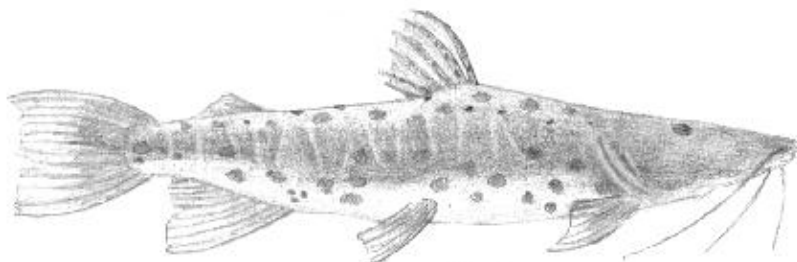
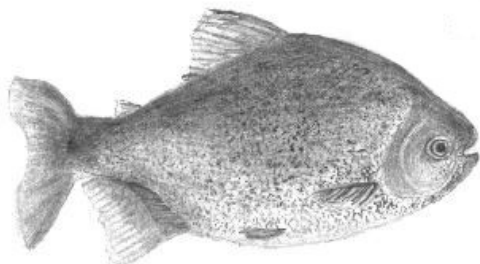
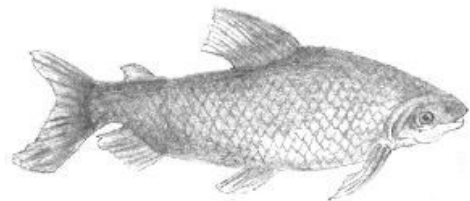
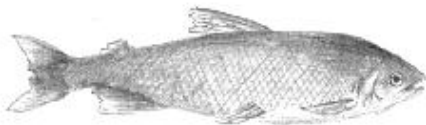
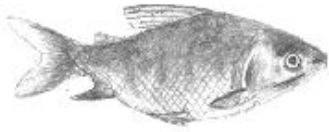


Simone Marques



**PRESERVAÇÃO A CURTO PRAZO DO
SÊMEN DE TELEÓSTEOS
NEOTROPICAIS DE ÁGUA DOCE**

Belo Horizonte - Minas Gerais
2001

Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais
Programa de Pós-Graduação em Zoologia de
Vertebrados

PRESERVAÇÃO A CURTO PRAZO DO SÊMEN DE TELEÓSTEOS NEOTROPICAIS
DE ÁGUA DOCE

Simone Marques
Orientador: Dr. Hugo Pereira Godinho

Dissertação apresentada ao Mestrado de Zoologia de
Vertebrados, Pontifícia Universidade Católica de
Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do
título de Mestre em Zoologia.

Belo Horizonte – MG

2001

Esta dissertação foi realizada no Laboratório de Ictiologia do Mestrado de Zoologia de Vertebrados da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, sob orientação do Prof. Hugo Pereira Godinho e com auxílio das seguintes instituições:

- CAPES;
- Fazenda Mangueira, Buritizeiro, MG;
- Estação de Hidrobiologia e Piscicultura de Furnas, Furnas, MG;
- Estação de Hidrobiologia e Piscicultura de Três Marias - CODEVASF, Três Marias, MG;
- Estação de Pesquisa e Desenvolvimento Ambiental de Volta Grande da Companhia Energética de Minas Gerais, Volta Grande, MG.

“ A verdadeira viagem de descobrimento consiste
não em procurar novas paisagens
mas em possuir
novos olhos.”

Marcel Proust

Dedico este trabalho:

Aos meus pais, Sérgio e Helena.

Ao meu irmão Sérgio.

Ao meu namorado Rogério.

AGRADECIMENTOS

À Deus e todos os Anjos que me iluminaram durante esta jornada.

Ao orientador Prof. Hugo P. Godinho por todos ensinamentos, toda atenção, compreensão e carinho durante este trabalho.

A toda minha família que me incentivou nessa caminhada, em especial: padrinho Antônio, madrinhas Carime e Maria de Lourdes; Claudinha e Patrícia.

À minha grande amiga Andressa Vitória e toda sua família, em especial Cleusa e André, que me estimularam em todos os momentos deste trabalho.

À família do Rogério em especial: Maria Aparecida e Rogério, Ronaldo e Daniela, Rosângela e Adilson, Thiago e Gabriela, pela confiança e acompanhamento.

À toda equipe da Estação de Hidrobiologia e Piscicultura de Três Marias – CODEVASF, Três Marias – MG, em especial ao Yoshimi Sato por toda instrução, incentivo e pelas fotos cedidas a esse trabalho.

À toda equipe da estação de Hidrobiologia e Piscicultura de Furnas, Furnas – MG, em especial ao Dirceu M. Ribeiro por todo auxílio.

À toda equipe da Estação de Pesquisa e Desenvolvimento Ambiental de Volta Grande, Volta Grande – MG, em especial à bióloga Alessandra G. Bedore pelo acolhimento, troca de idéias e pela foto cedida a essa dissertação; ao José Lucas, Rubens e Daniel pela colaboração nas coletas.

À Fazenda Mangueira – Estação de Piscicultura – Buritizeiro – MG e toda a equipe, em especial ao Redelvin Dumont Neto pelo auxílio nas coletas.

Aos companheiros do mestrado: Ana Maria, Vânia, Baró, Bia, Vinícius, Stael e Paulo pelo acompanhamento, troca de idéias e experiências; Marcelo pelas fotos cedidas a esse trabalho; Daniella, Renata, Cibele, Vanessa, Taciana, Regianne, Rubinho, Túlio, Orion, e Geraldo por toda assistência durante o curso.

Aos estagiários Bruno, Luiz e Rafael por todo apoio durante este trabalho.

Aos professores do mestrado pelas colaborações e ensinamentos.

Aos funcionários do mestrado, em especial Clédima, Rogério, Giovanni e Helena pela atenção, solidariedade e carinho.

Ao técnico Miltinho do Laboratório de Bioquímica, PUC Minas, pela solidariedade no preparo das soluções.

Ao Prof. Gilmar B. Santos pela troca de idéias e colaboração nas análises estatísticas.

Aos colegas do Laboratório de Ictiologia – ICB – UFMG, Fábio pelo acompanhamento; Paulo pelo apoio e incentivo; Volney pela troca de materiais; e Carlos Bernardo pelo prestígio.

Aos professores do curso de Ciências Biológicas – PUC Minas, em especial Prof. José Enemir, Profa. Luciana, Profa. Virgínia, Prof. Cleiton, Prof. Bruno Garzon pela confiança e acompanhamento.

Ao colega André “Tuías” por todo incentivo.

Às colegas Fabiana e Rosy da pós-graduação de Biologia Celular, ICB – UFMG, pelos auxílios e trocas de experiências.

À CAPES pela bolsa de estudo.

A todos amigos e colegas não mencionados que de alguma forma colaboraram durante este trabalho,

meus eternos agradecimentos!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>Brycon lundii</i> (matrinchã).	24
Figura 2: <i>Brycon orbignyanus</i> (piracanjuba).	24
Figura 3: <i>Piaractus mesopotamicus</i> (pacu-caranha).	25
Figura 4: <i>Leporinus elongatus</i> (piauí-verdadeiro / piapara).	25
Figura 5: <i>Leporinus friderici</i> (piauí-três-pintas).	26
Figura 6: <i>Prochilodus lineatus</i> (curimatã).	26
Figura 7: <i>Prochilodus marggravii</i> (curimatã-pacu).	27
Figura 8: <i>Pseudoplatystoma coruscans</i> (surubim).	27
Figura 9: Captura das espécies (E. H. P. Três Marias – CODEVASF).	36
Figura 10: Seleção das espécies (E. H. P. Três Marias – CODEVASF).	36
Figura 11: Papila urogenital do surubim antes da coleta do sêmen (E.P.D.A Volta Grande).	37
Figura 12: Coleta do sêmen.	37
Figura 13: Recipientes para a preservação do sêmen: tubo Falcon; saco plástico inflado com ar ou oxigênio.	38
Figura 14: Caixas de isopor para a refrigeração do sêmen.	38
Figura 15: Desova de curimatã-pacu.	39
Figura 16: Pesagem dos ovos para a fertilização do sêmen preservado.	39
Figura 17: Mistura do sêmen preservado aos ovos.	40
Figura 18: Fertilização e hidratação dos ovos.	40
Figura 19: Incubadoras de 20 L (E. H. P. Três Marias – CODEVASF).	41
Figura 20: Incubadoras de 60 L (E. H. P. Três Marias – CODEVASF).	41

Figura 21: **A:** temperatura da caixa de isopor com gelo dentro de um caixa de isopor maior nos três dias de observações 1, 2, 3. **B:** temperatura da caixa de isopor isolada com gelo nos três dias de observações 1, 2, 3. **C:** temperatura da caixa de isopor com termogel congelado dentro de uma caixa de isopor maior nos quatro dias de observações 1, 2, 3, 4.

.....47

Figura 22: Teste de ativação do sêmen em soluções de NaCl em diferentes concentrações e em água pura ou destilada; ■ Taxa de motilidade espermática (%); □ Duração da motilidade espermática (s); **A:** PC- *Pseudoplatystoma coruscans*; **B:** PL - *Prochilodus lineatus*; **C:** PM2 - *Piaractus mesopotamicus*, da estação de Furnas; **D:** PMa – *Prochilodus marggravii*; **E:** BL - *Brycon lundii*; **F:** BO - *Brycon orbignyanus*; **G:** LE1 - *Leporinus elongatus*, da estação de Furnas; **H:** LE2 – *Leporinus elongatus*, da estação de Três Marias; **I:** LE2 - *Leporinus friderici*; **J:** PM1 – *Piaractus mesopotamicus*, da estação de Buritizeiro.

.....48-53

Figura 23: T: taxa de motilidade espermática (%) em diferentes tempos (h) após a coleta do sêmen de cada espécie estudada; D: duração da motilidade (s) em diferentes tempos (h) após a coleta do sêmen de cada espécie estudada; ■ Saco plástico inflado com ar ou oxigênio; □ Tubo sem adição de ar ou oxigênio.

.....54-57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Concentração espermática de algumas espécies neotropicais de água doce.	5
Tabela 2: Espécies utilizadas para o estudo de preservação a curto prazo de sêmen, sua origem e local de coleta.	28
Tabela 3: Número de indivíduos (N), peso corporal (PC) e comprimento total (CT) dos indivíduos de cada espécie.	29
Tabela 4: Aplicação de extrato bruto de hipófise em cada estação de piscicultura.	30
Tabela 5: Ensaios de temperatura em caixas de isopor com gelo localizada no interior da caixa de isopor maior.	78
Tabela 6: Ensaios de temperatura em caixa de isopor com gelo isolada.	78
Tabela 7: Ensaios de temperatura em caixas de isopor com termogel congelado localizada no interior da caixa de isopor maior.	78
Tabela 8: Teste de ativação do sêmen de cada espécie estudada.	79
Tabela 9: Motilidade e duração do sêmen preservado de <i>Piaractus mesopotamicus</i> ¹ .	80
Tabela 10: Motilidade e duração do sêmen preservado de <i>Prochilodus lineatus</i> .	80
Tabela 11: Motilidade e duração do sêmen preservado de <i>Piaractus mesopotamicus</i> ² .	81
Tabela 12: Motilidade e duração do sêmen preservado de <i>Pseudoplatystoma coruscans</i> .	81
Tabela 13: Motilidade e duração do sêmen preservado de <i>Brycon lundii</i> .	82
Tabela 14: Motilidade e duração do sêmen preservado de <i>Brycon orbignyanus</i> .	82
Tabela 15: Motilidade e duração do sêmen preservado de <i>Prochilodus marggravii</i> .	82
Tabela 16: Motilidade e duração do sêmen preservado de <i>Leporinus elongatus</i> ¹ .	83
Tabela 17: Motilidade e duração do sêmen preservado de <i>Leporinus elongatus</i> ² .	83
Tabela 18: Motilidade e duração do sêmen preservado de <i>Leporinus friderici</i> .	83

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Aplicações.....	1
1.2	Objetivos.....	2
1.2.1	Objetivo geral.....	2
1.2.2	Objetivos específicos.....	2
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1	Biologia do Sêmen.....	3
2.1.1	Plasma seminal.....	3
2.1.2	Espermatozóide.....	3
2.1.3	Produção espermática.....	4
2.1.4	Motilidade espermática.....	5
2.2	Preservação a Curto Prazo do Sêmen.....	7
2.3	Ambientes de Preservação.....	9
2.4	Avaliação da Qualidade do Sêmen Preservado.....	11
2.4.1	Soluções ativadoras do sêmen.....	13
2.4.2	Caracterização da motilidade espermática	14
2.5	Fertilização.....	16
2.6	Aspectos de Biologia Reprodutiva das Espécies Estudadas.....	17
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1	Peixes e sua Procedência.....	28
3.2	Captura e Seleção dos Peixes.....	28
3.3	Hipofisacão.....	29
3.4	Coleta do Sêmen.....	30
3.5	Contaminação do Sêmen.....	30
3.6	Resfriamento em Caixa de Isopor.....	30
3.6.1	Ensaio com gelo.....	31

3.6.2	Ensaio com termogel.....	31
3.7	Ativação da Motilidade Espermática.....	31
3.8	Preservação do Sêmen.....	32
3.9	Análise da Qualidade do Sêmen Preservado.....	33
3.10	Fertilização com Sêmen Preservado.....	33
3.11	Análises Estatísticas.....	34
4	RESULTADOS.....	42
4.1	Motilidade Espermática Inicial.....	42
4.2	Resfriamento em Caixa de Isopor.....	42
4.2.1	Resfriamento com gelo.....	42
4.2.2	Resfriamento com termogel.....	42
4.3	Ativação da Motilidade Espermática.....	43
4.4	Qualidade do Sêmen Resfriado.....	44
4.5	Fertilização com Sêmen Resfriado.....	46
5	DISCUSSÃO.....	58
5.1	Processos de Preservação do Sêmen a Curto Prazo.....	58
5.1.1	Temperatura de resfriamento.....	58
5.1.2	Recipientes utilizados no resfriamento.....	58
5.1.3	Uso de oxigênio e outros gases.....	59
5.1.4	Qualidade do sêmen fresco.....	60
5.1.5	Diluição do sêmen.....	60
5.2	Ativação da Motilidade Espermática.....	61
5.2.1	O espermatozóide no plasma seminal.....	61
5.2.2	Duração da motilidade.....	61
5.2.3	Soluções ativadoras.....	61
5.2.4	Caracterização da motilidade.....	62
5.2.4.1	Diluição.....	62
5.2.4.2	Estimativas da motilidade espermática.....	62
5.2.4.3	Temperatura do sêmen durante a análise.....	63

5.3	Qualidade do Sêmen Resfriado.....	63
5.3.1	Taxa de motilidade.....	63
5.3.2	Duração da motilidade.....	64
5.3.3	Tempo de viabilidade do sêmen.....	65
5.4	Fertilização com Sêmen Preservado.....	66
6	CONCLUSÕES.....	67
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
8	TABELAS EM ANEXO.....	77

RESUMO

A preservação de sêmen a curto prazo consiste na manutenção de sua viabilidade por período de horas ou dias em temperatura de refrigeração sem atingir o congelamento. O presente estudo visa aplicar esta tecnologia para o sêmen de espécies nativas brasileiras de água doce. Deste modo, avaliou-se a qualidade do sêmen preservado por curto período em ambientes resfriados com gelo e com ou sem oxigênio ou ar. As espécies doadoras foram: *Brycon lundii* (matrinchã), *Piaractus mesopotamicus* (pacu-caranha) oriundos de piscicultura particular; *P. mesopotamicus*, *Prochilodus lineatus* (curimatá), *Leporinus friderici* (piauí-três-pintas) e *Leporinus elongatus* (piapara) oriundos da Estação de Hidrobiologia e Piscicultura de Furnas, Furnas, MG; *Prochilodus marggravii* (curimatá-pacu) e *L. elongatus* da Estação de Hidrobiologia e Piscicultura de Três Marias, Três Marias, MG, *Pseudoplatystoma coruscans* (surubim/pintado) e *Brycon orbignyanus* (piracanjuba) da Estação de Pesquisa e Desenvolvimento Ambiental de Volta Grande, Volta Grande, MG. O sêmen coletado foi inicialmente submetido à análise para se evitar o uso de amostras eventualmente contaminadas por urina, fezes, sangue ou água e para estimar-se a taxa de motilidade espermática (%) e a sua duração (em segundos). Cada amostra de sêmen foi então dividida em duas alíquotas. A primeira foi colocada em saco plástico (10 x 20 cm) inflado com oxigênio ou ar e a outra em tubo plástico (12 ml de capacidade). Em seguida, as amostras foram estocadas em caixas de isopor (23 x 18 x 14 cm) sobre uma camada de gelo de 3 cm de altura ou sobre uma placa de termogel congelada. As caixas de isopor ficaram armazenadas dentro de outra maior (80 x 50 x 58 cm) para auxiliar na manutenção da temperatura e facilitar o transporte. O oxigênio ou ar e o gelo foram renovados a cada ~ 6h de intervalo, ocasião em que eram feitas as análises do sêmen. As determinações de taxa de motilidade e duração da motilidade foram feitas ao microscópio óptico, tendo o sêmen sido pré-diluído (1:100) com solução de NaCl 200 mM (previamente estabelecida como não ativadora da motilidade espermática). A ativação do sêmen foi feita em

soluções de NaCl 75, 50 e 25 mM (diluição 1:10, diluição final = 1:1000) em lâmina histológica previamente focalizada em 400x. As análises foram conduzidas até quando a taxa de motilidade espermática atingiu aproximadamente 15%. As taxas de motilidade espermática do sêmen preservado apresentaram queda gradual variando de 90 a 15% ao longo do experimento entre indivíduos da mesma espécie, entre espécies e entre intervalos de tempo. Não ocorreram diferenças significativas entre os dois ambientes de preservação para todos intervalos tempo ($p > 0,05$). Considerando-se a taxa de motilidade espermática de 30%, com a qual ainda se poderia ter aplicações práticas, alíquotas de sêmen de *L. elongatus* (Três Marias) e de *L. friderici* atingiram este valor 7 h após o início do experimento e o de *P. mesopotamicus*, 25-19 h. Ao final deste estudo realizaram-se ensaios de fertilização com sêmen preservado de *Prochilodus marginatus* na estação de Três Marias. As taxas de fertilização variaram de acordo com as incubadoras em que os ovos foram transferidos após a fertilização. Em incubadoras de 20 L obteve-se 38% de fertilização, enquanto em incubadoras de 60 L a taxa foi de 88 e 90%. Tais resultados sugerem que a técnica de preservação a curto prazo tem aplicações práticas vantajosas, especialmente no manejo reprodutivo em estações de piscicultura.

ABSTRACT

Short-term preservation of the milt from freshwater Neotropical teleosts

Short-term preservation of fish milt consists on keeping its viability for a period of hours or days at temperatures of refrigeration without reaching freezing. The species utilized in this work were: *Brycon lundii* (matrinchã), *Piaractus mesopotamicus* (pacu-caranha), *Prochilodus lineatus* (curimatá), *Prochilodus marggravii* (curimatá-pacu), *Leporinus friderici* (piauí-três-pintas), *Leporinus elongatus* (piapara/piauí-verdadeiro), *Pseudoplatystoma coruscans* (surubim/pintado) and *Brycon orbignyanus* (piracanjuba). The milt was initially analyzed to detect eventual contamination with urine, feces, blood or water. Each milt sample was split into two aliquots. The first was placed into a plastic bag (10x20 cm) blew with oxygen or air and the second in a plastic tube. Both aliquots were stored in Styrofoam boxes (23x18x14 cm) on a layer of ice of ~ 3 cm or on a frozen thermogel. The boxes were then placed in a larger box (80x50x58 cm). Oxygen or air and ice were changed at each ~ 6 h. At these times the rate and duration of spermatozoan motility were estimated in the microscope previously focused at 400x. For this, the milt was initially diluted to 1:100 (10 µL of milt: 1 mL of 200 mM NaCl solution, previously established as non-activator of the spermatozoa motility). A 25, 50 and 75 mM NaCl solutions were used as the activating solution (final dilution = 1:1000). Analyses were conducted until the rate of spermatozoa motility reached nearly 15%. The rate of spermatozoa motility showed gradual decline along the experiments. There was no significant difference between the preservation environments in all time intervals ($p < 0,05$). *L. elongatus* and *L. friderici* milt reached the motility rate of ~ 30% (rate considered still valuable for practical purposes) 7 h after the beginning of the experiment. Regarding the milt of *P. mesopotamicus*, that rate was reached at 19-29 h. Fertilization test using curimatá-pacu milt preserved for 8 h yielded 38-90% of viable embryos. These results suggest that short-term preservation have practical applications, especially on reproductive management at hatchery stations.

1 INTRODUÇÃO

A preservação do sêmen a curto prazo consiste na manutenção de sua viabilidade por um período de horas ou dias, usualmente em temperaturas de refrigeração, sem todavia atingir o congelamento e que, por isto, dispensa o uso de substâncias crioprotetoras.

As metodologias de preservação de sêmen a curto prazo existentes para algumas espécies de peixes de clima temperado (Stoss et al., 1978; Billard, 1980; Billard & Legendre, 1982; Fogli da Silveira et al.; 1984; Stoss & Refstie, 1983; Kavamoto et al., 1987; McNiven et al., 1993) são adequadas para uso em programas de rotina em reprodução. Por outro lado, a revisão de literatura elaborada para o presente trabalho não revelou publicações sobre preservação de sêmen a curto prazo em teleósteos neotropicais de água doce, com exceção de Ferraz de Lima et al. (1989), que realizaram preservação do sêmen de pacu-caranha (*Piaractus mesopotamicus*).

1.1 Aplicações

A preservação a curto prazo do sêmen de peixes é indicada para facilitar o manejo e aumentar a eficiência da reprodução artificial em estações de piscicultura. O armazenamento a curto prazo, variando de horas a semanas, é útil quando ocorre assincronia na maturação, no transporte dos gametas ou no uso seletivo de reprodutores (Stoss, 1983; Cóser, 1988).

A necessidade do armazenamento de gametas a curto prazo depende, dentre outros fatores, do tamanho e da finalidade da operação, seja ela aquicultura ou conservacionista, do manejo dos reprodutores e dos métodos de produção dos gametas (Rana, 1995). A coleta e o armazenamento do sêmen por vários dias permitem o uso de sêmen de melhor qualidade para atender aos acasalamentos desejados (McNiven et al., 1993).

A técnica de preservação de sêmen a curto prazo é bastante vantajosa, pois além de ser barata, permite que o sêmen assim preservado esteja apto à fertilização de ovos produzidos por fêmeas induzidas hormonalmente em vários intervalos de tempo, garantindo assim maior produtividade no processo de reprodução. Outras vantagens desta técnica são possibilitar o estudo de características do sêmen (Ciereszko & Dabrowski, 1994) e transportá-lo facilmente (Henderson & Dewar, 1959; Davy & Chouinard, 1980).

Dependendo das espécies e do estoque de reprodutores utilizados na propagação artificial, a coleta e sua preservação prévias facilitam a fertilização em massa, pois os gametas masculinos podem ser independentemente armazenados e usados posteriormente, enquanto as fêmeas ainda não ovularam.

A viabilidade dos gametas preservados a curto prazo depende da interação de vários fatores, cujo sucesso será influenciado pela variabilidade intrínseca dos gametas coletados, das técnicas de coleta e do processo de armazenamento.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo geral

Desenvolver tecnologia de preservação a curto prazo de sêmen de teleósteos neotropicais de água doce.

1.2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da manutenção do sêmen resfriado em atmosfera de ar ou oxigênio sobre a taxa de motilidade e sua duração.
- Testar a capacidade de fertilização de espermatozóides mantidos resfriados nessas condições.

2.1 **Biologia do Sêmen**

Estudos de biologia do sêmen de peixes começaram no século XIX. Várias características da biologia do sêmen de peixe foram rapidamente identificadas: a imobilidade do espermatozóide no sêmen, a curta duração do seu movimento após sua ativação e a necessidade de diluição em água para a iniciação do movimento do espermatozóide (Billard & Cosson, 1992). Essas características têm sido estudadas principalmente em salmonídeos e um pequeno volume de informação é disponível para outras espécies (Billard, 1990a).

2.1.1 **Plasma seminal**

A composição bioquímica do plasma seminal varia amplamente entre as espécies e entre indivíduos da mesma espécie, relacionando-se à diferentes concentrações de proteínas, enzimas, lipídios (Perchee et al., 1993; Lahnsteiner et al., 1996), açúcares e ácidos (Piironen & Hyvärinen, 1983), responsáveis pelo metabolismo do sêmen. Shimoda et al. (1999), em estudos da composição química do plasma seminal do pacu-carannha (*Piaractus mesopotamicus*) hipofisado, observaram que o pH do plasma ($8,74 \pm 0,17$) é superior ao verificado na maioria das espécies de peixes já estudadas. Obtiveram também as concentrações (em mmol/L) dos seguintes íons do plasma seminal: potássio ($37,3 \pm 4,1$), cálcio ($0,88 \pm 0,07$), magnésio ($0,73 \pm 0,09$), sódio ($83,1 \pm 9,4$), cloreto ($100,2 \pm 18,0$) e proteína ($0,732 \text{ mg/mL}$).

2.1.2 **Espermatozóide**

Os principais tipos de espermatozóides em peixes são: espermatozóides de fertilização externa, com ou sem acrossoma, uniflagelados ou biflagelados e espermatozóides de fertilização interna, com ou sem acrossoma, uniflagelados ou biflagelados (Jamieson & Leung, 1991). A forma da cabeça do espermatozóide varia

amplamente na maioria das espécies de peixes (Billard, 1990a). A carência do acrossoma na maioria dos teleósteos é compensada pela presença da micrópila, um orifício no córion do ovo para a penetração do espermatozóide. (Cosson et al., 1999).

Os espermatozóides de fertilização externa de teleósteos, os quais compreendem os analisados nesta dissertação, são uniflagelados e desprovidos de acrossoma. Segundo Jamieson & Leung (1991), esses espermatozóides caracterizam-se por possuir núcleo pequeno redondo ou ovóide com aproximadamente 2-3 μm de diâmetro. Apresentam 2 centríolos; o centríolo proximal é geralmente em ângulo reto ao centríolo distal que forma o corpo basal do flagelo. Pequenas mitocôndrias com cristas estão presentes em torno dos centríolos e da base do flagelo. A região contendo as mitocôndrias forma a peça intermediária com menos de 1 μm de tamanho. O flagelo contém um axonema com 9 microtúbulos duplos periféricos e 1 par de microtúbulos centrais. A membrana plasmática do flagelo estende-se com um, dois ou três processos longitudinais achatados (algumas vezes ausentes) considerados como nadadeiras.

2.1.3 Produção espermática

A produção espermática de peixes é muito alta, devido ao grande número de divisões espermatogoniais. Entretanto, é difícil obter-se uma verdadeira análise quantitativa da espermatogênese em teleósteos, especialmente naqueles em que o testículo é lobular (Billard, 1990c). Os peixes produzem quantidade variável de gametas. Em algumas espécies, o macho produz 100 bilhões de espermatozóides/ano/kg do peso corporal ou mais de 1×10^9 espermatozóides/g de testículo/dia, o que é 10 vezes maior do que a produção relatada para mamíferos (Billard, 1990a). A concentração espermática de algumas espécies neotrópicas de água doce encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1

Concentração espermática de algumas espécies neotropicais de água doce

Família Espécie – nome popular	Concentração espermática (espermatozóides x 10 ⁹ /mL)	Autor(es)
Família Characidae		
<i>Brycon orbignyanus</i> – piracanjuba	10 ± 4,3 – 14 ± 8,4	Bedore (1999)
<i>Salminus maxillosus</i> – dourado	4,3 – 10,8	Godinho & Cóser (1995)
<i>Piaractus mesopotamicus</i> – pacu-caranha	28,07 ± 8,2	Fogli da Silveira et al. (1990)
	7,1 – 11,1	Godinho & Cóser (1995)
	36,6 ± 16,5 – 48,1 ± 38,6	Bedore (1999)
Família Anostomidae		
<i>Leporinus elongatus</i> – piapara	7,0 – 16,0	Godinho & Cóser (1995)
<i>Leporinus obtusidens</i> – piapara	6,625 – 52,250	Murgas et al. (1999)
Família Prochilodontidae		
<i>Prochilodus lineatus</i> – curimatá	34,19	Kavamoto et al. (1986)
	13,3 – 20,5	Godinho & Cóser (1995)
<i>Prochilodus marggravii</i> – curimatá-pacu	19,2 – 26,6	Godinho & Cóser (1995)
Família Pimelodidae		
<i>Pseudoplatystoma coruscans</i> – surubim	8,0 – 16,0	Godinho & Cóser (1995)
<i>Rhamdia hilarii</i> – bagre	55,8	Fogli da Silveira et al. (1985)
	63,5	Kavamoto & Fogli da Silveira (1986)

2.1.4 Motilidade espermática

Estudos de motilidade espermática em peixes, com análises detalhadas, são ainda limitados e têm sido conduzidos somente a partir da década passada (Billard & Cosson, 1992). A maior parte dos estudos de regulação da ativação da motilidade de peixes foi feita com espermatozóides de truta. Os principais problemas limitantes de pesquisas em motilidade espermática consistem em sua curta duração, em sua rápida alteração e na dificuldade de se obter uma mistura homogênea do sêmen (Cosson et al., 1999).

A duração da motilidade espermática em teleósteos de água doce é muito curta (Legendre et al, 1996; Cosson et al., 1999) e muito variada entre as espécies: 300 s em

Salminus maxillosus (dourado), 612 s em *Prochilodus lineatus* (=scofa) (curimatá) (Cóser et al., 1984) e 30 s em *Oncorhynchus mykiss* (truta-arco-íris) (Perchec et al., 1993).

Ihering & Azevedo (1935) relataram que os espermatozóides de peixes que habitam águas paradas têm sempre vitalidade mais prolongada que aqueles provindos de peixes de águas correntes. Em consequência, a micrópila do ovo é mais facilmente alcançada quando a água movimenta os espermatozóides; em águas paradas é necessário mais tempo para o espermatozóide entrar em contato com o ovo.

A motilidade espermática, reprimida pela osmolaridade isotônica do plasma seminal, é iniciada pela diminuição ou aumento da osmolaridade do meio externo. Em teleósteos, os espermatozóides, que são imóveis no plasma seminal, têm a osmolaridade em torno de 300 a 350 mOsm/kg em espécies de água doce e salgada (Morisawa & Susuki, 1980). Legendre et al. (1996) avaliaram que a imobilidade do sêmen de silurídeos é resultado da pressão osmótica do fluido seminal como em ciprinídeos e não parece ser devido ao íon K^+ como acontece em salmonídeos. A hipotonicidade, segundo Stoss (1983), é um dos únicos fatores que pode explicar a indução da motilidade em peixes de água doce. Em muitos animais, a hipotonicidade é prejudicial à estrutura do espermatozóide e à motilidade espermática (Morisawa & Susuki, 1980; Maggese et al., 1984).

A energia para a motilidade e o metabolismo básico do espermatozóide são derivados de uma quebra de nutrientes exógenos e endógenos na presença ou ausência de oxigênio. Dados sobre o uso de oxigênio em espermatozóides de peixes de clima temperado são limitados (Stoss, 1983). A diminuição da capacidade de natação dos espermatozóides é originada em parte pela diminuição do estoque de energia ocorrida durante o período de motilidade (Billard, 1990b; Cosson et al., 1999). Em espermatozóide de peixes, a fosforilação oxidativa mitocondrial, que é altamente requerida para produzir energia durante a locomoção, permanece insuficiente para sustentar o armazenamento de ATP endógeno (Cosson et al., 1999).

Em estudos realizados por Perchec et al. (1993) com sêmen de truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), logo após a iniciação da motilidade, o ATP intracelular nos

espermatozóides diminuiu rapidamente e sua regeneração ocorreu espontaneamente dentro de 15 min. Lahnsteiner et al. (1993) verificaram que o espermatozóide de sêmen de truta arco-íris (*O. mykiss*) utiliza triglicérides e glicose como fonte primária de energia, mas o ATP continua sendo a fonte de energia mais importante para o batimento flagelar. Durante a imobilidade do espermatozóide, o catabolismo da glicose e do triglicéride pode ocorrer simultaneamente, e os parâmetros que regulam esta energia ainda são desconhecidos.

Alterações ultraestruturais no espermatozóide ocorrem após a iniciação da motilidade com o aumento ou a diminuição da osmolaridade. Várias distorções morfológicas foram observadas em 3 teleósteos marinhos quando o sêmen a fresco foi exposto à uma solução hipotônica, incluindo intumescência do núcleo, rompimento da membrana plasmática e desaparecimento de mitocôndria. Os flagelos perdem a membrana plasmática e os axonemas espiralizam-se, rompem-se ou aderem entre si. Assim, as lesões osmóticas à estrutura do espermatozóide podem constituir-se no fator limitante principal quanto à duração da motilidade espermática. Provavelmente a exaustão de energia (ATP) contida na mitocôndria restringe também a motilidade, tendo como hipótese que a mitocôndria seja o reservatório endógeno de fonte de energia para a motilidade de espermatozóides de peixes ovulíparos (Gwo, 1995).

2.2 Preservação a Curto Prazo do Sêmen

O uso de gelo para a preservação do sêmen de peixes de clima temperado é uma prática antiga (Barret, 1951; Billard & Legendre, 1982, Kavamoto et al., 1987). Assim, há registros de sêmen de salmonídeos armazenado em caixa térmica de madeira com gelo, em temperaturas entre 2 a 8 °C por período de horas a dias (Barret, 1951). O sêmen pode ser armazenado a 5 °C por períodos de poucos dias a várias semanas e a melhor estratégia é armazená-lo a fresco sem diluição (Harvey & Carolsfeld, 1993). A preservação a curto prazo do sêmen é um método menos estressante para prolongar a viabilidade dos espermatozóides do que manter os peixes capturados em tanques de manutenção, garantindo assim aplicações para propagações artificiais de estoque de descendentes naturais (Dilauro et al., 1994).

Moore (1987) observou que a espermição dos machos de *Stizostedion vitreum* é precoce e antecede vários dias à ovoposição das fêmeas, ocorrendo a redução da fertilidade em muitos machos quando as fêmeas iniciam a ovoposição. Diante disto, ele fez uma coleta do sêmen mais cedo e preservou-o, concluindo que a preservação do sêmen pode aumentar a eficiência na fertilização reduzindo o número dos machos, aumentando a fertilidade e diminuindo os custos operacionais.

Em peixes tropicais, a técnica de preservação do sêmen em baixas temperaturas tem sido pouco empregada. A única publicação relativa à preservação do sêmen de peixes brasileiros, obtida da revisão de literatura realizada para a presente dissertação, trata do sêmen do pacu-caranha (*Piaractus mesopotamicus*). Nesse trabalho demonstrou-se sua viabilidade em refrigerador doméstico com suplementação de oxigênio por 30 horas, com sobrevivência total (Ferraz de Lima et al., 1989).

Hara et al. (1982) armazenou sêmen diluído de "milkfish" (*Chanos chanos*) em temperatura entre 0 e 4 °C, em refrigerador doméstico, pelo período de 4 a 10 dias. Harvey & Kelley (1984) preservaram o sêmen de *Sarotherodon mossambicus*, diluído com gema de ovo e citrato a 5 °C por 18 dias. Dilauro et al. (1994) preservaram o sêmen de esturjão-do-atlântico (*Acipenser oxyrhyncus oxyrhyncus*) em saco plástico inflado com oxigênio, repostado diariamente, em caixas com capacidade de 34 L, por 5 dias.

O armazenamento *in vitro* de sêmen é feito usualmente por meio de refrigeração a 4-5 °C, sem diluição ou diluído em uma solução imobilizadora (Legendre et al., 1996). Wayman et al. (1997), com o armazenamento de sêmen de *Pogonias cromis*, observaram que a motilidade espermática do sêmen não diluído foi significativamente mais baixa do que em amostras pré-diluídas em diferentes concentrações de água salgada artificial ou HBSS (solução salina balanceada de Hanks).

Lahnsteiner & Patzner (1998) armazenaram o sêmen com gelo, pré-diluído com solução salina inibidora de motilidade de baixa osmolaridade para melhor utilização e

melhores condições de armazenamento, reduzindo a densidade do sêmen e melhorando o suprimento de oxigênio.

2.3 Ambientes de Preservação

O sucesso da preservação está relacionado com os ambientes em que o sêmen será armazenado, com a facilidade do seu manuseio no campo e o seu transporte. Procedimentos relativamente simples podem ser usados para preservar a curto prazo espermatozóides desde que eles permaneçam imóveis e inativos. Os fatores mais importantes para o sucesso da preservação são: redução de temperatura, oxigênio para trocas gasosas; prevenção de crescimento bacteriano (uso de antibióticos) e prevenção do ressecamento (Stoss, 1983; Cóser, 1988).

Assim, uma variedade de recipientes tem sido utilizada na preservação do sêmen a curto prazo. Henderson & Dewar (1959) mantiveram sêmen de truta marrom (*Salvelinus fontinalis*) em frascos de Erlenmeyer, diluído com solução Ringer em diferentes concentrações, cada um com gás carbônico reposto. Clemens & Hill (1969) preservaram o sêmen de “white bass” (*Morone chrysops*) em seringas por 38 dias. Billard (1981) usou sacos plásticos para o armazenamento do sêmen em seu experimento com sêmen de *Oncorhynchus mykiss* (= *Salmo gairdneri*) (truta-arco-íris). Estes sacos foram inflados com oxigênio sem risco de evaporação excessiva. Foi verificado, pelo mesmo autor, que o oxigênio atmosférico foi mais eficiente que o ar para o armazenamento do sêmen de truta-arco-íris, determinando assim que o ambiente do trato genital ou do testículo é mais favorável do que *in vitro*, e possivelmente o suprimento de oxigênio é mais homogêneo *in vivo* do que *in vitro*. Billard & Legendre (1982) obtiveram a taxa de fertilização maior com sêmen de truta-arco-íris armazenado com ar do que mantido com oxigênio.

Chereguini et al. (1997) preservaram sêmen de “turbot” (*Scophthalmus maximus*) em tubos plásticos mantidos horizontalmente a 6 °C com oxigênio, nitrogênio ou ar atmosférico. Wayman et al. (1998) armazenaram o sêmen de “red drum” (*Sciaenops ocellatus*) a 1 °C em tubos com capacidade de aproximadamente 50 ml.

A temperatura de acondicionamento é o principal fator que afeta a viabilidade dos gametas no armazenamento *in vitro*. Tal viabilidade pode ser prolongada quando o sêmen é mantido em temperaturas próximas de 0 °C, que reduzem a carga de seu metabolismo (Billard, 1990b). Truscott et al. (1968) armazenaram sêmen de salmão-do-atlântico não diluído a 2 °C por 5 dias, sem reduzir a capacidade de fertilização. Buyukhatipoglu & Holtz (1978) verificaram que o sêmen não diluído, armazenado a 4 °C sob oxigênio atmosférico, teve o melhor resultado retendo a capacidade de fertilização por 15 dias com a taxa de 80,6%. Hara et al. (1982) armazenaram amostras triplicadas de sêmen diluído de “milkfish” (*Chanos chanos*) em temperatura de 0 - 4 °C em refrigerador doméstico no período de 4 a 10 dias variando com o diluidor usado em cada amostra. No experimento de Ravinder et al. (1997), com de sêmen de carpa (*Cyprinus carpio*) preservado a curto prazo, os espermatozóides sustentaram a motilidade depois de 24 h armazenados a 5 °C.

Um dos pré-requisitos para o processo de preservação é o ambiente aeróbico (rico em oxigênio) no qual o sêmen ficará armazenado. Em altas concentrações de espermatozóides, uma rápida exaustão de oxigênio pode ocorrer durante curto período de armazenamento (Billard, 1981; McNiven et al., 1993).

Outra condição facultativa para prolongar-se a viabilidade do sêmen é o uso de antibióticos que deverão ser adicionados ao sêmen previamente diluído para se evitar contaminação por fungos ou bactérias (Rana, 1995).

Muitos autores que obtiveram sucesso na preservação do sêmen de teleósteos armazenaram o sêmen diluído com ajuste do pH da solução, mantendo os espermatozóides imóveis. O pH é fator importante, para se definir a natureza da motilidade espermática em diferentes diluidores utilizados como tampão (Billard et al., 1974). A redução da osmolaridade induz a ativação dos espermatozóides enquanto que a redução do pH (< 6) diminui o potencial da motilidade (Ravinder et al., 1997).

Moore (1987) diluiu o sêmen de “walleye” (*Stizostedion vitreum vitreum*) na proporção volumétrica de 1:2 e o pH do diluidor foi ajustado com NaOH. Ravinder et al.

(1997) diluíram uma alíquota de sêmen de carpa comum 150 vezes imediatamente após a coleta com 11 concentrações de diferentes componentes para cada alíquota, mantendo os espermatozóides quiescentes. E o efeito do pH no sêmen armazenado foi avaliado no sêmen diluído.

Guest et al. (1976) preservaram o sêmen de “channel catfish” (*Ictalurus punctatus*) a 4 °C por 9 semanas sem adição de crioprotetores, com avaliações semanais da motilidade espermática.

Stoss & Refstie (1983) mantiveram por mais de 10 dias o sêmen do salmão-do-atlântico (*Salmo salar*) armazenado a 0 °C em saco plástico com oxigênio atmosférico na proporção entre 1:50 e 1:120 (sêmen diluído : oxigênio), e com a presença de antibióticos. Depois de 24 dias a fertilidade foi completamente perdida.

Ciereszko & Dabrowski (1994) preservaram sêmen de “whitefish” (*Coregonus clupeaformis*) por 7 dias e truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) por 14 dias em frascos de Erlenmeyer cobertos por parafilme sobre gelo com oxigênio que foi renovado uma vez por dia.

2.4 Avaliação da qualidade do sêmen preservado

A qualidade do sêmen está intrinsecamente envolvida com o processo de sua coleta, pois no momento da extrusão o sêmen pode entrar em contato com urina ou fezes (Saad & Billard, 1995; Legendre et al., 1996), sangue e/ou água, identificados pelas variações de coloração (Fogli da Silveira et al., 1990). Desencadeia-se assim a motilidade espermática a qual interfere no processo de preservação do sêmen. A questão da idade do sêmen tem sido relatada em muitas espécies de peixes, pois mudanças na qualidade do sêmen têm sido associadas com o progresso da época reprodutiva (Stoss, 1983; Rana, 1995).

O sêmen preservado, composto de plasma seminal e espermatozóides imóveis, passa por etapas de diluições com soluções ativadoras para ser avaliado. A taxa de motilidade espermática, a duração da motilidade, a concentração espermática, a composição do plasma

seminal e a capacidade de fertilização são algumas das principais variáveis biológicas utilizadas por diferentes autores na avaliação da qualidade do sêmen (Rana, 1995). Para se processar a preservação, a taxa de motilidade adequada é acima de 90% (Cosson et al., 1999).

A diluição vem a ser a chave da imobilidade e motilidade dos espermatozóides, porque o volume do diluente adicionado determina a dinâmica de ativação. Uma diluição relativamente alta (1:1000) é necessária para iniciar a motilidade simultânea de 100% dos espermatozóides. Em baixas diluições somente alguns espermatozóides são ativados e outros vem a ser ativados progressivamente mais tarde (Billard & Cosson, 1992).

O processo baseia-se em duas etapas de diluição. Para a análise ao microscópio de luz, é necessária uma pré-diluição (100 vezes) do sêmen com a condição de não iniciar sua motilidade. A iniciação da motilidade é desencadeada na segunda etapa de diluição processada diretamente no microscópio, em que o sêmen pré-diluído é diluído 200 vezes. Nessas condições, observa-se ativação completa e homogênea do movimento dos espermatozóides (Billard & Cosson, 1992; Billard et al., 1993; Cosson et al., 1999).

O sêmen viscoso não se mistura facilmente com o diluente, sendo difícil obter suspensões homogêneas de espermatozóides, porque suas células têm a tendência de permanecer em pequenos grupos formando uma suspensão heterogênea (Cosson et al., 1999).

A concentração espermática é uma das medidas quantitativas mais importantes utilizadas na pesquisa e rotina para a avaliação do sêmen de animais de fecundação interna e externa, para maximizar o aproveitamento do material fecundante e para ter melhores resultados na fertilização (Fogli da Silveira et al., 1987).

Segundo Kavamoto & Fogli da Silveira (1986), as características seminais do bagre *Rhamdia hilarii*, coletado às margens do rio, revelam melhor qualidade e maior quantidade

de espermatozóides, quando comparados com exemplares mantidos em condições de laboratório.

A temperatura durante as observações da motilidade espermática é essencial para se obter uma melhor diluição e uma melhor análise do sêmen. Billard & Cosson (1992) observaram em sêmen de truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) que a frequência do batimento flagelar do espermatozóide e a duração da motilidade espermática variam com a temperatura, apresentando um aumento em temperaturas altas em torno de 21 °C.

2.4.1 Soluções ativadoras do sêmen

A motilidade espermática inicia-se em espécies marinhas quando a osmolaridade aumenta e para as dulcícolas quando ela diminui (Takai & Morisawa, 1995). O meio artificial, que induz boa ativação de espermatozóides sem expô-los a condições osmóticas extremas, promove o prolongamento da motilidade e do período de fertilidade (Lahnsteiner & Patzner, 1998; Cosson et al., 1999).

Várias soluções salinas têm sido utilizadas na ativação do sêmen de peixes. Quanto às espécies dulcícolas, destaca-se o original trabalho de Ihering & Azevedo (1935). Em experimentos com sêmen de curimatã (*Prochilodus argenteus*) (= *P. marggravii*), esses autores realizaram vários testes a respeito do teor de cloretos compatíveis com a ativação do sêmen utilizando: água pura; solução fisiológica de NaCl diluída (1/2, 1/4, 1/8); água salgada semelhante à água do mar; água pura com pH 4; água de açude com salinidade 0,8% e 0,137%; água oxigenada + solução fisiológica. As análises basearam-se na duração em minutos de espermatozóides móveis em cada solução utilizada até a morte desses ou na imobilidade dos mesmos.

Billard (1980) prolongou a motilidade espermática do sêmen de truta-arco-íris (*O. mykiss*) com solução ativadora de 0,01 e 0,001 M de teofilina. Apesar de ter prolongado a motilidade, esta foi mais baixa do que a motilidade normal em comparação com a solução controle sem teofilina.

Fogli da Silveira et al. (1990) estimaram a motilidade espermática de sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) com duas gotas de solução de bicarbonato de sódio a 1%.

Lahnsteiner et al. (1995) avaliaram a motilidade espermática da perca (*Perca fluviatilis*) ativando o sêmen com água destilada (pH 7.0), em soluções com NaCl, glicose e sacarose em várias osmolaridades (50 a 400 mosm/kg pH 7.5), em soluções de NaCl (100 mosm/kg) com diferentes valores de pH (6-9), e em soluções de NaCl contendo várias concentrações de potássio (KCl 10-40 mmol l⁻¹, osmolaridade final de 100-400 mosmol l⁻¹ pH 7.5). Em soluções de NaCl, a velocidade inicial do espermatozóide foi maior do que em água destilada, por outro lado a diminuição da velocidade espermática foi mais rápida do que em água.

Saad & Billard (1995), nas ativações da motilidade espermática do sêmen pré-diluído de *Silurus glanis* em NaCl 200 mM, Tri-HCl 30 mM, pH 7,0, com soluções de diferentes concentrações de NaCl e KCl, observaram que as soluções ativadoras de baixas concentrações de NaCl 55 mM e KCl 63 mM apresentaram as maiores taxas e durações da motilidade.

Ravinder et al. (1997) ativaram o sêmen de carpa comum (*Cyprinus carpio*), previamente diluído 150 vezes, com soluções de diferentes pressões osmóticas: água destilada (5mOsm), KCl (65mOsm), NaCl (200mOsm) e manitol (200mOsm), com 15, 30, 45, 60, e 75 segundos depois da ativação.

2.4.2 Caracterização da motilidade espermática

A duração da motilidade no meio natural varia amplamente entre as espécies e coincide em geral com o período fértil do espermatozóide (Cosson et al., 1999). Em razão do tamanho dos espermatozóides, análises de motilidade espermática de peixes têm sido conduzidas em microscopia de luz ou em contraste de fase com aumento de 100 a 650x, com variações entre os autores (Truscott, 1968; Kavamoto et al., 1985; Lahnsteiner et al., 1995; Wayman et al., 1997; Emri et al., 1998; Suquet et al., 1998; Wayman et al., 1998).

Modernamente, métodos de análise de motilidade espermática assistida por computador (CASA) têm sido utilizados (Ravinder et al., 1997).

Lahnsteiner et al. (1996), para analisar a motilidade do sêmen de *Alburnus alburnus*, realizaram uma pré-diluição em solução fisiológica salina (NaCl 75mM, KCl 70mM, CaCl₂ 2mM, MgSO₄ 1mM, Hepes 10mM, pH 8). A ativação do sêmen pré-diluído ocorreu depois de uma nova diluição na proporção de 1:40 em NaCl 50 mM tamponado com pH 9,0 com Tris 10 mM:20 µl de NaCl 50 mM.

A qualidade do sêmen em termos de motilidade espermática é usualmente expressa pela percentagem de espermatozóides móveis em sêmen adequadamente ativado. Maggese et al. (1984), na análise da 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. Fauvel et al. (1999) basearam-se na escala de 0 a 5, em que a escala 0 significava a imotilidade, 1- 0 a 20% de células móveis, 2 – 20 a 40%, 3 – 40 a 60%, 4 – 60 a 80%, e 5 – 80 a 100%. Fogli da Silveira et al. (1990) avaliaram a motilidade espermática de sêmen de pacu-caranha (*P. mesopotamicus*), sob microscopia de contraste de fase (400x), estimando a porcentagem de células móveis na escala de 0 a 100%. Kavamoto & Fogli da Silveira (1986) também usaram o mesmo método para avaliação da motilidade do sêmen de bagre (*Rhamdia hilarii*).

A motilidade espermática tem sido avaliada ao microscópio óptico mantido em temperatura ambiente (Billard et al., 1993). Lahnsteiner & Patzner (1998) investigaram a motilidade espermática de espécies marinhas à temperatura de 15 °C por resfriamento do microscópio. Suquet et al. (1998) estimaram a taxa de motilidade espermática do sêmen de “turbot” (*Scophthalmus maximus*) a uma temperatura ambiente (19 ±1 °C). Já Lahnsteiner et al. (1998) avaliaram a motilidade em seu experimento com resfriamento a 4,1 ± 1 °C do microscópio e das soluções salinas. Billard & Cosson (1992) relataram que o aumento da temperatura (amplitude de 5 para 26 °C) aumenta a frequência de batimentos de espermatozóides de truta e diminui a duração do movimento direcionado.

2.5 Fertilização

O desenvolvimento da inseminação artificial em peixes e o cultivo de salmonídeos iniciaram-se na metade do século XIX (Billard & Cosson, 1992). De Quatrefages (1853) relatou que seu interesse em espermatozóides de peixe foi uma resposta aos pedidos de pessoas envolvidas em criação de peixes. A técnica tradicional de inseminações ainda é usada em fazendas de peixes, consistindo simplesmente em colocar os espermatozóides e ovos juntos em um meio externo (água doce ou salgada). A eficiência desta técnica é limitada, particularmente no que se refere a economia de gametas: o esperma de um único macho pode fertilizar 1 a 5 fêmeas (Billard, 1990a).

Economicamente, a produtividade na aquicultura é amplamente dependente de um suprimento adequado de gametas, de ovos férteis e de peixes jovens. A produção artificial de gametas é necessária para compensar a degradação dos recursos naturais e satisfazer a demanda dos criadores de peixes. O investimento na pesquisa é necessário para aumentar o suprimento de gametas de peixes; para assegurar uma alta taxa de sobrevivência e para melhorar a taxa de crescimento de todas as espécies cultivadas (Davy & Chouinard, 1980).

Segundo Fogli da Silveira et al. (1988), a rotina de reprodução artificial com sêmen fresco ou congelado revela a possibilidade de limitar o estoque de machos na piscicultura intensiva, propiciando uma exploração mais racional de reprodutores geneticamente selecionados e uma redução nos custos de produção.

Os ovos da maioria dos teleósteos são fertilizados externamente. Depois de passar através da micrópila, o espermatozóide penetra na membrana plasmática. Este processo ocorre quando os espermatozóides são colocados diretamente em contato com os ovos. Contudo, de acordo com o diâmetro dos ovos, fica claro que cada espermatozóide tem pouca chance de alcançar a micrópila que é única em cada ovo, sendo necessário um grande número de espermatozóides para ocorrer a fertilização em cada ovo (Billard, 1990a). O número de espermatozóides necessários para a fertilizar um ovo de peixe é relativamente alto e depende da espécie, variando até mesmo entre as espécies. Quando a fertilização é obtida usando-se uma proporção relativamente baixa de espermatozóides:ovo, juntamente

com o fato da fertilização ocorrer durante um curto período de motilidade, indica que a espécie tem alta capacidade de fertilização (Rurangawa et al., 1998).

O processo da inseminação realizado por Poole & Dillane (1998) com sêmen de “truta marrom” (*Salmo trutta*) foi executado em 15 lotes de 200-400 ovos com fluido ovariano em cada container individual. Os ovos foram fertilizados imediatamente com 0,01 ml de sêmen, considerando que cada alíquota de sêmen era de um macho diferente para cada lote de ovos. Logo após este procedimento, 70 ml de água limpa foram adicionados e a solução foi gentilmente agitada por 30 s e lavada. A fertilização foi acima de 50%, com a proporção de espermatozóides por ovo maior que $3,8 \times 10^5$.

A viabilidade do sêmen preservado é determinada pela observação dos ovos embrionados após à fertilização (Lahnsteiner et al., 1998). Com isso, as condições mais adequadas para este sucesso varia entre as espécies de acordo com a qualidade do sêmen e dos ovos.

Existe uma interação significativa entre a idade do sêmen e os ovos. O sêmen da truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (= *Salmo gairdineri*) perde 25% de sua viabilidade depois de um dia e 10% durante os dias seguidos. Entretanto, a perda da fertilidade pode ser particularmente compensada pelo uso de grandes doses de sêmen (12×10^6 espermatozóides/ovo) (Carpentier & Billard, 1978). Fogli da Silveira et al. (1988), diante das condições experimentais no processo de fertilização de truta-arco-íris (*O. mykiss*), concluíram que duzentos mil espermatozóides foi o número mínimo necessário à fecundação de um ovo com uma taxa de fertilidade considerada ótima.

2.6 Aspectos de Biologia Reprodutiva das Espécies Estudadas

Segundo Lowe-McConnell (1999), do total mundial, 6.650 espécies de peixes são de água doce, e 93% destes são otofísios, caracterizados pela presença de ossículos weberianos, partes modificadas das vértebras anteriores que ligam a bexiga gasosa ao ouvido, estando envolvidos na detecção de sons subaquáticos e nas mudanças de pressão. E a maioria destes está representada pela série Teleostei.

As espécies do presente estudo pertencem às ordens Characiformes e Siluriformes - série Teleostei, conforme abaixo relacionadas:

Ordem Characiformes

Família Characidae

Brycon lundii Reinhardti, 1874 (matrinchã) (Figura 1)

Brycon orbignyanus Reinhardti, 1974 (piracanjuba) (Figura 2)

Piaractus mesopotamicus Holmberg, 1891 (pacu-caranha) (Figura 3)

Família Anostomidae

Leporinus elongatus Valenciennes, 1849 (piarara/piau-verdadeiro) (Figura 4)

Leporinus friderici Bloch, 1794 (piau-três-pintas) (Figura 5)

Família Prochilodontidae

Prochilodus lineatus (= *scrofa*) Valenciennes, 1836 (curimatá) (Figura 6)

Prochilodus marggravii Walbaum, 1792 (curimatá-pacu) (Figura 7)

Ordem Siluriformes

Família Pimelodidae

Pseudoplatystoma coruscans Agassiz, 1829 (surubim) (Figura 8)

***Brycon lundii* - matrinchã**

O matrinchã apresenta o corpo alto e comprimido laterolateralmente com uma mancha umeral bem evidente (Britski et al., 1988). Esta espécie migradora é endêmica do rio São Francisco (Fowler, 1950) e tem muita importância comercial (Sato, 1999). Seu período reprodutivo ocorre de novembro a fevereiro, apresentando desova total (Sato & Godinho, 1988). A fêmea atinge maturidade sexual em cativeiro com 3 anos, enquanto que os machos a atingem com 2 anos (Sato et al., 1997). Os estoques naturais de matrinchã estão bem reduzidos em algumas áreas do Rio São Francisco, devido à remoção da vegetação ribeirinha/mata ciliar (Sato & Godinho, em preparação). Esta espécie encontra-se na lista daquelas presumivelmente ameaçadas de Minas Gerais (Lins et al., 1997).

***Brycon orbignyanus* - piracanjuba**

Segundo Fowler (1950), esta espécie ocorre no rio Amazonas, alto Amazonas, no rio Paraguai, rio Uruguai. É peixe de piracema, com desova total (Vazzoler, 1996). Possui grande porte podendo atingir até 80 cm de comprimento e 8 kg de peso. Apresenta corpo fusiforme e comprimido, e boca ampla e terminal. O dorso é castanho-escuro e apresenta uma grande mancha negra na base do pedúnculo caudal, estendendo-se até os raios caudais medianos. A nadadeira caudal apresenta cor vermelha, com uma faixa mediana bem escura. Prefere ambientes lóticos de águas claras. É uma espécie que realiza migrações reprodutivas no período de novembro a janeiro. Os machos apresentam como caráter sexual aspereza na nadadeira anal, devido à presença de pequenas espículas na época da reprodução. O macho reproduz-se a partir dos dois anos de idade, e a fêmea a partir dos três anos. É um peixe apreciado na pesca esportiva devido ao seu comportamento agressivo e na comercial pelo sabor delicado e aparência rósea-salmão da carne (Companhia Energética de Minas Gerais & Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais, 2000). A desova desta espécie é do tipo total (Vazzoler, 1996). A motilidade espermática registrada durou cerca de 2 minutos (Godoy, 1975).

Esta espécie não é mais encontrada em vários trechos do rio Grande, estando vulnerável, devido à destruição da mata ciliar (Companhia Energética de Minas Gerais & Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais, 2000) e encontra-se na lista oficial de espécies ameaçadas de extinção (Lins et al., 1997).

***Piaractus mesopotamicus* - pacu-caranha**

Ocorre na América do Sul, nos rios da Prata e Paraguai (Fowler, 1950). Apresenta o flanco castanho ou cinza-escuro com o ventre mais claro; os indivíduos jovens (cerca de 150 mm) possuem máculas escuras no flanco. Em vida, o ventre é amarelo-dourado. O comprimento total atinge cerca de 500 mm (Britski et al., 1999).

O pacu-caranha é espécie de ambiente lótico e desova após um longo período de migração, no leito do rio, no período de outubro a dezembro, com mais frequência no mês de novembro. A desova ocorre apenas uma vez por ano (Ferraz de Lima et al., 1984). Em

cativeiro, adapta-se facilmente, entretanto não se reproduz naturalmente em ambientes confinados, necessitando ser induzida hormonalmente. Nestas condições de cultivo, o período reprodutivo desta espécie ocorre no final de novembro até o início de janeiro (Romagosa et al., 1988).

***Leporinus elongatus* - piapara/piau-verdadeiro**

É peixe de piracema, sendo de grande importância na pesca comercial e esportiva (Sato & Godinho, em preparação), com distribuição no rio São Francisco e rio Paraguai (Fowler, 1950). Apresenta corpo alongado nos exemplares maiores; boca em posição subinferior, cabeça alongada; corpo com 3 máculas arredondadas no flanco, sobre a linha lateral (pouco visíveis em indivíduos de grande porte). As nadadeiras pares são amareladas. O comprimento total atinge cerca de 500 mm (Britski et al., 1999).

Como peixe de piracema, a piapara macho se reproduz a partir do segundo ano de vida e a fêmea a partir do terceiro ano com desova total (Sato, 1999). O período reprodutivo estende-se de novembro a fevereiro, quando esta espécie encontra-se em cativeiro (Sato & Godinho, em preparação).

***Leporinus friderici* - piau-três-pintas**

O piau-três-pintas ocorre no rio Amazonas, alto Amazonas, rio Paraguai (Fowler, 1950). Esta espécie apresenta 3 máculas escuras bem nítidas, arredondadas ou horizontalmente alongadas sobre a linha lateral. Algumas escamas anteriores da série logo abaixo da linha lateral são alaranjadas ou avermelhadas. O comprimento corporal atinge cerca de 400 mm (Britski et al., 1999).

É um peixe de piracema, com hábitos migratórios registrados (Godoy, 1975). O tamanho no qual *L. friderici* inicia sua atividade reprodutiva em reservatórios varia de ano para ano, mas é similar para machos e fêmeas (Lopes et al., 2000). O macho se reproduz a partir do segundo ano de vida, e a fêmea o faz a partir do terceiro ano (Godoy, 1975). O período reprodutivo geralmente ocorre de setembro a abril, aparentemente, com táticas reprodutivas distintas em diferentes reservatórios (Lopes et al., 2000).

***Prochilodus lineatus* (= *scrofa*) - curimbatá**

O curimbatá ocorre no sudeste do Brasil, no rio Paraguai (Fowler, 1950). É um peixe de grande porte, podendo atingir até 70 cm, apresentando corpo comprimido e alto, e cabeça larga. A boca é circular, projetando-se um pouco para frente quando aberta, tendo lábios grossos e móveis, providos de numerosos dentículos diminutos em duas séries. As nadadeiras anal, ventrais, caudal e adiposa são escamadas na base, e são cinza-amareladas, sem manchas no adulto. O corpo apresenta-se de cor cinza-esverdeada, sendo mais escuro no dorso, com o ventre prateado. É encontrada em ambientes lóticos, porém de águas mais lentas.

É uma espécie migradora, com período reprodutivo de novembro a janeiro. O macho reproduz-se aos dois anos de idade e a fêmea aos três anos. É muito importante para a pesca comercial, artesanal ou de subsistência, apesar da carne não ser tão apreciada. Em cativeiro é necessário recorrer à hipofisacção da espécie, por esta não se reproduzir em ambientes lênticos (Companhia Energética de Minas Gerais & Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais, 2000). O tipo de desova desta espécie é total (Vazzoler, 1996).

***Prochilodus marggravii* - curimatá-pacu**

A espécie conhecida como curimatá-pacu é endêmica do rio São Francisco, de grande porte, podendo alcançar até 15 kg de peso corporal (Sato & Godinho, em preparação) e de grande importância para a pesca (Sato & Godinho, 1999). É possivelmente a espécie que atinge maior porte dentro dos Prochilodontidae. Apresenta corpo relativamente alto e muitas faixas transversais, às vezes completamente inconspícuas (Britski et al., 1988).

Esta espécie é de piracema (Sato & Godinho, 1999), apresentando desova total (Fontenele, 1953; Sato, 1999), com período reprodutivo de novembro a janeiro; machos e fêmeas atingem maturidade sexual com, respectivamente, 1 e 2 anos de idade (Sato & Godinho, em preparação).

***Pseudoplatystoma coruscans* - surubim**

O surubim ocorre na bacia Amazônica; rio São Francisco; rio da Prata (Argentina); rio Paraguai; rio Paraná; rio Uruguai, rio Pilcomayo (Bolívia) (Godoy, 1987). O gênero *Pseudoplatystoma* compreende os maiores peixes da família Pimelodidae e pode ser encontrado nas principais bacias hidrográficas sulamericanas, Amazônica, do Prata e São Francisco. *P. coruscans* pode ser encontrada na bacia do Prata e do São Francisco (Welcome, 1985; Petrere, 1995). Esta espécie é considerada o peixe de maior valor comercial no rio São Francisco (Sato & Godinho, em preparação), marcada pela alta qualidade de sua carne e sua marcante participação na pesca comercial nas diferentes regiões que ocorre (Marques, 1993).

Esta espécie apresenta palato com dentes, cabeça deprimida, boca larga, mandíbula mais curta do que a maxila, corpo longo e roliço, laterais do corpo com manchas arredondadas, e as nadadeiras dorsal e caudal com manchas menores que as laterais (Britski et al., 1988).

O surubim realiza grandes migrações reprodutivas de novembro a janeiro, quando as chuvas são intensas e a temperatura da água atinge seu pico (Sato et al., 1997). Em cativeiro, os machos alcançam a maturidade sexual com 3 anos de idade e peso corporal de 3-5 kg e as fêmeas com 3 a 4 anos e peso corporal de 8-12 kg (Sato & Godinho, em preparação). A desova é considerada do tipo total (Sato & Godinho, 1988).

A importância ecológica do surubim pode ser evidenciada pelo fato de ser o segundo maior peixe predador da bacia do Paraná e o primeiro da bacia do São Francisco e pela abundância em ambas. Outro aspecto relevante é o fato da espécie ocupar um habitat crescentemente alterado pelas ações antrópicas, com grandes riscos de desaparecimento (Marques, 1993). Encontra-se na lista das espécies presumivelmente ameaçadas de Minas Gerais (Lins et al., 1997).



Foto: Yoshimi Sato

Figura 1. *Brycon lundii* (matrinchã).



Foto: Alessandra Gomes Bedore

Figura 2. *Brycon orbignyanus* (piracanjuba).



Foto: José Eduardo Nunes de Queiroz

Figura 3. *Piaractus mesopotamicus* (pacu-caranha).



Foto: Marcelo Fulgêncio Guedes de Brito

Figura 4. *Leporinus elongatus* (piauí-verdadeiro / piapara).



Foto: José Eduardo Nunes de Queiroz

Figura 5. *Leporinus friderici* (piauí-três-pintas).



Foto: José Eduardo Nunes de Queiroz

Figura 6. *Prochilodus lineatus* (curimatá).



Foto: Yoshimi Sato

Figura 7. *Prochilodus marginatus* (curimatá-pacu).



Foto: Yoshimi Sato

Figura 8. *Pseudoplatystoma coruscans* (surubim).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Peixes e sua Procedência

As espécies utilizadas, nome popular, bacia hidrográfica de origem e local de coleta estão na Tabela 2. Essas espécies estão ilustradas nas Figuras 1 a 8.

Tabela 2

Espécies utilizadas para o estudo de preservação a curto prazo de sêmen, sua origem e local de coleta

Espécie	Nome popular	Bacia hidrográfica de origem	Local de coleta
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	pacu-caranha	Rio Paraguai	Buritizeiro ¹ Furnas ²
<i>Prochilodus lineatus</i> (= <i>scrofa</i>)	curimatá	Rio Grande	Furnas
<i>Pseudoplatystoma coruscans</i>	surubim/pintado	Rio Grande	Volta Grande ³
<i>Brycon lundii</i>	matrinchã	Rio São Francisco	Buritizeiro
<i>Brycon orbignyanus</i>	piracanjuba	Rio Grande	Volta Grande
<i>Prochilodus marggravii</i>	curimatá-pacu	Rio São Francisco	Três Marias ⁴
<i>Leporinus elongatus</i>	piapara/piau-verdadeiro	Rio Grande	Furnas
		Rio São Francisco	Três Marias
<i>Leporinus frederici</i>	piau-três-pintas	Rio Grande	Furnas

1 = Fazenda particular, em Buritizeiro, MG; 2 = Estação de Hidrobiologia e Piscicultura de Furnas, Alpinópolis, MG; 3 = Estação de Pesquisa e Desenvolvimento Ambiental de Volta Grande, Conceição das Alagoas, MG; 4 = Estação de Hidrobiologia e Piscicultura de Três Marias, Três Marias, MG.

3.2 Captura e Seleção dos Peixes

O período de coleta do sêmen das espécies do presente estudo compreendeu os meses de janeiro/2000, novembro/2000, janeiro e fevereiro/2001.

Os peixes utilizados pertenciam aos respectivos plantéis de reprodutores e eram utilizados rotineiramente nas atividades de reprodução destinadas à produção de alevinos.

O processo de captura foi realizado por arrasto com redes de emalhar (Figuras 9 e 10). Os peixes doadores de sêmen foram selecionados de acordo com a característica de vermelhidão da papila urogenital (Figura 11) e a liberação de sêmen por leve compressão da parede celômica. O número de doadores por espécie variou em cada local de coleta. O número de indivíduos (N), peso corporal (PC) e o comprimento total (CT) dos indivíduos de cada espécie foram registrados antes da coleta do sêmen (Tabela 3).

Tabela 3

Número de indivíduos (N), peso corporal (PC) e comprimento total (CT) dos indivíduos de cada espécie

Espécie – nome popular	N	PC (kg)	CT (cm)
<i>P. mesopotamicus</i> ¹ – pacu-caranha	2	2,5 ± 0,0	51,8 ± 0,4
<i>P. lineatus</i> - curimatá	6	1,5 ± 0,7	47,9 ± 6,0
<i>P. mesopotamicus</i> ² – pacu-caranha	6	3,0 ± 1,0	51,0 ± 4,6
<i>P. coruscans</i> – surubim	4	3,2 ± 0,4	79,0 ± 5,1
<i>B. lundii</i> – matrinhã	4	0,6 ± 0,1	37,4 ± 2,4
<i>B. orbignyanus</i> - piracanjuba	2	0,7 ± 0,1	39,5 ± 0,7
<i>P. marggravii</i> – curimatá-pacu	6	0,4 ± 0,2	32,8 ± 3,6
<i>L. elongatus</i> ¹ - piapara	6	1,5 ± 0,7	47,9 ± 6,0
<i>L. elongatus</i> ² – piau-verdadeiro	4	0,4 ± 0,1	34,1 ± 2,0
<i>L. friderici</i> – piau-três-pintas	5	0,5 ± 0,1	28,0 ± 9,5

P. mesopotamicus, 1 – Buritizeiro, 2 – Furnas; *L. elongatus*, 1 – Furnas, 2 – Três Marias.

3.3 Hipofisacão

A hipofisacão foi realizada com aplicação de extrato bruto de hipófise de carpa (Ihering, 1937), com modificações segundo a estação de piscicultura considerada. A dosagem hormonal, o número de aplicações e o tempo para a coleta do sêmen dependeu da metodologia utilizada em cada estação (Tabela 4). Para este processo, os peixes tiveram seus pesos registrados.

Tabela 4

Aplicação de extrato bruto de hipófise em cada estação de piscicultura

Estação de piscicultura	Número de aplicações	Dosagem (mg/kg de peso corporal)	Tempo para a coleta após o tratamento (h)
Buritizeiro	1	0,5	12
Furnas	1	3,0	14
Três Marias	1	2,5	14
Volta Grande	2	1 ^a aplicação – 0,5	24
		2 ^a aplicação – 5,0	

3.4 Coleta do sêmen

Para a coleta de sêmen, cada peixe foi envolvido por toalha umedecida, que auxiliava em sua contenção. Neste momento, o corpo do peixe e sua papila genital foram secos com toalha de papel, para se evitar possível contaminação com urina, fezes, sangue e/ou água. O peixe foi massageado levemente na parede celômica no sentido crânio-caudal (Figura 12). O sêmen extruído foi coletado em tubos Falcon (capacidade: 12 mL) e anotado o seu volume.

3.5 Contaminação do Sêmen

Imediatamente após a coleta, fizeram-se testes para avaliar eventuais contaminações por urina, fezes, sangue ou água. Para isso, uma gotícula do sêmen foi colocada em lâmina histológica, previamente focalizada, para observação ao microscópio de luz, em aumento de 100 ou 400x. Em caso de contaminação na coleta, identificada pela presença de motilidade espermática, este sêmen foi descartado. Em seguida, o sêmen viável foi misturado com água destilada para avaliar-se a taxa de motilidade espermática, tendo-se sido utilizado aqueles que apresentaram taxa superior a 80%.

3.6 Resfriamento em Caixa de Isopor

Com a finalidade de se registrar a temperatura de refrigeração à qual o sêmen foi submetido, fizeram-se ensaios de medição de temperatura em caixas de isopor pequenas (23 cm x 18 cm x 14cm) contendo gelo ou termogel congelado (termogel atóxico, com gel a

base de celulose vegetal). As temperaturas foram registradas com termômetro digital do tipo termopar (Digi-Sense, Cole & Parmer – EUA). As caixas pequenas foram armazenadas numa caixa de isopor maior (80cm x50 cm x 58 cm). Fizeram-se também os mesmos ensaios de medições de temperatura em caixa de isopor pequena com gelo, porém isolada, isto é, fora da caixa de isopor maior.

3.6.1 Ensaios com gelo

Para os ensaios de medição de temperatura das caixas de isopor com gelo, registraram-se as temperaturas durante 6 horas após o início do ensaio, com intervalos de hora em hora, tanto para as caixas que ficaram armazenadas na caixa de isopor maior quanto para a caixa que ficou isolada. Esses ensaios foram repetidos 3 vezes.

3.6.2 Ensaios com termogel

Os mesmos ensaios foram realizados para as caixas pequenas com termogel congelado. Os termogéis foram congelados para cada teste, à temperatura e tempo de congelamento diferentes. Esses ensaios foram repetidos 4 vezes, sendo que, no primeiro ensaio, a temperatura foi registrada durante 6 horas com uma hora de intervalo para cada leitura. Os outros três ensaios foram realizados com leituras durante 22 horas, com intervalo de uma hora nas primeiras 6 horas, de duas horas nas 6 horas seguintes e de seis horas nas últimas 12 horas.

3.7 Ativação da Motilidade Espermática

Após o teste de contaminação, o sêmen pré-diluído 1:100 em solução não ativadora (10 µl de sêmen : 1ml de solução diluidora de NaCl 200 mM) foi novamente diluído (~ 1 µl de sêmen pré-diluído : 10 µl da solução, diluição final de 1:1000) em soluções de diferentes concentrações de NaCl, isto é, 150, 100, 75, 50 e 25 mM, e em água destilada e/ou corrente para se avaliar, dentre estas, a melhor solução ativadora. Tal solução ativadora, que variou entre espécies, foi utilizada durante todas as análises de motilidade espermática. As variáveis avaliadas no exame de motilidade foram taxa de motilidade espermática (%) e sua duração (s).

3.8 Preservação do Sêmen

Cada amostra de sêmen coletado foi dividida em duas alíquotas de, aproximadamente, mesmo volume. Uma delas foi transferida para um saco plástico, de 10cm x 20cm, identificado e inflado com ar ou oxigênio oriundo de cilindro hospitalar (cilindro com capacidade de 315 k gf/cm², White-Martins), na proporção de volume:volume (mL) entre 1:110 e 1:440 (sêmen : ar ou oxigênio) e lacrado com fio plástico. A outra alíquota permaneceu no tubo Falcon original, também identificado (Figura 13). Em seguida, tanto o tubo quanto o saco plástico contendo sêmen foram estocados em uma caixa de isopor média (43 cm x 35 cm x 24 cm) ou em caixas de isopor pequenas (23 cm x 18 cm x 14cm) sobre uma camada de gelo de aproximadamente 3cm de altura ou sobre uma placa de termogel congelada. Cada uma destas caixas de isopor pequena comportou, no máximo, quatro sacos inflados ou seis tubos. Para auxiliar na manutenção da temperatura e facilitar o transporte das caixas pequenas, estas foram armazenadas em outra caixa de isopor maior (80cm x 50 cm x 58 cm) (Figura 14). O ar ou oxigênio contido dentro dos sacos plásticos e o gelo foram renovados em cada análise de motilidade do sêmen. A placa de termogel, quando descongelada, foi substituída por outra congelada, em intervalo de aproximadamente 12 horas.

As alíquotas de sêmen de *P. mesopotamicus* (Buritizeiro) e de *B. lundii* foram armazenadas em sacos plásticos inflados com ar enquanto que as alíquotas de sêmen das demais espécies foram armazenadas em sacos plásticos inflados com oxigênio. As alíquotas de sêmen de *P. mesopotamicus* (Buritizeiro) e de *B. lundii* foram refrigeradas sobre uma camada de gelo na caixa de isopor média de 43 cm x 35 cm x 24 cm.

As alíquotas de sêmen de *P. mesopotamicus* (Furnas), *P. lineatus*, *L. elongatus* (Três Marias), *L. elongatus* (Furnas) e *L. friderici* foram refrigeradas sobre uma camada de gelo nas caixas de isopor pequenas (23 cm x 18 cm x 14cm) armazenadas na caixa de isopor maior (80cm x 50 cm x 58 cm). As alíquotas de sêmen de *P. coruscans* e *B. orbignyianus* foram refrigeradas sobre placas de termogel congeladas nas caixas de isopor pequenas armazenadas na caixa de isopor maior.

3.9 Análise da Qualidade do Sêmen Preservado

O sêmen preservado foi avaliado através da taxa de motilidade e do tempo de duração da motilidade, com intervalo aproximado de 6 h entre as análises. Para isto, alíquotas de sêmen de cada tubo e de cada saco foram previamente diluídas tal como no teste de seleção de solução ativadora. Em seguida, fez-se uma segunda diluição de 1:10 (1 µl de sêmen previamente diluído:10 µl de solução ativadora selecionada) sobre lâmina histológica previamente focalizada ao microscópio óptico, 100 ou 400x. Assim, a diluição final do sêmen foi de 1:1000. A partir deste momento, o cronômetro foi ativado para registrar a duração da motilidade do espermatozóide. A taxa de motilidade de 0 a 100% estimada por um único observador e a duração da motilidade dos espermatozoides foram avaliados nesta ocasião. Finalmente, o experimento encerrou-se quando a taxa de motilidade foi inferior a ~ 30%.

3.10 Fertilização com Sêmen Preservado

Dois ensaios de fertilização foram realizados na Estação de Hidrobiologia e Piscicultura de Três Marias, da CODEVASF, em Três Marias, MG, nos quais utilizou-se sêmen preservado de *Prochilodus marginatus* (curimatá-pacu) em fevereiro/2001. Os ensaios de fertilização foram realizados com ovos de curimatá-pacu obtidos por hipofização, conforme a rotina da Estação (Sato et al., 1996).

No primeiro ensaio, alíquotas de sêmen foram coletadas de 2 peixes, 14 horas após a hipofização, em tubos plásticos de Falcon (capacidade: 12 ml). Em seguida, foram feitos testes de contaminação e a estimativa da taxa (%) e da duração (s) da motilidade espermática. Utilizou-se para isso NaCl 50 mM como solução ativadora, considerada a melhor nos testes previamente realizados.

As alíquotas de sêmen permaneceram nos tubos plásticos refrigerados em caixas de isopor, tal como descrito anteriormente, sobre placas de termogel congeladas, por 8 h antecedendo à fertilização. Cerca de 1 h antes da fertilização, fez-se a análise de motilidade espermática estimando-se sua taxa (%) e duração(s).

Após a desova (Figura 15), duas alíquotas de 10 g de ovos cada foram colocadas, respectivamente, em 2 copos plásticos (capacidade: 200 ml) (Figura 16). Em seguida, adicionaram-se 0,5 ml de sêmen fresco (controle) e 0,5 ml do sêmen preservado, respectivamente em cada copo, ativando-se o sêmen com 10 ml de NaCl 50 mM. Os copos foram levemente agitados por poucos minutos e lavados, algumas vezes, com água das incubadoras para as quais seriam transferidos. Finalmente, os ovos de cada copo, já hidratados, foram transferidos para incubadoras (capacidade: 20 L, com água circulante proveniente de poço artesiano) (Figura 19).

No segundo ensaio, um pool de 1,5 mL do mesmo sêmen preservado foi utilizado para fertilizar 241g de ovos. Para isso, os ovos e o sêmen, colocados juntos numa bacia plástica, foram levemente misturados e acrescidos de água das incubadoras (capacidade: 60 L, com água circulante proveniente do rio) para fertilização (Figuras 17 e 18). Após lavagem e hidratação, os ovos foram então repartidos em duas porções e transferidos para 2 incubadoras de 60 L (Figura 20).

Coletaram-se amostras de ovos de cada incubadora cerca de 5 h após a fertilização, as quais foram imediatamente transferidas para frascos plásticos (capacidade = 25 mL) e fixadas em solução tamponada de formol a 4%. A percentagem de ovos viáveis foi estabelecida após sua identificação ao estereomicroscópio, no laboratório do Mestrado de Zoologia de Vertebrados – PUC- Minas.

3.11 Análises Estatísticas

Utilizou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney (Statsoft, 1996) para analisar a taxa (%) de motilidade espermática nos 2 ambientes de preservação do sêmen: saco plástico, com ar ou oxigênio, e tubo plástico. Este teste foi aplicado ao mesmo tempo de análise correspondente a cada ambiente simultaneamente ($\alpha = 0,05$). O mesmo teste foi aplicado para a duração (s) da motilidade espermática, ao mesmo nível de significância.

Aplicou-se também o teste não paramétrico Kruskal – Wallis (Statsoft, 1996) para detectar diferenças significativas nas taxas de motilidade espermática em todos os tempos de análise de cada ambiente de preservação ($\alpha = 0,05$). O mesmo teste foi aplicado para a duração (s) da motilidade espermática entre todos os intervalos de análise, para o mesmo nível de significância.



Foto: Marcelo Fulgêncio Guedes de Brito

Figura 9. Captura das espécies (E. H. P. Três Marias – CODEVASF).



Marcelo Fulgêncio Guedes de Brito

Figura 10. Seleção das espécies (E. H. P. Três Marias – CODEVASF).



Foto: Simone Marques

Figura 11. Papila urogenital do surubim antes da coleta do sêmen (E.P.D.A Volta Grande).



Foto: Hugo Pereira Godinho

Figura 12. Coleta do sêmen.



Foto: Simone Marques

Figura 13. Recipientes para a preservação do sêmen: tubo Falcon; saco plástico inflado com ar ou oxigênio.



Foto: Simone Marques

Figura 14. Caixas de isopor para a refrigeração do sêmen.



Foto: Marcelo Fulgêncio Guedes de Brito

Figura 15. Desova de curimatá-pacu.

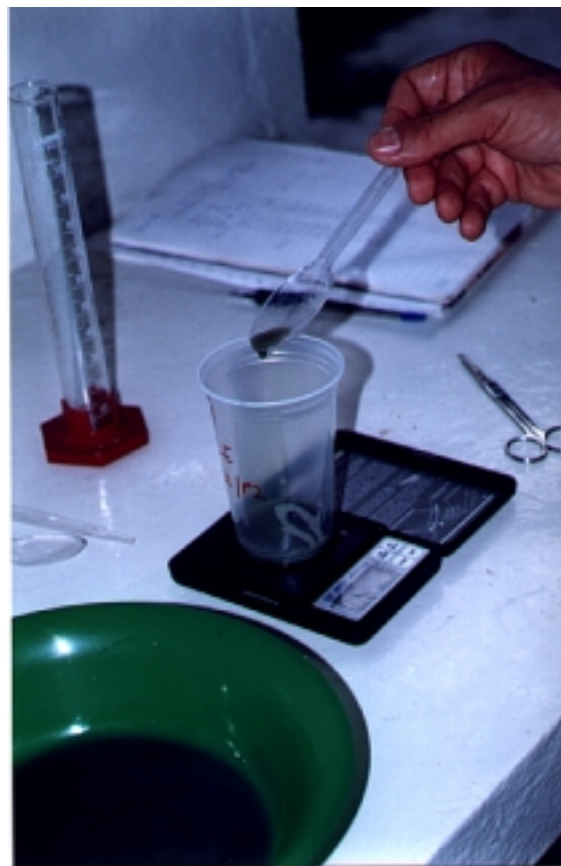


Foto: Marcelo Fulgêncio Guedes de Brito

Figura 16. Pesagem dos ovos para a fertilização do sêmen preservado.



Foto: Simone Marques

Figura 17. Mistura do sêmen preservado aos ovos.



Foto: Marcelo Fulgêncio Guedes de Brito

Figura 18. Fertilização e hidratação dos ovos.



Foto: Simone Marques

Figura 19. Incubadoras de 20 L (E. H. P. Três Marias – CODEVASF).



Foto: Simone Marques

Figura 20. Incubadoras de 60 L (E. H. P. Três Marias – CODEVASF).

4 RESULTADOS

4.1 Motilidade Espermática Inicial

Os espermatozóides do sêmen das espécies utilizadas apresentaram-se imóveis por ocasião da coleta. Imediatamente após ativação com água destilada, foram utilizados aqueles com taxas de motilidade acima de 80%.

4.2 Resfriamento em Caixa de Isopor

4.2.1 Resfriamento com gelo

Os três ensaios de medição de temperatura realizados na caixa de isopor pequena contendo gelo e armazenada na caixa de isopor maior apresentaram temperaturas crescentes de 0,5 a 2,9 °C no intervalo de 0 a 6 horas após o início dos ensaios. A temperatura ambiente durante a realização dos três ensaios foi de $24,0 \pm 1,7$ °C (Figura 21 A).

Os três ensaios de medição realizados na caixa de isopor pequena contendo gelo porém mantida fora da caixa maior, à temperatura ambiente, apresentaram temperaturas crescentes de -2,1 a 9,3 °C no intervalo de 0 a 6 horas após o início dos ensaios. A temperatura ambiente durante a realização desses ensaios foi de $23,3 \pm 1,1$ °C (Figura 21 B).

4.2.2 Resfriamento com termogel

As medições realizadas em caixas de isopor pequenas com termogel, em substituição ao gelo, armazenadas na caixa de isopor maior, apresentaram poucas variações de temperatura nos quatro ensaios realizados com diferentes tempos e temperaturas de congelamento. As temperaturas foram registradas no intervalo de 0 a 6 horas no primeiro ensaio, e de 0 a 22 horas nos três últimos ensaios.

No primeiro ensaio, em que as placas de termo gel foram congeladas a $-28,5^{\circ}\text{C}$ por tempo indeterminado (> 24 h), as temperaturas registradas variaram de $-0,5$ a $9,4^{\circ}\text{C}$ 6 h após o início do experimento. O segundo ensaio, em que a temperatura de congelamento do termogel foi de $-12,4^{\circ}\text{C}$ por 12 horas, as temperaturas registradas tiveram a variação de $4,6$ a $11,5^{\circ}\text{C}$ após 22 h de observações. No terceiro ensaio com a temperatura de congelamento do termogel de $-20,3^{\circ}\text{C}$, por 12 horas, as temperaturas registradas variaram de $4,6$ a $18,1^{\circ}\text{C}$ em 22 h de observações. Finalmente, o quarto ensaio, com temperatura de congelamento de $-14,3^{\circ}\text{C}$, por 12 horas, apresentou variações de $3,7$ a $10,4^{\circ}\text{C}$, também após 22 h. A temperatura ambiente durante a realização desses quatro ensaios foi de $21,5 \pm 2,2^{\circ}\text{C}$ (Figura 21 C).

4.3 Ativação da Motilidade Espermática

O ensaio de ativação da motilidade espermática revelou que o sêmen de todas as espécies estudadas manteve-se imóvel quando diluído em solução de NaCl 200 mM. Nas soluções de molaridades decrescentes ocorreram, correspondentemente, taxas crescentes de motilidade espermática até que o pico fosse alcançado. Todavia, a curva de atingimento do pico variou entre as espécies, podendo ser reconhecidos 4 grupos.

Assim, no 1º grupo, constituído por surubim e curimatá, o sêmen não foi ativado nas soluções de 150 e 100 mM tendo atingido taxas altas nas soluções restantes. No 2º grupo (pacu-caranha de Furnas e curimatá-pacu), a solução de NaCl 150 mM, diferentemente do grupo anterior, foi capaz de ativar o sêmen; quando diluído em NaCl 100 mM e nas demais, as taxas de motilidade atingiram valores superiores a 75%. No 3º grupo, constituído por matrinhã, piracanjuba, piauí-verdadeiro e piapara, a taxa de motilidade em NaCl 150 mM foi nula e nas demais ela foi crescente, até alcançar o pico. No 4º grupo, formado pelo piauí-três-pintas e pacu-caranha (Buritizeiro), a diferença em relação ao grupo anterior esteve relacionada à apresentação de taxa de ativação de 10% em NaCl 150 mM (Figura 22, de A a J).

Quanto à duração da motilidade nas diferentes soluções ativadoras, os resultados foram variáveis, não apresentando por conseguinte, padrões de duração.

A melhor solução ativadora da motilidade espermática, isto é, aquela na qual o sêmen atingiu maior taxa de motilidade associada ao maior tempo de duração desta, para a maioria das espécies estudadas foi NaCl 50 mM, com exceção da piapara, para a qual a melhor solução ativadora foi NaCl 25 mM e do surubim em que a melhor solução ativadora foi NaCl 75 mM (Figura 22; Tabela 8).

4.4 Qualidade do Sêmen Resfriado

As taxas de motilidade espermática do sêmen resfriado apresentaram queda gradual, de 90% para 10% ao longo do experimento, ocorrendo variação entre espécies, entre indivíduos da mesma espécie e entre os tempos de avaliação (Figura 23, de A a J). Não ocorreram diferenças significativas entre os dois ambientes de preservação, isto é, saco plástico inflado com ar ou oxigênio e tubo plástico em todos os tempos avaliados ($p > 0,05$), exceto para o sêmen de piau-verdadeiro e curimatá-pacu ($p < 0,05$). As diferenças entre os valores obtidos em cada tempo para cada ambiente não foram significativas para a maioria das espécies ($p > 0,05$), com exceção do pacu-caranha de Buritizeiro e da piracanjuba ($p < 0,05$). A seguir são apresentados os dados obtidos por espécie em ordem decrescente de duração da motilidade.

Sêmen de *P. mesopotamicus* - pacu-caranha

O sêmen de pacu-caranha, coletado em Buritizeiro, 29 h após seu acondicionamento apresentou taxa de motilidade de $40,0 \pm 42,4$ % em saco plástico com ar e $40,0 \pm 14,1$ % em tubo plástico (Figura 23 A1, Tabela 9). Para o sêmen de pacu-caranha, oriundo de Furnas, as taxas de motilidade encontravam-se em $38,0 \pm 16,0$ % para saco com oxigênio e $24,0 \pm 17,7$ % para tubo, 19 h após o início do armazenamento (Figura 23 C1, Tabela 11).

Sêmen de *P. lineatus* - curimbatá

O sêmen de curimbatá, após 20 h de resfriamento, apresentou taxa de motilidade final de $34,0 \pm 20,1\%$ para saco com oxigênio e $24,0 \pm 16,2\%$ para tubo (Figura 23 B1, Tabela 10).

Sêmen de *P. coruscans* - surubim

O sêmen de surubim, ao completar 18 h de resfriamento, apresentou taxa de motilidade espermática de $28,0 \pm 22,1\%$ no saco com oxigênio e $25,0 \pm 19,1\%$ no tubo (Figura 23 D1, Tabela 12).

Sêmen de *B. lundii* - matrinhã

O sêmen de matrinhã reduziu a taxa de motilidade espermática para $40,0 \pm 25,8\%$ no saco com ar e para $10,0 \pm 8,1\%$ no tubo após 14 h de resfriamento (Figura 23 E1, Tabela 13).

Sêmen de *B. orbignyanus* - piracanjuba

Após 12 h de resfriamento, o sêmen de piracanjuba apresentou taxa de motilidade espermática de $50 \pm 0,0\%$ no saco com oxigênio e $25 \pm 7,0\%$ no tubo (Figura 24 F1, Tabela 14).

Sêmen de *P. maggravii* - curimatá-pacu

O sêmen de curimatá-pacu, após 12 h de resfriamento, atingiu a taxa de motilidade espermática de $43,0 \pm 24,0\%$ no saco com oxigênio e $42,0 \pm 10,0\%$ no tubo (Figura 24 G1, Tabela 15).

Sêmen de *L. elongatus* - piapara (Furnas)/piauí-verdadeiro (Três Marias)

O sêmen de piapara, coletado em Furnas, permaneceu 8 h resfriado, apresentando após este tempo, a taxa de motilidade espermática de $13,0 \pm 17,1\%$ para saco com oxigênio e de $16 \pm 30,5\%$ para tubo (Figura 24 H1, Tabela 16). O sêmen da mesma espécie, coletado em Três Marias, durou 7 h resfriado, quando a taxa de motilidade espermática havia

alcançado $25,0 \pm 5,8\%$ em saco com oxigênio e $5,0 \pm 4,1\%$ no tubo (Figura 24 I1, Tabela 17).

Sêmen de *L. friderici* - piau-três-pintas

O sêmen de piau-três-pintas de Furnas, após 7 h de resfriamento, tanto para saco com oxigênio quanto para tubo, apresentou a taxa de motilidade espermática final de $28,0 \pm 13,0 \%$ para saco com oxigênio e de $34,0 \pm 16,7\%$ para tubo (Figura 24 J1, Tabela 18).

A duração da motilidade entre as espécies estudadas variou de 24 a 88 s considerando-se todos os intervalos de tempo em que foi obtida (Tabelas 9 a 18). Ela apresentou diferenças significativas entre os dois ambientes de armazenamento ($p < 0,05$) em cada tempo analisado, com exceção para o sêmen de pacu-caranha, de Furnas, no tempo de 13 h após a coleta e para o sêmen de matrinhã no tempo de 14 h após a coleta (Figura 23 C2 e E2).

A duração da motilidade não mostrou variações significativas ($p > 0,05$) entre os intervalos de análise para a maioria das espécies (Figura 23). Entretanto, houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre todos os intervalos de análise para o sêmen de pacu-caranha, de Furnas (Figura 23 C2), para o sêmen de curimatá e de piau-três-pintas armazenados no saco plástico (Figura 23 B2 e J2) e para o sêmen de matrinhã armazenado no tubo (Figura 23 E2).

4.5 Fertilização com Sêmen Resfriado

A taxa de fertilização dos ovos de curimatá-pacu utilizando-se sêmen resfriado em incubadoras de 20 L, foi de 38%, enquanto no controle (fertilizado com sêmen fresco) foi de 25%. Por outro lado, as taxas de fertilização dos ovos com sêmen resfriado, nas incubadoras de 60 L, foi de 88 e 90%, respectivamente.

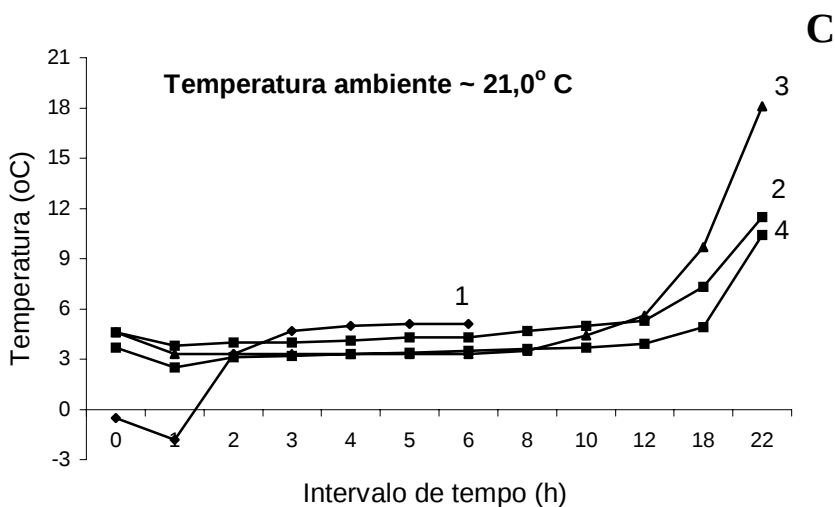
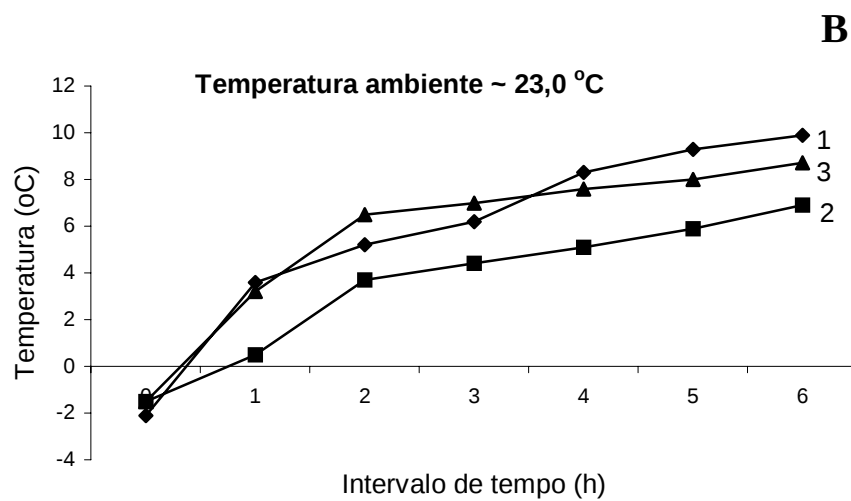
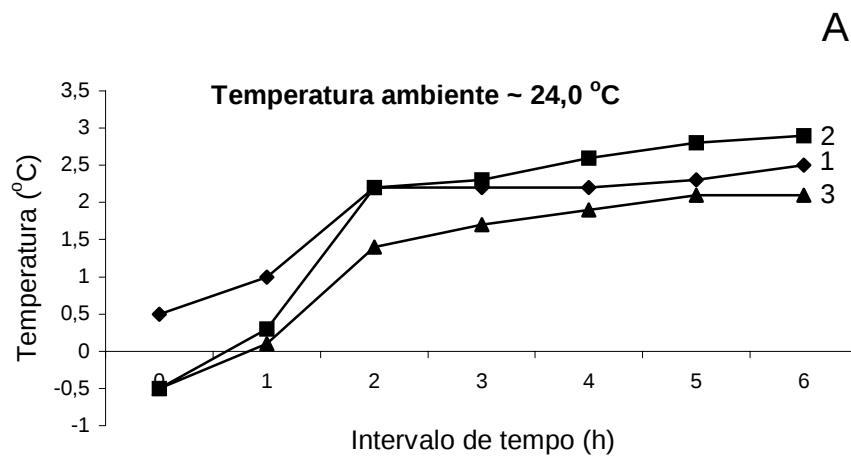


Figura 21 - **A**: temperatura da caixa de isopor com gelo dentro de um caixa de isopor maior nos três dias de observações 1, 2, 3. **B**: temperatura da caixa de isopor isolada com gelo nos três dias de observações 1, 2, 3. **C**: temperatura da caixa de isopor com termogel congelado dentro de uma caixa de isopor maior nos quatro dias de observações 1, 2, 3, 4.

Figura 22:

- Teste de ativação do sêmen em soluções de NaCl em diferentes concentrações e em água pura ou destilada;
- ■ Taxa de motilidade espermática (%);
- □ Duração da motilidade espermática (s);
- A: PC- *Pseudoplatystoma coruscans*;
- B: PL - *Prochilodus lineatus*;
- C: PM2 - *Piaractus mesopotamicus*, da estação de Furnas;
- D: PMa – *Prochilodus marggravii*.

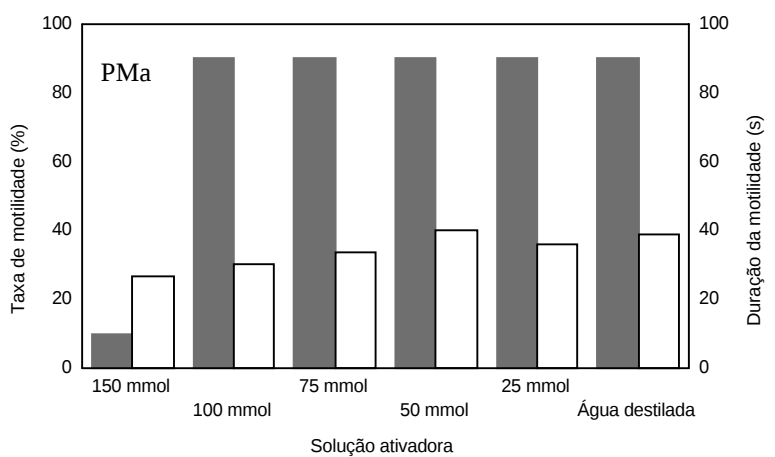
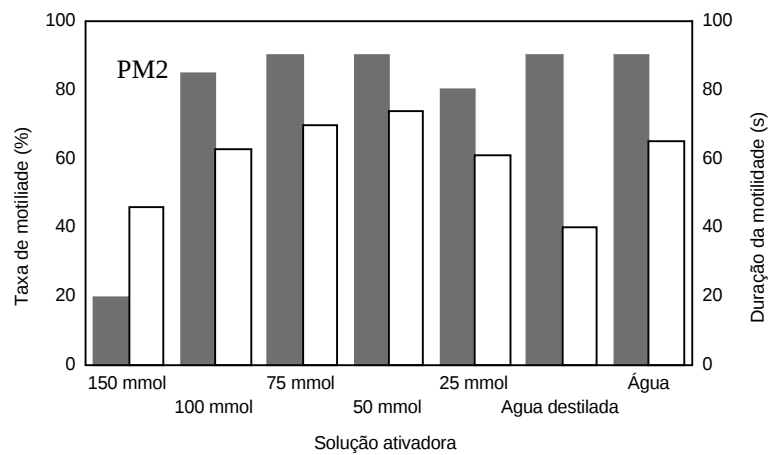
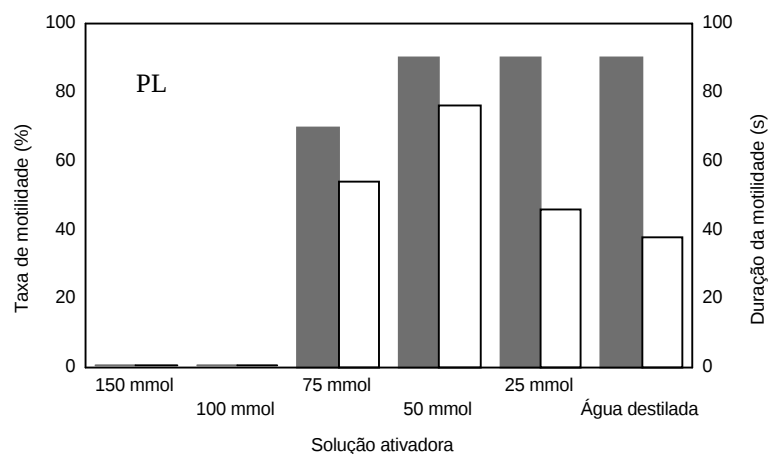
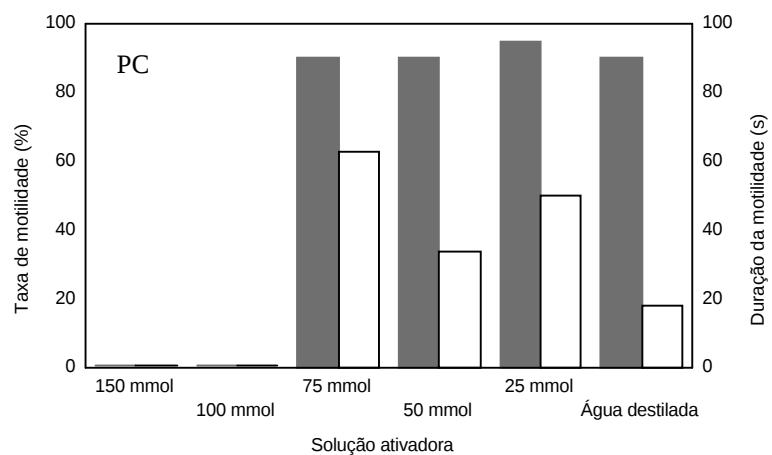


Figura 22:

- Teste de ativação do sêmen em soluções de NaCl em diferentes concentrações e em água pura ou destilada;
- ■ Taxa de motilidade espermática (%);
- □ Duração da motilidade espermática (s);
- E: BL - *Brycon lundii*;
- F: BO - *Brycon orbignyanus*;
- G: LE1 - *Leporinus elongatus*, da estação de Furnas;
- H: LE2 – *Leporinus elongatus*, da estação de Três Marias.

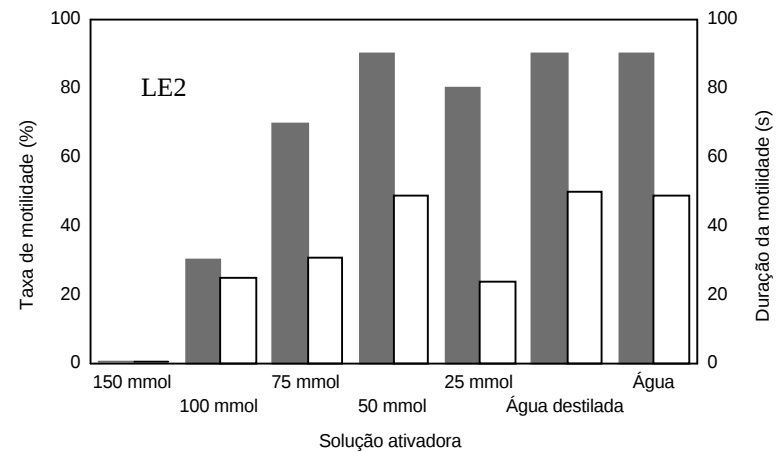
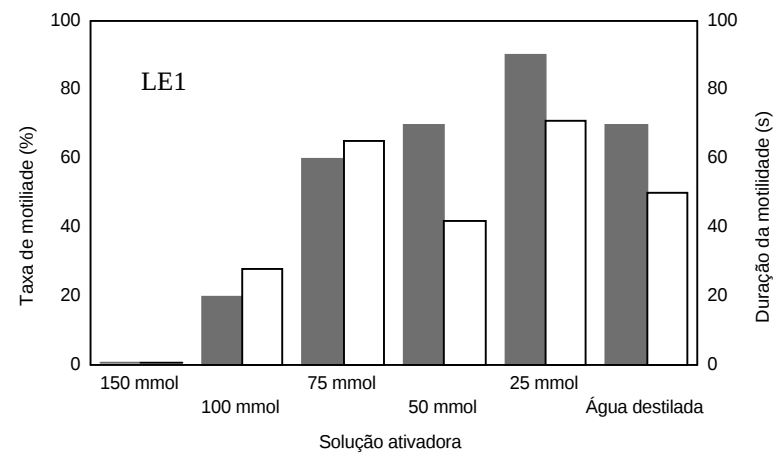
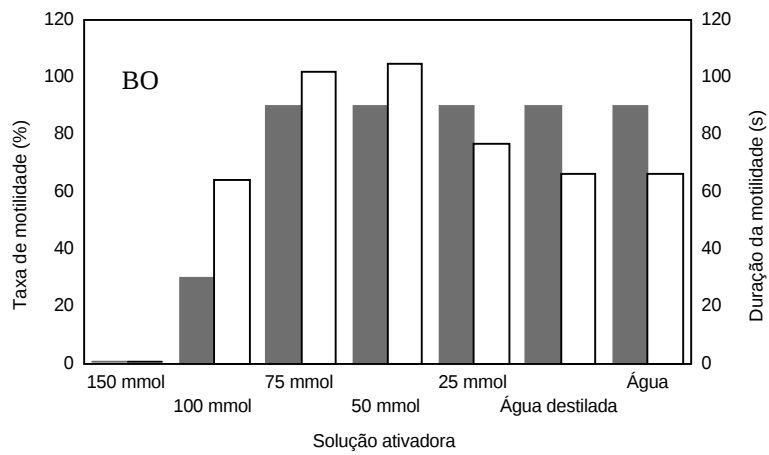
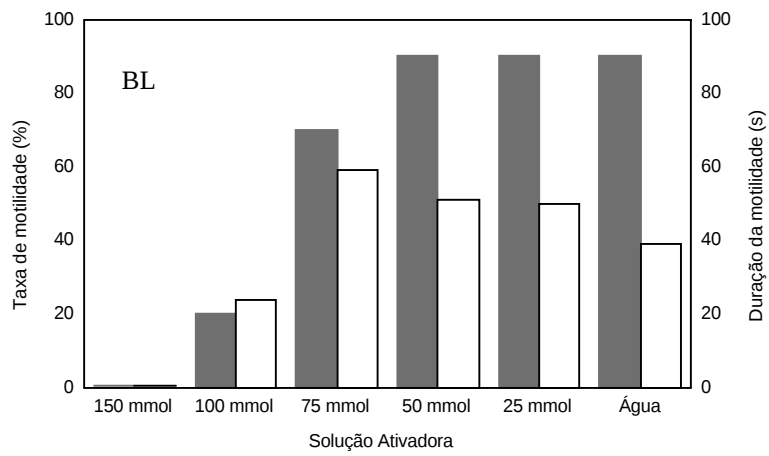
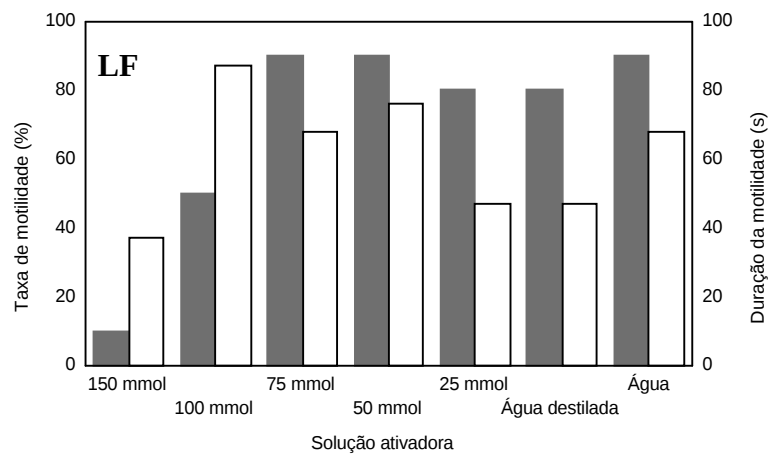
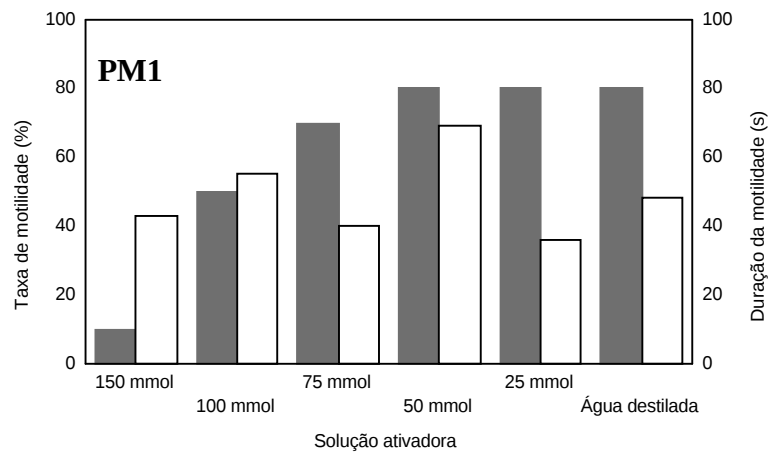


Figura 22:

- Teste de ativação do sêmen em soluções de NaCl em diferentes concentrações e em água pura ou destilada;
- ■ Taxa de motilidade espermática (%);
- □ Duração da motilidade espermática (s);
- **I:** LF - *Leporinus friderici*;
- **J:** PM1 – *Piaractus mesopotamicus*, da estação de Buritizeiro.



I



J

Figura 23:

- **T:** taxa de motilidade espermática (%) em diferentes tempos (h) após a coleta do sêmen de cada espécie estudada;
- **D:** duração da motilidade (s) em diferentes tempos (h) após a coleta do sêmen de cada espécie estudada;
-  Saco plástico inflado com ar ou oxigênio;
-  Tubo sem adição de ar ou oxigênio;
- *****: diferença significativa ($p < 0,05$) nos dois ambientes de preservação independentes durante todos os intervalos de tempo (h);
- ***** : diferença significativa ($p < 0,05$) em cada intervalo de tempo no ambiente de preservação apontado;
-  : diferença significativa ($p < 0,05$) de um intervalo de tempo para o outro nos dois ambientes de preservação simultaneamente, ou seja, no saco e no tubo.

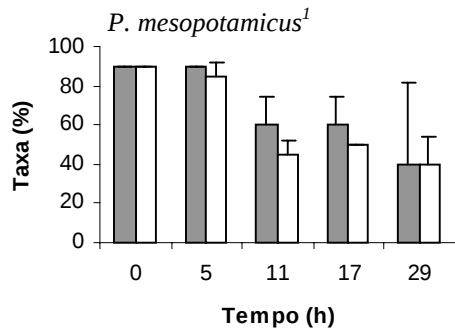
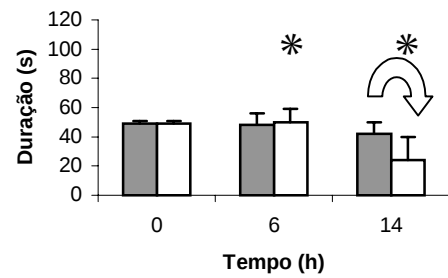
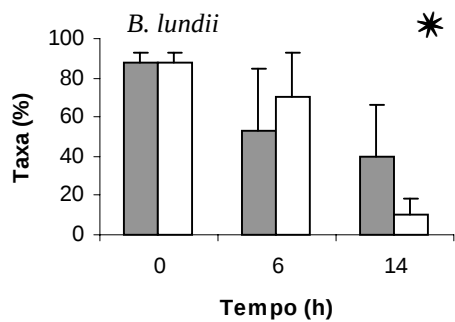
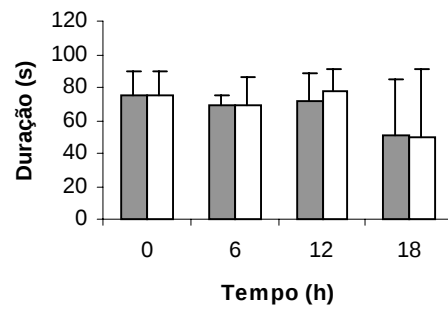
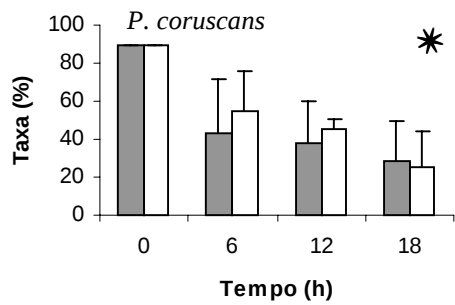
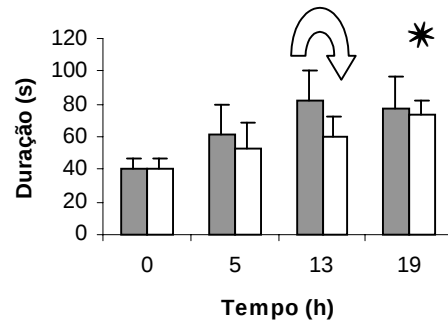
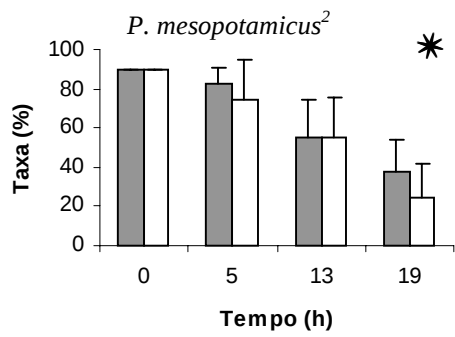
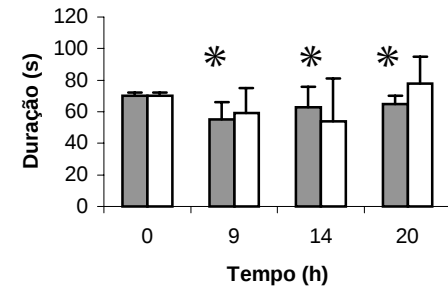
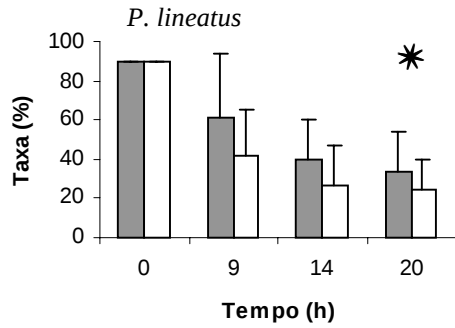
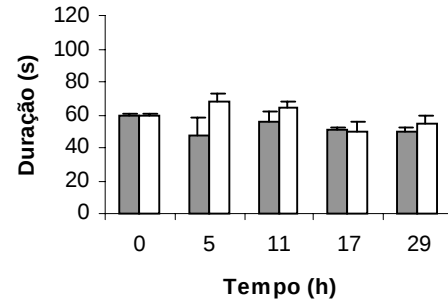
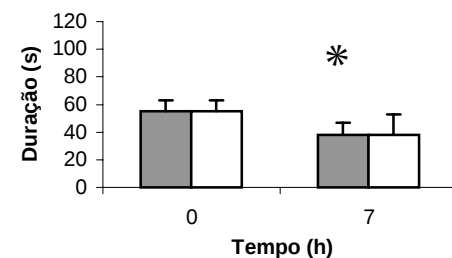
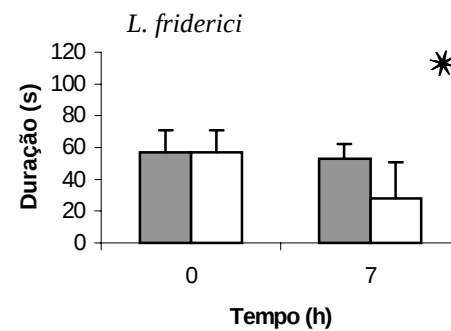
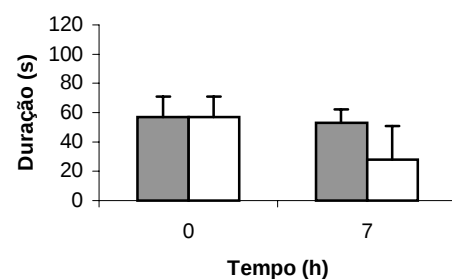
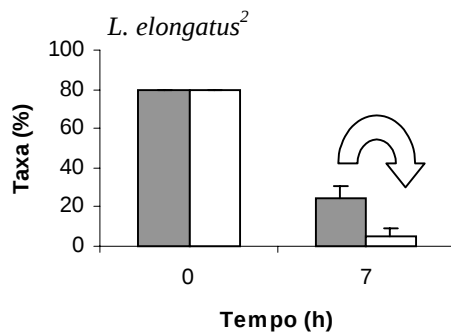
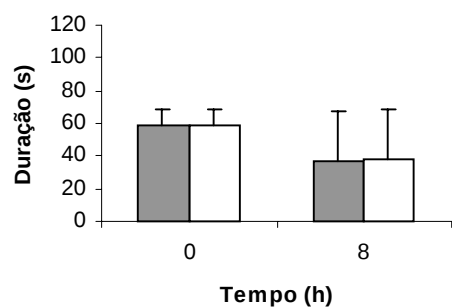
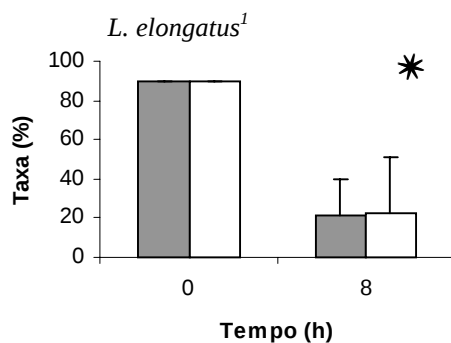
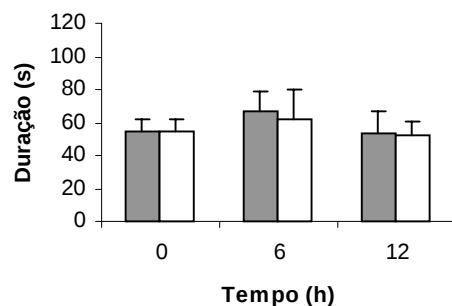
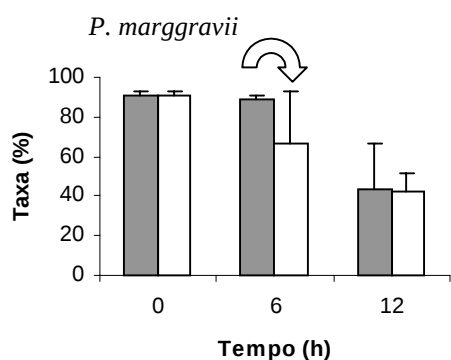
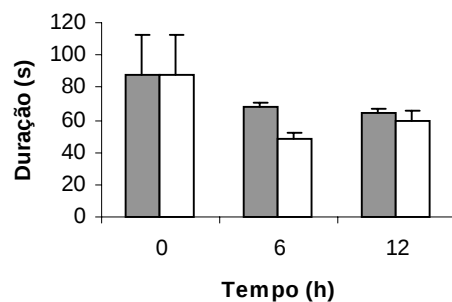
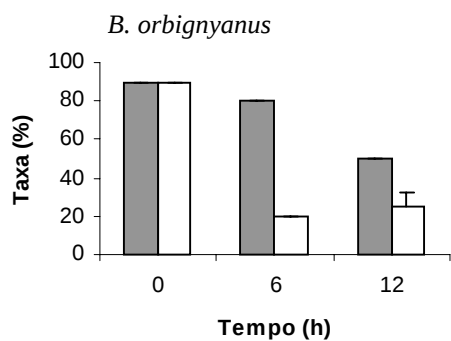
T**D**

Figura 23:

- **T:** taxa de motilidade espermática (%) em diferentes tempos (h) após a coleta do sêmen de cada espécie estudada;
- **D:** duração da motilidade (s) em diferentes tempos (h) após a coleta do sêmen de cada espécie estudada;
-  Saco plástico inflado com ar ou oxigênio;
-  Tubo sem adição de ar ou oxigênio;
- * : diferença significativa ($p < 0,05$) nos dois ambientes de preservação independentes durante todos os intervalos de tempo (h);
- *: diferença significativa ($p < 0,05$) em cada intervalo de tempo no ambiente de preservação apontado;
-  : diferença significativa ($p < 0,05$) de um intervalo de tempo para o outro nos dois ambientes de preservação simultaneamente, ou seja, no saco e no tubo.



5.1 Processos de Preservação do Sêmen a Curto Prazo

Embora o uso de gelo para preservação do sêmen de peixes de clima temperado seja uma prática antiga e comum (Barret, 1951; Billard & Legendre, 1982, Kavamoto et al., 1987), essa situação não ocorre com peixes neotropicais. A preservação do sêmen de várias espécies de peixes brasileiros (presente dissertação) constitui-se no 2º trabalho nesta área.

5.1.1 Temperatura de resfriamento

Demonstrou-se, nesta dissertação, que é possível manter a refrigeração dos recipientes utilizados para a preservação do sêmen em gelo ou termogel congelado. Esses recipientes podem ser refrigerados por pelo menos 6 h em temperaturas que variam de -0,5 a 9,9 °C. No decorrer dos experimentos, as placas de termogel foram substituídas por outras previamente congeladas no intervalo de ~ 12 horas, mantendo a temperatura de refrigeração entre -0,5 a 5,6 °C, o que torna vantajoso seu uso em relação ao gelo.

Os ensaios de medição de temperatura, realizados na caixa de isopor contendo gelo e mantida isolada, isto é, fora da caixa de isopor maior, mostraram também que é possível manter o sêmen resfriado no intervalo de 6 horas com temperaturas entre -2,1 a 9,9 °C. Todavia, como se poderia supor, a amplitude de variação da temperatura nessas condições foi maior do que naquele em que a caixa de isopor pequena foi acondicionada dentro da caixa maior.

5.1.2 Recipientes utilizados no resfriamento

Os ambientes de armazenamento do sêmen garantem o sucesso da preservação, pois são eles que determinam a manutenção da viabilidade dos espermatozóides fora do trato genital. Estudos realizados por Billard (1981), com sêmen de truta-arco-íris (*Oncorhynchus*

mykiss /*Salmo gairdneri*), apontaram que o ambiente do trato genital ou do testículo é mais favorável do que o *in vitro*. Como nem sempre é possível manter o sêmen em bancos genéticos vivos pelo tempo necessário, recipientes de armazenamento *in vitro* mais utilizados na preservação do sêmen de peixes são frascos de Erlenmeyer (Henderson & Dewar, 1959), seringas (Clemens & Hill, 1969), sacos plásticos (Billard, 1981), e tubos graduados (Chereguini et al, 1997; Wayman et al., 1998). Esses recipientes, utilizados com sêmen não diluído ou diluído, com ou sem adição de gases, mantiveram com sucesso a viabilidade dos espermatozóides de espécies de clima temperado por vários dias ou semanas.

Os ambientes de preservação do sêmen não diluído usados no presente estudo, saco plástico com ar ou oxigênio e tubo vedados para se evitar o ressecamento (Stoss, 1983; Cóser, 1988), mostraram a sua utilidade para a preservação do sêmen, podendo assim transportar-lo facilmente.

5.1.3 Uso de oxigênio e outros gases

O uso de oxigênio e outros gases (ar, gás carbônico) têm sido usado com sucesso para a preservação do sêmen de peixes de clima temperado (Henderson & Dewar, 1959; Billard, 1981). O ambiente rico em oxigênio é um dos pré-requisitos para o processo de preservação do sêmen desses peixes (Billard, 1981; McNiven et al., 1993). Os dados relativos à quantidade de oxigênio necessária ao metabolismo dos espermatozóides preservados de peixes de clima temperado são limitados (Stoss, 1983) e os relativos aos peixes de água doce brasileiros são inexistentes.

O sêmen preservado, segundo Stoss & Refstie (1983), deve ser mantido em saco plástico oxigenado na proporção volume:volume (sêmen:oxigênio) entre 1:50 e 1:120 (0 °C). A proporção de ar ou oxigênio utilizado na preservação de sêmen no presente estudo foi entre 1:110 e 1:440 (sêmen:ar ou oxigênio).

Para o sêmen da maioria das espécies estudadas, a adição de ar ou oxigênio ao sêmen para a preservação em sacos plásticos não mostrou diferença significativa em

comparação com aquele preservado sem adição de ar ou oxigênio em tubos. A adição de ar ao sêmen contido no saco plástico de *P. mesopotamicus* (Buritizeiro) e de *B. lundii*, em comparação com a adição de oxigênio ao sêmen das demais espécies também não mostrou diferença significativa na duração do sêmen preservado.

5.1.4 Qualidade do sêmen fresco

Um dos fatores principais para se determinar a qualidade do sêmen destinado à preservação é o processo de coleta em que o sêmen pode ser contaminado por urina, fezes, sangue (Saad & Billard, 1995; Legendre et al., 1996) e/ou água (Fogli da Silveira et al., 1990). Por isso, amostras de sêmen coletadas no presente estudo foram submetidas previamente ao teste de contaminação. Algumas amostras foram, por esta razão, descartadas, especialmente no caso da piracanjuba, sem que as causas dessa ocorrência tenham sido determinadas.

Outro fator importante para se avaliar a qualidade do sêmen a ser preservado é a taxa de motilidade inicial do sêmen fresco. A taxa de motilidade adequada para se processar a preservação é acima de 90% (Cosson et al., 1999). Entretanto, para esta dissertação, utilizaram-se sêmens cuja taxa de motilidade inicial foi de no mínimo 80%.

5.1.5 Diluição do sêmen

A preservação pode ser conduzida com sêmen diluído ou não diluído (Legendre et al., 1996). A estratégia de se utilizar sêmen fresco não diluído para preservação, recomendada por Harvey & Carolsfeld (1993), foi utilizada nesta dissertação. Soluções de antibióticos (Moore, 1987; Rana, 1995) são empregadas quando há possibilidade de o sêmen, especialmente de espécies de clima temperado, ser contaminado por fungos e bactérias em razão de sua longa duração sob refrigeração. Por outro lado, a diluição pode ocasionar maior duração da motilidade espermática (Wayman et al., 1997).

5.2 Ativação da Motilidade Espermática

5.2.1 O espermatozóide no plasma seminal

O plasma seminal inibe a motilidade do espermatozóide no trato genital ou quando o sêmen é extruído. A iniciação da motilidade é induzida por mudanças em meio osmótico (Perchec et al., 1993; Legendre et al., 1996; Cosson et al., 1999). Em teleósteos de água doce e salgada, a osmolaridade do plasma seminal tem poucas variações (300 – 350 mOsm/kg) (Morisawa & Suzuki, 1980). Entretanto, a motilidade espermática se inicia quando ocorre uma diminuição da osmolaridade do plasma seminal para espécies de água doce e um aumento da osmolaridade para espécies de água salgada (Morisawa & Suzuki, 1980; Takai & Morisawa, 1985).

As alíquotas de sêmen não diluído resfriado das espécies do presente estudo continham espermatozóides imóveis antes de sua diluição. A motilidade espermática foi observada após as diluições com soluções salinas de NaCl em baixas concentrações (entre 25 mM e 75 mM).

5.2.2 Duração da motilidade

Em teleósteos de água doce, a duração da motilidade espermática é muito curta devido a vários fatores interagidos na fisiologia do espermatozóide e no processo de ativação (Billard & Cosson, 1992). Esses fatores podem estar relacionados com a diminuição do estoque de energia que propicia a motilidade (Billard, 1990c; Cosson et al., 1999), com o processo de preservação do sêmen e com os diluentes utilizados para sua ativação. A duração da motilidade espermática das espécies no presente estudo, de 24 a 88 s, é mais curta em relação à algumas durações registradas na literatura; como por exemplo, 300 s no dourado, 612 s no curimatá (Cóser et al., 1984).

5.2.3 Soluções ativadoras

O sucesso da ativação dos espermatozóides de teleósteos de água doce depende do diluente usado na diluição do sêmen e a concentração adequada do mesmo para a iniciação da motilidade espermática (Billard & Cosson, 1992; Cosson et al., 1999). Os diluentes mais utilizados, conhecidos como soluções ativadoras, são água doce, água salgada (Ihering &

Azevedo, 1935), água destilada e soluções salinas de NaHCO_3 (Fogli da Silveira et al., 1990), NaCl (Ihering & Azevedo, 1935; Lahnsteiner et al., 1995; Ravinder et al., 1997), e KCl (Lahnsteiner et al., 1995; Ravinder et al., 1997) em diferentes concentrações que variam entre as espécies.

As soluções ativadoras, utilizadas no presente estudo, isto é, água doce, água destilada e solução salina de NaCl em baixas concentrações, induziram a melhor taxa de motilidade espermática. Os testes de ativação, realizados com essas soluções em diferentes concentrações, indicaram a solução ativadora de NaCl como melhor para o sêmen pré-diluído (1:100, 10 μL de sêmen:1ml de solução de NaCl 200 mM) de cada espécie. A solução de NaCl 50 mM foi considerada como melhor solução ativadora, apresentando maiores taxas e tempos de duração da motilidade espermática para o sêmen da maioria das espécies. Entretanto, para o sêmen de matrinhã, as soluções de NaCl 25 e 50 mM tiveram as mesmas taxas e durações. Para o sêmen de piapara e de surubim, as soluções de NaCl 25 e 75 mM, respectivamente, demonstraram ser as ideais para a ativação do sêmen com melhores taxas e durações da motilidade espermática.

5.2.4 Caracterização da motilidade

5.2.4.1 Diluição

A diluição é o fator determinante na caracterização da motilidade espermática, sendo a concentração e o volume do diluente os desencadeadores da ativação do sêmen. Para se obter a motilidade simultânea de, aproximadamente, 100% dos espermatozóides é necessária uma diluição relativamente alta (1:1000), pois em baixas diluições poucos espermatozóides são ativados (Billard & Cosson, 1992).

5.2.4.2 Estimativas da motilidade espermática

A caracterização da motilidade espermática tem sido baseada na taxa de espermatozóides móveis utilizando-se escalas arbitrárias, em percentagem (Maggese et al., 1984; Kavamoto & Fogli da Silveira, 1986; Fogli da Silveira et al., 1990; Fauvel et al., 1999) e na duração da motilidade, em segundos, para a determinação da qualidade do sêmen. A caracterização da taxa de motilidade espermática em observações ao microscópio

óptico no presente estudo foi a mesma usada por Fogli da Silveira et al. (1990) que utilizaram a escala arbitrária de 0 a 100% para avaliar o sêmen de pacu-caranha.

5.2.4.3 Temperatura do sêmen durante a análise

A temperatura na qual o sêmen é observado ao microscópio é outro fator importante que interfere na caracterização da motilidade espermática. Alguns autores resfriam o sêmen antes da sua ativação para análise ao microscópio (Lahnsteiner & Patzner, 1998; Lahnsteiner et al., 1998). Entretanto, estudos com sêmen de truta (Billard & Cosson, 1992) demonstraram que o aumento da temperatura (até 26 °C) produz elevação da taxa e da duração da motilidade dos espermatozóides. A análise da motilidade espermática também tem sido feita ao microscópio óptico em temperatura ambiente (Billard et al., 1993; Cosson et al., 1999). Na presente dissertação, essa análise ocorreu em temperatura ambiente, acima de 20 °C.

5.3 Qualidade do Sêmen Resfriado

A qualidade do sêmen resfriado é resultante da metodologia utilizada para sua preservação (Saad & Billard, 1995; Legendre et al., 1996). Entretanto, existem outros fatores intrínsecos que podem interferir no processo de preservação do sêmen, como idade e período reprodutivo de cada espécie (Rana, 1995). Todos os indivíduos doadores de sêmen neste trabalho encontravam-se sexualmente maduros, e o sêmen foi coletado em pleno período reprodutivo, compreendido entre os meses de novembro a fevereiro.

A taxa e a duração da motilidade espermática são alguns dos principais parâmetros para se avaliar a qualidade do sêmen resfriado (Rana, 1995). Esses dois parâmetros foram utilizados na presente dissertação para avaliar o sêmen de cada espécie nos dois ambientes de preservação, saco plástico com ar ou oxigênio e tubo.

5.3.1 Taxa de motilidade

As taxas de motilidade espermática para o sêmen da maioria das espécies estudadas mostraram quedas graduais ao longo do tempo de armazenamento, com variações individuais indicadas pelos altos desvios-padrão entre os intervalos de tempo analisados.

As variações individuais das taxas de motilidade indicadas neste trabalho podem ser devidas a vários fatores, tais como: i) escala arbitrária de 0 a 100% (Fogli da Silveira et al., 1990) – a escala utilizada é subjetiva e, portanto, sujeita a erros de leitura por parte do pesquisador; ii) dificuldade de se misturar adequadamente o sêmen ao diluente (Billard & Cosson, 1992) devido à sua viscosidade (Cosson et al., 1999); iii) possíveis contaminações por urina, fezes (Saad & Billard, 1995; Legendre et al., 1996), sangue e/ou água (Fogli da Silveira et al., 1990) no momento da coleta, não identificadas no exame da motilidade inicial; iv) valores do pH do plasma seminal diferentes daqueles da solução diluidora ou da água (Cosson et al., 1999) os quais não foram medidos em nosso trabalho; v) temperatura ambiente durante as análises (Billard et al., 1993), que pode ter apresentado variações provocando choque térmico; vi) mudanças nas condições aeróbicas do sêmen preservado (Lahnsteiner et al., 1996); e, vii) proliferações microscópicas de bactérias ou fungos (Rana, 1995).

O mecanismo da motilidade está relacionado com a quantidade de ATP intracelular e a finalização da motilidade espermática pode estar associada com a diminuição deste ATP (Billard et al., 1993), apesar de que este não se exaure totalmente (Billard & Cosson, 1992). Segundo Cosson et al. (1999), a produção de energia pela respiração é mais baixa do que o consumo, resultando na limitação de energia dentro do curto período de motilidade. Embora essa questão não tenha sido investigada nesta dissertação, é plausível supor que as variações nas taxas de motilidade de nossas espécies podem estar relacionadas com a diminuição da quantidade de ATP endógeno, fonte de energia principal para o batimento flagelar (Lahnsteiner et al., 1993).

5.3.2 Duração da motilidade

A duração da motilidade apresenta variações entre as espécies. As características químicas do meio de ativação são um dos principais fatores que determinam a duração da motilidade (Cosson et al., 1999). As soluções salinas de NaCl de baixas concentrações utilizadas para a ativação dos espermatozóides do presente estudo produziram poucas variações na duração da motilidade espermática de cada espécie.

5.3.3 Tempo de viabilidade do sêmen

As taxas e a duração da motilidade espermática do sêmen preservado de cada espécie nesta dissertação determinaram a sua viabilidade. Além dessas variáveis, o sucesso da preservação do sêmen também é influenciado pela variabilidade intrínseca dos gametas coletados e das técnicas de coleta (Rana, 1995). A quantidade de espermatozóides vivos é que determina se um sêmen deve ou não ser aproveitado, tendo em vista que se deve procurar um número máximo de ovos fertilizados com um número mínimo de espermatozóides (Fogli da Silveira et al., 1988).

O sêmen de pacu-caranha (de Buritizeiro) manteve sua viabilidade por 29 h com a taxa de motilidade espermática de 40%, preservado em gelo e com adição de ar. Estudos de preservação do sêmen desta espécie realizados, demonstraram sua viabilidade em refrigerador doméstico com suplementação de oxigênio, com sobrevivência total de até 30 horas (Ferraz de Lima et al., 1989). Por outro lado, o sêmen do pacu-caranha de Furnas, do presente estudo, preservado em gelo e com adição de oxigênio, manteve sua viabilidade com duração de 19 h e sobrevivência de ~ 40%.

A duração da viabilidade do sêmen de matrinhã foi próxima à da piracanjuba, ambas pertencentes à família Characidae, com 14 e 12 h, respectivamente. A duração da viabilidade do sêmen de piau-verdadeiro (de Três Marias), piau-três-pintas e piapara (de Furnas), da família Anostomidae, também foi bem próxima, com 7-8 h. Já a duração da viabilidade do sêmen de curimbatá e curimatá-pacu (família Prochilodontidae) mostrou diferença de 8 h. Quanto ao sêmen do surubim, a duração de sua viabilidade, de 18 h com a taxa de sobrevivência de 30%, foi próxima à do sêmen de curimbatá e pacu-caranha (de Furnas). Assim, a duração da viabilidade do sêmen preservado também pode variar inter e intraespecificamente. Todavia, Stoss et al. (1978) e Billard (1981), que realizaram a preservação do sêmen da mesma espécie, truta-arco-íris (*O. mykiss* /*Salmo gairdineri*), com temperaturas de -2°C e 4°C respectivamente, mantiveram a capacidade de fertilização do sêmen em ambos os experimentos por 15 dias de armazenamento com oxigênio.

5.4 Fertilização com Sêmen Preservado

A fertilização é a confirmação da manutenção da viabilidade do sêmen preservado, medida pela contagem do número de embriões (Ciereszko & Dabrowski, 1994). O sucesso da fertilização depende da densidade de espermatozóides em volta do ovo, pois a distância que um espermatozóide consegue percorrer é menor do que todo o diâmetro de um ovo (Billard & Cosson, 1992). A concentração espermática de *P. marggravii* varia de 19,2 – 26,6 x 10⁹ espermatozóides/mL (Godinho & Cóser, 1995). As taxas de fertilização com sêmen preservado de curimatá-pacu, obtidas nos testes preliminares do presente estudo, mostraram a viabilidade do seu uso. Os ovos viáveis foram contados e usados como medida de sucesso da fertilização tal como indicado por Lahnsteiner et al. (1998).

Os resultados obtidos na fertilização com o sêmen de curimatá-pacu indicaram ser necessária a realização de mais testes de fertilização para o conhecimento da potencialidade dos gametas e suas variabilidades, tal como proposto por Kavamoto et al. (1987).

Diante do estudo realizado conclui-se que:

1. É possível manter-se o sêmen viável das espécies estudadas acondicionado em caixas térmicas de isopor com gelo ou termogel congelado, em temperaturas entre 0 a 6 °C, com ou sem adição de ar ou oxigênio, por período variável segundo a espécie;
2. Os dois ambientes de preservação, isto é saco plástico com ar ou oxigênio e tubo plástico, não mostraram diferenças significativas entre si na manutenção do sêmen;
3. A obtenção de altas taxas de fertilização de ovos de curimatá-pacu com sêmen preservado por 8h confirmou a viabilidade da técnica de preservação a curto prazo.

BARRET, I. Fertility of salmonid eggs and sperm after storage. **J. Fish Res. Bd. Can.**, v.8, n.3, p.125-133, 1951.

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

BILLARD, R., COSSON, J., LAURENCE, W. C. Motility of fresh and aged halibut sperm. **Aquat. Living Resour.**, v.6, p.67-75, 1993.

BILLARD, R., COSSON, M. P. Some problems related to the assesment of sperm motility in freshwater fish. **The Journal of Experimental Zoology**, v.261, p.122-131, 1992.

BILLARD, R., JALABERT, B., BRETON, B. L'insémination artificiaelle de la truite (*Salmo gairdneri* Richardson) III. - Definition de la nature et de la molarite du tampon a employer avec les dilueurs d'insémination et de conservation. **Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.**, v.14, n.4-A, p.611-621, 1974.

BILLARD, R., LEGENDRE, M. Conservation a court terme des gamètes de truite arc-en-ciel en condition *in vitro* sous atmosphère d'oxygene. **Bull. Fr. Piscic.**, v.284, p.162-167, 1982.

BILLARD, R.. Artificial Insemination in Fish. In: LAMMING, G. E (Org.). **Marshall' s Physiology of Reproduction**. 4.ed. Endinburgh, London, Melbourne and New York: Churchill Livingstone, 1990a. Chapter 9, p.870-887.

BILLARD, R.. La motilite du spermatozoide de poisson: aspects energetics. In: **5 as Jornadas Internacionales de Reproduccion animal**, 1990b, Zaragoza. Anais... Zaragoza, Espagne, p.163-186.

BILLARD, R.. Physiologie Animale - Prolongation de la durée de motilité et du pouvoir fécondant des spermatozoïdes de truite arc-en-ciel par addition de théophylline au milieu de dilution. **C. R. Acad. Sc. Paris**, v.291, p.649-652, 1980.

BILLARD, R.. Short-term preservation of sperm under oxygen atmosphere in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Aquaculture**, v.23, p.287-293, 1981.

BILLARD, R.. Spermatogenesis in teleost fish. In: LAMMING, G. E (ed.). **Marshall' s Physiology of Reproduction**. 4.ed. Endinburgh, London, Melbourne and New York: Churchill Livingstone, 1990c. Chapter 3, p. 183-213.

BRITSKI, H. A., DE SILIMON, KEVE Z. DE S., LOPES, B. S. **Peixes do Pantanal. Manual de identificação**. Brasília: Embrapa - SPI; Corumbá: Embrapa – CPAP, 1999. 184p.

BRITSKI, H. A., SATO, Y., ROSA, A. B. S. **Manual de identificação de peixes da região de Três Marias: com chaves de identificação para os peixes da bacia do São Francisco**. Brasília: Câmara dos Deputados – CODEVASF, 1988, 115p.

BUYUKHATIPOGLU, S., HOLTZ, W. Preservation of trout sperm in liquid or frozen state. **Aquaculture**, v.14, p.49-56, 1978.

CARPENTIER, P., BILLARD, R. Conservation à court terme des gamètes de salmonidés à des températures voisines de 0 °C. **Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.**, v.18, n.4, p.1083-1088, 1978.

CHEREGUINI, O., CAL, R., DREANNO, C., ORGIER DE BAULNY, B., SUQUET, M., MAISSE, G. Short-term storage and cryopreservation of turbot (*Scophthalmus maximus*) sperm. **Aquatic Living Resources**, v.10, n.4, p.1-5, 1997.

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

CLEMENS, H. P., HILL, L. G. The collection and short-term storage of milt of white bass. **Prog. Fish-Cult.**, v.31, p.26, 1969 apud STOSS, J. Fish gamete preservation and spermatozoa physiology. In: HOAR, W. S., RANDALL, D. J., DONALDSON, E. M. (eds.). **Fish physiology**. vol.9. London: B. Academic Press, 1983. Cap.6, p.305-350.

COMPANHIA ENERGÉTICA DA MINAS GERAIS, FUNDAÇÃO CENTRO TECNOLÓGICO DE MINAS GERAIS. **Guia ilustrado de peixes da bacia do rio Grande**. Belo Horizonte: CEMIG/CETEC, 2000. 144p.

CÓSER, A. M. L. Preservação de gametas de peixe. In: **Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**, 1987. Anais... Belo Horizonte, MG: Campinas, Fundação Cargill, 1988, p.251-262.

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

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

DAVY, F. B., CHOUINARD A. **Induced fish breeding in southeast Asia: report of a workshop held in Singapore**. Ottawa: 25-28 November, 1980. 48p.

DE QUATREFAGES, A. Vitalité des spermatozoïdes de quelques poissons d'eau douce. **Ann. Sci. Nat.**, v.19, p.341-369, 1853 apud BILLARD, R., COSSON, M. P. Some problems related to the assesment of sperm motility in freshwater fish. **The Journal of Experimental Zoology**, v.261, p.122-131, 1992.

DILAURO, M., KRISE, W., HENDRIX, M. A., BAKER, S. E. Short-term cold storage of Atlantic sturgeon sperm. **The Progressive Fish-Culturist**, v.56, n.2, p.143-144, 1994.

EMRI, M., MÁRIÁN, T., TRÓN, L., BALKAY, L., KRASZNAI, Z. Temperature adaptation changes ion concentrations in spermatozoa and seminal plasma of common carp without affecting sperm motility. **Aquaculture**, v.167, p.85-94, 1998.

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.

FERRAZ DE LIMA, J. A., BARBIERI, G., VERANI, J. R. Período de reprodução, tamanho, e idade de primeira maturação gonadal do pacu, *Colossoma mitrei*, em ambiente natural (rio Cuiabá – Pantanal do Mato Grosso). In: **Simpósio Brasileiro de Aquicultura**, 3, 1983. **Anais...** São Carlos, SP: Sociedade Brasileira de Aquicultura, 1984. p.477-497.

FERRAZ DE LIMA, J. A., CASTAGNOLLI, N., FIGUEREIDO, G. M. Reprodução, larvicultura e genética. In: HERNANDEZ, A. (ed.) **Cultivo de Colossoma**. Colombia: Red. Regional de Entidades y Centros de Acuicultura de America Latina, 1989. p.315-332.

FOGLI DA SILVEIRA, W., KAVAMOTO, E. T., CESTAROLLI, M. A., GODINHO, H. M., RAMOS, S. M., SILVEIRA, A. N. Avaliação espermática, preservação criogênica e fertilidade do sêmen do pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), proveniente de reprodução induzida. **B. Inst. Pesca**, v.17, p.1-13, 1990.

FOGLI DA SILVEIRA, W., KAVAMOTO, E. T., NARAHARA, M. Y. Avaliação da qualidade e criopreservação em forma de “pellets” do sêmen do bagre, *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840). **B. Inst. Pesca**, v.12, n.4, p.7-11, 1985.

FOGLI DA SILVEIRA, W., KAVAMOTO, E. T., RIGOLINO, M. G., PENTEADO, L. A., CARVALHO FILHO, A. C. Primeiros resultados de fertilização com sêmen congelado da truta arco-íris, *Salmo irideus* Gibbons, no Brasil. **B. Inst. Pesca**, v.11, p.131-136, 1984.

FOGLI DA SILVEIRA, W., KAVAMOTO, E. T., RIGOLINO, M. G., TABATA, Y. A. O método espectrofotométrico na avaliação da concentração de espermatozóides da truta arco-íris, *Salmo irideus* Gibbons. **B. Inst. Pesca**, v.14, p.69-73, 1987.

FOGLI DA SILVEIRA, W., 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. **B. Inst. Pesca**, v.15, n.1, p.51-54, 1988.

FONTENELE, O. Contribuição para o conhecimento da biologia do curimatã-pacu, "*Prochilodus argenteus*" SPIX IN SPIX & AGASSIZ (Pisces: Characidae, Prochilodinae). **Rev. Brasil. Biol.**, v. 13, n.1, p.87-102, 1953.

FOWLER, H. W. Os peixes de água doce do Brasil. **Arq. Zool. São Paulo**, v.6, p.205-404, 1950.

GODINHO, H. P., CÓSER, A. M. L. Bases morfofuncionais da espermatogênese e criopreservação de sêmen de peixes. In: **Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**, 11, 1995. **Anais...** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1995, p.16-25.

GODOY, M. P. **Peixes do Brasil: Subordem Characoidei – Bacia do rio Mogi Guassu**. Piracicaba: Editora Franciscana, 1975, 4v.

GODOY, M. P. **Peixes do Estado de Santa Catarina**. Florianópolis: Editora da UFSC; Co-edição: Eletrosul e FURB, 1987. 571p.

GUEST, W. C., AVAULT, J. W., ROUSSEL, J. D. Preservation of channel catfish sperm. **Trans. Am. Fish. Soc.**, n.3, p.469-473, 1976.

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

HARA, S., CANTO JR, J. T., ALMENDRAS, J. M. E. A comparative study of various extenders for milkfish, *Chanos chanos* (Forsskål), sperm preservation. **Aquaculture**, v.28, p.339-346, 1982.

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

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

HENDERSON, N. E., DEWAR, J. E. Short-term storage of brook trout milt. **The Progressive Fish Culturist**, v.21, p.169-171, 1959.

INHERING, R. von. A method for inducing fish to spawn. **Progr. Fish-Cult.**, v.34, p.15-16, 1937.

IHERING, R. von., AZEVEDO, P. DE. Experiências com o esperma da curimatã (*Prochilodus*) dos açudes salgados da Parahyba. **Anais Acad. Bras. Ciências**, v.7, p.19-27, 1935.

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

KAVAMOTO, E. T., FOGLI DA SILVEIRA, W., GODINHO, H. M. Características seminais do curimatã *Prochilodus scrofa*, Steindachner, 1881. **B. Inst. Pesca**, v.13, n.2, p.45-50, 1986.

KAVAMOTO, E. T., FOGLI DA SILVEIRA, W., RIGOLINO, M. G., TABATA, Y. A., CAMPOS, B. DO E. S. DE C. Produção espermática e teste de fertilização do sêmen de truta arco-íris, *Salmo irideus* Gibbons no primeiro ciclo reprodutivo. **B. Inst. Pesca**, v.14 (único), p.51-62, 1987.

KAVAMOTO, E. T., FOGLI DA SILVEIRA, W. Características físicas, químicas e microscópicas do sêmen de bagre, *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840) em condições de campo. **B. Inst. Pesca**, v.13, n.1, p.95-100, 1986.

KAVAMOTO, E. T., FOGLI DA SILVEIRA, W., RIGOLINO, M. G., CARVALHO FILHO, A. C. DE. Avaliação macro e microscópica do sêmen da truta arco-íris, *Salmo irideus* Gibbons. **B. Inst. Pesca**, v.12, n.3, p.73-81, 1985.

LAHNSTEINER, F., BERGER, B., WEISMANN, T., PATZNER, R. A. Determination of semen quality of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by sperm motility, seminal plasma parameters, and spermatozoal metabolism. **Aquaculture**, v.163, p.163-181, 1998.

LAHNSTEINER, F., BERGER, B., WEISMANN, T., PATZNER, R. A. Fine structure and motility of spermatozoa and composition of the seminal plasma in the pech. **Journal of Fish Biology**, v.47, p.492-508, 1995.

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

LAHNSTEINER, F., PATZNER, R. A. Sperm motility of the marien teleosts *Boops boops*, *Diplodus sargus*, *Mullus barbatus* and *Trachurus mediterraneus*. **Journal of Fish Biology**, v.52, p.726-742, 1998.

LAHNSTEINER, F., PATZNER, R. A., WEISMANN, T. Energy resources of spermatozoa of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Pisces, Teleostei). **Reprod. Nutr. Dev.**, v.33, p.349-360, 1993.

LEGENDRE, M., LINHART, O., BILLARD, R. Spawning and management of gametes, fertilized eggs and embryos in Siluroidei. **Aquat. Living Resour.**, v.9, p.59-80, 1996.

LINS, L. V., MACHADO, A. B. M., COSTA, C. M. R., HERRMANN, G. **Roteiro metodológico para elaboração de listas de espécies ameaçadas de extinção: (contendo a lista oficial da fauna ameaçada de Minas Gerais)**. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 1997. 55p.

LOPES, C. de A., BENEDITO-CECÍLIO, E., AGOSTINHO, A. A. The reproductive strategy of *Leporinus friderici* (Characiformes, Anostomidae) in the Paraná river basin: the effect of reservoirs. **Rev. Brasil. Biol.**, v.60, n.2, p.255-266, 2000.

LOWE-McCONNELL, R. H. **Estudos ecológicos de comunidade de peixes tropicais (Ecological studies in tropical fish communities)**. Tradução de VAZZOLER, A. E. M., AGOSTINHO, A. A., CUNNINGHAM, P. T. M. - São Paulo: EDUSP, 1999. 534p.

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

MARQUES, E. E. **Biologia reprodutiva, alimentação natural e dinâmica de nutrição do pintado *Pseudoplatystoma coruscans* (Agassiz, 1829) (Osteichthyes, Pimelodidae) no alto rio Paraná**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 1993. 104p. (Dissertação, Mestrado em Ciências Biológicas).

McNIVEN, M., GALLANT, R., RICHARDSON, G. F. Fresh storage of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) semen using a non-aqueous medium. **Aquaculture**, v.109, p.71-82, 1993.

MOORE, A. A. Short-term storage and Cryopreservation of walleye semen. **The Progressive Fish Culturist**, v.49, p.40-43, 1987.

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

MURGAS, L. D. S., SILVA, M. O. B., MELLO, C. B. M., KABEYA, D. M., SANTANA, G. M. Avaliação quantitativa e qualitativa do sêmen de piaparas (*Leporinus obtusidens*). **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.23, n.3, p.246-248, 1999.

PERCHEC, P. G., COSSON, J., ANDRÉ, F., BILLARD, R. La motilité des spermatozoïdes de truite (*Oncorhynchus mykiss*) et de carpe (*Cyprinus carpio*). **J. Appl. Ichthyol.**, v.9, p.129-149, 1993.

PETREIRE Jr., M. A pesca de água doce no Brasil. **Ciência Hoje**, v.19, n.110, p.28-33, 1995 apud TAVARES, M. P. O surubim. In: MIRANDA, M. O. T. (Org.) **Surubim**. Belo Horizonte: IBAMA, 1997, p.9-25.

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

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

RANA, K. Preservation of Gametes. In: BROMAGE, N. R., ROBERTS, R. B. (eds.) **Broodstock management and egg and larval quality**. Cambridge: Institute of Aquaculture, 1995. Chapter 3, p.53-75.

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

ROGAMOSA, E., DE PAIVA, P., GODINHO, H. M., STORFER, R. B. Desenvolvimento de ovócitos de *Piaractus mesopotamicus* (Homberg, 1891) (= *Colossoma mitrei*, 1985) em condições de cultivo intensivo. **Ciência e Cultura**, v.40, n.1, p.60-64, 1988.

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**, v.53, p.402-413, 1998.

SAAD, A., BILLARD, R. Production et gestion des spermatozoïdes chez le poisson-chat européen *Silurus glanis*. **Aquat. Living Resour.**, v.8, p.323-328, 1995.

SATO, Y., FENERICH-VERANI, N., GODINHO, H. P., VERANI, J. R., VIEIRA, L. J. S. Reprodução induzida do matrinhã *Brycon lundii* Reinhardt, 1877, da bacia do rio São Francisco. In: **Seminário Regional de Ecologia**, 8, 1997, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFScar, 1997. p.353-359.

SATO, Y. **Reprodução de peixes da bacia do rio São Francisco: indução e caracterização de padrões**. São Carlos: Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – Universidade Federal de São Carlos, 1999. 179p. (Tese, Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais).

SATO, Y., CARDOSO, E. L., SALLUM, W. B., GODINHO, H. P. Indução experimental da desova do surubim *Pseudoplatystoma coruscans*. In: MIRANDA, M. O. T. (Org.). **Surubim**. Belo Horizonte: IBAMA, 1997, p.69-79.

SATO, Y., GODINHO, H. P. Adesividade de ovos e tipos de desova dos peixes de Três Marias. In: **Coletânea de Resumos dos Encontros da Associação Mineira de Aquicultura (AMA), 1982-1987**. Brasília: CODEVASF, 1988. p.102-103.

SATO, Y., GODINHO, H. P. Peixes da bacia do rio São Francisco. In: LOWE-MCCONNELL, R. (ed.). **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**. Tradução de VAZZOLLER, A. E. A., AGOSTINHO, A. A., CUNNIGHAN. São Paulo: EDUSP, 1999. Cap.17, p.401-413.

SATO, Y.; CARDOSO, E.L.; GODINHO, A.L. & GODINHO, H.P. Hypophysation parameters of the fish *Prochilodus marginatus* obtained in routine hatchery station conditions. **Rev. Brasil. Biol.**, v.56, n.1, p.59-64, 1996.

SHIMODA, E., ANDRADE, D. R., CRUZ, G. M., SILVA, J. F. S., GODINHO, H. P. Caracterização química do plasma seminal do pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) hipofisado. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.23, n.3, p.248-250, 1999.

STATSOFT, INC. **Statistica for windows [Computer program manual]**. Tulsa, OK: 1996.

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

STOSS, J., BÜYÜKHATİPOĞLU, S., HOLTZ, W. Short-term and cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) sperm. **Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.**, v.18, n.4, p.1077-1082, 1978.

STOSS, J., REFSTIE, T. Short-term storage and cryopreservation of milt from atlantic salmon and sea trout. **Aquaculture**, v.30, p.229-236, 1983.

SUQUET, M., DREANNO, C., DORANGE, G., NORMANT, Y., QUEMENER, L, GAIGNON, J. L., BILLARD, R. The ageing phenomenon of turbot spermatozoa: Effects on morphology, motility and concentration, intracellular ATP content, fertilization, and storage capacities. **Journal of Fish Biology**, v.52, n.1, p.31-41, 1998.

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**, v.108, p.1175-1181, 1995.

TRUSCOTT, B. Sub-zero preservation of atlantic salmon sperm. **J. Fish. Res. Bd. Canada**, v.25, n.2, p.363-372, 1968.

VAZZOLLER, A. E. A. DE M. Um estudo de caso: estratégias reprodutivas da comunidade de teleósteos do alto rio Paraná. In: VAZZOLLER, A. E. A. DE M. (ed.) **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática**. Maringá: EDUEM; São Paulo: SBI, 1996. P.81-97.

WAYMAN, W. R., THOMAS, R. G., TIERSCH, T. R. Refrigerated storage and cryopreservation of black drum (*Pogonias cromis*) spermatozoa. **Theriogenology**, v.47, p.1519-1529, 1997.

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

WELCOMME, R. L. **River fisheries**. Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO, Roma, 1985. 330p. (FAO Fisheries Technical Papers, 262) apud TAVARES, M. P. O surubim. In: MIRANDA, M. O. T. (Org.) **Surubim**. Belo Horizonte: IBAMA, 1997, p.9-25.

Tabela 5
Ensaio de temperatura em caixas de isopor com gelo localizada
no interior da caixa de isopor maior

Intervalo de tempo (h)	1º Dia	2º Dia	3º Dia
	Temperatura (°C)	Temperatura (°C)	Temperatura (°C)
0	0,5	0,5	0,5
1	1	0,3	0,1
2	2,2	2,2	1,4
3	2,2	2,3	1,7
4	2,2	2,6	1,9
5	2,3	2,8	2,1
6	2,5	2,9	2,1
Temperatura ambiente (°C)	24,9	25,3	21,6

Tabela 6
Ensaio de temperatura em caixa de isopor com gelo isolada

Intervalo de tempo (h)	1º Dia	2º Dia	3º Dia
	Temperatura (°C)	Temperatura (°C)	Temperatura (°C)
0	-2,1	-1,5	-1,5
1	3,6	0,5	3,2
2	5,2	3,7	6,5
3	6,2	4,4	7
4	8,3	5,1	7,6
5	9,3	5,9	8
6	9,9	6,9	8,7
Temperatura ambiente (°C)	24,8	22,1	23

Tabela 7
Ensaio de temperatura em caixas de isopor com termogel congelado localizada no
interior da caixa de isopor maior

Intervalo de tempo (h)	1º Dia	2º Dia	3º Dia	4º Dia
	Temperatura (°C)	Temperatura (°C)	Temperatura (°C)	Temperatura (°C)
0	-0,5	4,6	4,6	3,7
1	-1,8	3,8	3,3	2,5
2	3,3	4,0	3,3	3,1
3	4,7	4,0	3,3	3,2
4	5,0	4,1	3,3	3,3
5	5,1	4,3	3,3	3,4
6	5,1	4,3	3,3	3,5
8	-	4,7	3,5	3,6
10	-	5,0	4,4	3,7
12	-	5,3	5,6	3,9
18	-	7,3	9,7	4,9
22	-	11,5	18,1	10,4
Temperatura ambiente (°C)	20,3	23,7	22,7	19,0

Tabela 8
Teste de ativação do sêmen de cada espécie estudada

Espécie	Taxa (%) e duração (s) da motilidade espermática em soluções de NaCl em diferentes concentrações e em água destilada ou pura													
	150 mmol		100 mmol		75 mmol		50 mmol		25 mmol		Água dest.		Água	
	%	s	%	s	%	s	%	s	%	s	%	s	%	S
<i>P. coruscans</i>	0	0	0	0	90	63	90	34	95	50	90	18	-	-
<i>P. lineatus</i>	0	0	0	0	70	54	90	76	90	46	90	38	-	--
<i>P. mesopotamicus</i> ²	20	46	85	63	90	70	90	74	80	61	90	40	90	65
<i>P. marggravii</i>	10	27	90	30	90	34	90	40	90	36	90	39	-	-
<i>B. lundii</i>	0	0	20	24	70	59	90	51	90	51			90	39
<i>B. orbignyana</i>	0	0	30	64	90	102	90	105	90	77	90	66	90	66
<i>L. elongatus</i> ¹	0	0	20	28	60	65	70	42	90	71	70	50	-	-
<i>L. elongatus</i> ²	0	0	30	25	70	31	90	49	80	24	90	50	90	49
<i>L. frederici</i>	10	37	50	87	90	68	90	76	80	47	90	68	90	63
<i>P. mesopotamicus</i> ¹	10	43	50	55	70	40	80	69	80	36	80	48	-	-

Obs.: *P. mesopotamicus*, 1 - Buritizeiro, 2 - Furnas; *L. elongatus*1 - Furnas, 2 - Três Marias; *P. lineatus* – dados fornecidos por Vânia Lúcia Bicalho Cruz; *B. lundii* - dados fornecidos por Fabiana Cristina Silveira Alves de Melo; *L. elongatus*¹ – dados fornecidos por Ana Maria Rodrigues de Carvalho; *L. elongatus*² - dados fornecidos por Paulo Taitson.

Tabela 9

Motilidade e duração do sêmen preservado de *Piaractus mesopotamicus*¹

Peixe	Taxa (%) e duração(s) da motilidade espermática em saco com ar (S) e tubo (T) em diferentes tempos (H) após a coleta																			
	0H S		0H T		5H S		5H T		11H S		11 H T		17H S		17H T		29 H S		29H T	
	%	s	%	s	%	s	%	s	%	s	%	s	%	s	%	s	%	s	%	s
1	90	60	90	60	90	54	80	71	50	60	40	61	70	50	50	46	10	48	30	57
2	90	59	90	59	90	39	90	64	70	51	50	67	50	52	50	50	70	51	50	50
Média	90	60	90	60	90	47	85	68	60	56	45	64	60	51	50	54	40	50	40	54
dp	0,00	0,71	0,00	0,71	0,00	10,61	7,07	4,95	14,14	6,36	7,07	4,24	14,14	1,41	0,00	5,66	42,43	2,12	14,14	4,95

Tabela 10

Motilidade e duração do sêmen preservado de *Prochilodus lineatus*

Peixe	Taxa (%) e duração(s) da motilidade espermática em saco com oxigênio (S) e tubo (T) em diferentes tempos (H) após a coleta															
	0H S		0H T		9H S		9H T		14H S		14H T		20H S		20 H T	
	%	s	%	s	%	s	%	s	%	s	%	s	%	s	%	s
1	90	69	90	69	90	55	30	78	60	84	30	59	60	67	30	95
2	90	72	90	72	30	64	50	57	30	70	20	74	20	61	10	55
3	90	67	90	67	85	61	30	50	60	56	20	66	50	69	20	73
4	90	70	90	70	80	59	80	79	30	54	30	63	30	61	30	97
5	90	70	90	70	70	55	50	41	50	66	60	64	40	58	50	84
6	90	70	90	70	10	34	10	47	10	48	0	0	5	71	5	66
Média	90	70	90	70	61	55	42	59	40	63	27	54	34	65	24	78
dp	0,00	1,63	0,00	1,63	32,93	10,71	24,01	16,21	20,00	13,07	19,66	27,08	20,10	5,21	16,25	16,63

Tabela 11

Motilidade e duração do sêmen preservado de *Piaractus mesopotamicus*²

Peixe	Taxa (%) e duração(s) da motilidade espermática em saco com oxigênio (S) e tubo (T) em diferentes tempos (H) após a coleta															
	0H S		0H T		5H S		5H T		13H S		13H T		19H S		19H T	
	%	s	%	s	%	s	%	s	%	s	%	s	%	s	%	s
1	90	49	90	49	90	64	70	29	30	59	20	38	50	55	10	59
2	90	36	90	36	80	41	90	48	70	65	60	56	60	71	25	75
3	90	36	90	36	90	84	90	54	40	76	50	62	40	54	5	69
4	90	44	90	44	90	45	90	74	50	101	70	62	15	88	15	79
5	90	37	90	37	70	50	70	53	80	93	80	66	30	97	50	80
6	90	43	90	43	80	80	40	60	60	97	50	74	30	98	40	79
Média	90	41	90	41	83	61	75	53	55	82	55	60	38	77	24	74
Dp	0,00	5,34	0,00	5,34	8,16	18,30	19,75	14,78	18,71	17,67	20,74	12,16	16,05	20,05	17,72	8,19

Tabela 12

Motilidade e duração do sêmen preservado de *Pseudoplatystoma coruscans*

Peixe	Taxa (%) e duração(s) da motilidade espermática em saco com oxigênio (S) e tubo (T) em diferentes tempos (H) após a coleta															
	0H S		0H T		6H S		6H T		12H S		12H T		18H S		18H T	
	%	s	%	s	%	s	%	s	%	s	%	s	%	s	%	s
1	90	58	90	58	50	74	60	71	50	75	50	89	40	62	40	100
2	90	67	90	67	20	60	80	92	10	49	50	65	20	70	20	49
3	90	85	90	85	80	68	50	62	60	77	40	68	50	72	40	50
4	90	90	90	90	20	72	30	51	30	88	40	89	0	0	0	0
Média	90	75	90	75	43	69	55	69	38	72	45	78	28	51	25	50
dp	0,00	15,03	0,00	15,03	28,72	6,19	20,82	17,38	22,17	16,52	5,77	13,05	22,17	34,27	19,15	40,83

Tabela 13

Motilidade e duração do sêmen preservado de *Brycon lundii*

Peixe	Taxa (%) e duração(s) da motilidade espermática em saco com ar (S) e tubo (T) em diferentes tempos (H) após a coleta											
	0H S		0H T		6H S		6H T		14H S		14H T	
	%	s	%	s	%	s	%	s	%	s	%	s
1	90	50	90	50	80	54	50	50	10	35	10	35
2	90	50	90	50	80	50	90	61	70	39	10	31
3	90	51	90	51	30	37	90	40	30	40	20	30
4	80	46	80	46	20	51	50	50	50	53	0	0
Média	88	49	88	49	53	48	70	50	40	42	10	24
Dp	5,00	2,22	5,00	2,22	32,02	7,53	23,09	8,58	25,82	7,80	8,16	16,15

Tabela 14

Motilidade e duração do sêmen preservado de *Brycon orbignyanus*

Peixe	Taxa (%) e duração(s) da motilidade espermática em saco com oxigênio (S) e tubo (T) em diferentes tempos (H) após a coleta											
	0H S		0H T		6H S		6H T		12H S		12H T	
	%	s	%	s	%	s	%	s	%	s	%	s
1	90	105	90	105	80	66	20	45	50	66	30	55
2	90	70	90	70	80	70	20	50	50	62	20	63
Média	90	88	90	88	80	68	20	48	50	64	25	59
d.p.	0,00	24,75	0,00	24,75	0,00	2,83	0,00	3,54	0,00	2,83	7,07	5,66

Tabela 15

Motilidade e duração do sêmen preservado de *Prochilodus marggravii*

Peixe	Taxa (%) e duração(s) da motilidade espermática em saco com oxigênio (S) e tubo (T) em diferentes tempos (H) após a coleta											
	0H S		0H T		6H S		6H T		12H S		12H T	
	%	s	%	s	%	s	%	s	%	s	%	s
1	90	57	90	57	90	87	30	47	10	77	50	65
2	90	67	90	67	90	68	40	93	80	53	40	58
3	90	43	90	43	90	71	90	48	40	52	50	51
4	90	52	90	52	85	57	80	68	50	36	30	46
5	90	52	90	52	90	54	70	47	25	45	30	50
6	95	53	95	53	90	62	90	68	50	56	50	41
Média	91	54	91	54	89	67	67	62	43	53	42	52
Dp	2,0	7,85	2,0	7,85	2,0	11,91	25,8	18,32	24,0	13,70	9,8	8,57

Tabela 16

Motilidade e duração do sêmen preservado de *Leporinus elongatus*¹

Peixe	Taxa (%) e duração(s) da motilidade espermática em saco com oxigênio (S) e tubo (T) em diferentes tempos (H) após a coleta							
	0H S		0H T		8H S		8H T	
	%	s	%	s	%	s	%	s
1	90	55	90	55	5	61	0	0
2	90	51	90	51	0	0	10	50
3	90	61	90	61	20	68	0	0
4	90	68	90	68	40	45	70	63
5	90	48	90	48	0	0	0	72
6	90	70	90	70	40	50	30	45
Média	90	59	90	59	13	37	16	38
dp	0,00	9,02	0,00	9,02	17,18	30,02	30,50	31,18

Tabela 17

Motilidade e duração do sêmen preservado de *Leporinus elongatus*²

Peixe	Taxa (%) e duração(s) da motilidade espermática em saco com oxigênio (S) e tubo (T) em diferentes tempos (H) após a coleta							
	0H S		0H T		7H S		7H T	
	%	s	%	s	%	s	%	s
1	80	55	80	55	30	46	10	32
2	80	60	80	60	20	62	5	23
3	80	74	80	74	20	44	0	0
4	80	40	80	40	30	58	5	55
Média	80	57	80	57	25	53	5	28
dp	0,00	14,03	0,00	14,03	5,77	8,85	4,08	22,75

Tabela 18

Motilidade e duração do sêmen preservado de *Leporinus friderici*

Peixe	Taxa (%) e duração(s) da motilidade espermática em saco com oxigênio (S) e tubo (T) em diferentes tempos (H) após a coleta							
	0H S		0H T		7H S		7H T	
	%	s	%	s	%	s	%	s
1	90	58	90	58	40	50	50	36
2	90	48	90	48	20	30	30	31
3	80	67	80	67	30	44	30	40
4	90	54	90	54	10	30	10	23
5	90	50	90	50	40	37	50	62
Média	88	55	88	55	28	38	34	38
dp	4,47	7,54	4,47	7,54	13,04	8,79	16,73	14,64