3, \dots, 7$;

e_{ij} = erro experimental associado ao tratamento i dentro da repetição j , com $j = 1, 2, 3$.

5 RESULTADOS

5.1 Características seminais

O sêmen de piauí-açu, nas condições deste trabalho, apresentou-se de coloração branca e bastante viscoso. No entanto, o volume de sêmen obtido foi muito baixo, variando de 0,13 mL a 0,79 mL dentre as diferentes faixas de peso, como pode ser observado na Tabela 3. O volume de sêmen apresentou uma correlação significativa, com um valor intermediário (0,597), com o peso corporal do peixe, indicando uma possível correlação linear. A concentração espermática não apresentou correlação com peso corporal, nem com o volume do sêmen, como pode ser visto na Tabela 4.

TABELA 3. Concentração espermática e volume de sêmen, por faixa de peso de piauí-açu, observados nesse estudo

Intervalo de peso (g)	Frequência absoluta (n)	Frequência percentual	Sptz $\times 10^9 \text{ mL}^{-1}$	Volume (mL)
[140 - 980)	4	8,51	4,91	0,13
[980 - 1820)	40	85,11	4,80	0,22
[1820-2660)	3	6,38	3,50	0,79
Total	47	100	Média 4,4	

Sptz: espermatozoides

TABELA 4. Coeficiente de correlação das características seminais de piau-açu em relação ao peso corporal ($n= 47$).

Variável	Volume de sêmen	Peso
Concentração	0,038 ns	-0,072 ns
Volume de sêmen	-	0,597 *

(*) significativa ($p<0,05$), e (ns) não significativa ($p>0,05$)

O espermatozóide de piau-açu apresenta cabeça de forma ovóide, característica morfológica bastante primitiva, de acordo com classificação de Billard (1970) & Jameison (1991), como pode ser visto na Figura 6.

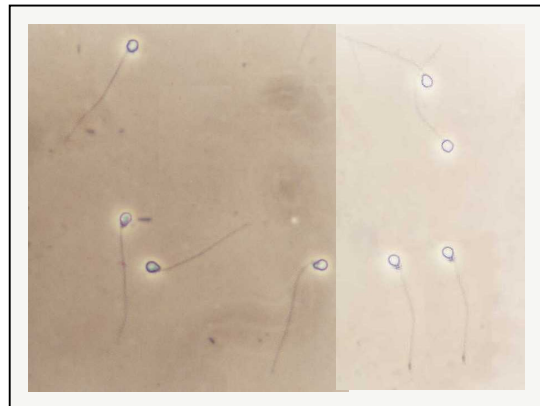


FIGURA 6. Espermatozoides de piau-açu, observação em microscópio de contraste de fase, ocular 100x

5.2 Experimento I - Soluções ativadoras da motilidade espermática e diluidores de sêmen durante o resfriamento

Experimento Ia - O aumento da concentração de NaCl ou NaHCO₃ e o conseqüente aumento na osmolaridade das soluções testadas promoveram uma diminuição na motilidade dos espermatozóides de piau-açu. A solução de NaCl 25 mM induziu a motilidade em 78% dos espermatozóides; quando a concentração da solução de NaCl foi aumentada para 150 mM, a motilidade foi induzida em apenas 2% dos espermatozóides, tornando-se nula em solução de NaCl 200 mM, como apresentado na Tabela 5. Já as soluções pouco concentradas de NaHCO₃ se comportaram de forma diferente. A motilidade espermática aumentou quando a concentração de NaHCO₃ passou de 25 mM a 75 mM. A partir de 75 mM houve uma queda da taxa de motilidade até que se tornasse nula, nas concentrações de 150 e 200 mM (Tabela 5 e Figura 7).

TABELA 5. Efeitos de soluções de NaCl e NaHCO₃ em diferentes concentrações sobre a taxa de motilidade espermática expressa em porcentagem (média + desvio padrão) do sêmen fresco de piau-açu (experimento Ia)

Concentração (mM)	NaCl	NaHCO ₃
25	78 ± 16 ^a	61 ± 10 ^c
50	62 ± 16 ^b	74 ± 8 ^b
75	29 ± 6 ^c	81 ± 2 ^a
100	15 ± 8 ^c	12 ± 2 ^d
125	6 ± 3 ^d	5 ± 2 ^e
150	2 ± 2 ^d	0 ± 0 ^f
200	0 ± 0 ^d	0 ± 0 ^f

^{a-f} Médias com letra igual na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knot p<0,05.

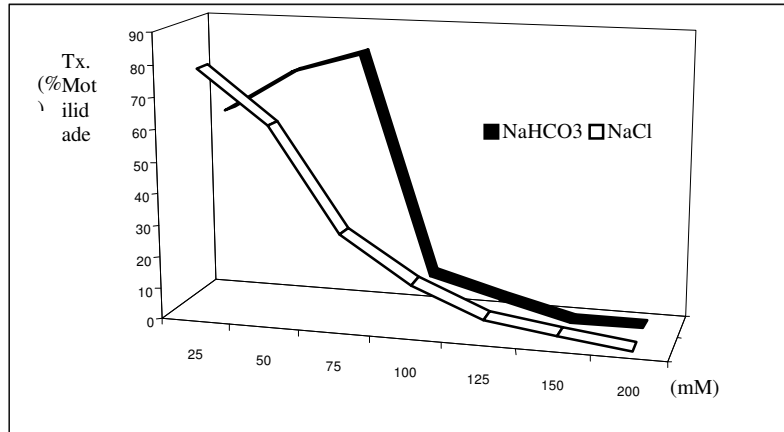


FIGURA 7. Comportamento da motilidade espermática após ativação em soluções de NaCl e NaHCO₃ em diferentes concentrações no sêmen de piau-açu.

Experimento Ib - A solução de NaCl 25 mM foi significativamente mais eficiente, como ativador da motilidade espermática, em relação aos demais tratamentos testados, como pode ser visto na Tabela 6. Nas soluções de NaHCO₃, não foi observada diferença significativa na taxa de motilidade espermática quando se aumentou a concentração de 50 para 75 mM. As menores taxas de motilidade espermáticas foram observadas após ativação dos espermatozoides, com água destilada e água in natura.

TABELA 6. Efeito de ativadores sobre a taxa de motilidade espermática expressa em porcentagem (média \pm desvio padrão) no sêmen fresco de piau-açu (Experimento Ib)

Ativadores	Motilidade (%)
Água destilada	47 \pm 7 ^c
Água in natura	51 \pm 5 ^c
NaHCO ₃ 50 mM	78 \pm 9 ^b
NaHCO ₃ 75 mM	82 \pm 4 ^b
NaCl 25 mM	87 \pm 4 ^a

^{a-c} Médias com letras iguais não diferem entre si, pelo teste Scott-Knott $p < 0.05$

Experimento Ic primeira fase - As taxas de motilidade espermática após ativação do sêmen diluído nas diferentes soluções testadas mantiveram-se próximas à aquela observada no controle até duas horas após incubação. Após doze horas, houve uma queda na taxa de motilidade espermática no sêmen diluído nas duas soluções de NHCO₃. Após 48 horas de incubação, ainda foi observado nas amostras diluídas em NaCl 200 mM e Kurokura, taxas de motilidade espermática de 59% e 33%, respectivamente (Tabela 7).

Experimento Ic segunda fase - Os diluidores testados nessa fase apresentaram comportamento semelhante aos testados na primeira fase deste experimento em relação ao tempo de incubação. Até 2 horas após a incubação, não houve efeito do tempo em cada diluidor, exceto para o sêmen diluído em extender II. O sêmen diluído no extender II apresentou taxa de motilidade espermática bastante reduzida desde o primeiro momento de incubação. As amostras diluídas em Ginsburg fish Ringer II apresentaram as maiores taxas de

motilidade espermática (44%), após 48 horas de incubação, como pode ser visto na Tabela 7.

5.3 Experimento II - Uso de crioprotetores durante o resfriamento

Experimento IIa - A taxa de motilidade espermática do sêmen diluído em soluções contendo crioprotetores está apresentada na Tabela 8. O sêmen controle não sofreu efeito do tempo na taxa de motilidade espermática ($p > 0,05$), mantendo-se acima de 80% até 60 minutos após a incubação. Imediatamente após a diluição do sêmen em solução contendo crioprotetor (tempo 0), a motilidade espermática caiu ($p < 0,05$) em relação ao controle, nos seguintes tratamentos: NaCl associado a glicerol; Ginsburg fish Ringer associado a DMSO; Ginsburg fish Ringer associado a glicerol; Ginsburg fish Ringer associado a etilenoglicol; Kurokura associado a DMSO e Kurokura associado a glicerol.

TABELA 7. Motilidade espermática expressa em porcentagem (média \pm desvio padrão), do sêmen de piau-açu, diluído em diferentes soluções e incubado a 5°C- 8°C por até 48 horas. Experimento Ic 1º e 2º fase.

Diluidor	Período de incubação (horas)						
	0	0,5	1	2	12	24	48
1º Fase							
Controle	87 \pm 3 ^{aA}	77 \pm 10 ^{bB}	83 \pm 4 ^{aA}	86 \pm 5 ^{aA}	73 \pm 26 ^{bB}	59 \pm 19 ^{cC}	2 \pm 2 ^{cD}
NaHCO ₃ 200mM	80 \pm 9 ^{bA}	82 \pm 11 ^{aA}	84 \pm 5 ^{aA}	81 \pm 13 ^{aA}	8 \pm 8 ^{cB}	0 \pm 0 ^{dB}	0 \pm 0 ^{cB}
NaHCO ₃ 150 mM	86 \pm 8 ^{aA}	88 \pm 3 ^{aA}	91 \pm 4 ^{aA}	91 \pm 5 ^{aA}	7 \pm 6 ^{cB}	0 \pm 0 ^{dB}	0 \pm 0 ^{cB}
NaCl 200mM	82 \pm 4 ^{aA}	84 \pm 9 ^{aA}	86 \pm 3 ^{aA}	89 \pm 7 ^{aA}	87 \pm 6 ^{aA}	85 \pm 4 ^{aA}	59 \pm 7 ^{aB}
Ohta & Izawa	75 \pm 3 ^{bB}	78 \pm 7 ^{bB}	82 \pm 5 ^{aA}	85 \pm 5 ^{aA}	84 \pm 7 ^{aA}	73 \pm 12 ^{bB}	5 \pm 2 ^{cC}
Kurokura	82 \pm 2 ^{aA}	81 \pm 4 ^{bA}	84 \pm 5 ^{aA}	87 \pm 5 ^{aA}	81 \pm 7 ^{aA}	83 \pm 7 ^{aA}	33 \pm 4 ^{bB}
2º Fase							
Controle	84 \pm 5 ^{aA}	84 \pm 3 ^{aA}	83 \pm 3 ^{aA}	86 \pm 4 ^{aA}	26 \pm 5 ^{cB}	8 \pm 2 ^{cC}	1 \pm 1 ^{dC}
Ginsburg fish Ringer I	76 \pm 8 ^{aA}	80 \pm 9 ^{aA}	86 \pm 6 ^{aA}	83 \pm 3 ^{aA}	39 \pm 18 ^{bB}	14 \pm 15 ^{bC}	7 \pm 5 ^{cC}
Ginsburg fish Ringer II	80 \pm 7 ^{aA}	76 \pm 8 ^{aA}	77 \pm 9 ^{bA}	84 \pm 7 ^{aA}	69 \pm 8 ^{aA}	56 \pm 8 ^{aB}	44 \pm 11 ^{aC}
Ginsburg fish Ringer III	82 \pm 4 ^{aA}	80 \pm 10 ^{aA}	79 \pm 12 ^{bA}	80 \pm 10 ^{aA}	43 \pm 9 ^{bB}	17 \pm 23 ^{bC}	9 \pm 9 ^{cC}
Extender II	19 \pm 4 ^{bA}	22 \pm 7 ^{bA}	21 \pm 3 ^{cA}	21 \pm 7 ^{bA}	29 \pm 6 ^{cA}	20 \pm 8 ^{bA}	18 \pm 3 ^{bA}

^{a-d, A-D} Médias com a mesma letra (maiúscula na linha, minúscula na coluna) não diferem entre si dentro de cada fase pelo teste scott-Knott $p < 0,05$.

TABELA 8. Taxa de motilidade espermática expressa em porcentagem (média \pm desvio padrão) do sêmen de piauí, incubado entre 5-8°C com diluidores acrescidos de 10% de crioprotetor por até 48 horas.(Exp.IIa)

Soluções		Período de incubação (horas)				
Diluidor	Crioprotetor	0	0,5	1	24	48
Controle	-----	91 \pm 8 ^{aA}	87 \pm 5 ^{aA}	86 \pm 5 ^{aA}	17 \pm 10 ^{bB}	0 \pm 1 ^{bC}
NaCl 200mM	DMSO	88 \pm 5 ^{aA}	69 \pm 17 ^{bB}	68 \pm 12 ^{bB}	7 \pm 5 ^{cC}	0 \pm 0 ^{bC}
	Glicerol	70 \pm 17 ^{bA}	63 \pm 11 ^{cA}	62 \pm 10 ^{bA}	3 \pm 5 ^{cB}	0 \pm 0 ^{bB}
	Etilenoglicol	80 \pm 27 ^{aA}	74 \pm 12 ^{bA}	68 \pm 17 ^{bB}	0 \pm 0 ^{cC}	1 \pm 0 ^{bC}
	Metanol	90 \pm 9 ^{aA}	74 \pm 19 ^{bB}	77 \pm 14 ^{aB}	3 \pm 5 ^{cC}	0 \pm 0 ^{bC}
Ginsburg fish Ringer	DMSO	73 \pm 5 ^{bA}	39 \pm 9 ^{dB}	19 \pm 12 ^{dC}	0 \pm 0 ^{cD}	1 \pm 0 ^{bD}
	Glicerol	73 \pm 5 ^{bA}	72 \pm 10 ^{bA}	80 \pm 0 ^{aA}	3 \pm 5 ^{cB}	0 \pm 0 ^{bB}
	Etilenoglicol	76 \pm 11 ^{bA}	46 \pm 7 ^{dB}	50 \pm 13 ^{cB}	1 \pm 0 ^{cC}	0 \pm 0 ^{bC}
	Metanol	82 \pm 4 ^{aA}	79 \pm 4 ^{aA}	81 \pm 8 ^{aA}	21 \pm 32 ^{bB}	23 \pm 30 ^{aB}
Kurokura	DMSO	73 \pm 9 ^{bA}	60 \pm 7 ^{cB}	68 \pm 8 ^{bA}	0 \pm 0 ^{cC}	1 \pm 0 ^{bC}
	Glicerol	54 \pm 9 ^{cA}	30 \pm 0 ^{eB}	20 \pm 13 ^{dC}	0 \pm 0 ^{cD}	1 \pm 0 ^{bD}
	Etilenoglicol	84 \pm 7 ^{aA}	73 \pm 7 ^{bB}	84 \pm 8 ^{aA}	3 \pm 5 ^{cC}	0 \pm 0 ^{bC}
	Metanol	92 \pm 6 ^{aA}	88 \pm 4 ^{aA}	92 \pm 4 ^{aA}	63 \pm 10 ^{aB}	14 \pm 12 ^{aC}

^{a-d, A-D} Médias com mesma letra (minúscula na coluna, maiúscula na linha) não diferem entre si (Scott-Knott p < 0,05)

Quando comparadas com o tempo 0 de incubação, 5 soluções além do controle mantiveram altas taxas de motilidade espermática após 30 minutos de incubação: NaCl + glicerol, NaCl + tilenoglicol; G.F.R.II + glicerol, G.F.R.II + metanol e Kurokura + metanol. As amostras de sêmen diluídas em G. F. R.II acrescidas de metanol (79% de motilidade espermática) e Kurokura acrescidas metanol (88%) foram estatisticamente iguais ao controle (87%), após 30 minutos de incubação.

Após 48 horas de incubação, o sêmen diluído em Ginsburg fish Ringer II associado a metanol ainda apresentou 23% de motilidade espermática e o sêmen diluído em Kurokura associado a metanol apresentou 14% de motilidade espermática. As amostras diluídas nas outras soluções, bem como o controle, apresentaram taxas de motilidade espermática muito baixas (até 1%; Tabela 8).

Experimento IIb Os resultados deste experimento mostram que não houve diferença significativa ($p>0,05$) na taxa de motilidade espermática entre o controle (84%) e as 16 combinações de diluidor com crioprotetor, 30 minutos após a incubação, como apresentado na Tabela 9.

Após 48 horas de incubação taxas de motilidade espermática acima de 50% foram observadas nas amostras de sêmen diluídas em soluções de Kurokura com 0%, 5%, 10% e 15% de metanol e Kurokura com 0% e 5% de etilenoglicol. É importante salientar ainda que o sêmen diluído em Kurokura associado a 0%, 5% e 15% de metanol não sofreu efeito do tempo de incubação, mantendo taxas de motilidade espermática semelhantes ($p>0,05$) àquelas registradas logo após a diluição (tempo 0; Tabela 9).

TABELA 9. Taxa de motilidade espermática expressa em porcentagem (média \pm desvio padrão) de sêmen de piaucacu, incubado entre 5°C-8°C com diluidores acrescido de um crioprotetor por até 48 horas.(Exp.IIb)

Soluções			Período de incubação (horas)				
Diluidor	Crioprotetor	% Crioprot.	0	0,5	1	24	48
Controle	-----	-----	87 \pm 6 ^{aA}	84 \pm 7 ^{aA}	90 \pm 1 ^{aA}	42 \pm 24 ^{cB}	23 \pm 20 ^{cC}
NaCl 200mM	Metanol	0	87 \pm 5 ^{aA}	82 \pm 4 ^{aA}	73 \pm 13 ^{aA}	31 \pm 6 ^{dB}	4 \pm 4 ^{dC}
		5	82 \pm 8 ^{aA}	81 \pm 10 ^{aA}	74 \pm 12 ^{aA}	42 \pm 16 ^{cB}	14 \pm 7 ^{cC}
		10	88 \pm 4 ^{aA}	84 \pm 5 ^{aA}	73 \pm 15 ^{aA}	40 \pm 9 ^{cB}	20 \pm 9 ^{cC}
		15	86 \pm 5 ^{aA}	79 \pm 6 ^{aA}	61 \pm 20 ^{bB}	20 \pm 20 ^{dC}	3 \pm 2 ^{dC}
		0	89 \pm 3 ^{aA}	76 \pm 19 ^{aA}	79 \pm 9 ^{aA}	54 \pm 26 ^{bB}	12 \pm 11 ^{cC}
1	Etilenoglico	5	80 \pm 9 ^{aA}	72 \pm 7 ^{aA}	77 \pm 10 ^{aA}	27 \pm 25 ^{dB}	1 \pm 2 ^{dC}
		10	78 \pm 8 ^{aA}	69 \pm 10 ^{aA}	78 \pm 15 ^{aA}	2 \pm 2 ^{eB}	0 \pm 0 ^{dB}
		15	76 \pm 5 ^{aA}	61 \pm 6 ^{aA}	44 \pm 27 ^{cA}	1 \pm 0 ^{eB}	1 \pm 0 ^{dB}
Kurokura	Metanol	0	86 \pm 5 ^{aA}	78 \pm 8 ^{aA}	87 \pm 5 ^{aA}	70 \pm 16 ^{aB}	67 \pm 13 ^{aB}
		5	87 \pm 5 ^{aA}	89 \pm 3 ^{aA}	88 \pm 4 ^{aA}	82 \pm 4 ^{aA}	80 \pm 0 ^{aA}
		10	90 \pm 3 ^{aA}	79 \pm 14 ^{aA}	81 \pm 14 ^{aA}	83 \pm 5 ^{aA}	56 \pm 34 ^{bB}
		15	85 \pm 16 ^{aA}	81 \pm 12 ^{aA}	84 \pm 7 ^{aA}	83 \pm 5 ^{aA}	78 \pm 4 ^{aA}
		0	88 \pm 4 ^{aA}	81 \pm 13 ^{aA}	84 \pm 5 ^{aA}	76 \pm 21 ^{aA}	76 \pm 10 ^{aA}
1	Etilenoglico	5	83 \pm 5 ^{aA}	87 \pm 5 ^{aA}	85 \pm 5 ^{aA}	72 \pm 7 ^{aA}	50 \pm 12 ^{bB}
		10	86 \pm 5 ^{aA}	84 \pm 5 ^{aA}	77 \pm 7 ^{aA}	44 \pm 9 ^{cB}	1 \pm 0 ^{dC}
		15	68 \pm 16 ^{aA}	60 \pm 14 ^{aA}	59 \pm 10 ^{bB}	1 \pm 0 ^{eB}	1 \pm 0 ^{dB}

^{a-c, A-D} Médias com mesma letra (minúscula na coluna, maiúscula na linha) não diferem entre si (Scott-Knott P < 0,05)

5.4 Experimento III - Congelamento do sêmen

No procedimento para o congelamento do sêmen, foi registrado o tempo necessário para a queda da temperatura de 23°C até -80°C, de 1,16 minuto em média, gerando uma velocidade de congelamento de 88,8°C min⁻¹. As amostras precisaram de cerca de 7 minutos para estabilizar a temperatura a -176°C, sob as condições de trabalho com o botijão de vapor de nitrogênio líquido.

As amostra de sêmen congelado em Kurokura acrescidas de 5% de metanol e 5% de etilenoglicol apresentaram motilidade espermática após o descongelamento de 8% e 4%, respectivamente. Sêmen congelado em outras soluções não apresentou motilidade após o descongelamento (Tabela 10).

TABELA 10. Taxa de motilidade espermática expressa em porcentagem (média \pm desvio padrão) do sêmen de piau-açu, criopreservado em diferentes soluções crioprotetoras (Exp.III).

Diluidor	Crioprotetor	Crioprotetor (%)	Motilidade (%)
	Etilenoglicol	5%	4 \pm 6 ^b
		10%	0 \pm 0 ^c
	Kurokura	5%	8 \pm 3 ^a
Metanol		10%	0 \pm 0 ^c
		15%	0 \pm 0 ^c
NaCl	Etilenoglicol	5%	0 \pm 0 ^c
		10%	0 \pm 0 ^c

^{a-c} Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste Scott-Knott $p < 0,05$.

6 DISCUSSÃO

6.1 Características seminais

As características observadas no sêmen de piau-açu, assim como o baixo volume de sêmen produzido (0,13 a 0,79 mL), coincidem com o descrito para as espécies nativas, com exceção dos peixes de couro (Godinho, 2000). Na tentativa de contornar essa dificuldade, alguns estudos foram feitos com o sêmen de piau-açu, coletado diretamente do testículo com o sacrifício do macho (Ribeiro, 2003).

A concentração espermática média do sêmen de piau-açu observada no presente estudo ($4,4 \times 10^9$ spz mL⁻¹) mostra valores relativamente baixos quando comparados com o sêmen de outras espécies. Variadas taxas de concentrações espermática são descritas para diferentes espécies de peixes nativos: piapara *Leporinus elongatus* 7 a 16×10^9 spz.mL⁻¹; pacu-caranha *Piaractus mesopotamicus* 7,1 a $11,1 \times 10^9$ spz.mL⁻¹; dourado *S. maxillosum* 4,3 a 10×10^9 spz.mL⁻¹ (Godinho & Cóser, 1995); curimatã-pacu *Prochilodus marggravii* 19×10^9 spz.mL⁻¹ (Bedore et al., 1997); curimbatá *Prochilodus lineatus* $10,6 \times 10^9$ spz.mL⁻¹ (Franciscato et al., 2002) e pacu *Piaractus mesopotamicus* $18,62 \times 10^9$ spz.mL⁻¹ (Miliorini et al., 2002). Como se pode ver visto, há uma grande variação na concentração espermática entre as diferentes espécies de peixes e até dentre as mesmas espécies. Estas variações podem ser explicadas pela variabilidade genética entre as diferentes espécies e entre indivíduos da mesma espécie, seja pela incidência da época de coleta do sêmen, pelo manejo de manutenção dos reprodutores e pelas condições ambientais da região em que os dados foram coletados.

Os resultados obtidos no presente trabalho mostram que não houve correlação entre peso do reprodutor e concentração espermática e nem entre o volume de sêmen coletado e concentração espermática ($p > 0,05$). No entanto, a correlação entre peso corporal e volume do sêmen apresentou-se significativa com um valor intermediário (0,597), indicando uma possível correlação linear. Convém salientar que é necessário investigar outros fatores, tais como genética, alimentação, época de coleta, etc., para confirmar a correlação entre peso corporal e volume de sêmen coletado.

6.2 Soluções ativadoras da motilidade espermática

Em espécies de peixes de água doce, a motilidade dos espermatozoides é iniciada quando o sêmen entra em contato com a água, pela diminuição da osmolaridade (Inoda, 1987; Carolsfeld & Harvey, 1999). A diferença existente entre a baixa pressão osmótica da água em relação ao plasma seminal é essencial para iniciar a motilidade espermática nessas espécies (Godinho, 2000). O sêmen de peixes de água doce pode tolerar osmolaridades entre 0 e 300 mOsmol L⁻¹ (Dzuba, 2002). Na África do Sul, foi observada osmolaridade do sêmen ao redor de 250 mOsmol L⁻¹ em espécies de água doce (Inoda, 1987). No presente estudo, baixas concentrações (< 75 mM) e conseqüentemente, baixa osmolaridade (< 150 mOsmol L⁻¹) das soluções de NaCl e NaHCO₃, promoveram as melhores taxas de motilidade espermática, classificando essas soluções como ativadoras.

As soluções ativadoras, usadas normalmente em sêmen de espécies nativas, se mostram espécie específica. Mesmo quando os espermatozoides entram em contato com meios de baixa osmolaridade, ocorrem respostas diferentes entre variadas espécies e até mesmo entre o sêmen fresco e criopreservado da mesma espécie (Marques, 2001).

No presente estudo observou-se que o sêmen fresco de piau-açu ativado com solução de NaHCO_3 75 mM apresentou maiores taxas de motilidade espermática em relação ao sêmen ativado com NaHCO_3 119 mM. Na mesma espécie o sêmen ativado com solução de NaHCO_3 50mM apresentou as maiores taxas de motilidade em relação as concentrações de 75 e 119 mM (Viveiro et al., 2003). Resultado diferente foi observado no sêmen criopreservado de piau-açu, em que o NaHCO_3 119 Mm apresentou as maiores taxas de motilidade após ativação (Ribeiro, 2003). Em outras espécies, como pacu *P. mesopotamicus* e piapara *L. elongatus* também tem sido usado com sucesso o NaHCO_3 119 mM como solução ativadora para o sêmen resfriado (Miliorine et al., 2002; Murgas et al., 2002). A solução de NaHCO_3 119 mM demonstrou melhor resultado de ativação espermática em relação a NaHCO_3 59,5 Mm e água destilada no sêmen criopreservado de piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Murgas et al., 2001). Estes resultados mostram um comportamento diferente do sêmen de piau-açu em relação a outras espécies de peixes, sobre ativação espermática com soluções de NaHCO_3 . No entanto o sêmen de pacu *P. mesopotamicus* apresentou as maiores taxas de motilidade espermática quando ativado com solução de NaHCO_3 75 mM, em comparação com concentrações variando de 25 a 200mM (Viveiros, 2003)

Por outro lado, o sêmen fresco de piau-açu ativado com solução de NaCl 25 mM apresentou melhores taxas de motilidade quando comparado com soluções de NaCl em osmolaridades mais altas, como NaHCO_3 75 mM, água destilada e água in natura. Os bons resultados de motilidade espermática obtidos neste estudo com o sêmen de piau-açu ativado com NaCl 25 mM já foram obtidos em outras espécies, como piapara *L. elongatus*, matrinhã *B. lundii*, piracanjuba *B. orbignyanus*, pacu-caranha *P. mesopotamicus*, piau-três-pintas *L. frederici*, curimbatá *P. lineatus* (Marques, 2001); curimbatá *P. lineatus* (Cruz, 2001) e curimatã-pacu *P. marggravii* (Bedore et al., 1997). Em todas estas

espécies, o sêmen resfriado ou fresco apresentou altas taxas de motilidade espermática quando ativado com soluções de NaCl em concentrações de 25 a 75 mM. Portanto o sêmen fresco de piau-açu, quando é ativado com soluções de NaCl em baixas concentrações, apresenta respostas semelhantes ao sêmen de outras espécies nativas.

6.3 Diluidores do sêmen durante o resfriamento

Diferente do processo de ativação do sêmen, o aumento da osmolaridade das soluções proporciona um meio isotônico ao plasma seminal, impedindo a ativação dos espermatozoides. Estas soluções com osmolaridade mais altas são chamadas de soluções diluidoras (Inoda & Morisawa, 1987).

Neste estudo foram testados, em uma espécie nativa, diluidores utilizados anteriormente só em espécies exóticas, como a carpa *Cyprinus carpio* e bagre africano *Clarias gariepinus*. Os diluidores à base de solução salina, como Kurokura e Ginsburg fish Ringer, mantiveram a capacidade de ativação do sêmen de forma semelhante ao NaCl 200 mM. As maiores taxas de motilidade espermática em sêmen resfriado foram observadas nas amostras diluídas em Kurokura (76%), seguidas pelas diluídas em NaCl 200 mM (59%) e Ginsburg fish Ringer (44%), 48 horas após o armazenamento. Estes resultados mostram que os diluidores usados em espécies exóticas podem ser usados com sucesso no sêmen de espécies nativas. Soluções de NaCl em concentrações entre 150 e 200 mM têm sido usadas amplamente como diluidores de sêmen em diferentes espécies de peixes, tais como piau-açu *Leporinus macrocephalus* (Ribeiro, 2003); piapara *Leporinus elongatus*, piau três pintas *Leporinus frederici*, pacu *Piaractus mesopotamicus* e piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Marques, 2001; Bedore et al., 1999).

Apesar de soluções de NaHCO_3 em altas concentrações não ativarem a motilidade espermática em diferentes espécies de peixes, essas soluções são pouco usadas isoladamente como diluidoras. Foi observado neste estudo, que as amostras de sêmen diluídas em NaHCO_3 150 e 200 mM tomaram um aspecto coagulado a partir de 12 horas de incubação a 5°C - 8°C . O líquido desprendido deste coágulo era isento de espermatozóides. A massa coagulada era difícil de ser pipetada e, ao ser observada no microscópio, não era possível identificar os espermatozóides.

Uma solução diluidora deve ser utilizada no processo de criopreservação para facilitar o contato do crioprotetor com a célula espermática, fazendo com que este atinja o interior dos espermatozóides rapidamente. No processo de resfriamento, a diluição diminui a competição dos espermatozóides por O_2 e espaço (Carolsfeld & Harvey, 1999). Portanto, para que o diluidor consiga realizar o efeito esperado, a taxa de diluição é tão importante, quanto a escolha do próprio diluidor. Neste trabalho, a diluição usada de 1:6 (sêmen : diluidor) apresentou bons resultados no processo de resfriamento até 48 horas, proporcionando um ambiente favorável à sobrevivência dos espermatozóides, em comparação com o sêmen não diluído (Tabelas 7 e 8). Diversas taxas de diluição do sêmen tem sido usadas nas espécies de peixe, variando de 1:1 na tilápia, (Harvey & Kelley, 1988) até 1:8, no piau-açu para o processo de criopreservação (Ribeiro, 2003).

6.4 Agentes crioprotetores

No presente estudo, a toxicidade do crioprotetor foi avaliada até 48 horas após sua adição ao sêmen. Este método permite visualizar os efeitos tóxicos do crioprotetor por um período mais longo, permitindo a manipulação do

sêmen de acordo com o objetivo desejado. Na criopreservação, é importante observar a toxicidade do crioprotetor por um período suficiente para manipular o sêmen, antes de iniciar o congelamento, geralmente em torno de 30 minutos. No resfriamento, entretanto, é interessante observar o comportamento tóxico dos crioprotetores em relação ao sêmen por um período mais longo, como as 48 horas estudadas neste experimento. Ao contrário do que foi feito neste estudo, a toxicidade de crioprotetores foi determinada observando-se a taxa de motilidade espermática imediatamente após a adição do crioprotetor ao sêmen de piau-açu *L. macrocephalus* (Ribeiro, 2003) e curimatá *P. lineatus* (Cruz, 2000).

A toxicidade dos crioprotetores parece ser espécie específica, pois após a adição de um mesmo crioprotetor ao sêmen, as taxas de motilidade espermática permanecem altas em algumas espécies e baixas ou até nulas em outras (Bedore, 1999). Deve-se salientar também que há uma interação entre os componentes da solução diluidora e crioprotetor, pois um determinado crioprotetor, quando associado a diferentes diluidores, apresenta variação na taxa de motilidade espermática no sêmen de uma mesma espécie (Jamieson & Leung, 1991).

Nesse sentido, é importante observar que a solução crioprotetora (diluidor associado a um crioprotetor) não deve somente proteger os espermatozóides contra crioinjúria, mas também mantê-los imóveis durante o congelamento e descongelamento, pois a presença de motilidade nestas fases, consome a energia (ATP) necessária para a motilidade dos espermatozóides pós descongelamento (Ginbons et al., 1985; Oda & Morisawa, 1993; Ohta et al., 1995).

As taxas de motilidade espermática observadas no presente estudo após resfriamento do sêmen de piau-açu diluído em Kurokura associado ou não ao metanol por 48 horas, foram bastante altas (80%), enquanto que o sêmen não diluído apresentou motilidade bastante baixa (4%). Estes resultados mostram a

necessidade de se diluir sêmen a ser resfriado e a não necessidade de se acrescentar um crioprotetor.

6.5 Congelamento do sêmen

A velocidade de congelamento do congelador de vapor de nitrogênio líquido observada neste estudo, entre 23°C até -176°C, foi de 88,8°C.min⁻¹. No mesmo tipo de botijão já foi registrada velocidade de congelamento entre 17,9 e 52,9°C min⁻¹ levando a temperatura de 0 a -60°C (Cruz, 2001). Carolsfeld et al. (2003) observou velocidade de congelamento de 45°C min⁻¹ levando a temperatura de 8°C até -150°C.

A temperatura de estabilização da temperatura dentro do botijão encontrada no presente estudo, foi de -176°C semelhante a -180°C encontrada por Harvey & Carolsfeld (1993).

A velocidade de congelamento obtida no botijão de vapor de nitrogênio pode ser afetada pelo estado de conservação do botijão, tempo para sua estabilização e frequência de uso dentre outros (Bedore, 1999). A temperatura de estabilização encontrada no presente estudo foi de -176°C, semelhante a -180°C encontrada por Harvey & Carolsfeld (1993).

Após o descongelamento, foi observada baixa taxa de motilidade em todos os tratamentos. A mais alta taxa de motilidade (8%) foi observada quando o sêmen foi congelado em Kurokura acrescido de 5% de metanol. Usando o mesmo modelo de botijão no congelamento do sêmen de piau-açu, foi observado taxa de motilidade de 40% após o descongelamento do sêmen diluído em glicose, gema de ovo, DMSO e água destilada, em comparação com 79% de motilidade no sêmen fresco (Ribeiro, 2003). Em outras espécies de piracema, velocidades de congelamento entre 20°C e 100°C min⁻¹ foram usadas com

sucesso para o sêmen de dourado *S. maxillosus* e curimatá *P. scrofa* (Coser, 1984), como também em piracanjuba *B. orbignyanus* (Murgas et al., 2001). Já usando outro tipo de equipamento, um freezer computadorizado, foi usada com sucesso uma velocidade de congelamento mais baixa ($5^{\circ}\text{C min}^{-1}$) para o sêmen de bagre africano *C. gariepinus* e transferido ao nitrogênio líquido a -50°C . O sêmen foi diluído em Ginsburg fish Ringer II e metanol; após o descongelamento, proporcionou 85% de taxa de eclosão dos ovos, igual ao sêmen fresco, de 55,7% de eclosão (Viveiros et al., 2000).

A desidratação da célula está diretamente relacionada à velocidade de congelamento. Baixa velocidade de congelamento promove grande perda de água para o meio extracelular; no entanto, alta velocidade promove pouca perda de água (Meryman et al., 1977; Ashwood-Smith, 1986). A desidratação da célula é necessária para evitar a formação de gelo intracelular e conseqüente rompimento da membrana. Além da velocidade de congelamento, um aumento na concentração de soluto no meio extracelular aumenta a desidratação da célula e diminui o ponto de congelamento. Esta relação ocorre até baixas temperaturas como -100 a -120°C (Jamieson, 1991).

A velocidade de descongelamento deve ser semelhante à velocidade de congelamento, a fim de proporcionar um equilíbrio na perda e no ganho de água pela célula nos processos de desidratação e hidratação, respectivamente. A maioria das células suporta um descongelamento rápido, mesmo que ela não se hidrate totalmente. A rapidez no descongelamento é necessária para evitar a recristalização, ou seja, o reagrupamento de pequenos cristais de gelo em grandes cristais de gelo no interior da célula, sendo letal para a mesma (Stoss et al., 1983; Jamieson, 1991; Carolsfeld & Harvey, 1999).

Nesse estudo, foi usado uma alta temperatura na água do banho-maria (60°C), a fim de que a velocidade de descongelamento fosse bastante rápida, uma vez que o congelamento também foi bastante rápido. Entretanto, as taxas de

motilidade espermática após o descongelamento foram muito baixas. Na mesma espécie, piau-açu, o descongelamento realizado em banho-maria a 30°C, por 6 segundos, foi capaz de promover taxas de motilidade espermática de 44% (Ribeiro, 2003). Já em outras espécies de piracema, foram usadas temperaturas do banho-maria entre 26°C e 60°C, com um tempo de exposição entre 5 a 14 minutos (Silva, 2000; Murgas et al., 2001; Cruz, 2001; Bedore, 1999).

As baixas taxas de motilidade espermática observadas no presente estudo, após descongelamento, podem ter sido causadas pela ausência de um crioprotetor externo, como açúcares e proteínas. No sêmen criopreservado de piau-açu diluído em soluções de glicose acescida de gema de ovo e DMSO, foram obtidas taxas de motilidade de 44% após descongelamento (Ribeiro, 2003). No entanto, soluções contendo apenas um crioprotetor interno já foram usadas no processo de criopreservação do sêmen de outras espécies. Soluções como NaCl associado a DMSO foram utilizadas em dourado *S. maxillosus* e curimatá *P. scrofa*, obtendo-se, após descongelamento, taxas de motilidade 40% e 5% para cada espécie, respectivamente (Cóser, 1984). Também no dourado *S. maxillosus* usando soluções salinas simples de Saad (NaCl 200 mM, Tris 30 mM, pH 7,0) associado a um crioprotetor interno, foram obtidas taxas motilidade acima de 60% após descongelamento (A. N. Maria, informação pessoal).

Outra possível causa da baixas taxas de motilidade espermática após o descongelamento, pode ser a alta diluição usada neste experimento (1:100). Uma alta taxa de diluição faz com que os crioprotetores não entre em contato com a célula espermática, em uma proporção suficiente para proporcionar uma completa proteção dos espermatozoides. A diluição que tem sido usada para o processo de criopreservação varia entre 1:1 no sêmen de tilápia (Harvey & Kelley, 1988) e 1:10 no sêmen de bagre africano *C. gariepinus* (Vieiros et al.,)

7 CONCLUSÕES

Nas condições do presente estudo pôde-se concluir que:

- o sêmen de piau-açu possui uma aparência viscosa e branca, apresentando em média, menos de 0,5 mL de volume e concentrações, em média, acima de 4×10^9 espermatozóiide por mL;
- a solução ativadora da motilidade espermática mais indicada para o sêmen de piau-açu é NaCl 25 mM;
- para ser resfriado (5°C - 8°C) por 48 horas e manter boa qualidade, o sêmen de piau-açu deverá ser diluído em Kurokura;
- não há vantagens em se acrescentar um crioprotetor interno na solução diluidora de Kurokura para preservação a 5°C - 8°C do sêmen de piau-açu;
- as baixas taxas de motilidade espermática observadas após o descongelamento não permitiram concluir sobre uma solução crioprotetora eficiente para o congelamento do sêmen desta espécie.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, A. A. **Ciclo Reprodutivo Anual em Machos de Leporinus macrocephalus**. 1998. 64 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.

ASHWOOD-SMITH, M. J. The cryopreservation of human embryos. **Human Reproduction**, Oxford, v. 1, n. 5, p. 319-332, Aug. 1986.

BABIAK, I. J.; GLOGOWSKI, E.; BRZUSKA, J.; SZUMIEC, J. A. Cryopreservation of sperm of common carp, (*Cyprinus carpio*). **Aquaculture Research**, Amsterdam, v. 28 n. 7. p. 567-571, 1997

BEDORE, A. G. **Característica e conservação do sêmen de Pacu-Caranha (Piaractus mesopotamicus) e de Piracanjuba (Brycon orbgnyanus)**. 1999. 53 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

BEDORE, A. G.; CARDOSO, E. L.; GODINHO, H. P. **Biologia do sêmen do Curimatã-pacu (Prochilodus marggravi)**. Departamento de Morfologia, ICB/UFMG, 1997.

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

BILLARD, R. Ultraestrutura comparée de spermatozoides de quelques poissons téléostéens. In: BACCETTI, (Ed.). **Comparative spermatology**. New York: Academic Press, 1970. p. 71-80

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

CAROLSFELD, J.; HARVEY, B. J. **Conservação de recursos genéticos em peixes: teoria e prática**. Curso de treinamento brasileiro. Tradução H. P. Godinho. Victória, Canadá: World fisheries Trut, 1999. p. 47. Datilografado.

CASTAGNOLLI, N. **Criação de peixes de água doce**. Jaboticabal: FUNEP, 1992. 189 p

CHAO, N. H.; CHAO, W. C.; LIU, K. C.; LIAO, I-C. The properties of tilapia sperm and its cryopreservation. **Journal of Fish Biology**, Oxford, v. 30, n. 2, p.107-118, Feb. 1987.

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

COSER, A. M. L.; GODINHO, H. P.; TORQUATO, V. C. Criopreservação do sêmen do peixe Piau *Leporinus silvestrii* (oulangier, 1902). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e zootecnica**, Belo Horizonte, v. 98, n. 1, p. 37-42, Fev. 1987.

CRUZ, V. L. B. **Criopreservação do sêmen de curimatá (*Prochilodus lineatus*)**. 2001. 59 p. Dissertação (Mestrado) - Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

FRANSCISCATO, R. T.; MURGAS, L. S. D.; MILIORINI, A. B.; SILVA, M. O. B.; LOGATO, P. V. R. . Qualidade do sêmen de Curimatá (*Prochilodus lineatus*) e taxa de fertilidade após resfriamento. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 26, n.3, p. 213-215, jul/set. 2002.

GARAVELLO, J. C.; BRITSKI, H. A. *Leporinus macrocephalus* sp. N. da bacia do Rio Paraguai (Ostariophysi, Anostomidae). **Naturalia**, São Paulo, v. 13, p. 67-74, 1988.

GINSBURG, A. S. Sperm-egg association and its relationship fishes. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, Cambs, v. 11, n. 1, p.13-33, 1963.

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

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

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. 15. ICLARM Conference proceedings. Bangkok, Thailand: Department of Fisheries; Manila, Philippines: International Center for Living Aquatic Resources Management, 1988. 623 p.

HARVEY, B.; CAROLSFELD, J. **Induced breeding in tropical fish culture.** Ottawa, Canada. Technical editor: G C R Croomel. International Development Research Centre. 1993.

HARVEY, B. Cryopreservation of *Sarotherodon mossambicus* spermatozoa. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 32, n. 3/4, p. 313-320, 1983.

HANCOCK, J. L. 1957. The morphology of boar spermatozoa. **Journal of the Royal Microscopical Society**, Oxford, v, 76, n. 1, p. 76-84, 1957.

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**, Amsterdam, v. 31, n. 3, p. 317-324, Mar. 2000.

INODA T.; MORISAWA M. Effect of osmolality on the initiation of sperm motility in *Xenopus laevis*. **Comparative Biochemistry and Physiology, A – Physiology**, Oxford, v. 88, n. 3, p. 539-542, 1987.

JAMIESON G. M. B. **Fish evolution and systematics:** evidence from spermatozoa. Sydney, Australia: Department of Zoology University of Queensland Brisbane, 1991. 317 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, 1991b. Cap. 5, p. 56-72.

KAVAMOTO, E. T.; FOGLI DA SILVEIRA, W.; GODINHO, M. G.; Romagosa, E. Conservação em nitrogênio líquido do semen de *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 16, p. 29-36, 1989.

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

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

LAHNSTEINER, F. Introduction to the special issue on 'Cryopreservation of gametes in aquatic species'. **Aquaculture Research**, Amsterdam, v. 31, n. 3, p. 229-229, Mar. 2000.

LEUNG, L. K. P.; JAMIESON, B. G. M. Live preservation of fish gametes. In: JAMIESON, B. G. M. Fish evolution and systematics: evidence from spermatozoa. Cambridge, Cambridge University Press, 1991, p. 245-269

LOCK, E. J. **A comparative study on cryoprotectant toxicity and freezing rates of catfish (*Clarias gariepinus*), Cyprinus carpio) and eel (*Anguilla anguilla*) sperm**. Wageningen: Wageningen University. Department of Animal Sciences, 2002. 23 p.

MANSOUR, N.; LAHNSTEINER, F.; PATZNER, R. A. The spermatozoon of the African catfish: fine structure, motility, viability and its behaviour in seminal vesicle secretion. **Journal of Fish Biology**, London, v. 60, n. 3, p. 545-560, Mar. 2002.

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

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

MURGAS, L. D. S.; FRANCISCATO, R. T.; MILIORINI, A. B.; SILVA, M. O. B.; MARIA, A. N. Viabilidade seminal de Piapara (*Leporinus obtusidens*), empregando diferentes diluentes, no resfriamento do sêmen à 4°C. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 26, n. 3, p. 211-213, jul./set. 2002.

MURGAS, L. D. S.; GUALHANONE, A.; SILVA, M. O. B.; MELLO, C. B. FREITAS, R. T. F.; ZANGERONIMO, M. G. Calidad seminal del pez piracanjuba (*Brycon orbignyianus*) post-descongelación. **NA. VET. (MURCIA)** 17:3-10(2001)

OTHA, H.; IZAWA, T. Diluent for cool storage of the Japanese eel *Anguilla japonica* spermatozoa. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 142, n. 1/2, p. 107-118, June 1996.

OHTA, H.; KAWAMURA, K.; UNUMA, T.; TAKEGOSHI, Y. Cryopreservation of sperm of the Japanese bitterling. **Journal of Fish Biology**, Oxford, v. 58, n. 3, p. 670-681, Mar. 2001.

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

RENARD, J. P. AND BABINET, C. High survival of mouse embryos after rapid freezing and thawing in side plastic straws with 1, 2 propanediol as cryoprotectant. **Journal of experimental Zoology**, New York, v. 230, n. 3, p. 443-448, 1984.

RICHARDSON, G. F.; MILLER, T. L.; MCNIVEN, M. A. Cryopreservation of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.), semen in various extenders and in three sizes of straw. **Aquaculture Research**, Amsterdam, v. 31, n. 3, p. 307-315, Mar. 2000.

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

SAAD, A.; HOLLEBECQ, M. G.; BILLARD, R.; PIONNIER, E. AND HEYMAM, A. Production spermatogénétique, dilution et conservation du sperm du silure européen *Silurus glanis*. In: **SZYMPOSIO SOBRE CULTIVO INTENSIVO DE PECES CONTINENTALES**, 1988, Madrid: Asociación Española de Acuicultura, 1988.

SALLUM, W. B. **Reprodução das Principais Espécies de Peixes**. Lavras: UFLA/FAEP, 1999. 47 p.

SATO, Y. **Reprodução de peixes da bacia do rio São Francisco: indução e caracterização de padrões**. São Carlos: Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Universidade Federal de São Carlos, 1999.

SILVA, E. B. **Avaliação comparativa da utilização do sêmen criopreservado e fresco na fertilização dos óvulos de curimatã *Prochilodus lineatus***. 2000. Dissertação (Mestrado) - Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis.

SILVEIRA, A. N. **Caracterização espermática, preservação criogênica do sêmen e fertilidade do matrinxã, (*Brycon cephalus*)**. 2000. 45 p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.

SILVEIRA, W. F.; KAVAMOTO, E. T.; RIGOLINO, M. G.; TABATA, Y. A. SOARES, H. A. VERISSIMO, R. Congelamento do sêmen da truta arco-iris, *Oncorhynchus mykiss*, em vapor de nitrogênio líquido. **Boletim Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 21, p. 55-60, 1994.

STOSS, J.; HOLTZ, W. Successful storage of chilled rainbow trout (*Salmo gairdneri*) spermatozoa for up to 34 days. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 31, n. 2/4, p. 269-274, 1983.

TANAKA, S. H.; ZHANG, N.; HORIE, Y.; YAMADA, A.; OKAMURA, T.; UTOH, N. MIKAWA, N.; OKA, H. P.; KUROKURA, H. Long-term cryopreservation of sperm of Japanese eel. **Journal of Fish Biology**, Oxford, v. 60, n. 1, p. 139-146, 2002b.

VERRETH, J. **Biology of fish larval production An international course**. Fish culture and Fisheries Group, Wageningen Institute of Animal Science, Wageningen University. The Netherlands. April 19-24, 1999.

Viveiros, A. T. M.; Murgas, L. S. D.; Maria, A. N.; Moraes, G. F.; Silva, M. O. B.; Oliveira, A. V. **The effects of sodium chloride and sodium bicarbonate on sperm motility of pacu, *Piaractus mesopotamicus***. In: *World Aquaculture 2003: Proceeding of an World Aquaculture 2003, held at Salvador, Bahia*, (edited by Society, W. A.) pp. 825 abstr.

Viveiros, A. T. M.; Murgas, L. S. D.; Moraes, G. F.; Maria, A. N.; Silva, M. O. B.; Oliveira, A. V. **The effects of sodium chloride and sodium bicarbonate on sperm motility of piau-açu, *Leporinus macrocephalus***. In: *World Aquaculture 2003: Proceeding of an World Aquaculture 2003, held at Salvador, Bahia*, (edited by Society, W. A.) pp. 824 abstr.

VIVEIROS A. T. M. **Semen collection and preservation in African Catfish (*Clarias gariepinus*)**. 2002. 144 p. Thesis (PhD) - Wageningen University, The Netherlands.

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

VIVEIROS A. T. M. **Semen collection and preservation in African catfish (*Clarias gariepinus*)**. 2002. 144 p. Thesis (PhD thesis) - Wageningen University, Wageningen - The Netherlands.

WOYNAROVICH, E.; HORVATH, L. **A Propagação artificial de peixes de águas tropicais**: manual de extensão: tradução de Vera L. M. Chama. Brasília: FAO/CODEVASF/CNPq. 1989. 225 p.

ANEXOS

ANEXO 1. Análise de variância do efeito de soluções de NaCl e NaHCO ₃ sobre a taxa de motilidade espermática (exp.Ia).....	62
ANEXO 2. Análise de variância do efeito de soluções ativadoras da motilidade espermática (Exp. Ib).....	63
ANEXO 3. Análise de variância do efeito de soluções diluidoras do sêmen. (Exp. Ic 1ª fase).....	64
ANEXO 4 Análise de variância do efeito de soluções diluidoras do sêmen. (Exp. Ic 2ª fase).....	65
ANEXO 5. Análise de variância do efeito de soluções diluidoras acrescida de 10% de crioprotetores (Exp.IIa).....	66
ANEXO 6. Análise de variância do efeito de soluções diluidoras acrescidas de crioprotetores na preservação do sêmen (Exp. IIb).....	67
ANEXO 7. Análise de variância do efeito de soluções crioprotetoras no congelamento do sêmen (Exp. III).....	68

ANEXO I

ANÁLISE DE VARIANCA DO EFEITO DE SOLUÇÕES DE NaCl E NaHCO₃ SOBRE A TAXA DE MOTILIDADE ESPERMÁTICA (EXP. IA)

NaCl

FV	GL	QM	Fc	Pr>Fc
BLOCO	2	196.761905	2.942	0.0912
TRAT.	6	2861.777778	42.794	0.0000
erro	12	66.873016		
Total corrigido	20	18366.666667		
CV (%) =	29.56			
Média geral:	27.6666667	Número de observações:	21	

NaHCO₃

FV	GL	QM	Fc	Pr>Fc
BLOCO	2	1220.333333	5.657	0.0186
TRAT.	6	3179.269841	14.738	0.0001
erro	12	215.722222		
Total corrigido	20	24104.952381		
CV (%) =	43.26			
Média geral:	33.9523810	Número de observações:	21	

ANEXO 2

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EFEITO DE SOLUÇÕES ATIVADORAS DA MOTILIDADE ESPERMÁTICA (EXP. Ib)

FV	GL	QM	Fc	Pr>Fc
BLOCO	2	120.555556	7.041	0.0025
TRAT	4	2500.555556	15.712	0.0000
erro	38	59.152047		
Total corrigido	44	18291.111111		
CV (%) =	19.28			
Média geral:	65.444444		Número de observações:	45

ANEXO 3

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EFEITO DE SOLUÇÕES DILUIDORAS DO SÊMEN (EXP. IC 1ª FASE)

FV	GL	QM	Fc	Pr>Fc
BLOCO	2	1886.637566	7.402	0.0081
TEMPO	6	36556.227513	143.426	0.0000
erro 1	12	254.878307		
TRAT	5	11021.839153	250.411	0.0000
TEMPO*TRAT	30	3723.357672	84.593	0.0000
erro 2	322	14172.851852	44.	015068
Total corrigido	377	407151.957672		
CV 1 (%) =	24.40			
CV 2 (%) =	10.14			
Média geral:	65.4179894	Número de observações:	378	

ANEXO 4

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EFEITO DE SOLUÇÕES DILUIDORAS DO SÊMEN (EXP. IC 2ª FASE)

FV	GL	QM	Fc	Pr>Fc
BLOCO	2	6291.622222	3.251	0.0744
TEMPO	6	32030.980952	16.550	0.0000
erro 1	12	1935.433333		
TRAT	4	27892.869841	16.436	0.0000
TEMPO*TRAT	24	3545.999471	2.090	0.0027
erro 2	266	1697.012531		
Total corrigido	314	876075.130159		
CV 1 (%) =	82.60			
CV 2 (%) =	77.34			
Média geral:	53.2634921	Número de observações:	315	

ANEXO 5

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EFEITO DE SOLUÇÕES DILUIDORAS
ACRESCIDAS DE 10% DE CRIOPROTETORES (EXP.IIa)

FV	GL	QM	Fc	Pr>Fc
BLOCO	3	076.977117	1.823	0.1711
TRAT	12	7606.543875	12.876	0.0000
erro 1	23	590.769168		
TEMPO	4	47960.494017	1817.335	0.0000
TRAT*TEMPO	48	1107.281054	13.600	0.0000
erro 2	494	81.416194		
Total corrigido		584	793308.215385	
CV 1 (%) =	54.55			
CV 2 (%) =	20.25			
Média geral:	44.5589744	Número de observações:	585	

ANEXO 6

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EFEITO DE SOLÇÕES DILUIDORAS
ACRESCIDAS DE CRIOPROTETORES NA PRESERVAÇÃO DO SÊMEN
(EXP. IIb)

FV	GL	QM	Fc	Pr>Fc
BLOCO	2	4696.236601	6.527	0.0042
TRAT	16	10856.666340	15.090	0.0000
erro 1	32	719.468546		
TEMPO	4	89507.341830	137.626	0.0000
erro 2	8	650.367320		
TEMPO*TRAT	64	1987.534191	25.035	0.0000
erro 3	638	79.388776		
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>				
Total corrigido	764	747206.661438		
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>				
CV 1 (%) =	43.03			
CV 2 (%) =	40.91			
CV 3 (%) =	14.29			
Média geral:	62.3359477	Número de observações:	765	

ANEXO 7

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO EFEITO DE SOLUÇÕES CRIOPROTETORAS NO CONGELAMENTO DO SÊMEN (EXP. VI)

FV .	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Repetição .	2	75.523810	37.761905	6.961	0.0020
Trat	6	579.269841	96.544974	17.798	0.0000
erro	54	292.920635	5.424456		
Total corrigido	62	947.714286			
CV (%) =	128.71				
Média geral:	1.8095238		Número de observações:	63	