



UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL

CAMPUS DE LARANJEIRAS DO SUL

CURSO DE ENGENHARIA DE AQUICULTURA

RENATO PAULO GLOWKA

**CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE JUNDIÁ, *Rhamdia voulezi* E *R. branneri*
(SILURIFORMES: HEPTAPTERIDAE) UTILIZANDO DIFERENTES
CRIOPROTETORES**

LARANJEIRAS DO SUL

2014

RENATO PAULO GLOWKA

**CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE JUNDIÁ, *Rhamdia voulezi* E *R. branneri*
(SILURIFORMES: HEPTAPTERIDAE) UTILIZANDO DIFERENTES
CRIOPROTETORES**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Engenharia de Aquicultura da Universidade Federal da Fronteira Sul, como requisito para obtenção de grau de Bacharel em Engenharia de Aquicultura.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Weingartner

Laranjeiras do Sul

2014

Glowka, Renato Paulo

CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE JUNDIÁ, *Rhamdia voulezi* E
R. branneri (SILURIFORMES: HEPTAPTERIDAE) UTILIZANDO
DIFERENTES CRIOPROTETORES/ Renato Paulo Glowka. -- 2014.
47 f.:il.

Orientador: Marcos Weingartner.

Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de
Engenharia de Aquicultura , Laranjeiras do Sul, PR,
2014.

1. Congelamento de sêmen. 2. Motilidade espermática.
3. Soluções crioprotetoras. 4. Conservação . I.
Weingartner, Marcos, orient. II. Universidade Federal da
Fronteira Sul. III. Título.

RENATO PAULO GLOWKA

CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE JUNDIÁ, *Rhamdia voulezi* E *R. branneri*
(SILURIFORMES: HEPTAPTERIDAE) UTILIZANDO DIFERENTES
CRIOPROTETORES

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Engenharia de Aquicultura da Universidade Federal da Fronteira Sul, como requisito para obtenção de grau de Bacharel em Engenharia de Aquicultura.

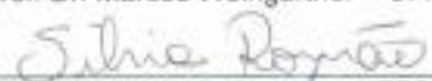
Orientador: Prof. Dr. Marcos Weingartner

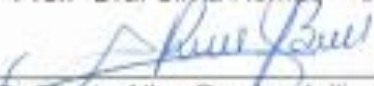
Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela banca em:

11/12/2019

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Marcos Weingartner – UFFS


Prof.ª Dra. Sílvia Romão – UFFS


Prof. Dr. Rabie Allan Bombardelli - UNIOESTE

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por me guiar, proteger e dar forças (muitas e imensuráveis) especialmente nos momentos críticos. Aos meus pais Pedro (*in memoriam*) e Eva, e meu irmão Silvano, de quem os herdei o espírito da busca incessante para adquirir o conhecimento e vencer cada obstáculo sem deixar-se abater com as adversidades.

AGRADECIMENTOS

Ao professor e orientador Marcos Weingartner, pela orientação, pela amizade, pelo companheirismo também nos vários momentos de descontração e acima de tudo, pelos ensinamentos proporcionados ao longo dos anos de graduação.

De forma especial aos professores: Alexandre Monkolski, Bruno Fernandes de Oliveira e Silvia Romão que sempre estiveram presentes significativamente, durante o processo de formação.

Aos demais professores da Universidade Federal da Fronteira Sul que proporcionaram, de forma relevante, o meu crescimento profissional.

Aos técnicos da Universidade Federal da Fronteira Sul, especialmente ao Dr. Frank Belettini por proporcionar grandiosos aprendizados.

Ao professor Gilmar Baumgartner da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Toledo e os Engenheiros de Pesca: Vinicius Valiente dos Santos (Montanha); Tiago Debona (Pardal) e Vitor André Frana por proporcionarem a realização do primeiro estágio.

Aos responsáveis pelo CDT Iguaçu – Boa Vista da Aparecida – Pr, no momento da realização do estágio extracurricular, Junior Antonio Decarli, Fabio de Araújo Pedron e Ronan Rorato (*in memoriam*).

Ao Dr. Darci Carlos Fornari da Genetic Fish Rise, pela supervisão, orientação, ensinamentos, companheirismo e principalmente pela amizade proporcionada durante a realização do Estágio Curricular Supervisionado I na empresa Delicious Fish em Sorriso – Mt.

Aos colegas de curso pela ajuda e amizade formada. Sem vocês tudo seria mais difícil. Especialmente: Angelita, Desieli, Katiele, Leonardo, Mariane, Samara e principalmente ao Diego pela ajuda, colaboração e parceria neste trabalho.

Ao InPAA – Instituto de Pesquisas em Aquicultura Ambiental – Toledo – Pr, na pessoa do diretor Prof. Dr. Robie Allan Bombardelli, que não mediu esforços para proporcionar a realização deste trabalho.

Ao prof. Msc. Ronan Maciel Marcos pela ajuda durante a realização dos trabalhos no InPAA.

Finalmente, aos diretores e colegas de trabalho da Farmácia Santa Terezinha, pela compreensão e paciência nos momentos de estresse e de ausências.

“Podem me chamar de louco
Mas aprendi com os mais quebrados
A não galopar nas pedras,
Nem pelear por muito pouco.”

“A autenticidade é a maior diferença entre
os que são, e os que tentam ser.”

Jayme Caetano Braun

RESUMO

As espécies de jundiá *Rhamdia branneri* e *R. voulezi* são endêmicas à Bacia do Rio Iguaçu e possuem características favoráveis que despertam interesse para a piscicultura. A tecnologia de criopreservação de sêmen vem sendo muito utilizada na aquicultura, principalmente no melhoramento genético e na conservação genética de espécies ameaçadas. Para estas espécies ainda não se tinham estudos relativos ao tema. Desta forma, objetivou-se realizar estudos a fim de comparar diferentes crioprotetores intra e extracelulares na criopreservação de sêmen de jundiá *R. branneri* e *R. voulezi*. Foram testadas quatro soluções crioprotetoras contendo 10% de glicose anidra ($C_6H_{12}O_6$) como diluidor. Soluções: 1 - DMSO (C_2H_6OS) 10% e gema de ovo; 2 - metanol (CH_3OH)10% e leite em pó 5%; 3 - glicerol ($C_3H_8O_3$) 10% e gema de ovo e 4 - glicerol 10% e leite em pó 5%, respectivamente protetor intra e extracelular. Foi coletado sêmen de cada espécie e realizado teste de motilidade para cada amostra, obtendo-se motilidade superior a 30 segundos considerando assim, viáveis para criopreservação. Foi realizado pool do sêmen de três machos de *R. voulezi* e dois machos de *R. branneri* e antes de efetuar o congelamento, as soluções foram testadas garantindo a não ocorrência de ativação por parte da solução crioprotetora. A solução ativadora testada foi água destilada. A solução 1, contendo DMSO não foi eficaz para ambas espécies, não apresentando motilidade espermática após tentativa de ativação. Para o tempo de motilidade de *R. voulezi* as soluções crioprotetoras metanol+leite e glicerol+ovo foram similares entre si e superiores a glicerol+leite ($P<0,05$). Já para *R. branneri* as três soluções foram eficientes na criopreservação sem apresentar diferença significativa ($P>0,05$) para a variável tempo de motilidade. Avaliando a escala de intensidade de motilidade, o melhor resultado foi obtido através da solução glicerol+ovo para *R. branneri* e igualando-se à glicerol+leite para *R. voulezi*. O sêmen de *R. branneri* e *R. voulezi* pode ser criopreservado com as soluções apresentadas excetuando a utilização de DMSO. A melhor solução crioprotetora na motilidade espermática para estas espécies é o conjunto glicerol+ovo.

Palavras-chave: Congelamento de sêmen. Motilidade espermática. Soluções crioprotetoras. Conservação.

ABSTRACT

The species of catfish *Rhamdia branneri* and *R. voulezi* are endemic to the Iguaçú River Basin and have favorable characteristics which are interesting for fish farming. Semen cryopreservation technology has been widely used in aquaculture, especially in breeding and genetic conservation of endangered species. For these species had not yet studies on the subject. Thus, the objective was to conduct studies in order to compare different intracellular and extracellular cryoprotectants in semen cryopreservation catfish *R. branneri* and *R. voulezi*. Four cryoprotectant solution containing 10% of anhydrous glucose were tested ($C_6H_{12}O_6$) as diluent. Solutions: 1 - DMSO (C_2H_6OS) and 10% egg yolk; 2 - methanol (CH_3OH) 10% and 5% powdered milk; 3 - glycerol ($C_3H_8O_3$) and 10% egg yolk and 4 - 10% glycerol and 5% milk powder, respectively intra and extracellular protector. Semen was collected and each species motility test performed for each sample, resulting in higher motility than 30 seconds considering just viable cryopreservation. Was performed semen pool of three males of *R. voulezi* and two males of *R. branneri* before submitting freezing, the solutions were tested ensuring the non-occurrence of activation by the extender solution. The activator solution was tested distilled water. The solution 1, containing DMSO was not effective for both species, showing no sperm motility after activation. For the motility time of *R. voulezi* the cryoprotectant solutions methanol + milk and glycerol + egg were similar to each other and higher glycerol + milk ($P < 0.05$). For *R. branneri* the three solutions were efficient in cryopreservation no significant difference ($P > 0.05$) for the time variable motility. Assessing the motility intensity scale, the best result was obtained by glycerol + egg solution to *R. branneri* and equating to the glycerol + milk to *R. voulezi*. The semen *R. branneri* and *R. voulezi* can be cryopreserved with the solutions presented except the use of DMSO. The best extender solution in sperm motility for these species is glycerol + egg.

Keywords: Semen freezing. Sperm motility. Cryoprotectant solutions. Conservation.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 O JUNDIÁ	13
2.1 <i>Rhamdia quelen</i> (SILURIFORMES: HEPTAPTERIDAE) QUOY & GAIMARD, 1824	14
2.2 <i>Rhamdia branneri</i> (SILURIFORMES: HEPTAPTERIDAE) HASEMAN, 1911 ...	15
2.3 <i>Rhamdia voulezi</i> (SILURIFORMES: HEPTAPTERIDAE) HASEMAN, 1911	16
3 CRIOPRESERVAÇÃO	17
3.1 CRIOPRESERVAÇÃO EM PEIXES	20
3.1.1 Diluentes	23
3.1.2 Crioprotetores	24
3.2 DESCONGELAMENTO.....	25
4 OBJETIVO GERAL	25
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
5 MATERIAIS E MÉTODOS	26
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	38
REFERÊNCIAS	39

1 INTRODUÇÃO

A aquicultura é representada através do cultivo de organismos aquáticos como os peixes, moluscos, crustáceos, algas e plantas aquáticas. A intervenção no processo de produção em suas diferentes etapas como: atividades de manejo, alimentação, reprodução, proteção contra predadores, etc. constituem a atividade (FAO, 2014).

Conforme os dados estatísticos da FAO - *Food and Agriculture Organization of the United Nations* – em 2012 o número de espécies registradas nas suas estatísticas totalizaram 567, incluindo peixes ósseos (354 espécies com cinco híbridos), moluscos (102), crustáceos (59), anfíbios e répteis (6), invertebrados aquáticos (9) marinhos e de água doce e algas (37). Estima-se que mais de 600 espécies aquáticas são criadas em todo o mundo em vários sistemas e instalações para o cultivo com diferentes graus de complexidade tecnológica, utilizando água doce, salobra e salgada (FAO, 2014).

A produção do pescado, proveniente da pesca extrativa e da aquicultura, juntas somaram 158 milhões de toneladas em 2012, exceto algas e plantas aquáticas. Deste total, 66,6 milhões de toneladas foram oriundas da aquicultura, utilizadas diretamente ao consumo humano. Acrescenta-se a esses números, a produção de plantas e algas marinhas, que somou 23,8 milhões de toneladas. Deste total representativo da aquicultura (marinha e continental), o Brasil ocupa a 12ª posição com uma produção de 707.461t (FAO, 2014).

Através de dados atualizados apresentados pela FAO, é demonstrado que a aquicultura no mundo continua crescente, ainda em um ritmo mais rápido que o crescimento da população mundial. A estimativa é de que, devido à demanda da nova classe média, e a estabilização do rendimento da pesca extrativa, a aquicultura atinja um crescimento de 62% em 2030 (FAO, 2014).

Segundo dados do MPA - Ministério da Pesca e Aquicultura - (2011), referentes à produção mundial de pescado (pesca extrativa e aquicultura) no ano de 2011, o Brasil representou cerca de 0,75% com 1.264.765 t, sendo 628.704 t da aquicultura (marinha e continental). Dados mais recentes da FAO (2014) apontam o Brasil com uma produção de 707.461 t, sendo o Paraná o maior produtor da

aquicultura continental com 73.831,1 t além de ser o maior produtor da aquicultura geral do país.

Ainda segundo o MPA (2010), em 2010 o consumo de pescado Per Capita foi de 9,75 kg/hab/ano, abaixo do recomendado pela FAO, que é de 12 kg/hab/ano.

O Brasil é um país de dimensões continentais. É o quinto maior país do mundo, possui 1,7% do território do globo terrestre e ocupa 47% da América do Sul. Ocupa uma área de 8.514.876,599 km², 7.367 km de costa oceânica, 3,5 milhões de km² de Zona Econômica Exclusiva e possui 5.563 municípios, localizados em 26 estados, mais o Distrito Federal. Possui características regionais bastante específicas no campo social, econômico e geográfico (BOSCARDIN, 2007, p. 49). Com uma população em crescimento e que passou dos 200 milhões em 2014 (IBGE, 2014), o Brasil possui um imenso mercado consumidor em potencial para produtos provenientes da aquicultura.

A água ocupa aproximadamente 70% da superfície do nosso planeta. Mas 97,5% da água do planeta é salgada. Da parcela de água doce, 68,9% encontram-se nas geleiras, calotas polares ou em regiões montanhosas, 29,9% em águas subterrâneas, 0,9% compõe a umidade do solo e dos pântanos e apenas 0,3% constitui a porção superficial de água doce presente em rios e lagos. A água doce não está distribuída uniformemente pelo globo. Sua distribuição depende essencialmente dos ecossistemas que compõem o território de cada país. Na América do Sul encontra-se 26% do total de água doce disponível no planeta e apenas 6% da população mundial, enquanto o continente asiático possui 36% do total de água e abriga 60% da população mundial. Em função de suas dimensões continentais, o Brasil apresenta grandes contrastes relacionados não somente ao clima, vegetação original e topografia, mas também à distribuição da população e ao desenvolvimento econômico e social, entre outros fatores. De maneira geral, o Brasil é um país privilegiado quanto ao volume de recursos hídricos, pois abriga 13,7% da água doce do mundo (BRASIL, [200-]).

Segundo Boscardin (2007, p. 50) a aquicultura vem tendo um crescimento acentuado desde 1995, com quedas apenas em 2003 na aquicultura continental e em 2004 na aquicultura marinha, quando a aquicultura continental retomou seu crescimento. A queda de 2004 está relacionada à problemas com doenças na carcinicultura.

Quanto ao impacto ambiental, a aquicultura é considerada como uma atividade pouco impactante, porém já existem discussões mais aprofundadas sobre tal afirmação. Desta forma, alguns pontos merecem uma reflexão mais apurada, como a utilização de espécies de peixes exóticos ou alóctones (ex. da tilápia e do tucunaré) que podem causar impactos sobre a biota local (CASTILHO; PEREIRA; PIE, 2007, p. 194).

Segundo Pestana; Pie; Pilchowski (2007), a aquicultura pode ser dividida em:

- 1) Aquicultura comercial – possui como objetivo a geração de renda financeira através da produção de plantas e animais que são demandados no mercado;
- 2) Aquicultura de Subsistência - aquela cuja produção não atinge escala de produção comercial, evidenciando a produção destinada ao sustento familiar;
- 3) Aquicultura Familiar – como o próprio nome diz, predomina a interação entre a gestão e o trabalho. É estabelecimento integrante da agricultura familiar aquele dirigido pelo próprio produtor rural e que utiliza mais a mão-de-obra familiar que a contratada;
- 4) Aquicultura Industrial – representada pela utilização de meios mais intensivos de produção e, concomitantemente, a existência de uma cadeia produtiva bem estruturada.

A aquicultura no Brasil, quando se trata da atividade de piscicultura, está baseada no cultivo de espécies exóticas. No Paraná o destaque fica por conta da tilápia *Oreochromis niloticus*. Segundo Ostrensky; Boeger; Chamma (2007, p. 203) a introdução de linhagens com expressivo ganho genético tem ocorrido apenas na tilapicultura, com a importação de indivíduos geneticamente melhorados, que são multiplicados e distribuídos aos produtores nacionais.

Estes autores destacam que o Brasil possui um número muito grande de espécies sendo cultivadas. Essa grande diversidade, por sua vez, ainda leva à inviabilidade técnica e econômica para as empresas produzirem rações específicas para a grande maioria delas, devido seus diferentes hábitos e exigências alimentares. Investir em pesquisas ainda parece ser a melhor saída para amenizar este problema.

Em relação às espécies exóticas introduzidas, faltam estudos para responder as perguntas tangentes sobre os problemas desta prática. Importantes tópicos intermedeiam essa discussão, em especial aspectos ambientais, econômicos e legais. Esta falta de estudos a respeito de quais são os reais impactos diretamente

provocados pelas espécies exóticas invasoras vindas da aquicultura, colocam maior responsabilidade sobre as Políticas Públicas empregadas no Brasil para orientar na tomada de decisões (OSTRENSKY; BOEGER; CHAMMA, 2007, p. 231).

Desenvolver tecnologias para o cultivo de espécies nativas em condições de competição de vantagem com as espécies exóticas exige grandes investimentos de tempo e de recursos financeiros em pesquisas aplicadas. Mesmo ainda estando longe disso se tornar rotina no Brasil, é sabido que o potencial existe.

2 O JUNDIÁ

O jundiá, assim denominados comumente os peixes pertencentes ao gênero *Rhamdia* (BALDISEROTTO; RADÜNZ-NETO, 2004, p. 65) desperta interesse para a piscicultura da região Sul do Brasil devido ao seu crescimento durante o ano todo, mesmo em ocorrências de temperaturas mais baixas. Possui boa resistência ao manejo, docilidade, alta eficiência alimentar mesmo em épocas de frio e boa qualidade de carcaça devido principalmente ao fato dos espinhos intramusculares estarem ausentes (LIMA; BERGAMIN; MORO, 2013, p. 361).

O gênero *Rhamdia* possui uma ordem taxonômica e também uma sistemática que consiste de elevadas contradições sendo considerada muito confusa desde que foi descrita. Silfvergrip (1996 apud GOMES et al, 2000) realizou uma ampla revisão taxonômica do gênero, baseada em caracteres da morfologia interna, e concluiu que o gênero *Rhamdia* é formado de apenas 11 espécies dentre 100 anteriormente descritas. Segundo o mesmo autor, o gênero *Rhamdia* pertence à seguinte divisão taxonômica: Classe: Osteichthyes, Ordem: Siluriformes, Família: Pimelodidae.

As discussões se iniciam já nas alterações feitas em relação à Classe. Ao que tudo indica, a antiga Classe Osteichthyes foi dividida em duas classes novas: Actinopterygii e Sarcopterygii. Nakatani et al. (2001) descrevem a classe dos peixes como Actinopterygii, enquanto que Malabarba, L. e Malabarba, M. (2014), colocam os Actinopterygii como sendo uma Superclasse e dividem esta em duas classes: Cladistia e Actinopteri.

Porém, a principal alteração, segundo Malabarba, L.; Malabarba, M. (2014), está na família Pimelodidae, que foi reclassificada e um sub-grupo passou a ser denominado família Heptapteridae. Dentro desta nova família estão inclusos boa parte dos siluriformes de pequeno a médio porte que antes estavam alocados em

outras famílias, destacando-se o gênero *Rhamdia*. De acordo com isso, uma nova classificação para o gênero pode ser aqui descrita:

Classe: Actinopterygii

Ordem: Siluriformes

Família: Heptapteridae

Gênero: *Rhamdia*

A família Heptapteridae é uma das mais representativas dentro da ordem siluriformes e é endêmica da região neotropical. Os peixes desta família podem ser encontrados em pequenos corpos de água desde o México até o sul da Argentina. A distribuição de alguns gêneros pode ser ampla pelos rios da América do Sul, enquanto algumas espécies de heptapterídeos são marcadas pelo endemismo (BOCKMANN; GUAZZELLI, 2003).

O alto grau de endemismo do Rio Iguaçu, onde são encontrados as duas espécies utilizadas neste trabalho, *Rhamdia branneri* e *Rhamdia voulezi*, é determinado, provavelmente, devido ao seu isolamento geográfico imposto pelas Cataratas do Iguaçu. Estas quedas são íngremes e formam uma barreira muito eficaz separando a ictiofauna localizada à montante das quedas (a maioria de extensão do rio), a partir da ictiofauna localizada a jusante (a poucos quilômetros antes da foz do rio) (BAUMGARTNER et al., 2006).

2.1 *Rhamdia quelen* (SILURIFORMES: HEPTAPTERIDAE) QUOY & GAIMARD, 1824

Segundo Silfvergrip (1996 apud GOMES et al, 2000) o *R. quelen* pode ser diferenciado das outras espécies de *Rhamdia* pelas seguintes características: espinho da nadadeira peitoral serrilhado em ambos os lados; nadadeira caudal com lóbulos desiguais; membrana interrredial menor do que 2/3 do comprimento do raio do lobo superior da nadadeira caudal/lobo inferior da nadadeira caudal; com ou sem poros sensoriais múltiplos na cabeça; véu da narina posterior aberta postero-lateralmente, barbilhões maxilares no mínimo 28,8% do comprimento padrão; vértebras pós Weberianas de 36 a 44; olhos de tamanho médio, com ou sem padrão de manchas; com ou sem uma marca tipo selim escuro na nuca.

A característica negativa conhecida como um dos principais problemas que afetam o desenvolvimento durante o cultivo de *R. quelen* é a maturação precoce das

fêmeas, que acabam direcionando parte da energia para o desenvolvimento gonadal, reduzindo assim, o seu crescimento (FRACALOSSI et al., 2004). Deste modo, a fim de aperfeiçoar o cultivo do jundiá, torna-se indispensável apurar manejos e/ou técnicas capazes de reduzir o efeito negativo da sua maturação precoce (FUKUSHIMA et al., 2011).

Além disso, Carneiro et al. (2006) realizaram observações a campo encontrando resultados onde o macho de *Rhamdia quelen* prepara-se precocemente produzindo sêmen num momento em que as fêmeas ainda não estão aptas à reprodução. No final do período reprodutivo, quando facilmente encontram-se fêmeas prontas para o processo de indução hormonal, houve redução na proporção de machos liberando sêmen, bem como na quantidade de sêmen produzido por indivíduo. A ausência de sincronismo entre machos e fêmeas durante o período de reprodução também é comum em outras espécies de peixes.

Por serem fisiologicamente semelhantes, *Rhamdia branneri* e *Rhamdia voulezi* podem ser consideradas constituintes do mesmo problema o que enfatiza a necessidade de estudos para obtenção de alternativas para sanar este problema.

2.2 *Rhamdia branneri* (SILURIFORMES: HEPTAPTERIDAE) HASEMAN, 1911

Conhecido popularmente como bagre, bagre-amarelo, jundiá ou jundiá amarelo, esta espécie possui distribuição geográfica exclusiva, endêmica à bacia do rio Iguaçu (NAKATANI et al., 2001; BAUMGARTNER et al., 2006). Possui corpo e nadadeiras cinza, mais claro na região ventral. Corpo alongado, arredondado próximo à cabeça, comprimido na região da base da nadadeira adiposa, cabeça deprimida, adiposa longa e boca terminal (BAUMGARTNER et al., 2012, p.134), e três pares de barbilhões (NAKATANI et al., 2001, p. 287).

A primeira maturação sexual ocorre com cerca de 140 mm de comprimento total em fêmeas e possui período reprodutivo se estendendo de setembro a março (NAKATANI et al., 2001, p. 287).

Estes autores descrevem que a eclosão das larvas ocorre 34 horas após a fecundação em uma temperatura de 23,9°C. A absorção total do saco vitelínico ocorre quando as larvas atingem cerca de 5,53 mm de comprimento padrão.

2.3 *Rhamdia voulezi* (SILURIFORMES: HEPTAPTERIDAE) HASEMAN, 1911

Possui corpo e nadadeiras cinza, mais claro na região ventral. Corpo alongado, arredondado próximo à cabeça, comprimido na região da base da nadadeira adiposa, cabeça deprimida, adiposa longa e boca terminal (BAUMGARTNER et al., 2012). Conhecido popularmente como bagre, bagre-amarelo, jundiá ou jundiá amarelo, esta espécie possui distribuição geográfica exclusiva, endêmica à bacia do rio Iguaçu (NAKATANI et al., 2001; BAUMGARTNER et al., 2006).

R. branneri e *R. voulezi* (Fig. 01) foram consideradas sinônimas de *R. quelen* por Silvergrip (1996 apud GOMES et al, 2000), no entanto este autor não examinou o material da bacia do rio Iguaçu. Baumgartner et al. (2012) validam *R. branneri* e *R. voulezi* como não sendo sinônimas de *R. quelen*, tomando por base o alto grau de endemismo da ictiofauna da bacia do Iguaçu, reforçado por estudos genéticos que apontaram diferenças cariotípicas entre as espécies desta bacia.

Figura 01- Exemplos de *R. voulezi* e *R. branneri*



Fonte: BAUMGARTNER et al., 2012.

As duas espécies são consideradas constituintes de hábito alimentar piscívoro. São indígenas endêmicas, ou seja, sua ocorrência é restrita à bacia do rio

Iguaçu (Fig. 02), não sendo encontradas naturalmente em outras bacias. Porém, nesta bacia podem ser encontradas facilmente. A principal diferença morfológica para a diferenciação entre estas espécies está relacionada às nadadeiras dorsal e adiposa. Para o *R. branneri* a nadadeira dorsal não alcança a nadadeira adiposa quando adpressa. Já no *R. voulezi* a nadadeira dorsal alcança a nadadeira adiposa. É descrito ainda, que o *R. voulezi* possui a altura do corpo um pouco maior em relação ao seu semelhante (BAUMGARTNER et al., 2012).

Figura 02 - Distribuição geográfica do jundiá, *Rhamdia voulezi* e *Rhamdia branneri*.



3 CRIOPRESERVAÇÃO

O melhoramento genético em animais domésticos se desenvolveu através da técnica de inseminação artificial com sêmen criopreservado de animais selecionados (FOGLI DA SILVEIRA; KAVAMOTO; NARAHARA, 1985).

As espécies de peixes de piracema constituem parte significativa das espécies comerciais brasileiras. No entanto, essas espécies reofílicas não adaptam suas formas de reprodução em cativeiro, constituídos de águas lânticas (PAULINO, 2009). Para obter êxito na manipulação da reprodução desses peixes reofílicos, muito tem se estudado, há muito tempo, pois esses peixes necessitam da dinâmica da correnteza fluvial para o desenvolvimento cíclico de seus órgãos sexuais, maturação dos gametas e estímulo para o ato reprodutivo.

Um dos grandes desafios da produção de peixes nativos é dominar as técnicas reprodutivas com precisão e melhorar a sua eficiência. Para isso é preciso conhecer a biologia reprodutiva de cada espécie bem como estratégias reprodutivas que os peixes adotam.

Os primeiros trabalhos de indução à desova de peixes reofílicos foram desenvolvidos na década de 30, paralelamente na Argentina e no Brasil, quando foram obtidos resultados positivos de indução à maturação final e desova de peixes migradores utilizando como metodologia a aplicação de hormônios naturais presentes na hipófise de peixes maduros. Essa técnica foi adotada por produtores e pesquisadores como sendo uma das alternativas utilizadas para induzir a reprodução de peixes migradores em todo mundo, sendo conhecida como “hipofisação” (ZANIBONI-FILHO; WEINGARTNER, 2007).

Com uma demanda continuamente crescente e um mercado cada vez mais atrativo e exigente, a piscicultura torna-se cada vez mais tecnificada e moderna. Cada vez mais há a busca por uma produção em larga escala, objetivando sempre maiores lucratividades.

Quando se trata de reprodução, os espermatozoides de peixes podem ser armazenados sob refrigeração por algumas horas ou dias, dependendo da espécie, enquanto que mantidos em temperaturas negativas podem ser estocados por muitos anos. Algumas espécies nativas de interesse comercial possibilitam a estocagem dos seus espermatozoides sob refrigeração por mais de 10 dias e ainda assim continuam viáveis. Essa técnica é simples, de baixo custo, reduz os custos de manutenção de plantel de reprodutores e colabora para trocas de material genético entre diferentes laboratórios (CARNEIRO et al., 2006).

Um dos pontos em destaque nos últimos anos neste contexto consiste nas técnicas de criopreservação. Elas têm se expandindo nos últimos anos, sendo impulsionadas tanto pela indústria aquícola como por questões ecológicas. Existe a busca pelo desenvolvimento de métodos eficientes na criopreservação do sêmen para diferentes espécies de peixes (PAULINO, 2009).

O processo de criopreservação mantém os sistemas vivos (células e alguns tecidos simples) em estado viável em baixas temperaturas, para isso são estocados em gelo seco (-80°C), suspensos em vapor de nitrogênio líquido (abaixo de -130°C) ou imersos em nitrogênio líquido (-196°C).

Os métodos de criopreservação consistem em procedimentos para congelar o sêmen, mantendo sua viabilidade genética, conservando-o até sua utilização. A definição da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) para a criopreservação é: “Técnica de congelamento e armazenamento em nitrogênio líquido, a ultra-baixa temperatura (igual ou inferior a 135°C negativos), cujo processo é lento e delicado, pois deve evitar a formação de cristais de gelo no interior das células, que poderiam destruí-las”.

Ao se praticar o congelamento de células vivas, quando a temperatura está abaixo de 0 °C, o gelo começa a ser formado no exterior da célula e com o declínio da temperatura esta começa a desidratar-se. Esta desidratação por meio do congelamento lento é inadequada, pois, normalmente, a desidratação da célula é insuficiente para impedir a formação de gelo no seu interior, o que causa a sua morte a não ser que medidas extras sejam tomadas para a sua proteção (CAROLSFELD; HARVEY, 1999; RESENDE; MARQUES, 2009).

A técnica de criopreservação é capaz de preservar os tecidos por tempo indeterminado. Além de facilitar o acesso à informação dos melhoristas, a criopreservação tem a vantagem de conservar o material em um espaço reduzido e com cuidados intensivos (MALAJOVICH, 2011).

O controle da reprodução dos animais permite a expansão rápida dos estoques, reduzindo os custos de transporte de animais. O processo começa com a seleção dos pais (reprodutores e matrizes), escolhidos pelas suas características genéticas relativas à produtividade e à saúde. (MALAJOVICH, 2011).

A técnica de criopreservação de sêmen exige uma solução crioprotetora adequada, conseguindo assim, se obter taxas de congelamento e de descongelamento consideradas ótimas (VIVEIROS, 2005).

Para obter o sucesso neste processo é preciso ter um procedimento adequado e a eficiência em diversas etapas, desde a incorporação de uma solução protetora até um correto resfriamento, congelamento e descongelamento (PAULINO, 2009). O principal desafio para o sucesso dessa técnica está associado à retirada do excesso de água presente no interior da célula espermática, evitando assim a formação de cristais de gelo, causadores de danos funcionais irreversíveis (CARNEIRO, 2007).

3.1 CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN EM PEIXES

A indústria da aquicultura atual e moderna tem impulsionado a rápida expansão da técnica de criopreservação em peixes nos últimos anos.

A criopreservação tem como uma importante finalidade guardar genes para aumentar a variabilidade genética de uma determinada população. Da mesma forma que uma população natural de peixes depende de elevada biodiversidade genética para aumentar suas chances de adaptação ao meio onde vive, um programa de melhoramento genético precisa dessa variabilidade para diminuir possíveis efeitos negativos causados por endocruzamentos e homozigoses (CAROLSFELD et al., 2003) e para transmitir à população genes que poderão ser responsáveis por características importantes como resistência a doenças e a mudanças climáticas entre outros (MARIA; AZEVEDO; CARNEIRO, 2009).

Assim como já aconteceu para outros animais de produção (bovinos - criopreservação e suínos - resfriamento), onde a técnica de criopreservação possibilitou o fácil acesso e maior eficiência na disseminação do material genético de alto potencial ao setor produtivo, para a piscicultura esta técnica se torna de relativa importância. Especialmente para espécies nativas, permite a otimização de reprodutores e no futuro, se alcançar o sucesso da criopreservação de embriões ou ovócitos e a oferta de alevinos pode acontecer em todo período do ano (FORNARI; TONISSI; STREIT Jr., 2014).

A técnica de criopreservação de sêmen de peixes é de elevado interesse para a piscicultura que pode ser utilizada nos laboratórios de reprodução. Tal técnica visa à conservação deste material genético em nitrogênio líquido a -196°C (CARNEIRO, 2007; PEGG, 2007).

A criopreservação deve ser feita sem que o sêmen seja ativado, sendo imprescindível evitar seu contato com a água ou mesmo a urina do peixe durante sua extração. Diferente de mamíferos, o espermatozoide do peixe quando liberado do trato reprodutivo está imóvel, ou seja, são imóveis nos testículos e no plasma seminal de espécies de água doce. Porém ao entrar em contato com a água começa a se locomover e diminui o movimento até cessar por completo, na maioria das espécies, pouco tempo depois (± 45 segundos) (COSSON, 2004; FORNARI; TONISSI; STREIT Jr., 2014).

Quando fazemos um histórico sobre criopreservação de sêmen de peixes, as informações são de que os primeiros congelamentos deste material no mundo foram realizados na década de 1950. Apenas cerca de 30 anos depois o Brasil iniciou suas pesquisas na área (CAROSFELD et al., 2003; VIVEIROS, 2011; MARIA; AZEVEDO; CARNEIRO, 2009).

A criopreservação de gametas de peixes tem sido estudada de forma objetiva nas últimas décadas e a criopreservação de espermatozoides de cerca de 200 espécies de peixe foi alcançada com sucesso (GODOY; STREIT Jr.; BOS-MIKICH, 2011).

Atualmente os benefícios da técnica de criopreservação de sêmen são muitos. Entre eles podemos citar: a eliminação do problema causado pela assincronia na maturidade gonadal entre machos e fêmeas; a simplificação do manejo dos reprodutores, não necessitando mais de se trabalhar com machos e fêmeas praticamente ao mesmo tempo; a facilidade de transporte de material genético eliminando o transporte de animais vivos, que é de alto custo e risco; a formação de bancos de germoplasma que permite a conservação de gametas de animais selecionados em programas de melhoramento ou manipulados e o estabelecimento de programas de hibridização utilizando peixes com períodos reprodutivos diferentes (VIVEIROS, 2005; MARIA; AZEVEDO; CARNEIRO, 2009; MARIA; CARNEIRO, 2012).

Fornari; Tonissi; Streit Jr. (2014) também destacam tais vantagens e acrescentam ainda que a criopreservação de sêmen é uma biotécnica, que dentre outras vantagens reduz a quantidade de reprodutores a serem estocados para a produção de alevinos. Outra vantagem atribuída à biotécnica de congelamento de sêmen refere-se a programas de melhoramento genético, na qual é enfatizado que a consanguinidade dos indivíduos resulta em uma baixa variabilidade genética na prole.

Os bancos genéticos, incluindo os de sêmen criopreservado, podem ser apontados como solução e um dos esforços de conservação para uma série de problemas encontrados na aquicultura brasileira, principalmente relacionados a consanguinidade. O banco genético pode ser de particular importância para garantir a diversidade genética em cativeiro e programas de melhoramento genético, que são realizados enquanto outras medidas de conservação são desenvolvidas. Muitas das espécies da aquicultura em questão são também de alto interesse comercial,

devido a isso a utilização de sêmen criopreservado pode servir como uma ferramenta para facilitar a produção e assim evoluir no contexto da atividade (CAROLSFELD et al., 2003).

A criopreservação, porém, expõe os espermatozoides a situações de estresse, sendo necessário o desenvolvimento de protocolos adequados, que permitam sua preservação por curtos (resfriamento) ou longos períodos (congelamento). O ajuste desses protocolos requer o estudo de fatores que podem afetar o sucesso da criopreservação, como a formulação de diluentes adequados às características inerentes a cada espécie, haja vista que tais características podem variar, não possibilitando a extrapolação direta de uma espécie para outra (SOUZA; LIMA; SILVA, 2014).

Através da criopreservação tem se conseguido obter excelentes constituições de bancos de germoplasma de espécies ameaçadas. Esta medida tem sido eficiente e adotada em vários países, pela sua relativa simplicidade e pelo baixo custo de implantação e de manutenção. A sua utilização na restauração da variabilidade genética de estoques naturais prejudicados e sob ameaça de extinção iminente faz desta tecnologia uma poderosa ferramenta de conservação de recursos genéticos de peixes (VIVEIROS; GODINHO, 2009).

O congelamento de células vivas pode ser feito basicamente de três formas. A primeira se refere ao uso do gelo seco (neve carbônica ou dióxido de carbono sólido) ou do nitrogênio líquido. O gelo seco mantém as células na temperatura -79°C. O vapor de nitrogênio líquido (-120/-130°C) é também um resfriador bem prático, portanto faz sentido usar o nitrogênio líquido tanto para resfriamento quanto para estocagem de material biológico (CAROLSFELD; HARVEY, 1999). A terceira forma de se armazenar o material é usando nitrogênio líquido, que permite a manutenção da temperatura a -196°C (CAROLSFELD; HARVEY, 1999; CARNEIRO et al., 2006; CARNEIRO, 2007; PAULINO, 2009; RESENDE; MARQUES, 2009), sendo esse último o melhor meio para conservação de sêmen de peixe, e de outros animais, por longos períodos de tempo, facilitando inclusive sua identificação e diminuindo o risco de contaminação do material (CARNEIRO, 2007).

Segundo Maria e Carneiro (2012), a sequência de eventos normalmente relacionados à criopreservação de sêmen de peixes envolve etapas como: 1. Coleta do sêmen; 2. Avaliação microscópica da qualidade seminal; 3. Adição de diluidores e

crioprotetores; 4. Envase; 5. Congelamento e armazenamento; 6. Descongelamento; 7. Fertilização e acompanhamento do desenvolvimento embrionário e larval.

Segundo Maria; Azevedo; Carneiro (2009), alguns detalhes importantes devem ser observados para a obtenção de sucesso no armazenamento de sêmen por longos períodos. São eles:

- incorporação à solução crioprotetora adequada;
- seu correto resfriamento anterior ao congelamento; e,
- descongelamento e utilização.

3.1.1 Diluentes

No interior dos testículos e, para a maioria das espécies também no plasma seminal, os espermatozoides de peixes são imóveis adquirindo motilidade somente devido à diferença de osmolaridade entre o plasma seminal e a solução ativadora (COSSON, 2004).

O congelamento do sêmen puro praticamente inviabiliza sua atividade após o descongelamento. Para evitar isso se faz necessária adição de crioprotetores externos e internos bem como de meios diluentes. Os diluentes são soluções de sais ou de carboidratos, que adicionados ao sêmen mantém a viabilidade das células espermáticas durante a redução da temperatura. Uma solução diluidora deve ser utilizada no processo de resfriamento porque a diluição diminui a competição dos espermatozoides por oxigênio (O_2) e espaço (CAROLSFELD; HARVEY, 1999). Os diluentes devem garantir que não haja ativação prévia da motilidade espermática, mantendo o sêmen estável. É importante que a motilidade dos espermatozoides não seja ativada antes do congelamento e nem durante o descongelamento, pois a mesma pode exaurir a reserva energética necessária à fertilização (LEGENDRE; BILLARD, 1980; MARIA et al., 2006; CARNEIRO et al., 2006).

A ação dos açúcares não penetrantes consiste em elevar a pressão osmótica, resultando na desidratação celular, com conseqüente redução da formação de gelo intracelular. Além disso, os açúcares podem interagir com os fosfolipídios da membrana plasmática, reorganizando-a e, a partir disto, aumentando a capacidade de sobrevivência dos espermatozoides submetidos ao processo de criopreservação (BUCAK et al., 2007).

Dentre os açúcares utilizados nos meios diluidores para criopreservação de sêmen estão os açúcares simples, como a frutose e a glicose, e os açúcares não penetrantes na célula, como a lactose, a rafinose e a trealose (SQUIRES et al., 2004).

Entre os diluidores mais conhecidos e utilizados com sucesso na criopreservação de sêmen de peixes nativos brasileiros podemos citar a solução de glicose, geralmente na concentração de 5%.

3.1.2 Crioprotetores

Para a obtenção de sucesso durante o processo de criopreservação como um todo, é necessária a diluição do sêmen em uma solução crioprotetora que deve conter um diluidor, um crioprotetor intracelular e um crioprotetor extracelular. Esses produtos garantem a não ativação dos espermatozoides durante o armazenamento e protegem as células espermáticas das chamadas crioinjúrias, danos celulares causados pela sua exposição a baixas temperaturas (BILLARD; COSSON; NOVEIRI, 2004).

Os crioprotetores devem ser adicionados ao meio diluidor/crioprotetor para que haja uma proteção do espermatozoide durante o congelamento e o descongelamento. Os crioprotetores extracelulares recobrem a superfície celular e estabilizam a membrana, minimizando e reparando os possíveis danos celulares causados pelo congelamento. Já o intracelular, é uma substância química não tóxica para os gametas que simplesmente retira a água da célula e diminui a temperatura na qual o interior da célula é congelado, impedindo a formação de cristais de gelo. (CAROLSFELD; HARVEY, 1999; FORNARI; TONISSI; STREIT Jr., 2014; RESENDE; MARQUES, 2009). Todos os crioprotetores devem ser relativamente não tóxicos, e facilmente removíveis no final do ciclo de congelamento-descongelamento (CAROLSFELD; HARVEY, 1999; RESENDE; MARQUES, 2009;).

Diversos autores citam os crioprotetores intracelulares mais comuns utilizados em piscicultura. São eles: Dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol e metanol (CAROLSFELD; HARVEY, 1999; RESENDE; MARQUES, 2009), DMSO e o metilglicol, (MARIA; AZEVEDO; CARNEIRO, 2009; VIVEIROS; GODINHO, 2009).

Já os protetores extracelulares mais utilizados são: gema de ovo (FORNARI; TONISSI; STREIT Jr., 2014; MARIA et al., 2006; VIVEIROS; GODINHO, 2009;

VIVEIROS et al., 2011), leite em pó e, BTS (Beltsville Thawing Solution) (FORNARI; TONISSI; STREIT Jr., 2014).

As soluções crioprotetoras mais utilizadas nas espécies da família Pimelodidae são compostas por DMSO ou metanol e leite em pó ou lactose, utilizadas como crioprotetores intracelulares e extracelulares, respectivamente (CAROSFELD et al., 2003).

A associação entre crioprotetores intracelulares e extracelulares é indicada e, conveniente utilizada (CAROLSFELD; HARVEY, 1999; GODINHO, 2000).

O preparo da solução crioprotetora envolve primeiramente a diluição do crioprotetor intracelular, geralmente em concentrações que podem variar de 5 a 10%, com a presença de glicose (5%) para aumentar a pressão osmótica da solução e evitar a ativação dos espermatozoides. Em seguida pode-se adicionar o crioprotetor extracelular, gema de ovo, leite em pó, ou outro. A proporção normalmente utilizada está entre 1:3 e 1:10 (sêmen: solução) (MARIA; AZEVEDO; CARNEIRO, 2009).

3.2 DESCONGELAMENTO

Assim como para o congelamento, os cuidados para o descongelamento também são de grande importância para obter células viáveis, caso contrário poderão ocorrer mortes celulares principalmente se descongeladas muito rápida ou muito lentamente. No descongelamento as células precisam de tempo para se reidratar, e ao mesmo tempo descongelar rapidamente para evitar a formação de cristal de gelo intracelular e acabar morrendo (CAROLSFELD; HARVEY, 1999).

Com sêmen de peixe congelado, a melhor sobrevivência de células é obtida ao se descongelar o mais rápido possível. Mas há exceções e frequentemente a melhor taxa de descongelamento é descoberta por tentativa e erro (CAROLSFELD; HARVEY, 1999).

4 OBJETIVO GERAL

Comparar diferentes crioprotetores para a criopreservação de sêmen de jundiá, *R. voulezi* e *R. branneri*.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar diferentes crioprotetores intra e extracelulares quanto à eficácia na criopreservação de espermatozoides de jundiá, *R. voulezi* e *R. branneri*.

Avaliar o efeito de diferentes soluções crioprotetoras na motilidade do sêmen criopreservado do jundiá *R. voulezi* e *R. branneri*.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi realizado durante o período reprodutivo das espécies, no mês de novembro de 2014. Inicialmente foram selecionados os reprodutores de *R. branneri* e de *R. voulezi* sendo estocados em tanques de alvenaria (2500 litros). A seleção ocorreu a partir dos estoques destas espécies junto ao InPAA (Instituto de Pesquisas em Aquicultura Ambiental), pertencente à UNIOESTE (Universidade Estadual do Oeste do Paraná) Campus Toledo – Pr. Para a seleção dos reprodutores verificou-se a ocorrência de espermição sob leve pressão abdominal. Devido à fácil espermição e a necessidade de pouco sêmen, os reprodutores não foram submetidos ao processo de indução hormonal.

Foram analisados os parâmetros de qualidade da água onde os reprodutores foram estocados através de sonda multiparâmetros (Horiba). Temperatura – 24,5°C, oxigênio dissolvido – 6,8 mg/L, pH 6,9 e condutividade elétrica 0,88 µS/cm.

Os peixes são todos microchipados a fim de se ter um controle na população selvagem e seus descendentes F1. Desta forma foi realizada a leitura dos microchips para saber a origem dos reprodutores (Tab. 01 e 02).

Tabela 01 - Identificação e características dos machos de *R. voulezi*

Macho	Identificação	Volume sêmen (mL)	Peso do macho (g)
1	463377 – F1	1,5	130
2	61685 – S	2	162
3	771234 – F1	1	80

S – selvagem; F1 – primeira geração/família de descendentes.

A coleta do sêmen foi realizada por pressão abdominal com massagem na região ventral do animal sempre no sentido céfalo-caudal, eliminando a primeira gota, contendo urina, para não ocorrer possível contaminação. O sêmen foi coletado e armazenado diretamente em Tubos de Falcon acondicionando em caixa com gelo para manter refrigerado e conservado. Foram utilizados sêmen de três machos de *R. voulezi* e dois de *R. branneri* em quantidade suficiente para a realização do trabalho. Foram realizadas as pesagens de cada macho após a coleta do sêmen registrando o peso e volume de sêmen coletado de cada macho (Tab. 01 e 02). O sêmen de cada espécie coletado foi misturado para obter o pool de sêmen.

Tabela 02: Identificação e características dos machos de *R. branneri*

Macho	Identificação	Volume sêmen (mL)	Peso do macho (g)
4	61611 – S	1	222
5	60454 – S	2	202

S – selvagem; F1 – primeira geração/família de descendentes.

Para estimar a concentração espermática do sêmen de *R. voulezi* e *R. branneri* foi utilizado o método de espermátocrito e também contagem em câmara de Neubauer.

Para a determinação do espermátocrito amostras de cada pool de sêmen foram coletadas em tubos capilares de microhematócrito, preenchidos com aproximadamente 75% de sêmen e vedados em uma das extremidades e submetidos à centrifugação por 40 minutos com 5.000 rotações por minuto (RPM). Após a centrifugação realizou-se a medida do percentual de massa celular conforme a régua com escala de leitura (Fig. 03) e os dados estão apresentados na Tabela 03.

A contagem em câmara de Neubauer foi realizada utilizando amostras do pool de sêmen de cada espécie. As amostras foram diluídas em solução formol salina numa relação de 1:5000 (sêmen:diluyente) e em seguida colocada uma pequena parcela sobre a câmara de Neubauer para a contagem das células. Ao todo foram realizadas três contagens para cada amostra realizando-se uma média. Desta forma, obteve-se uma concentração espermática de $2,56 \times 10^{10} \text{ .mL}^{-1}$ e $2,46 \times 10^{10} \text{ .mL}^{-1}$ para *R. voulezi* e *R. branneri*, respectivamente.

Figura 03 – Régua para verificação do percentual do volume de células (espermatozoides) e o capilar com o esperma não diluído



Fonte: GLOWKA; WERLANG, 2014.

Tabela 03 – Espermatócrito de *R. voulezi* e *R. branneri*

Espécie	Percentual celular em relação ao volume (%)
<i>R. voulezi</i>	95
<i>R. voulezi</i>	92
<i>R. branneri</i>	83
<i>R. branneri</i>	89
<i>R. branneri</i>	83

Foram realizadas quatro soluções com diferentes crioprotetores internos e externos. Para todas as soluções testadas utilizou-se a glicose como diluidor visto que, é um diluidor de fácil acesso e garante a não ativação dos espermatozoides.

Solução 1 – 150 mL:

135 mL de água destilada

10% de glicose anidra - $C_6H_{12}O_6$

10% de Dimetilsulfóxido (DMSO) C_2H_6OS

1 gema de ovo

* solução recomendada para peixes tropicais de escama segundo Carolsfeld et al. (2003).

Primeiramente mediu-se 135 mL de água destilada pesando em seguida 15g de glicose anidra e adicionando-a à água agitando até a completa diluição. Em seguida foram adicionados 15 mL do protetor intracelular DMSO à solução. O próximo passo foi separar a gema do ovo, retirar a sua membrana protetora, inserir na solução e misturá-la. Após este processo, a solução foi acondicionada em Becker e colocada em caixa térmica.

Solução 2 – 100 mL

90 mL de água destilada

10% de glicose anidra $C_6H_{12}O_6$

10% de metanol CH_3OH

5% leite em pó

*solução recomendada para peixes tropicais de couro segundo Carolsfeld et al. (2003).

A solução foi preparada em um Becker e inicialmente foi medido 90 mL de água destilada e em seguida adicionado 10 g de glicose anidra realizando a diluição. Posteriormente, foram adicionados 10 mL de metanol e a solução homogeneizada. O último ingrediente a ser adicionado na solução foi 5 g de leite em pó. Depois de pronta, a solução foi acondicionada em caixa térmica para o seu resfriamento e conservação.

Solução 3 – 150 mL

135 mL de água destilada

10% de glicose anidra $C_6H_{12}O_6$

10% de glicerol $C_3H_8O_3$

1 gema ovo

Primeiramente, foi tomada a medida de 135 mL de água destilada e adicionado 15 g de glicose anidra sendo misturados em seguida e efetuada a diluição em um Becker. Posteriormente, foram adicionados 15 mL de glicerol e

agitado levemente para haver homogeneização. Em seguida adicionou-se a gema de ovo aos demais ingredientes, misturando e colocando sob refrigeração para a conservação.

Solução 4 – 100 mL

90 mL de água destilada

10% de glicose anidra $C_6H_{12}O_6$

10% de glicerol $C_3H_8O_3$

5% de leite em pó.

Após realizada a medida de 90 mL de água destilada acrescentou-se 10 g de glicose anidra agitando a solução para diluição e mistura e um Becker. Em seguida acrescentou-se 10 mL de glicerol agitando levemente até a completa homogeneização. Na sequência, foram adicionadas à solução 5 g de leite em pó realizando a sua diluição e após armazenando em caixa térmica para a conservação.

A fim de verificar a qualidade do sêmen fresco para a criopreservação, foram utilizadas amostras com tempo de motilidade superior a 30 segundos, ativadas com água destilada. Posteriormente, foi realizado um pool do sêmen coletado de cada espécie.

Em seguida foi inserido o sêmen junto à solução crioprotetora. Para isso, foi utilizada a proporção de 1:4 (sêmen:crioprotetor), agitando lentamente para haver a homogeneização. Com a mistura pronta, o material foi “aspirado” para o armazenamento em palhetas de 0,25 mL de volume. As palhetas foram acondicionadas em *hack* (suporte vertical para palhetas) enumeradas (Tab. 04) e estas, por sua vez, armazenadas em vapor de nitrogênio no botijão de vapor de nitrogênio (*dry shipper*) por cerca de cinco horas (Fig. 04 e 05).

Para testar a eficácia dos diferentes crioprotetores utilizados no experimento, foi determinada a utilização da água destilada como ativador devido este ser o método mais utilizado na grande maioria dos trabalhos referentes à avaliação de motilidade.

Foram verificados a intensidade de motilidade dos espermatozóides e o tempo de motilidade. A definição das escalas de intensidade de movimentação dos

espermatozoides foi adaptada do modelo definido por Carolsfeld et al. (2003). Desta forma ficou definido que: escala 0 representou 0% de motilidade (sem movimento); 1, 1 – 20%; 2, 21 – 40%; 3, 41 – 60%; 4, 61 – 80% e; 5, 81 – 100%. Esta escala é avaliada no início da ativação e faz referência a vigorosidade do movimento observado.

Para a determinação do tempo de motilidade em segundos foi utilizado cronômetro sendo iniciado logo após a ativação dos espermatozoides com água e marcado o tempo final após o término total de motilidade.

Tabela 04 – Numeração das *hack* conforme a solução crioprotetora e a espécie

Nº <i>hack</i> de criopreservação	Solução crioprotetora	Espécie
1	1	<i>R. voulezi</i>
2	2	<i>R. voulezi</i>
3	3	<i>R. voulezi</i>
4	4	<i>R. voulezi</i>
5	1	<i>R. branneri</i>
6	2	<i>R. branneri</i>
7	3	<i>R. branneri</i>
8	4	<i>R. branneri</i>

Solução 1 - 10% DMSO+10% glicose + ovo; Solução 2 - 10% metanol + 10% glicose + 5% leite em pó; Solução 3 - 10% glicerol + 10% glicose + ovo; Solução 4 – 10% glicerol + 10% glicose + 5% leite em pó.

Figura 04 – a) Inserção do sêmen à solução crioprotetora; b) processo de agitação da solução para homogeneização junto ao sêmen



Fonte: GLOWKA; WERLANG, 2014.

Figura 05 – a) Processo de aspiração da solução crioprotetora juntamente com o sêmen através da palheta de armazenamento; b) *dry shipper* para congelamento e armazenamento das amostras



Fonte: GLOWKA; WERLANG, 2014.

Desta forma, as palhetas foram retiradas do *dry shipper* e após aproximadamente cinco segundos em temperatura ambiente o material do seu interior foi colocado em vidro relógio. Utilizando uma micropipetadora, foram colocados sobre uma lâmina, 10 μL de sêmen e 100 μL de solução ativadora água destilada para visualização em microscopia óptica. Ao se fazer a junção da água destilada ao material criopreservado se deu início à cronometragem para obter o tempo de motilidade. Para cada uma das quatro soluções crioprotetoras foram realizadas três repetições para cada espécie, totalizando oito tratamentos com três repetições. Para a realização de cada repetição foi utilizado diferentes palhetas.

Para a análise estatística, os dados foram submetidos aos testes de normalidade Shapiro-Wilk. Em seguida realizou-se análise de variância ANOVA ($P < 0,05$) utilizando o software estatístico XLSTAT 2014.5. Como teste de comparação de médias aplicou-se o teste Tukey ao nível de significância de 5%.

Figura 06 – a) retirada de parte da palheta com sêmen criopreservado do *dry shipper*; b) descongelamento; c) ativação com água destilada; d) observação das taxas e tempo de motilidade dos espermatozoides



Fonte: GLOWKA; WERLANG, 2014.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A insuficiência de ATP é uma das principais causas da redução do tempo da motilidade espermática. Desta forma, o espermatozoide depende da fosforilação oxidativa mitocondrial para produzir a energia necessária durante o batimento do flagelo (COSSON et al.,1999). Por este fato, deve-se avaliar o efeito dos crioprotetores na motilidade pré congelamento dos espermatozoides quando se tem a intenção de utiliza-los em espécies onde não foram testadas anteriormente (MELO; GODINHO, 2006). No presente trabalho foram utilizadas amostras de sêmen com tempo de motilidade superior a 30 segundos, podendo ser considerado dentro dos padrões para as espécies.

A concentração espermática encontrada de $2,56 \times 10^{10} \text{ .mL}^{-1}$ e $2,46 \times 10^{10} \text{ .mL}^{-1}$ para *R. voulezi* e *R. branneri*, respectivamente, foi acima da encontrada por Bombardelli et al. (2006), para o *Rhamdia quelen* $1,97 \times 10^{10} \text{ .mL}^{-1}$, e Sanches et al.

(2011) $1,79 \times 10^{10} \cdot \text{mL}^{-1}$ para a mesma espécie. Este fato pode ser em decorrência da não indução hormonal, diferente dos outros trabalhos aqui mencionados. De acordo com Zaniboni-Filho e Weingartner (2007), a indução hormonal em machos promove um aumento do volume de sêmen, porém, não aumenta o número de células espermáticas liberadas.

Todas as soluções crioprotetoras foram testadas anteriormente ao processo de congelamento quanto a sua capacidade de ativar os espermatozoides, sendo que nenhuma solução ativou o sêmen, fato este desejado para a solução crioprotetora.

O crioprotetor DMSO em concentração de 10% (solução crioprotetora 1) não foi eficaz na criopreservação de sêmen de jundiá *R. branneri* e *R. voulezi* utilizando água destilada como ativador. No presente trabalho, a solução com este crioprotetor não apresentou motilidade espermática após adição do ativador, o que pode indicar a mortalidade total dos espermatozoides.

Carolsfeld et al. (2003) obteve sucesso no congelamento de sêmen utilizando DMSO 10% para outras espécies de peixes nativos como: curimatá (*Prochilodus lineatus*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*), piapara (*Leporinus elongatus*), piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) e dourado (*Salminus maxillosus*) e, para somente a espécie de couro *Pseudoplatystoma corruscans*, não se mostrou eficaz, demonstrando resultados semelhantes ao presente trabalho. Medina; Velasco; Cruz (2005) obtiveram taxas de motilidade entre 60 e 80% utilizando o DMSO como crioprotetor intracelular em yamú *Brycon siebenthale*. Viveiros et al. (2009) também conseguiram bons resultados utilizando o crioprotetor DMSO, indicando ser um bom crioprotetor a ser utilizado para o dourado, *Salminus brasiliensis*. Oliveira (2006) obteve melhores resultados utilizando DMSO em comparação com o glicerol para ao dourado *Salminus maxillosus*. De forma geral, podemos observar que o crioprotetor DMSO + gema de ovo é indicado para a criopreservação do sêmen de espécies de escamas, sendo que para *Pseudoplatystoma* sp., uma espécie de couro, também se mostrou ineficaz.

Corso (2014) conseguiu bons resultados de motilidade em *R. quelen* usando Beltsville Thawing Solution (BTS) como diluidor e metanol como crioprotetor, na proporção de 1:3 (sêmen:diluyente). Já Araújo et al. (2011) recomendam o uso do crioprotetor DMSO com diluyente BTS para *Steindachneridion parahybae* pois este proporciona altos rendimentos na qualidade do esperma após o descongelamento.

O DMSO é um crioprotetor que apresenta características importantes que podem determinar sucesso na sua utilização. Por apresentar peso molecular pequeno e possuir elevada permeabilidade celular. Todavia, alguns autores ponderam que, ainda assim, o DMSO pode causar danos pelo choque osmótico e pela sua toxidez (STREIT Jr.; OLIVEIRA; RIBEIRO, 2009).

Os diferentes crioprotetores utilizados no presente trabalho apresentaram resultados diferentes entre si e entre as espécies estudadas. Foi verificada eficiência para as soluções 2, 3 e 4 com diferença significativa ($P < 0,05$) no tempo e intensidade da motilidade espermática (Tab. 05 e 06).

Tabela 05 - Duração média do tempo de motilidade espermática expressa em segundos (média±DP) e escala de intensidade (0 – 5) de sêmen de jundiá *R. voulezi*

SOLUÇÃO CRIOPROTETORA	ESCALA DE MOTILIDADE	TEMPO (s)
METANOL+LEITE	1	30,67±1,53 ^A
GLICEROL+OVO	2	32,33±0,58 ^A
GLICEROL+LEITE	2	26,67±1,15 ^B

Solução 2 - 10% metanol + 10% glicose + 5% leite em pó; Solução 3 - 10% glicerol + 10% glicose + ovo; Solução 4 - 10% glicerol + 10% glicose + 5% leite em pó. Escalas de motilidade: escala 0 representou 0% de motilidade (sem movimento); 1, 1 – 20%; 2, 21 – 40%; 3, 41 – 60%; 4, 61 – 80% e; 5, 81 – 100%. Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($P < 0,05$), pelo Teste Tukey.

Para o *R. voulezi* o crioprotetor metanol apresentou escala de motilidade inferior ao demais tratamentos, porém sem apresentar diferença significativa ($P > 0,05$). Já para o tempo de motilidade, as soluções crioprotetoras metanol+leite e glicerol+ovo foram similares entre si e superiores a glicerol+leite ($P < 0,05$). Murgas et al. (2007) obtiveram resultados significativos utilizando metanol diluído em BTS para a espécie *Prochilodus lineatus*.

O metanol tem o menor peso molecular e, assim, a permeação celular é mais rápida em comparação com outros compostos que permeiam, tais como DMSO e glicerol (VIVEIROS et al., 2011).

Para *R. branneri*, a solução crioprotetora a base de DMSO não foi eficaz em promover a motilidade de sêmen após o descongelamento. As demais soluções foram eficientes na criopreservação, sendo observado motilidade pós

descongelamento, porém não tiveram diferença significativa ($P>0,05$) nos seus tempos de motilidade (Tab. 06).

Para *R. voulezi*, os tratamentos com glicerol+ovo e metanol+leite como crioprotetores, foram similares entre si no tempo de motilidade dos espermatozoides, e superiores a solução a base de glicerol+leite. Estes resultados revelam que uma combinação entre os crioprotetores extracelular e intracelular é capaz de tornar uma solução crioprotetora mais eficaz que outra. As soluções contendo o mesmo crioprotetor intracelular glicerol apresentaram resultados diferentes ($P<0,05$) quando usada com gema de ovo ou leite em pó como crioprotetor extracelular.

Tabela 06 - Duração média do tempo de motilidade espermática expressa em segundos (média±DP) e escala de intensidade (0 – 5) de sêmen de jundiá *R. branneri*

SOLUÇÃO CRIOPROTETORA	ESCALA DE MOTILIDADE	TEMPO (s)
METANOL+LEITE	1	25,00±3,6
GLICEROL+OVO	3	34,00±5,20
GLICEROL+LEITE	2	26,33±4,51

Solução 2 - 10% metanol + 10% glicose + 5% leite em pó; Solução 3 - 10% glicerol + 10% glicose + ovo; Solução 4 - 10% glicerol + 10% glicose + 5% leite em pó. Escalas de motilidade: escala 0 representou 0% de motilidade (sem movimento); 1, 1 – 20%; 2, 21 – 40%; 3, 41 – 60%; 4, 61 – 80% e; 5, 81 – 100%.

O glicerol é um líquido oleoso, incolor, viscoso e de sabor doce, solúvel em água e álcool. Esse crioprotetor induz à mudanças nos eventos citoplasmáticos por aumentar a viscosidade ao penetrar a membrana celular da célula espermática através de difusão passiva, proporciona desidratação celular através do seu efeito osmótico, criando um meio hipertônico que induz a saída de água das células espermáticas causando também alterações na polimerização da tubulina, na associação de microtúbulos no balanço bioenergético (HAMMERSTED; GRAHAM, 1992).

O glicerol foi reconhecido como sendo capaz de proteger as células contra os efeitos deletérios do congelamento por volta da década de 1950 e desde então vem sendo utilizado na preservação de sêmen a longo prazo também em peixes (GODINHO, 2000).

Streit Jr. et al. (2006) realizaram estudos utilizando vários crioprotetores intracelulares associados a outros extracelulares para o pacu, *Piaractus mesopotamicus* e identificou o glicerol como não sendo um bom crioprotetor pra esta espécie.

Viveiros et al. (2009) avaliaram a sensibilidade dos espermatozoides de dourado (*Salminus brasiliensis*) a diferentes soluções crioprotetoras e obtiveram bons resultados com DMSO. Já os espermatozoides se mostraram altamente sensíveis à exposição ao glicerol, recomendando que este crioprotetor não deva ser usado em soluções crioprotetoras para o sêmen dessa espécie.

Linhart; Billard; Proteau (1993) encontraram melhores resultados utilizando o crioprotetor glicerol quando comparado ao DMSO, para o bagre *Silurus glanis*, similar ao encontrado no presente trabalho para jundiá. Já Steyn (1993), obteve resultados positivos utilizando solução crioprotetora a base de DMSO na criopreservação do sêmen do bagre africano *Clarias gariepinus*.

Para ambas as espécies, o conjunto glicerol+ovo foi a solução que apresentou os maiores tempos de motilidade, mesmo não apresentando diferença significativa ($P>0,05$) em relação aos demais conjuntos (glicerol+leite e metanol+leite) para o *R. branneri* e também não havendo diferença ($P>0,05$) com o metanol+leite para o *R. voulezi*.

Para a espécie *R. branneri*, as soluções crioprotetoras testadas não apresentaram diferença significativa ($P>0,05$) no entanto, para esta espécie o maior tempo de motilidade esteve próximo ao de *R. voulezi*, utilizando o crioprotetor intracelular glicerol e gema de ovo como extracelular (Tab. 06).

Avaliando a motilidade após o descongelamento, Carolsfeld et al. (2003) também observaram soluções crioprotetoras com metanol como sendo eficazes na criopreservação de espermatozoides de pintado, *Pseudoplatystoma corruscans*. Estes autores recomendam o uso de metanol como crioprotetor intracelular em peixes de couro.

Curso (2014) observou boa taxa e tempo de motilidade utilizando o crioprotetor metanol, porém, usando como diluente o BTS, para *R. quelen*. Também, Miliorini (2006) observou que o metanol proporcionou as maiores durações de motilidade espermática pós descongelamento quando comparado ao DMSO para a espécie *Prochilodus lineatus*.

Para ambas as espécies estudadas o crioprotetor DMSO não foi efetivo na manutenção da qualidade das células espermáticas durante a criopreservação, não sendo orientado o seu uso.

Diante dos resultados encontrados no experimento, aqui apresentados, para as espécies de jundiá, *Rhamdia voulezi* e *Rhamdia branneri* os crioprotetores glicerol e metanol se mostraram eficazes e podem ser utilizados nos processos de criopreservação de sêmen, associados à crioprotetores extracelulares gema de ovo e leite em pó respectivamente.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As espécies *R. branneri* e *R. voulezi* necessitam receber mais estudos para verificar além dos crioprotetores, diferentes ativadores e verificar a fertilidade utilizando as soluções crioprotetoras aqui apresentadas.

É importante ressaltar que, além dos crioprotetores e do método de análise do sêmen, outros fatores também exercem influência sobre a qualidade do sêmen criopreservado, como a taxa de resfriamento, concentração espermática, tempo e método de adição dos crioprotetores, métodos de envase, condições de congelamento, tempo e temperatura de descongelamento, dentre outros. Além disso, cada um desses fatores responde de forma diferente e dependente da espécie, mostrando a importância de novos estudos.

REFERÊNCIAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Criopreservação**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Sangue+Tecidos+e+Orgaos/Assunto+de+Interesse/Conceitos,+glossarios,+siglas/Criopreservacao>>. Acesso em: 31 out. 2014.

ARAÚJO, Rafael Venâncio de. Fertility, velocities and motility of Surubim-do-paraíba *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes) sperm cryopreserved in lactose and lactose-free media. In: **Motilidade, velocidade e fertilidade do sêmen de surubim-do-paraíba *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes) criopreservado em diferentes diluidores**. 2011. 93p., p. 67-93. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

BALDISSEROTTO, Bernardo; RADÜNZ NETO, João. **Criação de Jundiá**. Santa Maria: Ed. UFSM, 2004. 232 p.

BAUMGARTNER, Dirceu et al. **Fish, Salto Osório Reservoir, Iguazu River basin, Paraná State, Brazil**. Check List 2(1):1-4, 2006.

BAUMGARTNER, Gilmar et al. **Peixes do baixo rio Iguazu**. Maringá: EDUEM, 2012.

BILLARD R. J.; COSSON, S.B.; NOVEIRI, M. Cryopreservation and short-term storage of sturgeon sperm, a review. **Aquaculture**, v. 236, p.1-9, 2004.

BOCKMANN, F.A.; GUAZZELLI, A.Y.G.M. Heptapteridae. In: **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. (R.E. Reis, S.O. Kullander & C.J Ferraris Jr., orgs). EDIPUCRS, Porto Alegre, p. 406-431, 2003.

BOMBARDELLI, Robie Allan et al. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimardm, 1824). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.4, p.1251-1257, 2006.

BOSCARDIN, Nádia Rita. A produção aquícola brasileira. In: OSTRENSKI, A.; BORGHETTI, J.R.; SOTO, D (Editores). **Estudo setorial para consolidação de uma aquicultura sustentável no Brasil**. Curitiba, 2007. 279 p.

BRASIL. MMA – Ministério do Meio Ambiente. **Água: um recurso cada vez mais ameaçado**. [200-] Disponível em:

<http://www.mma.gov.br/estruturas/sedr_proecotur/_publicacao/140_publicacao09062009025910.pdf>. Acesso em: 18 out. 2014.

BUCAK M.N. et al. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen. Microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. **Theriogenology**, v.67, p.1060-1067, 2007.

CARNEIRO, Paulo César Falanghe et al. Viabilidade do sêmen do jundiá, *Rhamdia quelen*, armazenado sob refrigeração. **Revista Acadêmica**, v.4, n.3, 2006.

CARNEIRO, Paulo César Falanghe. Tecnologias de produção e armazenamento de sêmen de peixes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.31, n.3, p.361-366, jul./set. 2007.

CAROLSFELD, Joachim; HARVEY, Briam. Conservação de recursos genéticos de peixes: teoria e prática. **World Fisheries Trust**, 1999.

CAROLSFELD, Joachim et al. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. **Journal Fish Biology**, v.63, p.472-489, 2003.

CASTILHO, Gisela Geraldine; PEREIRA, Leandro Angelo; PIE, Márcio Roberto. Aquicultura, segurança alimentar, sanidade e meio ambiente. In: OSTRENSKI, Antonio; BORGHETTI, José Roberto; SOTO, Doris (Editores). **Estudo setorial para consolidação de uma aquicultura sustentável no Brasil**. Curitiba, 2007. 279 p.

CORSO, Maira Nesello. **Cortisol plasmático e qualidade seminal de *Rhamdia quelen* após uso de diferentes concentrações do anestésico eugenol**. 2014. 54f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2014.

COSSON, Jacky et al. Ionic factors regulating the motility of fish sperm. In: GAGNON, C. (Ed.) **The male gamete: from basic science to clinical applications**. Vienna: Cache River Press. Chap. 16, p. 162-186, 1999.

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

FOGLI DA SILVEIRA, Washington; KAVAMOTO, Emiko Tahira; NARAHARA, Massuka Yamane. Avaliação da qualidade e criopreservação em forma de "pellets"

do sêmen do bagre, *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840). **Boletim do Instituto da Pesca**, São Paulo, 12 (4): 7-11, 1985.

FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The state of world fisheries and aquaculture 2014**. Rome: FAO, 2014. 253 p.

FORNARI, Darci Carlos; TONISSI, Laura; STREIT Jr.; Danilo Pedro. Tecnologia na produção de peixes nativos. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE AQUICULTURA E BIOLOGIA AQUÁTICA, 6., 2014, Foz do Iguaçu, PR. **Anais...** Foz do Iguaçu: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, 2014. Disponível em: < <http://www.vrsys.com.br/images/vrsys/downloads/clientes/aquaciencia.zip>>. Acesso em: 01 out. 2014.

FRACALOSSI, Débora M. et al. Desempenho do jundiá, *Rhamdia quelen*, e do dourado, *Salminus brasiliensis*, em viveiros de terra na região Sul do Brasil. **Acta Scientiarum**, Maringá, v.26, n.3, p.345-352, 2004.

FUKUSHIMA, Hirla Costa Silva et al. Effect of Stock Density and Ploidy in Jundiá, *Rhamdia quelen*, Larvae Performance. **Journal of Applied Aquaculture**. 2011. 23: 147-156.

GODINHO, Hugo P. Criopreservação de sêmen de peixes. **Informe Agropecuário**, v.21, n.203, p.6-20, 2000.

GODOY, Leandro C. de; STREIT Jr., Danilo Pedro; BOS-MIKICH, Adriana. Cryopreservation of fish female gametes : recent advances and challenges. In: **World Aquaculture**.(2011) Natal, RN. Abstracts, Louisiana : World Aquaculture Society, 2011. p. 480.

GOMES, L.C., GOLOMBIESKI, J.I., GOMES, A.R.C. & BALDISSEROTTO, B. 2000. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). **Ciência Rural** 30(1):179-185.

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

INSTITUTO BRASILEIRO de GEOGRAFIA e ESTATÍSTICA. **Projeção da população**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/apps/populacao/projecao/>>. Acesso em: 26 set. 2014.

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

LIMA, Adriana F.; BERGAMIN, Giovani T.; MORO, Giovanni V. **Piscicultura de água doce: multiplicando conhecimentos**. Engorda de peixes. Brasília, DF: Embrapa, 2013. 440 p.

LINHART, O.; BILLARD, R.; PROTEAU, J.P. Cryopreservation of European catfish (*Silurus glanis* L.) spermatozoa. **Aquaculture**, v.115, p.347-359, 1993.

MALABARBA, Luiz Roberto; MALABARBA, Márcia Claudia de S. L. Filogenia e classificação dos peixes neotropicais. In: BALDISSEROTTO, Bernardo; CYRINO, José E. P.; URBINATI, Elisabeth C. (Org.). **Biologia e fisiologia de peixes neotropicais de água doce**. Jaboticabal: FUNEP; UNESP, 2014.p. 1-12.

MALAJOVICH Maria Antonia. **Biotecnologia 2011**. Rio de Janeiro, Edições da Biblioteca Max Feffer do Instituto de Tecnologia ORT, 2012.

MARIA, Alexandre Nízio; CARNEIRO, Paulo Cesar Falanghe. Criopreservação de sêmen de peixes no Brasil: estado da arte e perspectivas futuras. **Ciência Animal**. 22(1): 124-131, 2012 – Edição Especial - EMBRAPA, 2012.

MARIA, Alexandre Nízio et al. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba *Brycon orbignyanus* semen, an endangered Brazilian teleost fish. **Aquaculture**, v. 260, n. 29, p.298-306, 2006.

MARIA, Alexandre Nízio; AZEVEDO, Hymerson Costa; CARNEIRO, Paulo Cesar Falanghe. Criopreservação de sêmen de peixes no contexto do agronegócio da piscicultura. In: Tavares-Dias, M.. (Org.). **Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo**. 1 ed. Amapá: Embrapa Amapá, 2009, v. 1, p. 47-63.

MEDINA, V.; VELASCO, Y.; CRUZ, P. Aspectos generales de la criopreservación espermática en peces teleósteos. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v.18, n.1, p.34-48, 2005.

MELO, F.C.S.A.; GODINHO H. P. A protocol for cryopreservation of spermatozoa of the fish, *Brycon orthotaenia*. **Animal Reproduction**, v. 33, p.380-385, 2006.

MILIORINI, Aléssio Batista. **Ativadores e concentrações de metanol e dimetilsulfóxido na qualidade do sêmen criopreservado de Curimba**

(*Prochilodus lineatus*). 2006. 99 p. Dissertação (Mestrado em Veterinária) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura**. Brasília: MPA, 2011. 60 p.

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura**. Brasília: MPA, 2010. 128 p.

MURGAS, Luis David Solis et al. Criopreservação do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) mediante adição de diferentes diluidores, ativadores e crioprotetores. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 36: 526-531, 2007.

NAKATANI, Keshiyu et al. **Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e manual de identificação**. Maringá: EDUEM, 2001. 378 p.

OLIVEIRA, Alexmiliano Vogel de. **Resfriamento e criopreservação do sêmen de dourado *Salminus maxillosus* e de pirapitinga *Brycon nattereri***. 2006. 94f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2006.

OSTRENSKY, Antonio; BOEGER, Walter Antonio; CHAMMAS, Marcelo. Potencial para o desenvolvimento da aquicultura no Brasil. In: OSTRENSKI, Antonio; BORGHETTI, José Roberto; SOTO, Doris. (Editores). **Estudo setorial para consolidação de uma aquicultura sustentável no Brasil**. Curitiba, 2007. 279 p.

PAULINO, Michelle Sampaio. **Criopreservação do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*): técnicas para o descongelamento**. 2009. Dissertação (Mestrado em ciências veterinárias) – Universidade Federal de Lavras. Lavras: UFLA, 2009.

PEGG, D. E. Principles of Cryopreservation. In: DAY, J. G.; STACEY, G. N. (Ed). **Methods in molecular biology: Cryopreservation and freeze-drying protocols**. 2ed. Totowa, NJ: Humana Press Inc. v.368, p.39-58, 2007.

PESTANA, Débora; PIE, Márcio Roberto; PILCHOWSKI, Robert Willian. Organização e administração do setor para o desenvolvimento da aquicultura. In: OSTRENSKI, Antonio; BORGHETTI, José Roberto; SOTO, Doris (Editores). **Estudo setorial para consolidação de uma aquicultura sustentável no Brasil**. Curitiba, 2007. 279 p.

RESENDE, Emiko Kawakami de; MARQUES, Débora Karla Silvestre. **Criopreservação de sêmen de peixe**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2009. 5 p. (Embrapa Pantanal. Circular Técnica, 84). Disponível em: <http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/download.php?arq_pdf=CT84>. Acesso em: 05 nov. 2014.

SANCHES, Eduardo Antônio et al. Estimativa da concentração espermática do sêmen de peixe pelo método de espermátocrito. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, n.6, p.1163-1167, 2011.

SILFVERGRIP, A.M.C. **A systematic revision of the neotropical catfish genus *Rhamdia* (Teleostei, Pimelodidae)**. Stockholm, Sweden, 1996. 156p. (PhD Thesis) - Department of Zoology, Stockholm University and Department of Vertebrate Zoology, Swedish Museum of Natural History, 1996.

SOUZA, A. L. P.; LIMA, G. L.; SILVA, A. R. Alternativas para o aperfeiçoamento dos protocolos de criopreservação de sêmen de animais selvagens. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.38, n.2, p.98-102,. 2014.

SQUIRES, et al. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 62, p. 1056-1065, 2004.

STEYN, G.J. The effect of freezing rate on the survival of cryopreserved African sharptooth catfish (*Clarias gariepinus*) spermatozoa. **Cryobiology**, v.30, p.581-590, 1993.

STREIT JR., Danilo Pedro; OLIVEIRA, Ana C.; RIBEIRO, Ricardo P. Motilidade, vigor e patologias seminal in natura e pós criopreservação de *Piaractus mesopotamicus*. **Boletim do Instituto da Pesca**, v.35, p.159-167, 2009.

STREIT JR., Danilo Pedro et al. Sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) criopreservado com diluentes utilizados para sêmen de suínos. **Ciência Animal Brasileira**, v. 7, n. 3, p. 289-297, 2006.

VIVEIROS, Ana Tereza de Mendonça. Semen cryopreservation in catfish species, with particular emphasis on the African catfish. **Animal Breeding Abstracts**., v.73, p.1N-9N, 2005.

VIVEIROS, Ana Tereza de Mendonça. Current Status of Sperm Cryopreservation in Siluriform Cat fishes. In: **Cryopreservation in Aquatic Species**, 2nd Edition. T. R.

Tiersch and C. C. Green, editors. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana.p. 387-397, 2011.

VIVEIROS, Ana Tereza de Mendonça et al. Sensibilidade dos espermatozoides de dourado (*Salminus brasiliensis*) a diferentes soluções crioprotetoras. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.4, p.883-889, 2009.

VIVEIROS, Ana Tereza de Mendonça. Spermatozoon ultrastructure and sperm cryopreservation of the Brazilian dry season spawner fish pirapitinga, *Brycon nattereri*. **Aquaculture Research**, p. 1-10, 2011.

VIVEIROS, Ana Tereza de Mendonça; GODINHO, Hugo P. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.35, p.137-150, 2009.

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