

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E
ENGENHARIA DE PESCA

ALAN MÜLLER MENDONÇA XAVIER

Vitaminas C e E como aditivos em soluções crioprotetoras empregadas no
congelamento de sêmen do *Rhamdia quelen*

Toledo
2010

ALAN MÜLLER MENDONÇA XAVIER

Vitaminas C e E como aditivos em soluções crioprotetoras empregadas no congelamento de sêmen do *Rhamdia quelen*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca do Centro de Engenharias e Ciências Exatas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.
Área de concentração: Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca

Orientador: Prof. Dr. Robie Allan Bombardelli
Co-orientador: Prof. Dr Gilmar Baumgartner

Toledo
2010-10-08

Catálogo na Publicação elaborada pela Biblioteca Universitária
UNIOESTE/Campus de Toledo.
Bibliotecária: Marilene de Fátima Donadel - CRB – 9/924

X3v Xavier, Alan Müller Mendonça
Vitaminas C e E como aditivos em soluções crioprotetoras
empregadas no congelamento de sêmen do *Rhamdia quelen* /
Alan Muller Mendonça Xavier. -- Toledo, PR : [s. n.], 2010.
35 f.
Orientador: Dr^o Robie Allan Bombardelli
Co-orientador: Dr^o Gilmar Baumgartner
Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e
Engenharia de Pesca) - Universidade Estadual do Oeste do
Paraná. Campus de Toledo. Centro de Engenharias e Ciências
Exatas.

1. Jundiá (Peixe) 2. Peixe – Reprodução 3. Fertilização 4.
Sêmen animal 5. Peixe – Criopreservação 6. Vitamina C 7.
Vitamina E 8. Antioxidantes I. Bombardelli, Robie Allan, Or.
II. Baumgartner, Gilmar, Or. III. T

CDD 20. ed. 639.3752

FOLHA DE APROVAÇÃO

ALAN MÜLLER MENDONÇA XAVIER

Vitaminas C e E como aditivos em soluções crioprotetoras empregadas no congelamento de sêmen do *Rhamdia quelen*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca do Centro de Engenharias e Ciências Exatas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Robie Allan Bombardelli
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Presidente)

Prof. Dr. Nyamien Yahaut Sebastien
Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Prof. Dr. Fábio Meurer
Universidade Federal do Paraná

Local de defesa: Auditório do Gerpel - UNIOESTE, *Campus* de Toledo.

DEDICATÓRIA

A minha família, em especial aos meus pais, Antonio (*in memoriam*), minha mãe Neli, por crescer através das oportunidades por eles dadas. A minha companheira Adriana pelo amor e compreensão em todos os momentos.

AGRADECIMENTO(S)

Agradeço a Deus, pela conquista de mais uma etapa com sucesso em minha vida.

Ao meu orientador e amigo, Prof. Dr. Robie Allan Bombardelli, por sua dedicação, amizade, e ter compartilhado seus conhecimentos para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Pitágoras Augusto Piana, pelo auxílio nas análises estatísticas

Ao LATRAAC – Laboratório de tecnologia da reprodução de animais aquáticos cultiváveis, em especial aos amigos deste grupo, Giovano, Lucélia, César, Krause, Eduardo, Cíntia pelo apoio concedido durante a realização deste trabalho.

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca, pelas valiosas contribuições durante o curso.

Aos amigos, presentes em todos os momentos.

Dissertação elaborada e formatada conforme as normas da publicação científica *Aquaculture Research*. Disponível em: <<http://www.http://www.wiley.com/bw/journal.asp?ref=1355-557x>>*

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1 REVISÃO DE LITERATURA	01
1.1 Espécie	01
1.2 Criopreservação de sêmen	01
1.3 Estresse oxidativo e a ação de antioxidantes.....	04
1.5 Vitamina C e E	06
1.6 Diluidores e crioprotetores	07
1.7 Descongelamento de sêmen de peixes	08
2 INTRODUÇÃO.....	10
3 OBJETIVO.....	12
3.1 Objetivo geral.....	12
3.2 Objetivos específicos	12
4 MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1 Análise dos dados	17
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
5.1 Ensaio 1.....	17
5.2 Ensaio 2	19
5.3 Ensaio 3.....	22
6 CONCLUSÕES	26
REFERÊNCIAS	27
APÊNDICE A.....	35

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Parâmetros espermáticos (taxa de motilidade, velocidade curvilinear - VCL, velocidade média de deslocamento - VMD, velocidade linear - VLR) após descongelamento, de sêmen de jundiá (*Rhamdia quelen*) diluído em solução crioprotetora contendo diferentes níveis de vitamina C.....18
- Tabela 2** Parâmetros espermáticos (taxa de motilidade, velocidade curvilinear - VCL, velocidade média de deslocamento - VMD, velocidade linear - VLR) após descongelamento, de sêmen de jundiá (*Rhamdia quelen*) diluído em solução crioprotetora contendo diferentes níveis de vitamina E.....21
- Tabela 3** Parâmetros espermáticos (taxa de motilidade, velocidade curvilinear - VCL, velocidade média de deslocamento - VMD, velocidade linear - VLR) após descongelamento, de sêmen de jundiá (*Rhamdia quelen*) diluído em solução crioprotetora contendo diferentes níveis de vitamina C+E.....22

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Taxas de motilidade espermática após descongelamento, de sêmen de jundiá (*Rhamdia quelen*) diluído em solução crioprotetora contendo diferentes níveis de vitamina C.....18
- Figura 2** Média das velocidades lineares de deslocamento após descongelamento, de sêmen de jundiá (*Rhamdia quelen*) diluído em solução crioprotetora contendo diferentes níveis de vitamina E.....21
- Figura 3** Taxas de motilidade espermática após descongelamento, de sêmen de jundiá (*Rhamdia quelen*) diluído em solução crioprotetora contendo diferentes níveis de vitamina C+E.....23
- Figura 4** Taxas de velocidade média de deslocamento após descongelamento, de sêmen de jundiá (*Rhamdia quelen*) diluído em solução crioprotetora contendo diferentes níveis de vitamina C+E.....24
- Figura 5** Taxas de velocidade linear de deslocamento após descongelamento, de sêmen de jundiá (*Rhamdia quelen*) diluído em solução crioprotetora contendo diferentes níveis de vitamina C+E.....24

Vitaminas C e E como aditivos em soluções crioprotetoras empregadas no congelamento de sêmen do *Rhamdia quelen*

Resumo

O presente trabalho foi conduzido com a finalidade de avaliar o efeito da adição das vitaminas C e E em soluções crioprotetoras empregadas no congelamento do sêmen do *Rhamdia quelen* sobre os parâmetros de motilidade espermática após descongelamento. Foram realizados três ensaios: (1) emprego de 0,0, 4,0, 6,5, 9,0 e 11,5 mg da vitamina C (monovin C[®]).mL de solução⁻¹, (2) emprego de 0,0, 2,0, 4,0, 6,0 e 8,0 mg da vitamina E (monovin E[®]); (3) emprego de 0,0, 4,0+2,0, 6,5+4,0, 9,0+6,0 e 11,5+8,0 mg de vitamina C (monovin C[®]) + mg da vitamina E (monovin E[®]).mL de solução⁻¹ respectivamente. Para os procedimentos de criopreservação, o sêmen foi diluído em solução crioprotetora na proporção de 1:3, submetido ao pré congelamento em vapor de nitrogênio e em seguida mergulhado em nitrogênio líquido. Este material foi descongelado por meio de imersão em água a temperatura ambiente por aproximadamente oito segundo. Os parâmetros espermáticos de taxa de motilidade espermática (MOT), velocidade curvilínea (VCL), velocidade média do deslocamento (VMD) e velocidade em linha reta (VLR), do sêmen *in natura* e do sêmen descongelado foram mensurados por análise computacional (CASA). Verificou-se que quanto empregado apenas a vitamina C, os níveis entre 4,0 e 6,5 apresentaram melhores resultados ($P < 0,05$) relacionados à motilidade espermática das células, que os apresentados com apenas o emprego de vitamina E, que apresentou efeito deletério sobre as células espermáticas ($p = 0,0086$ para velocidade linear) e com o uso combinados das duas vitaminas (C+E) que apresentou valor significativo ($p = 0,0029$) para motilidade espermática, fato porém, que não deve ser considerado, pois os valores de velocidade média de deslocamento ($p = 0,0149$) e velocidade linear ($p = 0,0006$) demonstraram efeito deletério sobre as células espermáticas.

Palavras-chave: antioxidantes, criopreservação, jundiá.

Vitamins C and E as additives in cryoprotectant solutions used in freezing semen of *Rhamdia quelen*

Abstract

This study was conducted to evaluate the effect of the addition of vitamins C and E in cryoprotectant solutions used in freezing semen of *Rhamdia quelen* on the parameters of sperm motility after thawing. Assays were conducted: (1) employment of 0.0, 4.0, 6.5, 9.0 and 11.5 mg of vitamin C (monovin C[®]). mL⁻¹, (2) employment of 0.0, 2.0, 4.0, 6.0 and 8.0 mg of vitamin E (monovin E[®]), (3) employment of 0.0, 4.0 +2.0, 6.5 + 4.0, 9.0 +6.0 and 11.5 +8.0 mg vitamin C (monovin[®] C) + mg of vitamin E (monovin E[®]) mL⁻¹ respectively. Procedures for cryopreservation, the semen was diluted in cryoprotectant solution at a ratio of 1:3, subjected to pre freezing in nitrogen vapor and then plunged into liquid nitrogen. This material was thawed by immersion in water at room temperature for about eight seconds. The rate of sperm parameters of sperm motility (MOT), curvilinear velocity (VCL), average velocity of displacement (VMD) and straight-line speed (VLR), semen fresh and thawed semen were measured by computational analysis (CASA) . It was found that the use of only vitamin C levels between 4.0 and 6.5 showed better results (P <0.05) related to sperm motility of cells, which presented only with the use of vitamin E, which had a deleterious effect on sperm cells (p = 0.0086 for linear speed) and the combined use of both vitamins (C + E) showed significant value (p = 0.0029) for sperm motility, a fact however, that no should be considered, because the values of average speed (p = 0.0149) and linear velocity (p = 0.0006) demonstrated a deleterious effect on sperm cells.

Keywords: antioxidants, cryopreservation, jundiá.

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Espécie

O jundiá, *Rhamdia quelen*, é um bagre nativo da América do Sul, ocorrendo desde Argentina até o sul do México (Silfvergrip, 1996). Nakatani *et al* (2001) descreve o gênero *Rhamdia*, como pertencente à família Pimelodidae, mas em 2003, Bockmann *and* Guazzelli (2003), após realizarem uma revisão sobre a espécie, descreveram a mesma como sendo da família Heptapteridae, pertencendo a Ordem Siluriformes, com sinônimas mais comuns: *R. branneri*, *R. sapo*, *R. hilarii* e *R. sebae*.

O jundiá vive em lagos e poços fundos dos rios, preferindo ambiente de águas mais calmas, junto às margens e vegetação. Seu hábito é noturno, período onde saem a procura de alimento. Sua reprodução pode ser alterado pelas condições ambientais. Machos e fêmeas estão aptos a se reproduzirem por volta de um ano de idade, sendo que seu período reprodutivo varia de agosto a março (Baldisserotto *et al* 2005).

Varias características tornam o jundiá interessante para exploração em piscicultura, pois o mesmo apresenta hábito alimentar onívoro, não possui espinhos intramusculares e pela sua rusticidade apresenta resistência ao manejo e também uma boa conversão alimentar (Fracalossi *et al.* 2004). Apresenta também uma boa aceitação de ração pelas larvas desde o início da alimentação exógena e crescimento acelerado inclusive nos meses mais frios (Fracalossi *et al.* 2002). Sua criação comercial vem se desenvolvendo progressivamente na região Sul do Brasil, sendo a produção em sua maior parte destinada para pesqueiros e estabelecimentos comerciais, para fins de consumo.

1.2 Criopreservação de sêmen

Spallanzani no ano de 1776, foi o primeiro a observar que a diminuição da temperatura reduzia a atividade metabólica dos espermatozoides, permitindo seu armazenamento por período de tempo superior àquele observado com a temperatura ambiente (England, 1993). Os métodos de criopreservação estão baseados na diluição, na refrigeração, na penetração do crioprotetor, no envasamento, no congelamento, no armazenamento e no descongelamento. Um sêmen de boa qualidade é um fator de

fundamental importância para o sucesso da técnica de criopreservação, por isso, este processo deve preservá-lo ao máximo e os processos de congelamento e descongelamento causam diminuição do número de espermatozóides viáveis. (Watson, 1995).

É durante o período de resfriamento que os espermatozóides interagem com os componentes da solução crioprotetora e adquirem resistência ao choque térmico e à criopreservação (Watson, 1995), sendo este período a principal etapa no sucesso do congelamento.

A criopreservação resulta na redução da fertilidade espermática quando comparada com os resultados obtidos com sêmen fresco, devido à diminuição da motilidade espermática e à ocorrência de danos irreversíveis nas células sobreviventes (Watson, 2000).

Porém, o declínio na motilidade após congelamento e descongelamento da célula espermática pode ser explicado, parcialmente, pelas mudanças no transporte ativo e na permeabilidade da membrana plasmática da região caudal (De Lamirande *and* Gagnon, 1995).

Segundo Viveiros (2005), pode ser citada uma série de benefícios relacionados ao desenvolvimento das técnicas de criopreservação de gametas, tais como:

- A recuperação de estoques silvestres ameaçados de extinção;
- A redução do número de reprodutores (machos) utilizados em programas de propagação artificial com conseqüente redução dos custos;
- A eliminação do problema da assincronia na maturidade gonadal entre reprodutores, principalmente das espécies migratórias (ou de piracema) quando machos e fêmeas não estão preparados simultaneamente para a reprodução;
- O estabelecimento de programas de melhoramento genético com a utilização de machos selecionados ou manipulados geneticamente (triplóides, transgênicos);
- A facilidade de transporte, difusão e troca de material genético entre organizações atuantes na área com risco reduzido de transmissão de patógenos;
- O fornecimento de materiais genéticos para a identificação de populações ou estoques por meio de técnicas de biologia molecular;
- O estabelecimento de programa de hibridização utilizando espécies com períodos reprodutivos diferentes.

A criopreservação espermática é uma importante técnica na aquacultura e tem produzido significativas contribuições na preservação em longo prazo do sêmen para reprodução artificial de muitas espécies de peixes, como, por exemplo, o dourado (*Salminus maxillosus*; Coser *et al.*, 1984); a piracanjuba (Bedore, 1999); o bagre africano (Viveiros *et al.*, 2000); o matrinxã (Silveira, 2000); o curimatá (Cruz, 2001),

O sêmen de peixe, ao ser congelado, necessita previamente de diluição em soluções contendo diluidor(es) e crioprotetor(es). Um diluente criopreservativo é projetado não somente para prevenir as alterações indesejáveis que possam ocorrer nos espermatozoides, mas também a iniciação da motilidade.

As proporções de diluição do sêmen variam entre espécies e mesmo entre pesquisadores. Assim, Bedore (1999) utilizou uma diluição de 1:4 (sêmen:diluidor) para pacu-caranha e piracanjuba; Silveira (2000) utilizou 1:4 para matrinxã; Ribeiro *et al.* (2003) utilizaram 1:8 para piau-açú; e Viveiros *et al.* (2000) utilizaram 1:10 para bagre africano.

O contato direto do sêmen com o nitrogênio líquido provoca lesões na membrana plasmática e peça intermediária do espermatozoide. Já no procedimento de resfriamento com o vapor de nitrogênio líquido, os espermatozoides sofrem um congelamento gradativo de forma que as estruturas não são muito danificadas, embora o aspecto da cromatina seja consideravelmente modificado (Billard, 1983).

Os maiores prejuízos conhecidos na estrutura dos espermatozoides com relação ao congelamento e descongelamento ocorrem na temperatura crítica entre 0°C e -40 °C. De forma geral, a remoção de calor e a adição de crioprotetor são as causas de prejuízos; mais detalhadamente pode-se citar o choque de frio, os efeitos do pH, o gelo intracelular e extracelular, o soluto, o volume e a toxicidade dos crioprotetores (Billard, 1983).

A temperatura do sêmen deve ser levada rapidamente até -50°C, porém entre -50 a -80°C deve ser em uma velocidade um pouco mais lenta. A partir deste momento, o sêmen pode ser transferido para nitrogênio líquido e a temperatura levada a -196°C (Harvey *and* Carolsfeld, 1993). Em contraste, Viveiros *et al.* (2000) usaram três etapas no congelamento do sêmen de bagre africano (*C. gariepinus*) e obtiveram taxas de eclosão dos ovos semelhantes às do sêmen fresco. Primeiramente o sêmen foi resfriado a -5°C/min entre 5°C a -40°C. O sêmen permaneceu 5 minutos a -40°C, depois foi mergulhado em nitrogênio líquido (-196°C).

Os métodos de criopreservação consistem de procedimentos para se congelar o sêmen e armazená-lo até sua utilização. Dentre eles, podemos salientar a utilização de palhetas, que envolve seu envasamento com sêmen diluído. Elas são então lacradas e congeladas. Palhetas de diferentes capacidades (0,25 mL; 0,5 mL; 1,0 mL; 1,2 mL; 2,5 mL e 5 mL) têm sido utilizadas. Segundo Lahnsteiner *et al.* (1997), a taxa de fertilização realizada com palheta de 1,2 mL foi semelhante à palheta de 0,5 mL para salmonídeos usando baixa temperatura de congelamento e alta temperatura de descongelamento. A palheta de 5 mL resultou no sucesso da fertilização de somente 40% do sêmen controle fresco.

1.3 Estresse oxidativo e a ação de antioxidantes

O estresse oxidativo é um fator associado com a diminuição da fertilidade durante a estocagem do sêmen (Bilodeau *et al.*, 2000). A geração de espécies reativas ao oxigênio (ROS) em excesso parece estar envolvida nos danos causados na membrana plasmática e no DNA dos espermatozoides (Ochsendorf, 1999) em condições hipotérmicas de estocagem (Maxwell *and* Watson, 1996).

Os termos espécies reativas ao oxigênio (ROS) se referem a todos radicais livres ou espécies ativas ao oxigênio, tais como, radical livre superóxido, radical hidroxil, peróxido de hidrogênio e oxigênio singlete, que podem causar injúria oxidativa em membranas lipídicas, proteínas trans membranas e carboidratos, danificando ácidos nucleicos e despolimerizando ácidos hialurônicos (Ochsendorf, 1999).

O processo de geração de (ROS) é componente chave de processos como: inflamação, isquemia, envelhecimento e carcinogêneses. Por isso que, o desbalanço entre oxidante e antioxidante favorece a formação de peróxidos causando estresse oxidativo e conseqüentemente sequelas patológicas (Ochsendorf, 1999).

A maioria das espécies vivas possui eficiente sistema de proteção capaz de neutralizar os efeitos maléficos ocasionados pelas espécies reativas formadas durante o metabolismo do oxigênio e da oxidação de lipídios. Diversas enzimas estão envolvidas nesse mecanismo: a superóxido dismutase, remove o radical superóxido, convertendo-o em peróxido de hidrogênio; a catalase, destrói o peróxido de hidrogênio, convertendo-o em água e oxigênio; a glutatona peroxidase, é a mais importante na remoção de peróxido nas células; os antioxidantes, como α -tocoferol (vitamina E), ácido ascórbico

(vitamina C) entre outros, participam desse sistema bloqueando a ação dos radicais livres, envolvidos na oxigenização de ácidos graxos poliinsaturados, e conseqüentemente, na formação de peróxidos (Araújo, 2001).

Os antioxidantes podem ser classificados como primários e secundários (ou sinérgicos). Os primários incluem os compostos fenólicos poliidroxilados (Galatos) e os fenóis com impedimento estrutural (Butil hidroxianisol - BHA, Butil hidroxitolueno - BHT, Butil hidroxiquinona - TBHQ e tocoferóis) e possuem a função de inibir a fase inicial da reação pela interação com os radicais livres, ou na etapa de propagação, reagindo com os radicais alcoxil ou peroxil, e/ou pela formação do complexo antioxidante-peroxil. Os secundários são classificados de forma genérica como removedores de oxigênio e complexantes, sendo o ácido ascórbico o principal antioxidante deste grupo (Araújo, 2001). Estes podem atuar na regeneração do radical fenoxil, doando hidrogênio e conseqüentemente regenerando o antioxidante primário. Essa interação entre os vários antioxidantes com a habilidade de regenerar outras espécies oxidadas (vitamina E, vitamina C e glutathione) é, talvez, mais importantes que o nível destes no organismo (Buettner, 1993).

Os antioxidantes, como α -tocoferol (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C) entre outros, participam desse sistema bloqueando a ação dos radicais livres, envolvidos na oxigenização de ácidos graxos poliinsaturados, e conseqüentemente, na formação de peróxidos (Araújo, 2001). Antioxidantes químicos não são efetivos como a vitamina E para a proteção das células, pois não são estocados no corpo do animal (Mcdowell *et al.*, 2000).

A proteção das células é alcançada por meio dos mecanismos de remoção dos radicais livres, sendo que nas membranas, o principal removedor é o α -tocoferol. Os tocoferóis removem os radicais peroxil antes que estes venham a oxidar os ácidos graxos adjacentes ou as proteínas. O grupo hidroxila presente no tocoferol doa seu átomo de hidrogênio para o radical peroxil, convertendo-o em peróxido. Desta forma as enzimas atuarão para a remoção dos novos radicais formados (Araújo, 2001).

Com o objetivo de manter sempre a integridade da célula e aumentar a viabilidade espermática, experimentos utilizando antioxidantes (vitamina E, vitamina C, catalase, superóxido dismutase, entre outros), como componente do diluente, tem sido empregado em várias espécies (Ball *et al.*, 2001), sendo que os mesmos inibem ou diminuem a produção de radicais livres, mas algumas vezes não interferem nos parâmetros da viabilidade espermática (O'flaherty *et al.*, 1997).

1.4 Vitamina C e E

O ácido ascórbico primeiramente ocorre em duas formas, chamada de ácido ascórbico reduzido e ácido dehidroascórbico oxidado, essa oxidação ocorre tão rápido, de forma que a vitamina C protege outros compostos contra oxidação. A oxidaçãoredução reversível do ácido ascórbico com ácido dehidroascórbico é a propriedade química mais importante da vitamina C (McDowell *et al.*, 2000).

A vitamina C é o principal antioxidante hidrossolúvel disponível tanto no meio intra quanto no extracelular, e atua eliminando diretamente as espécies reativas ao oxigênio (ROS), além de estar envolvido na reciclagem de α -tocoferil em α -tocoferol. O calor, a exposição ao ar e o meio alcalino aceleram a oxidação desta vitamina, especialmente em contato com o ferro, cobre ou enzimas oxidativas (Guilland *and* Lequeu, 1995).

O radical tocoferol formado pela oxidação da vitamina E é regenerado pela vitamina C, sendo o ácido ascórbico solúvel em água, este mecanismo pressupõe que o radical tocoferol se mova através da membrana até a superfície, para ser então reduzido pelo ácido ascórbico. Dessa interação ocorre formação do radical ascorbato (muito pouco reativo) que pode interagir com o NADH, regenerando o ascorbato. Deste modo a vitamina C é um antioxidante sinérgico a vitamina E (Buettner, 1993; Araújo, 2001).

O ácido ascórbico é necessário também para o metabolismo de vários aminoácidos, além de ser um co-fator muito importante nas reações de hidroxilação, onde o cobre e o ferro devem permanecer reduzidos (Archrya *et al.*, 2003).

Vitamina E é o nome dado a um grupo de tocoferóis biologicamente ativos derivados de componentes presentes nos vegetais. O principal composto ativo que ocorre naturalmente é o d- α -tocoferol, sendo a forma γ a menos ativa (Booth *and* McDonald, 1992; Swenson *et al.*, 1996).

Os tocoferóis ou vitamina E tem como função a manutenção da integridade e da funcionalidade dos sistemas reprodutivo, muscular, circulatório, nervoso e imune. Algumas dessas funções podem ser realizadas inteiramente ou parcialmente pelo selênio ou certos antioxidantes sintéticos. Ela também está relacionada a reações normais de fosforilação (ATP); proteção das vitaminas A e C contra oxidação; síntese deubiquinona; metabolismo de aminoácidos sulfurosos; metabolismo de vitamina B12,

sendo que a deficiência afeta a conversão da vitamina em coenzima (injúrias neurológicas); metabolismo da vitamina D no fígado e rins, sendo que a deficiência reduz a atividade das hidroxilases (McDowell *et al.*, 2000).

A vitamina E natural está sujeita a destruição por oxidação que pode ser acelerada pelo calor, umidade, gordura rancificada, luz, álcali e microminerais (cobre e ferro). A esterificação da vitamina E aumenta sua estabilidade, por isso, formas comerciais usualmente contem acetato, sendo muito estável a oxidação e não possuindo atividade antioxidante *in vitro* (McDowell *et al.*, 2000).

A vitamina E é um inibidor reconhecido da peroxidação de lipídios em membranas biológicas e tem efeito de proteção na atividade metabólica e viabilidade celular de espermatozóides bovinos criopreservados (Beconi *et al.*, 1993). Porém, O'flaherty *et al.*, (1997) não obtiveram modificações nos parâmetros de viabilidade espermática após o descongelamento de sêmen de bovinos contendo vitamina E.

1.5 Diluidores e Crioprotetores

Os meios diluidores são constituídos de substâncias que permitem a preservação da motilidade e da integridade da membrana plasmática dos espermatozóides, por estabilizar o pH do meio, neutralizar produtos tóxicos produzidos pelos espermatozóides, proteger os mesmos contra o choque térmico, manter o equilíbrio eletrolítico e pressão osmótica compatível com os espermatozóides, atuar como fonte de energia, estabilizar sistemas enzimáticos e ainda inibir o crescimento bacteriano (England, 1993).

Muitos estudos tem sido realizados na tentativa de desenvolver um meio que atenda todas essas qualidades, fazendo com que o mínimo de espermatozóides sejam perdidos no processo de criopreservação. Existem diferenças na composição lipídica da membrana plasmática entre as espécies, raças e ainda entre indivíduos da mesma espécie, o que pode explicar o maior ou menor efeito protetor de um diluente aos espermatozóides de um determinado indivíduo (Holt, 2000), sendo que aqueles cujo sêmen tolera os efeitos da criopreservação são denominados de bons congeladores (Watson, 2000).

Os crioprotetores que são substâncias capazes de promover a sobrevivência celular durante o resfriamento, congelamento e descongelamento, podem ser classificados de duas maneiras: intracelulares e extracelulares (Amann *and* Picket,

1987). Entre os crioprotetores intracelulares mais utilizados estão dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol, metanol, etilenoglicol e dimetil-acetamida (DMA). Estes crioprotetores já foram testados em sêmen de teleósteos (Suquet *et al.*, 2000). Os crioprotetores extracelulares, por outro lado, recobrem a superfície celular e estabilizam a membrana, ajudando, portanto, a minimizar e reparar os possíveis danos celulares causados pelo processo de congelamento. A gema de ovo e o leite em pó desnatado são os crioprotetores extracelulares mais comuns (Carolsfeld *and* Harvey, 1999).

Recentemente foi descrita a excelente ação do metil glicol como crioprotetor de sêmen de piracanjuba (Maria, 2005). O DMSO é o crioprotetor mais usado em criopreservação de sêmen de espécies de piracema e tem produzido bons resultados. Carolsfeld *et al.* (2003), trabalhando com criopreservação de sêmen de peixes migratórios brasileiros, utilizaram o crioprotetor DMSO com sucesso no congelamento do sêmen das seguintes espécies: curimatá (*Prochilodus lineatus*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*), piapara (*Leporinus elongatus*), piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) e dourado (*Salminus maxillosus*).

Os crioprotetores devem ser substâncias de baixo peso molecular e de baixa toxicidade para as células. Embora todos os crioprotetores sejam tóxicos para as células em algumas concentrações, por outro lado crioprotetores externos, combinados com os internos, promovem proteção mais completa ao espermatozóide, atuando na membrana celular (Fahy, 1986)

1.6 Descongelamento do sêmen de peixes

O congelamento envolve a perda de água e a desidratação celular (Squires *et al.*, 1999). Por outro lado, o descongelamento envolve uma reidratação das células, ocorrendo um influxo de água para seu interior (Holt, 2000).

A maioria das células suporta um descongelamento rápido, mesmo que ela não se hidrate totalmente, exceto para embriões de mamíferos. A rapidez no descongelamento é necessária para evitar a recristalização, ou seja, o reagrupamento de pequenos cristais de gelo, formando grandes cristais, letais para a célula (Fahy, 1986).

As palhetas normalmente são descongeladas por imersão em banho maria (Amorim, 2002). O sêmen congelado, ao ser retirado do botijão de nitrogênio líquido, deve ser agitado em banho-maria por poucos segundos para que descongele

uniformemente (Cruz, 2001). Geralmente, excelentes resultados são obtidos ao se descongelarem palhetas em água quente (cerca de 50 a 60°C). Porém, o descongelamento em água com temperatura elevada pode chegar ao super aquecimento, que é letal aos espermatozoides. Deve-se então aquecer a palheta apenas o tempo suficiente para iniciar o descongelamento do conteúdo de modo que a temperatura da palheta continue a subir mesmo depois de ter sido removida da água quente, completando, assim, o processo de descongelamento (Carolfeld *and* Harvey, 1999).

Existe uma variação entre a opinião de diversos autores a respeito do tempo e da temperatura da água para descongelar o sêmen estocado em palheta de 0,5 ml por meio de banho-maria. Lanhsteiner *et al.* (1997) descongelaram o sêmen de algumas espécies de peixes salmonídeos a 25°C por 30 segundos; Murgas *et al* (2001) descongelaram o sêmen de piracanjuba (*B. orbignyanus*) a 60°C por 5 segundos.

2 INTRODUÇÃO

As espécies nativas, em sua maioria, não se reproduzem naturalmente em cativeiro, sendo necessária a indução da desova pelo uso de hormônios. Outro problema comum encontrado para a utilização das técnicas de reprodução induzida nestas espécies é a assincronia na maturação das gônadas de machos e de fêmeas. Estudos sobre o resfriamento e a criopreservação do sêmen de peixes têm contribuído sensivelmente para o desenvolvimento e aplicação de metodologias visando o controle da reprodução, favorecendo a manipulação genética, a seleção de plantéis e a redução do estoque de machos, por tornar disponíveis os gametas a qualquer tempo (OLIVEIRA 2006).

O jundiá, *Rhamdia quelen*, é uma espécie nativa amplamente distribuída nas bacias hidrográficas das Américas Central e Sul, desde o sudoeste do México ao centro da Argentina (FROESE and PAULY, 2009). É um peixe com grande potencial para a aquicultura no sul do Brasil. (CARNEIRO, 2004; GARCIA *et al.*, 2008). Além desta característica é um peixe bastante apreciado por responder positivamente ao processo de indução hormonal (SAMPAIO and SATO, 2006; CARNEIRO and MIKOS, 2008).

Técnicas de preservação de sêmen sob baixas temperaturas vêm sendo utilizadas há tempos em várias espécies de peixes para otimizar os trabalhos de reprodução induzida em laboratório e reduzir os custos de produção. Uma das vantagens na utilização dessa técnica é manipular o sêmen e/ou os ovócitos durante a coleta por um período de tempo, principalmente quando há uma falta de sincronismo dos reprodutores durante a liberação dos gametas. Ainda, os poucos trabalhos de pesquisa direcionados para espécies nativas brasileiras sugerem benefícios da criopreservação e a necessidade de desenvolvimento e padronização dos protocolos efetivos (Carolsfeld 2003)

A maioria das pesquisas envolvendo o armazenamento do sêmen, utiliza métodos de criopreservação em nitrogênio líquido. Durante o armazenamento em nitrogênio líquido, muitos autores sugerem o uso de crioprotetores e aditivos no intuito de aumentar a viabilidade do espermatozóide bem como o tempo de armazenamento.

Os crioprotetores e aditivos devem ser adicionados ao meio diluidor para que haja uma proteção do espermatozóide durante o congelamento e o descongelamento (Carolsfeld and Harvey, 1999).

O emprego de aditivos nas soluções crioprotetoras tem obtido sucesso em procedimentos de criopreservação de sêmen de diversas espécies animais. Para tentar buscar a preservação da integridade das células, a adição de substâncias antioxidantes tem sido utilizadas em soluções crioprotetoras de sêmen de várias espécies no intuito de reduzir essas alterações causadas à membrana dos espermatozóides (BECONI *et al.*, 1993).

Para Silva *et al.* (2007), os antioxidantes funcionam como agentes protetores impedindo a formação das espécies reativas ao oxigênio e prevenindo o aparecimento de danos oxidativos nos espermatozóides, com conseqüente preservação da motilidade, vigor, integridade do DNA e das membranas espermáticas.

A vitamina C é um potente antioxidante intracelular, capaz de combater os efeitos do superóxido e dos radicais hidroxilas (MAJD *et al.*, 2003). A vitamina E (e seus derivados hidro e lipossolúveis) também atua como substância antioxidante, protegendo as células de estresse oxidativo (SATOH *et al.*, 1997), destacando-se como potente protetor de membranas biológicas e da integridade de DNA (AGARWAL *et al.*, 2004).

Trabalhos realizados com ovinos (PEIXOTO, 2007), empregando-se vitaminas C e E em procedimentos de criopreservação do sêmen, demonstrou resultados positivos quanto à manutenção da qualidade espermática após o descongelamento.

Diante disso, o conhecimento do efeito das vitaminas C e E como aditivos em soluções crioprotetoras empregadas no congelamento de sêmen, é de fundamental importância, pois favorece a manipulação genética, a seleção de plantéis, de modo a garantir a preservação da espécie em seu ambiente a qualquer tempo.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

O trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar o uso das vitaminas C e E como aditivos em soluções crioprotetoras empregadas no congelamento de sêmen do *Rhamdia quelen*, sobre os parâmetros de motilidade espermática (motilidade, velocidade curvelínea, velocidade média de deslocamento e velocidade linear), mensurado por meio de análise computacional.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da vitamina C como aditivo em soluções crioprotetoras empregadas no congelamento de sêmen do *Rhamdia quelen*.
- Avaliar o efeito da vitamina E como aditivo em soluções crioprotetoras empregadas no congelamento de sêmen do *Rhamdia quelen*.
- Avaliar o efeito das vitaminas C+E como aditivo em soluções crioprotetoras empregadas no congelamento de sêmen do *Rhamdia quelen*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho constituído de três ensaios, conduzidos no Laboratório de Tecnologia da Reprodução dos Animais Aquáticos Cultiváveis (LATRAAC), da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), instalado no Centro de Pesquisas em Aqüicultura Ambiental (CPAA), em Toledo, Paraná, Brasil.

No primeiro ensaio foram testados diferentes níveis de vitamina C adicionados na solução crioprotetora empregada no congelamento do sêmen do jundiá. Foram utilizados cinco machos ($136,66g \pm 60,67g$) de jundiá (*Rhamdia quelen*), com aproximadamente um ano e meio de idade provenientes de tanques da estação de pesquisa. Os peixes foram capturados com o auxílio de uma rede de arrasto e encaminhados para o laboratório de reprodução. Os peixes foram selecionados de acordo características de fluidez do sêmen sob leve compressão abdominal conforme Bombardelli *et al.* (2006). Após seleção, os peixes foram transferidos alojados em caixas de água, instaladas em sistema de recirculação, com volume de 2.500L.

Os peixes foram induzidos hormonalmente, através da aplicação de extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC) conforme Woynaróvich *and* Horváth (1983) e Bombardelli *et al.* (2006). Os indivíduos receberam uma dose única de 2,5 mg EBHC.kg⁻¹. As injeções foram aplicadas no músculo da região dorsal, próximo a nadadeira dorsal. A coleta dos gametas foi realizada após o período de 240 horas-grau (10 horas, água a 24°C), contadas a partir do momento da aplicação de hormonal (BOMBARDELLI *et al.*, 2006).

Para as coletas de sêmen cada peixe foi contido individualmente, seco com pano e com papel toalha, procedimento este, realizado para evitar que a água entrasse em contato com o sêmen. Os indivíduos foram massageados na região abdominal no sentido céfalo-caudal. A primeira gota de sêmen foi desprezada para evitar possível contaminação com urina e/ou sangue, o restante do sêmen foi coletado com tubo de ensaio graduado ($\pm 0,1$ mL) para mensuração do volume total de sêmen liberado por cada macho. Em seguida o sêmen foi conservado sob resfriamento ($\pm 13^\circ\text{C}$) (SANCHES *et al.*, 2009; BOMBARDELLI *et al.*, 2006).

Do sêmen *in natura*, foram avaliados os parâmetros de taxa de motilidade espermática, velocidade curvilínea, velocidade média de deslocamento e velocidade linear. A ativação espermática foi realizada por meio de diluição do material seminal em água destilada.

Os parâmetros de motilidade espermática foram analisados pelo método computacional (CASA). Para tanto, o material foi visualizado em microscópio óptico, em objetiva de 40X. O equipamento utilizado para a captura dos vídeos foi uma câmera Basler 602fc acoplada a um microscópio triocular Nikon, modelo eclipse (E200) e utilizado um computador com processador Intel Celerom CPU 2,53 GHz, 1Gb de Ram, 80Gb de HD (SANCHES *in press.*, 2010).

Os vídeos foram capturados pelo software AMCAP (Basler Vision Technologies) a uma taxa de 60 frames por segundo. Os vídeos foram capturados em formato *.avi, editados no software VIRTUALDUB-1.9.0 (virtualdub.org), e exportados como seqüência de imagens em formato *.jpg, para um diretório específico. As imagens correspondentes a um segundo (1seg.) de vídeo foram abertas, editadas no software IMAGEJ (National Institutes of Health, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) e compiladas por meio do aplicativo CASA (University of California and Howard Hughes Medical Institute, USA) (SANCHES *in press* 2010).

As análises de motilidade foram realizadas nos 10, 15 e 20 segundos após o início da ativação espermática, com um segundo de vídeo em cada instante. O sêmen proveniente de cada macho após o descongelamento foi analisado separadamente em triplicata, sendo que os parâmetros analisados foram: taxa de motilidade (MOT), velocidade curvilinear (VCL – velocidade entre cada frame avaliado), velocidade média do deslocamento (VMD – velocidade entre cada frame utilizando um deslocamento médio na taxa de 1/6 da taxa de frames utilizados), velocidade linear (VLR – velocidade entre o primeiro e o último frame analisado).

Para a realização dos procedimentos de criopreservação, foi utilizado um delineamento experimental inteiramente casualizado com fator principal, composto por cinco tratamentos e cinco repetições. Fora considerados como tratamentos as soluções crioprotetoras contendo 0,0; 4,0; 6,5; 9,0 e 11,5 mg de vitamina C (BRAVET – Monovin C[®]).mL de solução⁻¹. Foi considerado como uma unidade experimental o sêmen descongelado proveniente de um único reprodutor. Foram considerados como fatores, a) o peixe, b) o período de tempo após a ativação espermática e c) as doses vitamínicas.

Neste caso, foram preparadas soluções crioprotetoras compostas por 5% de leite em pó, 5% de glicose anidra e 10% de metanol (adaptado de CAROSFELD *et al.*, 2003) e cinco diferentes níveis de vitamina C.

O sêmen *in natura* foi diluído na solução crioprotetora na proporção de 1:3 (1 parte de sêmen para 3 partes de solução crioprotetora).

Imediatamente após a diluição o sêmen diluído em solução crioprotetora foi envasado manualmente em palhetas de volume correspondente a 0,5mL. Em seguida os palhetas foram submetidos, em triplicata, ao procedimento de pré-congelamento, pelo alojamento em um botijão de vapor de nitrogênio líquido de 4 L (“Dry Shipper”), por um período de 18 horas. Após este período, as palhetas foram transferidas para um botijão de nitrogênio líquido.

Após permanecerem imersos em nitrogênio líquido por 24 horas, as amostras de sêmen foram descongeladas em banho maria a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) por 8 segundos.

Após o descongelamento, os mesmos procedimentos de avaliação espermática realizados para o sêmen *in natura* foram conduzidos.

Para a realização do segundo ensaio, foram utilizados cinco machos (69,78g ± 28,69g). O sêmen coletado de cada macho foi submetido, em triplicata, aos protocolos de diluição e criopreservação em soluções crioprotetoras contendo cinco diferentes concentrações de vitamina E. Os procedimentos de análise espermática do sêmen *in natura* e descongelado foram conduzidos de forma idêntica ao primeiro ensaio.

Neste ensaio, o delineamento experimental e os procedimentos de diluição, criopreservação, descongelamento e análise espermática foram os mesmo empregados para o primeiro ensaio. Contudo, os tratamentos foram constituídos por soluções crioprotetoras contendo cinco diferentes níveis de vitamina E, correspondentes a 0,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0 mg de vitamina E (BRAVET – Monovin E[®]).mL de solução⁻¹.

Para a realização do terceiro ensaio, foram utilizados outros cinco machos (96,75± 18,25g) de jundia. O sêmen coletado de cada macho foi submetido, em triplicata, aos protocolos de diluição e criopreservação em soluções crioprotetoras contendo cinco diferentes concentrações de vitamina C e E combinadas, correspondendo a 0,0; 4,0; 6,5; 9,0 e 11,5 mg de vitamina C (BRAVET – Monovin C[®]).mL⁻¹ e a 0,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0 mg de vitamina E (BRAVET – Monovin E[®]), respectivamente.mL de solução⁻¹. Os procedimentos de análise espermática do sêmen *in natura* e descongelado foram conduzidos de forma idêntica ao primeiro ensaio.

Os resultados de motilidade espermática, velocidade curvilínea, velocidade linear do deslocamento e velocidade em linha reta, dos três ensaios, foram submetidos à análise de variância a um nível de 5% de significância. No caso das análises

apresentarem alguma evidência de efeito dos parâmetros analisados com o tratamento, foi aplicado o teste de comparação múltipla de médias de Tukey ao mesmo nível de significância. O software utilizado para realização das análises estatísticas foi o STATISTICA 7.0[®].

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Ensaio 1

Os cinco machos utilizados no ensaio de criopreservação do sêmen de jundiá com emprego da vitamina C como aditivo na solução crioprotetora em média liberaram $5,38 \pm 1,89$ mL de sêmen, sendo que este valor corresponde a $39,36$ mL de sêmen.kg⁻¹ de reprodutor, valores semelhantes aos apresentados por Bombardelli *et al.* (2006).

Logo após a coleta, os machos apresentaram tempo de ativação espermática de $23,12 \pm 4,05$ segundos. De modo geral, as taxas de motilidade espermática permaneceram abaixo do esperado para sêmen após congelamento (14,75% de espermatozóides móveis). Este fato pode estar associado ao período em que o experimento foi desenvolvido, o qual foi depois do período de máxima atividade reprodutiva da espécie.

No ensaio que se utilizou da vitamina C como aditivo, observou-se que doses crescentes deste antioxidante não influenciaram ($p > 0,05$) os parâmetros espermáticos de velocidade curvilinear, velocidade média de deslocamento e velocidade linear (Tabela 1).

Por outro lado, os níveis crescentes de vitamina C adicionada na solução crioprotetora influenciaram ($p < 0,05$), os resultados de taxa de motilidade espermática após o descongelamento (Tabela 1 e Figura 1). Os resultados mostraram que a taxa de motilidade espermática aumenta em função da adição de vitamina C na solução crioprotetora, com melhores resultados para o emprego de 4,0 e 6,5mg de vitamina C (marca).mL de solução⁻¹. Contudo, níveis de inclusão superiores a este promovem prejuízos na taxa de motilidade espermática.

O efeito benéfico da vitamina C, sobre a motilidade espermática, pode estar relacionado com a redução do estresse oxidativo às células, protegendo a membrana plasmática contra a peroxidação lipídica imediatamente após o descongelamento. Resultados semelhantes a estes, positivos quanto ao uso da vitamina C em protocolos de criopreservação se sêmen de ovinos, verificados por PEIXOTO (2007), corroboram os resultados verificados para o jundiá.

Tabela 1 Parâmetros espermáticos (taxa de motilidade, velocidade curvilinear - VCL, velocidade média de deslocamento - VMD, velocidade linear - VLR) após descongelamento, de sêmen de jundiá (*Rhamdia quelen*) diluído em solução crioprotetora contendo diferentes níveis de vitamina C.

Variáveis	Níveis de adição de vitamina C (mg.mL ⁻¹)					p
	0,0	4,0	6,5	9,0	11,5	
MOT (%)	14,75ab	21,88a	20,45a	13,80ab	10,99b	0.0024
VCL	50,34a	47,57a	50,49a	47,92a	61,60a	0.0534
VMD	31,66a	32,47a	33,87a	31,05a	32,85a	0.4377
VLR	27,52a	27,67a	28,48a	25,97a	25,04a	0.2585

Letras iguais na mesma linha representam médias semelhantes pelo teste de Tukey (P<0,05)

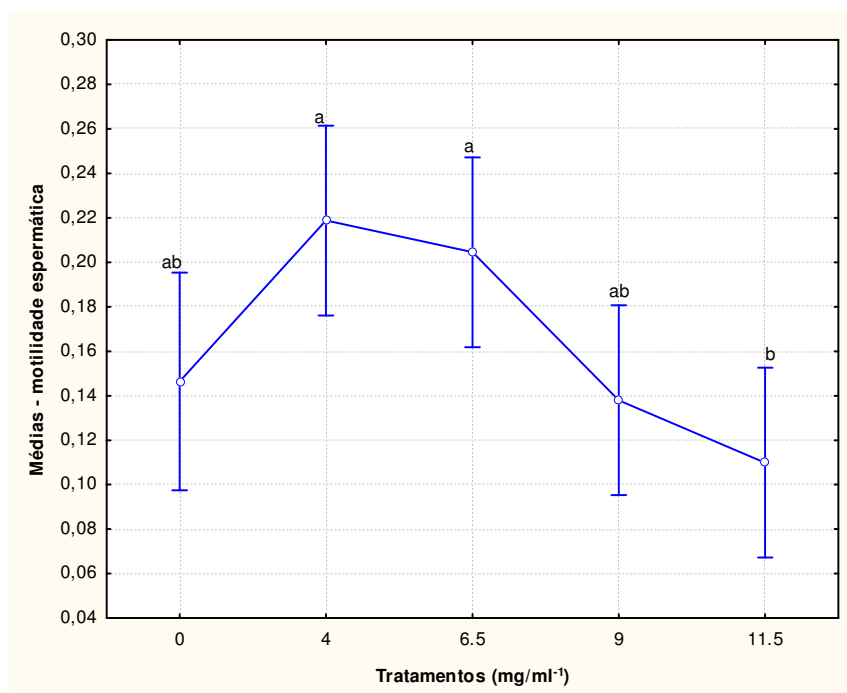


Figura 1 Taxas de motilidade espermática após descongelamento, de sêmen de jundiá (*Rhamdia quelen*) diluído em solução crioprotetora contendo diferentes níveis de vitamina C.

Alguns estudos mostram o efeito benéfico da adição de vitamina C sobre os parâmetros espermáticos em diferentes espécies de mamíferos, tais como a motilidade progressiva, a integridade de acrossoma e integridade do DNA, para o sêmen humano (AGARWAL *et al.*, 2004), bovino (BECONI *et al.*, 1993), eqüino (BALL *et al.*, 2002) e ovino (GUERRA *et al.*, 2005). Isto se deve principalmente à capacidade que estes antioxidantes têm de proteger as membranas espermáticas da peroxidação lipídica (LPO), reduzindo a ação do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e combatendo os danos ao DNA (Ácido Desoxirribonucléico)(AGARWAL *et al.*, 2004).

Estas alterações físico-químicas levam ao aumento da produção das espécies reativas ao oxigênio, como resposta aos efeitos da congelação/descongelação, além do

que, os minerais existentes no plasma seminal inibem a ação protetora do ácido ascórbico, uma vez que a mistura *in vitro* entre Cobreascorbato ou Ferro-ascorbato induz a formação de radicais livres, os quais danificam DNA, lipídios e proteínas (NORBERG *and* ÁRNER, 2001).

Os valores médios de velocidade curvilínea, velocidade média de deslocamento e velocidade linear, não foram influenciados ($P>0,05$) pelos tratamentos (Tabela 1). Isto sugere que os danos causados as células espermáticas sejam severos o suficiente para promover a completa inativação espermática, contudo, não interferem no vigor de movimentação naquelas células que permanecem vivas.

É durante o período de resfriamento que a membrana plasmática dos espermatozoides interagem com os crioprotetores, adquirindo resistência ao choque térmico e ao congelamento ou descongelamento, embora muitas células espermáticas não resistam as mudanças irreversíveis à membrana plasmática, tais como: desidratação dos espermatozoides, mudança da fase de transição dos fosfolipídios, formação de gelo intracelular, enrugamento e distensão da membrana em resposta a hiperosmolaridade, rearranjo estrutural (PARKS *and* GRAHAM, 1992).

5.2 Ensaio 2

No ensaio em que se utilizou vitamina E como aditivo, os machos utilizados liberaram um volume médio de $4,98\pm 0,85$ ml de sêmen, sendo que este valor corresponde a $80,61$ mL de sêmen. kg^{-1} de reprodutor.

Logo após a coleta, os machos apresentaram tempo de ativação espermática de $21,63\pm 3,42$ segundos. De modo geral, as taxas de motilidade espermática de $11,07$, permaneceram abaixo do esperado para sêmen após congelamento. Justifica-se este valor pelo motivo deste ensaio ter sido realizado na mesma época do ano que o ensaio 1.

Os resultados do segundo ensaio mostraram que a vitamina E, não causou efeito ($P<0,05$) sobre a taxa de motilidade espermática, velocidade curvilínea e velocidade média de deslocamento (Tabela 2).

Isto pode estar associado ao fato de que os níveis de adição de vitamina E adicionadas nas soluções crioprotetoras, foram baixos e/ou incapazes de promover efeito sobre as taxas de motilidade espermática.

Os valores de velocidade linear obtidos no ensaio variaram em média de 20,91 à 30,78, com valor de $p=0,0086$ ($p<0,05$), indicando que o tratamento causou efeito, mesmo que deletério, sobre a velocidade linear dos espermatozóides, de acordo com os valores apresentados na tabela 2.

Os resultados obtidos com relação à velocidade linear dos espermatozóides está de relativamente baixa e com efeito deletério, de acordo com os resultados achados por BUENO (2000) e MARTINS (2001), quando realizaram testes com mamíferos. Esse fato também foi observado por FÜRST (2002) que trabalhou com sêmen de mamífero, e o autor relata que os resultados obtidos foram explicados pelo choque térmico drástico que os espermatozóides sofrem, aliada à baixa resistência ao processo de criopreservação apresentado pela espécie.

Este resultado também pode estar associado ao fato de que o desequilíbrio entre as concentrações de espécies reativas ao oxigênio e de antioxidantes como a vitamina E, conhecido como estresse oxidativo (De LAMIRANDE *and* GAGNON, 1995), podem causar uma redução na qualidade dos parâmetros espermáticos (GUERRA *et al.*, 2005), a qual é acentuada após a descongelação (SILVA *et al.*, 2007), refletindo em injúrias celulares que podem provocar prejuízos em parâmetros de velocidade linear e outros parâmetros importante como a motilidade espermática, analisados neste ensaio.

Alguns estudos realizados com mamíferos demonstram que o uso de vitamina E em amostras de sêmen ovino podem produzir efeito negativo (UPRETI *et al.*, 1997) ou não interferir na preservação da motilidade espermática (DONNELLY *et al.*, 1999), corroborando os resultados do presente experimento (Tabela 2 e Figura 2).

É durante o período de resfriamento que a membrana plasmática dos espermatozóides interagem com os componentes crioprotetores e aditivos adquirindo resistência ao choque térmico e ao congelamento/descongelamento. Segundo Parks *and* Graham (1992), é neste período que muitas células espermáticas não resistam as mudanças irreversíveis à membrana plasmática, tais como: desidratação dos espermatozóides, formação de gelo intracelular, enrugamento e distensão da membrana, rearranjo estrutural. Este fato pode estar relacionado

Tais resultados nos levam a questionar a acurácia dos testes complementares *in vitro*, visto que o hiposmótico, por exemplo, na maioria dos trabalhos apresentam a porcentagem de células com membrana plasmática íntegras baixa quando comparado com motilidade espermática e fertilidade.

Tabela 2 Parâmetros espermáticos (taxa de motilidade, velocidade curvilinear - VCL, velocidade média de deslocamento - VMD, velocidade linear - VLR) após descongelamento, de sêmen de jundiá (*Rhamdia quelen*) diluído em solução crioprotetora contendo diferentes níveis de vitamina E.

Variáveis	Níveis de adição de vitamina E (mg.mL ⁻¹)					P
	0,0	2,0	4,0	6,0	8,0	
MOT (%)	11,07a	11,71a	10,92a	9,65a	7,20a	0,2907
VCL	51,92a	52,20a	51,08a	53,61a	54,11a	0,9287
VMD	32,62a	32,68a	30,00a	30,86a	29,07a	0,1004
VLR	30,78a	27,34ab	23,39ab	24,19ab	20,91b	0,0086

Letras iguais na mesma linha representam médias semelhantes pelo teste de Tukey (P<0,05)

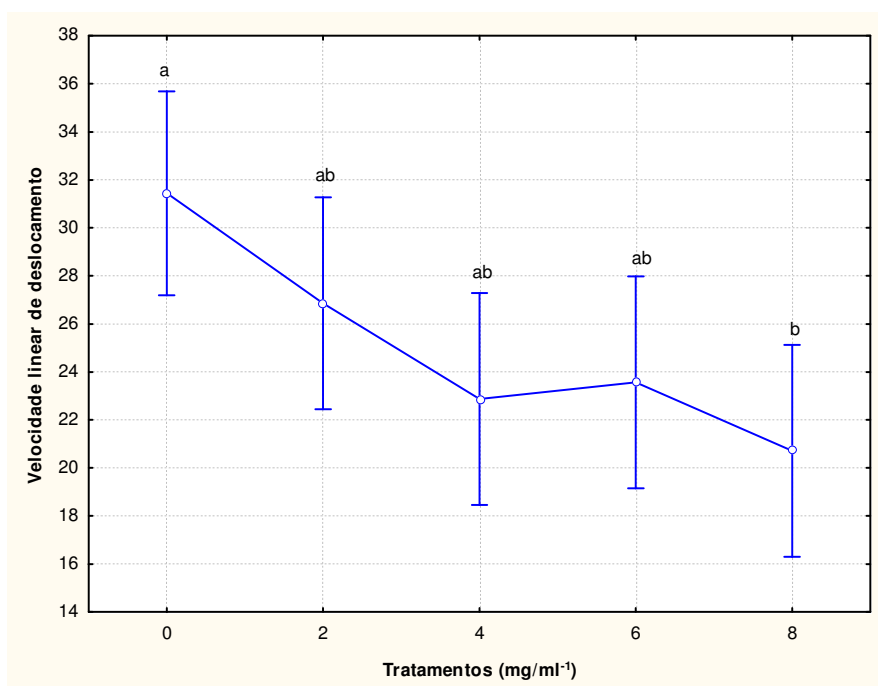


Figura 2 Média das velocidades lineares de deslocamento após descongelamento, de sêmen de jundiá (*Rhamdia quelen*) diluído em solução crioprotetora contendo diferentes níveis de vitamina E.

5.3 Ensaio 3

No ensaio em que se utilizou vitamina C+E como aditivo, os machos utilizados liberaram um volume médio de $4,11 \pm 2,05$ ml de sêmen, sendo que este valor corresponde a $42,48$ mL de sêmen.kg⁻¹ de reprodutor.

Logo após a coleta, os machos apresentaram tempo de ativação espermática de $25,09 \pm 2,12$ segundos. De modo geral, as taxas de motilidade espermática de $12,29$, permaneceram abaixo do esperado para sêmen após congelamento. Justifica-se também

este valor pelo motivo deste ensaio ter sido realizado na mesma época do ano que o ensaio 1.

Neste ensaio que se utilizou os níveis de vitamina C+E do ensaio 1 e 2 como aditivo, observou-se que a mesma causou efeito ($p < 0,05$) sobre a taxa de motilidade espermática (Figura 3), velocidade média de deslocamento (Figura 4) e velocidade linear (Figura 5) (Tabela 3).

Tabela 3 Parâmetros espermáticos (taxa de motilidade, velocidade curvilínea - VCL, velocidade média de deslocamento - VMD, velocidade linear - VLR) após descongelamento, de sêmen de jundiá (*Rhamdia quelen*) diluído em solução crioprotetora contendo diferentes níveis de vitamina C+E.

Variáveis	Níveis de adição de vitaminas C+E ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)					p
	0,0	4,0+2,0	6,5+4,0	9,0+6,0	11,5+8,0	
MOT (%)	12,29a	21,61b	16,50ab	13,69ab	8,56a	0,0029
VCL	58,83a	57,85a	53,24a	53,21a	51,14a	0,4106
VMD	41,47a	38,85ab	34,60ab	34,80ab	31,83b	0,0149
VLR	36,89a	33,42ab	28,97abc	27,35bc	23,55c	0,0006

Letras iguais na mesma linha representam médias semelhantes pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

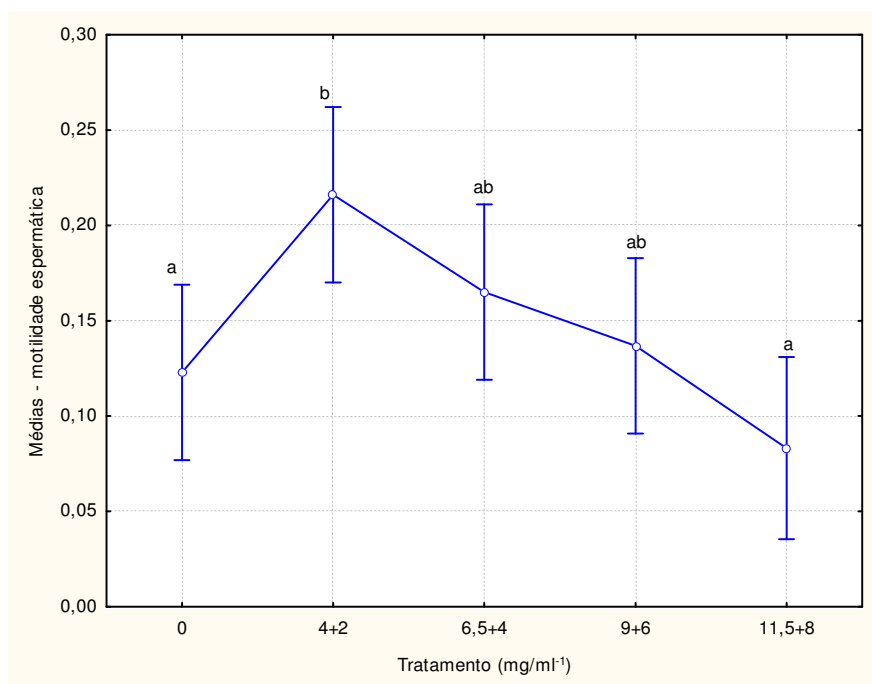


Figura 3 Taxas de motilidade espermática após descongelamento, de sêmen de jundiá (*Rhamdia quelen*) diluído em solução crioprotetora contendo diferentes níveis de vitamina C+E.

Os valores médios de motilidade espermática observados na figura 3, mostram que o uso associado das vitaminas causou efeito benéfico sobre a motilidade

espermática do jundiá. Este fato pode estar relacionado ao fato de que o ácido ascórbico além de reduzir radicais oxigênio e neutralizar espécies reativas ao oxigênio, protege a atividade da superóxido dismutase e regenera outros sistemas antioxidantes, como a vitamina E, como descrito por Araújo (2001), em ensaios com mamíferos.

Esperava-se que este ensaio apresentasse efeitos positivos em relação aos outros ensaios, o que aconteceu, devido ao fato de que o efeito antioxidante das vitaminas C e E, quando usadas em conjunto, ocasionam um efeito sinérgico, como descrito por Araújo (2001)

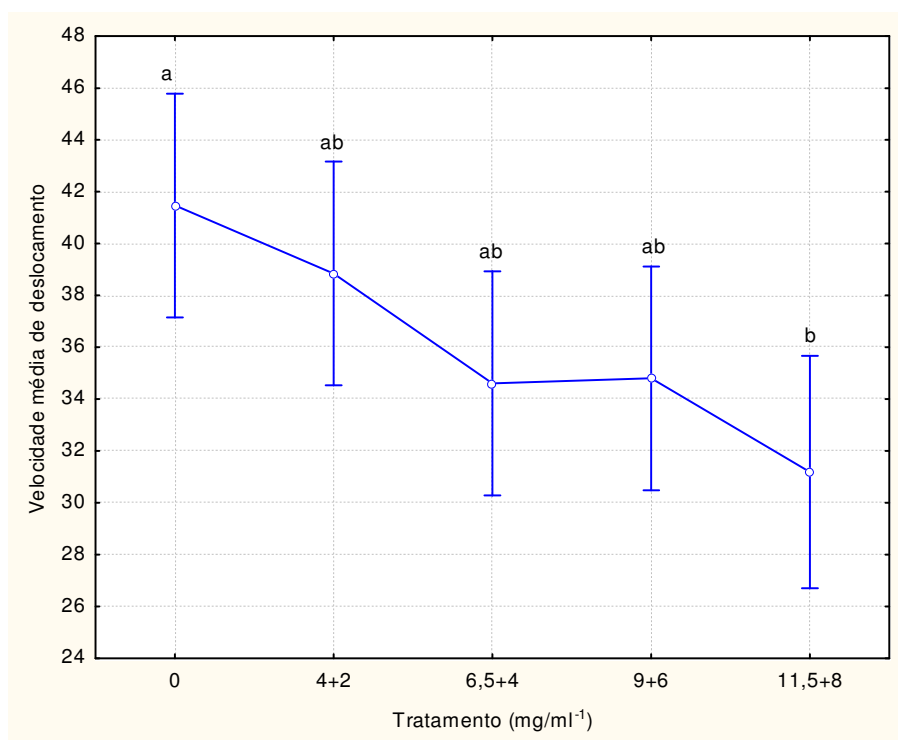


Figura 4 Taxas de velocidade média de deslocamento após descongelamento, de sêmen de jundiá (*Rhamdia quelen*) diluído em solução crioprotetora contendo diferentes níveis de vitamina C+E.

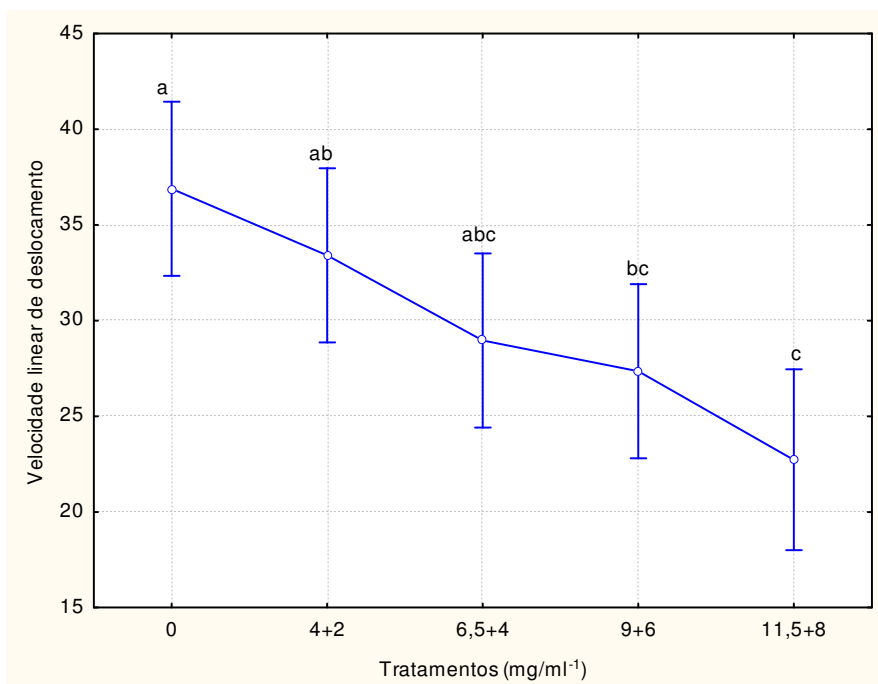


Figura 5 Taxas de velocidade linear de deslocamento após descongelamento, de sêmen de jundiá (*Rhamdia quelen*) diluído em solução crioprotetora contendo diferentes níveis de vitamina C+E.

Para os valores de velocidade média de deslocamento e velocidade linear (tabela 3) com valor significativo de $p=0,0149$ ($p<0,05$) e $p=0,0006$ ($p<0,05$) respectivamente, observou-se que os tratamentos ocasionaram efeito deletério sobre os parâmetros observados.

Este fato pode ocorrer devido à algumas lesões celulares ocasionadas durante o período de incubação. Segundo Zúccari (1998), As mudanças físico- químicas que ocorrem durante a estocagem são irreversíveis e os danos decorrentes são a instabilidade nuclear, lesão da membrana, perda de componente intracelular, queda da motilidade e peroxidação lipídica.

Como os antioxidantes proporcionam estabilização da membrana espermática, esperá-se que mantenham a viabilidade do sêmen por mais tempo, ou seja, mantenham integridade dos componentes estruturais e do metabolismo dos espermatozoides. Assim, esperava-se que características como motilidade espermática, velocidade média de deslocamento e velocidade linear, apresentassem maior longevidade, o que não ocorreu devido à possíveis lesões causadas durante o processo de congelamento e descongelamento.

Estes resultados obtidos, estão de acordo como observado por BALL *et al.* (2001) que não observaram melhora na manutenção dos parâmetros de velocidade com

a utilização destes mesmos antioxidantes, trabalhando com sêmen resfriado de ovino e eqüino, respectivamente, utilizando diluente à base de leite.

Apesar das evidências experimentais, novos estudos devem ser realizados a fim de se elucidar os mecanismos que governam a integridade das células espermáticas submetidas ao processo de criopreservação e os efeitos de substâncias que promovam a proteção celular.

6 CONCLUSÕES

Conclui-se que a vitamina C apresenta efeito positivo sobre a manutenção da integridade de células espermáticas de *Rhamdia quelen* submetidas à criopreservação, podendo ser recomendado o emprego de níveis entre 4,0 e 6,5mg de vitamina C.mL de solução crioprotetora⁻¹. Ainda, o emprego de vitamina E apresentou efeito deletério às células espermáticas submetidas à criopreservação. O uso combinado de vitamina C+E apesar de ter apresentado efeito significativo relacionado à motilidade espermática dos espermatozóides apresentou efeito deletério sobre os parâmetros de velocidade média de deslocamento e velocidade linear das células submetidas à criopreservação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amann, R.P., Pickett, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Vet. Sci.* V.7: 3, p 145-173, 1987.
- Amorin, V.M.C. Criopreservação de sêmen de tilápia-nilótica (*Oreochromis niloticus*), variedade chitralada. 2002. 64f. dissertação (Mestrado em Zoologia de Vertebrados) – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- Agarwal, A.; Nallela, K.P.; Allamaneni, S.S. R.; SAID, T. M. Role of antioxidants in treatment of male infertility: an review of the literature. *Reproductive Biomedicine online*, v. 8, p. 616-627, 2004.
- Araújo, J.M.A. *Química de Alimentos*. 2 Ed. Editora UFV, p 416, 2001.
- Archarya, U.R.; Rathore, R.M.; Mishra, M. Role of vitamin C on lead acetateinduced spermatogenesis in swiss mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 13,p. 9-14, 2003.
- Baldisserotto, B.; Radünz Neto O, J. Jundiá (*Rhamdia* sp.) In: Baldisserotto, B.; Gomes L. C. (Orgs.). Espécies nativas para a piscicultura no Brasil. Santa Maria: UFSM, 2005. p.303-325.
- Ball, B.B.; Vo, A.T. Detection of lipid peroxidation in equine spermatozoa based upon the lipophilic fluorescent dye C11-BODIPY 581/591. *Journal of Andrology*, v. 23, p. 259-269, 2002.
- Beconi, M.T.; Francia, C.R.; Mor, N.G.; Affrancchino, M.A. Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. *Theriogenology*, v. 40, p. 841-851, 1993.

- Bedore, A. G. Característica e conservação do sêmen de Pacu-Caranha (*Piaractus mesopotamicus*) e de Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). 1999. 53 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- Bilodeau, J.F., Suvro-Chatterjee, Sirard, M.A. Levels of antioxidant defenses are decrease in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Mol. Reprod. Dev.* V.55, p 282-288, 2000.
- Billard, R. Ultrastructure of trout spermatozoa: changes after dilution and deepfreezing. *Cell Tissue Research*, New York, v. 228, n. 2, p. 205-218, 1983.
- Bockmann, F. A.; Guazelli, G. M. Heptapteridae. In.: Reis , R. E.; Kullander, S. O.; Ferraris, JR. C. J. (Orgs.) *Check list of the Freshwater Fishes of South and Central America*. Porto Alegre:EDIPUCRS, 2003, p.406-431.
- Bombardelli R.A., Mörschbacher E.F., Campagnolo R. Sanches E.A. & Syperreck M.A. (2006) Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824). *Revista Brasileira de Zootecnia* 35,1251-1257.
- Booth, N.H., Mcdowell. L.E. *Farmacologia e Terapêutica em Veterinária*. Sexta edição, Editora Guanabara Koogan. S.A., Rio de Janeiro, 1992. 997pg.
- Bueno, R. Criopreservação de sêmen canino, utilizando dois diluidores e dois protocolos de resfriamento. Departamento de medicina Veterinária – Universidade Federal de Viçosa – UFV. Viçosa – MG.2000. 91p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, área de concentração em Reprodução Animal).
- Buettner, G.R. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, α -tocopherol, and ascorbate. *Arch. Bioch. Biophys.* V.300, p 535-543, 1993.

- Carneiro, P. C. F. 2004. A produção do jundiá em cativeiro. Pp. 117- 142. In: Baldisserotto, B. & J. Radünz Neto (Eds.). Criação de jundiá. Santa Maria, Editora UFSM, 232p.
- Carneiro, P. C. F.; Mikos, J. D. Gonadotrofina coriônica humana e hormônio liberador de gonadotrofina como indutores da reprodução do jundiá. *Acta Scientiarum, Animal Science*, v.30, n.3, p.345-350, 2008.
- Carolsfeld, J.; Harvey, B. Conservação de recursos genéticos de peixes: teoria e prática. Curso de Treinamento Brasileiro. Tradução de H. P. Godinho. Victoria, Canadá: *World Fisheries Trust*, 1999. 47 p.
- Carolsfeld, J.; Godinho, H. P.; Zaniboni Filho, E.; Harvey, B. J. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. *Journal of Fish Biology*, Oxford, v. 63, n. 2, p. 472-489, Aug. 2003.
- Coser, A. M. L.; Godinho, H. P.; Ribeiro, D. Cryogenic preservation of spermatozoa from *Prochilodus scrofa* and *Salminus maxillosus*. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 37, n. 4, p. 387-390, 1984.
- Cruz, V. L. B. Criopreservação do sêmen de curimbatá (*Prochilodus lineatus*). 2001. 59 p. Dissertação (Mestrado) - Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- De Lamirande, E.; Gagnon C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes; and II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. *Journal of Andrology*, v. 13, p. 368-386, 1995.
- Donnelly, E.T.; McClure, N.; Lewis, S.E.M. The effect of ascorbate and α -tocopherol supplementation in vitro on DNA integrity and hydrogen peroxide-induced DNA damage in human spermatozoa. *Mutagenesis*, v. 14, n. 5, p. 505-511, 1999.

- England, G.C.W. Cryopreservation of dog semen: a review. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, n. 47 p. 243-255, 1993.
- Fahy, G.M. The relevance of cryoprotectant toxicity to cryobiology. *Cryobiol.*, V. 23,p 1-13, 1986.
- Fürst, R. Efeito do resfriamento do sêmen eqüino sobre sua congelabilidade. Departamento de Zootecnia - Universidade Federal de Viçosa – UFV. Viçosa-MG. 2002. 46p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia, área de concentração em Reprodução Animal).
- Fracalossi, D.M., E. Zaniboni Filho, S. Meurer, 2002. No rastro das espécies nativas. *Panorama da Aqüicultura* 12, 43-49.
- Fracalossi, D. M.; Meyer, G.; Santamaria, F. M.; Weingartner, M.; Zaniboni-Filho, E. Desempenho do jundiá, *Rhamdia quelen*, e do dourado, *Salminus brasiliensis*, em viveiros de terra na região sul do Brasil. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, v.26, n.3, p.345-352, 2004.
- Froese, R.; Pauly, D. *FishBase*: World Wide Web electronic publication. 2009. Disponível em: <<http://www.fishbase.org>>. Acesso em: 05 maio. 2010.
- Garcia, L. O., C. E. Copatti, F. Wachholz, W. Pereira Filho & B. Baldisserotto. 2008. Freshwater temperature in the state of Rio Grande do Sul, Southern Brazil, and its implication for fish culture. *Neotropical Ichthyology*, 6(2): 275-281.
- Guerra, M.M. P.; De Graaf, S.; Underwood, S.; Maxwell, W.M.C. et al. Efeito de vitamina C e E na viabilidade de espermatozóides ovinos submetidos à diluição, coloração com HOECHST 33342 e congelação. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 2, 2005, Goiânia. *Proceedings* Goiânia: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2005.
- Guilland, J.C.; Lequeu, B. *As vitaminas do nutriente ao medicamento*. São Paulo ;Santos, 1995. 375p.

- Harvey.; Carolsfeld, J. Induced breeding in tropical fish culture. Ottawa: International Development Research Centre, 1993.
- Holt, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*, v. 62,p. 3-22, 2000.
- Lahnsteiner, F.; Weismann, T.; Patzner, R. A. Methanol as cryoprotectant and the suitability of 1,2 and 5 ml straws for cryopreservation of semen from salmonid fishes. *Aquaculture Research*, Oxford, v. 28, n. 6, p. 471-479, June 1997.
- Majd, E.S.; Goldgerd, M.; Stanislawski, L. In vitro effects of ascorbate and Trolox on the biocompatibility of dental restorative materials. *Biomaterials*, v. 24, p. 3-9, 2003.
- Maria, A. N. Diluidores e crioprotetores no resfriamento e congelamento do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyianus*). 2005. 71 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- Marques S. & Godinho H.P. (2004) Short-term Cold Storage of Sperm from Six Neotropical Characiformes Fishes. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 47, 799-804.
- Martins, L.F. Avaliação do sêmen e proteínas solúveis do plasma seminal de bodesda raça pardo alpina. Departamento de Veterinária – Universidade Federal de Viçosa – UFV. Viçosa-MG. 2001. 67p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, área de concentração em Reprodução Animal).
- Maxwell, W.M.C., Watson, P.F. Recent progress in the preservation of ram semen. *An. Reprod. Sci.* V.42:1-4, p 55-65, 1996.
- Mcdowell, L.R. *Vitamins in animal and human nutrition*. Iowa University Press, p.793, 2000.

- Murgas, L. D. S.; Gualhanone, A.; Silva, M. O. B.; Mello, C. B. Freitas, R. T. F.; Zangeronimo, M. G. Calidad seminal del pez piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) post-descongelación. *Revista Anales de Veterinária, Murcia*, v. 17, n. 1, p. 3-10, 2001.
- Murgas, L. D. S.; Miliorini, A. B.; Franciscato, R. T.; Maria, A. N. Viabilidade espermática do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) resfriado a 4°C. *Revista Brasileira de Zootecnia, Viçosa*, v. 33, n. 6, p. 1361- 1365, nov./dez. 2004.
- Nakatani, K.; Agostinho, A. A.; Baumgartner, G.; Bialecki, A.; Sanches, P. V.; Makrakis, M. C.; Pavanelli, C. S. *Ovos e Larvas de Peixes de Água Doce*. Maringá: EDUEM, 2001. 378p.
- Norberg, J.; Árner, E.S.J. Reactive oxygen species antioxidants and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 31, p. 1287-1312, 2001.
- Ochsendorf, F.R. Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. *Human Reprod.* V.5., p 399-420, 1999.
- O'flaherty, C.M., Beorlegui, N.B., Beconi, M.T. Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozen-thawed bull spermatozoa. *Androl.* V.29, p 269-275, 1997.
- Oliveira, A. V. Resfriamento e criopreservação de sêmen de Dourado *Salminus maxillosus* e Pirapitinga *Brycon nattereri*. 2006. 107 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- Parks, J. E., Graham, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriog.* V.38, p 209-222, 1992.
- Parks, J. E., Graham, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriog.* V.38, p 209-222, 1992.

- Peixoto, A. V. A. Efeito da adição de vitamina C e Trolox ao diluidor utilizado para criopreservação de sêmen ovino.. 2007. 96 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE.
- Rana K. (1995) Preservation of gametes. In: *Broodstock management and egg and larval quality* (ed. By N.R. Bromage & R.J. Roberts, orgs.) pp.53–75. Blackwell Science, London.
- Ribeiro, R. I. M. A.; Godinho, H. P. Criopreservação do sêmen testicular do teleósteo piau-açu *Leporinus macrocephalus*. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte, v. 55, n. 1, p. 75-79, jan./fev. 2003.
- Sampaio, E. V.; Sato, Y. Biologia reprodutiva e desova induzida de duas espécies de bagres (Osteichthyes: Siluriformes) da bacia do rio São Francisco. *Acta Scientiarum. Biological Science*, v.28, n.3, p.263-268, 2006.
- Satoh, K.; Kadofuku, T.; Sakagami, H. Effect of Trolox, a synthetic analog of α -tocoferol, on cytotoxicity induced by UV irradiation and antioxidants. *Anticancer Research*, v. 17, p. 2459-2464, 1997.
- Silfvergrip, A.M.C. A sistematic 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.
- Silva, P. F. N.; Gadella, B.M.; Colembrander, B.; Roelen, B.A. J. Exposure of bovine sperm to pro-oxidants impaires the developmental competence of the embryo after first cleavage. *Theriogenology*, v. 67, p. 609-619, 2007.
- Silveira, A. N. Caracterização espermática, preservação criogênica do sêmen e fertilidade do matrinxã, (*Brycon cephalus*). 2000. 45 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

- Squires, E. L.; Pickett, B. W.; Graham, J. K.; Vanderwall, D. K.; McCue, P. M.; Brummer, J. E. *Principles of cryopreservation*. In: Cooled and frozen Stallion Semen, 1999. Cap. 9.
- Stasoft. Inc. (2005) *Statistic (data analysis software system)*. Version 7.1. Tulsa, USA.
- Suquet, T.; Dreanno, C.; Fauvel, C.; Cosson, J.; Billard, R. Cryopreservation of sperm in marine fish. *Aquaculture Research*, Oxford, v.31, n. 3, p. 231-243, Mar. 2000.
- Swenson, M.J., Reece, W.O. Dukes *Fisiologia dos Animais Domésticos*. 11.ª edição, Editora Guanabara Koogan. S.A., Rio de Janeiro, 1996. 856pgs.
- Upreti, G.C.; Jensen, K.; Oliver, J.E.; Duganzich, D.M. et al. Motility of ram spermatozoa during storage in a chemically-defined diluent containing antioxidants. *Animal Reproduction Science*, v. 48, p. 269-278, 1997.
- Viveiros, A. T. M.; So, N.; Komen, J. Sperm Cryopreservation of African Catfish (*Clarias gariepinus*) Cryoprotectants, Freezing Rates and Sperm: Egg Dilution Ratio. *Theriogenology*, New York, v. 54, n. 9, p. 1305-1308, Dec. 2000.
- Watson, P. F. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, v. 62, p. 77-111, 2000.
- Woynarovich E. & Horvath L. (1983) *The Artificial Propagation of Warm -Water Finfishes - A Manual for Extension*. Translation by Chama V.L.M. FAO/CODEVASF/CNPq, Brasília.
- Zúccari, C.E.S.N. Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática equina. Campus Botucatu – Universidade Estadual Paulista – UNESP. Botucatu – SP. 1998. 121p. Dissertação (Doutorado em Medicina Veterinária).

APÊNDICE A



Figura 1 – jundiá (*Rhamdia quelen*).

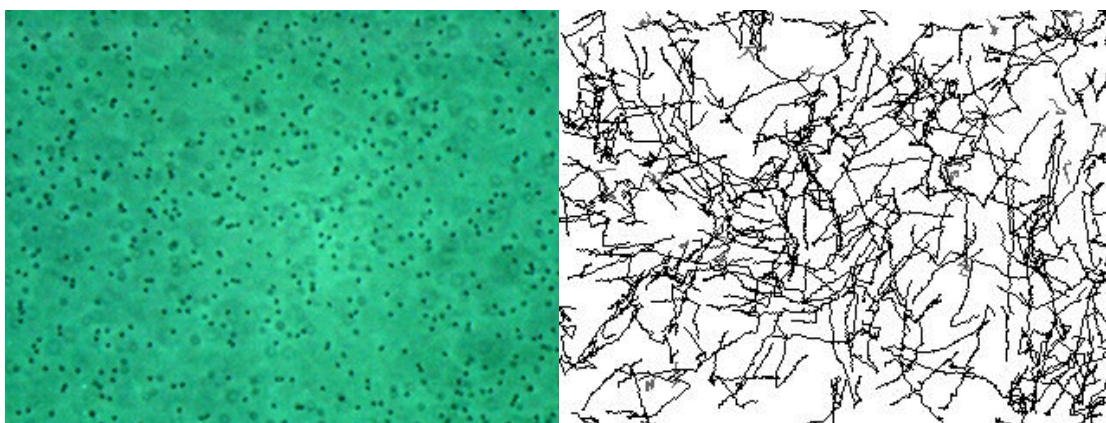


Figura 2 – Foto dos espermatozoides e caminho percorrido pelos espermatozoides.