

REPRODUÇÃO INDUZIDA DE JAÚ (*Zungaro jahu*): ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS SEMINAIS E OVOCITÁRIAS

MARIANA MARTINS DRUMOND

2008

MARIANA MARTINS DRUMOND

**REPRODUÇÃO INDUZIDA DE JAÚ (*Zungaro jahu*): ANÁLISE
DAS CARACTERÍSTICAS SEMINAIS E OVOCITÁRIAS**

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

Orientador
Prof. Dr. Luis David Solis Murgas

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2008

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

Drumond, Mariana Martins.

Reprodução induzida de jaú (*Zungaro jahu*) análise das características
seminais e ovocitárias / Mariana Martins Drumond. – Lavras: UFLA,
2008.

102 p. : il.

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

Orientador: Luis David Solis Murgas.

Bibliografia.

1. Protocolo hormonal. 2. Reprodução induzida. 3. Criopreservação. 4.
Desenvolvimento ovocitário. 5. Microscopia eletrônica. 6. Temperatura. 7.
Pluviosidade. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 639.3752

MARIANA MARTINS DRUMOND

**REPRODUÇÃO INDUZIDA DE JAÚ (*Zungaro jahu*): ANÁLISE
DAS CARACTERÍSTICAS SEMINAIS E OVOCITÁRIAS**

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

APROVADA em 12 de fevereiro de 2008.

Prof. Priscila Vieira Rosa Logato

UFLA

Prof. Paulo dos Santos Pompeu

UFLA

Pof. Paula Adriane Perez Ribeiro

UNIFENAS

Prof. Luis David Solis Murgas
UFLA
(Orientador)

LAVRAS – MINAS GERAIS
BRASIL

À Deus,

por toda sua sabedoria e misericórdia.

Aos meus pais Jamerson e Marta e ao meu irmão Tiago,

Pelo amor e por todo o esforço que fizeram para que pudesse chegar até aqui.

Ao Renato, por conviver e aceitar a minha ausência e pelo amor incondicional.

OFEREÇO

Aos meus avós, Edith e Vicente, pela confiança e pelo orgulho demonstrado nos momentos em que fraquejei.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luis David Solis Murgas, pela orientação e confiança.

À Prof. Dra. Priscila Logato, pela amizade e compreensão em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Nilo Bazzoli, por me guiar por este caminho e por todos os ensinamentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Lavras, pela aceitação e oportunidade de realizar o mestrado.

Ao Instituto Estadual de Florestas de Minas Gerais, IEF, pelo apoio financeiro para realização do projeto já;

À CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior, pela concessão da bolsa;

À Estação Ambiental de Volta Grande (CEMIG), nas pessoas dos Biólogos João de Magalhães Lopes e Alessandra Bedore, por todo o apoio e auxílio durante a execução deste projeto.

Ao laboratório do Departamento de Ciências dos Solos, pela disponibilização de equipamentos indispensáveis à realização das análises.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica (DFP), em especial ao Prof. Eduardo Alves e à Elo, por toda a colaboração.

Aos funcionários e amigos Willian César Cortez e Marcos Antônio Machado (DMV) por toda a ajuda e pelos bons momentos que passamos nestes quase dois anos.

Aos amigos da Estação Ambiental de Volta Grande: Caissor, Rubão, Sônia, Robertinha, Lê, João, Gonzaga e a todos aqueles que eu não me lembro o nome, mas quem eu levo no coração;

Aos amigos que fiz aqui, Gilmara Junqueira Machado Pereira, Viviane Felizardo, Juliana Milan, Ana Luísa Alvarenga, Daniel Okamura, Felipe Guedes de Araújo, Rafael Venâncio de Araújo, Ulisses Simon da Silveira, Paulinha, por toda disponibilidade, colaboração e “socorros” quando necessário.

Aos meus amigos de BH, Camilitx, Lu e Tati, sempre acreditaram em mim, desde as épocas de faculdade e que, mesmo de longe continuaram a demonstrar amor e carinho.

À minha família, desde os mais próximos aos mais distantes, Tios Thales, Cláudio, Jackson, Tias Tânia, Zulmira, Regina, Janice, Dulce, aos primos Ju, Pat, Edith, Gu, Lulu, Pepe, Nina, Ana Júlia, Carol e Taninha e os primos tortos “Dr. Thiago”, Paulo e Douglas. (Desculpe se esqueci alguém).

Enfim, a todos que de perto ou de longe contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

Mariana Martins Drumond, filha de Marta Cristina Martins Drumond e Jamerson Zuim Drumond, nasceu dia 15 de julho de 1981 na cidade de Belo Horizonte, MG.

Em 1998 formou-se no ensino médio no Colégio Sistema. No segundo semestre de 1999 ingressou no curso de Farmácia no Unicentro Newton Paiva.

No início de 2000, abandonou o curso de Farmácia e ingressou no curso de formação técnica em Patologia Clínica. Quando, no último período do curso, foi aprovada no vestibular da PUC Minas, Belo Horizonte para o curso de Biologia, no qual se formou e, em dezembro de 2005, recebeu o título de Bacharel Licenciada em Ciências Biológicas.

Logo depois de formada, foi empossada como Professora de Biologia, concursada, do Governo do Estado de Minas Gerais lecionando por seis meses na Escola Estadual Professor Pedro Aleixo. Deixou o cargo em julho de 2006 para se dedicar ao mestrado em zootecnia na Universidade Federal de Lavras, trabalhando com o que mais gosta e admira: os peixes.

Defendeu sua dissertação no dia 12 de fevereiro de 2008 e, em 25 de fevereiro do mesmo ano, iniciou seu doutorado em zootecnia pela Universidade Federal de Minas Gerais.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	i
GENERAL ABSTRACT	iii
1 REVISÃO DE LITERATURA	01
1.1 A espécie em estudo – Jaú (<i>Zungaro jahu</i>)	01
1.2 Reprodução Induzida	02
1.2.1 Hormônios utilizados	05
1.3 Sêmen	09
1.3.1 Qualidade espermática	09
1.3.2 Características gerais do sêmen de peixes	10
1.3.3 Iniciação da motilidade espermática	11
1.3.4 Morfologia espermática	11
1.3.5 Congelamento do sêmen de peixes	12
1.3.6 Soluções diluidoras e proporção de diluição em peixes	14
1.3.7 Soluções crioprotetoras do sêmen de peixes	16
1.3.8 O descongelamento do sêmen de peixes	19
1.4 Ovócito	19
1.4.1 Desenvolvimento ovocitário	19
1.4.2 Crescimento pré-vitelogênico	20
1.4.3 Vitelogênese e sua regulação	21
1.4.4 Crescimento vitelogênico	22
1.4.5 Formação do vitelo	23
1.4.6 Maturação	23
1.4.7 Ovulação	24
1.4.8 Qualidade ovocitária	25
Referências bibliográficas	27
II DESENVOLVIMENTO DE PROTOCOLO PARA INDUÇÃO HORMONAL DA REPRODUÇÃO DE JAÚ <i>Zungaro jaú.</i>	41
Resumo	42
Introdução	43
Material e métodos	44
Resultados	49
Discussão	51
Conclusão	55
Referências bibliográficas	55
III CARACTERÍSTICAS DO SÊMEN DE JAÚ (<i>Zungaro jahu</i>) <i>in natura</i> E PÓS-DESCONGELAMENTO: AÇÃO DOS DILUIDORES E CRIOPROTETORES SOBRE A	59

	MORFOLOGIA ESPERMÁTICA.	
	Resumo	60
	Introdução	61
	Material e métodos	63
	Resultados e discussão	68
	Conclusão	79
	Referências bibliográficas	79
IV	DESENVOLVIMENTO GONADAL DE FÊMEAS DE JAÚ (<i>Zungaro jahu</i>): ANÁLISES MICROSCÓPICAS E ULTRAESTRUTURAIS	83
	Resumo	84
	Introdução	85
	Material e métodos	87
	Resultados e discussão	89
	Conclusão	98
	Referências bibliográficas	99

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 A espécie em estudo – Jaú (*Zungaro jahu*)

Reino: Animalia;

Filo: Chordata;

Classe: Actinopterygii;

Ordem: Siluriformes

Família: Pimelodidae;

Gênero: *Zungaro*;

Espécie: *Zungaro jahu* (Ihering, 1898)

O jaú, *Zungaro jahu* (Figura 1), é espécie endêmica dos rios que formam a bacia do rio da Prata, nos rios Paraná, Paraguai e Uruguai, ocorrendo na Argentina, Bolívia, Brasil e Paraguai (Lundberg & Littmann, 2003; Zaniboni Filho & Schulz, 2003). É um dos maiores bagres neotropicais e pode atingir pesos superiores a 150kg. É uma espécie de piracema, mas seus deslocamentos reprodutivos são pouco conhecidos (Agostinho et al., 2003; Resende, 2003).



FIGURA 1: Exemplar de jaú (*Z. jahu*).

A espécie atinge sua maturidade sexual, em média, aos 70cm de comprimento total (CT) e se reproduz, no alto rio Paraná, entre os meses de

dezembro e fevereiro (Agostinho et al., 2003). Uma fêmea adulta pode desovar até 75000 ovos por quilo de peso corporal. Esta alta fecundidade compensa a baixa taxa de sobrevivência das larvas e alevinos, bastante susceptíveis à predação em ambientes naturais.

Evidências circunstanciais mostram que seus estoques naturais encontram-se muito reduzidos devido, possivelmente, às alterações e destruição de seu hábitat. Por estas razões, o jaú está incluído na lista oficial de espécies ameaçadas de extinção do estado de Minas Gerais (Minas Gerais, 1996) e no Livro Vermelho das espécies ameaçadas de extinção do estado de Minas Gerais (Machado et al., 1998).

Sua reprodução em cativeiro, assim como para a maioria das espécies de piracema, só é possível através da indução da desova por meio de metodologias específicas.

1.2 Reprodução induzida

O desenvolvimento da piscicultura mundial esteve centrado, durante séculos, no cultivo de peixes que se reproduzem naturalmente em ambientes lênticos, apesar dos peixes migradores apresentarem maior valor comercial. Essa tendência foi motivada pela dificuldade em se induzir a reprodução dessas espécies (Zaniboni Filho & Weingartner, 2007).

Entre as principais técnicas de reprodução artificial, se destaca, de modo geral, a indução reprodutiva hormonal, de peixes reofílicos, que realizam migrações reprodutivas. Pelo fato dos sistemas de cultivo reproduzirem ambientes lênticos, esses animais deixam de receber certos estímulos externos, fazendo com que não haja uma resposta endócrina

apropriada para a indução da maturação gonadal final, daí a importância da indução hormonal (Andrade & Yasui, 2003).

Os primeiros trabalhos de indução à desova de peixes reofílicos foram desenvolvidos paralelamente na Argentina (Houssay, 1930) e no Brasil (Ihering, 1935), quando foram obtidos resultados positivos de indução à maturação final de peixes migradores, a partir da aplicação de hormônios presentes na hipófise de peixes maduros.

As técnicas de reprodução artificial de peixes são múltiplas, todas com o objetivo de produzir quantidade abundante de ovos, larvas e alevinos, para a utilização em cultura ou para o repovoamento de reservatórios e cursos de água. Dependendo da eficiência do sistema de reprodução artificial, o aproveitamento dos ovos até alevinos pode atingir de 10% a 70% no rendimento; em contrapartida, a taxa de sobrevivência em condições naturais geralmente é muito inferior a 1% dos ovos produzidos (Woynarovich & Horvath, 1989).

As terapias hormonais induzem a maturação ovocitária via síntese de esteróides indutores da maturação, uma vez que a ovulação é estimulada pela síntese de prostaglandinas (Figura 2).

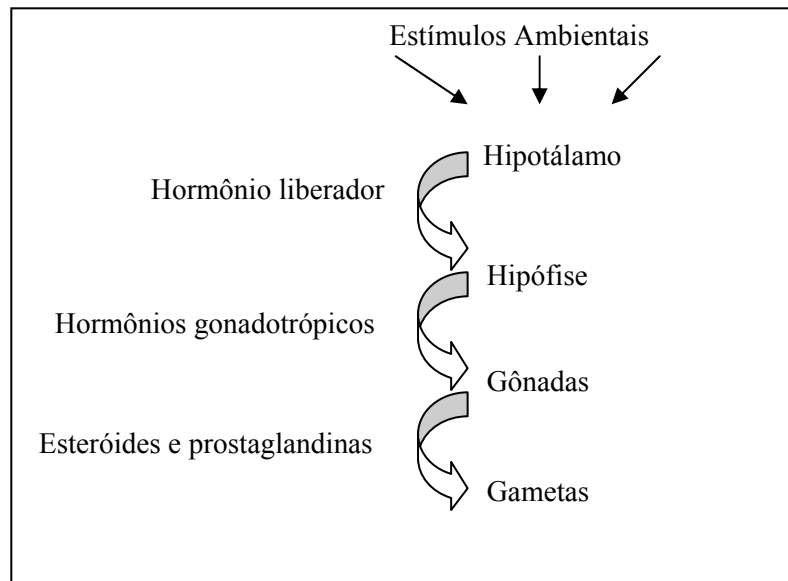


FIGURA 2: Esquema do mecanismo regulatório da reprodução em peixes (modificado de Rottmann *et al.*, 1991).

Um dos eventos que ocorre durante a ovulação é o reinício da meiose e sua progressão da primeira prófase da meiose para a segunda anáfase meiótica, no final da maturação ovocitária, fase em que o ovócito é considerado fertilizável (Mylonas & Zohar, 2007). Alguns estudos sugerem que a maturação meiótica pode não ser completada em sincronia com a ovulação. É possível que, devido a uma forte e rápida estimulação promovida por uma alta dose de hormônio, o processo de maturação ovocitária aconteça de forma muito rápida e leve a atresia, o que resulta na extrusão de ovócitos incapazes de serem fertilizados. Por isto, é importante que se estabeleçam as doses ideais de hormônio para cada espécie.

1.2.1 Hormônios utilizados

Há diferentes tipos de hormônios que podem ser utilizados na indução da reprodução, mas os hormônios hipofisários ainda são os mais utilizados. Sua utilização é baseada na importância da gonadotropina para a regulação da fase final do processo de maturação gonadal. Com os elevados preços das hipófises de carpa e salmão estimulou-se o desenvolvimento de pesquisas com hipófises de outros animais, obtendo-se sucesso na reprodução de peixes com utilização de hipófises de frango, pato e rã (Nwadukwe, 1993; Streit Junior, 2002), ou da urófise de peixes (Behr et al., 2000).

A Tabela 1 mostra o local de atuação e os principais indutores utilizados.

TABELA 1: Principais indutores utilizados na reprodução e o local onde atuam

Local de atuação	Principais formas de indução
Hipotálamo	Manipulação do ambiente (fotoperíodo, temperatura, salinidade, etc.), anti-estrogênicos, estresse, presença de machos e fêmeas conjuntamente.
Hipófise	Antagonistas de dopamina (domperidona, pimizida, metoclopramida), análogos do GnRH
Gônadas	Hipófises desidratadas, gonadotropinas de peixes, gonadotropina coriônica humana (hCG)

Fonte: Modificada de Andrade & Yasui, (2003).

A gonadotropina parcial ou totalmente purificada de peixes é obtida desde 1970, possibilitando a obtenção de um produto mais específico que o extrato hipofisário (Donaldson & Hunter, 1983).

A gonadotropina coriônica humana (HCG) também foi testada, se mostrando como potente indutor da ovulação de várias espécies de peixes, apesar de não estimular todas as espécies. A grande diferença na estrutura molecular da HCG, comparada à gonadotropina de peixes, tem exigido a aplicação de elevadas doses para estimular a maturação final de peixes (Harvey & Carolsfeld, 1993). Além disto, o uso continuado da HCG no plantel de reprodutores reduz o desempenho reprodutivo dos peixes (Donaldson & Hunter, 1983).

O uso de hormônios liberadores de gonadotropinas (GnRH) para indução da desova de peixes tem sido utilizado com sucesso desde 1975 (Donaldson & Hunter, 1983). Estes hormônios são muito semelhantes entre vertebrados inferiores e superiores. Por esta razão, o GnRH de mamíferos e seus análogos são efetivos na indução da desova em várias espécies de peixes (Harvey & Carolsfeld, 1993). Três grandes vantagens dos hormônios liberadores da gonadotropina são verificadas sobre a gonadotropina, na indução à maturação final e desova dos peixes. A primeira é que atuam no início da cadeia hormonal e estimulam o peixe a sintetizar sua própria gonadotropina, eliminando assim os problemas relacionados com a utilização de gonadotropina de outras espécies. A segunda é que a molécula não é altamente espécie-específica. Por último, são estruturas simples e facilmente fabricadas, apresentam grande estabilidade estrutural, são efetivas com pequenas dosagens de aplicação e seu uso é economicamente viável (Harvey & Carolsfeld, 1993).

Vários trabalhos foram realizados utilizando diferentes hormônios na indução da reprodução. Exemplos destes são descritos na Tabela 2.

TABELA 2: Diferentes tipos de hormônios utilizados na indução da reprodução de várias espécies de peixes

Substâncias	Hormônios	Dosagem	Espécies	Referência
Liberadores de Gonadotrofinas	GnRH	50µg	<i>A. ruthenus L.</i>	Rzeniuniechi <i>et al.</i> , 2004
	mGnRH a	25 e 50µg	<i>O. mykiss</i>	Arabaci <i>et al.</i> , 2004
		20µg	<i>C. nasus</i>	Szabó <i>et al.</i> , 2002
		30µg	<i>B. bidyamus</i>	Levavi-Sivan <i>et al.</i> , 2004
	sGnRH a	5, 10, 20, 40µg	<i>O. bonariensis</i>	Miranda, <i>et al.</i> , 2005
		10, 20, 30, 40 µg	<i>B. bidyamus</i>	Levavi-Sivan <i>et al.</i> , 2004
LHRH a	1,25, 2,5, 5, 10µg	<i>O. bonariensis</i>	Miranda, <i>et al.</i> , 2005	
		10, 20, 40, 50µg	<i>T. ocellatus</i>	Chen, 2005
		0,01, 0,02 µg	<i>S. asotus</i>	Wen & Lin, 2004
Esteróides	17,20β-dihydroxy-4-pregnen-3-one	2mg/kg	<i>A. anguilla</i>	Palstra <i>et al.</i> , 2005
			Várias	Woynarovich & Horvath, 1989
Gonadotrofinas	Extrato hipofisário de carpa	0,5 e 5,0 mg/kg	<i>B. insignis</i>	Andrade-Talmelli <i>et al.</i> , 2002
			<i>O. bonariensis</i>	Leonardo <i>et al.</i> , 2004
			<i>A. anguilla</i>	Palstra <i>et al.</i> , 2005
		3, 0,5, 5 mg/kg	<i>C. carpio</i>	Souza <i>et al.</i> , 2003
			<i>A. anguilla</i>	Palstra <i>et al.</i> , 2005
			<i>T. ocellatus</i>	Chen, 2005
Extrato hipofisário de frango	5, 1, 9 mg/kg	<i>C. nasus</i>	Szabó <i>et al.</i> , 2002	
		<i>P. lineatus</i>	Streit Jr. <i>et al.</i> , 2004	
			<i>L. macrocephalus</i>	Streit Jr. <i>et al.</i> , 2003
			<i>C. carpio</i>	Souza <i>et al.</i> , 2003

Continua

TABELA 2, Cont.

Substâncias	Hormônios	Dosagem	Espécies	Referência
Gonadotrofinas	Extrato hipofisário de coelho	7, 14, 12, 6mg/kg	<i>P. lineatus</i>	Streit Jr. <i>et al.</i> , 2004
			<i>L. macrocephalus</i>	Streit Jr. <i>et al.</i> , 2003
	Extrato hipofisário de salmão	5, 10, 20, 30, 40mg/kg 4 mg/kg	<i>C. carpio</i>	Souza <i>et al.</i> , 2003
			<i>A. anguilla</i>	Miranda <i>et al.</i> , 2005
Gonadotrofinas de mamíferos	hCG	500, 1000 UI/kg	<i>H. bidorsalis</i>	Adebayo & Fagbenro, 2004
			<i>E. striatus</i>	Watanabe <i>et al.</i> , 1995
			<i>P. scrofa</i>	Kavamoto <i>et al.</i> , 1997
		150, 500 UI/kg	<i>S. vitreum</i>	Malison <i>et al.</i> , 1998
			<i>B. insignis</i>	Andrade-Talmelli <i>et al.</i> , 2002
		1100, 550 UI/kg	<i>L. campechanus</i>	Paranilos <i>et al.</i> , 2003
		5000, 1000 UI/kg	<i>O. bonariensis</i>	Leonardo <i>et al.</i> , 2004
		150, 200 UI/kg	<i>B. bidyamus</i>	Levavi-Sivan <i>et al.</i> , 2004
		2000 UI/kg	<i>A. ruthenus L.</i>	Rzemienieck <i>et al.</i> , 2004
		100, 300, 500, 750 UI/kg	<i>M. furnieru</i>	Garcia-Alonso & Vizziano, 2004
		200 UI/kg	<i>A. anguilla</i>	Pedersen, 2004
		125, 1000 UI/kg	<i>A. anguilla</i>	Palstra <i>et al.</i> , 2005
		1,5 UI/kg	<i>H. longifilis</i>	Nguenga <i>et al.</i> , 2004
	<i>A. anguilla</i>	Asturiano <i>et al.</i> , 2005		
39, 78, 156, 312, 625 UI/kg	<i>A. anguilla</i>	Miranda <i>et al.</i> , 2005		
500, 2000, 25000 UI/kg	<i>T. ocellatus</i>	Chen, 2005		
500 UI/kg	<i>S. japonicus</i>	Shiraishi <i>et al.</i> , 2005		

1.3 Sêmen

1.3.1 Qualidade espermática

A qualidade espermática é a mensuração da habilidade do espermatozóide em fecundar um ovócito. Como no ambiente natural há interação de várias espécies entre si, o processo evolutivo fez com que, os teleósteos, de maneira geral, produzam diferentes tipos e quantidades de sêmen (Taborsky, 1998).

Na aquicultura, entretanto, algumas outras características específicas podem ser observadas para se obter sucesso na fertilização artificial. Algumas metodologias se baseiam na utilização de grandes quantidades de sêmen misturadas aos ovos, com fertilização em pequena quantidade de líquido (Rurangwa et al., 2004). Estas podem alcançar altas taxas de fertilização mas, em grande parte dos casos há queda acentuada na taxa de eclosão devida à má qualidade espermática, não avaliada antes da fertilização.

Como o termo “qualidade espermática” é subjetivo, há uma série de biomarcadores associados a este parâmetro, tais como: espermatócrito, densidade espermática, osmolaridade e pH do plasma seminal, composição química do plasma seminal, atividade enzimática, concentração de ATP (trifosfato de adenosina), motilidade, morfologia, ultra-estrutura, capacidade de fertilização, entre outras (Fauvel et al., 1998; Geffen & Evans, 2000; Chowdhury & Joy, 2000). Alguns estudos descrevendo características espermáticas, as quais podem influenciar a capacidade de fertilização, têm demonstrado grandes variações individuais nos diferentes parâmetros investigados. Assim, não se deve utilizar uma única característica espermática para se definir a qualidade seminal (Dreanno et al., 1998).

1.3.2 Características gerais do sêmen de peixes

Os espermatozóides de peixes são armazenados no plasma seminal quando no trato reprodutivo e, diferentemente dos mamíferos, a maioria dos teleósteos de fertilização externa, apresentam espermatozóides imóveis quando ejaculados. Estes só se tornam móveis e metabolicamente ativos após sua liberação na água. Na maioria das espécies de água doce, os espermatozóides se mantêm móveis por menos de dois minutos e em muitos casos apresentam grande atividade por menos de trinta segundos (Billard et al., 1995; Kime et al., 2001).

O sêmen dos teleósteos é caracterizado pela ausência de acrossoma, exceto nos peixes acipenseriformes (Linhart & Kudo, 1997). O formato da cabeça e do núcleo é altamente variável entre as espécies (Jamieson, 1991) e a peça intermediária pode ser mais desenvolvida, como no guppy, *Poecilia reticulata*, ou reduzida, como nos salmonídeos e ciprinídeos (Billard et al., 1995).

Alguns peixes de fertilização interna apresentam espermatozóides biflagelados (Yao et al., 1995) enquanto, de maneira geral, as espécies que apresentam fertilização externa possuem flagelo único.

Até o momento não existem evidências de que espermatozóides maiores sejam capazes de nadar em velocidades maiores que os demais (Gage et al., 2002). Deformidades espermáticas estão associadas à deficiências funcionais, relacionadas à diminuição da motilidade e taxa de fertilização (McAllister & Kime, 2003).

1.3.3 Iniciação da motilidade espermática

O fluido seminal é rico em nutrientes e íons e alguns deles são importantes para a manutenção da qualidade espermática, quando do armazenamento dos espermatozóides, ainda sem motilidade, no trato reprodutivo. Fatores ambientais externos podem afetar a qualidade e a motilidade durante o processo de ativação. O pH e íons presentes podem polarizar a membrana celular e estimular a motilidade espermática (Morisawa et al., 1999).

Durante a ativação, as células espermáticas estão expostas a um ambiente hostil, como, por exemplo, a uma osmolaridade maior ou menor que a do líquido seminal. Para aumentar a viabilidade destes espermatozóides durante a ativação, algumas soluções semelhantes ao líquido seminal têm sido desenvolvidas (Billard & Cosson, 1992)

1.3.4 Morfologia espermática

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

Outros fatores podem conduzir a defeitos morfológicos em espermatozóides. Segundo Herman et al. (1994), as patologias primárias como

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

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

1.3.5 Congelamento do sêmen de peixes

A criopreservação envolve procedimentos que permitem o armazenamento de espermatozóides em nitrogênio líquido, a uma temperatura de -196°C , mantendo-se a viabilidade dos gametas por tempo indefinido (Billard et al., 2004). A criopreservação constitui técnica importante na rotina da reprodução induzida e na melhoria genética das espécies de peixes, aumentando as chances de se desenvolverem pesquisas, sobretudo no campo genético, e sendo indicada para minimizar a assincronia na maturação dos gametas, no uso seletivo de reprodutores ou mesmo no transporte de gametas (Godinho, 2000).

Quando o sêmen é colocado diretamente no nitrogênio líquido, a membrana plasmática e a peça intermediária podem desaparecer inteiramente. Por outro lado, quando o sêmen é colocado no vapor de nitrogênio líquido, os espermatozóides sofrem um congelamento gradual, e as estruturas membranosas

não são muito alteradas, apesar do aspecto da cromatina ser consideravelmente modificado (Billard, 1983).

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

O processo de cristalização resulta ainda em elevação momentânea da temperatura, o que, segundo Maria (2005), é prejudicial às células espermáticas. Em temperaturas em torno de 5°C, a água intra e extracelular permanece super-resfriada e não se cristaliza. Segundo este mesmo autor, entre -5°C e -10°C, microcristais de gelo começam a se formar no meio extracelular e o processo de desidratação se inicia. Os maiores prejuízos conhecidos na estrutura do espermatozoide ocorrem no intervalo crítico entre 0°C e -40°C (Leung, 1991).

A finalidade do processo de congelamento em nitrogênio líquido é fazer com que a suspensão de células espermáticas atinja temperaturas abaixo do ponto de congelamento do meio (super-resfriamento), antes que haja a formação de microcristais de gelo nos meios intra e extracelular.

O sucesso do congelamento de sêmen com nitrogênio líquido exige que as taxas de resfriamento estejam situadas entre 10 e 50°C/min (Harvey & Carolsfeld, 1993). Resultados satisfatórios com esta metodologia encontram-se disponíveis na literatura (Serralheiro et al., 1999; Cruz, 2001).

Outro aspecto importante na transferência de temperatura é o tipo de recipiente de envasamento do sêmen. Geralmente são utilizadas palhetes de 0,25mL, 0,5mL, 1,0mL, 1,2mL e 5,0mL de capacidade. As palhetes de 0,5mL

são as mais utilizadas entre os pesquisadores, no congelamento de sêmen de peixes. Palhetes de 0,25mL acondicionam pequenos volumes de sêmen e palhetes muito calibrosas não proporcionam um descongelamento uniforme, ou seja, a superfície descongela mais rapidamente que a porção central (Carolsfeld & Harvey, 1999).

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

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

Em estudo recente, Routray et al.(2006) demonstram que é possível criopreservar sêmen mesmo após a morte do reprodutor. Esta técnica já havia sido descrita por Koteeswaran & Pandian (2002) como método alternativo de conservação de material genético em ocasiões de desastres naturais. No primeiro estudo os autores coletaram sêmen em diferentes tempos após a morte do reprodutor e armazenaram as amostras em diferentes temperaturas. Os resultados demonstraram que o sêmen estocado a 0°C tinha a mesma capacidade de fertilização que o *in natura*, mesmo três horas após a morte do reprodutor.

1.3.6 Soluções diluidoras e proporção de diluição em peixes

Os diluidores são soluções salinas ou de carboidratos, adicionadas ao sêmen, cuja função é manter a viabilidade das células espermáticas durante a

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

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

A qualidade dos espermatozoides criopreservados é de fundamental importância para o sucesso da fertilização (Johnson et al., 2000). A eficiência da fertilização pelo espermatozoide, pós-criopreservação, para Cloud (2000) está

diretamente relacionada com a composição da solução diluidora. Para o diluidor prolongar a vida do espermatozóide *in vitro*, é necessário possuir a propriedade de reduzir a atividade metabólica dos espermatozóides, seja por inibidores químicos ou por redução de temperatura (Johnson et al., 2000). De acordo com Morris & Watson (1984), as injúrias causadas pela baixa temperatura sobre os espermatozóides são classificadas em duas categorias: a) decorrentes diretamente do resfriamento ou pelo choque frio, em consequência do rápido resfriamento e, b) injúrias do processo de espermatogênese, causadas indiretamente e independentemente da taxa de resfriamento e que vão se manifestar após períodos extensos em baixas temperaturas.

1.3.7 Soluções crioprotetoras do sêmen de peixes

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

Soluções crioprotetoras são substâncias acrescentadas ao meio diluidor do sêmen com a finalidade de proteger os espermatozóides durante o congelamento e o descongelamento (Squires et al., 1998). Os crioprotetores impedem as criolesões, mas quando usados em concentrações elevadas, podem se tornar tóxicos aos espermatozóides. Dentre as características desejáveis em um crioprotetor, destacam-se a reduzida toxicidade e a alta solubilidade em água (Maria, 2005).

Os crioprotetores podem ser classificados em intracelulares (ou solúveis) ou extracelulares (ou não solúveis), sendo que o determinante são as

propriedades físico-químicas (principalmente o peso molecular) e a interação existente entre a substância e a membrana citoplasmática (Tabela 5).

TABELA 5: Classificação dos crioprotetores quanto à permeabilidade à membrana celular

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

Fonte: Modificado de Cruz (2001).

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

Aparentemente, alguns crioprotetores agem melhor em determinadas espécies do que em outras, sendo que a seleção do crioprotetor mais adequado, a

ser utilizado pela primeira vez em uma espécie, deve ser feita em testes de tentativa e erro (Bedore, 1999).

Miliorini et al. (2005) verificaram que a associação entre BTS, que apresenta em sua constituição glicose como crioprotetor externo, em uma concentração de 3,6% após a diluição, e quaisquer crioprotetores internos (DMSO ou metanol, a 10%), proporcionaram taxas de fertilização similares às do sêmen in natura. A associação de DMSO 10%, glicose 5% e gema de ovo 10% tem sido utilizada com sucesso na criopreservação de sêmen de curimba (Kavamoto et al., 1989; Silva, 2000), embora estudos preliminares com preservação a curto prazo nessa espécie, utilizando gema de ovo 10%, não tenham sido bem sucedidos.

O metanol, segundo Bedore (1999), é tido como o crioprotetor intracelular mais permeável à membrana, porém, é aquele que apresenta a maior toxicidade dentro de seu grupo, exceto para espermatozoides de tilápia (Harvey, 1983). Concentrações de DMSO de 5%, 10% e 15% foram menos tóxicas que o propanodiol e o etilenoglicol, nas mesmas concentrações (Cruz, 2001). Em trabalhos com sêmen de pacu (*P. mesopotamicus*; Murgas et al., 2005) e de curimba (Miliorini et al., 2005), uma concentração de 10% de DMSO proporcionou os resultados mais expressivos, tanto para o resfriamento, como para o congelamento de sêmen, respectivamente, quando comparadas a outras concentrações e ao metanol. Segundo Bedore (1999), a carência de estudos acerca da bioquímica do fluido seminal de teleósteos brasileiros dificulta a determinação de soluções crioprotetoras mais eficientes na recuperação da motilidade após o descongelamento.

1.3.8 Descongelamento do sêmen de peixes

O descongelamento é o processo inverso ao congelamento, mas é tão ou mais importante que ele. A velocidade de descongelamento do sêmen deve ser aquela que permita a re-hidratação celular e, ao mesmo tempo seja breve, evitando o aumento no tamanho de cristais que por ventura já se encontrem no interior da célula (Carneiro, 2007).

O descongelamento do sêmen de espécies tropicais é feito geralmente pela introdução rápida (de 03 a 08 segundos) da palhete em água quente (45-60°C).

1.4 Ovócito

1.4.1 Desenvolvimento ovocitário

De maneira geral a ovogênese é o processo pelo qual células germinativas primordiais se desenvolvem em ovócitos prontos para a fertilização. A ovogênese pode ser dividida em seis grandes etapas: (1) formação das células germinativas primordiais (segregação), (2) transformação destas células primordiais em ovogônias (diferenciação sexual), (3) transformação da ovogônia em ovócitos (princípio da meiose); (4) crescimento dos ovócitos (ainda no processo de meiose), (5) maturação e, (6) expulsão do ovócito do folículo (ovulação) (Patiño & Sullivan, 2002).

O crescimento do ovócito ocorre após a formação do folículo ovocitário. A estrutura básica deste folículo é formada quando células pré-foliculares, que irão formar a granulosa, e suas membranas basais

envolvem completamente o ovócito, ainda no processo de meiose. As células da granulosa formam uma camada em torno do ovócito. Externamente a esta camada deposita-se uma camada de células tecais. Estas estruturas não sofrem alterações durante o processo de desenvolvimento ovocitário (Patino & Takashima, 1995).

O crescimento ovocitário pode ser classificado em dois estágios: pré-vitelogênico e vitelogênico.

1.4.2 Crescimento pré-vitelogênico

É no crescimento pré-vitelogênico que o ovócito aumenta significativamente seu diâmetro. Grandes quantidades de RNA ribossomal e RNA heterogêneo são produzidos por nucléolos localizados na periferia nuclear (Wallace & Selman, 1990).

Grandes quantidades de glicoproteínas são sintetizadas pelo ovócito durante o final do crescimento pré-vitelogênico. Este material é incorporado aos alvéolos formados na periferia do ovócito e são conhecidos como alvéolos corticais, devido a sua localização na célula. O número destes alvéolos aumenta gradativamente, e na fase de crescimento vitelogênico diminui, dando lugar a grânulos de vitelo (Blazer, 2002). Durante a reação cortical, que ocorre no momento da fertilização, o conteúdo destes alvéolos corticais é lançado no espaço perivitelinico, localizado entre o ovócito propriamente dito e a zona radiata do envelope ovocitário.

A deposição lipídica no ovócito se inicia também na fase de crescimento pré-vitelogênico. A origem desses lipídeos ainda é desconhecida, mas acredita-se que são derivados de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) circulantes, que se ligam a receptores lipoprotéicos do ovócito (Prat et al., 1999). Estas lipoproteínas são hidrolisadas em ácidos graxos livres (FFAs) através de um processo de re-esterificação mediado pela ação de uma enzima específica (LeMenn et al., 1999).

1.4.3 Vitelogenese e sua regulação

A vitelogenina é uma glicofosfolipoproteína sintetizada pelo fígado, transportada via circulação sanguínea ao ovário e interiorizada pelos ovócitos (Mommensen & Walsh, 1988). Esta proteína é purificada e parece, então, ser o precursor do vitelo em teleósteos (Reith et al., 2001).

A indução natural da vitelogenese hepática ocorre devido à ativação neuroendócrina do eixo hipotálamo-hipófise-gônada, em resposta a estímulos endógenos e ambientais. Dados obtidos em alguns teleósteos, como os salmonídeos, demonstram que o aumento do FSH (hormônio folículo estimulante) na corrente sanguínea induz uma produção folicular de 17β -estradiol, o qual estimula a vitelogenese hepática (Specker & Sullivan, 1994). Em outras famílias a produção de 17β -estradiol pelo ovário pode ser regulada pelo hormônio luteinizante (LH) (Okuzawa, 2002). Outros hormônios estrogênicos como o estrógeno, podem contribuir para a indução da vitelogenese, estimulando o fígado a responder mais fortemente ao 17β -estradiol. Hormônios naturais e fatores de crescimento podem, também, modular a vitelogenese hepática (Tyler et al., 1999).

1.4.4 Crescimento vitelogênico

A vitelogenina penetra no folículo ovariano através de capilares da teca. Então, atravessa a membrana basal que separa a teca das células da camada granulosa, os espaços intracelulares da granulosa e finalmente passa por canais de vitelogenina, localizados ao longo das microvilosidades do ovócito (Patiño & Sullivan, 2002). A vitelogenina se liga a receptores específicos (VgR), localizados na superfície do ovócito. A internalização do complexo vitelogenina-receptor ocorre em áreas específicas da membrana. A clivagem proteolítica da vitelogenina em proteínas do vitelo ocorre em corpos multivesiculares. Dependendo da espécie, as proteínas do vitelo são armazenadas em glóbulos de vitelo, distribuídos por todo o ooplasma (Blazer, 2002). Em teleósteos de água doce, que desovam ovos demersais, as proteínas de vitelo derivadas da vitelogenina podem representar de 80-90% do peso seco da desova (Tyler et al., 1999).

Acredita-se que o receptor da vitelogenina em teleósteos, se liga apenas a vitelogenina e não a outras lipoproteínas, como ocorre na truta arco-íris, por exemplo (Tyler & Lubberink, 1996).

Nos folículos de teleósteos, a atividade ligadora dos receptores de vitelogenina é primeiramente identificada durante a transição dos crescimentos pré-vitelogênico - vitelogênico (Lancaster & Tyler, 1994). Uma diminuição na expressão do gene do receptor da vitelogenina e o declínio na sua transcrição, durante o crescimento vitelogênico, sugerem que as proteínas formadoras do receptor podem ser endocitadas e passar por um processo de reciclagem para continuarem se ligando à vitelogenina, na superfície do ovócito, durante este período de crescimento (Perazzolo et al., 1999).

A modulação do crescimento vitelogênico por hormônios não esteróides e fatores do crescimento também é possível. Estudos sugerem que hormônios da

tireóide estão envolvidos na regulação do crescimento vitelogênico do ovário, tanto direta, quanto indiretamente (Pavlidis et al.,2000).

Tem sido sugerido que o “tempo” do crescimento vitelogênico coincide com, e pode ser regulado, pela formação de canais extracelulares na parede do folículo, o que permite que a vitelogenina tenha acesso livre à superfície do ovócito (Tyler & Sumpster, 1996).

1.4.5 Formação do vitelo

A vitelogenina dá origem a duas grandes proteínas, a lipovitelina (Lv) e a fosfovítina (Pv) (Wallace, 1985). A maior parte da vitelogenina dá origem à lipovitelina, que é formada por dois polipeptídeos, uma cadeia pesada e uma cadeia leve. A lipovitelina é uma importante fonte nutricional de aminoácidos e lipídios que auxiliam o desenvolvimento embrionário. A fosfovítina é formada por uma longa cadeia de resíduos de serina, covalentemente ligados ao fosfato e ionicamente ligados ao cálcio. Ela é responsável pelo fornecimento dos minerais necessários ao desenvolvimento do esqueleto e à função metabólica. (Patiño & Sullivan, 2002).

1.4.6 Maturação

O termo “maturação do folículo ovariano” foi definido como o processo de alterações na indução dependentes de LH necessárias para que haja o reinício do processo de meiose no ovócito (Patiño et al., 2001).

Em muitos teleósteos, os níveis sanguíneos de LH começam a se elevar quando o crescimento vitelogênico do folículo ovariano é completado (Khan & Thomas, 1999). O LH se liga ao seu receptor, localizado na camada granulosa

do folículo, e estimula uma seqüência de eventos, que incluem a aquisição de competência maturacional pelo ovócito – capacidade de reiniciar a meiose quando estimulada pelos hormônios indutores da maturação (MIH), e produção destes hormônios indutores e maturação citoplasmática. A especificidade da ação do LH na maturação é sugerida por resultados de estudos com algumas espécies nas quais um homólogo do LH induz à maturação folicular (Kagawa et al., 1998).

1.4.7 Ovulação

A produção dos MIH, pelos folículos ovarianos dos teleósteos, é também necessária para a indução do último passo da ovogênese, a ovulação. Mas, diferentemente do que ocorre na reativação da meiose, a ovulação requer uma ativação transcricional, dependente de MIH, que é regulada por um MIHR nuclear (Pinter & Tomas, 1999; Patiño et al., 2003).

A ovulação hormônio-dependente requer ativação via proteína C quinase. Muitos estudos examinaram o papel da ciclooxigenase na ovulação e da lipoxigenase no metabolismo dos aminoácidos. Embora não haja consenso sobre a contribuição destas duas enzimas no processo de ovulação, estudo recente demonstrou que ambas são importantes no processo de ovulação dependente de MIH (Patiño et al., 2003). A ovulação envolve etapas relacionadas com a degradação folicular, ruptura e expulsão do ovo maduro, porém o mecanismo relacionado a estes processos, como metabólitos de aminoácidos, por exemplo, ainda não são claros para os teleósteos (Goetz et al., 1991).

Em algumas espécies a ovulação é altamente sincronizada com a espermiacão dos machos, através de um processo controlado por feromônios (Kobayashi et al., 2002). Os espermatozoides penetram no ovócito através de poros localizados no envelope vitelínico, denominados micrópilas. O contato

com a superfície do ovo (fertilização) induz à reação cortical, na qual o conteúdo dos alvéolos corticais é lançado no espaço perivitelínico. Osmoticamente, glicoproteínas causam a hidratação e metaloproteases hidrolizam as proteínas do envelope vitelogênico em subunidades menores. Estas subunidades são então polimerizadas em proteínas do envelope vitelogênico de alto peso molecular (Shibata et al., 2000).

1.4.8 Qualidade ovocitária

A qualidade dos ovócitos é um importante parâmetro para a aquicultura, uma vez que pode limitar o número, bem como a qualidade da progênie. Fatores intrínsecos e ambientais podem exercer influência na qualidade ovocitária (Brooks et al., 1997). Os critérios utilizados, nas criações comerciais, para avaliação da qualidade dos ovócitos são limitados e baseiam-se na flutuabilidade dos ovócitos (Lahnsteiner & Patarnello, 2003) e nas taxas de fertilização e eclosão (Mylonas et al., 1992).

Nos casos de espécies que não desovam espontaneamente em cativeiro e em que a fertilização só é alcançada artificialmente após indução e extrusão dos ovócitos, têm sido demonstrado que o tempo em que os ovócitos permanecem no ovário, após a ovulação e antes da extrusão, está diretamente relacionado à diminuição da qualidade ovocitária, processo este denominado de atresia. Este período de tempo (período de latência) varia de poucos minutos até alguns dias, conforme a espécie (Lahnsteiner, 2000; Shiraishi et al., 2005). Por esta razão, visando assegurar uma boa qualidade ovocitária e o sucesso na fertilização, o tempo necessário para se atingir a ovulação deve ser determinado para a maioria das espécies (Chen, 2005), de maneira a se determinar o intervalo entre ovulação e extrusão, evitando, assim a atresia (Mylonas & Zohar, 2007).

O período de latência varia, tanto em função de parâmetros intrínsecos, quanto ambientais, como espécie, temperatura da água, tipo de hormônio e dose utilizada bem como a história do peixe no período anterior à reprodução e o estágio de maturação ovocitária quando da aplicação do hormônio (Brzuska, 1999; Wendling et al., 2000; Tveiten.& Solevag, 2001; Wen & Lin, 2004). O estágio da maturação ovocitária é usualmente determinado após obtenção de uma amostra e (a) da mensuração do diâmetro máximo dos ovócitos (Shiraishi et al., 2005), (b) determinação da posição da vesícula germinativa (Yaron, 1995), ou (c) identificação do início da reabsorção dos grânulos de vitelo (Mylonas et al., 2003). A ocorrência de percentuais superiores a 5-10% de ovócitos, em início de atresia, é indicativo de que a fêmea pode não responder de maneira satisfatória à indução hormonal (Cerda et al., 1997). Por isto, metodologias específicas devem ser desenvolvidas para cada espécie e para cada tipo e dose de hormônio, levando-se em conta a densidade e as condições do cativeiro em que estes animais são mantidos durante o ano (Mylonas & Zohar, 2007).

O sucesso na fertilização pode ser reduzido se doses muito altas de hormônio forem utilizadas (Mylonas et al., 1992), embora o mecanismo desta ação ainda não esteja claro. Uma explicação pode estar baseada na rápida assincronia entre os processos de maturação ovocitária e ovulação, e por esta razão o efeito de um hormônio exógeno poderia aumentar essa assincronia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C.; SUZUKI, H. I.; JÚLIO JR., H. F. Migratory fish from the upper Parana river basin, Brasil. p.19-98. In: CAROLSFIELD, J., HARVEY, B.; ROSS, C.; BAER, A. (Eds.). **Migratory fishes of South America: biology, social importance and conservation status**. Victoria: World Bank and The International Development Research Centre, 2003
- ANDRADE, D. R.; YASUI, G. S. O manejo da reprodução natural e artificial e sua importância na produção de peixes no Brasil, **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, n.2, p.166-172, Abr./Jun. 2003.
- BEDORE, A. G. **Características criopreservação do sêmen de pacu-caranha (*Piaractus mesopotamicus*) e de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)**. 1999. p.53. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- BEHR, E. R.; BALDISSEROTTO, B.; GARCIA-PARRA, W.; BRANDÃO, D. A.; HERKE, Z. Urophysial and pituitary extracts for spawning induction in teleosts. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.30, n.5, p.897-898, set./out. 2000.
- BILLARD, R. Ultrastructure of trout spermatozoa: changes after dilution and deep-freezing. **Cell Tissue Research**, New York, v. 228, n. 2, p. 205-218, Jan. 1983.
- BILLARD, R.; COSSON, J.; PERCHEC, J.; LINHART, O. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. **Aquaculture**, Amsterdam, v.29, n.1/4, p.95-112, Jan. 1995.
- BILLARD, R.; COSSON, M. P. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. **The Journal of Experimental Zoology**, New York, v. 261, n. 2, p. 122-130, Feb. 1992.
- BILLARD, R.; COSSON, S.; NOVEIRI M. Cryopreservation and short-term storage of sturgeon sperm, a review. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 236, n.1, p. 1-9, June 2004.

- BLAZER, V. S. EUS in the United States: a case definition. In: Symposium on Diseases in Asian Aquaculture, 5th, **Surfers Paradise**, Queensland, p. 24-27, Nov. 2002.
- BROOKS, S.; TYLER, C. R.; SUMPTER, J. P. Egg quality in fish: what makes a good egg? **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, Netherlands, v.7, n.4, p.387-416, Dec. 1997.
- BRZUSKA, E. Artificial spawning of herbivorous fish: use of an LHRH-a induce ovulation in grass carp *Ctenopharygodon idella* (Valenciennes) and silver carp *Hyoiothalmichthys molitrix* (Valenciennes). **Aquaculture Research**, v.30, n.11, p.849-856, Nov. 1999.
- CARNEIRO, P. C. F. Tecnologias de produção e armazenamento de sêmen de peixes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 31, n. 3, p. 361-366, Jul./Set. 2007.
- CAROLSFELD, J.; HARVEY, B. **Conservação de recursos genéticos de peixes: teoria e prática**. Curso de Treinamento Brasileiro. Victoria: World Fisheries Trust, 1999. 41p.
- CERDÁ, J.; SELMAN, K.; HSIAO, S.-M.; WALLACE, R. A. Evidence for the differential regulation of ovarian follicle responsiveness to human chorionic gonadotropin in vitro in a serranid teleost, *Centropristis straita*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 159, n. 1, p.143-157, Dec. 1997.
- CHEN, Y. F. Induced ovulation and embryonic development of ocellated puffer, *Takifugu ocellatus*. **Journal Applied Ichthyology**, v. 21, n. 2, p. 136-140, Apr. 2005.
- CHOWDHURY, I.; JOY, K. P. Annual cyclic variations in some biochemical constituents of seminal vesicle and testis of the catfish *Heteropneustes fossilis* Bloch.: a study correlating plasma testosterone level. **Acta Biologica Hungarica**, v. 51, n. 1, p. 53-62, May 2000.
- CLOUD, J. G. Cryopreservation of sperm of steelhead rainbow trout after refrigerated storage. In: TIERSCH, T. R.; MAZIK, P. M. (Eds.) . **Cryopreservation in aquatic species**. Baton Rouge, Louisiana: World Aquaculture Society, 2000. p.101-103.

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

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

DONALDSON, E. M.; HUNTER, G.A. Induced Final maturation, ovulation and spermiation in cultured fishes. In: HOAR, W. S.; RANDAL, D. L.; DONALDSON, E. M. **Fish physiology**. Orlando, Fl.: Orlando Academic, 1983. p.351-403.

FAUVEL, C.; SUQUET, M.; DREANNO, C.; ZONNO, V.; MENU, B. Cryopreservation of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) spermatozoa in experimental and production conditions. **Aquatic Living Resources**, French, v.11, n.6, p.387-394, Nov. 1998.

FREITAS, R. T. F.; ZANGERÔNIMO, M. G. Calidad seminal del pez piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) post-descongelación. **Anales de Veterinária**, Murcia, v.17, n.1, p.3-10, 2001.

GAGE, M. J. G.; MACFARLANE C.; YEATES S., SHACKLETON R.; PARKER, G. A. Relationships between sperm morphometry and sperm motility in the Atlantic salmon. **Journal of Fish Biology**, British Isles, v.61, n.6, p.1528–1539, Dec. 2002.

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

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

GOETZ, F. W.; BERNDTSON, A. K.; RANJAN, M. Ovulation: mediators at the ovarian levels. In: PANG, P.K.T.; SCHREIBMAN, M. P. (Eds.). **Vertebrate endocrinology: fundamentals and biomedical implications**. New York: Academic, v. 4A, 1991. p. 127-203.

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

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

HERMAN, H. A.; MITCHELL, J. R.; DOAK, G. A. Evaluation of semen – morphology. In: HERMAN, H. A.; MITCHELL, J. R.; DOAK, G. A. (Eds.). **The artificial insemination and embryo transfer of dairy and beef cattle**. Prentice Hall, 1994. p.85-92.

HOUSSAY, B. A. Accion sexual de la hipofisis en los peces y reptiles. **Revista da Sociedade Argentina de Biologia**, v.106, n.6, p.686-688, 1930.

IHERING R. V. Die wirkung von Hypophysehijektion auf den Laichakt von Fischen. **Zoologischer Anzeiger**, v.111 p.273-279, 1935.

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

JOHNSON, L. A.; WEITZE, K. F.; FISER, P.; MAXWELL, W. M. C. Storage of boar semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, v.1-3, p.143-172, Aug. 2000.

KAGAWA, H.; TANAKA, H.; OKUZAWA, K.; KOBAYASHI, M. GTH II but not GTH I induces final maturation and the development of maturational competence of oocytes of red Seabream in vitro. **General and Comparative Endocrinology**, v.112, n. 1, p. 80-88, oct 1998.

KAVAMOTO, E. T.; SILVEIRA, W. F.; GODINHO, H. M. Conservação em nitrogênio líquido do sêmen de *Prochilodus scrofa* Steindachner 1881. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v.16, n.1, p.29-36, 1989.

KHAN, I. A.; THOMAS, P. Ovarian cycle, teleost fish. In: KNOBILI, E.; NEILLI, J. D. (Eds.). **Encyclopedia of reproduction**. San Diego: Academic, v.2, 1999. p. 193-204.

KIME, D. E.; VAN LOOK, K. J. W.; MCALLISTER, B. G.; HUYSKENS, G.; RURANGWA, E.; OLLEVIER, F. Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. **Comparative Biochemical Physiology**, v.130, n. 4, p. 425-433, dec 2001.

KOBAYASHI, J.; SEKIGUCHI, M.; SHIMAMOTO, S.; SHIGEMORI, H.; ISHIYAMA, H.; OHSAKI, A. Subincanadines A-C, novel quaternary indole alkaloids from *aspidosperma subincanum*. **Journal of Organic Chemistry**, v.67, n.18, p. 6449-6455, Sept. 2002.

KOTEESWARAN, R.; PANDIAN, T. J. Live sperm from postmortem preserved Indian catfish. **Current. Science**, v. 82, p. 447–450, 2002.

LAHNSTEINER, F. Morphological, physiological and biochemical parameters characterizing the overopening of rainbow trout eggs. **Fish Physiological and Biochemistry**, v.23, n. 2, p.107-118, Aug. 2000.

LAHNSTEINER, F.; PATARNELLO, P. Investigations on the metabolism of viable and nonviable gilthead sea bream (*Sparus aurata*) eggs. **Aquaculture**, Amsterdam, v.223, n.1, p.159-174, June 2003.

LANCASTER, P. M.; TYLER, C. R. Developmental expression and modulation of the vitellogenin receptor in ovarian follicles of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Journal of Experimental Zoology**, v.269, n.5, p.458–466, Aug.1994.

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

LeMENN, F.; DAVAIL, B.; PELISERO, C.; NDIAYE, P.; BOM, E.; PERAZZOLO, L.; NUNEZ RODRIGUEZ, J. A new approach to fish oocyte vitellogenesis. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE REPRODUCTIVE PHYSIOLOGY OF FISH, 6., 1999, Norway. **Proceedings...** Norway: Institute of marine research and University of Bergen, 1999. p. 281-282.

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

LINHART, R.; KUDO, S. Surface ultrastructure of paddlefish eggs before and after fertilization. **Journal of Fish Biology**, London, v. 51, p. 573-582, 1997.

LUNDBERG, J. G.; LITTMANN, M. W. Family Pimelodidae (Long-whiskered catfishes). In: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS Jr., C. J. (Eds.). **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: Edipucrs, 2003. p. 432-446.

MACHADO, A. B. M.; FONSECA, G. A. B.; MACHADO, R. B.; AGUIAR, L. M. S.; LINS, L. B. (Eds.). **Livro vermelho das espécies ameaçadas de extinção da fauna de Minas Gerais**. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 1998. 605p.

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

Marques, S. **Preservação a curto prazo do sêmen de teleósteos neotropicais de água doce**. 2001. 98 p. Dissertação (Mestrado em Zoologia de Vertebrados) – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte.

McALLISTER, B. G.; KIME, D. E. Early life exposure to environmental levels of the aromatase inhibitor tributyltin causes masculinisation and irreversible sperm damage in zebrafish (*Danio rerio*). **Aquatic Toxicology**, v.65, n.3, p.309–316, Nov. 2003.

MEDEIROS, A. S. L.; GOMES, G. M.; CARMO, M. T. Cryopreservation of stallion sperm using different amides. **Theriogenology**, v. 58, n. 1, p.1-4, July 2002.

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

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

MILIORINI, A. B.; MURGAS, L. D. S.; VIVEIROS, A. T. M.; MARIA, A. N.; OLIVEIRA, A. V.; ORFÃO, L. H. The effects of cryoprotectants and activators on sperm motility of curimba (*Prochilodus lineatus*). In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION-ICAR, 15., 2004, Porto Seguro. **Abstracts...** Porto Seguro: ICAR, 2004.

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

MINAS GERAIS. **Deliberação COPAM nº 041/95**. Aprova a lista de espécies ameaçadas de extinção da fauna do Estado de Minas Gerais. Minas Gerais, Órgão Oficial dos Poderes do Estado, Belo Horizonte, 20 de janeiro de 1996.

MOMMSEN T. P.; WALSH, P. J. Vitellogenesis and oocyte assembly. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J. (Eds.). *Fish physiology*. XIA. New York: Academic, 1988. p. 347-406.

MORRIS, G. J.; WATSON, P. F. Cold shock injury a comprehensive bibliography. **Cryo-Letters**, London, v. 5, n. 6, p. 352-372, nov.-dez. 1984.

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

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

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

MURGAS, L. D. S.; MILIORINI, A. B.; SILVA, M. O. B. Viabilidade seminal da piapara (*Ieporinus obtusidens*), empregando-se diferentes diluentes, no resfriamento do sêmen a 4 ° C. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 26, n. 3, p. 211-213, Jul.-Set. 2002.

MYLONAS, C. C.; HINSHAW, J. M.; SULLIVAN, C. V. GnRH α -induced ovulation of brook trout (*Salmo trutta*) and its effects on egg quality. **Aquaculture**, Amsterdam, v.106, n.3, p.379-392, sep 1992.

MYLONAS, C. C.; SIGELAKI, I.; DIVANACH, P.; MAÑANOS, E.; CARILLO, M.; AFONSO-POLYVIUO, A. Multiple spawning and egg quality of individual European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) females after repeated injections of GnRH α . **Aquaculture**, Amsterdam, v.221, n.1, p. 605-620, May 2003.

MYLONAS, C. C.; ZOHAR, Y. Promoting oocyte maturation, ovulation and spawning in farmed fish. p.437-474. In: BABIN, P. J.; CERDÁ, J; LUBZENS, E. (Eds.).The fish oocyte: from basic studies to biotechnological applications, Springer Netherlands, 2007.

NWADUKWE, F. O. Inducing oocyte maturation, ovulation and spawning in the African catfish, *Heterobranchius longifilis* Valenciennes (Pisces: Claridae), using frog pituitary extract. **Aquaculture and Fisheries Management**, v.24, n.4, p.625-630, 1993.

OKUZAWA, K. Puberty in teleosts. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.26, p. 31-41, 2002.

PATIÑO, R.; SULLIVAN, C. V. Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in teleost fish. **Fish Physiology and Biochemistry**, Netherlands, v.26, n.1, p.57-70, jan 2002.

PATIÑO, R.; TAKASHIMA, F. **Gonads**. In: _____. An atlas of fish histology: normal and pathological features. Kodansha: Takashima, 1995. p.128-153.

PATIÑO, R.; YOSHIKAZI, G.; THOMAS, P.; KAGAWA, H. Gonadotropic control of ovarian follicle maturation: the two-stage concept and its mechanisms. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 129, n. 4. p. 427-439, 2001.

PATIÑO, R.; YOSHIKAZI, G.; BOLAMBA, D.; THOMAS, P. Role of arachidonic acid and protein kinase C during maturation-inducing hormone-dependent meiotic resumption and ovulation in ovarian follicles of Atlantic croaker. **Biology of reproduction**, v.68, p.516-523, Feb. 2003.

PAVLIDIS, M.; KOUMOUNDOUROS, G.; STERIOTI, A.; SOMARAKIS, S.; DIVANACH, P. Evidence of temperature-dependent sex determination in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). **Journal of Experimental Zoology**, v.287, n. 3, p. 225–232, Feb. 2000.

PERAZZOLO, L. M.; COWARD, K.; DAVAIL, B.; NORMAND, E.; TYLER, C. R.; PAKDEL, F.; SCHENEIDER, W. J.; LE MENN, F. Expression and localization of messenger ribonucleic acid for the vitellogenin receptor in ovarian follicles throughout oogenesis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Biology of Reproduction**, v.60, n.5, p.1057–1068, May 1999.

PINTER, J.; THOMAS, P. Induction of ovulation of mature oocytes by the maturation-inducing steroid 17, 20 β -21-trihydroxy-4-pregnen-3-one in the spotted seatrout. **General and Comparative Endocrinology**, v.115, p. 200-209, 1999.

PRAT, N.; MUNNÉ, A.; RIERADEVALL, M; SOLÀ, C; BONADA, N. ECOBILL A protocol to establish the ecological status of Mediterranean rivers and streams. Barcelona: Univeridad de Barcelona, 1999.

REITH, M. E.; BERFIELD, J. L.; WANG, L. C.; FERRER, J. V.; JAVITCH, J. A. The uptake inhibitors cocaine and benztropine differentially alter the conformation of the human dopamine transporter. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 31, p. 29012-29018, Aug. 2001.

RESENDE, E. K. Migratory fishes of the Paraguay–Paraná basin, excluding the Upper Paraná basin. p. 99–156. In: CAROLSFIELD, J., HARVEY, B.; ROSS, C.; BAER, A (Eds.). **Migratory fishes of South America: biology, social importance and conservation status**. Victoria: World Fisheries Trust, The World Bank and The International Development Research Centre, 2003.

ROTTMANN, R. W.; SHIREMAN, J. V.; CHAPMAN, F. A. Hormonal control of reproduction in fish for infuced spawning. **Southern Regional Aquaculture Center**, n. 424, Nov. 1991.

ROUTRAY, P.; CHOUDHARY, A. K.; DASH, S. N.; VERMA, D. K.; DASH, C.; SWAIN, P.; JENA, J. K.; GUPTA, S. D.; SARANGI, N. Cryopreservation of dead fish spermatozoa several hours after death of Indian major carp, *Labeo rohita* and its successful utilization in fish production. **Aquaculture**, Amsterdam, v.261, n.4, p.1204–1211, Dec. 2006.

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

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

SHIBATA, Y.; IWAMATSU, T.; OBA, Y.; KOBAYASHI, D.; TANAKA, M.; NAGAHAMA, Y.; SUZUKI, N.; YOSHIKUNI, M. Identification and cDNA cloning of alveolin, an extracellular metalloproteinase, which induces chorion hardening of medaka (*Oryzias latipes*) eggs upon fertilization. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 8349-8354, 2000.

SHIRAIISHI, T.; OHTA, K., YAMAGUCHI, A.; YODA, M.; CHUDA, H.; MATSUYAMA, M. Reproductive parameters of the chub mackerel *Scomber japonicus* estimated from human chorionic gonadotropin-induced final oocyte maturation and ovulation in captivity. **Fisheries Science**, v.71, n.3, p.531-542, June 2005.

SILVA, E. B. **Avaliação comparativa da utilização do sêmen criopreservado e fresco na fertilização dos óvulos de curimatã**. *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1847). 2000. 49p. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

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

SPECKER, J. L.; SULLIVAN, C. V. Vitellogenesis in fishes: status and perspectives. In: DAVEY, K. G.; PETER, R. E.; TOBE, S. S. (Eds.) **Perspectives in Endocrinology**. Ottawa: National Research Council, 1994. p. 304-315.

SQUIRES, E. L.; McCUE, P. M.; VANDERWALL, D. The current of status of equine embryo transfer. **Theriogenology**, v.51, n.1, p.91-104, Jan. 1998.

STREIT JR., D. P. **Extrato de hipófise de frango e de coelho como indutores gonadais de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) macho e fêmea, em comparação com o extrato de hipófise de carpa.** 2002. 38 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

TABORSKY, M. Sperm competition in fish: bourgeois males and parasitic spawning. **Trends in Ecology & Evolution**, v.13, p. 222-227, 1998.

TVEITEN, H. H. SOLEVAG, H. K. Holding temperature during the spawning season influences final maturation and egg quality in common woffish. **Journal of Fish Biology**, v.58, n. 2, p. 374-385, Feb. 2001.

TYLER, C. R.; SUMPTER, J. P. Oocyte growth and development in teleosts, **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, Netherlands v.6, n.3, p.287-318, Sept. 1996.

TYLER, C. R.; LUBBERINK, K., Identification of four ovarian receptor proteins that bind vitellogenin but not other homologous plasma lipoproteins in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Journal of Comparative Physiology**, v. 166, n. 1, p.11-20, 1996.

TYLER, C. R.; VAN AERLE, R.; HUTCHINSON, T. H.; MADDIX, S. TRIP, H. An in vivo testing system for endocrine disruptors in fish early life stages using induction of vitellogenin. **Environmental Toxicology**, v.18, p.337-347, 1999.

WALLACE, R. A. Vitellogenesis and oocyte growth in non-mammalian vertebrates. In: BROWDER, L. W. (Ed.). **Developmental Biology**, New York, v. 1, p. 127-177, 1985.

WALLACE, R. A.; SELMAN, K. Ultrastructural aspects of oogenesis and oocyte growth in fish and amphibians. **Journal of Electron Microscopy Technique**, v.16, n.3, p.175-201, Nov. 1990.

WEN, H. S.; LIN, H. R. Effects of exogenous neurohormone, gonadotropin (GtH) and dopaminergic drugs on the serum GtH content and ovulatory responsiveness of wild catfish, *Silurus asotus*. **Aquaculture**, Amsterdam, v.32, n.2, p.204-212, 2004.

WENDLING, N. C.; BENCIC, D. C.; NAGLER, J. J.; CLOUD, J. G.; INGERMANN, R. L.. Adenosine triphosphate levels of chinool salmon

(*Oncorhynchus tshawytscha*) eggs following *in vitro* maintenance and activation/fertilization. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.22, n.3, p.217-223, Apr. 2000.

WOYNAROVICH, E.; HORVATH, L. **A propagação artificial de peixes de águas tropicais**. Tradução de Vera Lúcia Mixtro Chama. Brasília: FAO/CODEVASF/CNPq, 1989. 225 p.

YAO, Z.; EMERSON, C. J.; CRIM, L. W. Ultrastructure of the spermatozoa and eggs of the ocean Pout (*Macrozoarces americanus* L.), an internally fertilizing marine fish. **Molecular Reproduction and Development**, v. 42, n. 1, p. 58-64, Sept. 1995.

YARON, Z. Endocrine control of gametogenesis and spawning induction in the carp. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 129, p. 49-73, 1995.

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

**II – DESENVOLVIMENTO DE PROTOCOLO PARA INDUÇÃO
HOMONAL DA REPRODUÇÃO DO JAÚ, *Zungaro jahu*: RELATO DE
CASO.**

**DESENVOLVIMENTO DE PROTOCOLO PARA INDUÇÃO
HORMONAL DA REPRODUÇÃO DO JAÚ, *Zungaro jahu*: RELATO DE
CASO**

Drumond, M. M.; Murgas, L. D. S.; Logato, P.V.R.; Pompeu, P. S.; Pereira, G.
J. M. P.; Felizardo, V. O. Bedore, A. G., Lopes, J. M.

RESUMO

Nos períodos reprodutivos 2006-2007 e 2007-2008 realizou-se experimentos para se determinar qual o número e posologia de doses hormonais à base de extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC) na indução da reprodução de jaú (*Zungaro jahu*). Nos períodos experimentais estudados foram testados dois protocolos diferentes para indução de fêmeas e machos: no primeiro protocolo testou-se duas doses para os machos (número de indivíduos, N=2) sendo a primeira 0,50mg/kg e a segunda 5,00mg/kg, e três doses para as fêmeas (N=3) sendo a primeira 0,25mg/kg, a segunda de 0,50mg/kg e a terceira 5,00mg/kg de peso corporal. No segundo experimento testou-se protocolo de quatro doses para o macho (N=1) sendo as três primeiras na posologia de 0,30mg/kg e a última 6,00mg/kg e três doses para a fêmea (N=1), sendo a primeira 0,30mg/kg, a segunda 0,60mg/kg e a terceira 6,00mg/kg de peso corporal. Foram avaliados os parâmetros peso da desova, número de ovos/g de desova, fecundidade individual, fecundidade relativa e índice gonadossomático, para as fêmeas e volume espermiado e concentração espermática para os machos. Os resultados encontrados demonstraram que, em relação a todos os parâmetros avaliados, as doses recomendadas no segundo experimento apresentaram melhores resultados tanto para fêmeas quanto para machos.

Palavras-chave: indução hormonal, reprodução, cativo

ABSTRACT

In the reproductive periods 2006-2007 and 2007-2008 experiments were accomplished to determine the number, amount and timing of hormonal doses based on row extract of carp hypophysis (EBHC) to be used in the induction of jaú reproduction (Zungaro jahu). In the studied experimental periods two different protocols were tested for induction of females and males: in the first protocol two doses were tested for males (number of individuals, N=2) being the first 0,50mg/kg and second 5.00 mg/kg, and three doses for the females (N=3) being the first 0,25mg/kg, second of 0,50mg/kg and the third 5.00 mg/kg of corporal weight. In the second experiment protocol of four doses was tested for the male (N=1) being the first three in the 0,30mg/kg dosage and the last 6.00 mg/kg and three doses for the female (N=1), being the first 0,30mg/kg, the second 0,60mg/kg and the third 6.00 mg/kg of corporal weight. The parameters appraised were weight of the spawning, no. of spawning eggs/g, individual fecundity, relative fecundity and gonadossomatic index, for females, and volume and spermatic concentration for males. The found results demonstrated that, in relation to all the appraised parameters, the recommended doses in the second experiment presented better results both for females and for males.

Key words-: hormonal induction, reproduction, captivity

INTRODUÇÃO

O elevado número de espécies no cultivo aquícola implica em uma grande plasticidade de características reprodutivas, o que pode fazer com que uma técnica de indução bem sucedida em determinada espécie possa ter efeitos diferenciados em outra. Desta maneira, se faz necessário o conhecimento das características da espécie a ser propagada, como sua fisiologia reprodutiva, época e local de desova além das características físico-químicas do ambiente, para que se possa manipular adequadamente a reprodução destes animais (Andrade & Yasui, 2003).

O jaú (*Zungaro jahu*) é uma espécie nativa originária dos rios do Centro-Oeste, Sudeste e Sul do Brasil. Pertence à ordem Siluriformes, família Pimelodidae, apresentando grande porte, podendo atingir 1,50m e ultrapassar 100kg (Ihering, 1929). É uma espécie migradora típica, realizando deslocamentos ao longo dos rios das bacias do Paraná (Agostinho et al., 2003), Paraguai (Resende, 2003) e Uruguai (Zaniboni-Filho & Schulz, 2003).

A população desta espécie vem sofrendo declínio em consequência de fatores que interferem no seu comportamento migratório como o desmatamento marginal dos rios, a poluição e a construção de hidrelétricas (Torloni, 1992).

À semelhança de grande número de espécies reofilicas, que não se reproduzem naturalmente em condições de cativeiro, exemplares de *Z. jahu* necessitam ser induzidos à reprodução através de aplicação de hormônios (Narahara et al., 1994).

Diante da dificuldade em se reproduzir a espécie em cativeiro, da inexistência de dados científicos sobre sua reprodução em cativeiro, além da necessidade da produção de alevinos, seja para repovoamento ou para produção e engorda, uma vez que encontra-se ameaçada de extinção, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo eficaz para a indução hormonal da reprodução de jaú, *Zungaro jahu*.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado a partir de dois experimentos realizados em locais e épocas diferentes.

Experimento 1: Reprodução hormonal induzida de jaú - período reprodutivo 2006-2007.

Realizada na Estação de Piscicultura de Jupiá, CESP, localizada entre os municípios de Ilha Solteira, SP, e Três Lagoas, MS.

Os reprodutores foram selecionados através de caracteres sexuais secundários, como ventre abaulado, para fêmeas, e vermelhidão da papila urogenital, para ambos os sexos. Após seleção, os reprodutores foram separados por sexo, transferidos para aquários de alvenaria e vidro, com capacidade de 1500L e mantidos nestes para indução hormonal da reprodução e posterior desova (Figura 1).



FIGURA 1: Aquários para estocagem dos reprodutores

Foram testados protocolos de indução, à base de extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC), para fêmeas e machos (Tabela 1), protocolos estes que já haviam sido utilizados, com sucesso, na indução de reprodução de outras espécies de siluriformes nativas.

TABELA 1: Protocolo para indução da reprodução de jaú utilizando-se EBHC. Período reprodutivo 2006-2007.

Sexo	1ª Dose	2ª Dose	3ª Dose
Macho	-	0,50mg/kg	5,00mg/kg
Fêmea	0,25mg/kg	0,50mg/kg	5,00mg/kg

Foi utilizado um total de seis exemplares de *Z. jahu*, sendo três machos e três fêmeas.

O intervalo entre as doses, para fêmeas foi de 24 horas e 12 horas, respectivamente, enquanto que para os machos respeitou-se um intervalo de 12 horas entre as aplicações, sendo que a primeira dose para estes foi sincronizada com a segunda dose das fêmeas.

Experimento 2: Reprodução hormonal induzida de jaú - período reprodutivo 2007-2008.

Realizada na Estação de Piscicultura de Volta Grande, CEMIG, localizada no município de Conceição das Alagoas, MG.

A seleção dos reprodutores, bem como sua contenção até o momento da indução e desova, seguiu os procedimentos descritos no experimento anterior. Foram utilizados dois animais, uma fêmea e um macho.

O tempo de permanência dos animais, após seleção em tanque, nos aquários foi de quatro dias.

Foram testados dois protocolos, à base de EBHC, sendo um para o macho e outro para a fêmea (Tabela 2).

TABELA 2: Protocolo para indução da reprodução de jaú, utilizando-se EBHC, período reprodutivo 2007-2008

Sexo	1ª Dose	2ª Dose	3ª Dose	4ª Dose
Macho	0,30mg/kg	0,30mg/kg	0,30mg/kg	6,00mg/kg
Fêmea	-	0,30mg/kg	0,60mg/kg	6,00mg/kg

Foram administradas doses, com intervalo de 24 horas, no macho pelo período de três dias. A dose definitiva para o macho (4ª dose) foi sincronizada com a última dose para as fêmeas, administrada após 12 horas da segunda dose.

Nos dois experimentos, caso os machos não apresentassem resultados positivos à indução, seriam sacrificados por concussão cerebral e seus testículos retirados, para obtenção de sêmen por maceração.

Em ambos os experimentos, após extrusão dos gametas, avaliaram-se os seguintes parâmetros:

Para fêmeas:

- a. peso da desova;

- b. número de ovos / g de desova;
- c. fecundidade individual (número de ovócitos desovados / fêmea);
- d. fecundidade relativa (número de ovócitos desovados / peso corporal);
- e. índice gonadossomático (peso da desova x 100 / peso corporal).

Para machos:

- a. volume de sêmen espermiado;
- b. concentração espermática (determinada a partir da diluição do sêmen em solução de Formol Citrato - 2,9g de citrato de sódio, 4ml de solução comercial de formaldeído 35% e água destilada q.s.p. 100ml. Contagem do número de espermatozóides em câmara de Neubauer.

A concentração espermática foi obtida utilizando-se as seguintes fórmulas:

$$CE = N \times FC \quad [1]$$

onde:

CE = concentração espermática (espermatozóides/mm³);

N = número de células contadas na câmara de Neubauer.

FC = fator de correção, dado por:

$$FC = (q \times fd) / d \quad [2]$$

onde:

$q = 5$, e representa a razão entre o número total de quadrículos da câmara de

Neubauer (25) e o número de quadrículos contados (5);

fd = fator de diluição da alíquota de sêmen (= 104);

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

Posteriormente procedeu-se à fertilização “a seco” e os ovos recém-hidratados foram transferidos para incubadoras do tipo funil com aeração constante (Figura 2).



FIGURA 2: Incubadoras do tipo “funil” para avaliação da fertilidade

Para testar a eficácia da indução da reprodução, coletou-se três amostras de cada incubadora para cálculo da taxa de fertilidade, dada pela seguinte fórmula:

$$TF = \left[\frac{E}{(e + i)} \right] \times 100$$

onde:

TF = taxa de fertilidade

E = número de embriões viáveis

i = número de ovos inviáveis

RESULTADOS

Das fêmeas induzidas no experimento 1, 66,67% desovaram (Figura 3) (fêmeas 1 e 2). A fêmea induzida no experimento 2 (fêmea 3) também desovou (Figura 4). Os dados relativos ao peso da desova (PD), fecundidade individual (FI), relativa (FR) e índice gonadossomático (IGS) encontram-se na tabela 3.



FIGURA 3: Desova experimento 1



FIGURA 4: Desova do experimento 2

TABELA 3: Peso inicial de cada fêmea (PI), peso da desova, número de ovócitos/g, fecundidade individual, fecundidade relativa e índice gonadossomático das fêmeas de jaú (*Z. jahu*), submetidas a dois protocolos diferentes de indução hormonal

Experimento 1 – período reprodutivo 2006-2007						
	PI (g)	PD (g)	Nº ovos/g	FI	FR	IGS
Fêmea 1	13400	260	683	177580	13,25	1,94
Fêmea 2	15600	70	657	45990	2,95	0,45
Experimento 2 – período reprodutivo 2007-2008						
	PI (g)	PD	Nº ovos/g	FI	FR	IGS
Fêmea 3	16500	997	865	862405	52,27	6,04

Dos machos induzidos no experimento 1, nenhum respondeu ao tratamento, sendo necessário o sacrifício de um deles (macho 1) para se obter sêmen intratesticular do mesmo (Figura 5). O macho induzido à reprodução no experimento 2 (macho 2) espermiou espontaneamente, mediante massagem

celomática (Figura 6). Os dados relativos ao volume espermiado, por macho, e concentração espermática do sêmen encontram-se na Tabela 4.



FIGURA 5: Testículo retirado do macho para maceração (experimento 1)



FIGURA 6: Massagem celomática para espermição (experimento 2)

TABELA 4: Peso inicial (PI) e volume espermiado (VE), concentração espermática (CE) dos machos de jaú (*Z. jahu*), submetidos a dois protocolos diferentes de indução hormonal

Experimento 1 – período reprodutivo 2006-2007			
	PI (g)	VE (mL)	CE (sptz x 10 ⁹)
Macho 1*	13400	07	08
Experimento 2 – período reprodutivo 2007-2008			
	PI (g)	VE (mL)	CE (sptz x 10 ⁹)
Macho 2	16500	15	12

* sêmen intratesticular

As taxas de fertilização variaram de 5% a 90%. Notou-se grandes diferenças entre incubadoras fertilizadas com sêmen intratesticular (experimento 1) e sêmen ejaculado (experimento 2). Os dados relativos à taxa de fertilização, por fêmea, encontram-se na Tabela 5.

TABELA 5: Taxas de fertilização (TF), por fêmea de jaú (*Z. jahu*), em cada período experimental

Experimento 1 – período reprodutivo 2006-2007	
	TF (%)
Fêmea 1 x macho 1	5
Fêmea 2 x macho 1	15
Experimento 2 – período reprodutivo 2007-2008	
	TF (%)
Fêmea 3 x macho 2	90

DISCUSSÃO

A desova induzida através de diferentes terapias hormonais é bastante estudada. Entretanto, a metodologia de hipofiseção ainda é a mais utilizada, mas é necessário, neste tipo de metodologia, se levar em conta o protocolo de preparação do extrato de hipófise, a dose injetada e o número de doses aplicadas (Legendre *et al.*, 1996).

O presente estudo foi realizado com diferentes doses para fêmeas e machos, todas baseadas na utilização de extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC), que fornece hormônios gonadotrópicos necessários à indução da reprodução. Segundo Zaniboni-Filho & Weingartner (2007), a grande questão em se utilizar este tipo de hormônio é que há variação na quantidade de gonadotropina presente na hipófise no momento da sua coleta além da interferência que o processo de conservação pode oferecer na degradação do hormônio, o que ressalta a necessidade de se testar diferentes doses para uma espécie até se determinar qual àquela eficaz.

Sampaio & Sato (2006) obtiveram resultados positivos de hipofiseção para 75% das fêmeas de *Pseudopimelodus charus* e 80% para fêmeas de *Ramdia*

quelen, utilizando dosagem única de 6mg/kg de peso corporal das fêmeas. No presente estudo, mesmo com doses hormonais diferentes, pode-se considerar que o método de indução aplicado à desova de *Z. jahu* indica ser favorável, comparando-se com resultados obtidos para diversas espécies de Siluriformes: 71% para *R. sapo* (Espinach Ros et al., 1984) e 70% para *Franciscodoras marmoratus*, 60% para *Conorhynchos conirostris*, 75% para *Lophiosilurus alexandri*, 70% para *Pimelodus maculatus*, 58% para *Pseudoplatystoma corruscans* e 82% para *Rhinelepis aspera* (Sato, 1999).

Há inúmeras variações nos métodos para administração de hormônios em peixes, porém, as fêmeas geralmente requerem maiores doses de hormônios que os machos, sendo que doses parceladas produzem resultados melhores que uma única dose (Woynarovich & Horváth, 1983). No presente estudo, um dos experimentos acompanhou esta pressuposição (experimento 1), entretanto, para o experimento 2, no qual se administrou maior número de doses para machos e fêmeas, o resultado encontrado, para os parâmetros avaliados, foi visivelmente melhor.

Segundo Legendre et al. (1996), o tamanho e o número de ovócitos produzidos em uma desova é altamente variável entre os siluriformes. A fecundidade relativa desta ordem varia de poucas dúzias como em *Ictarus punctatus* (Tucker & Robinson, 1900) até mais de 150000 ovócitos por quilo de peso corporal, como em *Clarias gariempinus* e *Pseudoplatystoma corruscans* (Legendre et al., 1992; Cardoso et al., 1995). O jaú, *Z. jahu*, espécie alvo deste estudo, apresentou variações superiores a 1700% nos valores de fecundidade relativa, oscilando desde 2,95 à 52,27, dependendo do período estudado e, conseqüentemente, da dose hormonal administrada.

Assim como a fecundidade relativa, o número de ovócitos/grama de desova varia bastante entre os pimelodídeos, podendo atingir valores superiores a 3200 ovócitos/g de ova, como ocorre em *Pimelodus maculatus*. Nota-se, então,

que para diferentes espécies, tanto o tamanho quanto o peso da fêmea, bem como o índice gonadossomático (IGS) que ela apresenta quando da desova, não influenciam o número de ovócitos/g de desova. Estudo que comprova esta afirmação foi realizado por Sato *et al.* (2003), demonstrando que, dentre outros pimelodídeos, fêmeas de *P. maculatus*, com tamanho médio de 32,1cm e 688g, apresentaram IGS médio de 5,53 e 3276 ovócitos/g de desova, enquanto fêmeas de *Leophisilurus alexandri*, com tamanho médio de 61,9cm e 3147g, apresentaram IGS médio de 2,04 e 74 ovócitos/g de desova. No presente estudo, os valores do peso da desova, IGS e número de ovócitos/g de desova variou muito entre as fêmeas e entre os períodos experimentais, o que corrobora com os relatos de Sato *et al.* (2003), que demonstram a influência da dose hormonal administrada e das variações individuais entre os espécimes. Por isto, há necessidade de se desenvolver protocolo de indução efetivo e específico para cada espécie alvo, para então se determinar, com precisão, os valores reais dos parâmetros reprodutivos da espécie.

Nas pequenas produções aquícolas, tem-se notado uma maior preocupação com a qualidade ovocitária e larval em detrimento à qualidade espermática, mesmo sabendo que esta afeta a produção de larvas saudáveis. Entretanto, em criações comerciais, o sêmen é freqüentemente inadequado, tanto em termos de quantidade quanto de qualidade e nem sempre consegue sucesso no processo de fertilização e posterior eclosão (Rurangwa *et al.*, 2004). É o que acontece normalmente com as espécies que não realizam espermição espontaneamente mediante massagem celomática, como *Clarias gariepinus* e como ocorrido no experimento 1 deste estudo, com *Zungaro jahu*, onde o sêmen intratesticular foi obtido através da maceração dos testículos após o sacrifício do animal por concussão cerebral.

Em machos, os tratamentos hormonais não são utilizados para estimular a maturação dos gametas, mas sim para aumentar a fluidez e o volume seminal,

o que acarreta, para várias espécies, diminuição significativa da concentração espermática (Vermeirssen et al., 1998; Shangguan & Crim, 1999; Vermeirssen et al., 2000). Além disto, a indução artificial da espermição, dependendo do tipo de hormônio utilizado, pode afetar a resposta fisiológica do macho. Em *Silurus glanis*, o número total de espermatozoides coletados foi significativamente maior quando da utilização de EBHC, quando comparada à indução por análogos de GnRH (Roelants et al., 2000). Porém, em outras espécies, como *P. ferrugineus*, o uso destes análogos promoveu aumento no volume, concentração e motilidade espermática, bem como aumento no pH do plasma seminal (Clearwater & Crim, 1998).

Como as variações espécie-específicas são muito grandes, reforça-se a importância de se testar diferentes hormônios, em diferentes doses, na indução artificial da espermição, até que se determine protocolo eficaz, que, além de manter as características de qualidade esperadas do sêmen, cause menos danos metabólicos ao animal.

No presente estudo, como foram analisadas apenas duas variáveis, volume espermiado e concentração espermática, sob a ação de um único tipo de hormônio (EBHC), com diferente posologia e número de doses, pode-se afirmar apenas que, a aplicação de pequenas doses diariamente e uma dose maior, decisiva, sincronizada com a aplicação da última dose nas fêmeas, faz com que o macho desencadeie processos internos que permitem a espermição quando da massagem abdominal. Este fato mostra-se de suma importância uma vez que, até então, quando se realizava a reprodução induzida de jaú, os machos tinham que ser sacrificados devido à falta de resposta da indução sobre a ejaculação; e, como a espécie é de interesse comercial e está ameaçada de extinção, protocolos definidos são importantes tanto para a produção intensiva quanto para a conservação genética da espécie.

Quanto às taxas de fertilização de *Z. jahu*, demonstra-se que foram muito variáveis entre os períodos experimentais estudados, o que reforça a hipótese da influência das respostas individuais à indução hormonal e conseqüente qualidade dos gametas. Considerando-se apenas o experimento 2, a taxa de fertilização pode ser considerada ótima, em comparação com outros estudos com Siluriformes: 75% em *P. charus* e em *R. quelen* (Sampaio & Sato 2006), 61,6% em *R. sapo* (Espinach Ros *et al.*, 1984), 71% em *F. marmoratus*, 68% em *C. conirostris*, 59% em *L. alexandri*, 65% em *P. maculatus*, 79% em *P. coruscans* e 72% em *R. aspera* (Sato, 1999).

CONCLUSÃO

O protocolo 2 foi eficaz para a indução da reprodução do jaú, *Zungaro jahu*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C.; SUZUKI, H. I.; JÚLIO JR., H. F. Migratory fish from the upper Parana river basin, Brasil. p.19-98. In: CAROLSFIELD, J., HARVEY, B.; ROSS, C.; BAER, A. (Eds). **Migratory fishes of South America: biology, social importance and conservation status**. Victoria: World Bank and The International Development Research Centre, 2003.
- ANDRADE, D. R; YASUI, G. S. O manejo da reprodução natural e artificial e sua importância na produção de peixes no Brasil, **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.27, n.2, p.166-172, abr./jun. 2003.
- CARDOSO, E. L.; ALVES, M. S. D.; FERREIRA, R. M. A.; GODINHO, H. P. Embryogenesis of the Neotropical freshwater Siluriforme *Pseudoplatystoma coruscans*. **Aquatic Living Resources**, v.8, n.4, p. 343-346, oct/nov 1995.

CLEARWATER S. J.; CRIM, L. W. Gonadotropin releasing hormone-analogue treatment increases sperm motility, seminal plasma pH and sperm production in yellowtail flounder *Pleuronectes ferrugineus*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.19, n.4, p.349–357, dec 1998.

ESPINACH ROS, A.; FORTUNY, A.; AMUTIO, V. G. Induced breeding of the sabalo, *Prochilodus platensis* Holmberg. **Aquaculture**, Amsterdam, v.4, n.1, p.385-388, 1984.

IHERING, R. **Da vida dos peixes**: ensaios e cenas de pescaria. São Paulo: Melhoramentos, 1929. 150 p.

LEGENDRE, M.; LINHART, R.; BILLARD, R. Spawning and management of gametes, fertilized eggs and embryos in Siluroidei. **Aquatic Living Resources**, v.9, n.5, p. 59-80, 1996.

LEGENDRE, M.; TEUGELS, G. G.; CAUTY, C.; JALABERT, B. A comparative study on morphology, growth rate and reproduction of *Clarias gariepinus*, *Heterobranchus longifilis*, and their reciprocal hybrids, **Journal of Fish Biology**, v.40, n.1, p.59-79, Jan. 1992.

NARAHARA, M. Y.; KAVAMOTO, E. T.; TALMELLI, E. F. A.; GODINHO, H. M. Comportamento reprodutivo da pirapitinga do sul *Brycon* cf. *reinhardt* em cultivo. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, 8.; ENCONTRO DE PATOLOGIA DE ORGANISMOS AQUÁTICOS, 3.; 1994, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: ESALQ/FEALQ, 1994.

RESENDE, E. K. Migratory fishes of the Paraguay-Paraná Basin, excluding the Upper Paraná Basin.. In: CAROLSFELD, J.; HARVEY, B.; ROSS, C.; BAER, A. (Eds.). **Migratory fishes of South America**: biology, fisheries, and conservation status. Victoria: World Fisheries Trust/IDRC/World Bank. 372p, 2003. p.99-155.

ROELANTS, I.; MIKOLAJCZYK, T.; EPLER, P.; OLLEVIER, F.; CHYB, J.; BRETON, B. Induction of spermiation in common carp after enhanced intestinal uptake of sGnRH-A and primozide. **Journal of Fish Biology**, v.56, n.6, p.1398-1407, Dec. 2000.

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

SAMPAIO, E. V; SATO, Y. Biologia reprodutiva e desova induzida de duas espécies de bagres (Osteichthyes: Siluriformes) da bacia do rio São Francisco. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, Maringá, v.28, n.3, p.263-268, jul./set. 2006.

SATO, Y. **Reprodução de peixes da bacia do Rio São Francisco**: indução e caracterização de padrões. 1999. 179f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

SATO, Y.; FENERICH-VERANI, N.; GODINHO, H. P. Reprodução induzida de peixes da bacia do São Francisco. In: GODINHO, H. P.; GODINHO, A. L. (Org.). **Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais**. Belo Horizonte: PUC Minas, 2003. p.275-289.

SHANGGUAN, B.; CRIM, L. W. Seasonal variation in sperm production and sperm quality in male winter flounder, *Pleuronectes americanus*: the effects of hypophysectomy, pituitary replacement therapy, and GnRH-A treatment. **Marine Biology**, London, v. 34, n. 1, p. 19-27, Jan./Feb. 1999.

TORLONI, C. E. C. Manejo dos recursos pesqueiros nos reservatórios da CESP. São Paulo: CESP-SP, 1992. p.16. (Série Pesquisa e Desenvolvimento, 63).

TUCKER, C. S.; ROBINSON, E. H. **Channel catfish farming handbook**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1990.

VERMEIRSEN, E. L. M.; MAZORRA DE QUERO, C.; SHIELDS, R.; NORBERG, B.; SCOTT, A. P.; KIME, D. Fertility and motility of sperm from male Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) treated with gonadotrophin-releasing hormone agonist. In: NORBERG, B.; KJESBU, O. S.; TARANGER, G. L.; ANDERSON, E.; STEFANSSON, S. O. (Eds.). **Reproductive Physiology of Fish**, Elsevier, 2000. p.399-401.

VERMEIRSEN, E. L. M.; SCOTT, A. P.; MYLONAS, C. C.; ZOHAR, Y. Gonadotropin releasing hormone agonist stimulates milt fluidity and plasma concentrations of 17,20h-dihydroxylated and 5h-reduced, 3a-hydroxylated C21 steroids in male plaice (*Pleuronectes platessa*). **General and Comparative Endocrinology**, v.112, p. 163-177, Nov. 1998.

WOYNAROVICH, E.; HORVÁTH, L. **A propagação artificial de peixes de águas tropicais**: manual de extensão. Brasília: Escopo, 1983.

ZANIBONI FILHO, E.; SCHULZ, U. H. Migratory fishes of the Uruguay river. In: CAROLSFELD, J.; HARVEY, B.; ROSS, C.; BAER, A. (Eds.). Migratory Fishes of South America- Biology, Fisheries and Conservation Status. IDRC, **World Fisheries Trust and World Bank**, 2003. p.157-194.

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

**III – CARACTERÍSTICAS DO SÊMEN DE JAÚ (*Zungaro jahu*) *in natura*
E PÓS-DESCONGELAMENTO: AÇÃO DOS DILUIDORES E
CRIOPROTETORES SOBRE A MORFOLOGIA ESPERMÁTICA**

**CARACTERÍSTICAS DO SÊMEN DE JAÚ (*Zungaro jahu*) *in natura* E
PÓS-DESCONGELAMENTO: AÇÃO DOS DILUIDORES E
CRIOPROTEORES SOBRE A MORFOLOGIA ESPERMÁTICA**

Drumond, M. M.; Murgas, L.D.S.; Logato, P.V.R.; Pompeu, P.S.; Pereira,
G.J.M.P.; Felizardo, V. O.; Bedore, A.G., Lopes, J. M.

RESUMO

Para avaliar os efeitos de diluidores e crioprotetores sobre a morfologia espermática de jaú, *Zungaro jahu*, realizou-se experimentos nos períodos reprodutivos 2006-2007 e 2007-2008. Em ambos os experimentos foram testadas seis soluções diluidoras diferentes, utilizando DMSO e Metanol, sozinhos ou em combinação com gema de ovo e lactose; em todos os tratamentos utilizou-se como solução diluidora base o BTS. O congelamento do sêmen aconteceu em botijão de nitrogênio a -196°C e o descongelamento, em banho-maria (60°C , 8s). O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 2×7 (dois machos x sete tratamentos). As alterações morfológicas avaliadas foram: cabeça isolada, degenerada, microcefalia e macrocefalia, peça intermediária degenerada e caudas enrolada, dobrada e fraturada. Após descongelamento verificou-se ação criotóxica dos tratamentos sobre algumas das patologias estudadas e efeito benéfico desses tratamentos sobre as patologias, principalmente, de cauda. O estudo conclui que qualquer um dos seis tratamentos testados pode ser utilizado na criopreservação do sêmen maduro de jaú, sem que haja alterações significativas na morfologia espermática, quando comparada ao sêmen *in natura*.

Palavras-chave: espermatozóide, criopreservação, criotoxicidade.

ABSTRACT

To evaluate the diluter effects and crioprotectors on jaú spermatid morphology, *Zungaro jahu*, two experiments were accomplished in 2006-2007 and 2007-2008 reproductive periods. In both experiments six different diluter solutions were tested, using DMSO and Methanol, alone or in combination with egg yolk and lactose; in all treatments BTS based solution were used as diluter. The semen freezing occurred in liquid nitrogen container at -196°C and the defreezing, in boiling water bath (60°C, 8s). The experimental design was the entirely casualized in factorial design 2x7 (two males x seven treatments). The morphological alterations appraised were: isolated heads, degenerate, micro-cephalic and macro-cephalic problems, degeneration of intermediate parts and wounded, bent and fractured tails. After the defreezing, criotoxicity of the treatments was verified on some of the studied pathologies and beneficial effect of those treatments on the pathologies, mainly, of tail. The study allowed the conclusion that all the six tested treatments can be used in the criopreservation of the ripe semen of jaú, without any significant alterations in the spermatid morphology, when compared to natural semen.

Key words: spermatozoid, criopreservação, criotóxico

INTRODUÇÃO

A busca constante pela otimização de processos técnicos da preservação de espermatozoides de peixes responde aos objetivos econômicos e ecológicos atuais (Murgas, *et al.*, 2004).

Biotecnologias como a criopreservação, que permitam a melhor utilização do sêmen de inúmeras espécies de peixes, são constantemente estudadas (Streit Jr. *et al.*, 2006). O objetivo destes estudos tem se baseado em três pontos: 1) padronização dos protocolos de congelamento, que permitam alcançar taxas de fertilização semelhantes às alcançadas com o sêmen fresco; 2) determinação de substâncias crioprotetoras que diminuam os efeitos tóxicos e de criodano sobre o espermatozoide e; 3) extrapolação de resultados entre as diferentes espécies de peixes, para se encontrar pontos de similaridade entre elas (Robles *et al.*, 2005).

A criopreservação do sêmen de peixes tem contribuído para o desenvolvimento de aplicação de métodos de controle reprodutivo, através da manipulação genética e da redução do número de machos no plantel de reprodutores, uma vez que o sêmen coletado pode ser utilizado por tempo indeterminado. Além disto, os métodos de congelamento podem ser utilizados em programas de hibridização, preservação de material genético de espécies ameaçadas e para formação de bancos genéticos (Ninhaus-Silveira, *et al.*, 2006).

A qualidade dos espermatozoides criopreservados é de fundamental importância para o sucesso da fertilização (Johnson *et al.*, 2000). A eficiência da fertilização pelo espermatozoide criopreservado está diretamente relacionada à composição da solução diluidora (Cloud, 2000). Para um diluidor prolongar a vida de um espermatozoide, *in vitro*, é necessário que ele possua a capacidade de reduzir a atividade metabólica dos espermatozoides, seja por inibidores químicos ou pela redução da temperatura (Johnson *et al.*, 2000). De acordo com Morris & Watson (1984), as injúrias causadas pela baixa temperatura sobre os espermatozoides são classificadas em duas categorias: a) as decorrentes diretamente do resfriamento ou pelo choque frio, em consequência do rápido congelamento e; b) as injúrias causadas indireta e independentemente da taxa de resfriamento e que vão se manifestar após períodos extensos, em baixas temperaturas.

Os critérios utilizados para a avaliação do sêmen de peixes, até o presente momento, têm se baseado em exames de motilidade, concentração espermática e percentagem de espermatozoides vivos e mortos (Kavamoto *et al.*, 1985), sem levar em consideração a ocorrência de defeitos morfológicos nas células espermáticas.

O estudo morfológico das células espermáticas e sua relação com a infertilidade dos machos alcançaram maior importância com o advento da inseminação artificial em mamíferos, especialmente na espécie bovina. Assim,

foram realizados estudos a fim de se evitar a expansão de doenças decorrentes de anormalidades esperáticas, resultantes do baixo índice de fertilidade (Barth & Oko, 1989).

Entre os peixes, diferentes estratégias reprodutivas e espermatozóides com diferentes morfologias são descritos. Em peixes de fertilização interna, os espermatozóides apresentam cabeça alongada e peça intermediária mais elaborada e estruturada. Em espécies de fertilização externa, os espermatozóides comumente apresentam a cabeça redonda ou oval e peça intermediária pequena. Entre os teleósteos, os espermatozóides não apresentam acrossoma. Esta condição é associada à presença da micrópila na superfície dos ovos dessas espécies (Jamieson, 1991).

Diante da escassez de informações acerca da ocorrência de anormalidades morfológicas nos espermatozóides de peixes nativos, especialmente aqueles ameaçados de extinção, como o jaú, *Zungaro jahu*, objetivou-se, neste trabalho, determinar os valores normais de alterações morfológicas do sêmen *in natura* e o percentual de alterações morfológicas, ocasionadas pelo manuseio e processo de congelamento, no sêmen descongelado desta espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado nos períodos reprodutivos de 2006-2007 e 2007-2008 nas Estações de Piscicultura de Jupia (CESP) e de Volta Grande (CEMIG), respectivamente.

Os reprodutores foram selecionados do plantel das referidas estações mediante observação de características que determinam o estado de maturação dos peixes, como papila urogenital hiperêmica, abaulamento e maciez ao toque da região ventral da parede celomática. Os animais selecionados (um por

período experimental) foram transportados aos laboratórios com auxílio de caminhão específico para este fim. No laboratório, os reprodutores foram acondicionados em aquários com capacidade de 1500L e aeração constante.

Em cada período experimental foi utilizada uma dose hormonal diferente, ambas à base de extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC). As doses utilizadas, por período experimental, estão descritas na Tabela 1.

TABELA 1: Protocolo utilizado na indução da reprodução de machos de jaú (*Z. jahu*), utilizando-se EBHC

Período reprodutivo	N	1ª Dose	2ª Dose	3ª Dose	4ª Dose
2006-2007	1	-	-	0,50 mg/kg	5,00 mg/kg
2007-2008	1	0,30 mg/kg	0,30 mg/kg	0,30 mg/kg	6,00 mg/kg

N = número de exemplares induzidos à reprodução, por período experimental

Coleta do sêmen e análise do sêmen *in natura*

O sêmen foi coletado por meio de massagem crânio-caudal da região ventral da cavidade celomática, após secagem e limpeza da região circunjacente à papila urogenital. Caso o macho não liberasse sêmen mediante massagem, o mesmo seria sacrificado por concussão cerebral, para retirada dos testículos e posterior maceração para obtenção de sêmen intratesticular.

Os ejaculados foram coletados em tubos de ensaio graduados esterilizados. As amostras utilizadas estavam livres de contaminantes (água, sangue, fezes ou urina) e durante todo o processamento do sêmen, permaneceram protegidas da luz e sob temperatura ambiente.

As amostras de sêmen *in natura* foram avaliadas em microscopia óptica em aumento de 100 dioptrias, mediante ativação com água destilada, para verificação da motilidade espermática.

Diluidores testados

Foram avaliadas seis soluções diluidoras, que diferiram entre si no tipo de crioprotetor empregado. Desta forma, testou-se seis crioprotetores, divididos da seguinte forma: sêmen *in natura* (controle), Dimetilsulfóxido (DMSO) associado à gema de ovo (D1) e à lactose (D3) e Metanol associado à gema de ovo (D2) e à lactose (D4) e apenas DMSO (D5) e Metanol (D6) como crioprotetores.

A solução diluidora (base) para cada tratamento consistiu de solução de BTS (Belltsville Thawing Solution[®]), nas concentrações finais de 5% e 90% (p:v). A Tabela 2 resume as soluções diluidoras testadas ao longo do estudo.

TABELA 2: Diluidores testados para avaliar as alterações morfológicas nos espermatozoides de jaú, *Z. jahu*, após congelamento / descongelamento

Crioprotetor	D1	D2	D3	D4	D5	D6
DMSO	8%	-	8 %	-	10%	-
Gema de ovo	5 %	5 %	-	-	-	-
Lactose	-	-	5 %	5 %	-	-
Metanol	-	8 %	-	8 %	-	10%
Diluidor base						
BTS	5 %	5 %	5 %	5 %	90%	90%

D1= diluidor 1; D2= diluidor 2; D3= diuidor 3, D4= diluidor 4, D5 = diluidor 5 e D6 = diluidor 6

Congelamento do sêmen de jaú e análise do sêmen descongelado

Após a diluição do sêmen pelas soluções crioprotetoras descritas, o mesmo foi envasado em palhetas de 0,5 mL (quatro palhetas por tratamento), que foram transferidas para botijão de vapor de nitrogênio líquido (Taylor-Wharton, modelo CP 300, tipo *dry shipper*) para resfriamento. Após 24 horas, as

raques foram transferidas para botijão de armazenamento (Cryometal, modelo DS-18) e congeladas, permanecendo submersas à temperatura de -196°C.

Após 96 horas do congelamento, as amostras foram descongeladas em banho-maria, a 60°C, por oito segundos. Três réplicas por palheta foram obtidas para análise morfológica do sêmen, totalizando nove réplicas, por tratamento. As amostras foram coletadas em solução de formol citrato (2,9g de citrato de sódio, 4mL de solução comercial de formaldeído 35% e água destilada q.s.p. 100mL).

As análises morfológicas do sêmen descongelado foram realizadas em microscópio óptico composto, com iluminação episcópica fluorescente (Nikon, modelo OPTIPHOT-2), no Laboratório de Microbiologia do Solo, do Departamento de Ciência dos Solos da UFLA.

O exame morfológico consistiu da observação da morfopatologia de 100 espermatozóides, focalizados em diversos campos ao longo de toda a lâmina, conforme esquematizado na Figura 1.

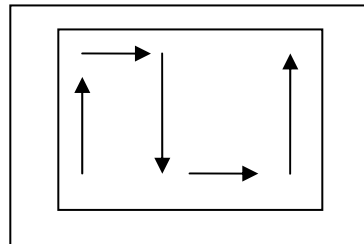


FIGURA 1: Seqüência de campos observados durante a análise morfológica do sêmen de jaú. As setas indicam o sentido da avaliação.

Sob aumento de 1.000 dioptrias foram analisadas as patologias de cabeça, peça intermediária e cauda, descritas na tabela 3.

TABELA 3: Patologias espermáticas avaliadas no sêmen *in natura* e pós-congelamento / descongelamento

Porção acometida	Patologias
-------------------------	-------------------

Cabeça	Microcefalia Macrocefalia Isolada Degenerada
Peça intermediária	Degenerada
Cauda	Enrolada Dobrada Fraturada

Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento utilizado para análise do efeito dos diluidores e crioprotetores sobre a morfologia espermática foi o inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 2 x 7 (machos e soluções diluidoras) com quatro repetições.

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \beta_j + (\tau\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk},$$

onde:

Y_{ij} = morfologia espermática encontrada na ação do diluidor i sobre o sêmen do macho j ;

μ = é a média geral do experimento;

τ_i = é o efeito do diluidor i ($i = 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6$);

β_j = é o efeito do macho j ($j = 1, 2$);

$(\tau\beta)_{ij}$ = é o efeito da interação entre o diluidor i e o macho j ;

ε_{ijk} = é o erro associado à morfologia espermática obtida pelo diluidor i , no macho j , considerado normal e independentemente distribuído, com média 0 e variância σ^2 .

As variáveis foram analisadas com auxílio do pacote estatístico SISVAR (Ferreira, 2004) e as médias dos tratamentos foram submetidas à análise de

variância e comparadas pelo teste Student-Newman-Keuls (SNK) considerando-se o nível de 5% de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As alterações morfológicas encontradas no presente estudo estão apresentadas nas Figuras 2 e 3.

Neste estudo, constatou-se que os espermatozóides de jaú apresentaram cabeça arredondada (Figura 2A), achado que corrobora os estudos de Billard (1970), Ginzbur (1972) e Grier (1985), que demonstram que a forma da cabeça dos espermatozóides está relacionada com o tipo de fertilização realizada pela espécie, afirmando existir relação entre cabeça arredondada e fertilização externa.

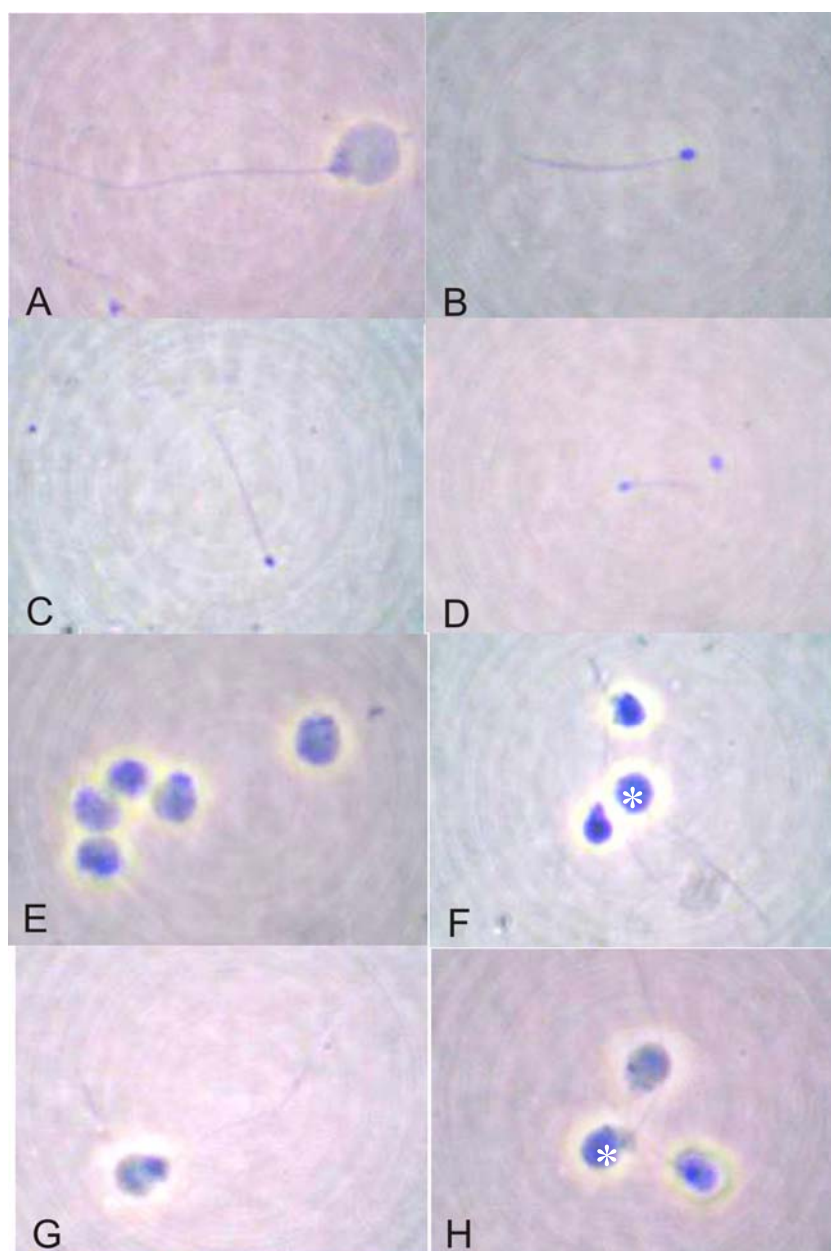


FIGURA 2: Alterações morfológicas encontradas nos espermatozoides de *Z. jahu* no sêmen *in natura* e pós descongelado em diferentes aumentos. (A = espermatozóide normal; B, C = microcefalia; D = microcefalia com cauda fraturada; E = cabeças isoladas; F = macrocefalia (*) e cabeça degenerada (seta); G = espermatozóide normal; H = comparação entre espermatozóide normal e PID (*).

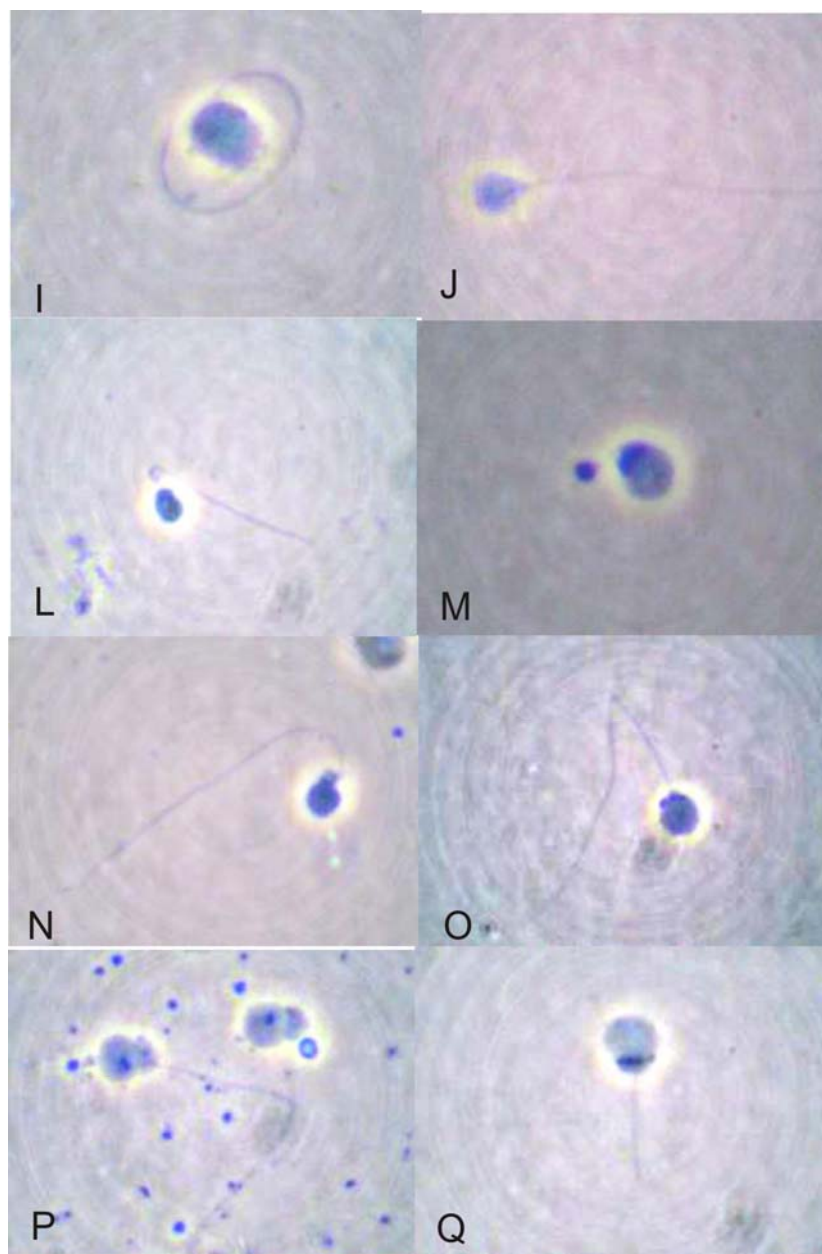


FIGURA 3: Alterações morfológicas encontradas nos espermatozoides de *Z. jahu* no sêmen *in natura* e pós descongelado. (I = cauda dobrada; J = espermatozoide normal; L = cauda dobrada e cabeça degenerada; M = cauda enrolada (fortemente); N = cauda dobrada com PID; O, Q = cauda fraturada; P = cauda fraturada e cabeça isolada.

As análises estatísticas para a patologia microcefalia demonstraram diferenças significativas ($P < 0,05$) para interação período experimental x tratamentos (Tabela 4).

O sêmen do macho do período experimental 1 (macho 1) foi estatisticamente semelhante ao sêmen do macho do período experimental 2 (macho 2) para os tratamentos 3, 4, 5 e 6. Entretanto, quando comparados os tratamentos 0 (testemunha), 1 e 2, o efeito do período experimental foi significativo ($P < 0,05$) demonstrando diferenças entre a qualidade seminal dos machos estudados. Este fato pode ser explicado pela diferença entre as duas amostras uma vez que o protocolo de indução hormonal testado no período experimental 1 mostrou-se ineficiente, sendo necessário o sacrifício do animal para obtenção do sêmen intratesticular.

As diferenças encontradas entre os tratamentos 1 e 2 dentro de um mesmo período experimental podem ser explicadas pela ação da gema de ovo em associação ao DMSO ou metanol. Nota-se que a associação de gema de ovo e DMSO fizeram com que valores mais altos de microcefalia fossem encontrados, demonstrando que tal associação pode influenciar na ação crioprotetora externa da gema de ovo quando para tratamento para congelamento de sêmen intratesticular.

TABELA 4: Desdobramento da interação ano x tratamentos, para análise do sêmen de jacaré, submetido ao congelamento / descongelamento, com diferentes soluções diluidoras, para a variável microcefalia

Tipo de sêmen	Tratamentos						
	0	1	2	3	4	5	6
Macerado	9,75 B, bc	14,00 B, c	7,25 B, ab	4,00 A, a	1,00 A, a	2,50 A, a	1,25 A, a
Espermiado	0,50 A, a	1,75 A, a	1,75 A, a	0,00 A, a	0,75 A, a	0,50 A, a	0,25 A, a

Médias acompanhadas por letras diferentes na coluna, dentro de um mesmo tratamento, diferem entre si pelo teste de Student-Newman-Keuls ($P < 0,05$). Letras maiúsculas = efeito tipo de sêmen; letras minúsculas = efeito tratamentos.

Para o parâmetro macrocefalia, houve diferença estatisticamente significativa apenas para a variável tratamentos, demonstrando que para este parâmetro não há influência entre sêmen intratesticular (período 2006-2007) e ejaculado (período 2007-2008) (Tabela 5). Explicação coerente com os dados encontrados neste estudo foi descrita por Kavamoto *et al.* (1999) para *Prochilodus scrofa*, onde, o aumento da patologia macrocefalia foi associada à transição morfológica das células espermáticas entre espermátides e espermatozoides. O fato do tratamento para indução hormonal da reprodução, em machos, não atuar sobre a maturação dos gametas, mas sim sobre o aumento do volume seminal, corrobora com tal explicação.

TABELA 5: Ação dos tratamentos sobre o sêmen de jaú, submetido ao congelamento / descongelamento, com diferentes soluções diluidoras, para a variável macrocefalia.

Tratamentos	Médias 2006-2007	Médias 2007-2008	Média total tratamentos
0	3,00	3,00	3,00 a
1	2,75	3,25	3,00 a
2	0,00	2,75	1,38 a
3	0,00	1,00	0,50 a
4	2,25	1,25	1,75 a
5	2,50	3,25	2,88 a
6	0,75	3,25	2,00 a

Médias acompanhadas por letras diferentes na coluna, dentro de um mesmo tratamento, diferem entre si pelo teste de Student-Newman-Keuls ($P < 0,05$).

Na avaliação estatística do parâmetro cabeça isolada, resultados significativos foram encontrados tanto para período experimental, quanto para os tratamentos (Tabela 6).

TABELA 6: Efeito do período experimental e dos tratamentos sobre o sêmen de jaú, submetido ao congelamento / descongelamento, com diferentes soluções diluidoras, para a variável cabeça isolada

Tratamentos	Médias 2006-2007	Médias 2007-2008	Média total tratamentos
0	15,50	5,00	10,25 a
1	20,00	15,25	17,63 a
2	12,75	18,50	15,63 a
3	31,25	17,25	24,25 b
4	19,00	11,75	15,38 a
5	11,50	9,50	10,50 a
6	15,75	11,50	13,63 a
Médias anos	17,96 B	12,67 A	

Médias acompanhadas por letras diferentes na coluna, dentro de um mesmo tratamento, e na mesma linha, diferem entre si pelo teste de Student-Newman-Keuls ($P < 0,05$). Letras maiúsculas = efeito tipo de sêmen; letras minúsculas = efeito tratamentos.

A diferença entre os anos pode ser explicada pelo estágio de maturação gonadal de cada macho, em cada período experimental estudado. No período experimental 2006-2007 os testículos do macho encontravam-se em fase inicial de reabsorção, fase indicada pela resposta negativa à indução hormonal, à espermiacção e obtenção de sêmen apenas após maceração testicular. Como o macho 1 encontrava-se fora do período de “pico” reprodutivo, o presente estudo confirma os achados de Herman *et al.* (1994), que descrevem que este tipo de patologia ocorre durante o processo de espermatogênese em decorrência de causas que acometem os reprodutores, tais como enfermidades, desenvolvimento gonadal, consangüinidade, restrição alimentar, estresse ambiental entre outros.

Assim como descrito para a microcefalia, a diferença significativa entre o tratamento 3 e os demais pode estar relacionada à associação do DMSO à lactose. Como o efeito da ação conjunta dos componentes do tratamento 3, até o presente estudo, não haviam sido testadas em peixes de couro, pode ser que esta associação exerça influência negativa sobre os espermatozoides de siluriformes, acarretando o aumento de patologias do tipo cabeça isolada, que estão diretamente associadas ao sucesso da fertilização.

Em contraste com os dados do presente estudo, Moraes (2004), estudando *Prochilodus lineatus*, verificaram que a patologia cabeça isolada foi a mais freqüente para a espécie, atingindo percentuais médios de 28%. Estas diferenças reforçam a importância de se desenvolver ajustes espécie-específicos nos protocolos de criopreservação já existentes (Ciereszko & Drabrowski, 1993)

Quando analisada a patologia cabeça degenerada, observa-se apenas efeito significativo entre os períodos experimentais ($P < 0,05$) (Tabela 7). Este tipo de patologia é associado a espermatozoides com cabeça de tamanho normal, mas que apresentam contorno irregular e/ou degenerações cromatínica ou vacuolar aparentes.

TABELA 7: Efeito do período experimental sobre o sêmen de jaú, submetido ao congelamento / descongelamento, com diferentes soluções diluidoras, para a variável cabeça degenerada

Tratamentos	Médias 2006-2007	Médias 2007-2008
0	2,25	7,00
1	2,75	3,00
2	1,00	4,00
3	3,00	3,00
4	3,25	5,25
5	1,25	6,25
6	3,00	7,25
Médias anos	2,36 A	5,11 B

Médias acompanhadas por letras diferentes na linha, dentro de períodos diferentes, diferem entre si pelo teste de Student-Newman-Keuls ($P < 0,05$). Letras maiúsculas = efeito tipo de sêmen.

Como o macho 1, do período experimental 2006-2007, encontrava-se fora do período de “pico” da reprodução, era de se esperar um número maior deste tipo de alteração neste macho, fato que não ocorreu. Entretanto, relatos de outros autores afirmam que a formação de cristais de gelo intracelulares e a instabilidade da membrana celular causam instabilidade na osmorregulação das células espermáticas e, que esta pode ser prejudicada quando há exposição dos

espermatozoides em soluções crioprotetoras, resultando primeiro no inchamento da cabeça do espermatozoide e, em um segundo momento, causar injúrias em organelas intracelulares. Este quadro, segundo os autores citados, pode determinar a perda de funcionalidade da mitocôndria e efusão da cromatina nuclear, levando à ocorrência de degeneração na cabeça dos espermatozoides (Lahnsteiner et al.,1996; Taddei et al., 2001).

No presente estudo, acredita-se que as características descritas pelos referidos autores exerçam influência mais direta sobre os espermatozoides maduros do que sobre os espermatozoides intratesticulares, que ainda não completaram o processo de maturação, o que poderia explicar a diferença significativa de espermatozoides com a patologia cabeça isolada nos períodos experimentais estudados.

Na análise do parâmetro peça intermediária degenerada (PID), resultados significativos foram encontrados tanto para período experimental quanto para tratamentos ($P < 0,05$) (Tabela 8).

TABELA 8: Efeito do período experimental e dos tratamentos sobre o sêmen de jaú, submetido ao congelamento / descongelamento, com diferentes soluções diluidoras, para a variável peça intermediária degenerada (PID)

Tratamentos	Médias 2006-2007	Médias 2007-2008	Média total tratamentos
0	8,75	5,75	7,25 a
1	16,00	7,25	11,63 bc
2	5,00	5,50	5,25 a
3	11,00	6,25	8,63 ab
4	7,75	5,50	6,63 a
5	15,75	9,50	12,63 c
6	14,75	8,25	11,50 bc
Médias anos	11,2857 B	6,8571 A	

Médias acompanhadas por letras diferentes na coluna, dentro de um mesmo tratamento, e na mesma linha, diferem entre si pelo teste de Student-Newman-Keuls ($P < 0,05$). Letras maiúsculas = efeito tipo de sêmen; letras minúsculas = efeito tratamentos.

O efeito dos períodos experimentais pode ser explicado, assim como para as demais patologias espermáticas, pelo tipo de amostra obtida em cada um dos períodos estudados, sendo a amostra 1 de sêmen intratesticular e a amostra 2 de sêmen maduro, ejaculado. Como o processo de maturação de cada um dos componentes espermáticos é desconhecido, caso a peça intermediária termine seu processo de maturação ao final do desenvolvimento gonadal, é esperado que o sêmen intratesticular apresente maior percentual deste tipo de patologia. Entretanto, estudos mais aprofundados são necessários para elucidação desta questão.

Quanto à variação de tratamentos, o DMSO tanto em associação com lactose e gema de ovo, quanto sozinho não proporcionou resultados satisfatórios para este tipo de patologia. O metanol, quando utilizado como crioprotetor único também não apresentou resultados positivos, a fim de evitar a degradação da peça intermediária dos espermatozóides. Segundo Taddei et al. (2001), as injúrias nos espermatozóides são causadas pela exposição à solução crioprotetora e/ou à baixa temperatura do processo de criopreservação, especialmente no estágio de pré-congelamento. Os espermatozóides, quando submetidos à criopreservação, estão sujeitos ao estresse resultante da interação água e solução, que pode causar dano estrutural e até mesmo a morte das células espermáticas (Holt, 2000). No presente estudo, soluções de metanol associadas à lactose e gema de ovo foram as que mais exerceram função protetora aos espermatozóides, quanto à patologia analisada, demonstrando resultados semelhantes ao sêmen *in natura*.

Quando analisou-se a variável cauda enrolada, houve interação entre período experimental e tratamentos, sendo necessário realizar o desdobramento destas duas variáveis, para determinar qual a influência de cada uma delas sobre os resultados obtidos ($P < 0,05$) (Tabela 9).

TABELA 9: Desdobramento da interação ano x tratamentos, para análise do sêmen de jaú, submetido ao congelamento / descongelamento, com diferentes soluções diluidoras, para a variável cauda enrolada.

Tipo de sêmen	Tratamentos						
	0	1	2	3	4	5	6
Macerado	4,50 B, bc	1,25 A, ab	0,25 A, a	6,25 B, c	2,25 A, ab	1,50 A, ab	2,50 A, ab
Espermiado	1,50 A, a	3,50 A, a	3,75 B, a	1,25 A, a	2,50 A, a	2,00 A, a	2,00 A, a

Médias acompanhadas por letras diferentes na coluna, dentro de um mesmo tratamento, diferem entre si pelo teste de Student-Newman-Keuls ($P < 0,05$). Letras maiúsculas = efeito tipo de sêmen; letras minúsculas = efeito dos tratamentos.

Para as diferenças entre períodos experimentais, a influência do tipo de sêmen, se intratesticular ou ejaculado, pode ser melhor evidenciada no sêmen *in natura*. As diferenças significativas encontradas entre os tratamentos podem estar relacionadas tanto à composição do meio diluidor e à ação que seus componentes exercem sobre o espermatozóide tanto quanto pela qualidade seminal de cada um dos machos testados nos períodos experimentais. Metanol + gema de ovo exerceram função negativa sobre o sêmen testicular enquanto que DMSO + lactose exerceram a mesma função para o sêmen maduro.

Para a patologia de cauda dobrada apenas o efeito do tratamento foi estatisticamente significativo ($P < 0,05$) (Tabela 10).

TABELA 10: Ação dos tratamentos sobre o sêmen de jaú, submetido ao congelamento / descongelamento, com diferentes soluções diluidoras, para a variável cauda dobrada

Tratamentos	Médias 2006-2007	Médias 2007-2008	Média total tratamentos
0	5,00	5,00	5,00 b
1	1,00	1,75	1,38 a
2	0,50	2,50	1,50 a
3	1,75	2,75	2,25 a
4	4,00	1,50	2,75 a
5	1,50	3,00	2,25 a
6	2,50	3,00	2,75 a

Médias acompanhadas por letras diferentes na coluna, dentro de um mesmo tratamento, diferem entre si pelo teste de Student-Newman-Keuls ($P < 0,05$).

Os resultados encontrados demonstram que a ação de crioprotetores é positiva para patologia de cauda enrolada. Parece que estas soluções interagem com a cauda do espermatozóide, fazendo com que esta volte a apresentar características normais.

Assim como para a patologia de cauda dobrada, apenas os tratamentos exerceram influência significativa sobre a patologia cauda fraturada ($P < 0,05$) (Tabela 11). Ao contrário do encontrado para a patologia anterior, os tratamentos testados se mostraram eficientes na manutenção das características do sêmen *in natura* para esta patologia, com exceção do tratamento 2, resultado que pode ter sido influenciado composição do meio diluidor, uma vez que não há estudos sobre a interação das substâncias utilizadas sobre o metabolismo e as características espermáticas.

TABELA 11: Ação dos tratamentos sobre o sêmen de jaú, submetido ao congelamento / descongelamento, com diferentes soluções diluidoras, para a variável cauda fraturada.

Tratamentos	Médias 2006-2007	Médias 2007-2008	Média total tratamentos
0	7,50	7,25	7,38 a
1	9,00	6,00	7,50 a
2	3,25	4,21	3,75 b
3	14,25	8,00	11,13 a
4	9,50	7,50	8,50 a
5	9,25	8,50	8,88 a
6	7,00	8,00	7,50 a

Médias acompanhadas por letras diferentes na coluna, dentro de um mesmo tratamento, diferem entre si pelo teste de Student-Newman-Keuls ($P < 0,05$).

Diversos estudos realizados demonstram a importância de determinar quais substâncias exercem melhor papel crioprotetor para os espermatozóides de peixes. Alguns autores citam pesquisa com um único componente até várias substâncias sendo utilizadas em uma mesma composição (Cosser et al., 1987; Carolsfeld et al., 2003; Ribeiro & Godinho, 2003).

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

Das patologias estudadas, Kavamoto et al. (1999) descrevem que as anormalidades morfológicas de peça intermediária e cauda causam alterações progressivas na motilidade, aumentando o número de espermatozoides com movimentos circulares ou oscilatórios e, conseqüentemente, diminuindo a taxa de fertilização.

CONCLUSÃO

Para a maioria das alterações morfológicas estudadas, não há diferenças entre o sêmen obtido através de maceração e o sêmen espermiado espontaneamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARTH, A. D.; OKO, R.J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames: Iowa State University, 1989. p.285.

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

BILLARD, R. Ultrastructure comparée de spermatozoids de quelques poissons Téléostéens. In: BACCETI, B. (Ed.) **Comparative spermatology**. New York: Academic, 1970. p.71-79.

BILLARD, R.; DUPON, J.; BARNABE, G. Diminution de la motilité et de la durée de conservation du sperme de *Dicentrarchus labrax* L. (poisson téléostéen) pendant la période de spermiation. **Aquaculture**, Amsterdam, v11, n.4, p.363-7, 1977.

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

CIERESZKO, A.; DABROWSKI, K. Estimation of sperm concentration of rainbow trout, whitefish and yellow perch using a spectrophotometric technique. **Aquaculture**, Amsterdam, v.109, n.3, p.367-373, Feb. 1993.

CLOUD, J.G. Cryopreservation of sperm of steelhead rainbow trout after refrigerated storage. In: TIERSCH, T. R.; MAZIK, P. M. (Eds.). **Cryopreservation in aquatic species**. Baton Rouge, Louisiana: World Aquaculture Society, 2000. p.101-103.

COSER, A. M. L.; GODINHO, H. P.; TORQUATO, V. C. Criopreservação de sêmen do Peixe Piau, *Leporinus silvestrii* (Boulenger, 1902). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.39, p.37-42, 1987.

FERREIRA, D. F. **Sistema de análise de variância (Sisvar)**. versão 4.6 (Build 61). Lavras: UFLA, 2004.

GINZBURG, A. S. **Fertilization in fishes and the problem of polyspermy**. Springfield: Department of Commerce, National AM Technical Information Service, 1972. p. 87-359.

GRIER, H. J. Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. **American Zoology**, v. 21, p. 345-57, 1985.

HERMAN, H. A.; MITCHELL, J. R.; DOAK, G. A. Evaluation of semen-morphology. In: HERMAN, H. A.; MITCHELL, J. R.; DOAK, G. A. (Eds.). **The artificial insemination and embryo transfer of dairy and beef cattle**. Prentice Hall, 1994. p.85-92.

HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal reproduction Science**, v.62, n. 1, p.3-22, Aug. 2000.

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

JOHNSON, L. A.; WEITZE, K. F.; FISER, P.; MAXWELL, W. M. C. Storage of boar semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, n.1-3, p.143-172, Aug. 2000.

KAVAMOTO, E. T.; SILVEIRA, W. F.; RIGOLINO, M. G.; CARVALHO FILHO, A. C. Avaliação macro e microscópica do sêmen da truta arco-íris, *Salmo irideus* Gibbons. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v.3, n.12, p.73-81, 1985.

KAVAMOTO, E. T.; BARNABE, V. H.; CAMPOS, B. E. S.; ANDRADE-TALMELLI, E. F. Anormalidades morfológicas nos espermatozoides do curimatá, *Prochilodus scrofa* (Steidachner, 1881) (osteichthyes, characiformes, prochilodontidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v.25, p.61-66, 1999.

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

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

MORRIS, G. J.; WATSON, P. F. Cold shock injury comprehensive bibliography. **Cryo-Letters**, Londres, v.5, n.6, p.352-372, Nov./Dec. 1984.

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

NINHAUS-SILVEIRA, A.; FORESTI, F.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R.; SENHORINI, J. A. Seminal analysis, cryogenic preservation, and fertility in matrinxã fish, *Brycon cephalus*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.49, n.4, p.651-659, Jul. 2006.

RIBEIRO, R. I. M. A.; GODINHO, H. P. Criopreservação do sêmen testicular do teleósteo piau-açu, *Leporinus macrocephalus*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.55, n.1, p.1-7 2003.

ROBLES, F.; DE LA HERRÁN, R.; LUDWING, A.; REJÓN, C. R.. Genomic organization and evolution of the 5s ribosomal DNA in the ancient fish sturgeon. **Genome**, v.48, p.18-28, 2005.

STREIT JR., D. P.; BENITES, C.; MORAES, G. V.; RIBEIRO, R. P.; SAKAGUTI, E. S.; CALDIERI, R. F. Sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) criopreservado com diluentes utilizados para sêmen de suínos. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.7, n.3, p.289-297, jul./set. 2006.

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

IV – DESENVOLVIMENTO GONADAL DE FÊMEAS DE JAÚ (*Zungaro jahu*): ANÁLISES MICROSCÓPICAS E ULTRAESTRUTURAIIS
DESENVOLVIMENTO GONADAL DE FÊMEAS DE JAÚ (*Zungaro jahu*): ANÁLISES MICROSCÓPICAS E ULTRAESTRUTURAIIS

Drumond, M. M.; Murgas, L.D.S.; Logato, P.V.R.; Pompeu, P.S.; Pereira, G.J.M.P.; FELIZARDO, V. O.; Bedore, A.G., Lopes, J. M.

RESUMO

Para avaliar o desenvolvimento gonadal de fêmeas de jaú, *Zungaro jahu*, nos períodos reprodutivos, 2005-2006, 2006-2007 e 2007-2008 avaliou-se quinzenalmente, por meio de biópsia ovariana, cinco fêmeas do plantel de reprodutores da Estação Ambiental de Volta Grande (CEMIG) quanto ao deslocamento da vesícula germinativa e ao diâmetro dos ovócitos, através de técnicas de microscopias de luz e eletrônica de varredura. O desenvolvimento ovariano de jaú é do tipo sincrônico, seguindo o padrão de outras espécies migradoras. A influência dos fatores abióticos de cada período reprodutivo sobre o desenvolvimento ovariano foi testada pelo pacote estatístico SAEG, através do teste de Kruskal-Wallis. Os resultados obtidos demonstram que os fatores abióticos estudados, dentro de cada período reprodutivo, exerceram influência sobre o desenvolvimento ovariano ($P < 0,05$) e que, dependendo destas variações as fêmeas foram capazes ou não de completar seu desenvolvimento gonadal nas condições do cativeiro.

Palavras-chave: pluviosidade, temperatura, diâmetro ovocitário, microscopia eletrônica de varredura.

ABSTRACT

To evaluate the gonadal development of jaú females, *Zungaro jahu*, in the reproductive periods, 2005-2006, 2006-2007 and 2007-2008 were evaluated fortnightly, through ovarian biopsy, five female reproducer of the Environmental Station of Volta Grande (CEMIG) related to the displacement of the germination vesicle and the diameter of the oocytes, through techniques of light microscopy and sweeping electronic microscopy. The ovarian development of jaú is of the synchronous type, following the pattern of other migratory species. The influence of abiotic factors of each reproductive period on the ovarian development was tested by the statistical package SAEG, through the test of Kruskal-Wallis. The obtained results demonstrate that the abiotic factors, in each reproductive period, affected the ovarian development ($P < 0,05$) and that, depending on these variations, the females were or not capable of completing their gonadal development in captivity conditions.

Key words:- pluviosity, temperature, ovary diameter, sweeping electronic microscopy.

INTRODUÇÃO

A maioria dos teleósteos apresenta ciclos de desenvolvimento ovariano distintos, com a ovulação ocorrendo em períodos específicos do ano. Três padrões de desenvolvimento folicular ovariano são descritos em teleósteos: totalmente sincrônico, parcialmente sincrônico e assincrônico (Wallace & Selman, 1981). Geralmente, os peixes que morrem após a desova, como o salmão, por exemplo, apresentam desenvolvimento sincrônico, no qual todos os ovócitos das gônadas se apresentam no mesmo estágio de desenvolvimento. Por outro lado, para alguns teleósteos o desenvolvimento é denominado como parcialmente sincrônico, pois encontram-se, ao mesmo tempo, nos ovários, “populações” de ovócitos em diferentes estádios de maturação. Neste caso,

ovulação e desova podem ocorrer uma ou algumas vezes durante o período reprodutivo, dependendo da espécie e das características ambientais. Em peixes de desova parcelada, com desenvolvimento folicular assincrônico, ovócitos em todos os estádios de maturação são encontrados nos ovários. Ovulação e desova ocorrem durante um longo período reprodutivo (Peter & Yu, 1997).

O padrão básico de crescimento ovariano é semelhante entre os teleosteos (Tyler & Sumpter, 1996). O desenvolvimento de um ovócito em um ovo maduro é um processo complexo, modulado por diferentes fatores ambientais e endócrinos (Coward & Bromage, 2000). As características morfológicas são importantes para o entendimento da dinâmica da ovogênese, incluindo a maturação ovocitária final e ovulação (Tyler & Sumpter, 1996).

Ritmos circanuais endógenos de recrudescência e regressão dos ovários têm sido relatados para inúmeras espécies de siluriformes (Nguenga et al., 2004)

Alguns destes experimentos têm demonstrado que fatores ambientais como fotoperíodo, temperatura, pluviosidade e disponibilidade de alimento exercem papel importante na regulação de “ritmos internos” durante o período reprodutivo (Nguenga et al., 2004). Esses fatores ambientais estimulam receptores externos e, através deles, afetam o sistema nervoso central, o hipotálamo, a hipófise e as gônadas (Sundararaj & Vasal, 1976).

Dois grandes eventos devem ser levados em consideração no desenvolvimento ovariano. O primeiro refere-se ao aumento gradual do tamanho e volume dos ovários concomitantemente com a formação de grânulos de vitelo, que ocorre no período anterior à reprodução e depende da elevação da temperatura (Richter et al., 1987). O segundo evento, que inclui maturação, ovulação e desova ocorre devido a uma combinação de fatores ambientais como aumento no nível da água, ocasionado pelo aumento da pluviosidade e mudanças na composição química da água (Bruton, 1979).

O uso de dados sobre o diâmetro ovocitário para se avaliar a maturidade dos reprodutores foi descrita para peixes nativos brasileiros por Fenerich-Verani et al. (1984) quando estudavam a espécie *Prochilodus scrofa*. Esta técnica já foi utilizada com sucesso para espécies do gênero *Brycon*, (Romagosa et al., 2001; Andrade-Talmelli et al., 2002), mas trabalhos com pimelodídeos são raros.

Devido à dificuldade em se estabelecer parâmetros consistentes para determinação do estágio de maturação gonadal de fêmeas de jaú, *Zungaro jahu*, o presente estudo objetiva padronizar o método de biópsia ovariana (canulação), através da posição da vesícula germinativa dos ovócitos além de comparar os períodos reprodutivos relacionando as variações de temperatura e pluviosidade, dentro de cada um dos períodos, com o aumento no diâmetro ovocitário.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado nos períodos reprodutivos de 2005-2006, 2006-2007 e 2007-2008, na Estação de Piscicultura de Volta Grande (CEMIG) localizada no município de Conceição das Alagoas, MG.

Para a avaliação, seis fêmeas foram capturadas com auxílio de rede de arrasto (Figura 1) e manipuladas dentro do próprio tanque para minimizar o estresse do manejo. De cada fêmea, foram coletadas amostras de ovócitos intra-ováricos, com auxílio de cânula plástica nº8 introduzida na papila urogenital (Figura 2).



FIGURA 1: Captura das fêmeas



FIGURA 2: Processo de canulação

A canulação ocorreu durante os meses de setembro, outubro e novembro de cada um dos períodos reprodutivos estudados.

O grau de desenvolvimento ovariano foi verificado através da análise da migração da vesícula germinativa (núcleo) e mensuração do diâmetro dos ovócitos.

Para análise da migração da vesícula germinativa uma amostra de ovócitos, previamente canulada, foi fixada em solução de Serra (60mL de álcool 90%; 30mL de formalina; 10mL de ácido acético glacial) e imediatamente analisada sob microscópio estereoscópio binocular (Olympus, modelo SZ-40). Foram consideradas três categorias de ovócitos: com núcleo em posição central, com núcleo em posição periférica e com núcleo não-visível.

Para determinação do diâmetro ovocitário, uma amostra de ovócitos, previamente canulada, foi fixada em solução de Gilson (88mL de água destilada, 10mL de álcool 60%, 1,8mL de ácido acético glacial, 1,5mL de ácido nítrico 80% e 2g de cloreto de mercúrio sublimado), por 30 minutos, visando a dissociação completados ovócitos. A amostra foi, então, levada ao microscópio óptico binocular, para medição do diâmetro ovocitário, com auxílio de ocular micrométrica milimetrada (10x) ($10x - 1\text{mm} = 0,157\text{mm}$).

Uma amostra de ovócitos foi fixada em solução de Karnovsky modificada (2,5% de glutaraldeído, 2% formaldeído em solução tampão fosfato de sódio a 0,1 M e pH 7,4) por 24 horas, pós fixada em tetróxido de ósmio por 01 hora, seguindo seqüência de desidratação em acetona, secagem ao ponto crítico (CO₂ - Bal-Tec) e sputtering com ouro. Após o processamento as amostras foram analisadas em microscópio eletrônico de verredura (MEV) modelo LEO EVO 40 XVP, no laboratório de microscopia eletrônica, do departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras.

Os dados pluviométricos e de temperatura, dos meses do estudo, foram obtidos junto à Estação de Piscicultura de Volta Grande.

Para avaliar quais parâmetros abióticos influenciaram o desenvolvimento ovocitário realizou-se análise estatística onde as médias dos parâmetros avaliados (diâmetro dos ovócitos, temperatura da água e pluviosidade) foram submetidas à regressão, pelo sistema SISVAR (Ferreira, 2004) para determinar a dependência entre elas ($P < 0,10$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em 1973, Shehadeh et al. afirmaram que o conhecimento “à priori” sobre o estágio de maturidade das fêmeas era o fator mais importante a ser considerado na padronização da dosagem de agentes indutores e sugeriram que o método da biópsia ovariana, neste estudo denominado “canulação”, poderia ser aplicado para espécies com desenvolvimento ovariano sincrônico. No presente estudo, a técnica da canulação apresentou resultados positivos para determinação do estágio de desenvolvimento gonadal de jaú. Essa mesma técnica foi utilizada por Romagosa et al.(2001) em estudos com *Brycon cephalus*, obtendo altas taxas de fertilização e eclosão. Entretanto, Freire-Brasil (2001) utilizando cateter uretral de maior calibre, causou ferimentos internos nas fêmeas, o que diminuiu a eficiência reprodutiva de *P. scrofa*.

A análise do grau de desenvolvimento ovariano, através da migração da vesícula germinativa, mostrou grandes diferenças entre os períodos experimentais amostrados e entre as fêmeas estudadas, o que demonstra a variação individual dos indivíduos, uma vez que encontravam-se sobre as mesmas características, tanto de recinto, qualidade de água quanto alimentação. Os dados acerca da migração da vesícula germinativa das fêmeas de jaú, *Zungaro jahu*, encontram-se na tabela 1.

Segundo Lam (1982), a vesícula germinativa no início da maturação, ocupa posição central, deslocando-se para a periferia do ovócito no estágio final da maturação, quando então a membrana se rompe e o núcleo passa a não ser visível, estando o óvulo pronto para ser fertilizado.

O sucesso da reprodução depende de um ajuste temporal que garanta que a desova ocorra no melhor local e no momento exato, quando as condições ambientais se apresentem as mais favoráveis para a sobrevivência dos descendentes. Dessa forma, a sincronia entre os processos fisiológicos de maturação gonadal com as condições ambientais faz-se extremamente necessária (Zaniboni Filho & Weingartner, 2007).

TABELA 1: Posição da vesícula germinativa, por fêmea de jaú, *Z. jahu*, por período experimental, em percentual

Fêmeas	M.	PI (g)	Posição da vesícula germinativa por período experimental								
			2005-2006			2006-2007			2007-2008		
			PE	CE	NI	PE	CE	NI	PE	CE	NI
Fêmea 1	884	16500	4,76	71,42	23,80	0,00	0,00	100,00	55,56	33,33	11,10
Fêmea 2	885	17500	0,00	70,00	30,00	0,00	0,00	100,00	41,67	25,00	33,33
Fêmea 3	882	15000	0,00	83,33	16,66	5,90	94,1	0,00	0,00	0,00	100,00
Fêmea 4	888	10000	5,55	83,33	11,11	41,70	25,00	33,30	42,86	28,57	28,57
Fêmea 5	881	13000	13,51	81,08	5,40	81,80	9,10	9,10	68,75	25,00	6,25
Fêmea 6	886	15000	0,00	100,00	0,00	69,30	23,00	7,70	0,00	0,00	100,00

M = marca; PI = peso inicial; para posições: PE = periférica, CE = central, NI = não identificada.

No período reprodutivo 2005-2006, 100% das fêmeas analisadas apresentaram maior percentual de ovócitos com vesícula germinativa central, demonstrando que neste período experimental, as fêmeas não encontraram, em cativeiro, estímulos suficientes para maturação ovocitária. Estudos como o de Carolsfeld (1989), que afirmou que apesar da diversidade de procedimentos recomendados para garantir a seleção adequada dos reprodutores, existem as diferenças que são observadas entre indivíduos ou situações, talvez afetados pela temperatura, estresse ou outro fator ambiental, ou ainda, algum fator do processo de maturação gonadal ainda não determinado, reforçam os resultados do presente estudo para o primeiro período experimental avaliado.

Nos dois últimos períodos experimentais, 2006-2007 e 2007-2008, notou-se aumento no número de fêmeas bem como no percentual de vesículas germinativas em posição periférica, demonstrando que diferenças de fatores ambientais entre os períodos estudados podem ter influenciado no estágio de maturação gonadal fazendo com que estas fêmeas atingissem o estágio inicial de vitelogênese. No presente estudo, os resultados encontrados no período experimental 2006-2007 reafirmam os achados de Harvey & Carolsfeld (1993), que descreveram que em uma determinada época do ano, em resposta a estímulos ambientais, ocorrem descargas periódicas de gonadotropina que induzem o início da vitelogênese e, para que haja a reprodução, o processo de vitelogênese deve ser continuado através da aplicação de hormônios.

Diferenças entre o desenvolvimento ovocitário de jaú, *Z. jahu*, foram também observadas através de microscopia eletrônica de varredura (MEV), na qual se pode evidenciar a presença de estruturas encontradas nas gônadas de praticamente todas as espécies de peixes.

Na maioria das espécies, os ovários são órgãos pares, alongados, orientados longitudinalmente na cavidade celomática. São recobertos por uma

túnica conjuntiva, o mesovário, aderido ao revestimento da cavidade celomática, na bexiga natatória. A parte posterior de cada ovário prolonga-se em ovidutos que se encontram na papila urogenital.

Os ovários são compartimentalizados por numerosos septos formados por dobras do eptélio germinativo, as lamelas ovulíferas, que se projetam no lúmen ovariano. Essas lamelas contêm ovogônias e ovócitos em estágios iniciais de desenvolvimento (Grier, 2000; Jalabert, 2005). No presente estudo, os ovários demonstraram as mesmas características descritas anteriormente, sendo possível observar a túnica conjuntiva (Figura 3A), as lamelas ovulíferas (Figura 3C, E, G) e ovócitos de diferentes tamanhos e estágios de desenvolvimento (Figura 3B, F, G, e H).

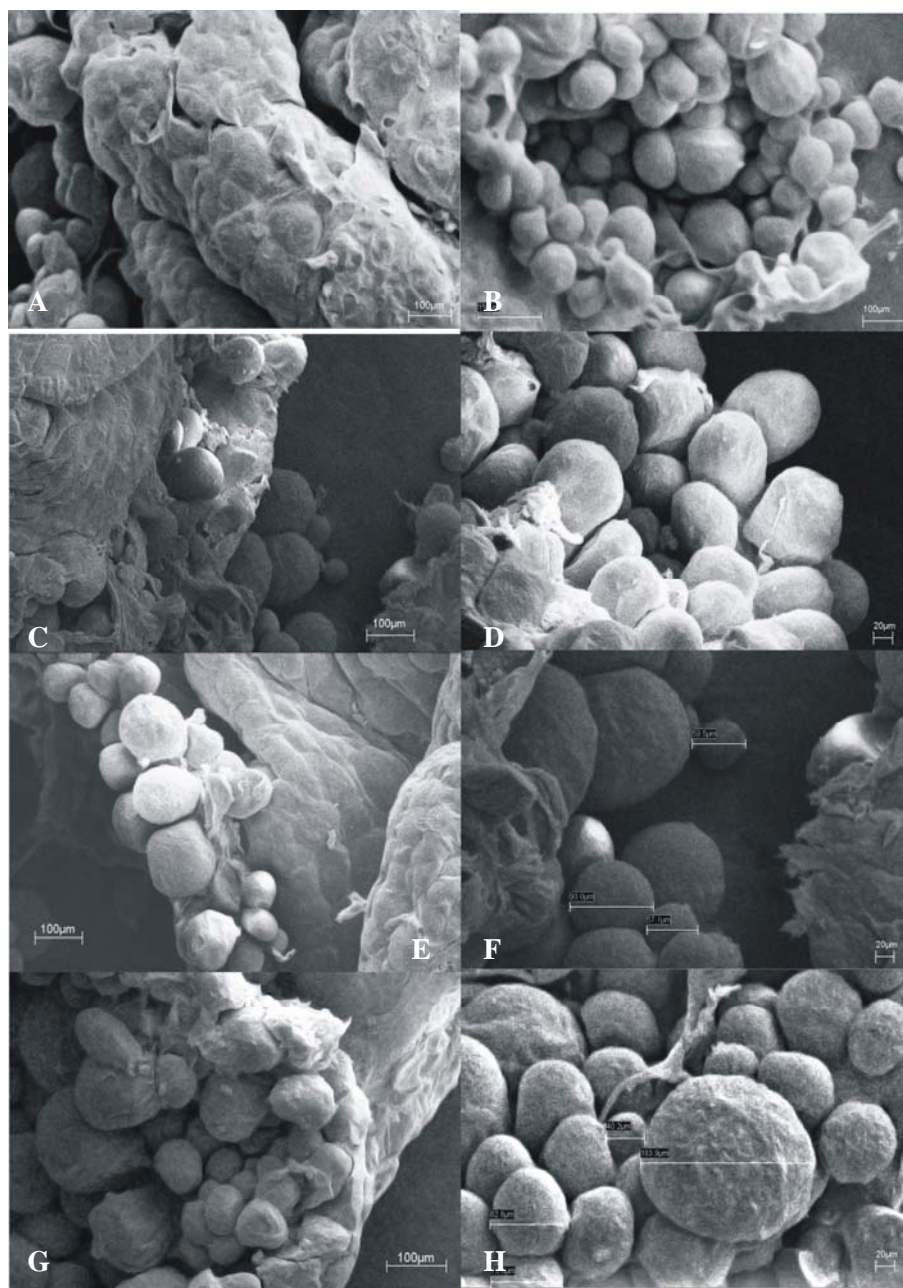


FIGURA 3: A – túnica conjuntiva; B, D, F, H – ovócitos em diferentes estágios de maturação gonadal, C, E, G – lamelas ovulíferas com ovócitos de diferentes tamanhos.

Numa determinada época do ano, em resposta a estímulos ambientais, ocorrem periódicas descargas de gonadotropina na corrente sanguínea que induzem o início da vitelogênese (Zaniboni Filho & Weingartner, 2007).

Depois de concluída a vitelogênese, a atividade ovariana se torna mais reduzida, fase conhecida como “período de dormência”. Durante o “período de dormência”, quando as condições ambientais são propícias, tem início a etapa final de maturação gonadal. A fase final de maturação dos ovócitos é caracterizada pela migração da vesícula germinativa (núcleo) para a periferia celular e a sua posterior desintegração, dando origem à micrópila, quando os ovócitos estão prontos para serem eliminados do envelope folicular (Vazzoler, 1996).

Nos peixes, o aparelho micropilar permite o acesso do espermatozóide diretamente à membrana ovocitária, sem reação acrossômica, como ocorre na maioria dos vertebrados (Redding & Patino, 1993).

A micrópila dos ovócitos de jaú, (Figura 4E, G) apresenta-se como na maioria dos teleósteos, em forma de funil, sendo constituída de vestíbulo e de canal micropilar na maioria dos peixes teleósteos (Rizzo & Godinho, 2003).

Em contato com a água o óvulo sofre processo de hidratação e a micrópila se fecha gradativamente, em aproximadamente um minuto já é inviável a fecundação, não apenas devido ao fechamento da micrópila, mas também porque os espermatozoides ativados inicialmente pelo contato com a água tem tempo de vida e motilidade aproximadamente igual (Andrade & Yasui, 2003).

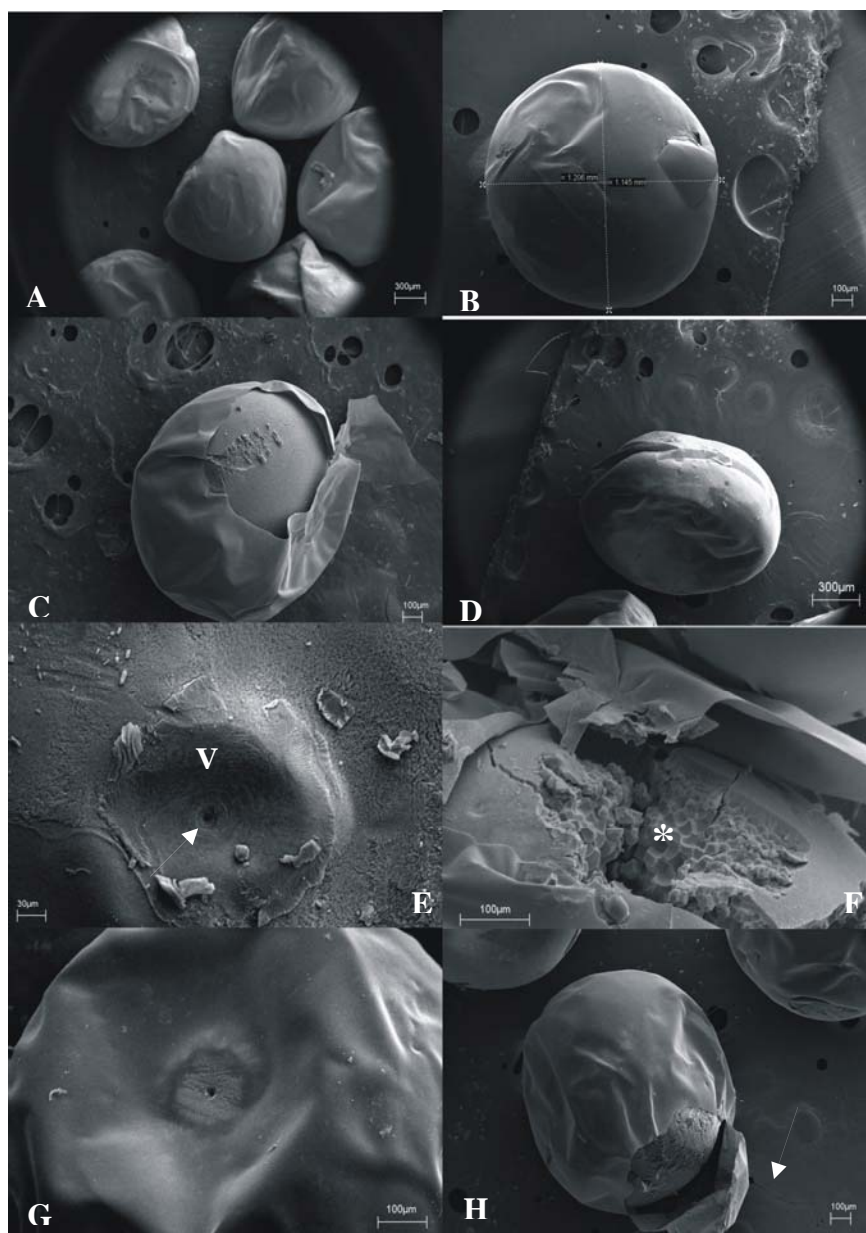


FIGURA 4: A – Vista em menor aumento dos ovócitos de jaú; B- medidas do diâmetro de ovócito vitelogênico, maduro, pronto para a fertilização; C, D – Duas vistas de ovócitos vitelogênicos; E, G – aparelho micropilar (V = vestículo, seta = canal micropilar); F = Envelope ovocitário rompido expondo os grânulos de vitelo (*); H- espermatozóide se deslocando até a micrópila (seta)

Os resultados sobre a influência dos períodos reprodutivos, através da variação da temperatura da água e pluviosidade, sobre o diâmetro ovocitário estão descritos na Tabela 2 e Figura 5

TABELA 2: Influência dos períodos reprodutivos sobre o diâmetro ovocitário de fêmeas de jaú, *Zungaro jahu*, quando analisados os parâmetros temperatura da água e pluviosidade

PERÍODO REPRODUTIVO	DIÂMETRO OVOCITÁRIO (mm)
2005-2006	1,226 a
2006-2007	0,702 b
2007-2008	0,918 b
P=	0,0081

Médias seguidas de diferentes letras diferem pelo teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$)

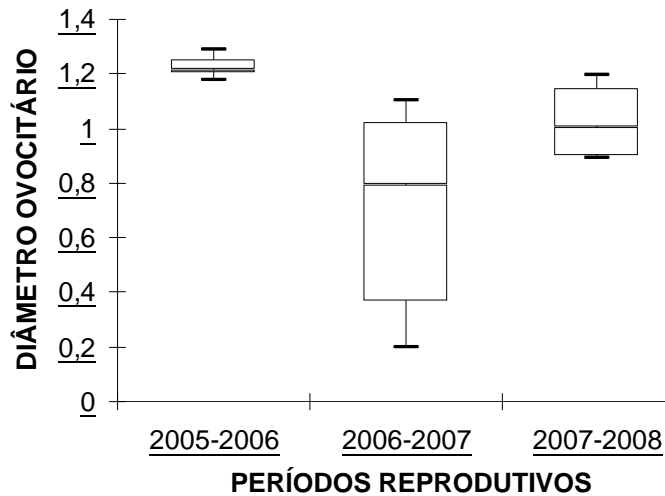


FIGURA 5: Influência dos períodos reprodutivos sobre o diâmetro ovocitário de fêmeas de jaú, *Zungaro jahu*, quando analisados os parâmetros temperatura da água e pluviosidade.

Os processos reprodutivos em peixes são controlados por fatores endógenos ou hormonais e fatores exógenos ou ambientais, como temperatura, precipitação pluviométrica, fotoperíodo e disponibilidade de alimento. Segundo Isaac-Nahum & Vazzoler (1983), esses fatores ambientais podem ter efeito sobre a fisiologia do ciclo reprodutivo, determinando o período de maturação e de desova.

No presente estudo, comprovou-se a influência da tanto da temperatura quanto da pluviosidade sobre o desenvolvimento ovocitário. Diversos trabalhos destacam a influência de fatores ambientais sobre a maturação gonadal (Godinho, 1984, Godinho & Godinho, 2003, Bazzoli, 2003). Nguenga et al. (2004) descrevem duas fases para o desenvolvimento ovocitário, sendo a primeira delas, altamente dependente do aumento da temperatura. Jalabert (2005) afirma que a temperatura tem uma função importante na modulação de processos fisiológicos e na regulação endócrina. Afirma ainda que, em alguns casos, a temperatura pode atuar como maior ou menor fator limitante durante certos estágios da gametogênese.

CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo demonstram que o desenvolvimento ovariano do jaú, assim como para outras espécies migradoras, é do tipo sincrônico. Ovócitos em diferentes estágios de maturação são encontrados nos ovários durante todo o período reprodutivo. O aumento do diâmetro ovocitário é altamente dependente da pluviosidade e da temperatura da água.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, D. R.; YASUI, G. S. O manejo da reprodução natural e artificial e sua importância na produção de peixes no Brasil, **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.27, n.2, p.166-172, Abr./Jun. 2003.

ANDRADE-TALMELLI, E. F.; KAVAMOTO, E. T.; NARAHARA, M. Y.; FENERICH-VERANI, N. Reprodução induzida da piabanha, *Brycon insignis* (Steind, 1876) (Characiformes, Bryconinae), mantida em confinamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v.31, n.2, p. 803– 811, apr. 2002. Suplemento.

BAZZOLI, N. Parâmetros reprodutivos dos peixes de interesse comercial na região de Pirapora. In: GODINHO, H. P.; GODINHO, A. L. (Org). **Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais**. Belo Horizonte: PUC Minas, 2003. p.291-306.

BRUTON, M. N., The breeding biology and early development of *Clarias gariepinus* (Pisces: Clariidae) in Lake Sibaya, South Africa, with a review of breeding in species of the subgenus *Clarias* (*Clarias*), **Translations of Zoological Society**, London, n. 35, p.1-45, 1979.

COWARD, K.; BROMAGE, N. R. Reproductive physiology of female tilapia broodstock. **Reviews in Fish and Fisheries**, v.10, n. 1, p. 1–25, Mar. 2000.

FENERICH-VERANI, N.; GODINHO, H.M.; NARAHARA, M.Y. The size composition of the eggs of curimatá *Prochilodus scrofa*, Steindachner, 1881 induced to spawn with human chorionic gonadotropin (HCG). **Aquaculture**, v.42, p.37-41, 1984.

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

FREIRE-BRASIL, D. **Análise estrutural e ultra-estrutural da maturação final do ovócito, fertilização e primeira clivagem em curimatá, *Prochilodus lineatus***. 2001. 76p. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

GODINHO A. L.; GODINHO, H. P. Brief vision on the São Francisco. In: GODINHO, H. P.; GODINHO, A. L. (Eds.). **Waters, fishes, and fishermen of the São Francisco of Minas Gerais**. Belo Horizonte: PUC Minas, Brazil, 2003. p.15–24.

GODINHO, S. **Aspectos meteorológicos das inundações de novembro de 1983**. Lisboa: I.N.M.G., 1984.

GRIER, H. J. Ovarian germinal epithelium and folliculogenesis in the common snook, *Centropomus undecimalis* (Teleostei: Centropomidae). **Journal of Morphology**, v. 243, n.3, p.265-281, Mar 2000.

ISAAC-NAHUM, V. J., VAZZOLER, A. E. A. M. Biologia reprodutiva de *Micropogonias furnieri* (Desmarest, 1893) (Teleostei, Sciaenidae). 1. Fator de condição como indicador do período de desova. **Boletim do Instituto Oceanográfico**, São Paulo, v. 32, p.63-69, 1983.

JALABERT, B. Particularities of reproduction and oogenesis in teleost fish compared to mammals. **Reproduction, Nutrition, Development**, Paris, v. 45, n.3, p.261–279, May/June 2005.

NGUENGA, D.; TEUGELS, G. G.; LEGENDRE, M.; OLLEVIER, F. Influence of tropical seasonal changes on oocyte diameter, responses to hormonal induction and hatching quality in two strains of the catfish, *Heterobranchus longifilis* Val. (Clariidae). **Aquaculture**, Amsterdam, v.35, n.2, p.1349–1357, Jul. 2004.

PETER, R. E.; YU, K. L. Neuroendocrine regulation of ovulation in fishes: basic and applied aspects. **Reviews in fish biology and fisheries**, London, v.7,p.173-197, 1997.

REDDING, J. M.; PATIÑO, R. Reproductive physiology. In: EVANS, D. H. **The physiology of fishes**. London: CRC Press, 1993. p.503-534.

RICHTER, A. R.; FUXA, J. R.; ABDEL-FATTAH, M. Effect of host plant on the susceptibility of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to a nuclear polyhedrosis virus. **Environmental Entomology**, v.16, n.4, p.1004-1006, 1987.

RIZZO, E.; GODINHO, H. P. Superfície de ovos de peixes Characiformes e Siluriformes. In: GODINHO, H. P.; GODINHO, A. L. (Eds.). **Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais**. Belo Horizonte: PUC Minas, 2003. 468p. p.115-132.

ROMAGOSA, E.; NARAHARA, M. Y.; BORELLA, M. I.; FENERICH-VERANI, N. Seleção e caracterização de fêmeas de matrixã, *Brycon cephalus*, induzidas a reprodução. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v.2, n.27, p.139-147, 2001.

SANTOS, A. J. F. A., Contribuição para o conhecimento e avaliação do Stock de *Brama brama* no Atlântico Nordeste. **Relatório de Estágio Científico do Curso de Biologia**. Lisboa: Faculdade de Ciências de Lisboa, 1982.

SHEHADEH, Z. H.; KUO C. M.; MILSEM, K. K. Induced spawning of grey mullet (*Mugil cephalus*) with fractionated salmon pituitary extract. **Journal of Fish Biology**, v.5, p.471-478, 1973.

SUNDARARAJ, B. I.; VASAL, S. Photoperiod and temperature control in the regulation of reproduction in the female catfish *Heteropneustes fossilis*. **Journal of Fish Research Board Canadian**, v. 33, p. 950-973, 1976.

TRAJANO, E. Synopsis of Brazilian troglomorphic fishes. **Mémoires de Biospéologie**, v.24, n.1, p.119-126,1997.

TYLER, C. R.; SUMPTER, J. P. Oocyte growth and development in teleosts, **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v.6, p.287-318,1996.

WALLACE, R. A.; SELMAN, K. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. **American Zoologist**, v.21, p.325-343, 1981.