



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP  
CAMPUS DE JABOTICABAL



FERTILIZAÇÃO ARTIFICIAL DE OVÓCITOS DE CURIMBATÁ,  
*Prochilodus lineatus*

**BRUNO ESTEVÃO DE SOUZA**  
Engenheiro de Pesca

Jaboticabal  
São Paulo – Brasil  
2007



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP  
CAMPUS DE JABOTICABAL



FERTILIZAÇÃO ARTIFICIAL DE OVÓCITOS DE CURIMBATÁ,  
*Prochilodus lineatus*

**Bruno Estevão de Souza**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Elizabeth Romagosa**

**Co-orientador: Prof. MSc. Robie Allan Bombardelli**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aqüicultura, do Centro de Aqüicultura da UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção de Mestre em Aqüicultura.

Jaboticabal

São Paulo – Brasil

2007

Souza, Bruno Estevão de  
S729f Fertilização artificial de ovócitos de curimatá, *Prochilodus lineatus* / Bruno Estevão de Souza. -- Jaboticabal, 2007  
xiii, 63 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aqüicultura, 2007  
Orientadora: Elizabeth Romagosa  
Banca examinadora: Newton Castagnolli, Antônio Fernando Gervásio Leonardo  
Bibliografia

1. Dosagem inseminante. 2. Sêmen. 3. Ativação. 4. Motilidade. I. Título. II. Jaboticabal – Centro de Aqüicultura.

CDU 639.3.03

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

*Dedico este trabalho:*

*Aos meus pais, José e Neusa.*

*A meus irmãos, Carlos e Gisele.*

*Aos meus sobrinhos, Gabriela, Gabriel e Rafael.*

*Aos meus queridos avos que já partiram, Jordão e Maria, Jozias e Rosa.*

*A minha amiga e namorada, Rejane.*

***Agradecimentos:***

*A Deus pela força permanente e eterno amor.*

*A toda a minha família que me apoiou e incentivou nessa caminhada, em especial:*

*Aos meus pais: José e Neusa pelos ensinamentos tão preciosos, apoio e amor incondicional (Amo vocês ...).*

*A família Anschau pela compreensão e carinho ... me receberem como um filho em sua casa: Paulo, Marli, Sandra, Claudia e Andréia.*

*A minha irmã e sobrinha: Gisele e Gabriela por sempre estarem do meu lado e me receberem tão bem em Sampa enquanto escrevia a dissertação, momentos memoráveis!*

*Ao meu irmão: Carlos, tia Ro e aos meus sobrinhos: Gabriel e Rafael, pelo carinho, amizade e força.*

*A meu tio Ari e tia Neide sempre tão amáveis; aos meus primos: Rodrigo, Adriam, Marcelo, Marcos e Fernando os quais considero como irmãos.*

*Ao Máááááário ... pela amizade e carinho!*

*A todos meus amigos de São Paulo, Paraná e da Pró-Vida.*

*Ao Dr. Celso Charuri pelos eternos ensinamentos.*

*A minha amiga e namorada: Rejane pelo Amor incondicional, carinho e compreensão!*

*A minha Orientadora Elizabeth Romagosa pela oportunidade, por todos ensinamentos, pela atenção, carinho, compreensão e amizade adquirida durante a pós-graduação.*

*Ao meu Co-orientador Robie Allan Bombardelli pela oportunidade, confiança, por todos ensinamentos, compreensão e amizade.*

*Aos meus amigos que ajudaram na realização do experimento, sem os quais não seria possível a realização: Elizabeth Romagosa, Robie A. Bombardelli, Eduardo A. Sanches, Diego M. Baggio e Pitágoras A. Piana (Foram muitas madrugadas em claro!).*

*Aos professores que participaram da banca do exame geral de qualificação, Teresa Cristina Ribeiro Dias Koberstein e Alexandre Ninhaus Silveira contribuindo para o aprimoramento enriquecimento do trabalho.*

*Aos professores que participaram da “banca final” (Comissão Examinadora), Newton Castagnolli e Antônio Fernando Gervásio Leonardo contribuindo para o aprimoramento enriquecimento do trabalho.*

*Aos professores(as) da pós-graduação que contribuíram direta ou indiretamente com a minha formação.*

*Aos colegas da pós-graduação, em especial:*

*Alexandre, Bruno, Camila, Camilo, Charles, Daniela, Erico, Gabriela, Fabiana, Jaqueline, Marcelo, Márcia, Maria do Carmo, Marianne, Matheus, Mauricio, Nilson, Paracá, Róberson e tantos outros.*

*Aos amigos que fiz durante essa caminhada, em especial:*

*César, Débora, Djalma, João Paulo, Louise, Marcello, Munir, Luiz Ayroza e Casaca.*

*Aos professores da UNIOESTE ( pesquisadores do GEMaQ) pelo contato com a professora Elizabeth sem o qual não seria possível tê-la conhecido: Aldi Feiden, Adilson Reidel e Wilson Rogério Boscolo.*

*Ao Centro de Aqüicultura da Unesp – CAUNESP, diretoria, professores e funcionários sempre tão atenciosos e prestativos.*

*Ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela concessão da Bolsa de Estudos.*

*Ao diretor do Centro de Pesquisa em Aqüicultura Ambiental - CPAA/IAP, senhor Eléxio Vidal por ceder a estrutura física para realização deste trabalho.*

*A todos funcionários e estagiários do CPAA/IAP, que me receberam tão bem e ajudaram nos seis meses de trabalho no centro de pesquisa.*

*A Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE por ceder a estrutura física para realização deste trabalho.*

*Agradeço a todos que encontrei nessa caminhada, mesmo que não tenha mencionado, e de alguns nem recordo os nomes, rostos ou atos ...Todos os encontros proporcionaram uma mudança em minha Vida ...*

**MUITO OBRIGADO A TODOS!**

## ÍNDICE

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>ix</b>
x	
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>xi</b>
<b>INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>1</b>
<b>REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>3</b>
1.0 CARACTERÍSTICAS DA ESPÉCIE.....	3
2.0 REPRODUÇÃO ARTIFICIAL.....	5
3.0 QUALIDADE DOS GAMETAS.....	7
4.0 DOSE INSEMINANTE.....	9
5.0 VOLUME DE ÁGUA EMPREGADA NA ATIVAÇÃO DOS ESPERMATOZÓIDES.....	9
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	11
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>11</b>
OBJETIVO GERAL.....	20
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
<b>ARTIGO I.....</b>	<b>1</b>
<b>MOTILIDADE ESPERMÁTICA DO SÊMEN DO CURIMBATÁ, <i>Prochilodus lineatus</i>: EFEITO DO VOLUME E TEMPERATURA DA SOLUÇÃO ATIVADORA.....</b>	<b>1</b>
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUÇÃO.....	3
MATERIAL E MÉTODOS.....	5
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	7
CONCLUSÕES.....	12
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	13
<b>ARTIGO II.....</b>	<b>1</b>
<b>INTERAÇÃO ENTRE O NUMERO DE ESPERMATOZÓIDE.OVÓCITO<sup>-1</sup> E O VOLUME DE ÁGUA EMPREGADOS NA FERTILIZAÇÃO ARTIFICIAL DE OVÓCITOS DE CURIMBATÁ, <i>Prochilodus lineatus</i>.....</b>	<b>1</b>
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUÇÃO.....	3
MATERIAIS E MÉTODOS.....	4
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	7
CONCLUSÕES.....	11
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	12



## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO DA LITERATURA

<b>Figura 1.</b> Reprodutor de curimatá, <i>Prochilodus lineatus</i> utilizado no experimento.....	5
--	---

### ARTIGO I: MOTILIDADE ESPERMÁTICA DO SÊMEN DO CURIMBATÁ, *Prochilodus lineatus*: EFEITO DO VOLUME E TEMPERATURA DA SOLUÇÃO ATIVADORA

<b>Figura 1.</b> Duração da motilidade espermática do curimatá, <i>Prochilodus lineatus</i> utilizando-se diferentes relações de volume de sêmen:volume de água para a ativação dos espermatozoides.....	9
--	---

<b>Figura 2.</b> Duração da motilidade espermática dos espermatozoides de curimatá, <i>Prochilodus lineatus</i> , ativados utilizando-se água em diferentes temperatura.....	10
--	----

<b>Figura 3.</b> Vista aérea do Centro de Pesquisas em Aqüicultura Ambiental - CPAA/IAP – Toledo/PR. Fonte: Google Earth (2007).....	17
--	----

<b>Figura 4.</b> Laboratório e tanques do CPAA/IAP.....	17
---	----

<b>Figura 5.</b> Tanques das matrizes.....	17
--	----

<b>Figura 6.</b> Reprodutor de curimatá, <i>Prochilodus lineatus</i> utilizado no experimento.....	17
--	----

<b>Figura 7.</b> Seleção dos reprodutores de curimatá, <i>Prochilodus lineatus</i> .....	17
--	----

<b>Figura 8.</b> Laboratório de reprodução.....	18
---	----

<b>Figura 9.</b> Caixas onde foram acondicionadas as matrizes.....	18
--	----

<b>Figura 10.</b> Coleta de sêmen com auxílio de seringa descartável.....	18
---	----

<b>Figura 11.</b> Sêmen (5 $\mu$ L) e água (200 $\mu$ L) utilizados para aferir a motilidade espermática.....	18
---	----

<b>Figura 12.</b> Homogeneização do sêmen e água (ativação dos espermatozoides)....	18
---	----

<b>Figura 13.</b> Coleta do sêmen e água homogeneizados para leitura em microscópio sob lâmina de vidro.....	18
--	----

**ARTIGO II: INTERAÇÃO ENTRE O NÚMERO DE ESPERMATOZÓIDE. OVÓCITO<sup>-1</sup> E O VOLUME DE ÁGUA EMPREGADOS NA FERTILIZAÇÃO ARTIFICIAL DE OVÓCITOS DE CURIMBATÁ, *Prochilodus lineatus***

<b>Figura 1.</b> Projeção tridimensional do modelo de superfície de resposta ajustado para prever a taxa de fertilização do curimatá em função do volume de água e do número de espermatozoides (transformação logarítmica) utilizadas na reprodução artificial.....	9
<b>Figura 2.</b> Vista aérea do Centro de Pesquisas em Aqüicultura Ambiental - CPAA/IAP – Toledo/PR. Fonte: Google Earth (2007).....	17
<b>Figura 3.</b> Laboratório e tanques do CPAA/IAP.....	17
<b>Figura 4.</b> Tanques das matrizes.....	17
<b>Figura 5.</b> Reprodutor de curimatá, <i>Prochilodus lineatus</i> utilizado no experimento.....	17
<b>Figura 6.</b> Seleção dos reprodutores de curimatá, <i>Prochilodus lineatus</i> .....	17
<b>Figura 7.</b> Laboratório de reprodução.....	18
<b>Figura 8.</b> Caixas onde foram acondicionadas as matrizes.....	18
<b>Figura 9.</b> Coleta de sêmen com auxílio de seringa descartável.....	18
<b>Figura 10.</b> Coleta dos ovócitos em placa de petri.....	18
<b>Figura 11.</b> Os ovócitos com suas respectivas doses inseminantes antes da fertilização.....	18
<b>Figura 12.</b> Incubadoras experimentais utilizadas para os ensaios de fertilização....	18

**LISTA DE TABELAS****ARTIGO I: MOTILIDADE ESPERMÁTICA DO SÊMEN DO CURIMBATÁ, *Prochilodus lineatus*: EFEITO DO VOLUME E TEMPERATURA DA SOLUÇÃO ATIVADORA**

**Tabela 1.** Produção seminal e características seminais do “pool” de sêmen proveniente de 12 machos de curimbatá, *Prochilodus lineatus*.....8

**Tabela 2.** Valores médios de duração da motilidade espermática do “pool” de sêmen de 12 machos de *Prochilodus lineatus* submetido a diferentes relações de diluição durante o processo de ativação.....9

**ARTIGO II: INTERAÇÃO ENTRE O NUMERO DE ESPERMATOZÓIDE. OVÓCITO<sup>-1</sup> E O VOLUME DE ÁGUA EMPREGADOS NA FERTILIZAÇÃO ARTIFICIAL DE OVÓCITOS DE CURIMBATÁ, *Prochilodus lineatus***

**Tabela 1.** Valores médios das características reprodutivas do “pool” realizado com o sêmen de 30 machos de curimbatá, *Prochilodus lineatus*.....7

## INTRODUÇÃO GERAL

O curimatá *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) encontra-se distribuído geograficamente na Bacia do Prata e do rio Paraíba do Sul (Castro, 1990). A espécie é reofílica e apresenta importância econômica e social para a pesca artesanal, de subsistência e esportiva, além de apresentar carne saborosa (Barbieri et al., 2004).

A piscicultura está estreitamente relacionada com a capacidade de perpetuação das espécies, produzindo larvas para criação, repovoamento e a formação de plantéis de reprodutores (Godinho et al., 1984; Antoniutti et al., 1995). Os primeiros trabalhos em reprodução no Brasil se iniciaram em 1929, quando Rodolfo Von Ihering e seus colaboradores, coletaram hipófises de rã e induziram machos à espermiacção com dosagens crescentes e sucessivas em intervalos de seis horas. Posteriormente, apareceram outros estudos de reprodução de peixes no Nordeste do Brasil (Castagnolli, 1992).

A técnica tradicional de inseminação artificial em peixes ainda é usada em fazendas, consistindo simplesmente, em homogeneizar os espermatozoides e ovócitos em um meio externo (água doce ou salgada, ou outras soluções ativadoras) (Marques, 2001). Entretanto, a eficiência desta técnica é limitada, particularmente, no que se refere às taxas de fertilização e, a economia de gametas, pois, o esperma de um único macho pode fertilizar 1 a 5 fêmeas (Bart e Dunham, 1996; Chereguini et al., 1999; Marques, 2001; Shimoda et al., 2007).

Para a utilização racional de machos de curimatá, quando mantidos em ambiente confinados e, destinados a reprodução induzida, torna-se importante o conhecimento da capacidade de produção do material fecundante desses indivíduos durante o período reprodutivo (Kavamoto et al., 1997), bem como, sua capacidade de fertilização.

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

Thoth et al. (1997) e Lahnsteiner (2000) ressaltaram a importância de se conhecer as características morfológicas e funcionais dos espermatozoides para melhorar a produção de qualquer espécie de peixe em cativeiro.

Nos últimos anos, os estudos direcionados para o criação e preservação de algumas espécies nativas do Brasil têm sido muito relevantes, não só por sua importância econômica, como também ambiental. Por isso que se faz necessário à ampliação de conhecimentos básicos que resultem na obtenção de sucesso nos processos de reprodução e crescimento quando mantidos em cativeiro e ainda, o desenvolvimento de técnicas de conservação (Mojica, 2004).

Assim, o presente trabalho tem como objetivo conhecer melhor os processos envolvidos na fertilização artificial do curimatá, *Prochilodus lineatus* com intuito de aumentar as taxas de fertilização artificial e otimizar o uso de gametas e seus reprodutores.

## REVISÃO DA LITERATURA

### 1.0 CARACTERÍSTICAS DA ESPÉCIE

Entre as espécies de peixes de água doce destacam-se as da família PROCHILODONTIDAE, composta por exemplares de porte médio a grande (27-44cm), que estão entre as mais importantes na pesca continental, tanto comercial como de subsistência, nos rios sul-americanos, com exceção do Chile onde não há representantes (Castro, 1991; Lizama, 2000).

No Brasil ocorrem várias espécies do gênero *Prochilodus*, que são amplamente distribuídas pelas bacias hidrográficas, sendo o curimatá *Prochilodus lineatus* (Figura 1) a espécie mais comum na região sudeste, onde comumente é conhecida como curimba ou curimatá. A taxonomia desta família foi revista por Castro (1990), que constatou que o nome *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881) é sinônimo de *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836).

*Prochilodus lineatus* é classificado com base em sua aceitação para consumo, no valor de comércio e na demanda de mercado, como peixe de segunda ou terceira categoria por pescadores artesanais (Castro e Begossi, 1995) e, é a terceira espécie comercial mais capturada nos rios do Estado de São Paulo (Santos et al., 1995) é a segunda espécie mais importante da pesca profissional no reservatório de Itaipu/Paraná (FUEM-ITAIPU Binacional, 1987).

O curimatá apresenta corpo moderadamente alto e comprimido, com a maior altura na origem da nadadeira dorsal. A boca é terminal, com lábios carnosos equipados com duas séries de pequenos e numerosos dentes falciformes ou espatulares, formando um disco oral quando protraídos (Nakatani et al., 2001).

A espécie quando adulta pode medir cerca de 46,0cm de comprimento total (Castro, 1990). É um peixe detritívoro, tanto na fase jovem como na adulta (Companhia Energética de Minas Gerais e Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais, 2000) e, sua habilidade de explorar esta fonte de alimento confere grande importância a este grupo devido à sua atuação na ciclagem de nutrientes oriundos de materiais em decomposição (Ituassú et al, 2005). Segundo Castagnolli (1992) o

curimatá alimenta-se basicamente de detritos orgânicos, fauna bentônica e, aceita bem ração.

Atenção especial tem-se dado à piscicultura continental, principalmente, nas regiões sudeste e sul do país, pois, as populações das melhores espécies de peixes estão em acentuado declínio resultante das modificações ecológicas provocadas pelo crescimento demográfico, construção de barragens hidrelétricas, destruição das lagoas marginais, desenvolvimento industrial e intensa sobrepesca, provocando a queda da produtividade e a inadequação do ambiente, principalmente, das espécies migradoras (Godinho et al., 1984; Barbieri et al, 2004).

Pelas características alimentares e reprodutivas (Rosa Júnior e Schubart, 1945; Godoy 1959; 1967; 1972; Romagosa et al., 1985 a,b) e de crescimento do curimatá, em condições de confinamento, (Cestaroli et al., 1981; Verani, 1987; Narahara et al., 1990; Ayroza et al., 1992) esta espécie vem despertando grande interesse para a piscicultura extensiva e semi-intensiva. Mais recentemente, vem sendo utilizado também, em sistema intensivo (tanques-rede), onde tem papel de peixe sanitário, promovendo a limpeza de algas, bactérias e matéria orgânica depositadas nas malhas do tanque (Zaniboni Filho, 1997).

Alguns parâmetros reprodutivos do curimatá em condições naturais foram estudados, destacando-se aqueles relativos às migrações reprodutivas ascendentes, isto é, em direção às cabeceiras dos rios na primavera, portanto, como espécie reofílica, percorre grande distância no período da maturação gonadal (Godoy, 1959; 1967; 1972), a fecundidade (Rosa Júnior e Schubart, 1945) e ao tipo de desova (Romagosa et al., 1985), entre outros. Esta espécie atinge a primeira maturação gonadal com cerca de 19,7cm de comprimento, cujo período reprodutivo estende-se de novembro a fevereiro. A desova é do tipo total, sazonal, a fecundação é externa e não cuidam da prole (Vazzoler, 1996).

Estas migrações com fins reprodutivos estão sincronizadas com flutuações do nível da água. Tais migrações são disparadas pelo acréscimo da precipitação pluviométrica e aumento da temperatura e nível das águas, ocasião em que os machos produzem sons característicos que, provavelmente servem como fator de agrupamento (Kavamoto et al., 1996; Lowe-McConnell, 1999).

Os ovos são pelágicos e podem apresentar diâmetro médio de 3,92mm, a diferenciação do embrião inicia-se cerca de 08 horas após a fertilização. A eclosão das larvas ocorre 16 horas após a fertilização, à temperatura de 25,9°C, medindo

cerca de 3,50mm, a absorção completa do saco vitelino ocorre com cerca de 8,93mm de comprimento total (Nakatani et al., 2001). A temperatura ideal para o curimatá garantir o processo reprodutivo encontra-se entre os limites 22 e 28°C (Godoy, 1975).

A reprodução natural do curimatá não ocorre em condições de cativeiro, torna-se necessária à utilização de técnicas de indução hormonal (Fenerich-Verani et al., 1984; Godinho et al., 1984 e Borsato da Silva, 2000).



**Figura 1.** Reprodutor de curimatá (*Prochilodus lineatus*) utilizado no experimento.

## **2.0 REPRODUÇÃO ARTIFICIAL**

Os primeiros trabalhos visando à reprodução artificial de peixes reofílicos foram realizadas no Brasil, na década de 30, por Rodolpho von Ihering e seus colaboradores. Este processo consiste, basicamente, na extração de hormônios gonadotrópicos da glândula pituitária de peixes doadores e, em seguida, injetados no músculo de peixes sexualmente maduros, para induzir à ovulação e a desova em condições artificiais (Castagnolli e Cyrino, 1980). Durante as décadas de 50 e 60, os trabalhos nesta área restringiram-se às estações do DNOCS - Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (Cyrino *et al.*, 2004).

A reprodução dos peixes é um processo complexo controlado pelo eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (Romagosa, 1991; 1998 e Streit Jr., 2002). Para que ocorra o processo final da maturação gonadal e a liberação dos gametas há



necessidade de realizar a “hipofisação”, uma das técnicas mais utilizadas na indução hormonal, método que consiste na aplicação do extrato de hipófise (geralmente de carpas). Para tal, as fêmeas devem apresentar o ventre volumoso, abaulado e macio e os machos liberarem pequenas quantias de sêmen sobre leve pressão abdominal (Cyrino *et al.*, 2004).

A reprodução artificial, envolve a intervenção humana no processo de propagação natural proporcionando vantagens, tais como: aumento da taxa de fertilização e da eclosão, sobrevivência das larvas, melhores condições de crescimento e, principalmente, a garantia de não extinção das espécies de peixes (Cyrino *et al.*, 2004).

Em fêmeas, quando não são induzidas à reprodução, os ovários entram em processo de degeneração ou atresia folicular (Romagosa, 1991; Romagosa, 1998). Segundo os autores, este processo implica na involução e se caracteriza por uma série de alterações morfológicas. Romagosa *et al.* (1985) caracterizaram as diferentes fases do processo de atresia ovocitária em *P. scrofa*, provenientes de ambiente natural e em cativeiro. Estes autores procuraram identificar as mudanças que ocorrem durante a absorção dos folículos pós-ovulatórios em fêmeas que foram induzidas por tratamento hormonal.

Em relação aos machos de peixes, estudos da biologia do sêmen começaram no século XIX. Desde então as características deste foram rapidamente identificadas, como: imobilidade do espermatozóide em meio hipertônico, duração do movimento após sua ativação, composição do plasma seminal, a necessidade de diluição em água para a iniciação do movimento do espermatozóide e, capacidade para fertilizar (Billard e Cosson, 1992; Rana, 1995).

Para o sucesso tanto técnico, quanto econômico, na aquicultura ou em qualquer empreendimento agropecuário, é necessário que a seleção dos reprodutores “matrizes” seja realizada com gametas de alta qualidade. Todavia, pouca atenção é dada em relação a esta seleção, principalmente em relação aos machos (Rurangwa *et al.*, 2004). De acordo com Mojica (2004), o estudo do sêmen pela determinação do volume coletado, motilidade e concentração de espermatozoides, pode servir de base para a diluição do material fecundante e, mede a capacidade de produção do sêmen, de cada reprodutor.

### 3.0 QUALIDADE DOS GAMETAS

A avaliação das características seminais é importante na rotina da reprodução artificial em qualquer espécie animal (Fogli da Silveira et al., 1988).

A qualidade do sêmen pode ser avaliada em diferentes níveis de complexidade: espermátocrito, viabilidade espermática, porcentagem de motilidade espermática, intensidade da motilidade espermática, ultraestrutura dos espermatozóides, composição química do plasma ou pela capacidade de fertilização que possuem os espermatozóides (Rurangwa, et al., 2001).

A concentração espermática é uma das medidas quantitativas mais importantes utilizadas em pesquisas e, a rotina de avaliação do sêmen (fertilização externa ou interna), permite maximizar o aproveitamento do material fecundante e, melhorar os resultados referentes às taxas de fertilização e a eclosão das larvas (Fogli da Silveira et al., 1987).

Os peixes produzem quantidade variável de gametas. Em algumas espécies, o macho produz 100 bilhões de espermatozóides/ano/kg do peso corporal ou mais de  $1 \times 10^9$  espermatozóides/g de testículo/dia, o que é 10 vezes maior do que a produção relatada para mamíferos (Billard, 1990).

Um dos métodos utilizados para a realização das análises de qualidade espermática é o teste de sobrevivência espermática, que apresenta relação direta com a motilidade. Este índice é determinado a partir do emprego de soluções de corantes como à nigrosina e eosina. Neste método, quando o sêmen entra em contato com o corante, cora em vermelho os espermatozóides mortos, pois, são permeáveis a eosina, enquanto que, as células vivas permanecem brancas (Kavamoto e Fogli da Silveira, 1986).

A quantidade de espermatozóides obtida nos testículos é superior à parcela coletada por massagem abdominal (Kavamoto et al., 1987). A injeção de hormônios indutores leva a um aumento do volume de sêmen liberado alterando conseqüentemente a concentração espermática. Isto deve explicar o aspecto mais fluido do sêmen nos peixes injetados (Kavamoto et al., 1989).

Outro indicador da qualidade do sêmen é a sua coloração, que pode indicar maior ou menor quantidade de fluído seminal, influenciando diretamente na concentração de espermatozóides (Andrade-Talmelli et al., 2001).

Os espermatozóides de peixes são imóveis e inativos enquanto permanecem na luz testicular. A motilidade ocorre somente após a espermição em um meio aquoso ou, em espécies com fertilização interna, dentro do trato reprodutivo feminino, sugerindo que a motilidade é inibida por fatores químicos específicos dos testículos ou do fluido seminal (Morisawa, 1985).

A motilidade é avaliada observando-se a movimentação dos espermatozóides. Logo após, sua ativação com água ou em solução ativadora (Marques, 2001). Para determinar a taxa de movimentação é atribuído um valor para a quantia de espermatozóides em movimento, sendo 0 para nenhum espermatozóides móvel, um para 25% móvel, dois para 50% móvel, três para 75% móvel e quatro acima de 75% móvel (Viveiros et al., 2003)

Os fatores mais importantes na determinação da ativação espermática são: pressão osmótica, composição iônica e o pH, sendo que mudanças na pressão osmótica é o fator que mais influencia a ativação dos espermatozóides (Billard et al., 1995).

Além disso, o mecanismo da motilidade pode estar relacionado com a quantidade de ATP intracelular e, a finalização da motilidade espermática pode estar associada com a diminuição deste ATP (Billard et al., 1993), apesar de que este não se exaure totalmente (Billard e Cosson, 1992).

Determinar a qualidade dos ovócitos bem como as características que determinem sua capacidade de obter sucesso na fertilização tem se mostrado um problema significativo para os produtores, para as espécies já cultivadas e, para as novas espécies a serem introduzidas (Bromage et al., 1992).

Muito pouco é conhecido sobre o que determina a qualidade dos ovócitos, por outro lado, muitos fatores tem sido implicados como possíveis agentes causadores, como: qualidade da água, condições de cultivo, dieta e seleção dos reprodutores, métodos de reprodução, estresse, manipulação dos ovócitos (Bromage, 1995).

Apesar das análises anteriormente descritas indicarem a qualidade dos gametas, a mensuração das taxas de fertilização são mais determinantes, no sentido de incrementar a produção por reprodutor e conseqüentemente, elevar a produtividade por área, tornando-se necessária a realização de testes de fertilização para o conhecimento da potencialidade dos gametas (Kavamoto et al., 1987).

#### **4.0 DOSE INSEMINANTE**

A técnica tradicional de inseminação artificial em peixes ainda é usada em fazendas, consistindo simplesmente, em homogeneizar os espermatozóides e ovócitos juntos em um meio externo (água doce ou salgada, ou outras soluções ativadoras) (Marques, 2001). Entretanto, a eficiência desta técnica é limitada, particularmente no que se refere às taxas de fertilização e a economia de gametas, pois o esperma de um único macho pode fertilizar 1 a 5 fêmeas (Bart e Dunham, 1996; Chereguini et al., 1999; Marques, 2001; Shimoda et al., 2007).

Fogli da Silveira et al., (1988) e Morshbacher, (2004) enfatizaram a grande importância dos estudos que utilizam um número mínimo de espermatozóides para fertilizar o máximo de ovócitos. O conhecimento da correta relação espermatozóide: ovócito tem sido investigado devido a sua importância principalmente em relação aos programas de criopreservação (Denniston et al., 2000).

A reprodução artificial com sêmen fresco ou congelado também revela possibilidades de limitar o estoque de machos na piscicultura intensiva, propiciando uma exploração mais racional dos reprodutores geneticamente selecionadas e, uma redução nos custos de produção (Fogli da Silveira et al., 1988; Suquet et al., 1995; Lahnsteiner et al., 2003).

Além da redução dos custos e a economia de gametas, o conhecimento da dosagem inseminante determina a quantidade exata do sêmen para evitar menores percentuais de fertilização (Shimoda et al., 2007).

#### **5.0 VOLUME DE ÁGUA EMPREGADA NA ATIVAÇÃO DOS ESPERMATOZÓIDES**

A diluição do sêmen e o número de ovócitos que podem ser fertilizados com um determinado volume de sêmen tem sido objeto de investigação. Trabalhos utilizando água como meio de diluição, a exemplo de Erdahl e Graham (1987) obtiveram poucos resultados na fertilização devido ao curto tempo de duração da motilidade celular dos espermatozóides na água.

Soluções salinas também têm sido, extensivamente testadas como diferentes meios de diluição e geralmente, mostram resultados favoráveis, mas o tempo limite

da motilidade da célula espermática restringe-se à eficácia das soluções salinas (Erdahl e Graham, 1987).

Outro fator importante é o volume de solução ativadora a ser adicionada, pois, a inclusão de volumes elevados desta solução pode causar a diluição do sêmen diminuindo a possibilidade dos espermatozóides encontrarem a micrópila no momento da fertilização. Da mesma forma, a inclusão de volumes de solução ativadora insuficiente, reduz o sucesso na fertilização artificial, pois pode causar a obstrução da micrópila pelo muco ovariano ou até mesmo pelo contato entre ovócitos, além de prejudicar a ativação dos espermatozóides (Woynarovich e Horváth, 1983; Ninhaus-Silveira et al., 2000; Shimoda et al., 2007; Zaniboni-Filho e Weingartner, 2007).

A duração da motilidade espermática e a distância percorrida pelos espermatozóides após a ativação são curtas e variam para cada espécie (Billard, 1992).

Segundo Baldisserotto e Gomes (2005) a quantidade recomendada de água para a ativação dos espermatozóides do *P. lineatus* é de 10 a 20% do volume de ovos. Os mesmos autores sugerem para o *Salminus brasiliensis* aproximadamente 1g de óvulos para cada 1 mL de água. A água utilizada no processo de fertilização poderá ser a mesma utilizada nas incubadoras. A utilização de um grande volume de água recomendado pelos autores mostra a necessidade de estudos mais refinados que determinem o volume ideal de água para a fertilização de ovócitos de diferentes espécies de peixes migradores.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE-TALMELLI, E. F.; KAVAMOTO, E. T.; FENERICH-VERANI, N. Características seminais da piabanha, *Brycon insignis* (Steindachner, 1876), após estimulação hormonal. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 149 - 154, 2001.

AYROZA, L. M. S.; ROMAGOSA, E.; ANDRADE, E. F. Produção de alevinos de curimatá, *Prochilodus scrofa*, na região do Vale do Ribeira, SP. In: **Reunião Anual do Instituto de Pesca**, Resumo. São Paulo: Instituto de Pesca, 1992, 41p.

BALDISSEROTTO, B. e GOMES, L. C. **Espécies nativas para a piscicultura no Brasil** Santa Maria: Ed. UFSM, 2005. 468 p.

BARBIERI, G.; SALLES, F. A.; CESTAROLLI, M. A.; TEIXEIRA-FILHO, A. T. Estratégias reprodutivas do dourado, *Salminus maxillosus* e do curimatá, *Prochilodus lineatus* no Rio Mogi Guaçu, Estado de São Paulo, com ênfase nos parâmetros matemáticos da dinâmica populacional. Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Pirassununga. **Acta Scientiarum - Biological Sciences**, Maringá, v. 26, n. 2, p. 169-174, 2004.

BART, A. N. e DUNHAM, R. A. Effects of sperm concentration and egg number on fertilization efficiency with channel catfish (*Ictalurus punctatus*) eggs and blue catfish (*I. furcatus*) spermatozoa. **Theriogenology**. v. 45, p. 673-682, 1996.

BILLARD, R. Artificial Insemination. In: **Fish Physiology of Reproduction**. Endinburgh, London, Melbourne and New York, 1990. v. 4, Chapter 9, p. 870-887.

BILLARD, R. e COSSON, M. P. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. **J. Exp. Zoo**. v. 261, p. 122-131, 1992.

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

BILLARD, R.; COSSON, M. P.; PERCHEC, G.; LINHART, O. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 129, p. 95-112, 1995.

BORSATO DA SILVA, E. **Avaliação comparativa da utilização do sêmen criopreservado e fresco na fertilização dos óvulos de curimatá (*Prochilodus lineatus*) (Valenciennes, 1836)**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2000. 58p. Dissertação (Mestrado em aqüicultura) – Universidade Federal de Santa Catarina, 2000.

BROMAGE, N.; JONES, J; RANDALL, C.; THURSH, M.; SPRINGATE, J.; BARKER, G.; Broodstock management, fecundity, egg quality and timing of egg production in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 100, p. 66-141, 1992.

BROMAGE, N. In: Broodstock Management and Egg and Larval Quality. **Broodstock Management and Seed Quality – Geral Considerations**. Oxford: Blackwell Science Ltd, p. 23-52, 1995.

CASTAGNOLLI, N. e CYRINO, J. E. P. Desova induzida do Curimatá, *Prochilodus scrofa* Steindachner 1881 (Pisces, Prochilodontidae). **Ciência e Cultura**, v. 32 n. 9, p. 1245-1253, set. 1980.

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

CASTRO, R. M. C. Revisão **Taxonômica da Família Prochilodontidae (Ostariophysi: Characiformes)**. 1990. 293 f., il. + 43 figs. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1990.

CASTRO, R. M. C. 1991. Sistemática e distribuição geográfica da família Prochilodontidae (Ostariophysi, Characiformes). In: **Encontro Brasileiro de Ictiologia, IX**. Maringá, Pr, 1991. Resumos. Maringá. SBI/NUPELIA, p.128.

CASTRO, R. M. C.; BEGOSSI, A. Ecology of fishing on the Grande river (Brazil): technology and territorial rights. **Fisheries Research**, p. 1-14, 1995.

CESTAROLLI, M. A.; ROMAGOSA, E.; CIPOLI, M. N.; BASILE-MARTINS, M. A.; VERANI, J. R. 1981. Observações sobre o cultivo de curimatá *Prochilodus scrofa* Steind., 1881, em tanques adubados, Pirassununga, SP. **Ciênc. e Cult.**, 33 (7, supl.):6.

CHEREGUINI, O.; DE LA BANDA, I. G.; RASINES, I. et al. Artificial fertilization in turbot, *Scophthalmus maximus*, (L.): different methods and determination of the optimal sperm-egg ratio. **Aquaculture Research**, Amsterdam, v.30, p.319-324, 1999.

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

CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALOSSO, D. M.; CASTAGNOLLI, N. **Reprodução de peixes de água doce In: Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, 2004. p 45-74.

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

ERDAHL, A. W. e GRAHAM, E. F. Fertility of Teleost Semen as Affected by Dilution and Storage in Seminal Plasma-Mimicking Medium. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 60, p. 311-321. 1987.



FENERICH-VERANI, N.; GODINHO, H. M. The size composition of the eggs of Curimbatá *Prochilodus scrofa* Steindachner 1881, induced to spawn with human chorionic gonadotropin (HCG). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 42, p. 37-41, 1984.

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

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

FUEM-ITAIPU BINACIONAL. **Relatório do projeto “Ictiofauna e Biologia Pesqueira” – março/85 a fevereiro de 1986**. Maringá, v.2, 1987, 638 p.

GODINHO, H.M.; ROMAGOSA, E.; CESTAROLLI, M. A. et al. Reprodução induzida de curimbatá *Prochilodus scrofa* Steind., 1881 sob condições de cultivo experimental. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.8, n.2, p.113-119, 1984.

GODOY, M. P. 1959. Age, growth, sexual maturity, behavior, migration, tagging and transplantation of the curimbatá, *Prochilodus scrofa* Steind., 1881) of the Mogi-Guaçu river, SP state, Brazil. An. **Acad. Bras. Ciênc.**, Rio de Janeiro, 31 (3): 447-77.

GODOY, M. P. Dez anos de observações sobre periodicidade migratória de peixes do rio Mogi-Guaçu. **Rev. Bras.Biol.**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 1, p. 1-12, 1967.

GODOY, M. P. Brazilian tagging experiments, fishes migration and upper Paraná river basin ecosystem. **Rev. Bras. Biol.**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 4, p. 473-84, 1972.

GODOY, M. P. Brazilian tagging experiments, fishes migration and upper Paraná river basin ecosystem. **Rev. Bras. Biol.**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 4, p. 473-84, 1972.

GODOY, M. P. **Peixes do Brasil – Subordem Characoidei**. Editora Franciscana, v. 1, p. 629-874, 1975.

ITUASSÚ, R. D.; CAVERO, B. A. S.; FONSECA, F. A. L.; BORDINHON, A. M. **Cultivo de curimatã (*Prochilodus spp*)** in: Espécies nativas para piscicultura no Brasil. Santa Maria: editora UFSM, 2005. p.67-80.

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

KAVAMOTO, E. T.; FOGLI DA SILVEIRA, W.; RIGOLINO, M. G.; TABATA, Y. A., CAMPOS, B. E. S. Produção espermática e teste de fertilização do sêmen de Truta Arco-Íris, *Salmo irideus gibbons* no primeiro ciclo reprodutivo. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 14, p. 51-62, 1987.

KAVAMOTO, E. T.; FOGLI DA SILVEIRA, W.; GODINHO, H. M.; ROMAGOSA, E. Fertilização em *Prochilodus scrofa* Steindachner 1881, com sêmen criopreservado em nitrogênio líquido. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 16, n.1, p. 29-36, 1989.

KAVAMOTO, E. T.; NARAHANA, M. Y.; MAINARDES-PINTO, C. S. R.; ANDRADE-TALMELLI, E. F.; ROMAGOSA, E.; FERRAZ, E. M.; Efeito do HCG na produção de sêmen do curimatã *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881). **Revista Ceres**, v. 43, n. 245, p. 76-85, 1996.

LAHNSTEINER, F. Introduction to the special issue on cryopreservation of gametes in aquatic species. **Aquaculture Research**, Amsterdam, v. 31, p. 229, 2000.

LIZAMA, M. A. P. Estimativa do parâmetros de crescimento, recrutamento e mortalidade de *Prochilodus lineatus* da planície de inundação do Alto Rio Paraná, **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v.26, n. 2, 121-128, 2000.

LOWE-MCCONNELL, R. H. **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**. São Paulo; Edusp; 1999, 534 p.

MARQUES, S. **Preservação a curto prazo do sêmen de teleósteos neotropicais de água doce**. Belo Horizonte: Pontifícia Universidade Católica, 2001. 98p. Dissertação (Mestrado de Zoologia de Vertebrados) - Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, 2001.

MOJICA, C. A. P. **Análise ultraestrutura e avaliação do sêmen de peixes neotropicais, *Brycon orbignyanus*, *Rhamdia quelen* e *Brycon hilarii* (Pisces, Teleostei)**. 2004. 75 f. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) – Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

MORISAWA, M. Initiation mechanism of sperm at spawning in teleosts. **Zool. Sci.** v. 2., p. 605-615, 1985.

MORSHBACHER E. F. **Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundia cinza *Rhamdia quelen***. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2004.

NAKATANI, K.; AGOSTINHO, A. A.; BAUMGARTNER, G. et al. **Ovos e Larvas de Peixes de Água Doce**. Maringá: EDUEM, 2001. 378p.

NARAHARA, M. Y.; ROMAGOSA, E.; CESTAROLLI, M. A.; KAVAMOTO, E. T.; ANDRADE, E. F.; GODINHO, H. M.; GUILHERME, M. C. M.; VERRISSIMO, R. 1990. Análise do desempenho de reprodutores de curimatá, *Prochilodus scrofa*, em diferentes condições de cultivo. In: **Simpósio Brasileiro de aqüicultura**, Natal/RN, 1990. Resumos. Natal/ABRAQ, p.68.

NINHAUS-SILVEIRA, A. **Caracterização espermática, preservação criogênica e fertilidade do matrinhã, *Brycon cephalus* Gunther, 1860 (Teleostei, Characidae)**. 2000. 47 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas (Genética) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

RANA, K. In: In: **Broodstock Management and Egg and Larval Quality. Presevation of Gametas**, 1995, p. 53-75.

ROSA Jr. H.; SCHUBART, O. 1945. Anotações sobre a biologia do curimatã (*Prochilodus*) do rio Mogi-Guaçu, SP. **Rev.Bras.Biol.**, Rio de Janeiro, 5 (4): 541-55.

ROMAGOSA, E.; NARAHARA, M. Y.; GODINHO, H. M. Tipo de desova do curimatã, *Prochilodus scrofa* Staind. 1881, do rio Mogi-Guaçu, Pirassununga, São Paulo. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 12, n. 4, p. 1-5, 1985.

ROMAGOSA, E.; NARAHARA, M. Y.; GODINHO, H. M. Tipo de desova do curimatã, *Prochilodus scrofa* Steind., 1881, do Rio Mogi-Guaçu, Pirassununga, SP. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 12, n. 4, p. 1-5, 1985a.

ROMAGOSA, E.; NARAHARA, M. Y.; GODINHO, H. M.; STORFER, E. B. 1985b. Regressão ovariana de curimatã, *Prochilodus scrofa* Steind., 1881, sob condições de cultivo intensivo. In: **Congresso brasileiro de Zoologia**, 12, Campinas-SP, 1985b. Resumos. Campinas, SBZ/UNICAMP, p. 203-204.

ROMAGOSA, E. 1991. **Mudanças morfológicas(microscopia de luz e eletrônica) das gônadas do pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887),durante o ciclo reprodutivo, em condições de confinamento**. Rio Claro. 177p. (Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”).

ROMAGOSA, E. 1998 **Desenvolvimento gonadal (morfologia; ultra-estrutura) e indução da reprodução do matrinhã, *Brycon cephalus* (Günther, 1869) em cativo**. Vale do Ribeira, São Paulo. São Carlos. 211p. (Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos).

RURANGWA, E.; VOLCKAERT, F. A. M.; HUYSKENS; KIME, G. D. E.; OTLEVIER, F. Quality control of refrigerated and cryopreserved semen using computer assisted sperm analysis (casa), viable staining standardized fertilization in african catfish (*Clarias gariepinus*). **Theriogenology**, v. 55, p. 751-769, 2001.

RURANGWA, E.; KIME, D. E.; OLLEVIER, F.; NASH, J. P. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 234, p.1 –28, 2004.

SANTOS, R. A.; CÂMARA, J. J. C.; CAMPOS, E. C.; JUNIOR, H. V.; GIAMAS, M. T. D. Considerações sobre a pesca profissional e a reprodução pesqueira em águas continentais do estado de São Paulo. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, n. 19, 32 p, 1995.

SHIMODA, E.; ANDRADE, D. R.; VIDAL JÚNIOR, M. V.; GODINHO, H. P.; YASUI, G. S. Determinação da razão ótima de espermatozóides por ovócitos de piabanha *Brycon insignis* (pisces - characidae). **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 59, n. 4, p. 877-882, 2007.

STREIT JR., D. P. **Extrato de hipófise de frango e de Coelho como indutores gonadais de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) macho e fêmea, em comparação com extrato de carpa.** Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2002. 38p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual de Maringá, 2002.

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

VAZZOLER, A. E. M. de M. 1996. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática.** Maringá, EDUEM, 169p.

VERANI, J. R. 1987. **Análise quantitativa aplicada em experimento de cultivo intensivo e semi-intensivo do curimatá, *Prochilodus scrofa*, Steind., 1881 (Characiformes, Prochilodontidae).** São Carlos, Universidade Federal de São Carlos-UFSCar. 123p. (Tese de Doutorado).

VIVEIROS, A. T. M.; JATZKOWSKI, A.; KOMEN, J. Effects of oxytocin on semen release response in african catfish (*Clarias gariepinus*). **Theriogenology**, v. 59, p. 1905- 1917. 2003.

WOYNAROVICH, E.; HORVATH, L. **A propagação artificial de peixes de águas tropicais: manual de extensão.** Brasília: Escopo. 1983. 220p. Tradução de Vera Lucia Mixtra Chama de "The Artificial Propagation of Warm - Water Fin fishes – A Manual for Extension".

ZANIBONI FILHO, E. Apostila: **Piscicultura das espécies nativas de água doce.** UFSC, Florianópolis, 10p., 1997.

ZANIBONI FILHO, E. e WEINGARTNER, M. Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.31, n.3, p.367-373, 2007.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo geral**

Este trabalho foi conduzido com o objetivo de conhecer os processos envolvidos na fertilização artificial do curimatá, *Prochilodus lineatus* e otimizar o uso de gametas e seus reprodutores.

### **Objetivos específicos**

- I – Definir a qualidade espermática dos “pool’s” a serem utilizados nos experimentos
- II – Observar a influência que a relação, volume de sêmen:volume de água exerce sobre a ativação dos espermatozóides (duração da motilidade)
- III – Definir a temperatura ideal da solução ativadora
- IV – Determinar a melhor relação entre o número de espermatozóides.ovócito<sup>-1</sup> e o volume ideal de água empregados na fertilização artificial

## ARTIGO I

### MOTILIDADE ESPERMÁTICA DO SÊMEN DO CURIMBATÁ, *Prochilodus lineatus* EM RELAÇÃO AO VOLUME E A TEMPERATURA DA SOLUÇÃO ATIVADORA

#### RESUMO

A motilidade espermática é um fator chave para a determinação da qualidade do sêmen e sua capacidade de fertilização. Vários fatores influenciam a motilidade espermática como: espécie estudada, qualidade dos gametas, tipo, volume, temperatura e pH da solução ativadora. Assim sendo, o presente trabalho objetivou avaliar o efeito que a temperatura da solução ativadora e, a relação volume de sêmen:água exercem sob a duração da motilidade espermática. Foram utilizados 12 machos de curimbatá, *Prochilodus lineatus* com peso e comprimento padrão médio de  $405,83 \pm 134,20$  g,  $25,63 \pm 3,19$ cm, respectivamente. Os reprodutores receberam duas doses de extrato de hipófise de carpa (dose inicial de  $0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$  e final de  $5,0 \text{ mg.kg}^{-1}$ ). Do sêmen dos 12 machos foi realizado um “pool” e, analisada a concentração e o índice de sobrevivência espermática, bem como, a duração da motilidade espermática. Para o primeiro ensaio foi utilizado um delineamento experimental inteiramente casualizado e os tratamentos foram compostos pelos volumes de sêmen provenientes do “pool” e a água nas proporções de: 1:1, 1:2, 1:20, 1:200, 1:2000, 1:20000 e 1:100000 $\mu\text{L}$ , respectivamente. O segundo ensaio utilizou um delineamento experimental inteiramente casualizado os tratamentos foram constituídos por alíquotas de  $5\mu\text{L}$  do “pool” de sêmen e, adicionadas a  $200\mu\text{L}$  de solução ativadora nas seguintes temperaturas: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e  $50^{\circ}\text{C}$ . A duração da motilidade espermática do curimbatá, *P. lineatus* teve um comportamento linear ascendente em função do aumento da diluição a partir de 1:2 $\mu\text{L}$  sêmen:água (23,04s), até atingir o valor máximo estudado que foi de 1:100.000 $\mu\text{L}$  sêmen:água, com a duração da motilidade espermática de 28,83s Os melhores resultados de duração da motilidade espermática em função da temperatura da solução ativadora foram obtidos à temperatura de  $20^{\circ}\text{C}$ , a qual proporcionou uma duração média da motilidade de  $22,51 \pm 0,79$  segundos.

**Palavras-chave:** machos, ativação, espermatozóides, diluição



## ABSTRACT

Sperm motility is a key element to qualify semen and its fertilization capacity. Several factors act on sperm motility such as studied species, gametes quality, kind, volume, temperature and pH of activation swimming solution. That way, this study had as a goal evaluate the effect that the temperature of active solution and semen:water volume ratio exert on the sperm motility duration. Twelve male curimatás, *Prochilodus lineatus* with average weight and medium standard length of  $405,83 \pm 134,20$  g,  $25,63 \pm 3,19$ cm, respectively were used. Reproducers got two doses of pituitary extract from carp (initial dose of  $0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$  and final of  $5,0 \text{ mg.kg}^{-1}$ ). With the semen of those 12 male animals was made a pool and analysed its concentration and spermatoc survival index and also sperm motility duration. For the first analysis it was utilized an experimental design entirely randomized and treatments were composed by semen volume deriving from that pool and the water on the proportion of 1:1, 1:2, 1:20, 1:200, 1:2000, 1:20000 e 1:100000 $\mu\text{L}$ , respectively. The second analysis utilized an experimental delineation entirely randomized, treatment were composed by 5 $\mu\text{L}$  from the pool of the semen and added to a 200 $\mu\text{L}$  active solution on the following temperatures: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50°C. Sperm motility duration of "curimatá", *P. lineatus* had an ascendent linear behavior in function of dilution increasing from 1:2 $\mu\text{L}$  semen:water (23,04s), until it gets the maximum studied value that was 1:100.000 $\mu\text{L}$  semen:water with the sperm motility duration of 28,83s. Best results of sperm motility duration in function of active solution temperature were gotten in temperature of 20°C which provided a medium duration of motility of  $22,51 \pm 0,79$  seconds.

**Key words:** male animals, active, spermatozoids, dilution

## INTRODUÇÃO

O curimatá, *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) é conhecido também pelos nomes comuns de curimba, corimba, curimatá e corimatá, pertencente à Ordem dos Characiformes, à Família Prochilodontidae e ao Gênero *Prochilodus* (Nakatani et al., 2001). Sua distribuição geográfica ocorre nas Bacias do Prata e do rio Paraíba (Castro, 1990).

Por ser uma espécie reofílica, realiza migrações com fins reprodutivos. Estas migrações são sincronizadas com flutuações do nível da água e são disparadas pelo acréscimo da precipitação pluviométrica e aumento da temperatura e nível das águas (Kavamoto et al., 1996; Lowe-McConnell, 1999).

É um peixe bem consumido, principalmente nas cidades do interior paulista, devido ao maior percentual de captura e sabor de sua carne (Romagosa et al., 1985). Apresenta importância econômica e social para a pesca artesanal de subsistência e esportiva, além de apresentar carne saborosa (Barbieri et al., 2004).

Dentre as espécies de peixes com potencial para a aquicultura, o curimatá apresenta boa perspectiva de criação em cativeiro. Porém, tratando-se de uma espécie que não se reproduz naturalmente em ambientes estanques, necessita de ser induzida à reprodução através do emprego de hormônios gonadotrópicos (Borsato da Silva, 2000).

Apesar da tecnologia da reprodução do curimatá estar praticamente dominada, há necessidade de alguns estudos relacionados com o método de fertilização artificial, a qualidade dos gametas e suas relações com o sucesso da fertilização artificial ainda devem ser realizados.

A motilidade espermática é um dos parâmetros mais comuns e mais utilizados para se avaliar a qualidade dos espermatozoides. A simples estimativa visual do sêmen fresco, com auxílio de um microscópio é suficiente para avaliação parcial da qualidade do material fecundante (Kavamoto et al., 1986).

Em geral, o espermatozoide deve apresentar motilidade para efetivar a fertilização, embora em alguns casos possam apresentar motilidade mas não serem férteis. Normalmente, o espermatozoide é imóvel na região genital e é ativado em um meio externo após a diluição com um diluente apropriado (Billard et al., 1995).

Muitos fatores influenciam a duração da motilidade espermática, tais como o protocolo utilizado, a espécie estudada, tipo, volume, pH e temperatura da solução ativadora sendo que estes fatores variam de espécie para espécie (Billard et al., 1995).

A diluição é um fator determinante na caracterização da motilidade espermática, sendo a concentração e o volume do diluente os desencadeadores da ativação do sêmen (Marques, 2001). Níveis insuficientes ou irregulares de diluição não permitem aferir precisamente a duração da motilidade espermática (Billard et al, 1995).

A diluição seminal é um fator chave para o sucesso da reprodução artificial de peixes, pois, influencia a performance da motilidade espermática (Alavi e Cosson, 2005) a qual esta diretamente ligada ao sucesso da fertilização (Alavi et al., 2007).

Estudos recentes têm demonstrado que a taxa de diluição dos espermatozoides tem influencia sob a fertilização, pois, causa mudanças nos parâmetros da motilidade espermática como: velocidade, porcentagem de espermatozoides móveis e duração da motilidade espermática (Alavi et al., 2007).

Billard e Cosson (1992) constataram que o aumento ou decréscimo da temperatura influencia diretamente à duração da motilidade espermática, causando maior ou menor atividade celular, levando ao aumento ou decréscimo do consumo das reservas energéticas dos espermatozoides (Alavi e Cosson, 2005).

Com intuito de conhecer o efeito que a solução ativadora pode causar sobre a duração da motilidade espermática do curimatá, *Prochilodus lineatus*, este experimento foi realizado em três fases: (1) definir a qualidade espermática do “pool” a ser utilizado no experimento; (2) avaliar os efeitos de diferentes relações de diluição do sêmen ou volume de sêmen:volume de água sobre a duração da motilidade espermática; e (3) definir a temperatura ideal da solução ativadora.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado com reprodutores de curimatá, *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Figura 6), no Laboratório de Tecnologia da Reprodução dos Animais Aquáticos Cultiváveis - UNIOESTE, instalado no Centro de Pesquisas em Aqüicultura Ambiental - CPAA/IAP – Toledo/PR (Figuras 3 e 4), no mês de novembro de 2006.

Os peixes provenientes do Rio Paraná foram estocados durante o ano de 2005, no Centro de Pesquisa, em tanques escavados (em terra) de 200m<sup>2</sup> (Figura 5) e, renovação de água somente para compensar a perda por evaporação e infiltração. Os peixes foram alimentados com ração comercial extrusada com 32% de PB, duas vezes ao dia, às 8:00hs e 17:00hs.

Foram selecionados dentro do próprio tanque 12 machos de curimatá que liberavam pequenas quantidades de sêmen sob leve pressão abdominal (Figura 7) (Kavamoto et al., 1986a). Os animais selecionados foram transportados ao laboratório de reprodução (Figura 8).

Os reprodutores foram individualmente pesados, marcados e acondicionados em caixa d'água circular (1000L) e, renovação de água constante (Figura 9). Após este procedimento aplicou-se intraperitonealmente uma dose de 0,5mg de extrato de hipófise de carpa (EHC).kg de reprodutor<sup>-1</sup>. Doze horas após a primeira aplicação, foi aplicada uma segunda dose de 5mg EHC.kg de reprodutor<sup>-1</sup>. Após as aplicações a temperatura da água foi monitorada de hora em hora (Woynarovich e Horvath, 1983).

Os machos de curimatá, *P. lineatus* apresentaram valores médios de peso e comprimento padrão de 405,83 ± 134,20 g, 25,63 ± 3,19cm, respectivamente.

### **Fase 1: Qualidade espermática do “pool”**

A coleta dos gametas masculinos foi realizada após um período de 160 horas-grau ou unidades térmicas acumuladas (Woynarovich & Horvath, 1983). Os machos foram contidos e secos com panos e papel toalha e, aplicada massagem na região ventral do animal no sentido céfalo-caudal. A primeira gota de sêmen foi desprezada para evitar possível contaminação e, o restante foi com o auxílio de uma seringa descartável, com graduação de 0,1mL, para mensuração do volume de

sêmen liberado e da produção relativa de sêmen (Figura 10) (Bombardelli et al., 2006). O sêmen colhido dos 12 machos foi homogeneizado em um “pool” e armazenado sob resfriamento à 15°C.

Em seguida, foi mensurada a concentração espermática do sêmen. Para tanto, retirou-se uma amostra de 5µL de sêmen do “pool” descrito anteriormente, que foi diluído em 5mL de formol salina tamponado, resultando em uma diluição de 1:1000. Do material diluído e fixado anteriormente foi realizado o procedimento de contagem de células espermáticas em câmara hematimétrica de Neubauer (Mylonas et al., 1997).

Também, foi aferida a duração da motilidade espermática do “pool” de sêmen. Para a mensuração desta variável foi misturado 5µL de sêmen a 200µL de água e, concomitantemente a este evento, foi iniciada a contagem do tempo necessário para que aproximadamente 50% dos espermatozóides perdessem o movimento. Esta avaliação foi realizada por meio de microscópio óptico em objetiva 40X (Figura 11, 12 e 13).

Deste mesmo “pool” de sêmen foi determinado o índice de sobrevivência dos espermatozóides, a partir do método de coloração de nigrosina-eosina (Kavamoto e Fogli da Silveira, 1986). Para a mensuração do índice de sobrevivência, após a mistura e homogeneização do sêmen e os corantes, foram confeccionados dois esfregaço, em lâminas separadas. De cada lâmina foram contados pelo menos 400 espermatozóides, em microscópio de óptico (40x), sendo considerados vivos aqueles com coloração branca (impermeáveis ao corante) e, mortos, com vermelha ou rosada (permeáveis ao corante).

## **Fase 2: Efeito do volume do sêmen:volume de água na duração da motilidade espermática**

Foi utilizado um delineamento experimental inteiramente casualizado composto por sete tratamentos e três repetições. Os tratamentos foram compostos pelas relações entre volume de sêmen e volume de água empregada como solução ativadora de: 1:1, 1:2, 1:20, 1:200, 1:2000, 1:20000 e 1:100000 µL, respectivamente. Foi considerada como uma unidade experimental um recipiente plástico de 200mL, contendo sêmen ativado pelos diferentes volumes de solução ativadora.

Simultaneamente, à homogeneização do sêmen e da solução ativadora foi realizada a mensuração do tempo de ativação espermática, conforme descrito anteriormente.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e de regressão à nível de 5% de significância. O software utilizado para a realização das análises estatísticas foi *Statistica*® (Statsoft, 2005).

### **Fase 3: Efeito da temperatura da solução ativadora na duração da motilidade espermática**

Foi utilizado um delineamento experimental inteiramente casualizado composto por dez tratamentos e três repetições. Os tratamentos foram constituídos por alíquotas de 5 $\mu$ L do “pool” de sêmen (descrito anteriormente) e, adicionadas a 200 $\mu$ L de solução ativadora nas seguintes temperaturas: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50°C.

Após a mistura do sêmen e da solução ativadora foi mensurado o tempo de ativação espermática, conforme metodologia descrita anteriormente.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e de regressão à nível de 5% de significância. O software utilizado para a realização das análises estatísticas foi o *Statistica*® (Statsoft, 2005).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Fase 1: Qualidade espermática do “pool”**

A tabela 1 expressa os valores médios da produção seminal, concentração espermática, motilidade espermática, sobrevivência espermática e produção relativa de sêmen dos machos.

**Tabela 1.** Produção seminal e características seminais do “pool” de sêmen proveniente de 12 machos de curimatá, *Prochilodus lineatus*

<b>Parâmetros</b>	<b>Média ± DP</b>
Produção seminal (mL)	0,51 ± 0,35
Concentração de espermática (SPZ.mL-1)	2,95x10 <sup>10</sup> ± 2,0x10 <sup>9</sup>
Motilidade espermática (s)	23,47 ± 0,86
Sobrevivência espermática (%)	97,5 ± 0,07
Produção relativa de sêmen (mL.g-1)	0,0013 ± 0,0007

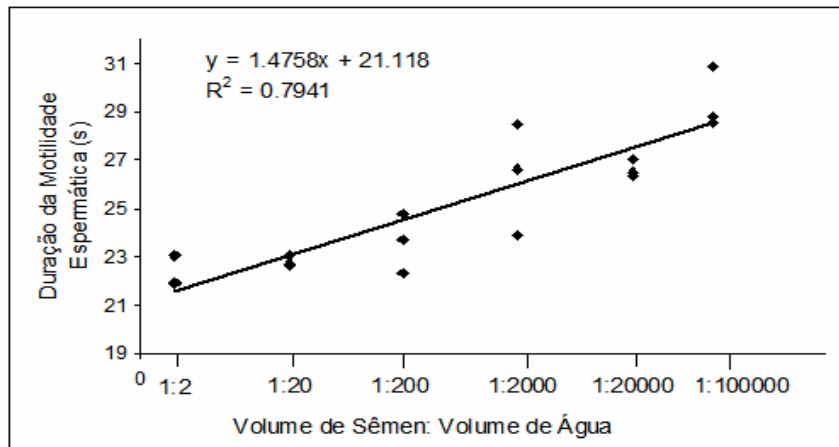
## **Fase 2: Efeito do volume do sêmen:volume de água na duração da motilidade espermática**

A Tabela 2 mostra os valores médios de duração da motilidade espermática do “pool” realizado com sêmen de 12 machos de curimatá, *P. lineatus* submetidos a diferentes relações de diluição durante o processo de ativação.

**Tabela 2.** Valores médios de duração da motilidade espermática do “pool” de sêmen de 12 machos de *P. lineatus* submetido a diferentes relações de diluição durante o processo de ativação

<b>Relações entre os volume de sêmen:volume de água</b>	<b>Duração da motilidade espermática (s) ± DP</b>
1:100000	28,83 ± 1,27
1:20000	27,02 ± 0,33
1:2000	28,51 ± 2,31
1:200	23,72 ± 1,24
1:20	22,62 ± 0,22
1:2	23,04 ± 0,67
1:1	-----

Os valores de duração da motilidade espermática (s) e as diferentes relações de volume de sêmen:volume de água utilizadas na ativação dos espermatozoides de curimatá estão expressos na Figura 1.



**Figura 1.** Duração da motilidade espermática do curimatá, *Prochilodus lineatus* utilizando-se diferentes relações de sêmen do volume de sêmen:volume de água para a ativação dos espermatozóides

Na menor diluição, 1:1µL sêmen:água não foi possível aferir a duração da motilidade espermática devido a não ativação de todos espermatozóides. Segundo Billard e Cosson (1992) é necessária uma diluição relativamente alta (acima de 1:1000) para que ocorra sincronizadamente a ativação de todos os espermatozóides.

Sob baixas diluições, não são ativados todos os espermatozóides e a ativação vai ocorrendo progressivamente por alguns minutos após a diluição. Este fato dificulta aferir corretamente a duração da motilidade espermática e pode explicar muitas discrepâncias encontradas na literatura (Billard et al., 1995).

Os resultados do presente experimento mostram uma relação diretamente proporcional ( $P < 0,05$ ) entre o tempo de ativação espermática e as relações de diluição seminal a partir do uso da água como solução ativadora (Figura 1).

A partir da diluição de 1:2µL sêmen:água (23,04s), a duração da motilidade espermática aumentou proporcionalmente com aumento da diluição até atingir o valor máximo estudado que foi de 1:100.000µL sêmen:água, com a duração da motilidade espermática de 28,83s.

Outros autores também estudaram o efeito da diluição do sêmen sob a motilidade espermática. Alavi et al. (2007) avaliaram as diluições de 1:25, 1:50 e 1:100µL sêmen:diluyente para a *Perca fluviatilis*, encontrando os melhores resultados na diluição de 1:50µL sêmen:diluyente. Alavi e Cosson (2005) avaliaram as diluições

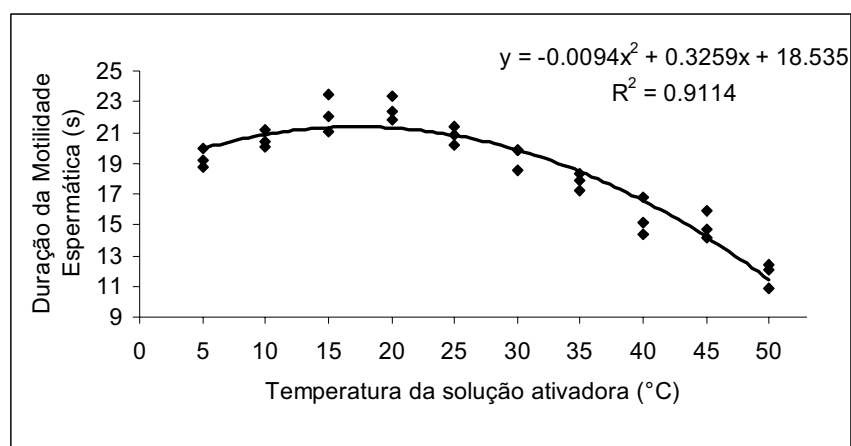


de 1:10, 1:50 e 1:200 $\mu$ L sêmen:dilúente para o esturjão persa, *Acipenser persicu* encontrando os melhores resultados nas diluições de 1:50 e 1:200 $\mu$ L sêmen:dilúente. Gallis et al, (1991) que também estudaram o efeito da diluição sobre a motilidade espermática observaram um aumento na motilidade e na diluição de 1:6 para 1:100 para o esturjão siberiano, *Acipenser baeri*.

As espécies de peixes acima citados quando comparadas aos peixes tropicais como, por exemplo, o curimatá apresenta motilidade sob baixas diluições devido às baixas concentrações de cátions inorgânicos no seu sêmen (Alavi et al., 2004).

### Fase 3: Efeito da temperatura da solução ativadora na duração da motilidade espermática

Os valores de duração da motilidade espermática (s), utilizando-se água como solução ativadora em diferentes temperaturas na ativação dos espermatozoides de curimatá, *P. lineatus* podem ser vistos na Figura 2.



**Figura 2.** Duração da motilidade espermática dos espermatozoides de curimatá, *P. lineatus* ativados, utilizando-se água em diferentes temperaturas

Os resultados de duração da motilidade espermática apresentaram um comportamento quadrático ( $P < 0,05$ ), com máximo desempenho teórico em termos de tempo de motilidade espermática para a temperatura de 17,34°C, promovendo uma duração da motilidade espermática de 21,36s (Figura 2).

A duração da motilidade espermática de *P. lineatus* aumentou proporcionalmente à temperatura da solução ativadora, a partir dos 5°C (19,34s) alcançando o ponto máximo aos 20°C (22,51s), depois, estes valores diminuem e passam a ter um comportamento inversamente proporcional ao aumento dos valores de temperatura da solução ativadora aos 50°C (11,77s).

Este comportamento da duração da motilidade ocorrer inversamente proporcional ao aumento da temperatura também foi registrado por Billard e Cosson (1992) para a truta arco-íris, Vladic e Jarvi (1997) para truta parda e salmão do Atlântico por Jezierska e Witeska (1999) para carpa comum e prateada e por Williot et al., (2000) para esturjão siberiano.

Segundo Billard e Cosson (1992) o aumento ou decréscimo da temperatura da solução ativadora tem influência direta na duração da motilidade espermática. Isto se deve ao fato que, à reserva energética dos espermatozóides dos peixes é limitada e conseqüentemente, o aumento da atividade celular espermática causado pelo aumento da temperatura da solução ativadora induz à uma redução na duração da motilidade espermática. Entretanto, uma redução na temperatura da solução ativadora resultará em um aumento da duração da motilidade espermática em função também, da redução no metabolismo celular dos espermatozóides (Alavi e Cosson, 2005).

Existem muitos outros fatores que influenciam a duração da motilidade espermática como a espécie estudada, a qualidade dos gametas, o tipo, volume e pH da solução ativadora e o protocolo utilizado, sendo que estes fatores ainda variam de espécie para espécie (Billard et al., 1995).

## CONCLUSÕES

A razão de diluição que proporcionou a maior duração da motilidade espermática do sêmen do curimatá, *P. lineatus* foi de 1:100.000µL sêmen:água, com a duração da motilidade espermática de 28,83s.

A temperatura da solução ativadora que proporcionou a maior duração da motilidade espermática do curimatá, *P. lineatus* foi de 20°C, a qual proporcionou uma duração média da motilidade de  $22,51 \pm 0,79$  segundos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAVI, S. M. H.; COSSON, J.; KARAMI, M.; AMIRI, B. M.; AKHOUNDZADEH, M. A. Spermatozoa motility in the Persian sturgeon, *Acipenser persicus*: effects of pH, dilution rate, ions and osmolality, **Reproduction**, v. 128, p. 819–828, 2004.

ALAVI, S. M. H. e COSSON, J. Sperm motility in fishes. I. Effects of temperature and pH: a review, **Cell Biology International**, v. 29, p. 101-110, 2005.

ALAVI, S. M. H.; RODINA, M.; POLICAR, T.; KOZAK, P.; PSENICKA, M.; LINHART, O. Semen of *Perca fluviatilis* L.: Sperm volume and density, seminal plasma indices and effects of dilution ratio, ions and osmolality on sperm motility, **Theriogenology**, v. 68, p. 276–283, 2007.

BARBIERI, G.; SALLES, F. A.; CESTAROLLI, M. A.; TEIXEIRA-FILHO, A. T. Estratégias reprodutivas do dourado, *Salminus maxillosus* e do curimatã, *Prochilodus lineatus* no Rio Mogi Guaçu, Estado de São Paulo, com ênfase nos parâmetros matemáticos da dinâmica populacional. Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Pirassununga. **Acta Scientiarum - Biological Sciences**, Maringá, v. 26, n. 2, p. 169-174, 2004.

BILLARD, R. e COSSON, M. P. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. **J. Exp. Zoo.** v. 261, p. 122-131, 1992.

BILLARD, R.; COSSON, M. P.; PERCHEC, G.; LINHART, O. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 129, p. 95-112, 1995.

BOMBARDELLI, R. A.; MÖRSCHBÄCHER, E. F.; CAMPAGNOLO, R. et al. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy e Gaimard, 1824). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viscosa, v.35, n.4, p.1251-1257, 2006.

BORSATO DA SILVA, E. **Avaliação comparativa da utilização do sêmen criopreservado e fresco na fertilização dos óvulos de curimatá (*Prochilodus lineatus*) (Valenciennes, 1836)**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2000. 58p. Dissertação (Mestrado em aqüicultura) – Universidade Federal de Santa Catarina, 2000.

CASTRO, R. M. C. **Revisão Taxonômica da Família Prochilodontidae (Ostariophysi: Characiformes)**. 1990. 293 f., il. + 43 figs. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1990.

GALLIS J. L.; FEDRIGO, E.; JATTEAU, P.; BONPUNT, E.; BILLARD R. Siberian sturgeon spermatozoa: effects of dilution, pH, osmotic pressure, sodium and potassium ions on motility. In: Williot P, editor. **Acipenser**. Bordeaux: Cemagref; p. 143-51, 1991.

JEZIERSKA B. e WITESKA M. 1999. THE EFFECT OF TIME AND TEMPERATURE ON MOTILITY OF SPERMATOZOA OF COMMON AND GRASS CARP **Electronic Journal of Polish Agricultural Universities**, Fisheries, Volume 2, Issue 2. Available Online <http://www.ejpau.media.pl/series/volume2/issue2/fisheries/art-04.html>

KAVAMOTO, E. T. e FOGLI DA SILVEIRA, W. Características físicas, químicas e microscópicas do sêmen do bagre, *rhamdia hylarri* (Valenciennes, 1840) em condições de campo. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v.13, n. 1, p.95-100, 1986.

KAVAMOTO, E. T.; FOGLI DA SILVEIRA, W.; GODINHO, H. M. Características seminais do curimatá *Prochilodus scrofa*, Steindachner 1881. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v.13, n. 2, p 45-50, 1986a.

KAVAMOTO, E. T.; NARAHANA, M. Y.; MAINARDES-PINTO, C. S. R.; ANDRADE-TALMELLI, E. F.; ROMAGOSA, E.; FERRAZ, E. M.; Efeito do HCG na produção de sêmen do curimatá *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881). **Revista Ceres**, v. 43, n. 245, p. 76-85, 1996.

LOWE-MCCONNELL, R. H. **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**. São Paulo; Edusp; 1999, 534 p.

MARQUES, S. **Preservação a curto prazo do sêmen de teleósteos neotropicais de água doce**. Belo Horizonte: Pontifícia Universidade Católica, 2001. 98p. Dissertação (Mestrado de Zoologia de Vertebrados) - Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, 2001.

MYLONAS, C. C.; GISSIS. A.; MAGNUS, Y. et al. Hormonal changes in male white bass (*Morone chrysops*) and evaluation of milt quality after treatment with a sustained-release GnRHa delivery system. **Aquaculture**, The Netherlands, v.153, p.301-311, 1997.

NAKATANI, K.; AGOSTINHO, A. A.; BAUMGARTNER, G. et al. **Ovos e Larvas de Peixes de Água Doce**. Maringá: EDUEM, 2001. 378p.

ROMAGOSA, E.; NARAHARA, M. Y.; GODINHO, H. M. Tipo de desova do curimatã, *Prochilodus scrofa* Staind. 1881, do rio Mogi-Guaça, Pirassununga, São Paulo. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 12, n. 4, p. 1-5, 1985.

STASOFT. INC. **Statistica (data analysis software system)**. version 7.1. Tulsa, USA, 2005.

VLADIC, T. e JARVI, T. Sperm motility and fertilization time span in Atlantic salmon and brown trout—the effect of water temperature, **Journal of Fish Biology**, v. 50, p. 1088–1093, 1997.

WILLIOT, P.; KOPEIKA, E. F.; GONCHAROV, B. F. Influence of testis state, temperature and delay in semen collection on spermatozoa motility in the cultured Siberian sturgeon (*Acipenser baeri* Brandt). **Aquaculture**, v. 189 p. 53-61, 2000.

WOYNAROVICH, E.; HORVATH, L. **A propagação artificial de peixes de águas tropicais: manual de extensão**. Brasília: Escopo. 1983. 220p. Tradução de Vera Lucia Mixtra Chama de "The Artificial Propagation of Warm - Water Fin fishes – A Manual for Extension".

## FIGURAS



**Figura 3.** Vista aérea do Centro de Pesquisas em Aquicultura Ambiental - CPAA/IAP – Toledo/PR. Fonte: Google Earth (2007).



**Figura 4.** Laboratório e tanques do CPAA/IAP



**Figura 5.** Tanques das matrizes



**Figura 6.** Reprodutor de curimatá curimatá (*Prochilodus lineatus*) utilizado no experimento



**Figura 7.** Seleção dos reprodutores de curimatá





**Figura 8.** Laboratório de reprodução



**Figura 9.** Caixas onde foram acondicionadas as matrizes



**Figura 10.** Coleta de sêmen com auxílio de seringa descartável



**Figura 11.** Sêmen (5 $\mu$ L) e água (200 $\mu$ L) utilizados para aferir a motilidade espermática



**Figura 12.** Homogeneização do sêmen e água (ativação dos espermatozoides)



**Figura 13.** Coleta do sêmen e água homogeneizados para leitura em microscópio sob lâmina de vidro

## ARTIGO II

### INTERAÇÃO ENTRE O NÚMERO DE ESPERMATOZÓIDE.OVÓCITO<sup>-1</sup> E O VOLUME DE ÁGUA EMPREGADO NA FERTILIZAÇÃO ARTIFICIAL DE OVÓCITOS DE CURIMBATÁ, *Prochilodus lineatus*

#### RESUMO

Estudos sobre a fertilização artificial de curimbatá, *Prochilodus lineatus* visando à otimização do uso de reprodutores e técnicas que permitam a máxima eficiência deste processo vêm sendo desenvolvidos no Brasil desde a década de 70. Deste modo, o presente trabalho objetivou determinar a melhor relação entre número de espermatozóides.ovócito<sup>-1</sup> e volume ideal de água empregados no momento da fertilização artificial do curimbatá. Foram utilizados 30 machos e 30 fêmeas de curimbatá com peso médio e comprimento padrão médio de 895,00 ± 431,00 g e 32,07 ± 6,25 cm e 1046,33 ± 417,50 g e 33,87 ± 5,41 cm, respectivamente. Machos e fêmeas receberam duas doses de extrato de hipófise de carpa (dose inicial de 0,5 mg.kg<sup>-1</sup> e final de 5,0 mg.kg<sup>-1</sup>). Do sêmen dos machos foi realizado um “pool” do qual foi analisado a concentração e o índice de sobrevivência espermática bem como a duração da motilidade espermática. No ensaio de fertilização, utilizou-se um delineamento experimental em estrutura fatorial 5X5X2, sendo os tratamentos constituídos pelas relações de número de espermatozóides.ovócito<sup>-1</sup> de 6x10<sup>3</sup>, 6x10<sup>4</sup>, 6x10<sup>5</sup>, 6x10<sup>6</sup>, 10x10<sup>6</sup> espermatozóides.ovócito<sup>-1</sup> e os volumes de água de 1, 25, 50, 75, 100 e 125 mL de água.2ml de ovócitos<sup>-1</sup>, respectivamente. Após 8 horas de incubação, foram analisadas as taxas de fertilização para cada tratamento. As variáveis quantidades de água e de espermatozóides não apresentaram interação significativa entre si e o período de coleta também não teve influencia significativa. A relação de espermatozóide.ovócito<sup>-1</sup> para o curimbatá, *P. lineatus*, que proporcionou a melhor taxa de fertilização foi de 1.007.660 espermatozóide.ovócito<sup>-1</sup> e, o volume ideal de água foi de 105,5mL de água.2mL de ovócitos<sup>-1</sup>, produzindo taxas máximas de 94,77% de fertilização.

**Palavras-chave:** dosagem inseminante, sêmen, ativação, motilidade

## ABSTRACT

Studies about "curimbatá" artificial fertilization, *Prochilodus lineatus* aiming optimization of reproducers use and technics than allow maximum efficiency of this process are being developed in Brazil since the 70's. This study aimed establish the best relation between spermatozoa.egg<sup>-1</sup> number and ideal water volume used in the moment of "curimbatá" artificial fertilization. It was used 30 males and 30 females of "curimbatá" with médium weight and medium standard length of 895,00 ± 431,00 g and 32,07 ± 6,25 cm e 1046,33 ± 417,50 g e 33,87 ± 5,41 cm, respectively. Males and females got two doses of pituitary extract from carp (inicial dose of ,5 mg.kg<sup>-1</sup> and final of 5,0 mg.kg<sup>-1</sup>). From male semen it was made a pool which was analyzed the concentration and spermatoc survival index such as sperm motility duration. In fertilization analysis it was utilized an experimental delineation in factorial arrangement 5X5X2, being the treatments compound by relation of numbers of spermatozoa.egg<sup>-1</sup> of 6x10<sup>3</sup>, 6x10<sup>4</sup>, 6x10<sup>5</sup>, 6x10<sup>6</sup>, 10x10<sup>6</sup> spermatozoa.egg<sup>-1</sup> and the water volume of 1, 25, 50, 75, 100 e 125 mL of water. 2ml of egg<sup>-1</sup>, respectively. Fertilization rates for each treatment were analyzed after 8 hours of incubation. Both amount of water and spermatozooids did not show significative interaction and the period of semen collection also did not have significative influence. Epermatzoa.egg<sup>-1</sup> relation for "curimbatá", *P. lineatus*, that provided the best fertilization rates was 1.007.660 spermatozoa.egg<sup>-1</sup> and the ideal water volume were 105,5mL of water. 2mL de egg<sup>-1</sup>, producing maximum fertilization rates of 94,77%.

Key words: activation swimming solution, semen, active, motility

## INTRODUÇÃO

Apesar da tecnologia da reprodução do curimatá estar praticamente dominada, muitos são os fatores limitantes durante o processo reprodutivo, dentre eles, a qualidade do material fecundante (Rurangwa et al., 2004), o emprego adequado das relações de número de espermatozoides.ovócito<sup>-1</sup> (Bombardelli et al., 2006; Shimoda et al., 2007) e o volume de água empregado no processo de fertilização artificial (Chereguini et al., 1999).

A técnica de inseminação artificial tradicionalmente empregada para espécies de peixes nativos brasileiro em fazendas, consiste simplesmente, na homogeneização dos espermatozoides e ovócitos em um meio externo (água doce ou salgada, ou outras soluções ativadoras) (Marques, 2001). Entretanto, a eficiência desta técnica é limitada, particularmente, no que se refere à estimativa das taxas de fertilização e à economia de gametas, pois, o esperma de um único macho pode fertilizar 1 a 5 fêmeas (Bart e Dunham, 1996; Chereguini et al., 1999; Marques, 2001; Shimoda et al., 2007).

A relação ótima de espermatozoides.ovócitos<sup>-1</sup> pode ser utilizada para determinar o número ideal de machos e fêmeas necessários para a fertilização artificial (Tarnbasen-Cheong et al., 1995) proporcionando assim à otimização do número de reprodutores (Marques, 2001).

Outro fator importante é o volume de solução ativadora a ser adicionada, pois, a inclusão de grandes volumes de solução ativadora pode causar a diluição do sêmen diminuindo assim, a possibilidade dos espermatozoides encontrarem a micrópila, no momento da fertilização. Da mesma forma, a inclusão de volumes de solução ativadora insuficientes, reduz o sucesso na fertilização artificial, pois, pode causar a obstrução da micrópila pelo muco ovariano ou até mesmo pelo contato entre ovócitos além de, prejudicar a ativação dos espermatozoides (Woynarovich e Horváth, 1983; Ninhaus-Silveira et al., 2000; Shimoda et al., 2007; Zaniboni-Filho e Weingartner, 2007).

Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo determinar a melhor relação entre o número de espermatozoides.ovócito<sup>-1</sup> e o volume ideal de água empregados na fertilização artificial do curimatá, *Prochilodus lineatus* bem como avaliar os efeitos e as possíveis interações.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado com reprodutores de curimatã, *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Figura 5), no Laboratório de Tecnologia da Reprodução dos Animais Aquáticos Cultiváveis - UNIOESTE, instalado no Centro de Pesquisas em Aqüicultura Ambiental - CPAA/IAP – Toledo/PR (Figuras 2 e 3), nos meses de novembro e dezembro de 2006.

Os peixes provenientes do Rio Paraná foram estocados durante o ano de 2005, no Centro de Pesquisa, em tanques escavados (em terra) de 200m<sup>2</sup> (Figura 4) e, renovação de água somente para compensar a perda por evaporação e infiltração. Os peixes foram alimentados com ração comercial extrusada com 32% de PB, duas vezes ao dia as 8:00hs e 17:00hs.

Foram selecionadas, 30 fêmeas que apresentavam abdômen abaulado e macio (Figura 6), papila urogenital avermelhada e levemente proeminente e ovócitos de tamanhos homogêneos (Godinho et al., 1984) e 30 machos que liberavam pequenas quantias de sêmen sob leve pressão abdominal (Kavamoto et al., 1986a). Os animais selecionados foram transportados para o laboratório de reprodução (Figura 7).

Os reprodutores foram individualmente pesados, marcados e separados por sexo, em caixas d'água circular (1000L) e, renovação de água constante (Figura 8). A 1ª dosagem (0,5mg de extrato de hipófise de carpa (EHC).kg de reprodutor<sup>-1</sup>) e a 2ª dose (5,0mg de EHC.kg de reprodutor<sup>-1</sup>) foram aplicadas intraperitonealmente, para as fêmeas e machos, respectivamente. O intervalo entre as duas doses foi de 12h. Após as aplicações hormonais a temperatura da água foi monitorada de hora em hora (UTA=h°C) (Woynarovich e Horvath, 1983).

Os machos e fêmeas de *P. lineatus* apresentaram valores médios de pesos e comprimentos padrão de 895,00±431,00g, 32,07±6,25cm e 1046,33±417,50g, 33,87±5,41cm, respectivamente.

Assim, após 160 horas-grau, os machos foram contidos e secos com panos e papel toalha e, aplicada massagem na região ventral do animal no sentido encéfalo-caudal. A primeira gota de sêmen foi desprezada para evitar possível contaminação e, o restante foi coletado com auxílio de seringa descartável, com graduação de

0,1mL, para mensuração do volume de sêmen liberado e da produção relativa de sêmen (Figura 9) (Bombardelli et al., 2006).

O sêmen colhido dos 3 machos foi homogeneizado em um “pool” e armazenado sob resfriamento à 15°C.

Em seguida, foi mensurada a concentração espermática do sêmen. Para tanto retirou-se uma amostra de 5µL de sêmen do “pool” descrito anteriormente, que foi diluído em 5mL de formol salina tamponado, resultando em uma diluição de 1:1000. Do material diluído e fixado anteriormente foi realizado o procedimento de contagem de células espermáticas em câmara hematimétrica de Neubauer (Mylonas et al., 1997).

Também, foi aferida a duração da motilidade espermática do “pool” de sêmen. Para a mensuração desta variável foi misturado 5µL de sêmen a 200µL de água e, concomitantemente a este evento, foi iniciada a contagem do tempo necessário para que aproximadamente 50% dos espermatozóides perdessem o movimento. Esta avaliação foi realizada por meio de microscópio óptico em objetiva 40X.

Deste mesmo “pool” de sêmen foi determinado o índice de sobrevivência dos espermatozóides, a partir do método de coloração de nigrosina-eosina (Kavamoto e Fogli da Silveira, 1986). Para a mensuração do índice de sobrevivência, após a mistura e homogeneização do sêmen e os corantes, foram confeccionados dois esfregaços, em lâminas separadas. De cada lâmina foram contados pelo menos 400 espermatozóides, em microscópio óptico (40x), sendo considerados vivos aqueles com coloração branca (impermeáveis ao corante) e, mortos com coloração vermelha ou rosada (permeáveis ao corante).

As fêmeas de *P. lineatus* apresentaram a produção total e relativa de ovócitos de  $182.186 \pm 56.853$  e  $166,17 \pm 30,64$  ovos.g<sup>-1</sup>, respectivamente.

Após 160 UTA, as fêmeas foram extrusadas de forma idêntica aos machos e seus ovócitos coletados em placas de petri (Figura 10). Logo após, foram colhidas e contadas três amostras de 0,1mL de ovócitos não hidratados para se estimar o número total de ovócitos utilizados em cada unidade experimental.

Após determinar o número relativo de ovócitos e a concentração espermática do “pool” de sêmen, foram colhidas, separadamente, cinco amostras de 2mL de ovócitos não hidratados e sobre estes adicionadas às respectivas doses inseminantes para realização dos ensaios de fertilização.

As desovas foram realizadas em grupos (3 machos e 3 fêmeas) em esquema fatorial. Assim, por desova foram utilizados 10mL de ovócitos não hidratados, os quais foram misturados ao sêmen, fertilizados e distribuídos em 5 incubadoras experimentais confeccionadas em PVC, com formato cônico e de volume útil de 2,5L (Figura 12).

Utilizou-se um delineamento experimental em estrutura fatorial 5X5X2, sendo os tratamentos constituídos pelas doses inseminantes ou relações de número de espermatozóides.ovócito<sup>-1</sup> de 6x10<sup>3</sup>, 6x10<sup>4</sup>, 6x10<sup>5</sup>, 6x10<sup>6</sup>, 10x10<sup>6</sup> espermatozóides.ovócito<sup>-1</sup> e os volumes de água de 1, 25, 50, 75, 100 e 125mL de água, respectivamente.

Foi considerado como uma unidade experimental um recipiente plástico de 250mL de volume útil contendo 2mL de ovócitos não hidratados e fertilizados com as respectivas relações espermatozóides.ovócitos<sup>-1</sup> e volumes de água.

As fertilizações foram realizadas seqüencialmente em recipientes plásticos descartáveis de 250mL onde foram colocadas às amostras de ovócitos e sêmen (Figura 11) até receberem a solução ativadora (água da incubadora, proveniente de poço artesianos). Após a adição da água os copos eram movimentados em sentido circular por um minuto para a homogeneização do material fertilizante. Em seguida, foi completado o volume total dos recipientes com água, onde os ovos fertilizados permaneceram por um período de três minutos para sofrerem a hidratação.

A água das incubadoras foi mantida aquecida em 27,0±1,0°C com o auxílio de resistência elétrica e termostato. As taxas de fertilização foram mensuradas 8 horas após fertilização dos ovos, em microscópio (10X), utilizando-se aproximadamente 380 ovos de cada unidade experimental, amostra esta superior ao mínimo (260 ovos) recomendado por Zaniboni Filho (1992).

Após inspeção gráfica dos resultados, as possíveis influências do período de coleta ( $T$ ), da quantidade de água ( $A$ ) e de espermatozóides ( $\text{Log}_{10}(E)$ ) sobre a fertilização ( $F$ ) dos ovos de curimatá foram avaliadas através do protocolo de regressão do modelo de superfície de resposta do *software Statistica*® (Statsoft, 2005):

$$F = \alpha_0 + \alpha_1 T + \alpha_2 A + \alpha_3 \text{Log}_{10}(E) + \alpha_4 A * \text{Log}_{10}(E) + \alpha_5 \text{Log}_{10}(A) + \alpha_6 [\text{Log}_{10}(E)]^2 + \mu$$

onde  $\alpha_i$  são os parâmetros e  $\mu \sim N(0, \sigma^2)$ , sendo removidos progressivamente os termos de ordens superiores não significativos ( $p > 0,05$ ) pelo método *backward stepwise*. Os pressupostos foram checados nos resíduos conforme sugerido em Myers (1990).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 mostra os valores médios das características de qualidade espermática do “pool” de sêmen.

**Tabela 1.** Valores médios das características reprodutivas do “pool” realizado com o sêmen de 30 machos de curimatá, *Prochilodus lineatus*

Variável	Média $\pm$ DP
Produção seminal (mL)	3,32 $\pm$ 2,69
Concentração de espermática (SPZ.mL <sup>-1</sup> )	2,21x10 <sup>10</sup> $\pm$ 5,57x10 <sup>9</sup>
Duração da motilidade espermática (s)	23,92 $\pm$ 3,23
Sobrevivência espermática (%)	97,91 $\pm$ 1,36
Produção relativa de sêmen (mL.g <sup>-1</sup> )	0,0037 $\pm$ 0,0019

Neste estudo a concentração espermática do “pool” ficou acima dos valores encontrados por Streit Jr. et al., (2004) de 1,40x10<sup>10</sup> SPZ.mL<sup>-1</sup> e Kavamoto et al. (1989) de 1,95x10<sup>10</sup> SPZ.mL<sup>-1</sup> e, inferiores aos valores citados por Kavamoto et al. (1997) de 3,29x10<sup>10</sup> SPZ.mL<sup>-1</sup> e Kavamoto et al. (1986a) de 3,06x10<sup>10</sup> SPZ.mL<sup>-1</sup>.

São muitos os fatores que podem influenciar a concentração espermática dos peixes tropicais de água doce, dentre eles, a aplicação ou não de hormônios indutores (Kavamoto et al., 1989), tipo de hormônio aplicado (Streit Jr. et al., 2004), número de doses hormonais (Kavamoto et al., 1996), intervalo de tempo entre as aplicações de hormônio (Castagnolli e Cyrino, 1980), período de coleta dos gametas (Kavamoto et al., 1997), idade dos reprodutores (Kavamoto et al., 1996a), entre outros.

A duração da motilidade espermática do *P. lineatus* verificadas neste experimento, contradiz os mencionados por Murgas et al., (2007) que foram de 85  $\pm$  11,18 segundos, quando analisaram a mesma espécie mas, utilizaram um protocolo diferenciado para aferir este parâmetro. Os autores utilizaram como solução ativadora, água destilada e aferiram à duração da motilidade espermática quando



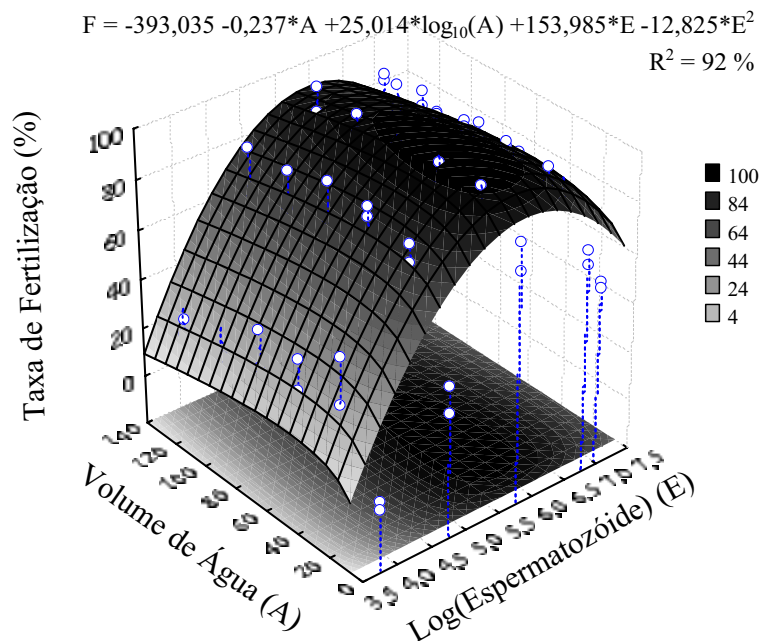
10% das células espermáticas apresentavam motilidade enquanto, nosso estudo utilizou água da incubadora (proveniente de nascente) e considerou 50% destas células, tornando-se praticamente impossível compará-los.

Além do protocolo utilizado, outros fatores que podem influenciar à duração da motilidade espermática são: espécie estudada, tipo, volume temperatura e pH da solução ativadora (Billard et al., 1995).

Os valores encontrados para a sobrevivência espermática de *Prochilodus lineatus* foram superiores aos encontrados por Kavamoto et al., (1996) de  $93,84 \pm 1,86$  % e Kavamoto et al., (1996a) de  $93,73 \pm 1,95$  % que também, avaliaram o curimbatá.

As diferentes quantidades de água e de espermatozóides empregados na fertilização artificial dos ovócitos de *P. lineatus* influenciaram significativamente ( $p < 0,0001$ ) na fertilização, de forma quadrática (Figura 1). Contudo, as variáveis em estudo não apresentaram efeito interativo ( $P > 0,05$ ), ou seja, o efeito que o volume de água exerceu sobre a taxa de fertilização independe da quantidade de espermatozóides utilizados e, vice-versa.

Além disso, o intervalo de tempo entre os protocolos de fertilização ou o período de coleta no experimento não apresentou efeito significativo ( $p > 0,05$ ). Assim, os dois grupos de dados foram submetidos ao mesmo modelo estatístico que, responderam por 92 % da variabilidade total observada e, apresentada na Figura 1.



**Figura 1.** Projeção tridimensional do modelo de superfície de resposta ajustado para prever a taxa de fertilização do curimatá em função do volume de água e do número de espermatozoides (transformação logarítmica) utilizadas na reprodução artificial. Pontos vazados representam os tratamentos.

A relação de espermatozóide.ovócito<sup>-1</sup> que proporcionou a melhor taxa de fertilização foi de 1.007.660 (1,0x10<sup>6</sup>) e, o volume ideal de água foi de 105,5mL de água.2mL de ovócitos<sup>-1</sup>, o que produziu taxa máxima de fertilização de 94,77%.

Borsato da Silva (2000), utilizou sêmen criopreservado de curimatá para estimar a capacidade de fertilização e, verificou que 0,06 mL de sêmen foi suficiente para fertilizar 15g de ovócitos. Entretanto, quando foi utilizado 20g de ovócitos fertilizados com a mesma quantidade de sêmen pode-se verificar uma redução significativa das taxas de fertilização. Segundo o autor, este resultado sugere a existência de uma relação ideal entre número de espermatozóide.ovócitos<sup>-1</sup> a serem utilizados durante o processo de fertilização a fim de se obter melhores resultados.

Outras pesquisas também foram realizadas visando otimizar o emprego dos reprodutores no processo de fertilização artificial encontrando doses inseminantes ideais para as espécies, como 1,25x10<sup>5</sup> espermatozoides.ovócito<sup>-1</sup> para o bagre do canal (*Ictalurus sp.*) com aproximadamente 80% de fertilização (Bart e Dunham, 1996), 15x10<sup>3</sup> espermatozóide.ovócito<sup>-1</sup> para o bagre africano (*Clarias gariepinus*) com aproximadamente 80% de fertilização (Rurangwa et al., 1998), acima de 9x10<sup>3</sup>

espermatozóide.ovócito<sup>-1</sup> para turbot (*Scopthalmus maximus*) com fertilização acima de 70% (Chereguini et al., 1999),  $23,67 \times 10^3$  espermatozoides. ovócito<sup>-1</sup> para a carpa comum (*Ciprinus carpio*) com fertilização acima de 80% (Linhart et al., 2003),  $8,95 \times 10^4$  espermatozóide.ovócito<sup>-1</sup>, para jundiá-cinza (*Rhamdia quelen*) com fertilização de 86,68% (Bombardelli et al., 2006),  $314,428 \times 10^3$  espermatozoides. ovócito<sup>-1</sup> para a piabanha (*Brycon insignis*) com fertilização de 88% (Shimoda et al., 2007).

Devido à alta concentração de células espermáticas em um pequeno volume de sêmen, fertilizar um grande número de óvulos é muitas vezes dificultado com o sêmen não diluído Borsato da Silva (2000). Bart e Dunham (1996) que estudaram a influência do volume de água empregado na ativação de ovócito do bagre do canal, *Ictalurus punctatus* e, observaram que essa relação quando empregada corretamente acarreta no aumento das taxas de fertilização.

Weingartner e Zaniboni (2006) estudaram a influência do volume da água na ativação do espermatozóide no momento da fertilização dos óvulos de dourado, *Salminus maxillosus*, e desenvolveram um novo protocolo que gerou um aumento significativo nas taxas de fertilização.

Baldisserotto e Gomes (2005) recomendam para o curimatá a quantidade de água de 10 a 20% do volume de ovos que se deseja fertilizar, valor este muito inferior ao encontrado no presente trabalho.

Kavamoto et al., (1986a) sugeriram que as diferenças encontradas entre os resultados obtidos para *P. lineatus* em relação a outras, devam-se talvez ao caráter específico de cada uma, sua posição taxonômica, idade e a fatores ambientais, sugerindo, que se desenvolvam estudos durante todo o ciclo de vida de cada espécie e, particularmente, em indivíduos adultos de idade conhecida, para melhor selecionar bons reprodutores.

## CONCLUSÕES

A relação de espermatozóide.ovócito<sup>-1</sup> para o curimatá, *Prochilodus lineatus*, que proporcionou a melhor taxa de fertilização foi de 1.007.660 (1,0x10<sup>6</sup>) espermatozóide.ovócito<sup>-1</sup> e, o volume ideal de água foi de 105,5mL de água.2mL de ovócitos<sup>-1</sup>, produzindo taxas máximas de 94,77% de fertilização.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALDISSEROTTO, B. e GOMES, L. C. **Espécies nativas para a piscicultura no Brasil** Santa Maria: Ed. UFSM, 2005. 468 p.

BART, A. N. e DUNHAM, R. A. Effects of sperm concentration and egg number on fertilization efficiency with channel catfish (*Ictalurus punctatus*) eggs and blue catfish (*I. furcatus*) spermatozoa. **Theriogenology**. v. 45, p. 673-682, 1996.

BILLARD, R.; COSSON, M. P.; PERCHEC, G.; LINHART, O. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 129, p. 95-112, 1995.

BOMBARDELLI, R.A.; MÖRSCHBÄCHER, E.F.; CAMPAGNOLO, R. et al. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy e Gaimard, 1824). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viscosa, v.35, n.4, p.1251-1257, 2006.

BORSATO DA SILVA, E. **Avaliação comparativa da utilização do sêmen criopreservado e fresco na fertilização dos óvulos de curimatá (*Prochilodus lineatus*) (Valenciennes, 1836)**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2000. 58p. Dissertação (Mestrado em aqüicultura) – Universidade Federal de Santa Catarina, 2000.

CASTAGNOLLI, N. e CYRINO, J. E. P. Desova induzida do Curimatá, *Prochilodus scrofa* Steindachner 1881 (Pisces, Prochilodontidae). **Ciência e Cultura**, v. 32 n. 9, p. 1245-1253, set. 1980.

CHEREGUINI, O.; DE LA BANDA, I.G.; RASINES, I. et al. Artificial fertilization in turbot, *Scophthalmus maximus*, (L.): different methods and determination of the optimal sperm-egg ratio. **Aquaculture Research**, Amsterdam, v. 30, p. 319-324, 1999.

GODINHO, H.M.; ROMAGOSA, E.; CESTAROLLI, M.A. et al. Reprodução induzida de curimatá *Prochilodus scrofa* Steind., 1881 sob condições de cultivo experimental. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 8, n. 2, p. 113-119, 1984.

KAVAMOTO, E. T. e FOGLI DA SILVEIRA, W. Características físicas, químicas e microscópicas do sêmen do bagre, *rhamdia hylarri* (Valenciennes, 1840) em condições de campo. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 13, n. 1, p. 95-100, 1986.

KAVAMOTO, E. T.; FOGLI DA SILVEIRA, W.; GODINHO, H. M. Características seminais do curimatá *Prochilodus scrofa*, Steindachner 1881. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 13, n. 2, p. 45-50, 1986a.

KAVAMOTO, E. T.; FOGLI DA SILVEIRA, W.; GODINHO, H. M.; ROMAGOSA, E. Fertilização em *Prochilodus scrofa* Steindachner 1881, com sêmen criopreservado em nitrogênio líquido. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 16, n.1, p. 29-36, 1989.

KAVAMOTO, E. T.; NARAHANA, M. Y.; MAINARDES-PINTO, C. S. R.; ANDRADE-TALMELLI, E. F.; ROMAGOSA, E.; FERRAZ, E. M.; Efeito do HCG na produção de sêmen do curimatá *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881). **Revista Ceres**, v. 43, n. 245, p. 76-85, 1996.

KAVAMOTO, E. T.; FERRAZ, E. M.; ANDRADE-TALMELLI, E. F.; MAINARDES-PINTO, C. S. R.; ROMAGOSA, E.; NARAHANA, M. Y.; BARNABE, V. H.; CAMPOS, B. E. S. Estimulação da espermição em curimatá *Prochilodus scrofa* (Steindachner) através de aplicações de HCG (Osteichthyes, Characiformes, Prochilodontidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, Viçosa, v. 13, n. 1, p. 27-38, 1996a.

KAVAMOTO, E. T.; MAINARDES-PINTO, C. S. R.; ANDRADE-TALMELLI, E. F.; CAMPOS, B. E. S. Produção espermática do curimatá *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 24, p. 73-78, 1997.

LINHART, O.; RODINA, M.; GCLA, D. et al. Improvement of common carp artificial reproduction using enzyme for elimination of eggs stickiness. **Aquatic Living Resources**, n. 16, p. 450-456, 2003.

MARQUES, S. **Preservação a curto prazo do sêmen de teleósteos neotropicais de água doce**. Belo Horizonte: Pontifícia Universidade Católica, 2001. 98p. Dissertação (Mestrado de Zoologia de Vertebrados) - Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, 2001.

MURGAS, L. D. S.; MILIORINI, A. B.; FREITAS, R. T. F.; PEREIRE, G. J. M. P. Criopreservação do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) mediante adição de diferentes diluidores, ativadores e crioprotetores. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Visçosa, v.36, n.3, p.526-531, 2007.

MYERS, R.H. **Classical and modern regression with applications**. 2<sup>a</sup> ed., Belmont: Duxbury Press, 1990.

MYLONAS, C. C.; GISSIS. A.; MAGNUS, Y. et al. Hormonal changes in male white bass (*Morone chrysops*) and evaluation of milt quality after treatment with a sustained-release GnRHa delivery system. **Aquaculture**, The Netherlands, v.153, p.301-311, 1997.

NINHAUS-SILVEIRA, A. **Caracterização espermática, preservação criogênica e fertilidade do matrinhã, Brycon cephalus Gunther, 1860 (Teleostei, Characidae)**. 2000. 47 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas (Genética)) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

RURANGWA, E.; ROCLANTS, I.; HUYSKENS, G. et al. The minimum effective spermatozoa:egg ratio for artificial insemination and the effects of mercury on sperm motility and fertilization ability in (*Clarias gariepinus*). **Journal of Fish Biology**, v.53, p.402-413, 1998.

RURANGWA, E.; KIME, D. E.; OLLEVIER, F.; NASH, J. P. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 234, p.1 –28, 2004.

SHIMODA, E.; ANDRADE, D. R.; VIDAL JÚNIOR, M. V.; GODINHO, H. P.; YASUI, G. S. Determinação da razão ótima de espermatozóides por ovócitos de piabanha *Brycon insignis* (pisces - characidae). **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 59, n. 4, p. 877-882, 2007.

STASOFT. INC. **Statistica (data analysis software system)**. version 7.1. Tulsa, USA. 2005.

STREIT JR., D.P.; MORAES, G.V.; RIBEIRO, R.P. et al. Comparação do sêmen de Curimbá (*Prochilodus lineatus*) induzido por extrato de hipófise de frango, coelho ou carpa, **Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science**, v.41, p.147-153, 2004.

TARNBASEN-CHEONG, M. V. P., TAN-FERMIN, J. D., GARCIA, L. M., BALDEVARONA, R. B. M Milt-egg ratio in artificial fertilization of the Asian freshwater catfish, *Clarias macrocephalus*, injected salmon gonadotropin-releasing hormone analogue and domperidone. **Aquatic Living Resources**, v. 8, p. 303-307, 1995.

WEINGARTNER, M.; ZANIBONI FILHO, E. Influência do volume da água de ativação do sêmen na fertilização de óvulos de dourado *Salminus brasiliensis*. In: CONGRESSO AQUACIÊNCIAS, 2006, 2., 2006, Bento Gonçalves, **Anais...**Bento Gonçalves: AQUABIO [2006] (CD-ROM).

WOYNAROVICH, E.; HORVATH, L. **A propagação artificial de peixes de águas tropicais: manual de extensão**. Brasília: Escopo. 1983. 220p. Tradução de Vera Lucia Mixtra Chama de "The Artificial Propagation of Warm - Water Fin fishes – A Manual for Extension".



ZANIBONI FILHO, E. **Incubação, larvicultura e alevinagem do tambaqui (*colossoma macropomum* Cuvier 1818)**. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 1992. 202p. Tese (Doutorado em Ecologia de Recursos Naturais) – Universidade Federal de São Carlos, 1992.

ZANIBONI FILHO, E. e WEINGARTNER, M. Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.31, n.3, p.367-373, 2007.

## FIGURAS



**Figura 2.** Vista aérea do Centro de Pesquisas em Aquicultura Ambiental - CPAA/IAP – Toledo/PR. Fonte: Google Earth (2007).



**Figura 3.** Laboratório e tanques do CPAA/IAP



**Figura 4.** Tanques das matrizes



**Figura 5.** Reprodutor de curimatá curimatá (*Prochilodus lineatus*) utilizado no experimento



**Figura 6.** Seleção dos reprodutores



**Figura 7.** Laboratório de reprodução



**Figura 8.** Caixas onde foram acondicionadas as matrizes



**Figura 9.** Coleta de sêmen com auxílio de seringa



**Figura 10.** Coleta dos ovócitos em placa de petri



**Figura 11.** Os ovócitos com suas respectivas doses inseminantes antes da fertilização



**Figura 12.** Incubadoras experimentais utilizadas para os ensaios de fertilização