

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA

**DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE DIMETILSULFÓXIDO SOBRE A
FUNCIONALIDADE DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS CRIOPRESERVADAS DE
SÊMEN DE CURIMBA (*Prochilodus lineatus*)**

Autora: Érica Yokoyama Namba
Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Adriana Fernandes de Barros Mexia

“Trabalho de Conclusão de Curso de graduação em Zootecnia, apresentado ao Departamento de Zootecnia da Universidade do Estado de Mato Grosso – Campus Universitário de Pontes e Lacerda, como parte das exigências para obtenção do título de BACHAREL EM ZOOTECNIA.”

PONTES E LACERDA
DEZEMBRO/2010

- Namba, Érica Yokoyama.
- N174d Diferentes concentrações de dimetilsulfóxido sobre a funcionalidade de células espermáticas criopreservadas de sêmen de Curimba (*Prochilodus lineatus*) / Érica Yokoyama Namba. – Pontes e Lacerda : [s.n.], 2010.
33 f.: il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado - Zootecnia) – Universidade do Estado de Mato Grosso, Campus Universitário de Pontes e Lacerda, 2010.
Orientadora: Prof. Dra. Adriana Fernandes de Barros Mexias.
1. Crioprotetor. 2. Taxa de Fertilização. 3. Beltsville Thawing Solution (BTS). I. Título.
II. Pontes e Lacerda – Universidade do Estado de Mato Grosso, Campus Universitário de Pontes e Lacerda.
- CDU 639.3

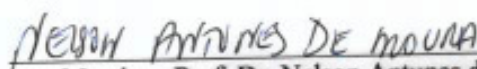
UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA

**DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE DIMETILSULFÓXIDO SOBRE
A FUNCIONALIDADE DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS
CRIOPRESERVADAS DE SÊMEN DE CURIMBA (*Prochilodus lineatus*)**

Autora: Érica Yokoyama Namba



Orientadora: Profa. Dra. Adriana Fernandes de Barros Mexia



Membro: Prof. Dr. Nelson Antunes de Moura



Membro: Profa. MSc. Tatiani Botini

PONTES E LACERDA
DEZEMBRO/2010

Aos meus pais Jorge H. Namba e Mirian A. Y. Namba.

Ao meu tio Megumi Yokoyama.

Pelo amor, carinho e incentivo durante esses anos e
por acreditarem em mim.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e sabedoria para conseguir atingir meus objetivos.

Aos meus pais, que nunca mediram esforços para me darem o melhor estudo, e que me ensinaram que não devo me desesperar diante dos problemas por mais difíceis que pareça, para tudo há solução.

À minha família, em especial ao meu tio Megumi Yokoyama (Pedrinho) por ter me ajudado a encontrar um rumo para a minha profissão, e minha prima Simone Yokoyama de Oliveira por toda ajuda para a realização do meu experimento e pela amizade e incentivo.

À Universidade do Estado de Mato Grosso agradeço por permitirem a realização de uma etapa muito importante na minha vida.

Ao Departamento de Zootecnia e a todos os docentes, no qual contribuíram e muito para a minha formação.

À professora Dr^a Adriana Fernandes de Barros Mexia pela paciência que teve comigo como orientadora, por não me deixar desistir dos meus objetivos e acreditar na minha capacidade.

À professora Dr^a Carine D.Corcini e ao professor Antonio Sérgio pela ajuda e incentivo para realizar esse experimento.

Aos meus amigos Juliana Minardi Galo e Diego de Oliveira pela ajuda na realização do meu trabalho. A Graciela Borella, Álisson Lauro, Francielli Blecha, Graciana S.das Neves, Juliana Paixão, Bruno Samartino pela amizade nesses anos de faculdade.

À Mariluce L.Blecha, Jaimi Blecha, Hugo e João Guilherme Blecha por me deixarem fazer parte da vida de vocês e pelo carinho e amizade que sempre levarei comigo.

Aos amigos e colegas não mencionados que de alguma forma fizeram parte da minha vida acadêmica, através de um abraço apertado, uma boa risada, uma palavra ou um olhar amigo, meus eternos agradecimentos.

“O futuro pertence aqueles que acreditam na beleza
dos seus sonhos.” (Eleanor Roosevelt).

RESUMO

A criopreservação é uma técnica de criopreservação do sêmen considerada uma boa alternativa para a melhoria da reprodução de peixes em cativeiro. Dentre os muitos benefícios gerados pela técnica destacam-se: sincronização na disponibilidade de sêmen, maior facilidade no transporte do mesmo e preservação dos gametas evitando seu envelhecimento; além disso, também permite a conservação da variabilidade genética e redução dos custos com a manutenção de machos. Considerando esses benefícios, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do crioprotetor dimetilsulfóxido (DMSO) em diferentes concentrações sobre a funcionalidade (motilidade, tempo de latência, taxa de fertilização e taxa de eclosão) de células espermáticas criopreservadas de sêmen da espécie *Prochilodus lineatus*, popularmente conhecida como Curimba. Para desenvolver o experimento foram selecionados 12 reprodutores e feita a aplicação do hormônio, após aproximadamente 240 horas/graus, iniciou-se a coleta do sêmen. O sêmen foi diluído numa proporção de 1:4 - 1 parte de sêmen para 4 partes de solução diluente de Beltsville Thawing Solution (BTS) e homogeneizado com dimetilsulfóxido (DMSO) nas seguintes concentrações: 2%, 5%, 8% e 11%. Sendo realizados quatro tratamentos com cinco repetições. O experimento demonstrou que, para o protocolo de criopreservação do sêmen de Curimba, os melhores resultados foram obtidos com a utilização de Dimetilsulfóxido como solução crioprotetora em concentração de 5%.

Palavras-chave: crioprotetor, Beltsville Thawing Solution (BTS), taxa de fertilização

ABSTRACT

Cryopreservation is a good alternative for improving fish breeding in controlled conditions. Its many benefits include: synchronization in semen availability, a greater easiness to transport the semen and preservation of gametes from aging process; besides it also conserves genetic variability, and eliminates maintenance costs of male individuals. Considering this, the objective of the present study was to evaluate the effect of cryoprotectant dimethyl sulfoxide (DMSO) at different concentrations on the functionality (motility, lag time, fertilization rate and hatching rate) of cryopreserved sperm cells from *Prochilodus lineatus* semen, commonly known as Curimba. In order to develop the experiment 12 breeders were selected and received a dose of hormones, and after approximately 240 hours/degrees the semen was collected. The semen was then diluted in a proportion of 1:4 - 1 part of semen to 4 parts of a diluent solution of Beltsville Thawing Solution (BTS) and mixed with dimethyl sulfoxide (DMSO) in the concentrations: 2%, 5%, 8% and 11%. Four treatments were performed with five replications. The experiment evidenced that, considering the protocol for cryopreservation of semen from Curimba, the best results were accomplished applying Dimethyl sulfoxide as cryoprotective solution in the concentration of 5%.

Key-words: cryoprotectant, Beltsville Thawing Solution (BTS), fertilization rate

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
2.1 Panorama da aquicultura nacional	11
2.2 Características biológicas e produtivas da curimba	13
2.3 Reprodução de peixes.....	14
2.4 Tecnologias de criopreservação de sêmen.....	16
2.4.1 Motilidade espermática e tempo de latência	18
2.4.2 Taxa de fertilização	19
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5 CONCLUSÃO	28
REFERÊNCIAS	29

1 INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta condições favoráveis para o desenvolvimento das diversas atividades econômicas relacionadas com a pesca e a aquicultura, por ser um país que possui grande diversidade de clima e ecossistemas. Também se destaca pelo grande potencial hídrico das bacias hidrográficas, dos aquíferos, canais irrigados e reservatórios (SEBRAE, 2010).

Entre as espécies de peixes nativos utilizadas na aquicultura podemos citar a curimba (*Pochilodus linetus*), que oferece grandes vantagens à piscicultura, devido à rusticidade e à elevada taxa de crescimento (MURGAS et al., 2007). Uma das principais características que os tornam importantes em sistemas de policultivo, é o seu hábito alimentar detritívoro, pois consomem a matéria orgânica em decomposição, auxiliando na limpeza dos viveiros (STREIT et al., 2004).

A piscicultura tem passado por constantes alterações nas últimas décadas e se consolida como importante atividade no agronegócio brasileiro, inclusive tem substituído, em parte, os peixes oriundos da pesca extrativista, o que permitiu a criação de grandes projetos de produção/abate e a diversificação de canais de distribuição (como contratos com grandes redes de hipermercado), o que facilitou o acesso dos consumidores aos pescados (SEREIA et al., 2010).

Outro ganho da atividade é a recente utilização de técnicas de conservação de sêmen, como o banco de sêmen, sendo utilizado nos laboratórios de reprodução das pisciculturas. Essa técnica tem como finalidade estocar por tempo indeterminado os sêmens de diferentes espécies de peixes, visando principalmente sua utilização para usos futuros em estudos genéticos e programas de produção com fins comerciais e também para o repovoamento da ictiofauna em ecossistemas alterados. O banco de sêmen utiliza a técnica de criopreservação, no qual é feito o congelamento do sêmen em nitrogênio líquido (RESENDE, 2005).

A criopreservação é uma boa alternativa para a melhoria da reprodução de peixes em cativeiro, tendo em vista que seus benefícios são variados, dentre eles: sincronização na disponibilidade do sêmen facilita o transporte e evita o envelhecimento dos gametas, além de conservar a variabilidade genética, e eliminar os custos com a manutenção dos machos (SUQUET et al., 2000).

Diante do assunto exposto objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito do crioprotetor, dimetilsulfóxido (DMSO) em diferentes concentrações sobre a funcionalidade

(motilidade, tempo de latência, taxa de fertilização e taxa de eclosão) de células espermáticas criopreservadas de sêmen de curimba (*P. lineatus*).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Panorama da aqüicultura nacional

A aqüicultura, em especial a atividade produtora de peixes (piscicultura), têm se tornado uma atividade agro-industrial importante no Brasil, principalmente ao longo da última década com crescimento de 777% (BORGHETTI et al., 2003), tornando-se, portanto, uma importante fonte geradora de divisas.

A piscicultura passou a ter no cenário agropecuário brasileiro, no fim dos anos 90 e início dos anos 2000, um aumento de sua importância econômica. Principalmente devido aos avanços da tilapicultura e seus ótimos resultados econômicos, e ainda criação em 2003 da Secretaria Especial da Aqüicultura e Pesca (SEAP/PR). Isso resultou no ano de 2009, a lei nº 11.958, que criou o Ministério da Pesca e Aqüicultura do Brasil.

Segundo o Ministério da Pesca e Aqüicultura-MPA (2010), a produção da aqüicultura do Brasil no período de 2007 a 2009, comparado às outras atividades zootécnicas, registrou crescimento relativo de 43,8%, ao passo que as principais criações da pecuária nacional, aves e suínos, registraram apenas 12,9% e 9,2%, respectivamente, e a de bovinos uma retração na ordem de 8,6% (Figura 1).

Conforme dados da Food and Agriculture Organization of United Nations-FAO (2009), o Brasil ocupa 17ª posição mundial como produtor aquícola (marinha estuarina e continental). Apesar dessa posição o Brasil tem apresentado dados interessantes, pois, de acordo com o MPA (2010), a produção da piscicultura no ano de 2009 foi 337.353 toneladas, apresentando incremento de 90% na produção em relação ao ano de 2003 e de 20% em relação a 2008, representando 39% da produção total de pescado nacional (Figura 2). Sendo que, as principais espécies produzidas são: tilápia (*Oreochromis niloticus*), carpas (*Ctenopharyngodon idella*, *Cyprinus carpio*, *Hypophthalmichthys molitrix* e *Aristichthys nobilis*), tambaqui (*Colossoma macropomum*), tambacu (♀ *Colossoma macropomum* x ♂ *Piaractus mesopotamicus*) e curimba (*Prochilodus lineatus*).

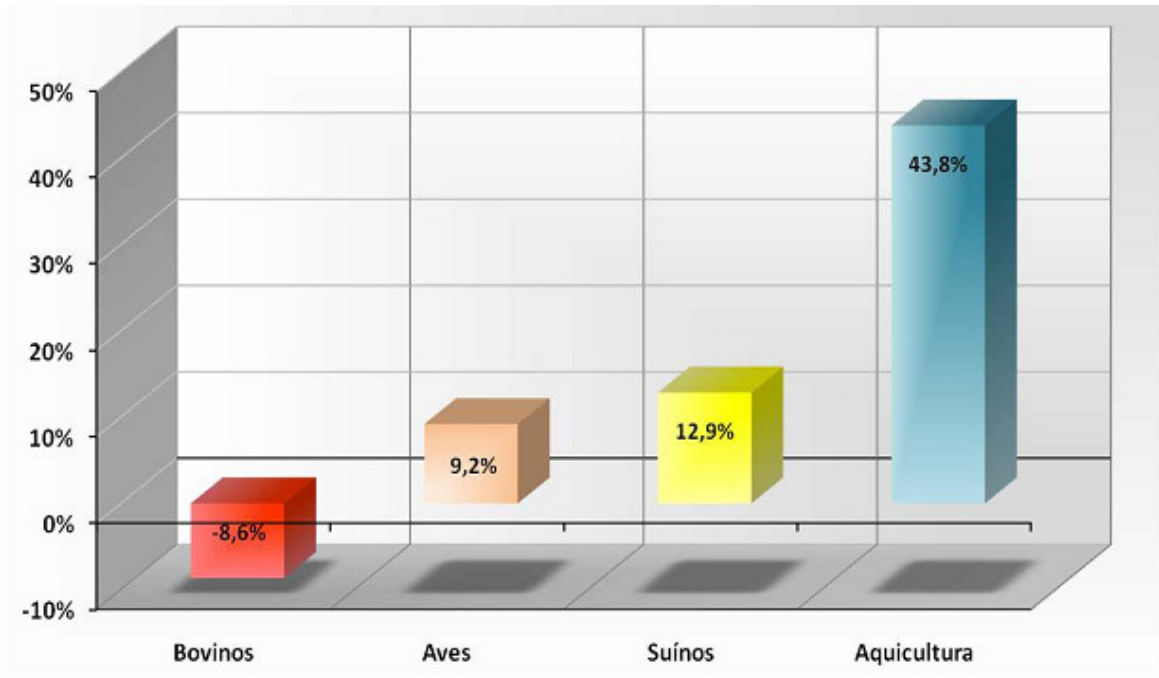


Figura 1: Crescimento relativo da pecuária e aquicultura nos anos de 2007-2009. Fonte: Ministério da Pesca e Aquicultura (2010).

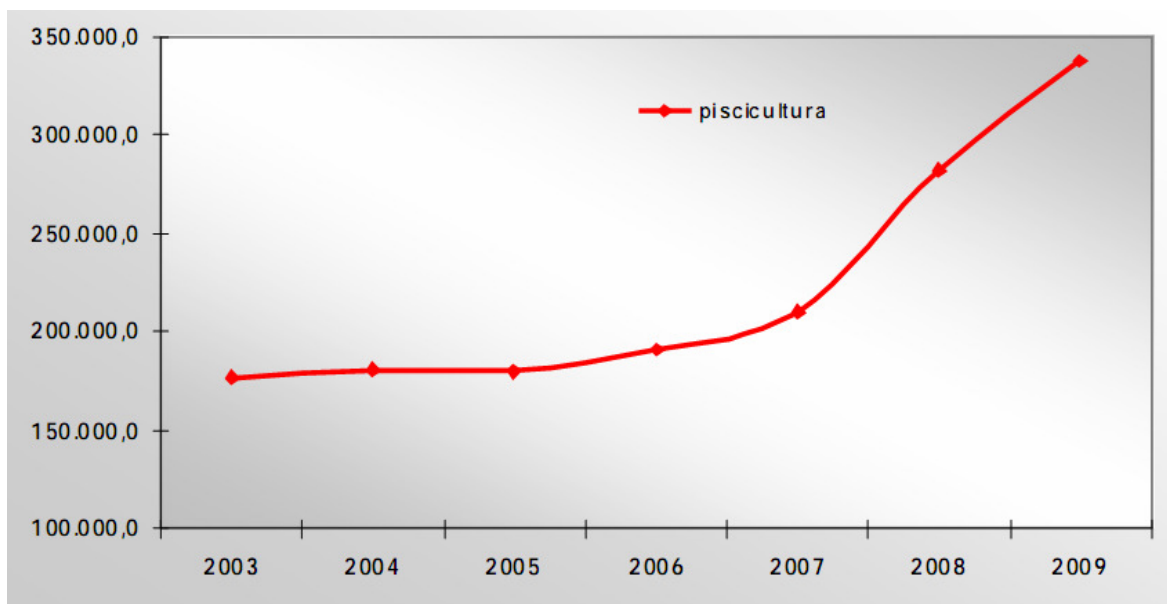


Figura 2: Produção de piscicultura de 2003 a 2009. Fonte: Ministério da Pesca e Aquicultura (2010).

A piscicultura brasileira já contribui com os saldos positivos da balança comercial do agronegócio brasileiro. No ano de 2006 foram exportadas 165 toneladas de tilápia para Europa e Estados Unidos. Peixes inteiros congelados, filés congelados e filés frescos obtiveram o valor de R\$ 1,15 milhões na exportação. A cadeia produtiva das espécies nativas organiza-se e já possui produtos semelhantes exportados para diversos países europeus e Estados Unidos (GARCIA et al., 2007).

2.2 Características biológicas e produtivas da curimba

Segundo Godinho (2007) pelo menos 40 espécies de peixes de água doce brasileiras são utilizadas na aquicultura, o que representa 1,5% das espécies conhecidas. Embora a produção brasileira de peixes cultivados venha crescendo, o ritmo é menor do que o indicado pelo seu potencial. Estudos de biologia reprodutiva de espécies nativas devem ser conduzidos, pois é área básica e fundamental para o estabelecimento do setor, e as tecnologias associadas a estes estudos devem ser implementadas.

A curimba (*P. lineatus*) atualmente tem sua população ameaçada pela construção de barragens hidrelétricas, pesca predatória e poluição do ambiente natural (GONÇALVES, 2008). É um peixe reofílico, de valor comercial, muito utilizado em repovoamento de rios e reservatórios de usinas hidrelétricas. Tem se mostrado eficiente como espécie forrageira na rotina reprodutiva de peixes carnívoros na fase larval. É considerada a espécie mais comum do Pantanal e reproduz-se na cabeceira dos rios de novembro a janeiro, na época das chuvas (STREIT et al., 2004).

Machos e fêmeas são muito semelhantes externamente, contudo, os machos atingem a competência reprodutiva aos dois anos (cerca de 24 cm de comprimento corporal), em média, enquanto as fêmeas atingem aos três anos, quando apresenta comprimento corporal médio de 31 cm (LOGATO, 2000).

A curimba (Figura 3) pertence à Ordem Characiformes, Família Prochilodontidae, sendo facilmente reconhecidos pelos lábios carnosos provido de duas séries de pequenos e numerosos dentes falciformes ou espatulares. Possuem escamas relativamente grandes e a nadadeira dorsal é precedida por um espinho procumbente, que pode ser afilado ou bifurcado.

Encontram-se distribuídos nos rios das bacias Solimões- Amazonas, Tocantins, São Francisco, Paraná-Paraguai e Uruguai (BALDISSEROTTO e GOMES, 2005).



Figura 3: *Prochilodus lineatus*, Curimba.

2.3 Reprodução de peixes

A reprodução dos peixes é cíclica, o que corresponde a um período de repouso intercalado por período de atividade sexual que finalizam com o surgimento de nova prole. Quando em repouso, as gônadas estão com o tamanho reduzido, concentrando apenas as células gametogênicas em fases iniciais de desenvolvimento. Com o avanço do ciclo, elas acumulam espermatozóides ou ovócitos vitelogênicos até atingir o pico no momento da reprodução. As gônadas, em virtude do acúmulo dessas células, sofrem mudanças radicais em sua constituição, alterando sua aparência e peso (GODINHO, 2007).

Se o peixe que desova em rio é mantido em cativeiro, sua gônada se desenvolve somente até certo estágio permanecendo nesse mesmo estágio até que se inicie a reabsorção. Esse processo pode se repetir ano após ano, sem jamais levar à desova. No entanto, a propagação desses peixes pode ser alcançada pela indução artificial da ovulação na época certa (MURGAS et al., 2003).

Em estudo realizado por Querol et al. (2004), utilizando a espécie cascudo viola (*Loricariichthys platymetopon*) observaram que o período de maior insolação diária juntamente com a elevação das taxas de temperatura e uma diminuição da precipitação pluviométrica durante o pico reprodutivo, exerceu influência sobre o ciclo gonadal, acelerando a maturação das gônadas e proporcionando a desova dessa espécie.

Os peixes podem se reproduzir naturalmente ou artificialmente, quando naturalmente, não há intervenção do homem, onde peixes sexualmente maduros lançam seus gametas no meio em que vivem, ou pode-se preparar tanques artificiais para esse fim. Já a reprodução artificial há interferência do homem no processo, onde se realiza a desova induzida por hormônio, sujeita à técnica de hipofisacção, usado principalmente em peixes que não se reproduzem em condição de confinamento, ou fazem-no somente sob condições ambientais específicas, visando assim a fertilização controlada incubação e criação de larvas e juvenis, tendo como objetivos de melhorar a sobrevivência dos peixes e alcançar maiores produções (RIBEIRO e PAVANELLI, 1998).

O processo de extrusão é a técnica utilizada para extrair os ovócitos e esperma dos reprodutores, nas fêmeas a extração é feita pela pressão delicada no abdômen próximo ao poro genital e depois ao longo do abdômen no sentido da cabeça ao poro, sendo recolhido os ovócitos em um recipiente plástico seco e limpo. Logo em seguida massageia-se o macho, tendo por baixo o recipiente com os ovócitos, para que o esperma caia sobre eles e, então, cuidadosamente coloca-se água sobre essa mistura para a fertilização, que dura cerca de cinco minutos. Após a fertilização os ovócitos são colocados nas incubadoras (BALDISSEROTTO e GOMES, 2005).

O desenvolvimento embrionário é um processo que se inicia com a fertilização do ovócito, até eclosão das larvas (KIMMEL et al., 1995). Após o processo de fertilização, o ovo absorve a água e ocorre a formação do espaço perivitelínico, com a separação entre o córion e a membrana vitelina. Os ovos dos peixes apresentam o vitelo acumulado em uma das extremidades, tendo seu elevado suprimento, no qual o embrião irá se nutrir durante a embriogênese, assim como as larvas durante algum tempo após sua eclosão (NAKATAMI et al., 2001).

2.4 Tecnologias de criopreservação de sêmen

A criopreservação permite o armazenamento de espermatozóides de peixes em nitrogênio líquido, mantendo a viabilidade dos gametas por tempo indefinido (GOLÇALVES, 2008), uma vez que os espermatozóides são imóveis nos testículos e no plasma seminal de espécies de água doce, sua motilidade é ativada quando o meio em que os espermatozóides vivem encontra-se em contato com a água do ambiente externo (COSSON, 2004).

A técnica de criopreservação auxilia a diminuir problemas de consangüinidade, que podem ocorrer como resultado de cruzamento seletivo que seleciona genes de interesse particular pelo endocruzamento, reduzindo a diversidade genética. A montagem de um banco genético com sêmen congelado de peixes é uma forma eficiente de manter o tamanho efetivo da população sem a manutenção de um grande número de reprodutores (JORSTAD e NAEVDAL, 1996). Facilitando o manejo por dispensar a presença do macho no ato da fecundação e aumentar, também, a eficiência da reprodução artificial nas estações de piscicultura. Contudo, devem-se ter alguns cuidados, nos quais são determinantes para o sucesso do resfriamento, tais como redução da temperatura, fornecimento e troca de gases e prevenção do desenvolvimento bacteriano (STOSS e DONALDSON, 1982 citado por OLIVEIRA et al., 2007).

Quanto aos procedimentos de congelamento, são necessários o uso de meios diluentes e agentes protetores, sendo geralmente constituídos de soluções aquosas que possuem a mesma osmolaridade do fluido seminal. Contudo, para não ocorrer a ativação dos espermatozóides, a solução elaborada, normalmente é composta com a adição de glicose para aumentar a sua pressão osmótica e evitar, com isso, a ativação do espermatozóide (CARNEIRO, 2007). Na prática, o desenvolvimento de uma dessas soluções, para uma determinada espécie de peixe necessita de ensaios para a avaliação dos seus eventuais efeitos tóxicos e sua influência sobre a integridade e funcionalidade espermática. Resumidamente, quando misturado ao meio diluidor, o sêmen não deve estar móvel, mas a sua ativação deve continuar sendo possível com a adição de água no momento da fertilização após seu armazenamento e descongelamento (OHTA e IZAWA, 1996, citado por CARNEIRO, 2007).

Uma das maiores dificuldades na congelação do sêmen é evitar a formação de cristais de gelo intra e extracelulares, e aumento da concentração de solutos. Para poder minimizar esses efeitos durante o processo de criopreservação do sêmen, é adicionado diluentes que devem ter

como uma de suas funções proteger os espermatozóides contra o choque térmico (MATEOS-REX e AGUILLAR, 1996).

Os diluidores são soluções de sais ou de carboidratos adicionados ao sêmen cuja função é manter a viabilidade das células espermáticas durante a redução da temperatura. As condições mínimas requeridas de um diluidor adequado são: isotonicidade, pois suas características físico-químicas não devem ser alteradas durante o contato com o sêmen; condutividade térmica elevada, permitindo a rápida transferência de temperatura do meio externo para os espermatozóides; esterilidade, ou seja, não devem veicular microrganismos potencialmente nocivos às células espermáticas e, finalmente, servir de carreador de crioprotetores (LEGENDRE e BILLARD, 1980).

Segundo Rall (1987) em experimentos com embriões de camundongos, constatou que a sacarose tem o efeito adicional de proteção celular, pois este crioprotetor causa desidratação, reduzindo a quantidade de água no citoplasma da célula e, desta forma, evita a formação de gelo.

Os crioprotetores segundo Cruz (2001), podem ser classificados em intracelulares (solúveis) ou extracelulares (não solúveis), como representado na Tabela 1.

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

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

Fonte: Cruz (2001).

Streit et al. (2007) em trabalho realizado com embriões de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) em estágio de pós-gástrula, submetidos a diferentes protocolos de resfriamento, observaram a toxidez do crioprotetor etilenoglicol, onde os embriões que foram submetidos ao tratamento controle, no qual foi utilizado apenas água sem o crioprotetor tiveram taxa de eclosão maior (6%) em relação aos embriões expostos ao etilenoglicol (0%). Os autores justificam que a não ocorrência de eclosão nos tratamentos com o etilenoglicol

pode estar relacionada a interferência desse crioprotetor no metabolismo do embrião, provocando assim a desestruturação celular, e com consequência, a morte.

O diluente deve proporcionar, nutrientes como fontes de energia, manter a pressão osmótica adequada e aumentar o volume do sêmen (WATSON, 1995).

Murgas et al. (2007) encontraram resultados satisfatórios quando utilizaram como diluente Beltsville Thawing Solution (BTS) com concentração final de 4,5%, enriquecido com os crioprotetores intracelulares metanol ou DMSO em concentração final de 10% em sêmen de curimba.

Miliorini (2006) ressalta que ainda não existe um protocolo específico de criopreservação do sêmen para cada espécie, uma vez que mesmo as espécies que coabitam nossas bacias hidrográficas, tendem a apresentar diferentes sensibilidades de seus espermatozóides à redução na temperatura e ao contato com soluções crioprotetoras.

2.4.1 Motilidade espermática e tempo de latência

A motilidade espermática é um dos parâmetros mais utilizados na qualificação de uma amostra de sêmen de peixes e geralmente é expressa em percentagem de espermatozóides móveis (MILIORINI et al., 2007). Maggese et al. (1984), na análise de motilidade do sêmen de bagre (*Rhamdia sapo*), estabeleceram uma escala arbitrária de 0 a 2 em que 0- significava sêmen imóvel, 1- movimentos vibratórios e 2- motilidade direcional. Por sua vez Fauvel et al. (1999) basearam-se na escala de 0 a 5, em que a escala 0- significa a imotilidade, 1- 0 a 20% de espermatozóides móveis, 2- 20 a 40%, 3- 40 a 60%, 4- 60 a 80% e 5- 80 a 100% de espermatozóides móveis.

No entanto deve-se levar em conta que a motilidade espermática é influenciada por inúmeros fatores como temperatura, estado nutricional, estado sanitário, condições de análise, soluções ativadoras empregadas, espécie estudada (CAROLSFELD e HARVEY, 1999). Segundo Rana (1995) um dos principais moderadores da motilidade espermática é o progresso da época reprodutiva em que os machos de piracema se encontram.

Billard et al., 1995 em estudos realizados com carpas (*Cyprinos*), constataram que a temperatura influencia decisivamente a duração da motilidade das células espermáticas, obtendo resultados de 30-40 segundos de motilidade espermática a 20 °C. Miliorini et al.

(2005) obtiveram uma duração de até 184 segundos para o sêmen descongelado de curimba (*P.lineatus*), a 25 °C.

Billard e Cosson (1992) observaram aumento na percentagem de espermatozóides móveis de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) à medida que temperatura da lâmina histológica aumentava durante a análise.

A proporção adequada do diluente: sêmen é importante para poder se obter taxas de motilidade espermática positivas após descongelamento. Estudos com o sêmen da tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*), mostraram que a combinação do dimetilsulfóxido (DMSO) com gema de ovo e do metanol com leite em pó, associados a glicose e água destilada, foram os mais adequados para o congelamento do sêmen dessa espécie, utilizando proporção de diluente de: 1:1, 1:4 e 1:9, também apresentam resultados satisfatórios (GODINHO et al., 2003).

Streit et al. (2004) comparando o sêmen de curimba (*P.lineatus*) induzido por extrato de hipófise de frango (EHF), carpa (EHC) ou coelho (EHCo), constatou que o tipo de hormônio pode influenciar na motilidade espermática, tendo como resultados 68,20%, 50% e 60% respectivamente, quanto à motilidade.

Segundo Billard e Cosson (1992), a diluição é a chave da imobilidade e motilidade dos espermatozóides, pois o volume do diluente adicionado determina a dinâmica de ativação. Uma diluição relativamente alta é necessária para iniciar a motilidade simultânea de 100% dos espermatozóides. Em baixas diluições, somente alguns espermatozóides são ativados e outros vêm a ser ativado progressivamente mais tarde.

O tempo de latência, segundo Godinho et al. (2003) é o tempo decorrido entre a mistura de sêmen com o crioprotetor e o início da motilidade espermática.

2.4.2 Taxa de fertilização

Bromage e Roberts (1995) relacionam a eficiência da qualidade seminal com a taxa de fertilização, tanto em estudos de inseminação como em preservação de sêmen.

A proporção de espermatozóide e ovócito também influencia na taxa de fertilização. Em metodologia empregada por Fogli da Silveira et al. (1988) no processo de fertilização de truta (*Oncorhynchus mykiss*) concluíram que 200 mil espermatozoides foi o número mínimo necessário à fecundação de um ovócito com uma taxa de fertilização ótima.

Em estudos realizados por Lahnsteiner et al. (1998) com truta encontraram correlação entre a taxa de fertilidade e velocidade da motilidade com a capacidade de fertilização, onde velocidade da natação menor que 5 um /segundos teve uma capacidade de fertilização de aproximadamente 20%.

Sanches et al. (2009) em experimento com dose inseminante para a fertilização de ovócitos de Dourado (*Salminus maxillosus*), chegaram a resultados em que, afirmam que a diluição do material fertilizante possui também duas importantes aplicações sobre as taxas de fertilização: uso de pouca água como solução ativadora, compromete a ativação espermática proporcionando assim um meio inadequado para o encontro dos gametas; e o uso da água em excesso pode diluir excessivamente o meio, impedindo o espermatozóide de chegar à micrópila durante o curto período de tempo de ativação que adquirem. Chegando a conclusão que o uso de 0,44 mL de sêmen em 100 mL de ovócitos não hidratados e ativados com 1.250 mL de água podem ser alcançados melhores taxas de fertilização dos ovócitos dessa espécie.

Estudos realizados por Marques (2001) foi observado que as taxas de fertilização variaram de acordo com as incubadoras para as quais os ovócitos foram transferidos após a fertilização com sêmen de curimba resfriado em gelo. Nas incubadoras com capacidade para 20 litros, obteve-se 38% de fertilização, enquanto que, nas incubadoras de 60 litros, a taxa de fertilização máxima foi de 90%.

Nascimento et al.(2007) em estudos comparando o efeito do processo de criopreservação do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*), utilizando as soluções Beltsville Thawing Solution (BTS) e água de coco em pó (ACP) combinadas ao crioprotetor metil glicol (MG) e sêmen fresco como controle obtiveram os seguintes resultados demonstrados na Tabela 2. Não houve diferença significativa entre as taxas de fertilização observadas entre o sêmen congelado com BTS + MG, ACP + MG e sêmen fresco. A motilidade média após descongelamento foi de 60% para sêmen congelado em ACP + MG e de 70 % para os congelados em BTS + MG. Assim os autores concluíram que o uso de sêmen congelado com ACP + MG oferece resultado satisfatórios na fertilização artificial dessa espécie quando comparado com os resultados obtidos com sêmen congelado com BTS + MG e o sêmen congelado.

Tabela 2: Taxas de motilidade e de fertilização com sêmen congelado em duas soluções crioprotetoras e com sêmen fresco não diluído (média $\pm$ desvio padrão).

Diluidor + crioprotetor	Motilidade após descongelamento (%)	Taxa de fertilização (%) *
ACP + MG	60	85,4 $\pm$ 14
BTS + MG	70	81,4 $\pm$ 16
Sêmen fresco	-	100

* Não significativo ao teste F ($p > 0,05$).

A taxa de fertilização é uma média obtida a partir da contagem de três alíquotas de cada uma das incubadoras, tendo assim o número de embriões viáveis e ovos gorados (Figuras 4 e 5).

A taxa de eclosão é a média do número de larvas eclodidas e ovos gorados obtidas por meio da contabilização de três alíquotas de cada incubadora.



Figura 4: Taxa de fertilização, contagem dos ovos gorados e fertilizados

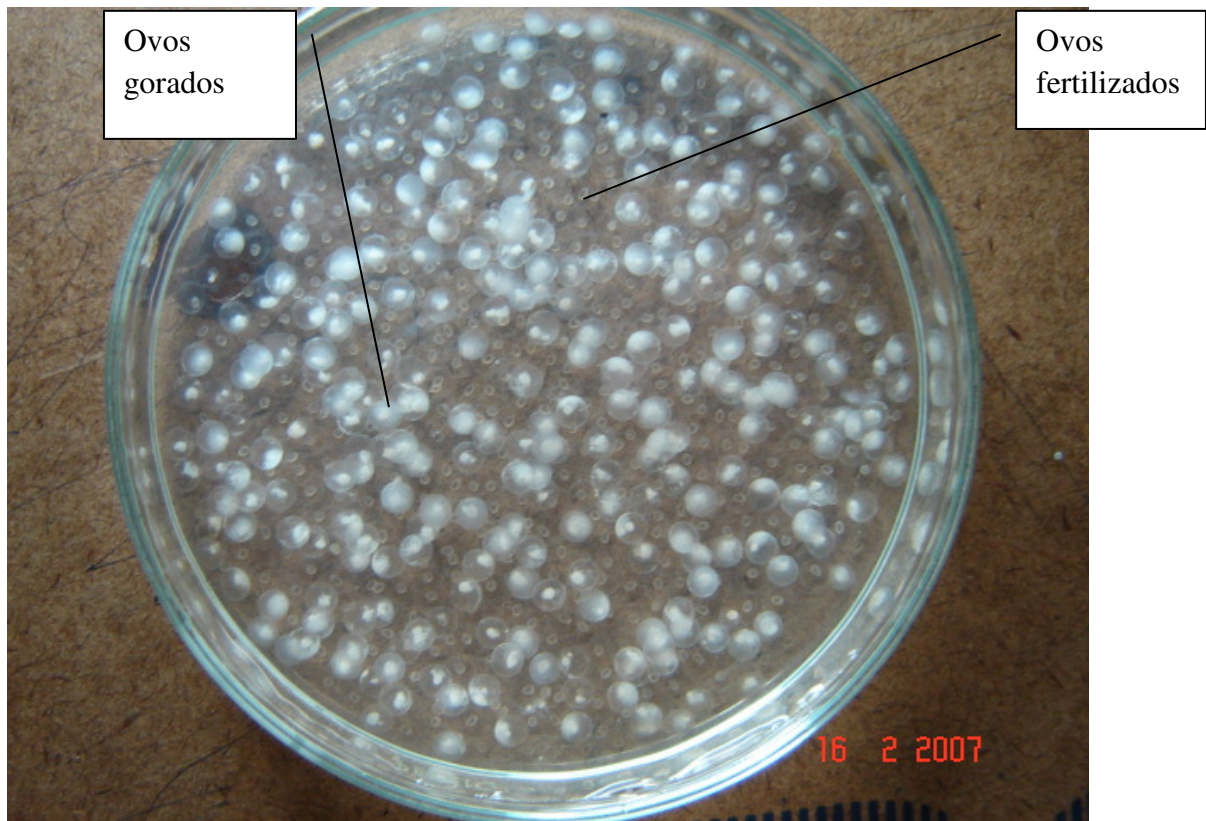


Figura 5: Taxa de fertilização.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no mês de janeiro de 2010 na Piscicultura Boa Esperança localizada no município de Pimenta Bueno, Estado de Rondônia. Na execução deste experimento foram selecionados 12 reprodutores de curimba (*Prochilodus lineatus*) que estavam estocados em viveiros e foram despescados com auxílio de redes de arrasto. Após a despesca, os reprodutores foram transportados para o laboratório e mantidos em caixas de água de 1000 litros. Cada reprodutor foi pesado e submetido ao tratamento hormonal com extrato bruto de hipófise de carpa para a indução da espermição. A dose utilizada foi de 0,5 mg/kg de peso corporal diluída em soro fisiológico e aplicada na nadadeira peitoral.

Após aplicação do hormônio e com aproximadamente 240 horas graus, iniciou-se a coleta do sêmen. Cada peixe foi enxugado por inteiro com auxílio de uma toalha, a fim de evitar o contato da água de seu corpo com o sêmen no momento da coleta, e a papila genital foi enxugada no momento da coleta com auxílio de papel toalha, prevenindo, assim, ativação do sêmen por água ou urina. Foi feita extrusão por massagem abdominal no sentido crânio-caudal. O sêmen foi coletado em tubo de 15 mL e mantidos em uma pequena caixa de isopor com gelo, para em seguida serem congelados. Após constatar que não ocorreu ativação prévia, observando se não havia vestígio de água ou urina, a motilidade foi avaliada colocando-se 1µL de sêmen *in natura* e 99µL de água destilada (25°C) em lâmina sob lamínula, em microscópio de contraste de fases (400x) (STREIT et al., 2006).

A solução base diluente foi o Beltsville Thawing Solution (BTS) constituído de 37 g de glicose (G5400, ≥99% Sigma), 6 g de citrato de sódio di-hidratado (W302600, ≥99%, Aldrich), 1,25 g de bicarbonato de sódio (S5761, ≥99,5%, Sigma), 1,25 g de etilenodiamino tetracetato (E4884, 99,0-101,0%, Sigma-Aldrich) e 0,9 g de cloreto de potássio (P8041, ~99%, Sigma) em 1 litro de água destilada (PURSEL e JOHNSON, 1975).

Esse diluidor normalmente é utilizado para o resfriamento do sêmen suíno, porém tem obtido bons resultados no resfriamento do sêmen de peixes como *Piaractus mesopotamicus* (Pacu), *Prochilodus lineatus* (Curimba) e *Brycon orbignyanus* (Piracanjuba) (MILIORINI et al., 2002).

O BTS apresenta glicose em sua formulação atuando, por sua vez, como crioprotetor externo à membrana citoplasmática dos espermatozoides e serve de substrato para a produção de ATP (fornecimento de energia química, que pode ser usada para trabalho químico, osmótico e mecânico) (MURGAS et al., 2007). Segundo Cosson et al. (1999) a fosforilação

oxidativa mitocondrial é altamente requerida para a produção de energia durante o batimento flagelar dos espermatozóides, de modo que a insuficiência de ATP constitui uma das principais causas da redução da motilidade espermática.

O sêmen foi diluído na proporção 1:4 (sêmen: solução diluente) e homogeneizado com dimetilsulfóxido (DMSO) nas seguintes concentrações: 2%, 5%, 8% e 11%, totalizando quatro tratamentos com cinco repetições.

Após a homogenização do sêmen com o diluente por pipetagem, foram envasadas quatro palhetas de 0,25 mL para cada tratamento e colocadas em raques. As palhetas permaneceram por dois minutos a 24 °C em temperatura ambiente. Após, foram alocadas em botijão do tipo dry shipper, à -70°C por 24h sendo transferidas para o botijão de nitrogênio líquido à -196°C, permanecendo submersas em nitrogênio líquido por sete dias.

Para avaliação da taxa de fertilização e eclosão foram utilizadas duas fêmeas. As fêmeas foram induzidas à desova com extrato de hipófise de carpa 5mg/kg de peso corporal. Após 240 hora-grau (CECCARELLI et al., 2000), os óvulos foram extrusados por massagem abdominal sendo coletados em Becker de 1000 mL. Dos óvulos coletados, foram utilizados 2 g, com aproximadamente 2.200 ovos por tratamento. Para obtenção da taxa de fertilização, as amostras de sêmen foram descongeladas em banho-maria à 37° C por cinco segundos, e enxugadas com papel toalha, tendo descartada a extremidade com massa cirúrgica. As amostras descongeladas fertilizaram as alíquotas de óvulos. Foram utilizados 150µL da amostra descongelada de cada tratamento de um mesmo macho, sendo duas alíquotas fertilizadas com sêmen fresco, coletado de dois machos no momento da execução do teste (controle com sêmen fresco). Das amostras com sêmen fresco foi utilizado 15µL, para que o número de células espermáticas por óvulo fosse similar aos tratamentos congelados, estas alíquotas foram utilizadas para fertilizar a primeira e a última alíquota de ovos (estas alíquotas serviram como controle).

Na execução dos testes de fertilização, tanto para as amostras de sêmen descongelado, como para as alíquotas de sêmen fresco (controle da qualidade dos óvulos), as células espermáticas foram colocadas em contato com as alíquotas dos óvulos em Becker de 10 mL. A ativação do sêmen foi realizada mediante a adição, ao Becker, de 2 mL de água destilada à temperatura de 29° C. Após, o material foi homogeneizado suavemente por aproximadamente cinco segundos e permaneceu em descanso por cinco minutos. Ao final deste período, foram adicionados 20 mL de água destilada à temperatura de 29° C em cada um das alíquotas, visando hidratar os óvulos fertilizados. Após, foram incubados à 29°C sob fluxo de água delicado e constante de 150 mL/min em incubadoras experimentais de 2 L (figura 6).



Figura 6: Incubadoras experimentais.

O acompanhamento dos estágios de desenvolvimento foi realizado por meio de estereomicroscópio (16 X), sendo avaliados 200 embriões por estágio e por tratamento.

A taxa de fertilização foi avaliada após 200 horas/grau, sendo considerado fertilizado sobre o total de embriões avaliados, e o final expresso em percentual. Já a taxa de eclosão foi avaliada considerando-se o total de embriões eclodidos, sobre o total de embriões fertilizados com sêmen, sendo ao final expresso em percentual.

O botijão de nitrogênio, contendo as outras amostras, foi transportado para o Laboratório de Reprodução Animal da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, onde foram realizadas outras análises seminais realizadas após o descongelamento, como: motilidade espermática e tempo de latência.

Foi realizada a análise de normalidade para todas as variáveis dependentes pelo teste de Shapiro-Wilk. Após foi realizado análise de variância com subsequente comparação entre as médias através do teste de Tukey. As diferentes concentrações de crioprotetores foram consideradas variáveis independentes, e as variáveis motilidade espermática, tempo de latência, taxa de fertilização e taxa de eclosão foram consideradas variáveis dependentes. Todas as análises foram realizadas no software Statistix 9.0 (2008).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi observado diferença entre as concentrações de DMSO na variável motilidade espermática (Tabela 1), porém não se deve ser tomada como indicativo da qualidade seminal isoladamente. Miliorini (2006) obteve uma motilidade pós-descongelamento em sêmen de curimba utilizando concentração de 5; 7,5; 10 e 12, 5 de DMSO de 76, 78, 85 e 69% o que diferem dos resultados encontrados neste trabalho. Neste estudo utilizou-se 2,16 vezes menos glicose do que o trabalho de Miliorini (2006) o que pode justificar essa grande diferença na motilidade espermática encontrada entre esses trabalhos. Streit et al. (2006) concluíram que a glicose que está na formulação do BTS atua como crioprotetor externo à membrana citoplasmática dos espermatozóides e serve de substrato para a síntese de ATP. Além de que a toxicidade do DMSO, a célula espermática de alguns peixes de água doce pode ser suprida pela adição de carboidratos (LEUNG, 1991). O sêmen de *P. lineatus* ao utilizar a glicose como fonte energética primária, pode suprir a necessidade metabólica da célula espermática.

Não foi observada diferença significativa ($P>0,05$) entre as concentrações de 2 a 8% de DMSO (Tabela 3) quanto à característica de tempo de latência no sêmen descongelado. Estes dados corroboram com os encontrados por Cruz (2001) que verificou que as amostras acrescidas de DMSO apresentaram duração média de motilidade superior à daquelas acrescidas de etilenoglicol e propanodiol.

Tabela 3: Taxa de motilidade espermática, tempo de latência (%) íntegro do sêmen descongelado de curimba (*P. lineatus*) (n=12)

Tratamentos	Motilidade	Tempo de latência (%)
DMSO a 2%	18,0 $\pm$ 4,9	16,8 $\pm$ 4,7 ^{ab}
DMSO a 5%	22,0 $\pm$ 4,9	23,4 $\pm$ 4,7 ^a
DMSO a 8%	16,0 $\pm$ 4,9	17,4 $\pm$ 4,7 ^{ab}
DMSO a 11%	12,0 $\pm$ 4,9	9,6 $\pm$ 4,7 ^b

^{a,b}Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($P<0,05$)

Segundo Rana e Mac Andrew (1989), muitos trabalhos determinam a qualidade espermática pós-descongelamento utilizando somente a motilidade e não considerando a taxa de fertilização dos ovos. Porém, o teste de fertilização é o método que melhor permite avaliar a manutenção da capacidade fertilizante do espermatozóide. Miliorini (2006), em seu estudo

de criopreservação de sêmen de curimba obteve médias de taxa de fertilização de 22,3; 17,1; 15,7 e 7,1% para as concentrações de 5; 7,5; 10 e 12,5% de DMSO, respectivamente. Nesse estudo, verificou-se taxas de fertilidade superiores para as concentrações de 5, 8 e 11% de DMSO, porém na concentração de 2% de DMSO, observou que o sêmen não manteve sua capacidade fertilizante, obtendo taxa de fertilização igual a zero.

O tratamento DMSO 5% apresentou resultado de taxa de fertilização (porcentagem de ovos que atingem a fase de fechamento do blastóporo) e eclosão melhores aos demais tratamentos além de não apresentarem diferença quando comparado ao sêmen *in natura* (Figura 7). Uma vez que o DMSO na concentração de 5% proporcionou as maiores durações médias de tempo de latência espermática pós descongelamento, pode-se supor que as taxas de fertilização também superiores sejam devido à prolongada capacidade de movimentação das células espermáticas, tendo em vista a maior probabilidade de penetração em micrópilas ainda abertas.

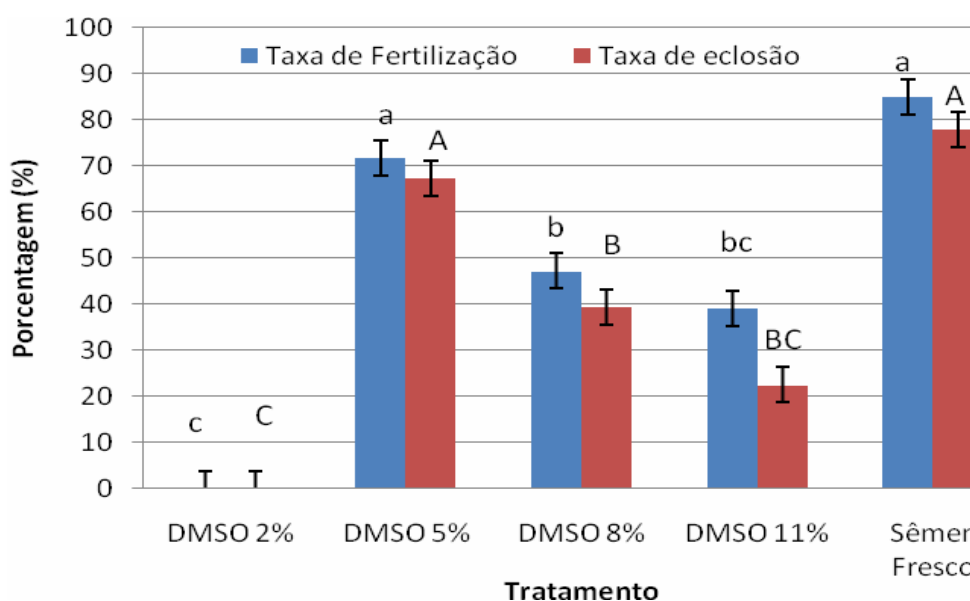


Figura 7: Taxa (%) de fertilização e de eclosão do sêmen descongelado de curimba (*P. lineatus*) (n=12) e do sêmen fresco controle (n=2). ^{a,b} ou ^{A,B} Letras diferentes na taxa de fertilização ou eclosão diferem estatisticamente (P<0,05).

5 CONCLUSÃO

Sob as condições em que este experimento foi realizado, pode-se concluir que o protocolo de criopreservação do sêmen de curimba deve envolver a utilização de Dimetilsulfóxido, na concentração de 5%, como solução crioprotetora.

REFERÊNCIAS

BORGHETTI, N.R.B. et al. Aquicultura: uma visão geral sobre a produção de organismos aquáticos no Brasil e no mundo. Curitiba: Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais, 2003. 128 p.

BILLARD, R.; COSSON, J. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. **Journal of experimental zoology**. v. 261, p.122-131, 1992.

BILLARD, R.; COSSON, J.; PERCHEC, J.; LINHART, O. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 29, n. 1/4, p. 95-112, Jan. 1995.

BROMAGE, N.R. Broodstock management and seed quality- general considerations. In: BROMAGE, N.R.; ROBERTS, R.J. (Eds) **Broodstock management and egg and larval quality**. Blackwell Science, Oxford, 1995, p. 1-24.

CARNEIRO, P.C.F. Tecnologias de produção e armazenamento de sêmen de peixes. **Revista brasileira reprodução animal**. Belo Horizonte, v.31, n.3, 2007.

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

CECCARELLI, P.S.; SENHORINI, J.A.; VOLPATO, G.L. 2000. **Dicas em piscicultura: perguntas e respostas**. Santana Gráfica Editora: Botucatu, 247p.

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

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

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

DENNISTON, R.S.; MICHELET, S.; GODKE, R.A. Principles of cryopreservation. In: TIERSCH, T.R.; MAZIK, P.M. (Eds). **Cryopreservation in aquatic species**. Baton Rouge: World Aquaculture Society, 2000.p.59-74.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. [S.l.: s.n.]. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. El Estado Mundial de la Pesca e la Acuicultura. Roma, 2009.

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

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

GARCIA, S. M.; FIRETTI, R.; SALES, D. S. Desenvolvimento de sistema informatizado para gestão do processo de produção de peixes. In: CONGRESSO DA SOBER, 45, Londrina, **Anais...**22 a 25 de julho de 2007.

GODINHO, H.P.; CUNHA AMORIM, V.M.; PEIXOTO, M. T.D. Criopreservação do sêmen da tilápia nilótica *Oreochromis niloticus*, var. Chitralada: crioprotetores, soluções ativadoras e refrigerador criogênico. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.6, p.1537-1543, 2003.

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

GONÇALVES, A. C. S. et al. Avaliação da morfologia espermática de curimba (*Prochilodus lineatus*) no sêmen criopreservado em diferentes soluções crioprotetoras. In: **Aquaciência**, 2008, Maringá - PR. Congresso Aquaciência, 2008.

ITUASSÚ, D.R.; CAVERO, B.A.S.; FONSECA, F.A.L.; BORDINHON, A.M. Cultivo de curimatã (*Prochilodus* ssp). In: BALDISSEROTTO, B.; CARVALHO GOMES, L. de. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Ed. Santa Maria: UFSM, 2005. p.67-79.

JORSTAD, K.E.; NAEVDAL, G. Breeding and Genetics. In: PENNEL, W.; BARTON, B.A. (Ed.). **Principles of salmonid culture**. Amsterdam: Elsevier, 1996. p.655-726.

KIMMEL, C.B.; BALLARD, W.W.; KIMMEL, S.R.; ULLMANN, B. Stages of embryonic development of the zebrafish. **Developmental dynamics**. v.203, p.253-310, 1995.

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

LAHNSTEINER, F.; BERGER, B.; WEISMANN, T.; PATZNER, A. Determination of semen quality of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by sperm motility, seminal plasma parameters, and spermatozoa metabolism. **Aquaculture**, v. 267, p.163-181, 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.

MAGGESE, M. C., CUKIER, M., CUSSAC, V. E. Morphological changes, fertilizing ability and motility of *Rhamdia sapo* (Pisces, Pimelodidae) sperm induced by media of **Rev. Brasl. Bio.** different salinities. , v.44, n.4, p.541-546, 1984.

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

MATEOS-REX, E.; AGUILLAR, C.G.C. Técnicas de control de la reproducción en ganado caprino. In: **Nuevas técnicas de reproducción asistida aplicadas a la producción animal**. Cuenca: Universidad de Castilla la Mancha, 1996, p. 183-202. Disponível em: <http://books.google.com.br/books?id=_DzRV7xD5_QC&pg=PA183&lpg=PA183&dq=t%C3%A9cnicas+de+control+de+la+reproducci%C3%B3n+en+ganado+caprino&source=bl&ots=c0mBw2jrfa&sig=exdV5zu1Ds-JS0phrR6mFTmb4l0&hl=pt-BR&ei=ey_jTL2TKYS8lQeft-W6Dg&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=1&ved=0CBYQ6AEwAA#v=onepage&q=t%C3%A9cnicas%20de%20control%20de%20la%20reproducci%C3%B3n%20en%20ganado%20caprino&f=false> Acessado em 16 nov.2010.

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA 2010, **Produção pesqueira e aquícola: Estatística** de 2008 e 2009, Acesso em: 22 de Agosto de 2010. Disponível em : <<http://www.mpa.gov.br.>> Acesso em: 20 set.2010.

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

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

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

MURGAS, L.D.S. MILIORINI, A.B.; de FREITAS, R.T.F.;PEREIRA, G.J.M. Criopreservação do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) mediante adição de diferentes diluidores, ativadores e crioprotetores. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.36, n.3, 2007.

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

NASCIMENTO, A.F.; ISAÚ, Z.A.; VIVEIROS, A.T.M.; CARVALHO, M.A.M.; SALGUEIRO, C.C.M. Fertilidade do sêmen de Piracanjuba *Brycon orbignyanus* criopreservado em água de coco em pó e em BTS. In: **1º Congresso Brasileiro de Produção de Peixes Nativos de Água Doce**. 2007. Disponível em: <http://www.cpao.embrapa.br/congressopeixe2007/TRABALHOS/REPRODUCAO/REPRO D_12.pdf> Acesso em: 21 dez.2010.

NAKATANI, K.; AGOSTINHO, A.A.; BAUMGARTNER,G.; BIALETZKI, A.; SANCHES, P.V.; CAVICCHIOLI, M..Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e manual de identificação. Maringá: **EDUEM/ Nupélia**, 2001, 359p.

PURSEL, VG e LA JOHNSON 1975. Freezing of boar spermatozoa: Fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. **Journal of Animal Science**, 40: 99-102.

QUEROL, M.V.M; QUEROL, E; PESSANO, E. F. Influência de fatores abióticos sobre a dinâmica da reprodução do cascudo viola (*Loricariichthys platymetopon*) (ISBRUCKER e NIJSSEN, 1979) (OSTEICHTHYES, LORICARIIDAE), no reservatório da estância Nova Esperança , Uruguaiana, Bacia do rio Uruguai, RS, Brasil. Biodiversidade Pampeana, **PUCRS**, Uruguaiana. v.2 p.24-29, 2004.

OLIVEIRA, A.V.; VIVEIROS, A.T.M.; MARIA, A.N.; FREITAS, R.T.F.; IZAÚ, Z.A. Sucesso do resfriamento e congelamento do sêmen de pirapitinga *Brycon nattereri*. **Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia**. V.59, n.6, 2007.

RALL, W.F. **Factores affecting the survival of mouse embryos criopreserved by vitrification**. *Criobiology*, v.24, p.387-402, 1987.

RANA, KJ, McANDREW, BJ. 1989. **The viability of cryopreserved tilapia spermatozoa**. *Aquaculture*, Amsterdam, 76: 335-345.

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

RIBEIRO, R.P.; PAVANELLI, C.S. Classificação de espécies . Anatomia e fisiologia dos peixes. Atualizações em piscicultura de água doce. Curso de atualizações em piscicultura de água doce por tutoria a distância. Modulo 1, p.35, 1998.

RESENDE, E.K.; CASTELLA, A.C.; MARQUES, D.K.S; ROTA, A. Banco de sêmen de peixes do pantanal. **REDVET**, vol.6, nº10, 2005. Disponível em: <<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n101005/100516.pdf>> .Acesso em: 12 set. 2010.

SANCHES, E.A.; BOMBARDELLI, R.A.; BAGGIO; D.M.; SOUZA, B.E. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de dourado. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 38, n.11, p.2091-2098, 2009.

SEBRAE, **Potencialidades do Brasil para pesca e aquicultura**. Disponível em: <http://www.sebrae.com.br/setor/aquicultura-e-pesca/o-setor/brasil/integra_bia?ident_unico=1611>. Acesso em: 20 set. 2010.

SEREIA, V.J. **A Inovação na piscicultura: análise do sistema de produção intensiva da empresa “grande pescado”**. In: Congresso internacional de administração, 2010. Disponível em: <<http://www.admpg.com.br/2010/down.php?id=963&q=1>>. Acesso em: 07 nov. 2010.

STATISTIX®. 2008. **Statistix for Windows User's manual**. Tallahassee: Analytical software.

STREIT JR., D. P.; MORAES, G.V.; RIBEIRO, R.P; SAKAGUTI, E.S.; SOUZA, E.D.; POVH, J.A.; CAÇADOR, W. Comparação do sêmen de Curimbá (*Prochilodus lineatus*)

induzido por extrato de hipófise de frango, coelho ou carpa **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. (2004) 41: 147- 153.

STREIR JR.,D.P.; DIGMAYER, M.; RIBEIRO, R.P.; SIROL, R.N.; MORAES, G.V.; GALO, J.M. Embriões de pacu submetidos a diferentes protocolos de resfriamento. Pesquisa agropecuária brasileira, Brasília, v.42, n.8, p. 1199- 1202, ago. 2007.

STREIT JR, D.P.; BENITES C.; MORAES; G.V.; RIBEIRO, R.P.; SAKAGUTI, E.S.. 2006. Sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) criopreservado com diluentes utilizados para sêmen de suínos. **Ciência Animal Brasileira**, 7: 289-297.

SUQUET, M.; DREANNO, C.; FAUVEL, C.; COSSON, J.; BILLARD, R. 2000 **Cryopreservation of sperm in marine fish**. Aquac. Res., (31):231.

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and assessment of their post-thawing function. **Reproduction fertility and development**, 1995 7: 871-891.