



**CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN DE
CURIMBA (*Prochilodus lineatus*): TÉCNICAS
PARA O DESCONGELAMENTO**

MICHELLE SAMPAIO PAULINO

2009

MICHELLE SAMPAIO PAULINO

**CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN DE CURIMBA (*Prochilodus
lineatus*): TÉCNICAS PARA O DESCONGELAMENTO**

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

Orientador

Prof. Dr. Luis David Solis Murgas

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2009

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

Paulino, Michelle Sampaio.

Criopreservação do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) :
técnicas para o descongelamento / Michelle Sampaio Paulino. –
Lavras : UFLA, 2009.

77 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.

Orientador: Luis David Solis Murgas.

Bibliografia.

1. Ativador. 2. Crioprotetores. 3. Temperatura. 4. Tempo.

I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 639.3
– 597.135

MICHELLE SAMPAIO PAULINO

**CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN DE CURIMBA (*Prochilodus
lineatus*): TÉCNICAS PARA O DESCONGELAMENTO**

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

APROVADA em 27 de fevereiro de 2009

Prof. Dr. Paulo do Santos Pompeu DBI/UFLA

Prof. Dr. Márcio Gilberto Zangeronimo DMV/UFLA

Prof. Dr. Rodrigo Diana Navarro DMV/UFLA

Prof. Dr. Luis David Solis Murgas

UFLA

(Orientador)

LAVRAS

MINAS GERAIS – BRASIL

A Deus por ter me dado força, garra e saúde até o presente momento e ter me
amparado nos momentos de fraqueza

DEDICO

A minha querida e amada filha Izabela de Carvalho, que apesar de tão pequena,
compreendeu os momentos em que estive ausente

OFEREÇO

*"Os pingos da chuva fazem um buraco na pedra não pela violência, mas
por cair com frequência."*

Lucretius

AGRADECIMENTOS

Primeiro a Deus por tudo na minha vida.

Ao Luíz Tadeu Rezende pelo companheirismo.

A minha mãe, Maria Cristina Sampaio, que apesar da distância, tem me incentivado e compreendido minha ausência.

Aos meus irmãos, Viviane Renata Sampaio Paulino e Ícaro Sampaio Paulino, e aos meus familiares, em especial às tias, Arpállice Sampaio e Alice Sampaio, por estarem presentes durante toda a minha infância.

A Universidade Federal de Lavras, em especial ao Departamento de Medicina Veterinária, por ter me dado essa oportunidade.

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

Ao professor Luis David Solis Murgas pela compreensão, orientação, confiança e pela oportunidade concedida.

Aos participantes da banca: Paulo S. Pompeu, Marcio G. Zangerônimo e Rodrigo D. Navarro.

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

À professora Silvia Arranz e seus orientados, Pablo Botta, Andrés Sciara, Emma Obrien e Cecília diBinzio, da Universidade Nacional de Rosário, Argentina, pela colaboração na execução desse trabalho.

A Willian César Cortez e Rilene Meiry Rios pela dedicação e ajuda no período do curso de mestrado.

Aos colegas Aléssio B. Miliorini, Gilmara J. M. Pereira, Ivan Bezerra Allaman, Viviane de Oliveira Felizardo, Marinez Moraes de Oliveira, Guilherme Oderlender e Estefânia Andrade por auxiliarem na execução desse projeto.

OBRIGADA!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELA.....	iii
LISTA DE FIGURAS	v
RESUMO GERAL.....	vii
ABSTRACT	ix
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	3
2.1 Objetivo geral.....	3
2.2 Objetivos específicos.....	3
3 REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1 Espécie em estudo	4
3.2 Motilidade dos espermatozóides	5
3.3 Ativadores da motilidade espermática	7
3.4 Análise de proteínas do sêmen de peixes	9
3.5 Concentração espermática.....	10
3.6 Congelamento do sêmen de peixes	11
3.6.1 Soluções crioprotetoras no congelamento do sêmen de peixes....	13
3.6.2 Soluções diluidoras no congelamento do sêmen de peixes.....	17
3.7 Temperatura e tempo de descongelamento do sêmen	18
3.8 Morfologia espermática.....	19
3.9 Fertilização do sêmen após congelamento	22
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1 Seleção dos reprodutores, manejo alimentar e hipofiseção.....	24
4.2 Coleta e avaliação do sêmen <i>in natura</i>	24
4.3 Congelamento do sêmen	26
4.4 Descongelamento do sêmen.....	27
4.5 Avaliação morfológica do sêmen <i>in natura</i> e descongelado.....	30
4.6 Capacidade de fertilização do sêmen descongelado.....	31
4.7 Análises da extração de proteínas nos espermatozóides de curimba	32

4.7.1 Extração de proteínas no sêmen de curimba	32
4.7.2 Eletroforese e análise de <i>Western Blot</i>	32
4.8 Análise	35
4.8.1 Análise da taxa e duração da motilidade espermática do sêmen de curimba descongelado	35
4.8.2 Análise da morfologia espermática do sêmen de curimba <i>in natura</i> e descongelado	36
4.8.3 Análise da capacidade de fertilização do sêmen descongelado	37
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1 Avaliação do sêmen <i>in natura</i>	39
5.2.1 Avaliação do sêmen descongelado.....	40
5.3 Avaliação da morfologia espermática	48
5.4 Capacidade de fertilização do sêmen congelado	58
5.5 Extração de proteína e Análise de <i>Western Blot</i>	60
7 CONCLUSÕES.....	63
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
ANEXOS.....	75

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Composição do diluidor e dos crioprotetores utilizados no congelamento do sêmen de curimba (<i>Prochilodus lineatus</i>).....	26
TABELA 2	Tratamento do sêmen de curimba criopreservado com DMSO e metanol e descongelado em temperatura de 60°C e 40°C por oito e doze segundos e ativado em diferentes concentrações de NaHCO ₃	29
TABELA 3	Peso corporal, concentração espermática (sptz x 10 ⁹) mL de sêmen, taxa e duração da motilidade (segundos) do sêmen <i>in natura</i> de curimba (<i>Prochilodus lineatus</i>).....	39
TABELA 4	Taxa de motilidade (%) do sêmen descongelado, criopreservado com DMSO + BTS e Metanol + BTS.....	41
TABELA 5	Taxa de motilidade (%) do sêmen descongelado de curimba (<i>Prochilodus lineatus</i>) ativado em diferentes concentrações de NaHCO ₃	42
TABELA 6	Taxa da motilidade do sêmen de curimba (<i>Prochilodus lineatus</i>) descongelado em diferentes tempos e temperaturas.....	43
TABELA 7	Duração da motilidade do sêmen descongelado de curimba (<i>Prochilodus lineatus</i>) em diferentes tempos e temperaturas.....	44

TABELA 8	Duração da motilidade em segundos do sêmen de curimba (<i>Prochilodus lineatus</i>) criopreservado com metanol e DMSO e ativado com diferentes concentrações de NaHCO ₃	45
TABELA 9	Porcentagem do número de espermatozóides de curimba (<i>Prochilodus lineatus</i>) com anormalidades maiores descongelado em oito e 12 segundos.....	48
TABELA 10	Porcentagem do número de espermatozóides de curimba (<i>Prochilodus lineatus</i>) com anormalidades maiores descongelado em temperatura de 60°C.....	49
TABELA 11	Porcentagem do número de espermatozóides de curimba (<i>Prochilodus lineatus</i>) com anormalidades maiores descongelado em temperatura de 40°C.....	50
TABELA 12	Porcentagem do número de espermatozóides de curimba (<i>Prochilodus lineatus</i>) com anormalidades menores.....	50
TABELA 13	Porcentagem do número de espermatozóides de curimba (<i>Prochilodus lineatus</i>) com anormalidades menores.....	51
TABELA 14	Taxa de fertilização do criopreservado com DMSO e descongelado em 60°C por oito segundos, ativado com 0,5% e 1% de bicarbonato de sódio (NaHCO ₃).	58

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Exemplar de curimba (<i>Prochilodus lineatus</i>).....	4
FIGURA 2	Taxa de motilidade do sêmen de curimba (<i>Prochilodus lineatus</i>) ativado em diferentes concentrações de NaHCO ₃	42
FIGURA 3	Duração da motilidade em segundos do sêmen de curimba (<i>Prochilodus lineatus</i>) criopreservado com metanol e DMSO e ativado com diferentes concentrações de NaHCO ₃	45
FIGURA 4	Taxa de anormalidades maiores do sêmen criopreservado com metanol e descongelado nas diferentes temperaturas e tempos. A – metanol, 8 s. e 60° C; B – metanol, 12 s. e 60° C; C – metanol, 8 s. e 40° C; D – metanol, 12 s. e 40° C....	52
FIGURA 5	Taxa de anormalidades maiores do sêmen criopreservado com DMSO e descongelado nas diferentes temperaturas e tempos. A – DMSO, 12 s. e 40° C; B – DMSO, 12 s. e 60° C; C – DMSO, 8 s. e 40° C; D – DMSO, 8 s. e 60° C.....	53
FIGURA 6	Taxa de anormalidades menores do sêmen criopreservado com metanol e descongelado nas diferentes temperaturas e tempos. A – metanol, 8 s e 60° C; B – metanol, 12 s e 60° C; C – metanol, 8 s. e 40° C; D – metanol, 12 s e 40° C.....	54

FIGURA 7	Taxa de anormalidades menores do sêmen criopreservado com DMSO e descongelado nas diferentes temperaturas e tempos. A – DMSO, 12 s e 40° C; B – DMSO, 12 s e 60° C; C – DMSO, 8 s e 40° C; D – DMSO, 8 s e 60° C.....	55
FIGURA 8	Taxa de anormalidades maiores e menores do sêmen <i>in natura</i>	56
FIGURA 9	Análise de <i>Western Blot</i> utilizando coloração roxo de <i>Ponceau</i> e os anticorpos serina e treonina fosfatase e tironina fosfatase.....	61

RESUMO

PAULINO; Michelle Sampaio. **Criopreservação do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*): técnicas para o descongelamento**. 2009. 77 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG¹.

O objetivo deste trabalho foi comparar a influência dos crioprotetores e dos diferentes tempos e temperaturas de descongelamento do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*). O trabalho foi realizado no período de Piracema, em 2007/2008, e a seleção dos reprodutores ocorreu na Estação de Piscicultura da CEMIG, Itutinga – MG. O sêmen de 12 reprodutores foi diluído em duas soluções: a primeira em 10% dimetilsulfóxido (DMSO) e a segunda em 10% metanol, ambas acrescidas de 5% de BTS. O sêmen foi envasado em palhetas de 0,5mL e acondicionado em Botijão de vapor de N₂; após 24 horas foi transferido para botijão de N₂, no qual permaneceu por sete dias. O sêmen de cada reprodutor foi descongelado em temperaturas de 40°C e 60°C por oito e doze segundos e as amostras, ativadas com bicarbonato de sódio (NaHCO₃) em diferentes concentrações de 0,5%, 1% e 1,5% e água destilada, para análise da motilidade espermática e a taxa de fertilização. Uma alíquota foi diluída em formol citrato e fixada em lâmina para verificar a incidência de espermatozói-de com anormalidades maiores e menores. Foram realizadas extrações de proteína com espermatozói-des ativado e não ativado. Houve diferença (P<0,05) entre os crioprotetores utilizados, sendo o DMSO o que apresentou as maiores taxas e durações de motilidade e as menores taxas de anormalidades espermáticas maiores. A regressão quadrática mostrou que o ponto máximo da duração da motilidade foi obtido com a concentração de 0,74% de NaHCO₃. A temperatura de 40°C e o tempo de 8 segundos proporcionaram as maiores taxas da motilidade e as menores taxas de anormalidades maiores. As taxas de fertilização do sêmen descongelado em 60 °C por oito segundos foram de 46% e 54%

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

quando ativado com 1% e 0,5% de NaHCO_3 respectivamente. Pode-se observar, no sêmen ativado, presença de bandas de proteínas, não observadas no sêmen não ativado. O sêmen de curimba pode ser criopreservado com DMSO e descongelado em 40°C por 8 segundos, sendo favorável sua ativação com 0,74% de NaHCO_3 .

Palavras-chave: ativador, crioprotetores, temperatura, tempo

ABSTRACT

PAULINO; Michelle Sampaio. **Cryopreservation of sperm of curimba (*Prochilodus lineatus*):** techniques for thawing. 2009. 77 p. Dissertation (Master of Veterinary Sciences) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG².

The objective of this work was to compare the influence of cryoprotectants and the different times and temperatures of semen thawing of “curimba” (*Prochilodus lineatus*). The work was carried out during the “Piracema” period in 2007/2008, and selection of reproducers occurred in the Fisheries of CEMIG, Itutinga - MG. The semen of twelve reproducers was diluted in two solutions: the first one in 10% dimethylsulfoxide (DMSO) and the second one in 10% methanol, both increased by 5% of BTS. The semen was envased in small tubes of 0.5 mL and stored in cylinders of N₂ vapor. After 24 hours it was transferred to cylinders of N₂, where they remained for seven days. The sperm of each reproducer was thawed at temperatures of 40 ° C and 60 ° C for eight to twelve seconds and the samples were activated with sodium bicarbonate (NaHCO₃) in different concentrations of 0.5%, 1% and 1.5% and distilled water, for analysis of the sperm motility and the fertilization rate. An aliquot was diluted in citrate formol and fixed in blade to check the incidence of spermatozoa with major and minor abnormalities. Protein extractions were carried out with activated and non activated spermatozoa. There were differences (P<0.05) between the cryoprotectants used; the DMSO was the one which had the highest motility rates and durations and the lowest rates of major sperm abnormalities. The quadratic regression showed that the peak duration of motility was obtained with a concentration of 0.74% of NaHCO₃. The temperature of 40 ° C and time of 8 seconds provided the highest rates of motility and the lower rates of major abnormalities. The fertilization

²Advising committee: Prof. Luis David Solis Murgas – UFLA (adviser), Prof. Márcio Gilberto Zangeronimo, Prof. Paulo dos Santos Pompeu, Prof. Rodrigo Diana Navarro – UFLA (Co-advisers).

rates of semen thawed at 60 ° C for eight seconds were 46% and 54% when activated with 1% and 0.5% NaHCO₃ respectively. It can be observed the presence of bands of proteins in activated sperms, which was not observed in non activated sperms. The semen of curimba can be cryopreserved with DMSO and thawed at 40 ° C for 8 seconds, and its activation is favorable with 0.74% of NaHCO₃.

Keywords: activator, cryoprotectants, temperature, time

1 INTRODUÇÃO

Os peixes de piracema constituem parte significativa das espécies comerciais brasileiras que não se adaptam aos regimes de águas lânticas dos reservatórios. Essas espécies necessitam da dinâmica da correnteza fluvial para o desenvolvimento cíclico de seus órgãos sexuais, maturação dos gametas e estímulo para o ato reprodutivo.

Neste contexto, técnicas de criopreservação têm se expandindo nos últimos anos, sendo impulsionadas tanto pela indústria aquícola como por questões ecológicas. Entretanto, tornam-se necessários estudos visando o desenvolvimento de métodos eficientes na criopreservação do sêmen para diferentes espécies de peixes.

Os métodos de criopreservação consistem em procedimentos para congelar o sêmen, mantendo sua viabilidade genética, conservando-o até sua utilização. Porém, para o sucesso do armazenamento do sêmen deve-se ter um procedimento adequado, desde a incorporação de uma solução protetora até um correto resfriamento, congelamento e descongelamento.

O gênero *Prochilodus* apresenta grande significado na piscicultura comercial brasileira devido à sua importante função no fluxo de energia dentro dos sistemas aquáticos que habita, sendo utilizado como alimento vivo na larvicultura de espécies carnívoras ameaçadas como a piracanjuba (*Brycon orbignyanus*), o dourado (*Salminus brasiliensis*) e o jaú (*Zungaro jahu*), além de servir como espécie-modelo no desenvolvimento de pesquisas em biotecnologia reprodutiva devido à sua facilidade de manejo.

Embora muitos trabalhos avaliam efeitos tóxicos de crioprotetores e ativadores nas características seminais de peixes, poucos trabalhos têm

ênfâtizado a influência do tempo e da temperatura ideal de descongelamento na qualidade do sêmên de peixes.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver um protocolo de congelamento e descongelamento do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*).

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a toxicidade dos crioprotetores metanol e dimetilsulfóxido (DMSO);
- Comparar a influência dos tempos e temperaturas de descongelamento na qualidade do sêmen;
- Comparar as diferentes concentrações das soluções ativadoras na qualidade do sêmen;
- Avaliar a taxa de anormalidades morfológicas do sêmen;
- Analisar a capacidade de fertilização do sêmen descongelado;
- Verificar a presença de proteínas no sêmen ativado e não ativado;

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Espécie em estudo



FIGURA 1 Exemplo de curimba (*Prochilodus lineatus*)

Reino: Animália

Filo: Chordata

Classe: Actinopterygii

Ordem: Characiformes

Família: Prochilodontidae

Gênero: Prochilodus

Espécie: *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836)

O gênero *Prochilodus* é amplamente distribuído pela América do Sul, incluindo várias espécies que apresentam comportamento similar em rios espalhados pela América Latina (Goulding, 1982). As espécies desse gênero alimentam-se de detritos de peixes, quando os nutrientes se tornam escassos. Devido a esse fato, o gênero *Prochilodus* exerce importante função para a biomassa (Welcome, 1985).

Em todas as regiões de ocorrência desse gênero, os peixes são largamente utilizados na alimentação humana (Castagnolli, 1992). Os peixes desse gênero atingem até 70 cm de comprimento, são altos e têm a cabeça larga. Preferem os ambientes lóticos e realizam migração em massa rio acima na época da reprodução (Piracema), que ocorre de novembro a janeiro (Companhia Energética de Minas Gerais, CEMIG, 2000).

Sua primeira maturação sexual ocorre com cerca de dois anos, apresenta hábito reprodutivo migrador e, portanto, grande potencial para piscicultura intensiva, semi-extensiva e extensiva (Castagnolli, 1992).

Machos e fêmeas são idênticos externamente. O macho se reproduz aos dois anos de idade, com 24 cm de comprimento, e a fêmea, aos 3 anos de idade, com 31 cm de comprimento (CEMIG, 2000).

A espécie *Prochilodus lineatus* (curimba) é um peixe iliófago (Logato, 2000) e, devido a esse tipo de hábito alimentar, exerce importante função no fluxo de energia dentro dos sistemas aquáticos que habita (Jepsen et al., 1997), pois suas larvas servem de alimento para espécies carnívoras ameaçadas de extinção, um dos motivos pelos quais pisciculturas têm grande interesse no sucesso de sua reprodução (Murgas et al., 2003).

3.2 Motilidade dos espermatozóides

A motilidade espermática é um dos principais parâmetros a ser avaliado para verificar a qualidade do sêmen de peixes (Godinho, 2007).

Após a ejaculação, a drástica mudança de osmolaridade e o efluxo de água na membrana são acionados, determinando a redução do volume celular com o aumento na concentração iônica intracelular (Cosson, 2004).

A adenyliclase (cAMP) é, então, ativada por diversos mecanismos como a hiperpolarização da membrana (Izumui et al., 1999) ou o aumento da concentração de Ca^{2+} , que irão dar início à motilidade espermática (Visconti, 1998).

A composição bioquímica do plasma seminal varia amplamente entre as espécies e entre indivíduos da mesma espécie, relacionando-se a diferentes concentrações de proteínas, enzimas e lipídios (Lahnsteiner, 1996), açúcares e ácidos, que são responsáveis pelo metabolismo das células espermáticas (Piironen, 1983). Entretanto, a diferença existente entre a baixa osmolaridade da água e aquela do plasma seminal é essencial para iniciação da motilidade dos espermatozóides em peixes de água doce (Alavi & Cosson, 2006). Em carpas (*Cyprinus carpio*), a exposição hiposmótica em torno de 200 mOsm/g^{-1} dispara a motilidade espermática (Morisawa et al., 1983; Perchec et al., 1995). Essa descarga osmótica modifica a permeabilidade da membrana e a organização do lipídio (Marian et al., 1993). O decréscimo na concentração intracelular de K^+ também dispara a ativação de espermatozóides de Zebra Fish (Takai & Morisawa, 1995). Os mesmos autores relatam que, em resposta ao stress hiposmótico, ocorre a modificação da concentração intracelular de eletrólitos (K^+ , Na^+ , Ca^+ , Cl^- e demais solutos).

Já em teleósteos marinhos a motilidade flagelar é iniciada pela descarga hiperosmótica (Alavi & Cosson, 2006). Neste caso, os espermatozóides são inativos no plasma seminal em torno de 300 mOsm/g^{-1} e ativados com o aumento da osmolaridade em torno de 1200 mOsm/g^{-1} (Cosson, 2004). Essa descarga hiperosmótica induz um aumento de K^+

intracelular e a concentração de Ca^{2+} , desencadeando a ativação da motilidade (Oda & Morisawa, 1993).

Espermatozóides de peixes de água doce são carregados com trifosfato de adenosina (ATP), o qual é hidrolisado rapidamente durante a fase ativa da motilidade. A síntese de ATP fornece uma contribuição muito pequena e pode ser resultado da glicólise e da respiração mitocondrial e a motilidade é interrompida quando 50 a 80% destes ATPs são consumidos pela hidrólise (Cosson, 1999).

Embora a motilidade espermática tenha sido frequentemente usada como parâmetro que determina a qualidade e a capacidade de fertilização do sêmen, nem sempre representa um bom indicativo, já que espermatozóides imóveis não estão necessariamente mortos ou incapazes de fertilização (Stoss, 1983). Em estudos, salmão do atlântico sem motilidade resultou em fertilização (Jamieson & Leung, 1991).

3.3 Ativadores da motilidade espermática

Os espermatozóides de peixes são imóveis nos testículos e, na maioria das espécies, no plasma seminal, e adquirem motilidade devido à diferença de osmolaridade entre o plasma seminal e a solução ativadora (Cosson, 2004). A vida dos espermatozóides de muitas espécies de peixes após a ativação é muito curta, em torno de 60 segundos (Billard & Cosson, 1992). Devido a isso, a determinação da solução adequada à ativação da motilidade espermática sem comprometer a qualidade seminal torna-se uma questão importante em trabalhos de criopreservação em peixes (Bedore, 1999).

Alguns autores têm testado diferentes ativadores, como a água (Linhart et al., 1993), o bicarbonato de sódio (Murgas et al., 2003; Miliorini, 2006), o cloreto de sódio (Cruz, 2001), o cloreto de potássio (Ravinder et al., 1997) e a uréia (Carolsfeld et al., 2003). Outro fator considerado importante é a concentração dos ativadores, utilizada para o sêmen de diferentes espécies (Ravinder et al., 1997). A solução ativadora de 1% de NaHCO_3 produziu resultados significativamente superiores a 0,21 % de NaCl e água destilada quando testada em sêmen criopreservado com dimetilsulfóxido, dimetilacetamida e propilenoglicol, na espécie piau-açu *L. macrocephalus* (Ribeiro & Godinho, 2003). Cóser et al. (1984) sugerem a utilização de NaHCO_3 em concentração de 1% como ativador para o sêmen de curimba descongelado. Esse mesmo ativador obteve consideráveis taxas de motilidade do sêmen de matrinxã (*Brycon cephalus*), porém os ovócitos, durante a fertilização, se aglutinaram no fundo do recipiente e a taxa de eclosão foi nula (Silveira, 2000).

Murgas et al. (2003) obtiveram taxas de motilidade acima de 70% utilizando 1% de NaHCO_3 em sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) descongelado. Murgas et al. (2007) obtiveram maiores durações de motilidade em sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) utilizando 0,5% de NaHCO_3 em relação a 1,0% de NaHCO_3 e à água destilada.

A razão sêmen: ativador é outro aspecto que varia entre espécies e que representa uma dificuldade em relação à ativação da motilidade espermática. Muitas vezes, alguns espermatozoides encontram-se imóveis, mas em diluições subseqüentes, apresentam movimento. Uma diluição relativamente alta é necessária simultaneamente ao início da motilidade em 100% das células espermáticas (Godinho, 2000). Em baixas diluições,

somente alguns espermatozóides são ativados, enquanto outros têm sua ativação tardia. Este fenômeno deve-se à diluição insuficiente ou à mistura inadequada da solução ativadora com o sêmen (Bedore, 1999).

3.4 Análise de proteínas no sêmen de peixes

A presença de proteínas é um dos maiores constituintes orgânicos no líquido seminal e a motilidade espermática pode ser influenciada pelas ações dessas proteínas (Curi et al., 2003). A identificação de vários grupos de proteínas presentes no sêmen de muitas espécies pode auxiliar em várias linhas de pesquisas, entre elas a criopreservação de gametas (Moura et al., 2006) e técnicas de fertilização artificial em bovinos (Jobim et al., 2004).

No caso de mamíferos, a utilização de marcadores bioquímicos para determinar a qualidade do sêmen possibilita a seleção de melhores machos, contribuindo no processo de maximização da reprodução artificial (Jobim, et al., 2004).

Para a identificação de marcadores bioquímicos que caracterizam a qualidade do sêmen, algumas técnicas de biologia molecular têm sido utilizadas, entre elas a eletroforese (*SDS PAGE*), que é empregada para mapear e identificar polipeptídios no sêmen de muitas espécies (Moura et al., 2006). A eletroforese é uma técnica utilizada para o fracionamento de proteínas, pois depende da habilidade de moléculas carregadas migrarem quando submetidas a um campo elétrico (Lewin, 2001).

Em estudos com espécies de peixes marinhos, as proteínas dos espermatozóides são separadas e identificadas por (*SDS-PAGE*) em membrana de nitrocelulose através da interação com anticorpos específicos como as fosfatases (Zilli et al., 2008).

As fosfatases são enzimas hidrolases que utilizam como substrato fosfomonoésteres, os quais estão amplamente distribuídos na natureza. Essas enzimas são divididas em três grupos: fosfatases alcalinas, fosfatases ácidas e proteínas fosfatases. Em relação a função, estrutura, seqüência, especificidade, ativadores e inibidores, as proteínas fosfatases podem ser agrupadas em dois grupos: proteínas serina/treonina fosfatase e proteínas tirosina fosfatases (Lewin, 2001).

Em células eucarióticas, a fosforilação de proteínas catalisadas por proteínas quinases, ocorre em resíduos de tirosina, serina e treonina. As proteínas tirosina e serina/treonina participam de várias vias de transdução de sinais (Bishop et al., 2001). No caso das proteínas serina/treonina, elas compreendem duas famílias de genes chamados de PPP e PPM. Já as proteínas tirosina (PTPs) representam uma grande família de enzima e são responsáveis pela hidrólise do fosfato ligado a resíduos de tirosina em proteínas. São estruturalmente diversas, incluindo tipo citoplasmático e tipo receptor, com a capacidade de transmitir sinais diretamente a enzimas de membrana e citoplasma, controlando diversos processos celulares (Bishop et al., 2001).

3.5 Concentração espermática

A concentração espermática é um parâmetro utilizado para verificar o número de espermatozoides por volume de sêmen. A concentração de espermatozoides no fluido seminal tem sido tradicionalmente usada para avaliar a qualidade espermática em peixes (Godinho, 2000). O método utilizado para determinar a contagem de células espermáticas por ml de sêmen é feito através de uma câmara hematimétrica. O cálculo é realizado

em números de células espermáticas contados por Kg de peso corporal (células/Kg). Porém, deve-se levar em consideração que sêmen altamente concentrado nem sempre oferece elevada motilidade ou altas taxas de fertilização (Williot et al., 2000).

Silva (2007) verificou que a concentração de espermatozoides por mm^2 em algumas espécies de piracema é influenciada pelos períodos de reprodução. No caso da curimba, a concentração é constante no início da reprodução e aumenta no fim da reprodução. Segundo Rurangwa et al. (2004), a concentração espermática torna-se uma característica relativamente importante quando se fertilizam ovos com um volume constante de sêmen.

A concentração espermática varia entre as espécies de peixes. Em curimba, a concentração espermática varia entre 13,3 e $20,5 \times 10^9$ sptz/mL (Godinho, 2007); em pirapitinga (*Brycon nattereri*), a concentração espermática média variou de 5,6 a 30×10^9 espermatozoides/mL (Oliveira et al., 2007); e em Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) foi obtida média de concentração espermática de 36,6 a $16,5 \times 10^9$ sptz por mL (Bedore, 1999).

3.6 Congelamento de sêmen de peixes

O primeiro trabalho sobre congelamento de sêmen de peixe foi realizado há mais de 50 anos por Blaxter, em 1953, para viabilizar o cruzamento de dois “tipos de arenque” que desovam em épocas diferentes do ano. A partir daí, novas técnicas vêm sendo desenvolvidas na criopreservação de gametas (Carneiro, 2007).

O congelamento de sêmen tem por finalidade promover o fornecimento de material genético para aumentar a variabilidade de uma

determinada população (Fauvel et al., 1999). O sêmen é envasado em palhetas geralmente de 0,5 ml, que são acondicionadas em raques e colocadas em vapor de nitrogênio líquido por um tempo de 24 horas, e posteriormente acondicionadas em botijões contendo nitrogênio líquido em temperatura de -196°C (Carolsfeld & Harvey, 1999). Para que esse procedimento seja viável, ele deve ser rigorosamente processado, pois se o sêmen for colocado diretamente no nitrogênio líquido, a membrana plasmática e a peça intermediária podem desaparecer inteiramente (Billard, 1983). Além disso, pode ocorrer a formação de microcristais de gelo, que é deletéria aos espermatozóides por duas razões principais: a redução brusca da temperatura dentro e fora da célula e a osmoconcentração extracelular, que ocasiona efluxo de água e intensificação da concentração osmótica interna, resultando no colapso da membrana celular (Medeiros et al., 2002).

Segundo Leung (1991), os maiores prejuízos conhecidos na estrutura dos espermatozóides ocorrem no intervalo crítico entre 0°C e -40°C . Quando o sêmen é colocado primeiro em vapor de nitrogênio, os espermatozóides sofrem congelamento gradual e as estruturas membranosas não são muito alteradas, apesar de o aspecto da cromatina ser consideravelmente modificado (Billard, 1983). Em temperaturas em torno de 5°C , a água intra e extracelular permanece resfriada e não cristaliza; entre -5°C e -10°C , microcristais de gelo começam a se formar no meio extracelular e o processo de desidratação se inicia (Medeiros et al., 2002). Para Cosson et al. (1999), uma taxa de motilidade espermática mínima de 90% é adequada para se processar o congelamento do sêmen de peixes, e segundo Cruz (2001), o período de tempo de congelamento não influencia

na qualidade do sêmen se este for mantido à temperatura constante de -196°C.

3.6.1 Soluções crioprotetoras no congelamento do sêmen de peixes

Os espermatozoides, quando submetidos ao congelamento, estão sujeitos ao estresse resultante da interação água e solução, responsável pela formação de cristais de gelo, causando dano estrutural ou até mesmo a morte das células espermáticas (Holt, 2000). Esses danos que o sêmen criopreservado pode sofrer são reduzidos ou evitados através da utilização de crioprotetores, que permitem o congelamento do sêmen em gelo seco a uma temperatura de -79°C, ou em nitrogênio líquido a -196°C (Cyrino et al., 2004).

A criopreservação de células espermáticas teve seu avanço nas pesquisas quando descobriram que o glicerol possui capacidade de protegê-las contra efeitos deletérios do congelamento (Holt, 2000). Desde então, várias substâncias, como metanol, metiglicol, DMSO, propanodiol e gema de ovo, entre outras, vêm sendo testadas com a finalidade de proteger células espermáticas quando expostas ao congelamento (Godinho, 2000).

O passo para a criopreservação inclui soluções crioprotetoras adequadas que penetram e desidratam as células, minimizando alterações celulares e danos na membrana celular ocasionados pela formação de cristais de gelo. Essas substâncias que exercem funções crioprotetoras são divididas em crioprotetores intra e extracelulares (Leung, 1991).

A baixa toxicidade e a alta solubilidade na água são requisitos essenciais para um agente químico ser considerado crioprotetor (Chao, 2001). O crioprotetor intracelular é uma substância química não tóxica

capaz de retirar a água da célula e diminuir a temperatura de congelamento no seu interior, impedindo a formação de cristais de gelo internamente (Carolsfeld et al., 2003).

Entre os crioprotetores intracelulares podem-se destacar o dimetilsulfóxido, o metanol, a dimetilacetamida (DMA), o glicerol, o metilglicol, o propanodiol e o etilenoglicol. O dimetilsulfóxido (DMSO) é um líquido orgânico, incolor, oleoso e sem odor, cuja fórmula é C_6H_6SO (Rosenbaem, 1965). É um composto derivado da lignina, substância responsável pela rigidez das células vegetais, e teve sua primeira utilização na preservação de órgãos (Jacob, 1983). Esse crioprotetor é um dos mais utilizados para preservar células espermáticas de peixe de água doce (Leung, 1991), porém concentrações ou períodos de estabilização elevados desta substância provocam redução na qualidade do sêmen de peixe (Bedore, 1999). Em algumas espécies, essa toxicidade do DMSO pode ser suprimida pela adição de carboidratos (Leung, 1991). Já o metanol é a substância que mais facilmente atravessa a membrana celular, sendo, entretanto, considerada a mais tóxica, exceto para tilápias (*Oreochromus niloticus*) (Harvey, 1983). A dimetilacetamida (DMA) tem sido utilizada com sucesso em bagre africano, porém sua toxicidade foi alta em tilápiánilótica (Amorim, 2002). O metilglicol éter monometílico de etilenoglicol, é proveniente do metanol (CH_3OH) e do óxido de eteno (CH_2OCH_2), utilizado como crioprotector na preservação de embriões bovinos (Takagi et al., 1993) e tem sido usado na criopreservação de algumas espécies de peixes (Viveiros et al., 2008). O glicerol é um líquido oleoso, incolor, viscoso e de sabor doce, solúvel em água e álcool. Esse crioprotetor induz a mudanças nos eventos citoplasmáticos por aumentar a viscosidade ao

penetrar a célula espermática, causando alterações na polimerização da tubulina, na associação de microtúbulos no balanço bioenergético (Hammersted & Graham,1992).

Os crioprotetores extracelulares, ao contrário dos intracelulares, revestem a célula externamente, estabilizando a membrana e diminuindo os danos provocados pelo congelamento (Carolsfeld et al., 2003). Entre os crioprotetores extracelulares podem ser citados citar açúcares (glicose, sacarose), proteínas (derivadas da gema de ovo, do leite desnatado, do soro e água de coco) e polímeros (dextram e PVP). Os açúcares atuam na desidratação da célula, reduzindo as injúrias causadas pela cristalização de gelo (Yildiz et al., 2000). Eles conferem proteção à membrana plasmática durante o congelamento através de interações diretas com a membrana, as quais envolvem ligações de hidrogênio dos grupos hidroxil dos açúcares com os grupos fosfatos localizados na cabeça dos fosfolipídeos. Por restaurarem o percentual de água ao redor dos grupos das cabeças dos fosfolipídios, os açúcares podem prevenir os danos causados pela desidratação extrema. Geralmente os dissacarídeos como a sacarose e a trealose têm melhor efeito na estabilização da bicamada da membrana do que os monossacarídeos, pois mantêm melhor a capacidade de transporte de cálcio e inibem a fusão das membranas (Crowe et al.,1987).

A gema de ovo é adicionada antes do uso da solução e funciona como fonte de nutrientes, além de ter ação crioprotetora por conter ácidos graxos e antioxidantes que auxiliam na proteção e conservação do espermatozóide (Carolsfeld et al.,1999). Sua ação crioprotetora se dá devido à presença de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), as quais

aderem à membrana celular durante o processo de criopreservação (Moussa et al., 2002).

Segundo Maria (2005), a proteção proporcionada pelos crioprotetores internos se dá sobre as enzimas lábeis (ex-catalase) e sobre a estabilidade das proteínas em soluções aquosas não congeladas. Alternativamente, pode também induzir a desnaturação e causar toxicidade nos sistemas celulares. Foi verificado que determinadas substâncias agem melhor em algumas espécies do que em outras (Godinho, 2000). Além disso, a eficiência crioprotetora pode aumentar quando dois crioprotetores (intracelular e extracelular) são combinados (Harvey, 1983).

Outro fator que se deve levar em consideração é a concentração do crioprotetor a ser utilizado. O preparo da solução protetora envolve primeiramente a diluição do crioprotetor intracelular para aumentar a pressão osmótica da solução e evitar a ativação dos espermatozoides (Cruz, 2001).

Milliorini (2006), utilizando, no congelamento do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*), o crioprotetor DMSO em concentração de 10% e BTS em 5%, obteve maiores durações de motilidade espermática comparadas com metanol e BTS nas mesmas concentrações. Maria et al. (2006) obtiveram média da taxa de motilidade de 70% utilizando o crioprotetor metilglicol em concentração de 10% e BTS em concentrações de 5% no congelamento de Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*).

3.6.2 Soluções diluidoras no congelamento do sêmen de peixes

Os diluidores são soluções de sais ou de carboidratos adicionadas ao sêmen, cuja função é manter a estrutura das células espermáticas durante a redução da temperatura (Legendre & Billard, 1980). Componentes constituintes de um meio diluidor são importantes para assegurar o pH, a força iônica, os tipos de íon e a pressão osmótica do sêmen de cada espécie animal (Chao, 1991). As condições exigidas para um diluidor são de que ele seja isotônico, ou seja, que não ative a motilidade espermática; estável durante o armazenamento, pois suas características físico - químicas não devem ser alteradas durante o contato com o sêmen; e estéril, pois não pode veicular microrganismos potencialmente nocivos às células espermáticas (Legendre & Billard, 1980).

A glicose é um diluidor de fácil acesso e, em combinação com o DMSO e a gema de ovo, ou com metilglicol, tem sido a mais utilizada em espécies de peixes de ordem characiformes no Brasil (Viveiros & Godinho, 2008). O BTS *Beltisville thawing solution* (BTS, Minitub) é um diluidor desenvolvido e utilizado para conservação do sêmen suíno, possuindo, em suas fórmulas, componentes que, além de nutrir células espermáticas e proporcionar um microambiente osmoticamente favorável, protegem a face intracelular da membrana citoplasmática durante o congelamento (Murgas et al., 2007). Logo, têm sido utilizados por vários autores em pesquisas com peixes de Piracema (Franciscatto et al., 2002; Maria et al., 2002; Miliorini, 2006).

Contudo, o diluidor pode ser utilizado desde que sejam adicionados solutos adequados em quantidades apropriadas para gerar um meio

osmoticamente favorável à inativação da motilidade dos espermatozóides (Murgas et al., 2004).

3.7 Temperatura e tempo de descongelamento do sêmen

O descongelamento de sêmen de peixes, ao contrário do congelamento, envolve uma reidratação das células devido ao influxo de água para seu interior (Holt, 2000). O descongelamento rápido é necessário para evitar a recristalização, ou seja, o reagrupamento de pequenos cristais de gelo em grandes cristais de gelo letais para a célula (Leung, 1991).

Normalmente o descongelamento é feito por imersão das palhetas em banho-maria (Murgas et al., 2001). Como há muitas particularidades entre sêmen de diferentes espécies de peixes, tanto a velocidade e a temperatura de congelamento quanto de descongelamento devem ser obtidas pela condução de ensaios experimentais com antecedência para uma determinada espécie pouco estudada (Carolsfeld et al., 2003). A taxa de descongelamento é um fator importante no processo de criopreservação, pois células que foram protegidas com um crioprotetor e resfriadas na taxa correta ainda podem morrer se forem descongeladas muito rápido ou muito lentamente (Carolsfeld & Harvey, 1999).

Leung (1991) verificou que a alta taxa de aquecimento é usualmente empregada para minimizar o grau de recristalização e, quando o descongelamento é rápido demais, não há tempo suficiente para a célula desidratar. Segundo Cruz (2001), o sêmen congelado, ao ser retirado do botijão de nitrogênio líquido e mergulhado em banho-maria, deve ser agitado por poucos segundos para que haja o descongelamento uniforme. Portanto, quando o sêmen é congelado em palhetas de grande volume,

acima de 0,5 ml, este processo se torna mais difícil porque o descongelamento não é uniforme e a superfície descongela mais rapidamente que a porção central.

Murgas et al. (2003) obtiveram resultados satisfatórios na motilidade quando descongelaram sêmen de Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) em 50°C por 10 segundos. Milliorini (2006) descongelou o sêmen de curimba em temperatura de 60°C por 8 segundos e obteve aceitáveis taxas e durações de motilidade.

3.8 Morfologia espermática

Em procedimentos de avaliação de sêmen em mamíferos, a morfopatologia dos espermatozóides é considerada um parâmetro importante entre os fatores que determinam a qualidade dos gametas (Hafez, 2004).

Em peixes, os critérios utilizados para avaliação do sêmen têm se baseado em exames de motilidade e concentração, sem levar em consideração a ocorrência de defeitos morfológicos nas células espermáticas (Kavamoto et al., 1999). As anormalidades morfológicas das células espermáticas são responsáveis pela diminuição da motilidade, provocando a redução da fertilização (Cosson et al., 1999). Assim, Yao et al. (2000) sugerem que os exames morfopatológicos dos espermatozóides de peixes sejam incorporados à rotina de avaliação do sêmen após a criopreservação.

Toda amostra de sêmen possui algumas células anormais e, de acordo com a metodologia, pelo menos 200 células devem ser avaliadas considerando a presença do tipo e a incidência de cada defeito morfológico

(Hafez, 2004). Em peixes, os exames que abordam esse parâmetro restringem-se praticamente a mudanças estruturais nos espermatozóides após a criopreservação, as quais podem se dar na cabeça, na peça intermediária e na cauda (Yao et al., 2000).

Os espermatozóides de peixes e da maioria dos teleósteos não possuem acrossoma, o que é compensado pela presença da micrópila no córion do ovócito (Cosson et al., 1999). Em mamíferos, a cauda ou flagelo pode ainda ser subdividido em colo e peça intermediária. O colo representa a inserção do corpo basal do flagelo à cabeça e a peça intermediária consiste de uma bainha mitocondrial disposta em hélice, responsável pela geração de energia necessária à propulsão dos espermatozóides (Hafez, 2004).

No caso dos espermatozóides de peixes, as anormalidades de cabeça grande e cauda mais curta podem ocorrer devido ao fato de estas células estarem em diferentes fases de transição de espermátide para espermatozóide (Kavamoto, 1999). O mesmo autor ainda relata que anormalidades morfológicas da peça intermediária e cauda causam alterações progressivas na motilidade, aumentando o número de espermatozóides com movimentos circulares ou oscilatórios, diminuindo a taxa de fertilização.

O manejo reprodutivo artificial em peixes é um fator estressante que pode influir na espermatogênese. Diversas pesquisas têm demonstrado a capacidade do estresse em inibir o desempenho reprodutivo de peixes (Small, 2004). O sêmen não apresenta características constantes durante todo o período de espermição, sendo sua qualidade afetada pela manipulação do animal ou, segundo Billard

(1983), pelo processo de envelhecimento das células que se apresenta mais intenso no período posterior ao pico de reprodução.

De acordo com Kavamoto et al. (1999), um dos fatores principais na avaliação morfológica dos espermatozoides de peixes é que ela pode auxiliar na caracterização de amostras descongeladas de sêmen, explicando insucessos de reprodutores tidos como aptos após análises convencionais de motilidade espermática. O Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, CBRA (1998) recomenda não utilizar, na inseminação artificial de mamífero, sêmen com índices de espermatozoides com anormalidade acima de 30% em bovinos e eqüinos e 20% em ovinos e suínos. Porém, em peixes, esse tipo de referência não foi estabelecido.

Milliorini (2006) relata que, como a fecundação artificial em curimba envolve a utilização de uma elevada proporção entre espermatozoides e ovócito em um ambiente controlado, é provável que o porcentual crítico de anormalidades espermáticas de peixes de fecundação externa oscile em torno de 50%.

Segundo Marques et al. (2001), o grau de anormalidades espermáticas pode interferir decisivamente no potencial fertilizante dos espermatozoides devido ao fato de o processo de congelamento induzir a muitas dessas anormalidades morfológicas, e mesmo espermatozoides com motilidade evidente podem ser incapazes de penetrar um ovócito ou de levar a termo o desenvolvimento embrionário.

3.9 Fertilização do sêmen após congelamento

O teste de fertilização constitui o método que melhor permite avaliar a qualidade seminal, sendo seu resultado expresso em porcentagem de ovos que atingem a fase de fechamento do blastóporo (Ribeiro & Godinho, 2003).

Segundo Rana & Mac Andrew (1989), a qualidade espermática, em muitos casos, tem sido somente avaliada em termos de motilidade após descongelamento, não considerando a taxa de fertilização dos ovos, que é, sem dúvida, o mais apropriado e prático critério nos protocolos de avaliação para criopreservação de espermatozóides.

A distância a ser percorrida pelo espermatozóide depende da velocidade espermática e do tempo da motilidade (Suquet et al., 1995), devido à abertura da micrópila ser em torno de 10 a 20 segundos (Cosson, 2004). Além disso, pode haver uma relação mínima espermatozóide: ovo (Suquet et al., 1995).

O teste de fertilização deve ser feito para comprovar a eficiência do método de criopreservação, pois espermatozóides exibindo motilidade podem não ser viáveis (Ribeiro & Godinho, 2003). Entretanto, a coleta de quantidades precisas de ovócitos é uma das dificuldades encontradas na avaliação da capacidade fecundante, já que ovócitos maiores necessitam de mais espermatozóides para a fecundação (Shimoda et al., 2007). Devido à injúrias sofridas no processo de criopreservação, deve-se utilizar o dobro da razão espermatozóides : ovócitos em sêmen congelado (Jenkins, 2000).

Shimoda et al. (2007), utilizando 0,9 ml de sêmen para 100gr de ovócitos em pianha *Brycon insignis*, obtiveram taxas de fertilização de

88%. Maria et al. (2006) obtiveram taxa de fertilização de 66% utilizando 100µl de sêmen de piracanjuba para 0,1 g de ovócito.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção dos reprodutores, manejo alimentar e hipofisação

O trabalho foi conduzido durante o período de Piracema, outubro de 2007 a fevereiro de 2008. Foram selecionados 12 reprodutores de curimba (*Prochilodus lineatus*) dos tanques de viveiro de terra com auxílio de redes de arrasto. Esses tanques estão localizados na estação de piscicultura da Cemig, às margens do Rio Grande, bacia do Paraná, Minas Gerais. Os reprodutores capturados apresentaram peso variando de 700gr a 2 Kg .

Esses reprodutores foram transportados para aquários de alvenaria com volume de 200 litros de água. Durante o período reprodutivo, os animais foram alimentados com ração extrusada de 8,0 mm de diâmetro com 32% de proteína bruta (ração comercial). O nível de oxigênio dissolvido foi monitorado e a temperatura da água dos tanques de alvenaria foi mantida em torno de $24\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 26^{\circ}\text{C}$.

Cada reprodutor foi pesado e submetido ao tratamento hormonal com extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC) para indução da espermição. A dose utilizada para machos constou de duas injeções intramusculares de 0,5 e 5,0 mg/kg de peso corporal com intervalos de 12 horas entre cada aplicação, conforme o procedimento da estação.

4.2 Coleta e avaliação do sêmen *in natura*

Aproximadamente oito horas após o término da última injeção, a papila urogenital foi limpa e enxugada com auxílio de um papel toalha. Foram realizadas massagens sobre a parede celomática do animal sentido crânio-caudal. O sêmen isento de contaminação com urina, fezes e sangue

foi coletado em tubos de ensaio graduados estéreis, os quais foram mantidos em temperatura ambiente (22°C). Para a avaliação do sêmen *in natura*, uma alíquota de 10 µl de sêmen foi colocada em uma lâmina histológica de vidro, homogeneizada com 40 µl de água destilada (Miliorini, 2006). Foi avaliada a motilidade espermática em microscópio óptico de luz, sob aumento de 100x, e estimada a porcentagem média de espermatozoides móveis observados em três campos da lâmina. A duração da motilidade espermática foi estimada desde a homogeneização com água destilada até que somente 10% dos espermatozoides estivessem móveis. O sêmen que apresentou motilidade subjetiva acima de 80% foi considerado apropriado para o experimento.

A concentração espermática foi estimada por meio da utilização de uma câmara de Newbawer. Para tanto, uma alíquota de 10 µl de sêmen de cada reprodutor foi diluída em 990 µl de solução de formol-citrato depositados em *eppendorfs*. Posteriormente foi feita nova diluição nas mesmas proporções, resultando em uma diluição 1:10000 (sêmen: formol citrato). Uma alíquota de sêmen diluído foi colocada na câmara hematimétrica e o valor obtido foi multiplicado pelo fator de correção 50.000, encontrando-se, assim, a quantidade de células por mm³. A transformação em espermatozoides/mL foi realizada multiplicando-se os valores encontrados por 10000.

Para a avaliação da morfologia espermática do sêmen *in natura*, 10 µl de sêmen de cada reprodutor foram diluídos em 990 µl de solução de formol-citrato. A composição da solução formol citrato foi de: 2,9 g de citrato de sódio, 4,0 ml de solução comercial de formaldeído 35% e 100 ml água destilada.

4.3 Congelamento do sêmen

Após a análise do sêmen *in natura*, o sêmen de cada reprodutor foi diluído em tubos de ensaio. O diluidor foi o BTS (*Beltisville Thawing Solution*-MINITUB) em concentração final de 5%. A composição para cada 100 g foi de 79,9 g de glicose, 12,7 g de citrato de sódio, 2,65g de EDTA, 2,65g de bicarbonato de sódio, 1,59 g de cloreto de potássio e 0,50 g de sulfato de gentamicina.

Os crioprotetores utilizados foram o metanol e o DMSO em concentração de 10%, (Tabela 1), cujas soluções crioprotetoras foram preparadas da seguinte forma:

Solução A: 5 g. de BTS acrescidos de 10 mL de metanol e água destilada até que a solução completasse 100 mL.

Solução B: 5 g. de BTS acrescidos de 10 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e água destilada até que a solução completasse 100 mL.

Após o preparo da solução crioprotetora, o sêmen foi diluído em proporção 1:4 sêmen: solução crioprotetora.

TABELA 1 Composição do diluidor e dos crioprotetores utilizados no congelamento do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*).

Tratamento	Crioprotetor externo	Diluidor
A	10% DMSO ²	5% BTS ¹
B	10% Metanol	5% BTS ¹

¹Belltsville Thawing Solution, Minitub do Brasil - LTDA. ²dimetilsulfóxido.

O sêmen coletado de cada reprodutor e criopreservado nas diferentes soluções foi envasado em 19 palhetas com capacidade de 0,5 mL, vedadas com massa cirúrgica estéril, sendo 16 palhetas para o experimento e 3 palhetas para reservas, caso ocorresse algum processo que inviabilizasse a perda das palhetas que seriam utilizadas para o experimento. Posteriormente as palhetas foram acondicionadas em raques e colocadas em botijão de vapor de nitrogênio líquido (Taylor-Warton, modelo CP 300, *dry shipper*) para resfriamento. Após 24 horas, foram transferidas para o botijão de armazenamento contendo nitrogênio líquido (Cryometal, modelo DS-18) e mantidas congeladas à temperatura de -196°C por sete dias.

4.4 Descongelamento do sêmen

O descongelamento do sêmen de cada reprodutor foi feito da seguinte forma: As palhetas de sêmen de cada reprodutor criopreservado com metanol e DMSO foram submetidas ao descongelamento em banho-maria em temperaturas de água controlada com termômetro de mercúrio metálico (modelo *Incoterm*). Os tempos de imersão das palhetas na água aquecida foram monitoradas em cronômetro (modelo *cronobio* SW 2018) em oito e doze segundos, e a contagem se iniciou desde a submersão das palhetas na água até sua retirada. Durante a imersão em água, as palhetas foram levemente agitadas para ocorrer um descongelamento uniforme, tanto da superfície como da porção central. Após o descongelamento, as palhetas foram enxugadas em papel toalha e, com auxílio de uma tesoura, foram cortadas as extremidades e o sêmen, depositado em placas de Petri estéreis. Quatro alíquotas de 10µl de sêmen contidos em cada palheta

descongelada foram depositadas em lâminas histológicas e ativadas em água destilada e soluções de bicarbonato de sódio em concentrações de 0,5%, 1% e 1,5%, em proporção 1:3 sêmen solução ativadora. As soluções de NaHCO_3 foram preparadas da seguintes forma:

a) 1,5 g. de NaHCO_3 acrescidos de água destilada até que completassem 100 ml de solução, cuja concentração final foi de 1,5% de solução de NaHCO_3 .

b) 1,0 g. de NaHCO_3 acrescido de água destilada até que completasse 100 ml de solução, cuja concentração final foi de 1,0% de solução de NaHCO_3 .

c) 0,5 g. de NaHCO_3 acrescidos de água destilada até que completassem 100 ml de solução, cuja concentração final foi de 0,5% de solução de NaHCO_3 .

Em microscópio óptico, foi avaliada a motilidade espermática subjetiva, que constou desde a mistura do sêmen com as soluções ativadoras até restarem 10% dos espermatozóides móveis no campo da lâmina. A taxa da motilidade seguiu uma escala de 0 a 100% e a duração da motilidade espermática foi cronometrada e avaliada em segundos. O tratamento ao qual foi submetido o descongelamento do sêmen de cada reprodutor pode ser observado na Tabela 2.

TABELA 2 Tratamento do sêmen de curimba criopreservado com DMSO e metanol, descongelado em temperaturas de 60°C e 40°C por oito e doze segundos e ativado em diferentes concentrações de NaHCO₃.

Crioprotetor	Tempo (seg.)	Temperatura (°C)	Ativador
DMSO	8	40	Água destilada NaHCO ₃ 0,5% NaHCO ₃ 1,0% NaHCO ₃ 1,5%
DMSO	8	60	Água destilada NaHCO ₃ 0,5% NaHCO ₃ 1,0% NaHCO ₃ 1,5%
DMSO	12	40	Água destilada NaHCO ₃ 0,5% NaHCO ₃ 1,0% NaHCO ₃ 1,5%
DMSO	12	60	Água destilada NaHCO ₃ 0,5% NaHCO ₃ 1,0% NaHCO ₃ 1,5%
Metanol	8	40	Água destilada NaHCO ₃ 0,5% NaHCO ₃ 1,0% NaHCO ₃ 1,5%
Metanol	8	60	Água destilada NaHCO ₃ 0,5% NaHCO ₃ 1,0% NaHCO ₃ 1,5%
Metanol	12	40	Água destilada NaHCO ₃ 0,5% NaHCO ₃ 1,0% NaHCO ₃ 1,5%
Metanol	12	60	Água destilada NaHCO ₃ 0,5% NaHCO ₃ 1,0% NaHCO ₃ 1,5%

4.5 Avaliação morfológica do sêmen *in natura* e descongelado

A avaliação da morfologia espermática ocorreu no Laboratório de Microbiologia do Solo do Departamento de Ciência do Solo da UFLA. Para essa análise foram avaliados o sêmen *in natura* e o sêmen criopreservado com DMSO e metanol e descongelado em temperaturas de 40°C e 60°C por oito e doze segundos. As análises foram realizadas em microscópio óptico composto, sob um aumento de 1000x, com iluminação epicóscopica fluorescente (Nikon, modelo OPTIPHOT-2). Uma alíquota de 10 µl de sêmen submetido aos diferentes tratamentos foi diluída 1:1000 solução de formol-citrato. Uma gota de cada amostra diluída nesta solução foi fixada em lâmina histológica e coberta por lamínula. A avaliação consistiu da observação de 200 espermatozóides normais e anormais, focalizados em diversos campos de cada lâmina. Nos espermatozóides anormais foram investigadas anormalidades da cabeça, peça intermediária e cauda, estabelecidas por (Hafez, 2004).

Foram consideradas anormalidades maiores

Cabeça: *macrocefalia* (espermatozóides que apresentaram cabeça maior que as cabeças de espermatozóides normais); *microcefalia* (espermatozóides que apresentavam cabeça menor que as de espermatozóides normais) e a *cabeça degenerada* (espermatozóides que apresentaram cabeça de forma irregular em relação aos espermatozóides de cabeça normal);

Peça intermediária: *degenerada*;

Cauda: *fraturada*: (espermatozóides com fraturas); *fortemente enrolada* (quando a cauda apresentou enovelamento em torno da cabeça) e *degenerada* (descontinuidade da cauda a partir da peça intermediária).

Foram consideradas anormalidades menores:

Cabeça: *isolada* (sem a cauda);

Cauda: *dobrada* (espermatozóides que apresentaram dobraduras em sua cauda); *gota citoplasmática proximal* (gotas na cauda, próximas à peça intermediária) e *gota citoplasmática distal* (gotas a partir da metade da cauda).

Quando os espermatozóides apresentaram anormalidades maiores e menores simultaneamente, foram consideradas apenas as primeiras, já que apresenta maior implicação sobre a fertilização. Quando ocorreram várias alterações da cabeça, foi considerada cabeça degenerada; quando ocorreram várias alterações na peça intermediária, foi considerada peça intermediária degenerada; e quando ocorreram várias alterações da cauda, foram consideradas, em ordem: cauda degenerada, cauda fraturada, cauda dobrada e cauda enrolada.

4.6 Capacidade de fertilização do sêmen descongelado

Para verificar a taxa de fertilização, palhetas de sêmen de cada reprodutor criopreservado com DMSO foram descongeladas em temperatura 60°C por oito e doze segundos e ativadas em concentrações de 0,5% e 1% de NaHCO₃. O sêmen *in natura* desses machos foi utilizado para fertilização de ovócitos a fim de se estabelecer um controle para o sêmen.

O experimento foi realizado no início de janeiro de 2008. O sêmen de cada reprodutor foi descongelado em temperatura de 60°C por oito e doze segundos e ativado com 10mL de solução ativadora de bicarbonato de sódio (NaHCO₃) em concentrações de 0,5% e 1%. Uma alíquota de

100µl do sêmen descongelado foi misturada a 0,1 g de ovócitos (aproximadamente 130 ovócitos), retirados de uma fêmea com peso corporal de 1.650 g. O procedimento (pré-incubação) durou aproximadamente dois minutos e envolveu delicada agitação da mistura sêmen-ovócito, sendo aclimatado gradualmente à temperatura da água de incubação. Os ovos foram então transferidos para incubadoras experimentais de cano de PVC teladas no fundo em três repetições. A temperatura da água para incubação dos ovos foi em torno de 26°C e a taxa de fertilização foi verificada oito horas após o início de incubação. Em cada incubadora foram contados 100 ovos em estereoscópico binocular, contando-se os números de embriões viáveis e ovos não fertilizados. Foi considerada a taxa de fertilização média entre cada amostragem, segundo a fórmula:

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

Em que:

E = número de embriões viáveis;

i = número de ovos não fertilizados.

4.7 Análises para verificar proteínas nos espermatozóides de curimba

4.7.1 Extração da proteína do sêmen de curimba

Este experimento foi realizado em outubro de 2008, no Laboratório de Fisiologia e Farmacologia do Departamento de Medicina Veterinária da UFLA. Duas amostras de sêmen de diferentes reprodutores de curimba criopreservado com DMSO e metanol foram mantidas congeladas por um tempo de aproximadamente dez meses. Após esse

prazo, amostras foram descongeladas em temperatura de 40°C por um tempo de oito segundos.

Uma alíquota de sêmen foi depositada em lâmina histológica e homogenizada com 40µl de água destilada para verificar a taxa e duração da motilidade espermática. Concentração de 7×10^6 células espermáticas de sêmen contendo os diferentes crioprotetores foi depositada em dois tubos de *ependorfs*. A primeira amostra foi ativada com água em uma proporção 1:20 (sêmen: água) e outra amostra não foi ativada. As amostras foram, posteriormente, centrifugadas em 600 r.p.m. durante cinco minutos em temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e depositado em solução de tampão de Lise. (50mM Tris-HCl [pH 7.4], 1% NP-40, 0.25% Deoxicolato de sódio, 150mM NaCl, 1 mM de EDTA, 1 mM PMSF, 1 µg/µl de leupeptina, 1 mM Na₃VO₄ e 1 mM NaF) para promover lise celular e liberação das proteínas. Essa suspensão foi, então, centrifugada em 1300 r.p.m. durante 10 minutos em temperatura ambiente. Após o término da centrifugação, o extrato protéico foi então retirado e transferido em tubos de *ependorfs* e mantido em temperatura de -70°C.

A descrição dos componentes do tampão de Lises pode ser vista a seguir:

- Tris: tampão neutralizador de pH;
- NP-40: surfactante (detergente), cuja função é solubilizar a membrana;
- Deoxicolato de sódio: detergente iônico cuja função é tornar lipídios e proteínas solúveis em água;
- NaCl: sua função é manter a osmolaridade do meio;
- EDTA: anticoagulante;

- PMSF: inibidor de proteases;
- Leupeptina: inibidor de proteases lisossomos;
- Na_3VO_4 : sua função é inibir tirosina fosfatase;
- NaF: sua função é inibir a serina e a trioninafosfatase.

4.7.2 Eletroforese e análise do *Western Blot*

As análises foram realizadas em novembro de 2008, no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Nacional de Rosário, município de Rosário, Argentina.

A separação das proteínas constou de 13% *SDS-Page* para extração de proteínas e 12,5% *SDS Page* para verificar as listras de proteínas. Para determinar a presença de proteínas foi utilizado o corante *Comassie Blue*. As condições de corrida foram 15mA/gel por 15 minutos e 30mA/gel por 60 minutos. As proteínas separadas por *SDS Page* foram transferidas para membrana de nitrocelulose e incubada com anticorpos comerciais monoclonais (4G10) Serina e Treonina Fosfatase em diluição 1:2000 e anticorpos comerciais policlonais PKA Tironina Fosfatase em diluição de 1:1000.

Foi utilizado o corante roxo *Ponceau* para verificar a concentração de proteínas e marcadores de proteínas para determinar o peso e o tamanho das bandas.

4.8 Análise estatística

4.8.1 Análise da taxa e duração da motilidade espermática do sêmen de curimba descongelado

Este experimento foi conduzido em delineamento em blocos casualizados (DBC), em esquema fatorial 2 x 2 x 2 x 4 (dois crioprotetores, duas temperaturas, dois tempos e quatro concentrações de ativadores) com 11 repetições, sendo o bloco formado pelo animal. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias obtidas com as concentrações de ativadores, submetidas à análise de regressão. Para atingir a normalidade, os dados foram transformados pela opção: raiz quadrada de $x + 0,5$. Foi assumida, então, uma distribuição normal para as variáveis analisadas, sendo o modelo:

$$y_{ijklm} = \mu + C_i + N_j + T_k + A_l + (CN)_{ij} + (CT)_{ik} + (CA)_{il} + (NT)_{jk} + (NA)_{jl} + (TA)_{kl} + B_m + (CNTA)_{ijkl}$$

em que:

Y_{ijklm} é a observação obtida para o sêmen diluído pelo crioprotetor i , na temperatura j , no tempo k e do ativador l , no bloco m ;

μ é a constante associada a cada observação;

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

N_j é o efeito da temperatura, sendo $j = 1,2$;

T_k é o efeito do tempo k , sendo $k = 1,2$;

A_l é o efeito do ativador, sendo $l = 1,2,3,4$;

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

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

$(CT)_{ik}$ é o efeito da interação entre o crioprotetor i e o tempo K;

$(CA)_{il}$ é o efeito da interação entre a temperatura j e do ativador l;

$(NT)_{jk}$ é o efeito da interação entre a temperatura j e o tempo k;

$(NA)_{jl}$ é o efeito da interação entre a temperatura e o ativador;

$(TA)_{kl}$ é o efeito da interação entre o tempo k e o ativador l;

$(CNTA)_{ijkl}$ é o efeito da interação entre o crioprotetor i, a temperatura j, o tempo k e o ativador l;

e_{ijklm} é o erro associado a cada observação, considerando normal e independentemente distribuído com média 0 e variância σ^2 ;

4.8.2 Análise da morfologia espermática do sêmen de curimba *in natura* e descongelado

A análise de morfologia espermática foi submetida à análise não paramétrica, visto que os dados não atingiram a normalidade mesmo após a transformação. Neste caso, as médias foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis quando houve significância ao teste qui-quadrado ($P < 0,05$).

4.8.3 Análise da capacidade de fertilização do sêmen descongelado

A análise da capacidade fertilizante do sêmen descongelado foi conduzida em delineamento inteiramente casualizado (DIC). Os tratamentos foram dispostos em estrutura fatorial 2 x 2 x 2 (temperaturas, tempos e concentrações de ativadores). Foi realizado o teste t para amostras de variâncias homogêneas com probabilidade de erro de 5%.

O modelo estatístico utilizado foi o seguinte:

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

em que:

y_{ijk} é a taxa de fertilização obtida para o sêmen diluído pela temperatura;

i , no tempo j e acrescido do ativador k ;

μ é a constante associada a cada observação;

C_i é o efeito da temperatura i , sendo $i = 1, 2$;

N_j é o efeito do tempo j , sendo $j = 1, 2$;

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

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

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

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

$(CNA)_{ijk}$ é o efeito da interação entre a temperatura i , o tempo j e o

ativador k ;

e_{ijk} é o erro associado à taxa de fertilização obtida para o sêmen diluído pela temperatura i , no tempo j e acrescido do ativador k , considerado normal e independentemente distribuído com média 0 e variância σ^2 .

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação do sêmen *in natura*

O peso corporal, a concentração espermática e a taxa e duração em segundos da motilidade espermática estão apresentados na Tabela 3.

TABELA 3 Peso corporal, concentração espermática (sptz x 10⁹ mL de sêmen), taxa e duração da motilidade espermática (segundos) do sêmen *in natura* de curimba (*Prochilodus lineatus*).

Animal	Peso (kg)	Sptz x 10 ⁹ mL	Motilidade(s)	Motilidade (%)
1	2,0	24,0	79	100
2	1,0	24,0	48	100
3	1,3	24,0	49	100
4	0,9	24,5	41	100
5	1,0	15,0	41	100
6	1,3	21,2	38	95
7	0,7	20,0	59	100
8	1,0	12,5	59	100
9	0,7	23,0	60	80
10	0,8	20,0	59	100
11	0,8	24,0	56	90
12	0,5	11,5	76	80
Médias	0,96	20,3	56,7	95,4

Pode-se verificar que a concentração de curimba nesse presente estudo foi de $11,5 \pm 24$ sptz x 10⁹mL. Esses dados estão de acordo com Godinho (2007), que relata que a concentração espermática de curimba varia entre 13,3 e 20,5 sptz x 10⁹sptz/mL, e com outros autores, que ao

avaliarem a concentração espermática do sêmen de curimba, obtiveram resultados semelhantes: Cruz (2001), $20,3 \pm 0,13 \times 10^9$ spz/mL, Órfão (2006) e Viveiros et al. (2008), $\pm 18,3 \times 10^9$ spz/ mL e $12,9 \times 10^9 \pm 16,8 \times 10^9$ spz/mL, respectivamente, e Nascimento (2008), que obteve médias de $19,2 \times 10^9$.

No presente trabalho essa variação da concentração espermática pode ter sido influenciada pelo período das coletas do sêmen, que foram realizadas nos meses de novembro, dezembro e janeiro. Segundo Silva (2007), a concentração espermática em peixes de piracema é influenciada pelo período de reprodução, uma vez que, no fim da reprodução (fim de janeiro) ela aumenta. Pode-se observar que o peso corporal dos reprodutores não foi um fator que influenciou na concentração espermática, pois os animais com peso mais elevados apresentaram baixa e altas concentrações de espermatozóides por mL.

5.2 Avaliação do sêmen descongelado

Os resultados obtidos com a taxa de motilidade (%) do sêmen criopreservado com DMSO e metanol acrescidos de BTS e descongelado encontram-se na Tabela 4.

TABELA 4 Taxa de motilidade (%) do sêmen descongelado, criopreservado com DMSO + BTS e Metanol + BTS¹ e descongelado em diferentes tempos (8 ou 12s), temperatura (40°C e 60°C) e concentrações de bicarbonato de sódio (0, 0,5%, 1% e 1,5%).

Crioprotetor	Taxa de motilidade ²
DMSO	59,2
Metanol	36,2
P	<0,0001
CV (%)	25,44

¹ Opção de transformação: $\sqrt{x+0,5}$,

Houve diferença ($P<0,05$) entre os crioprotetores utilizados, sendo o DMSO o que proporcionou as maiores taxas de motilidade do sêmen descongelado em relação ao metanol independentemente do tempo (8 ou 12 s), temperatura (40 ou 60° C) e concentrações de NaHCO_3 (0, 0,5, 1,0, e 1,5%)

A taxa de motilidade do sêmen descongelado ativado em concentrações de NaHCO_3 encontra-se na Tabela 5.

Houve regressão quadrática ($P<0,01$) das concentrações de bicarbonato de sódio sobre a motilidade espermática (Tabela 5), cuja maior taxa foi obtida com 0,74% do ativador (Figura 2), independentemente do crioprotetor (DMSO ou metanol), tempo (8 s ou 12 s) e temperatura de descongelamento (40° C ou 60° C).

TABELA 5 Taxa de motilidade (%) do sêmen descongelado de curimba (*Prochilodus lineatus*) ativado em diferentes concentrações de NaHCO₃¹

NaHCO ₃ (%)	Taxa de motilidade ²
0,0	36,47
0,5	58,97
1,0	60,85
1,5	34,65
P	<0,0001
CV (%)	25,44

¹ Opção de transformação: $\sqrt{x+0,5}$

² Regressão quadrática significativa (P<0,001)

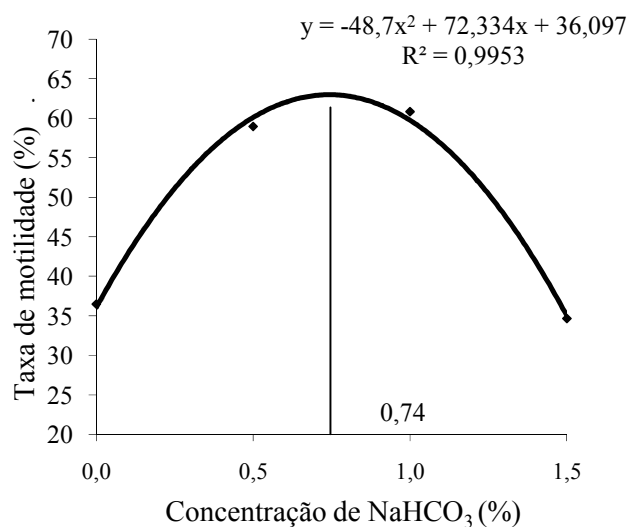


FIGURA 2 Taxa de motilidade do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) ativado em diferentes concentrações de NaHCO₃.

As taxas de motilidade do sêmen descongelado, considerando os tempos (8 e 12 s) e as temperaturas (40° C e 60° C), encontram-se na Tabela 6. Houve diferença (P<0,05) entre as temperaturas e os tempos de descongelamento do sêmen. A temperatura de 40°C e o tempo de oito segundos proporcionaram as maiores taxas de motilidade independentes entre si em relação à temperatura de 60°C e o tempo de doze segundos, independentemente do crioprotetor (DMSO ou metanol) e da concentração de NaHCO₃ como ativador.

TABELA 6 Taxa de motilidade do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) descongelado em diferentes tempos e temperaturas .

Tempo ²	Temperatura ¹		Média
	40°C	60°C	
8 s	60,8	47,78	54,29 a
12 s	54,55	27,84	41,20 b
Média	57,70 A	37,81 B	
P	<0,0252		
CV (%)	25,44		

¹ Opção de transformação: $\sqrt{x+0,5}$

² Médias seguidas de diferentes letras maiúsculas na linha e minúsculas na coluna diferem pelo teste F (P<0,05). s - segundos

Ao se analisar a duração da motilidade (Tabela 7), houve interação (P<0,05) entre o tempo e a temperatura. O sêmen descongelado em temperatura de 60°C em oito segundos proporcionou maiores durações na motilidade em relação ao sêmen descongelado na mesma temperatura em 12 segundos. Não houve diferença (P>0,05) entre os tempos de oito e 12

segundos quando o sêmen foi descongelado em temperatura de 40°C. Houve diferença ($P < 0,05$) entre as temperaturas quando 12 segundos de descongelamento foram utilizados para o descongelamento do sêmen, sendo a temperatura de 40°C a que proporcionou as maiores durações da motilidade. Não houve diferença ($P > 0,05$) entre as temperaturas quando se descongelou o sêmen em oito segundos.

TABELA 7 Duração da motilidade do sêmen descongelado de curimba (*Prochilodus lineatus*) em diferentes temperaturas e tempos¹.

Tempo ¹	Temperatura ²		Médias
	40°C	60°C	
8 s	257,5	243,8 A	244,0
12 s	230,6 a	141,8 Bb	127,8
Média	250,6	186,2	
P	<0,0001		
CV (%)	37,48		

¹ Opção de transformação: $\sqrt{x+0,5}$

² Médias seguidas de diferentes letras maiúsculas na linha e minúsculas na coluna diferem pelo teste F ($P < 0,001$). s - segundos

Na Tabela 8 estão apresentados os efeitos do metanol e DMSO do sêmen descongelado em diferentes temperaturas e tempos. Houve efeito quadrático ($P > 0,05$) dos crioprotetores, sendo que o sêmen criopreservado com DMSO proporcionou as maiores durações da motilidade em relação ao metanol (Figura 3).

TABELA 8 Duração da motilidade, em segundos, do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) criopreservado com metanol e DMSO e ativado com diferentes concentrações de NaHCO_3 ¹.

NaHCO ₃ (%)	Crioprotetor		Médias
	Metanol ²	DMSO ²	
0	45,2	97,1	71,1 a
0,5	222,4	567	394,7 b
1	184,4	409,3	296,8 c
1,5	80,3	141,7	111,0 d
Média ³	133,1 b	303,8 a	
P	<0,0001		
CV (%)	37,48		

¹ Opção de transformação: $\sqrt{x+0,5}$

² Regressão quadrática significativa ($P < 0,01$)

³ Médias seguidas de diferentes letras diferem pelo teste F ($P < 0,05$)

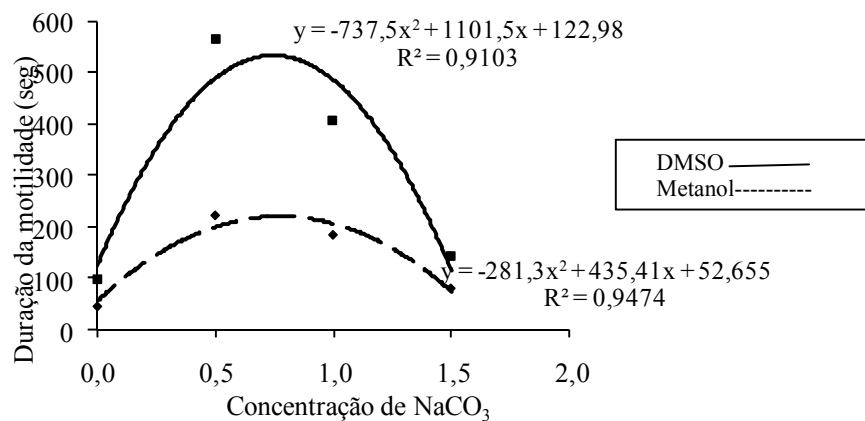


FIGURA 3 Duração da motilidade em segundos do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) criopreservado com metanol e DMSO e ativado com diferentes concentrações de NaHCO_3 .

Considerando a concentração de bicarbonato de sódio que proporcionou a maior ativação do sêmen neste trabalho (0,74%), o comportamento quadrático mostrou que, neste nível, as maiores durações da motilidade obtidas foram 534,2 segundos com o uso do DMSO e 220,8 com o metanol, evidenciando novamente que o DMSO foi mais eficiente na duração da motilidade do sêmen de curimba que o metanol. Essa melhor proteção atribuída ao DMSO pode ser explicada pela sua afinidade em interagir ou combinar com ácidos nucleicos, carboidratos, lipídios e proteínas, sem alterar de forma irreversível a configuração molecular (Sojka et al., 1990). Sua molécula é anfipática, com grande domínio polar, e a presença de dois grupos metil, apolares, resulta em solubilidade tanto em meio aquoso como em meio orgânico. Assim, o DMSO possui grande capacidade de penetrar com facilidade em membrana celular e intracelular (Brayton, 1986).

Geralmente, no descongelamento do sêmen de algumas espécies de piracema tem sido utilizada temperatura de banho-maria entre 26° e 60°C e tempo de imersão entre cinco e 14 segundos (Oliveira et al., 2007).

No descongelamento do sêmen de curimba, alguns autores têm utilizado a temperatura de 60°C, como Cruz (2001); Carolsfeld et al. (2003); Milliorini (2006); Murgas et al. (2007), Viveiros et al. (2008). Esses autores, no entanto não avaliaram a temperatura e tempo de descongelamento do sêmen. Medeiros et al. (2002) relatam que grande parte dos trabalhos em laboratórios têm sido úteis para verificar efeitos nocivos apontando sua origem, quer seja pela reformulação de protocolos ou para relatar novas abordagens para mitigar os efeitos prejudiciais do sêmen durante o processo de criopreservação.

No presente trabalho, a redução da motilidade espermática ocorrida quando se descongelou o sêmen em 60°C por 12 segundos, independentemente do crioprotetor utilizado, se deve, possivelmente, ao reagrupamento de grandes cristais de gelo na membrana, ocasionando efeitos deletérios nas células espermáticas.

Segundo Carolsfeld & Harvey (1999), células espermáticas que foram protegidas por um crioprotetor não tóxico a elas podem morrer se foram descongeladas muito rápidas ou muito lentamente.

Pode-se verificar que, na análise de regressão, o ponto máximo da taxa e duração da motilidade ocorreu com NaHCO₃ em concentração de 0,74%. Esse ativador é rotineiramente utilizado para ativar a motilidade espermática de algumas espécies de peixes. Alguns autores utilizaram esse ativador em concentrações de 0,5% e 1% para ativar o sêmen de curimba (Murgas et al., 2007; Viveiros et al., 2008).

Essa ativação da motilidade espermática proporcionada pelo NaHCO₃ ocorre devido a diferença de osmolaridade entre essa solução ativadora e o plasma seminal. No caso da curimba, o que se pode verificar é que a osmolaridade em torno de 180 mOsm/g⁻¹, que corresponde a 1,5% de NaHCO₃, dá início à motilidade espermática. Segundo Marian et al.(1993), a hiposmolaridade desencadeia mudanças na membrana e decréscimo de K⁺ e Ca²⁺. Possivelmente, 0,74% de NaHCO₃ devem modificar melhor a concentração intracelular desses solutos na membrana e proporcionar, assim, uma melhor ativação da motilidade espermática em relação às demais concentrações de NaHCO₃.

5.3 Avaliação da morfologia espermática

A taxa de anormalidades maiores do sêmen *in natura* foi de 3,77% e a taxa de anormalidades menores foi de 3,68%.

Houve interação ($P>0,05$) entre a temperatura e o crioprotetor. quando foram avaliados espermatozoides com anormalidades maiores descongelados em oito e 12 segundos. O sêmen criopreservado com metanol e descongelado em 60°C proporcionou maiores taxas de anormalidades quando comparado com DMSO em 60°C em ambos os tempos. O sêmen criopreservado com DMSO não apresentou diferença ($P>0,05$) quando foi descongelado em temperaturas de 40°C e 60° C e ambos os crioprotetores não diferiram ($P<0,05$) quando o sêmen foi descongelado em 40°C (Tabela 9).

TABELA 9 Porcentagem do número de espermatozoides de curimba (*Prochilodus lineatus*) com anormalidades maiores descongelados em oito e doze segundos.

Crioprotetor ¹	Temperatura °C		Média
	40	60	
Metanol	16,37b	27,55 Aa	21,96
DMSO	14,48	17,93 B	16,25
Média	15,47	22,74	
P	<0,0001		

¹ Médias seguidas por diferentes letras maiúsculas na coluna e minúsculas na linha diferem pelo teste de Kruskal-Wallis ($P<0,01$)

Os resultados de porcentagem do número de espermatozóides com anormalidades maiores descongelados em temperatura de 60°C e 40°C encontram-se nas Tabelas 10 e 11, respectivamente.

Quando o sêmen foi descongelado em temperatura de 60°C, o DMSO proporcionou baixas ($P < 0,01$) taxas de anormalidades, maiores no descongelamento em oito e 12 segundos, em relação ao metanol nos mesmos tempos de descongelamento. Porém, não houve diferença ($P > 0,05$) entre os crioprotetores quando o sêmen foi descongelado em temperatura de 40°C.

TABELA 10 Porcentagem do número de espermatozóides de curimba (*Prochilodus lineatus*) com anormalidades maiores descongelados em temperatura de 60°C.

Crioprotetor ¹	Tempo (segundos)		Média
	8 s	12 s	
Metanol	24,86	29,22	27,04 A
DMSO	15,86	18,54	17,20 B
Média	20,36	23,88	
P	<0,0001		

¹ Médias seguidas por diferentes letras maiúsculas diferem pelo teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,01$)

TABELA 11 Porcentagem do número de espermatozóides de curimba (*Prochilodus lineatus*) com anormalidades maiores descongelados em temperatura de 40°C.

Crioprotetor ¹	Tempo (segundos)		Média
	8	12	
Metanol	16	16,77	16,38
DMSO	13,5	15,27	14,38
Média	14,37	16,02	
P	>0,05		

¹ Não significativo ao teste de qui-quadrado (P>0,05)

Não houve diferença (P<0,05) entre os crioprotetores, tempos e temperaturas de descongelamento quando foram avaliados espermatozóides com anormalidades menores (Tabela 12 e 13).

TABELA 12 Porcentagem do número de espermatozóides de curimba (*Prochilodus lineatus*) com anormalidades menores.

Crioprotetor	Tempo (segundos)		Média
	8	12	
Metanol	18,09	15,95	17,02
DMSO	11,45	11,86	11,66
Média	14,77	13,91	
P =	0,8144		

¹ Não significativo ao teste de qui-quadrado (P>0,05)

TABELA 13 Porcentagem do número de espermatozóides de curimba (*Prochilodus lineatus*) com anormalidades menores.

Crioprotetor	Temperatura °C		Média
	60	40	
Metanol	16,02	18,5	17,67
DMSO	11,88	13,65	13,06
Média	13,26	15,26	
P =	0,8144		

¹ Não significativo ao teste de qui-quadrado ($P > 0,05$)

Quanto às anormalidades maiores e menores, as Figuras 4, 5, 6 e 7 mostram que, independentemente do tempo, da temperatura e do crioprotetor, as maiores ocorrências de anormalidades foram da cauda em relação à cabeça. Na Figura 8 podem-se verificar anormalidades do sêmen *in natura*, no qual também foram evidenciados maiores índices de anormalidades da cauda em relação à cabeça.

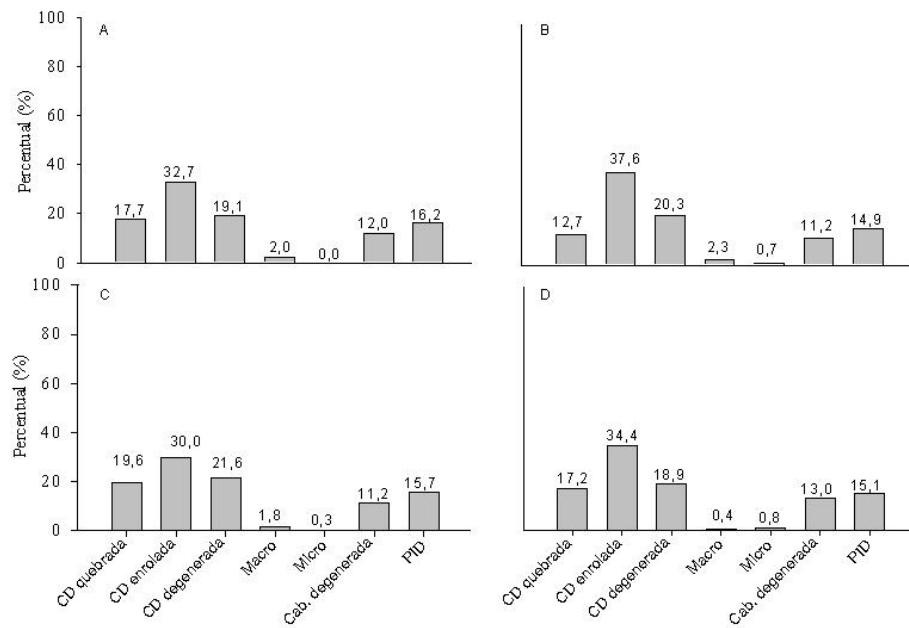


FIGURA 4 Taxa de anormalidades maiores do sêmen criopreservado com metanol e descongelado nas diferentes temperaturas e tempos. A - Metanol, 8 s e 60° C; B - metanol, 12 s e 60° C; C - metanol, 8 s. e 40° C; D - metanol, 12 s. e 40° C. CD - Cauda, Macro - Macrocefalia, Micro - microcefalia, PID - Peça intermediária degenerada.

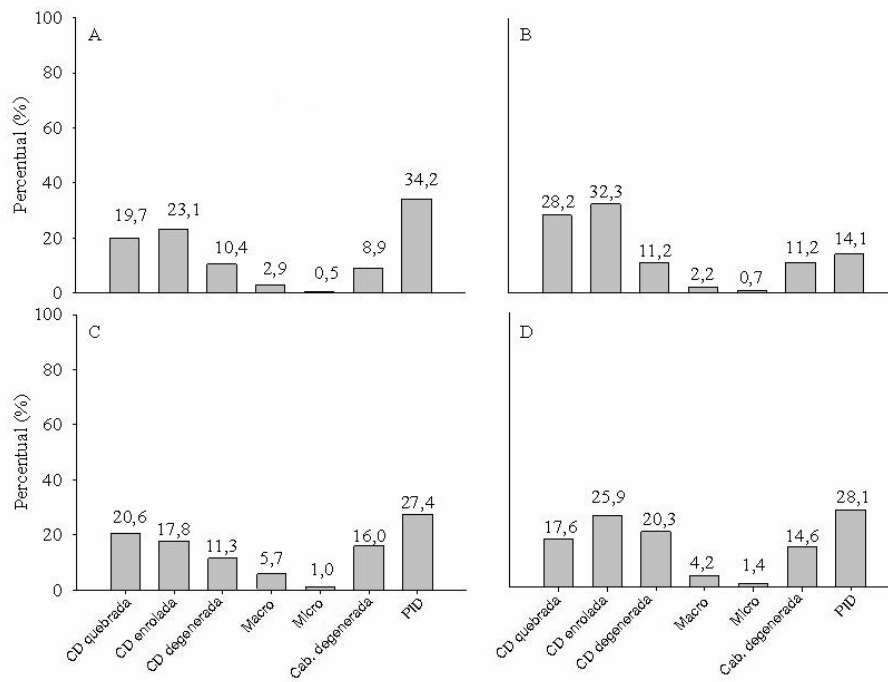


FIGURA 5 Taxa de anormalidades maiores do sêmen criopreservado com DMSO e descongelado nas diferentes temperaturas e tempos A - DMSO, 12 s e 40° C; B - DMSO, 12 s e 60° C; C - DMSO, 8 s e 40° C; D - DMSO, 8 s e 60° C. CD - Cauda, Macro - Macrocefalia, Micro - microcefalia, PID - Peça intermediária degenerada.

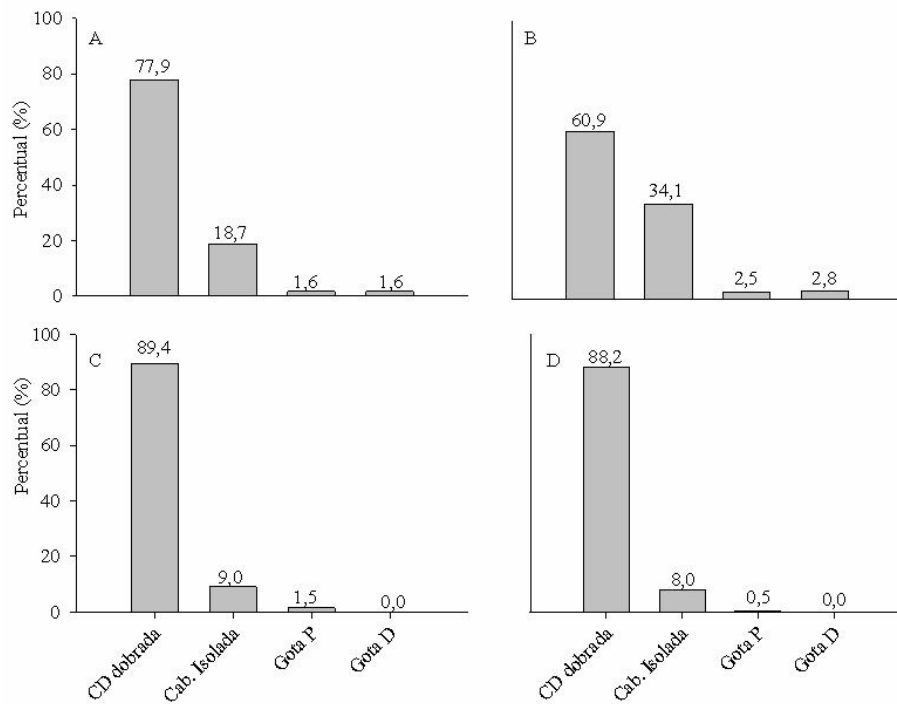


FIGURA 6 Taxa de anormalidades menores do sêmen criopreservado com metanol e descongelado nas diferentes temperaturas e tempos A - metanol, 8 s e 60° C; B - metanol, 12 s e 60° C; C - metanol, 8 s. e 40° C; D - metanol, 12 s e 40° C. CD - cauda, P - proximal, D - distal.

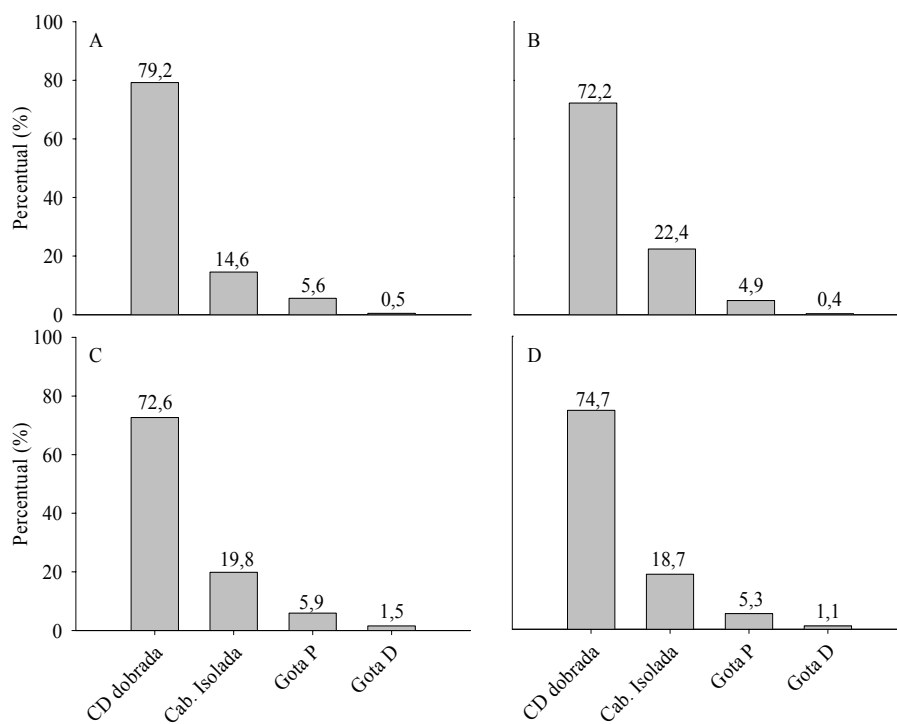


FIGURA 7 Taxa de anormalidades menores do sêmen criopreservado com DMSO e descongelado nas diferentes temperaturas e tempos. A - DMSO, 12 s e 40° C; B - DMSO, 12 s e 60° C; C - DMSO, 8 s e 40° C; D - DMSO, 8 s e 60° C. CD cauda, P proximal, D distal

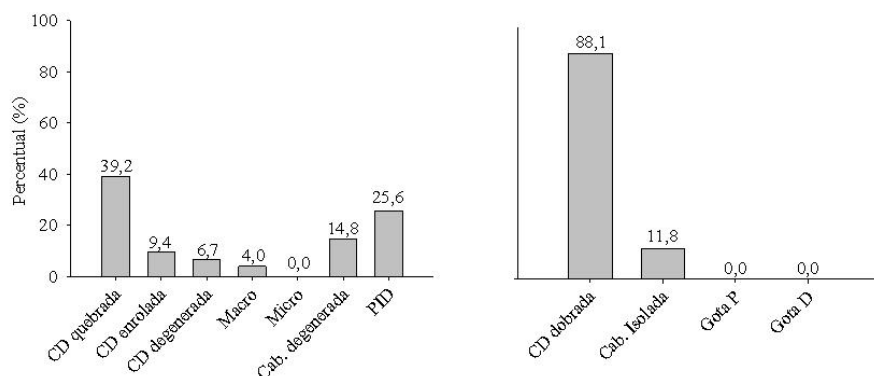


FIGURA 8 Taxa de Anormalidades maiores e menores do sêmen *in natura*. CD - cauda, Macro - macrocefalia, Micro - microcefalia, P - proximal, D - distal.

No presente trabalho, as anormalidades morfológicas do sêmen *in natura* foram de 3%, semelhantes às observadas por Milliorini (2006) quando avaliou o sêmen da mesma espécie.

Pode-se verificar que existe uma relação entre o crioprotetor utilizado no congelamento e a temperatura de descongelamento, o que foi evidenciado quando o sêmen foi criopreservado com metanol e descongelado em temperatura de 60°C. Neste caso, houve elevadas taxas de anormalidades maiores quando comparadas como sêmen criopreservado com DMSO, além de haver interferência na baixa taxa e duração da motilidade espermática. Milliorini (2006) também observou que o DMSO reduziu a ocorrência de anormalidades maiores. Segundo Harvery (1983), o metanol é considerado um dos crioprotetores que melhor penetra a membrana, mas é considerado tóxico para o sêmen de algumas espécies. Neste trabalho, o metanol proporcionou efeitos

inferiores nas células espermáticas se comparados com os efeitos do DMSO.

As coletas do sêmen foram realizadas em novembro e dezembro, mas isso não deve ter influenciado no aparecimento de anormalidades maiores, uma vez que Silva (2007) não observou diferenças significativas quando avaliou o sêmen de curimba coletado nos diferentes períodos de reprodução

No presente trabalho pode-se verificar que a manipulação do sêmen durante o processo de análise morfológica pode contribuir para a ocorrência de alterações morfológicas da cabeça e da cauda. Essas anormalidades possivelmente surgiram quando se retirou o sêmen da palheta, na agitação da mistura com a solução fixadora ou na própria manipulação do sêmen no momento da preparação da lâmina para análise morfológica. Neste sentido, os protocolos estabelecidos para o descongelamento (tempo e temperatura) não influenciaram estas variáveis. As demais anormalidades devem ter ocorrido na fase da espermatogênese, porém não influenciaram nos resultados, uma vez que se isolou o efeito dos animais durante a análise estatística. De acordo com Herman et al. (1994), patologias maiores estão relacionadas aos procedimentos de manejo durante a coleta do sêmen e a confecção de lâminas para avaliar as anormalidades.

Segundo Hafez (2004), em mamíferos, as gotas citoplasmáticas surgem na transição da espermátide para espermatozóide. Neste trabalho foram evidenciados baixos índices, sugerindo, portanto, que o congelamento e o descongelamento não são causas dessas anormalidades.

5.4 Capacidade de fertilização do sêmen congelado

Não houve diferença ($P < 0,05$) na taxa de fertilização feita com sêmen descongelado em 60°C por oito segundos e ativado com NaHCO_3 0,5% ou 1% (Tabela 15).

TABELA 14 Taxa de fertilização do criopreservado com DMSO e descongelado em 60°C por oito segundos, ativado com 0,5% e 1% de bicarbonato de sódio (NaHCO_3).

NaHCO_3 (%)	Fertilização (%)
0,5	47,79
1	52,94
Média	50,36
P	$>0,05$

[†] Não significativo ao teste t ($P > 0,05$)

Na fêmea utilizada para a fertilização do sêmen *in natura* observou-se uma taxa de fertilização de 60%. Neste trabalho, a fertilização foi de 0% quando se descongelou o sêmen em 60°C por 12 s; e ao se avaliarem essa temperatura e tempo, verificou-se que esse tratamento proporcionou as menores taxas e duração da motilidade.

Segundo Lanhsteiner (1998), a taxa de motilidade e a velocidade espermática estão correlacionadas, e a redução nesses parâmetros reduz a fecundidade. Isso sugere que tempos elevados de descongelamento interferem na capacidade natatório dos espermatozoides ou, até mesmo, na morte de algumas células espermáticas.

Segundo Silva (2007), a taxa de fertilidade é um parâmetro reprodutivo influenciado por fatores alheios, combinados ou não a

qualidades dos gametas. Portanto, sua análise é dependente da homogeneidade das condições no momento da fertilização. Apesar de fatores externos influenciarem na taxa de fertilização, esses não influenciaram na diferença da taxa de fertilização em ambos os tratamentos, uma vez que os tratamentos de 60° C em tempos de oito e 12 segundos estavam sob as mesmas condições experimentais.

Milliorini (2006) obteve médias de taxas de fertilização de 25,4% do sêmen de curimba criopreservado em concentração de 10% de DMSO quando o descongelou em temperatura de 60° por oito segundos. Esse tempo e temperatura de descongelamento até então vem sendo o protocolo utilizado para descongelar o sêmen de curimba; portanto, a temperatura de 60°C foi utilizada no presente estudo para averiguar a qualidade do sêmen.

Possivelmente, épocas de reprodução podem ser um fator decisivo no índice de fertilização, uma vez que a proporção de ovócitos não mais se encontra favorável durante o fim da reprodução. Isso pôde ser evidenciado na desfavorável taxa de fertilização (9%) quando se utilizou o descongelamento em 40°C, no período de fevereiro de 2008 (dados não publicados).

A quantidade de ovócito:sêmen e o volume do ativador possivelmente não devem ter interferido na baixa taxa de fertilização em 60°C por 12s, pois foi utilizado o mesmo protocolo para a relação sêmen: ovócito e volume do ativador nos tratamentos. Shimoda et al. (2007) relatam que a obtenção da quantidade de espermatozóides para fertilizar uma determinada massa de ovócitos evita a utilização de menos volume de sêmen que o necessário, o que poderia implicar em menos percentuais

de fertilização. Felizardo (2008) não obteve diferenças quando utilizou diferentes volumes de água na ativação do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyana*) para fertilização.

Possivelmente o tempo de 12 segundos de descongelamento deve ter alterado as características seminais, resultando na desfavorável taxa de fertilização.

5.5 Extração de proteínas e análise de *Western Blot*

O sêmen descongelado para a análise de proteína apresentou taxas de motilidade de 60% para o sêmen criopreservado com DMSO e 45% para o sêmen criopreservado com metanol; a duração em ambos os tratamentos foi de 2 minutos. Em um dos animais foi possível observar uma variação da concentração protéica quando comparada com proteínas de espermatozoides de bovinos.

A disposição das bandas de proteínas através da análise de *Western Blot* pode ser visualizada na Figura 9. Verificaram-se quantidades diferenciadas de proteínas em cada tratamento com o auxílio da coloração roxo *ponceau*. Nas amostras de DMSO e metanol contendo o anticorpo tirosina fosfatase não ocorreu presença de bandas diferentes, mas bandas diferentes podem ser vistas nos sêmens ativado e não ativado, pois em ambos ocorreram bandas de 110 KDa. Na amostra contendo serina e treonina fosfatase podem ser observadas bandas de 60 KDa no sêmen criopreservado com DMSO ativado e não ativado, porém sendo mais intenso no sêmen ativado. No tratamento com metanol, foi vista uma banda com mesmo peso molecular, possivelmente a mesma observada na

amostra de DMSO. No sêmen não ativado, podem-se observar três bandas de maior peso molecular, não observadas no sêmen ativado.

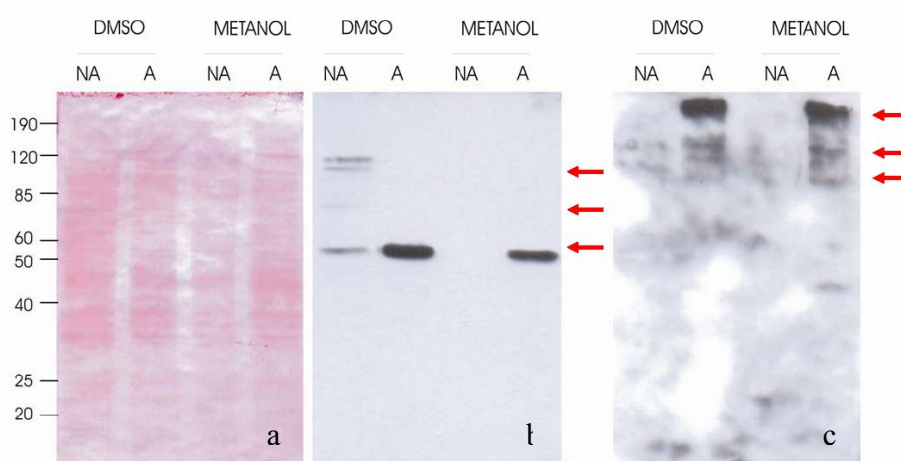


FIGURA 9 Análise de *Western Blot* utilizando coloração roxo de *Ponceau* e os anticorpos serina e treonina fosfatase e tironina fosfatase. DMSO: dimetilsulfóxido, A - sêmen ativado, NA - sêmen não ativado, a - roxo *Ponceau*, b - serina e treonina fosfatase, c - tirosina fosfatase.

A pressão osmótica é o estímulo que desencadeia a motilidade espermática. No caso de peixes de água doce a hiposmolaridade dão início á essa motilidade (Cosson, 2004). Neste trabalho os espermatozóides congelados há dez meses tiveram aceitáveis taxas e durações da motilidade, quando foram ativados com água destilada.

A análise de *Western Blot* sugere que existe diferenciação de proteínas nos espermatozóides após entrarem em contato com água ou qualquer meio aquoso.

Zilli et al. (2008), em experimentos para identificar proteínas em sêmen de *Sparus aurata* e *Lithognathus mormyrus*, espécies marinhas, observaram proteínas de 174 KDa e 147 KDa no sêmen ativado utilizando anticorpos serina e treonina fosfatase. Esses mesmos autores relatam que, em *Sparus aurata*, encontram-se proteínas de 33 KDa após a ativação. Entretanto, relatam que a função destas proteínas na ativação da motilidade está incerta. No presente trabalho, foram obtidas três bandas de 110 KDa no sêmen ativado utilizando o anticorpo tirosina e uma banda de 60 KDa utilizando os anticorpos serina e treonina fosfatase. Pode-se verificar semelhança na presença de proteínas no presente trabalho e no trabalho utilizando essas espécies marinhas. Payaningal et al. (2004) identificaram proteínas de 55 KDa (glicogênio sintase quinase) que estiveram envolvidas no início da motilidade espermática em mamíferos.

No presente trabalho não foram identificadas as proteínas, porém pode-se sugerir que, possivelmente, ocorrem proteínas que estão envolvidas na iniciação da motilidade espermática e essas mesmas proteínas podem estar inativas quando os espermatozoides encontram-se imóveis. Isso sugere que estudos futuros sejam feitos para identificar os tipos de proteínas presentes nos espermatozoides de espécies de peixes de piracema, pois a identificação dessas proteínas pode auxiliar na criopreservação de gametas e no melhor conhecimento da influência dessas proteínas na motilidade espermática.

7 CONCLUSÕES

- O sêmen de Curimba (*Prochilodus lineatus*) pode ser criopreservado em DMSO em concentração de 10% acrescido de 5% de BTS se descongelado em temperatura de 40° por oito segundos;
- NaHCO_3 em concentrações de 0,74% é favorável para ativar a motilidade do sêmen de curimba após o congelamento;
- Existe um padrão de fosforilação de proteínas nos espermatozóides de curimba quando ativado e não ativado.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAVI, S. M. H., COSSON, J. Sperm motility in fishes. Effects of ions and osmality: a review. **Cell Biology International**, London, v. 30, n.1, p.1-14, Jan. 2006.

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

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

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

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

BISHOP, A. C.; BUZKO, O.; SHOTAK, M. Magic bullets for protein Kinases **Trends cell Biol**, London, v. 11, n. 4, p. 167-172, Apr. 2001.

BRAYTON, C.F. Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. **Cornell Veterinarian**, Ithaca, v. 76, n. 1, p. 61-90, Jan. 1986.

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. J. **Conservação de recursos genéticos em peixes: teoria e prática**. Tradução de H. P. Godinho. Victória, Canadá: World Fisheries Trust, 1999. p. 47. (Curso de Treinamento Brasileiro).

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

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

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

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

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

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

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

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

CROWE, J. H.; CROWE, L. M.; CARPENTER, J. F. AURELLWISTROM, C. Stabilization of dryphospholipid bilayers and proteins by sugars. **Biochemistry Journal**, London, v. 242, p. 1-10, 1987.

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

CURI, S. M.; ARIAGNO, J. I.; CHENLO, P. H.; MENDELUK, G. R.; PUGLIESE, M. N.; SARDI-SEGOVIA, L. M.; REPETTO, H. E.; BLANCO, A. M. Asthenozoospermia: analysis of a large population. **Archives of Andrology**, Philadelphia, v. 49, n. 5 p. 343-349, Sept./Oct. 2003.

CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALOSSO, D. M.; CASTAGNOLLI, N. **Tópicos especiais em Piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática/Tec/Art, 2004. 533 p.

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

FELIZARDO, V. O. **Manejo reprodutivo de piracanjuba (*Brycon orbnyanus*)**: congelamento de sêmen e taxa de fertilidade. 2008. 84 p. Dissertação (Mestrado em Veterinária) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

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

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

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

GOULDING, M. **The fishes na the forest:** explorations in Amazonian natural history. Los Angeles: BerKley, 1980. 280 p.

GRANJEIRO, J. M. **Purificação e caracterização da Fosfatase ácida em rim bovino.** 1994. 80 p. Dissertação (Mestrado em Biologia celular e estrutural) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

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

HAMMERSTED, R. H., GRAHAM, J. K. Cryopreservation of poltry sperm: the enigma of glicerol. **Cryobiology**, San Diego, v. 29, n. 1, p. 26-28, 1992.

HARRISON, S.; PAGE, C. P.; SPINA, D. Airway neves and protein. **General Pharmacology**, Oxford, v. 32, n. 3, p. 287-298, Mar. 1999.

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

HERMAN, H. A; MITCHELL, J. R.; DOAK, G. A. **The artificial insemination and embryo transfer of diary and beef cattle.** 8. ed. Illinois: Interstate Publishers, 1994. 392 p.

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

IZUMI, H.; MARIAN, T.; INABA, K. O. K. Y.; MORISAWA, M. Membrane hyperpolarization by sperm activating and attracting factor increases cAMP level and activates sperm motility in the ascidian *Ciona intestinales*. **Developmental Biology**, New York, v. 213, n. 2, p. 246-256, Sept. 1999.

JACOB, S. W. Herschler R. Introductory remarks: dimethyl sulfoxide after twenty years. **Annals of Academy Science of the New York**, New York, n. 401, p. 13-17, 1983.

JAMIESON, B. G. M.; LEUNG, L. K. P. Introduction to fish spermatozoa and the micropyle. In: JAMIESON, B. G. M. (Ed.). **Fish evolution and**

systematics: evidence from spermatozoa. Cambridge: Cambridge University, 1991. cap.5, p. 56-72.

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

JOBIM, M. I. M.; OBERST, E. R.; SALBEGO, C. G.; SOUZA, D. O.; WALD, V. B.; TRAMONTINA, F.; MATTOS, R. C. Two-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with the freezability. **Theriogenology**, London, v. 61, p. 255-266, 2004.

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

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

LANHNSTEINER, F.; BERGER, B. WEISMAN, T., PATZNER, R. A. Determination of semen quality of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by sperm motility, seminal plasma parameters and spermatozoa metabolism. **Aquaculture**, Amsterdam, n. 163, p. 81, 1998.

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

LEUNG, L. K. P. 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.

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

LEWIN, B. **Genes** . 7. ed. Porto Alegre: Artemed, 2001. 955 p.

LINHART, O.; BILLARD, R.; PROTEAU, J. P. Criopreservação de European catfish (*Silurus glanis*.) spermatozoa. **Aquaculture**, Amsterdam, v.115, n. 3/4, p. 347-359, 1993.

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

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

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

MARIAN, T.; KRASZNAI, Z.; BALKAY, L.; BALAZS, M.; EMRI, M.; BENE, L., ANDTRON, L. Hypo-osmotic shock induces na osmolality dependent permeabilisation and structural changes in the membrane of carp sperm. **Journal of Histochemistry Cytochemistry**, New York, v. 41, p. 291-297, Jan. 1993.

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

MEDEIROS, C. M. O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A. T. D.; RODRIGUES, J. L. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, Woburn, v. 57, n. 1, p. 327-344, Jan. 2002.

MILLIORINI, A. B. **Ativadores e concentrações de metanol e dimetilsulfóxido na qualidade do sêmen criopreservado de Curimba**

(Prochilodus lineatus). 2006. 99 p. Dissertação (Mestrado em veterinária) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

MORISAWA, M., SUSUKI, K., H., MORISAWA, S., YASUDA, K. Effects of osmolality and potassium on motility of spermatozoa from fresh water cyprinid fishes. **Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 107, n. 1 p. 95-103, 1983.

MOURA, A.; CHAPMAN, D. A.; KOC, H.; KILLIAN, G. J. A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, 2006.

MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A.; TAINURIER, D.; ANTON, M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by a easy method: cryoprotective effect on frozen –thawed bull semen. **Theriogenology**, New York, v. 57, n. 6, p. 1695 - 1706, Apr. 2002.

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

MURGAS, L. D. S.; FRANCISCATTO, R. T.; SANTOS, A. G. O. Avaliação espermática pós descongelamento de Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) Vallenciennes, 1849). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 32, n. 6, nov./dez. 2003.

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, 2004.

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

NASCIMENTO, A. F. **Motilidade espermática de sêmen de peixes criopreservado em diferentes meios avaliada por métodos subjetivo e computadorizado**. 2008. 45 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

ODA, S.; MORISAWA, M. Rises of intracellular Ca^{2+} and pH mediate the initiation of sperm motility by hyperosmolality in marine teleosts. **Cell Motility and the Cytoskeleton**, New York, v. 25, n. 2, p. 171-178, 1993.

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

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

PAYANINGAL R. S.; SHANNAN, L. J.; VIJAYARAGHAVAN, S. Changes in sperm glycogen synthase kinase-3 serine phosphorylation and activity accompany motility initiation and stimulation. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 25, n. 4, p. 605–617, 2004.

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

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

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

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

RIBEIRO, R. I. M. A.; GODINHO, A. P. Criopreservação do sêmen testicular do teleósteo piau-açu (*Leoporinus macrocephalus*). **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 55, n. 1, p. 75-79, jan. 2003.

ROSENBAUM, E. E., HERSCHILER, R. J., JACOB, S. W. Dimethyl sulfoxide in musculoskeletal disorders. **Journal American Medical Association**, Chicago, v. 192, n. 4, p. 309-313, 1965.

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

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

SAYYED MOHAMMAD HADI ALAVI A, JACKY COSSON. Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: A review. **Cell Biology International**, London, v. 30, n. 1,p. 1-14, Jan. 2006.

SCHIMODA, E; ANDRADE, D. R.; VIDAL JUNIOR, M. V. V.; GODINHO, H. P.; YASUI, G. S. Determinação da razão ótima de espermatozoides por oócitos de pianha (*Brycon insignis*). **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 59, n. 4. p. 877-882, 2007.

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

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

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

SMALL, B. C. Effect of dietary cortisol administration on growth and reproductive success of channel catfish. **Journal Fish Biology**, Oxford, v. 64, n. 3, p. 589 -596, Mar. 2004.

SOJKA, E. J., KIMMICK, S. V. B., CARISON, G. P. et al. Dimethyl sulfoxide update: new applications and dosing methods. **Proceedings American Associations Equine Practics**, New York, v. 36, p. 683 - 690, 1990.

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

SUQUET, M.; BILLARD, R., COSSON, J.; NORMANT, Y.; FAUVEL, C. Artificial insemination in tubot (*Scophthalmus maximus*) determination of the optimal sperm to egg ratio and time of gamete contact. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 133, n. 1, p. 83-90, May 1995.

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

TAKAGI, M.; BOEDIONO, A.; SAHA, S. SUZUKI, T. Survival rate of frozen-thawed bovine IVF embryos in relation to exposure time using various cryoprotectants. **Cryobiology**, San Diego, v. 30, n. 5, p. 306-312, Oct. 1993.

VISCONTI, P. E.; KOPF, G. S. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. **Biology Reproduction**, Madison, v. 59, n. 1, p. 1-6, July 1998.

VIVEIROS, A. T. M.; GODINHO, H. P. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species a review. **Fish Physiology Biochemistry**, Amsterdam, v. 35, n.1, p.137-150, Mar. 2009

VIVEIROS, A. T. M.; ORFÃO, L. H.; MARIA, A. N.; ALLAMAN, I. B. A simple, inexpensive and successful freezing method for curimba (*Prochilodus lineatus*) (Characiformes) sêmen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 105, n. 3-4, p. 283-291, Mar. 2008.

WELCOME, R. L. **River fisheries**. California: FAO Fish, 1982. 330 p.

WILLIOT, P.; KOPEIKA, E. F.; GONCHARO, B. F. Influence of testis state, temperature and delay in sêmen collection on spermatozoa motility in the cultured Siberian sturgeon (*Acipenser baeri* Brandt). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 189, n.1/2, p. 53-61, Sept. 2000.

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

YILDIZ, C.; KAYA, A.; AKSOY, M.; TEKELI, T. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrossomal integrity of dog spermatozoa during freezing. **Theriogenology**, New York, v. 54, n. 4, p. 579 - 585, Sept. 2000.

ZILLI, L., SCHIAVONE, R., STORELLI, C.; VILELLA, S. Molecular mechanisms determining sperm motility initiation in two sparids (*Spartus aurata* and *Lithognathus mormyrus*). **Biology of Reproduction**, Madison, v. 79, n. 2, p. 356-366, Aug. 2008.

ANEXOS

- ANEXO 1 Tabela de análise de variância para taxa de motilidade (%) do sêmen de peixes criopreservado com DMSO ou metanol descongelados em diferentes tempos e temperaturas e ativados com diferentes concentrações de NaHCO_3 . 82
- ANEXO 2 Tabela de análise de variância para duração da motilidade (s) do sêmen de peixes criopreservado com DMSO ou metanol, descongelados em diferentes tempos e temperaturas e ativados com diferentes concentrações de NaHCO_3 . 83

Anexo 1 Tabela de análise de variância para taxa de motilidade (%) do sêmen de peixes criopreservado com DMSO ou metanol, descongelados em diferentes tempos e temperaturas e ativados com diferentes concentrações de bicarbonato de sódio.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
ANIMAL 0.0000		10	303.946139	30.394614	11.169
CRIOP 0.0000		1	291.862749	291.862749	107.251
TEMP 0.0000		1	297.099330	297.099330	109.175
TEMPO 0.0000		1	162.995169	162.995169	59.896
ATIVADOR 0.0000		3	356.375643	118.791881	43.652
CRIOP*TEMP 0.0921		1	7.769555	7.769555	2.855
CRIOP*TEMPO 0.4421		1	1.611768	1.611768	0.592
CRIOP*ATIVADOR 0.6927		3	3.958873	1.319624	0.485
TEMP*TEMPO 0.0000		1	68.876208	68.876208	25.310
TEMP*ATIVADOR 0.9401		3	1.104315	0.368105	0.135
TEMPO*ATIVADOR 0.7238		3	3.597418	1.199139	0.441
CRIOP*TEMP*TEMPO 0.8838		1	0.058227	0.058227	0.021
CRIOP*TEMP*ATIVADOR 0.6946		3	3.936851	1.312284	0.482
CRIOP*TEMPO*ATIVADOR 0.9741		3	0.627256	0.209085	0.077
TEMP*TEMPO*ATIVADOR 0.2179		3	12.143006	4.047669	1.487
CRIOP*TEMP*TEMPO*ATI 0.9795		3	0.540913	0.180304	0.066
erro		310	843.606344	2.721311	
CV (%) =		25.44			

Anexo 2 Tabela de análise de variância para duração da motilidade (s) do sêmen de peixes criopreservado com DMSO ou metanol, descongelados em diferentes tempos e temperaturas e ativados com diferentes concentrações de bicarbonato de sódio.

FV Pr>Fc	GL	SQ	QM	Fc
ANIMAL	10	3048.167596	304.816760	13.985
0.0000				
CRIOP	1	2660.662240	2660.662240	122.069
0.0000				
TEMP	1	570.243407	570.243407	26.162
0.0000				
TEMPO	1	865.965763	865.965763	39.730
0.0000				
ATIVADOR	3	7500.117976	2500.039325	114.700
0.0000				
CRIOP*TEMP	1	13.437189	13.437189	0.616
0.4330				
CRIOP*TEMPO	1	4.373605	4.373605	0.201
0.6545				
CRIOP*ATIVADOR	3	592.534901	197.511634	9.062
0.0000				
TEMP*TEMPO	1	333.853610	333.853610	15.317
0.0001				
TEMP*ATIVADOR	3	28.997817	9.665939	0.443
0.7218				
TEMPO*ATIVADOR	3	34.120832	11.373611	0.522
0.6673				
CRIOP*TEMP*TEMPO	1	0.399024	0.399024	0.018
0.8925				
CRIOP*TEMP*ATIVADOR	3	34.159548	11.386516	0.522
0.6669				
CRIOP*TEMPO*ATIVADOR	3	22.518226	7.506075	0.344
0.7928				
TEMP*TEMPO*ATIVADOR	3	99.583830	33.194610	1.523
0.2085				
CRIOP*TEMP*TEMPO*ATI	3	65.195771	21.731924	0.997
0.3944				
erro	310	6756.861804	21.796328	
Total corrigido	351	22631.193139		
CV (%) =	37.48			