

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**CORTISOL PLASMÁTICO E QUALIDADE SEMINAL DE *Rhamdia quelen*
APÓS USO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO ANESTÉSICO
EUGENOL**

MAIRA NESELLO CORSO
Médica Veterinária/UFRGS

Dissertação apresentada como um dos requisitos à obtenção do grau de
Mestre em Zootecnia
Área de concentração Produção Animal

Porto Alegre (RS), Brasil
Março, 2014

DEDICATÓRIA

Dedico esta e todas as etapas da minha vida a quem foi fundamental para a minha existência e transformação em quem sou hoje. À minha mãe, Eda Nesello Corso, meu anjo da guarda, que mesmo estando ausente fisicamente, sempre me acompanha em todas as minhas decisões, me guiando e me enviando um pouco da sua força e luz. Ao meu pai, Mario Corso, pelo apoio incondicional, mesmo algumas vezes discordando das minhas prioridades, e pelas inúmeras vezes que abdicou de suas coisas em nome da família. Ao meu irmão, Tobias Nesello Corso, às vezes pai e às vezes filho, pelo exemplo de determinação e pelo companheirismo. Vocês são tudo em minha vida, muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e pela oportunidade de vivenciar momentos incríveis.

Aos professores Danilo Pedro Streit Jr. e Leonardo José Gil Barcellos pela orientação, ensinamentos e oportunidade de desenvolvimento acadêmico e pessoal.

Aos colegas do Grupo de Pesquisas AQUAM pelo auxílio e companheirismo, especialmente ao Luis Fernando Guerrero Gracia pela ajuda no experimento, ao Raycon, Diego, Daniel, Raquel, Lis e Laura. Aos estagiários pela ajuda nas análises laboratoriais, à Gabriela, Gabriele, Pedro Henrique, Francieli, Rajla e também aqueles que estão seguindo sua vida acadêmica em outras áreas, Macgaiver e Thaynam. Todos vocês foram fundamentais para a execução deste estudo e para o agradável convívio no laboratório.

À equipe da Universidade de Passo Fundo pela disponibilidade da estrutura física e também pelo auxílio no experimento, à Mari, Paulo, Gessi e demais membros da equipe do prof. Leonardo Barcellos.

Aos meus queridos amigos pela lealdade e apoio, mesmo em momentos de ausência.

À minha família pela compreensão e suporte em momentos de decisões difíceis.

Aos membros do Departamento e do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da UFRGS, especialmente à Ione Borcelli Gonçalves pela competência e dedicação e à colega Lidiane Eloy pelo auxílio.

Aos membros da banca examinadora por aceitarem o convite para colaborar com este trabalho.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

Agradeço a todos aqueles que de alguma forma me auxiliaram nessa caminhada, seja com palavras de suporte, enviando boas energias, ou simplesmente estando juntos a mim nessa etapa.

CORTISOL PLASMÁTICO E QUALIDADE SEMINAL DE *Rhamdia quelen* APÓS USO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO ANESTÉSICO EUGENOL¹

Autor: Maira Nesello Corso

Orientador: Danilo Pedro Streit Jr.

Co-orientador: Leonardo José Gil Barcellos

RESUMO

A produção de peixes em cativeiro somente é possível com reprodução artificial, e sabe-se que a manipulação em peixes é um estímulo estressor. Devido ao crescente interesse no bem-estar animal, anestésicos estão sendo utilizados para a manipulação em peixes. O eugenol é um anestésico natural que possui ampla disponibilidade no mercado, apresenta baixo custo e é considerado seguro para o manipulador e para o meio ambiente. O objetivo desse estudo foi verificar se o uso de diferentes concentrações de eugenol (0, 30, 40, 50 e 60 mg/L), no manejo reprodutivo de *Rhamdia quelen*, causa alterações nos perfis do cortisol plasmático dos reprodutores e se influencia na qualidade do sêmen fresco e descongelado. Foram utilizados 75 machos de *R. quelen* sexualmente maduros, com peso de 500 g, selecionados aleatoriamente e distribuídos nos cinco tratamentos conforme as doses de eugenol utilizadas. Foram avaliadas as seguintes variáveis: taxa e tempo de motilidade, concentração espermática, taxa de fertilização, funcionalidade mitocondrial, integridade de membrana e de DNA, morfologia espermática e concentração de cortisol plasmático. Os animais anestesiados com as concentrações de 40 e 50 mg/L de eugenol apresentaram menores níveis de cortisol plasmático comparados ao controle, ou seja, se estressaram menos. A utilização de 30, 40 e 50 mg/L de eugenol manteve a qualidade seminal do sêmen fresco, já no sêmen descongelado, a qualidade foi mantida com o uso de 30 e 40 mg/L de eugenol. Esses resultados evidenciam que é possível conciliar a redução do estresse com a produção, pois cortisol plasmático foi reduzido e os parâmetros seminais se mantiveram após os tratamentos.

Palavras-chave: estresse, reprodução, criopreservação, anestésico.

¹ Dissertação de Mestrado em Zootecnia – Produção Animal, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil (51 p.). Março, 2014.

**PLASMATIC CORTISOL AND SEMINAL QUALITY OF *Rhamdia quelen*
AFTER USING DIFFERENT CONCENTRATIONS OF ANAESTHETIC
EUGENOL²**

Author : Maira Nesello Corso
Advisor: Danilo Pedro Streit Jr.
Co-supervisor : Leonardo José Gil Barcellos

ABSTRACT

The production of fish in captivity is only possible with artificial reproduction, and it is known that the handling is a stressful stimulation to the fish. Currently, the interest in animal welfare has been increased. Therefore anesthetic have been used to make the handling of the fish. Eugenol is a natural anesthetic that has a broad market availability, is inexpensive and is considered safe for the handler and the environment. The aim of this study was to determine whether the use of different concentrations of eugenol (0, 30, 40, 50 and 60 mg/L) in the reproductive management of *Rhamdia quelen* cause changes in the profiles of plasmatic cortisol and quality of fresh and thawed semen. Seventy five males of *R. quelen* sexually mature and weighing 500 g, were randomly selected and distributed in five treatments according to the dose of eugenol used. The following variables were evaluated: motility and time of motility, sperm concentration, fertilization rate, mitochondrial function, membrane and DNA integrity, sperm morphology and concentration of plasmatic cortisol. The animals anesthetized with concentrations of 40 and 50 mg/L of eugenol showed lower plasmatic cortisol levels compared to the control, therefore they were less stressed. The use of 30, 40 and 50 mg / L of eugenol maintaining sperm quality of fresh semen, whereas the quality of thawed is maintained with the use of 30 and 40 mg / L of eugenol. These results show that it is possible conciliate animal welfare with the production, since the seminal parameters were not altered.

Keywords: stress, reproduction, cryopreservation, anesthetic.

² Master of Science dissertation in Animal Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (51 p.). March, 2014.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	12
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1. Aquicultura brasileira.....	15
2.2. Espécie abordada: <i>Rhamdia quelen</i>	15
2.3. Estresse em peixes.....	16
2.4. Anestésicos.....	16
2.5. Reprodução.....	18
2.6. Criopreservação do sêmen	18
3. HIPÓTESES	20
4. OBJETIVOS.....	21
4.1. Objetivo geral.....	21
4.2. Objetivos específicos	21
CAPÍTULO 2	22
1. INTRODUÇÃO.....	26
2. MATERIAL E MÉTODOS	28
2.1. Delineamento experimental	28
2.2. Banhos anestésicos	28
2.3. Coleta das amostras	28
2.4. Análise do cortisol plasmático.....	28
2.5. Análise do sêmen fresco.....	29
2.6. Taxa de Fertilização.....	29
2.7. Congelamento.....	29
2.8. Análise do sêmen descongelado	29
2.9. Análise da Morfologia Espermática.....	30
2.10. Análise Estatística.....	31

3. Resultados	32
4. Discussão	36
Conclusão	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
CAPÍTULO 3	46
CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
VITA	55

RELAÇÃO DE TABELAS

TABELA 1. Concentração espermática ($\times 10^6$) e taxa de fertilização obtidas após tratamentos com diferentes concentrações de eugenol. Médias \pm erro padrão da média..... 33

TABELA 2. Integridade de membrana, integridade de DNA e porcentagem de espermatozoides normais obtidas após tratamentos com diferentes concentrações de eugenol. Média \pm erro padrão da média..... 35

RELAÇÃO DE FIGURAS

FIGURA 1. Taxa de motilidade média do sêmen fresco e do sêmen descongelado de *R. quelen*, submetido a cinco concentrações de eugenol (0, 30, 40, 50 e 60 mg/L). *Valores com diferença estatística ($P < 0,05$) estão representados por letras diferentes. Barras de erro representam o erro padrão da média. Comparação entre médias pelo teste Kruskal-Wallis. 32

FIGURA 2. Tempo de motilidade médio do sêmen fresco e do sêmen descongelado de *R. quelen*, submetido a cinco concentrações de eugenol (0, 30, 40, 50 e 50 mg/L). *Valores com diferença estatística ($P < 0,05$) estão representados por letras diferentes. Barras de erro representam o erro padrão da média. Comparação entre médias pelo teste Kruskal-Wallis. 33

FIGURA 3. Funcionalidade mitocondrial do sêmen descongelado de *R. quelen*, submetido a cinco concentrações de eugenol (0, 30, 40, 50 e 50 mg/L). *Valores com diferença estatística ($P < 0,05$) estão representados por letras diferentes. Barras de erro representam o erro padrão da média. Comparação entre médias pelo teste Kruskal-Wallis. 34

FIGURA 4. Cortisol plasmático dos reprodutores de *R. quelen*, submetidos a cinco concentrações de eugenol (0, 30, 40, 50 e 50 mg/L). *Valores com diferença estatística ($P < 0,05$) estão representados por letras diferentes. Comparação entre médias pelo teste Tukey. Barra de erro representa o erro padrão da média. 35

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP - Adenosina trifosfato

BTS - Beltsville Thawing Solution

DMSO - Dimetilsulfóxido

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO GERAL

O bem-estar em peixes tem sido alvo de crescente interesse por parte dos pesquisadores. É de conhecimento que os peixes cultivados, quando submetidos à manipulação, manifestam respostas ao estresse (IVERSEN *et al.*, 2003). Além disso, tem se considerado importantes os possíveis efeitos deletérios resultantes do estresse causado aos peixes e populações provenientes de práticas aquícolas nos processos de produção (BARTON & IWAMA, 1991). Conforme a severidade do agente estressor, os peixes podem deixar de apresentar uma resposta funcional a esse estímulo e, dessa forma, ter sua fisiologia impactada negativamente, sendo que a reprodução é particularmente afetada (CAMPBELL *et al.*, 1992). Com o objetivo de facilitar o manejo dos peixes e amenizar a intensidade do estresse provocado pela manipulação, a utilização de anestésicos tem sido cada vez mais frequente (GONÇALVES *et al.*, 2008).

O domínio do manejo reprodutivo é fundamental para o desenvolvimento do setor aquícola e para a manutenção da biodiversidade. A ameaça de redução da diversidade genética das populações de peixes nativos, decorrentes de problemas ambientais, evidencia a necessidade do domínio de técnicas reprodutivas. Para amenizar os impactos provenientes destes problemas, é importante que sejam implantados programas que possibilitem o armazenamento de gametas por longos períodos (MARIA *et al.*, 2011), ressaltando a necessidade de aprimorar as técnicas reprodutivas utilizadas atualmente, o que vai ao encontro da necessidade do desenvolvimento de técnicas mais eficientes de preservação de sêmen.

Atualmente, as espécies nativas tem assumido lugar de destaque na produção nacional de pescado, como o tambaqui (*Colossoma macropomum*), que passou a ser a segunda espécie mais produzida (MPA, 2013). Sabendo-se do potencial brasileiro para a produção aquícola, fica evidente a oportunidade de desenvolver a produção de espécies nativas. O jundiá (*Rhamdia quelen*) é uma espécie endêmica da América do Sul e intensamente cultivada no sul do Brasil, principalmente nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, por ser resistente ao frio (BARCELLOS *et al.*, 2012).

O objetivo deste estudo foi avaliar se o uso de diferentes concentrações do anestésico eugenol, no manejo reprodutivo, influencia no cortisol plasmático dos peixes, alterando características do sêmen fresco e descongelado de *R. quelen*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Aquicultura brasileira

Atualmente, a produção brasileira é de aproximadamente 1,43 milhões de toneladas de pescado, sendo 38% cultivados (MPA, 2013). Deve ser ressaltado que o Brasil dispõe de 12% da água doce disponível no planeta, ou seja, seu potencial para a aquicultura pode torná-lo um dos maiores produtores mundiais de pescado (MPA, 2012). A produção aquícola nacional de origem continental aumentou significativamente no triênio 2008-2010, com um incremento de aproximadamente 40%. Este crescimento pode ser relacionado ao desenvolvimento do setor, com a ampliação de políticas públicas que facilitaram o acesso aos programas governamentais existentes (MPA, 2012).

Em 2011, de acordo com o MPA (2013), a maior produção de pescado do Brasil ocorreu na Região Sul com 153.674,5 toneladas, correspondendo a 28,2% da produção nacional de aquicultura continental.

2.2. Espécie abordada: *Rhamdia quelen*

A ordem Siluriforme é composta por mais de 2.200 espécies distribuídas em todos os continentes. No Brasil existem centenas de espécies de peixes de couro e muitas delas com características zootécnicas e organolépticas atrativas para a produção aquícola. O surubim (*Pseudoplatystoma coruscans*) e o cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum*) são os peixes de água doce com maior valor comercial no Brasil, sendo considerados produtos nobres (KUBITZA *et al.*, 1998). As espécies Siluriformes destacam-se entre as espécies cultivadas devido à textura e sabor de sua carne e ao bom rendimento de carcaça (FERREIRA *et al.*, 2001), sendo o jundiá uma espécie bem aceita pelo mercado consumidor (BARCELLOS *et al.*, 2012).

Jundiá é o nome comum dos peixes pertencentes ao gênero *Rhamdia*. No Brasil, o *R. quelen* é vulgarmente chamado de: jundiá-tinga, jandiá, jandiá-tinga, mandi e sapipoca. É encontrado desde o sudeste do México até o centro da Argentina (BALDISSEROTTO & RADÜNZ NETO, 2005). Esta espécie endêmica da América do Sul é resistente ao frio. Quando cultivada pode atingir 500-600 g de peso corporal em seis a oito meses (BARCELLOS *et al.*, 2001). A sua produção passou de 911,0 toneladas em 2008 (MPA, 2012) para 1.747,3 toneladas em 2011 (MPA, 2013), ou seja, houve um incremento de aproximadamente 92% neste período.

Quanto à biologia da espécie, estes animais vivem em lagos e poços fundos dos rios, preferindo locais com águas calmas, fundo de areia e lama, junto às margens e vegetação. A sobrevivência se dá em temperaturas entre três e 32°C, desde que adaptado lentamente. A maturidade sexual é atingida por volta de um ano de idade em ambos os sexos. O período reprodutivo do *R. quelen* ocorre entre agosto e março, podendo apresentar variações a cada ano

(BALDISSEROTTO & GOMES, 2005). A desova é assincrônica, os ovos são recrutados de populações heterogêneas com os oócitos em desenvolvimento e liberados em várias ocasiões do período reprodutivo. Seus ovos são demersais e não aderentes. (GOMES *et al.*, 2000).

2.3. Estresse em peixes

Algumas práticas realizadas em pisciculturas, como biometria, transporte e reprodução induzida, são considerados agentes estressores para os peixes (VIDAL *et al.*, 2007). O manejo de animais aquáticos, dentro ou fora de seu habitat natural, costuma envolver atividade física, pois estes tentam fugir da captura e da manipulação, o que afeta o seu comportamento e a sua fisiologia, gerando respostas de estresse (BOLASINA, 2006).

Os peixes respondem fisiologicamente aos estímulos estressores podendo superar a perturbação existente. Quando esse mecanismo de resposta é forçado além da sua capacidade, as respostas tornam-se prejudiciais. Dessa forma, uma resposta ao estresse pode ser considerada como uma mudança na condição biológica do indivíduo, o que representa uma possível ameaça ao bem-estar do peixe (BARTON & IWAMA, 1991).

As respostas ao estresse são classificadas em três categorias: a) primárias que são hormonais, como o aumento nos corticosteroides e catecolaminas, além de alterações nos neurotransmissores. b) secundárias que incluem alterações metabólicas, como aumento da glicose e lactato e redução do glicogênio tecidual, alterações nas características hematológicas, alterações celulares, osmorregulatórias e imunológicas c) terciárias que compreendem mudanças no comportamento e no desempenho do peixe, como crescimento, natação e resistência a doenças (BARTON *et al.*, 2002).

O estresse, quando leve, tem efeito positivo sobre o desempenho reprodutivo. Por outro lado, quando ocasionado por estressores mais graves, prolongados ou frequentes, tem efeito negativo sobre os processos reprodutivos, entretanto, não se consegue definir esse limiar (SCHRECK, 2010). Quando submetidos a estresse agudo e repetido os machos apresentam redução no número de células espermáticas em comparação aos animais não submetidos ao estresse. Sabe-se também, que ocorre diferença significativa nas taxas de sobrevivência no momento da eclosão entre os descendentes dos cruzamentos de animais estressados, quando comparados aos descendentes de cruzamentos dos animais que não foram expostos a essa condição (CAMPBELL *et al.*, 1992).

2.4. Anestésicos

Com o objetivo de facilitar o manejo de peixes e amenizar a intensidade do estresse causado por estas atividades, têm-se utilizado anestésicos (GONÇALVES *et al.*, 2008). Os anestésicos mais utilizados na aquicultura são: triclaína metano sulfonato (MS 222), benzocaína, sulfato de quinaldina, metomidato, óleo de cravo e 2-fenoxietanol (VELÍSEK, *et al.*, 2005). Nos países que possuem legislação sobre bem-estar animal, o uso de

anestésicos se faz necessário durante procedimentos considerados estressantes ou dolorosos (VELÍSEK *et al.*, 2006). Já no Brasil não existem leis que regulamentem o uso de anestésicos em peixes. Todavia, a demanda por iniciativas que minimizem os efeitos relativos ao estresse provocado pelo manejo zootécnico é crescente.

A anestesia pode ser administrada de duas formas: por via inalatória e por via injetável. No Brasil a forma mais utilizada é a inalação (ROUBACH & GOMES, 2001), ou seja, através de banhos de imersão. Quando se utiliza agentes anestésicos de imersão, a qualidade da água é particularmente importante. Características como salinidade, dureza, pH, oxigênio dissolvido e temperatura devem ser semelhantes às características da água em que os animais estavam alocados anteriormente. O ideal é a utilização da água do tanque onde os peixes estão alojados, caso essa água seja de boa qualidade (FISH *et al.*, 2008). O ambiente em que o peixe se encontra antes da indução anestésica deve ser mantido silencioso e sem perturbações. Antes de imergir o peixe na solução de indução (anestésico diluído em água), a água de recuperação deve estar próxima e a disposição para receber imediatamente algum peixe caso haja overdose ou alguma reação inesperada. É fundamental assegurar uma oxigenação adequada na água de indução e na água de recuperação (FISH *et al.*, 2008).

Conforme as características de comportamento apresentadas pelos peixes identificam-se os estádios de anestesia. Estes são classificados de um a quatro e estágio de recuperação, quando os peixes voltam a apresentar capacidade de permanecer na posição vertical e comportamento normal de natação. O primeiro estágio de anestesia é caracterizado por movimento opercular retardado ou irregular; no segundo estágio ocorre perda de equilíbrio esporádica e dificuldade em manter a posição em repouso; já no terceiro, percebe-se total perda de equilíbrio e incapacidade de recuperar a posição vertical, por fim, o quarto estágio é alcançado quando não ocorre reação à manipulação (WOODY *et al.*, 2002).

Após estarem anestesiados, os peixes devem ser manuseados sutilmente e com cuidado para evitar danos a sua camada protetora de muco e ao seu epitélio. É importante evitar o contato do peixe com superfícies secas. Todas as superfícies que o peixe entra em contato direto devem ser úmidas e lisas. Além disso, devem ser tomadas precauções para minimizar o tempo que os peixes ficam fora de água (FISH *et al.*, 2008).

A escolha do anestésico depende de fatores tais como a conveniência para o uso; a segurança para peixes, seres humanos e para o meio ambiente; eficácia; alterações fisiológicas e custo do anestésico (PIRHONEN & SCHRECK, 2002). De acordo com Fish *et al.* (2008), entre os anestésicos por imersão comumente utilizados encontra-se o eugenol [2-metoxi-4-(2-propenil) fenol]. Este anestésico possui ampla disponibilidade no mercado, baixo custo e é considerado seguro para o manipulador e para o meio ambiente (IVERSEN *et al.*, 2003), atendendo aos fatores citados para a escolha do anestésico.

O eugenol é derivado do caule, folhas e brotos da árvore *Eugenia aromatica* (ANDERSON *et al.*, 1997). É um anestésico líquido, de cor amarela pálida, fracamente solúvel em água, portanto, deve ser dissolvido em etanol (1:9) antes da diluição em água (FISH *et al.*, 2008). O isômero isoeugenol é aprovado nos Estados Unidos como aditivo alimentar e o eugenol é aprovado como uma substância alimentar segura (WAGNER *et al.*, 2002). O produto comercial, AQUI-S[®], contém 54% de isoeugenol e está em processo de avaliação para aprovação como anestésico de peixes pela FDA (Food and Drug Administration). É aprovado para tal uso na Nova Zelândia, Austrália, Chile e nas Ilhas Faroé, com a vantagem de não apresentar tempo de carência para o consumo. De acordo com Wagner *et al.* (2002), com o uso de AQUI-S[®], o tempo de recuperação é longo, podendo ser útil para situações como a marcação, desova e cirurgia. Além disso, tem a vantagem de ser rapidamente metabolizado e excretado, e, portanto, não requer tempo de carência.

A dose de eugenol recomendada por Fish *et al.* (2008) é de 25-60 mg/L. A sedação em *R. quelen* é alcançada com doses de 20 mg/L de eugenol, mas para anestésiar os animais, as concentrações não devem ser inferiores a 40 mg/L (GOMES *et al.*, 2011). Porém, Bolner e Baldisserotto (2007) usaram 32 mg/L para anestésiar juvenis dessa espécie.

2.5. Reprodução

O controle da reprodução é fundamental para o domínio da aquicultura, e um dos fatores limitantes do sucesso reprodutivo é a qualidade dos gametas (BOBE & LABBÉ, 2010). Sabe-se que a reprodução é um processo fisiológico particularmente sensível aos efeitos do estresse e que o manejo a que os peixes são submetidos é um agente estressor (CAMPBELL *et al.*, 1994). Dessa forma, para que se consiga desenvolver uma cadeia produtiva mais eficiente é necessário que o estresse causado pelo manejo não interfira no processo reprodutivo.

A reprodução artificial da maioria das espécies é otimizada pela indução hormonal, que possibilita a maturação final e liberação dos gametas de peixes mantidos em cativeiro, além de possibilitar maior eficiência da reprodução em condições laboratoriais (CARNEIRO, 2007). A técnica mais utilizada no Brasil para a indução hormonal da maturação final de peixes é o uso de extrato bruto de hipófise de peixes maduros (ZANIBONI-FILHO & NUÑER, 2004).

A importância de realizar a indução hormonal com extrato hipofisário se deve ao fato deste proporcionar um aumento no volume de sêmen obtido, o que facilita os procedimentos da reprodução em laboratório. Além disso, permite a utilização de um menor número de machos, reduzindo o plantel de reprodutores necessário (CARNEIRO, 2007).

2.6. Criopreservação do sêmen

A busca por técnicas de preservação de sêmen eficientes é necessária para satisfazer aspectos econômicos e ecológicos (STREIT JR. *et*

al., 2009). A criopreservação utiliza temperaturas negativas extremas como estratégia para a privação de energia, resultando na preservação eficiente da estrutura e da função de células e tecidos vivos. As células a serem criopreservadas devem ser expostas a substâncias crioprotetoras antes de terem sua temperatura reduzida, período denominado de equilíbrio, no qual essas substâncias substituem a água existente no meio intracelular, devido ao gradiente osmótico, ocasionando uma menor formação de gelo (PEGG, 2007) e conseqüentemente menor dano celular. O BTS é um diluente comercial desenvolvido para armazenar sêmen suíno em 15-18 °C, durante três a cinco dias, e tem sido usado com sucesso para preservar o sêmen de espécies nativas de peixe (MARIA *et al.*, 2006; STREIT, 2013). Dentre os crioprotetores intracelulares, encontram-se o dimetilsulfóxido (DMSO) e o metanol (STREIT, 2013).

A técnica de criopreservação é de grande interesse, pois pode ser aplicada em diferentes campos de pesquisa e produção (CABRITA *et al.*, 2010), e é uma forma eficaz para que o material genético dos machos fique disponível por períodos indeterminados (NINHAUS-SILVEIRA *et al.*, 2006). Em espécies de interesse zootécnico, a congelação de sêmen é utilizada em programas de melhoramento genético, dispondo genes para aumentar a variabilidade genética de uma população, sendo, também, utilizada para a manutenção de plantéis de reprodutores (CARNEIRO, 2007).

Entretanto, sabe-se que a criopreservação de sêmen de peixes ainda não é amplamente utilizada devido à redução da viabilidade e fertilidade dos espermatozoides que ocorre após a descongelação. Essa perda de qualidade se deve aos danos celulares induzidos pela criopreservação (JUN *et al.*, 2006). Dessa forma, ressalta-se a importância de que o sêmen utilizado para a criopreservação seja de boa qualidade, para que, mesmo com a redução da qualidade pós-criopreservação, se obtenha resultados satisfatórios com o uso dessa técnica.

3. HIPÓTESES

3.1. O uso de anestésico no manejo reprodutivo de machos de *Rhamdia quelen* ameniza o estresse causado por esta atividade, resultando em ganhos qualitativos no sêmen.

3.2. O sêmen descongelado obtido de animais previamente anestesiados e que, conseqüentemente, sofreram menor estresse durante o manejo reprodutivo, apresenta ganhos qualitativos.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Verificar se o uso do anestésico eugenol no manejo reprodutivo de *R. quelen* reduz o cortisol plasmático e influencia na qualidade seminal.

4.2. Objetivos específicos

Identificar possíveis alterações nos perfis do cortisol plasmático dos peixes após o uso de anestésico.

Evidenciar se ocorrem alterações nas características qualitativas das amostras de sêmen fresco e descongelado após ter sido utilizado anestésico no manejo dos reprodutores.

CAPÍTULO 2

CORTISOL PLASMÁTICO E QUALIDADE SEMINAL DE *Rhamdia quelen* APÓS USO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO ANESTÉSICO EUGENOL

RESUMO

A produção de peixes em cativeiro somente é possível com reprodução artificial, e sabe-se que a manipulação em peixes é um estímulo estressor. Devido ao crescente interesse no bem-estar animal, anestésicos estão sendo utilizados para a manipulação em peixes. O eugenol é um anestésico natural que possui ampla disponibilidade no mercado, apresenta baixo custo e é considerado seguro para o manipulador e para o meio ambiente. O objetivo desse estudo foi verificar se o uso de diferentes concentrações de eugenol (0, 30, 40, 50 e 60 mg/L), no manejo reprodutivo de *Rhamdia quelen*, causa alterações nos perfis do cortisol plasmático dos reprodutores e se influencia na qualidade do sêmen fresco e descongelado. Foram utilizados 75 machos de *R. quelen* sexualmente maduros, com peso de 500 g, selecionados aleatoriamente e distribuídos nos cinco tratamentos conforme as doses de eugenol utilizadas. Foram avaliadas as seguintes variáveis: taxa e tempo de motilidade, concentração espermática, taxa de fertilização, funcionalidade mitocondrial, integridade de membrana e de DNA, morfologia espermática e concentração de cortisol plasmático. Os animais anestesiados com as concentrações de 40 e 50 mg/L de eugenol apresentaram menores níveis de cortisol plasmático comparados ao controle, ou seja, se estressaram menos. A utilização de 30, 40 e 50 mg/L de eugenol manteve a qualidade seminal do sêmen fresco, já no sêmen descongelado, a qualidade foi mantida com o uso de 30 e 40 mg/L de eugenol. Esses resultados evidenciam que é possível conciliar a redução do estresse com a produção, pois o cortisol plasmático foi reduzido e os parâmetros seminais se mantiveram após os tratamentos.

Palavras-chave: estresse, reprodução, criopreservação, anestésico.

**PLASMATIC CORTISOL AND SEMINAL QUALITY OF *Rhamdia quelen*
AFTER USING DIFFERENT CONCENTRATIONS OF ANAESTHETIC
EUGENOL**

ABSTRACT

The production of fish in captivity is only possible with artificial reproduction, and it is known that the handling is a stressful stimulation to the fish. Currently, the interest in animal welfare has been increased. Therefore anesthetic have been used to make the handling of the fish. Eugenol is a natural anesthetic that has a broad market availability, is inexpensive and is considered safe for the handler and the environment. The aim of this study was to determine whether the use of different concentrations of eugenol (0, 30, 40, 50 and 60 mg/L) in the reproductive management of *Rhamdia quelen* cause changes in the profiles of plasmatic cortisol and quality of fresh and thawed semen. Seventy five males of *R. quelen* sexually mature and weighing 500 g, were randomly selected and distributed in five treatments according to the dose of eugenol used. The following variables were evaluated: motility and time of motility, sperm concentration, fertilization rate, mitochondrial function, membrane and DNA integrity, sperm morphology and concentration of plasmatic cortisol. The animals anesthetized with concentrations of 40 and 50 mg/L of eugenol showed lower plasmatic cortisol levels compared to the control, therefore they were less stressed. The use of 30, 40 and 50 mg / L of eugenol maintaining sperm quality of fresh semen, whereas the quality of thawed is maintained with the use of 30 and 40 mg / L of eugenol. These results show that it is possible conciliate animal welfare with the production, since the seminal parameters were not altered.

Keywords: stress, reproduction, cryopreservation, anesthetic.

1. INTRODUÇÃO

O jundiá (*Rhamdia quelen*) é uma espécie nativa da América do Sul (BARCELLOS *et al.*, 2001). Pertence a ordem Siluriforme e destaca-se entre as espécies cultivadas devido à textura e sabor de sua carne e ao bom rendimento de carcaça (FERREIRA *et al.*, 2001). O cultivo do *R. quelen* vem crescendo, sua produção passou de 911,0 toneladas em 2008 (MPA, 2012) para 1.747,3 toneladas em 2011 (MPA, 2013), havendo um incremento de aproximadamente 92% neste período. A espécie é uma boa alternativa para a piscicultura da região sul por ser resistente ao frio e poder atingir 500-600 g de peso corporal entre seis e oito meses quando cultivado (Barcellos *et al.*, 2001).

Algumas práticas realizadas em pisciculturas geram estresse aos peixes, como biometria, transporte e reprodução induzida (VIDAL *et al.*, 2007). Os animais respondem fisiologicamente aos estímulos estressores, podendo superar a perturbação existente. Porém, quando esse mecanismo de resposta é forçado além da sua capacidade, as respostas tornam-se prejudiciais. (BARTON & IWAMA, 1991). Com o objetivo de facilitar o manejo dos peixes e amenizar o estresse causado por esta atividade, têm-se utilizado anestésicos (GONÇALVES *et al.*, 2008), o que facilita significativamente o processo de reprodução induzida (WAGNER *et al.*, 2002).

A escolha do anestésico depende de fatores tais como: conveniência para o uso; segurança para peixes, seres humanos e para o meio ambiente; eficácia; alterações fisiológicas e custo do anestésico (PIRHONEN & SCHRECK, 2002). De acordo com Fish *et al.* (2008), entre os anestésicos por imersão comumente utilizados encontra-se o eugenol [2-metoxi-4-(2-propenil) phenol]. Este anestésico possui ampla disponibilidade no mercado, baixo custo e é considerado seguro para o manipulador e para o meio ambiente (IVERSEN *et al.*, 2003). O eugenol deriva do caule, folhas e brotos da árvore *Eugenia aromatica* (ANDERSON *et al.*, 1997), sendo um líquido de cor amarela pálida, fracamente solúvel em água, devendo ser dissolvidos em etanol (1:9) antes da diluição em água (FISH *et al.*, 2008).

Para o domínio da aquicultura é fundamental que se controle a reprodução, e um dos fatores limitantes do sucesso reprodutivo é a qualidade dos gametas (BOBE & LABBÉ, 2010). Sabe-se que a reprodução exige grande gasto energético, conseqüentemente, o desempenho reprodutivo pode ser afetado pelo estresse (SCHRECK, 2010). Portanto, é necessário que o estresse causado pelo manejo não interfira na reprodução. A criopreservação é uma forma eficaz para que o material genético dos machos fique disponível por períodos indeterminados (NINHAUS-SILVEIRA *et al.*, 2006). Em espécies de interesse zootécnico, o congelamento de sêmen é utilizado em programas de melhoramento genético, dispondo genes para aumentar a variabilidade genética de uma população, sendo, também, utilizado para a redução de plantéis de reprodutores (CARNEIRO, 2007).

O objetivo desse estudo foi verificar se o uso do anestésico eugenol, no manejo reprodutivo de *R. quelen*, ameniza o estresse ao qual os peixes são

submetidos e se influencia na qualidade do sêmen fresco e após congelamento.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Delineamento experimental

O experimento foi realizado nos meses de dezembro e janeiro, sendo utilizados 75 machos de *R. quelen* sexualmente maduros, com peso de 500 g, que estavam alocados em tanques escavados. Estes foram selecionados aleatoriamente, transportados para tanques construídos em alvenaria e distribuídos em cinco tratamentos de acordo com as concentrações de eugenol usadas: 0 (controle), 30, 40, 50 e 60 mg/L. O manejo foi realizado conforme a forma usualmente realizada à campo, acrescentando-se o uso do eugenol. O sêmen coletado de cada animal foi destinado para a análise do sêmen fresco e para a criopreservação com dois diferentes crioprotetores (DMSO e metanol).

2.2. Banhos anestésicos

Os peixes foram submetidos aos tratamentos anestésicos pré-indução hormonal e coleta seminal. Para o manejo anestésico os reprodutores foram colocados em recipientes contendo 10 litros de água (6 mgO₂/L de água) contendo as diferentes concentrações de eugenol, previamente dissolvido em etanol (1:9). Foram anestesiados cinco animais em cada banho anestésico, sendo os banhos repetidos três vezes em momentos distintos. Os animais foram mantidos no banho anestésico até o momento em que manifestaram o quarto estágio de anestesia de acordo com Woody *et al.* (2002). Para padronização do manejo, o grupo controle foi submetido à imersão em um recipiente contendo somente água.

2.3. Coleta das amostras

Após os tratamentos, os animais foram induzidos à reprodução, para maturação final e liberação dos gametas, com uma dose de 2,5 mg/kg de extrato de hipófise de carpa, administrado via intraperitoneal, sob a nadadeira peitoral direita dos reprodutores.

A coleta do sêmen foi padronizada para 12 horas após a indução hormonal para a liberação espermática, quando os peixes foram novamente submetidos aos diferentes tratamentos. Após os reprodutores atingirem o quarto estágio de anestesia, o sêmen foi coletado através de uma leve compressão abdominal no sentido encéfalo-caudal com auxílio de seringa (BILLARD *et al.*, 1995), evitando a contaminação com água ou urina. O sêmen obtido de cada peixe foi fracionado em três partes, as quais foram destinadas para os seguintes procedimentos: análise das características do sêmen fresco, fertilização e criopreservação.

Após coletar o sêmen, coletou-se uma amostra de 1 a 3 mL de sangue de cada reprodutor, através de punção do vaso caudal com agulhas e seringas descartáveis, para a análise do cortisol plasmático.

2.4. Análise do cortisol plasmático

Após coletado, o sangue foi acondicionado em tubos de micro-hematócrito estéreis para ser centrifugado (3000×g/10 min). O plasma foi coletado com uma seringa Hamilton, transferido para tubos *ependorf* e armazenado a -25 °C até a análise. O cortisol foi mensurado em amostras duplicadas de plasma não extraído com o teste disponível comercialmente (¹²⁵I) DPC cortisol RIA test (Coat-A-Count®; DPC Los Angeles, CA). Os resultados obtidos foram validados com a curva padrão do kit. O coeficiente de variação intra-ensaio foi de 6 % e uma sensibilidade de 50 pg/mL.

2.5. Análise do sêmen fresco

Para avaliação da taxa e do tempo de motilidade, foi padronizada a diluição de 1:10, diluindo 2 µL de sêmen de cada animal em 20 µL de água destilada. As amostras foram observadas entre lâmina e lamínula em microscópio óptico (40X). A taxa de motilidade foi quantificada em valores de 0 a 100% conforme o percentual de espermatozoides móveis no campo óptico. Já o tempo de motilidade foi determinado acionando-se um cronômetro no momento da diluição do sêmen até cessarem os movimentos espermáticos no campo óptico.

Também se avaliou a concentração espermática diluindo-se o sêmen em formol-salina tamponada, utilizando-se pipeta de precisão, resultando em uma diluição de 1:2.000. A contagem de espermatozoides foi realizada em câmara de Neubauer.

2.6. Taxa de Fertilização

Para a fertilização foi utilizado *pool* de oócitos proveniente de quatro fêmeas sexualmente maduras e previamente induzidas, sendo destinados cinco gramas do *pool* para cada incubadora. Os oócitos foram fertilizados com o sêmen obtido de cada animal e em seguida acondicionados nas incubadoras. Após seis horas de incubação, foram coletadas amostras de ovos (100 unidades/incubadora) de acordo com metodologia adaptada de ZANIBONI FILHO; BARBOSA (1992) para a contagem de ovos viáveis e não viáveis, obtendo-se a taxa de fertilização (% de ovos fertilizados).

2.7. Congelamento

Para o congelamento das amostras, o sêmen foi diluído na proporção de 1:3 (sêmen:diluyente) em 90% de Beltsville Thawing Solution (BTS) com 10% de metanol e 90% de BTS com 10% de dimetilsulfóxido (DMSO). As amostras foram envasadas em palhetas de 250 µL, armazenadas por 12 horas em um container de vapor (*dry-shipper*) e então transferidas para um botijão de nitrogênio líquido (-196 °C) durante 30 dias.

2.8. Análise do sêmen descongelado

Para o descongelamento foi utilizado o protocolo adaptado de Carosfeld *et al.* (2003), sendo as palhetas submergidas em banho-maria a 45°C/8s e, em seguida, foram analisados os parâmetros seminais. Duas palhetas de cada tratamento foram descongeladas e diluídas em 400 µL de

BTS (1:3) a 22 °C. Utilizou-se microscópio de epifluorescência com aumento de 40 X para contar e avaliar 200 espermatozoides em cada amostra.

As taxas de motilidade e tempo da motilidade seguiram a mesma metodologia descrita para o sêmen fresco. Para a avaliação da integridade de membrana, uma amostra de 10µL de sêmen foi diluída em 40µL de solução salina isotônica, contendo 1,7 mM de formaldeído, 20 M de diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e 7,3 µM de iodeto de propídeo (IP). Quando ocorreu fluorescência verde, os espermatozoides foram considerados com membrana íntegra, pois a sua membrana não permitiu que o diacetato de carboxifluoresceína saísse do citoplasma. Os espermatozoides que apresentaram fluorescência vermelha ou vermelha e verde na cabeça foram considerados sem membrana íntegra (HARRISON & VICKERS, 1990). A porcentagem de espermatozoides viáveis, ou seja, aqueles com membrana íntegra, foi determinada pela proporção dos que emitiram fluorescência verde em comparação com o número total de espermatozoides (emissores de fluorescência verde, vermelho ou vermelho e verde).

A integridade do DNA foi avaliada após a diluição de 45 µL de sêmen em 50 µL de TNE (0,01 M Tris-HCl; 0,15 M NaCl; 0,001 M EDTA, pH 7,2). Após 30 segundos, 200µL de solução Triton 1X foram adicionados e 30 segundos depois, 50µL de laranja de acridina (2 mg / mL em água deionizada). Após cinco minutos, foram contados 200 espermatozoides. Quando apresentavam fluorescência verde, considerou-se que os espermatozoides possuíam DNA íntegro, enquanto aqueles que apresentavam fluorescência vermelha ou laranja foram considerados com o DNA não íntegro (BENCHARIF *et al.*, 2010). A taxa de integridade do DNA foi determinada pela proporção de espermatozoides emissores de fluorescência verde, com DNA íntegro, em relação ao número total de espermatozoides (fluorescência verde, vermelha ou laranja).

A avaliação da funcionalidade mitocondrial foi realizada após a incubação de 10 µL de sêmen com 40 µL de solução de rodamina 123 (13µM) a 20°C/10 minutos. Os espermatozoides com coloração rodamina positivo (fluorescência verde) foram considerados com mitocôndrias funcionais. Já espermatozoides com mitocôndrias não funcionais não manifestaram fluorescência, ou seja, coloração rodamina negativa (HE & WOODS, 2004). A proporção de espermatozoides emissores de fluorescência verde em relação ao total de espermatozoides (verde ou ausência de fluorescência) representou a taxa de funcionalidade mitocondrial.

2.9. Análise da Morfologia Espermática

A análise de morfologia espermática foi realizada no sêmen fresco e descongelado, diluindo-se o sêmen em solução formol-salina tamponada (1:2000) e em seguida corando com Rosa Bengala, de acordo com o método de Conn (1918). As morfopatologias foram avaliadas contabilizando-se 100 espermatozoides por amostra, em microscopia óptica (40 X), sendo classificadas em primárias e secundárias.

2.10. Análise Estatística

As amostras obtidas dos tratamentos (controle, 30, 40, 50 e 60 mg/L de eugenol) foram consideradas como variáveis independentes, assim como o uso dos crioprotetores metanol e DMSO. Os parâmetros quali-quantitativos seminais e o cortisol plasmático foram considerados como variáveis dependentes. Cada reprodutor foi considerado uma unidade experimental. A normalidade das variáveis foi testada pelo teste de Shapiro-Wilk. As variáveis em que a transformação de dados não resultou em normalidade foram submetidas à análise de variância não paramétrica e os tratamentos foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis. Para a análise do cortisol plasmático, os dados foram transformados para LOG e foi utilizado o teste de Tukey para a comparação de médias. As análises foram realizadas com o programa Statistix 9, Analítica Software.

3. RESULTADOS

A taxa de motilidade espermática do sêmen fresco diferiu ($P < 0,05$) apenas no tratamento com maior concentração de eugenol (60 mg/L). Quanto ao sêmen descongelado, a taxa de motilidade foi menor na concentração de 60 mg/L e na de 50 mg/L de eugenol em relação a concentração de 40 mg/L e ao controle, sendo que a concentração de 60 mg/L também diferiu do tratamento que utilizou 30 mg/L de eugenol (FIGURA 1).

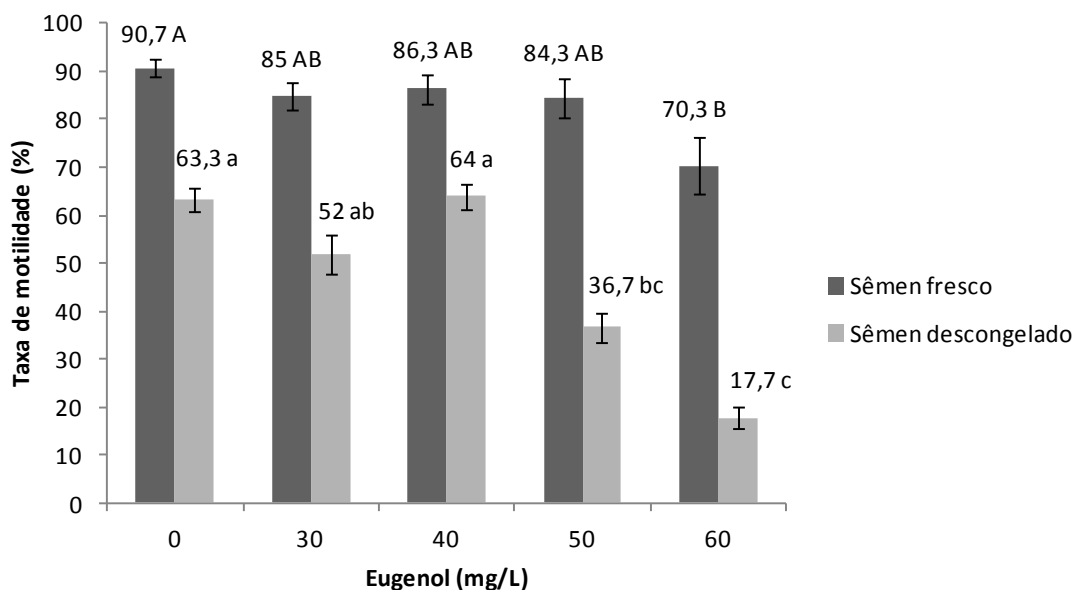


FIGURA 1. Taxa de motilidade média do sêmen fresco e do sêmen descongelado de *R. quelen*, submetido a cinco concentrações de eugenol (0, 30, 40, 50 e 60 mg/L). *Valores com diferença estatística ($P < 0,05$) estão representados por letras diferentes. Barras de erro representam o erro padrão da média. Comparação entre médias pelo teste Kruskal-Wallis.

O tempo de motilidade do tratamento com 60mg/L de eugenol foi inferior ($P < 0,05$) ao controle no sêmen fresco, e nos demais tratamentos não houve diferença. Já no sêmen descongelado, o tempo de motilidade foi inferior nos tratamentos com 50 e 60 mg/L quando comparados ao controle e ao tratamento com 40 mg/L de eugenol. Além disso, com o uso da concentração de 60 mg/L também ocorreu diferença em comparação ao tratamento que utilizou 30 mg/L de eugenol (FIGURA 2).

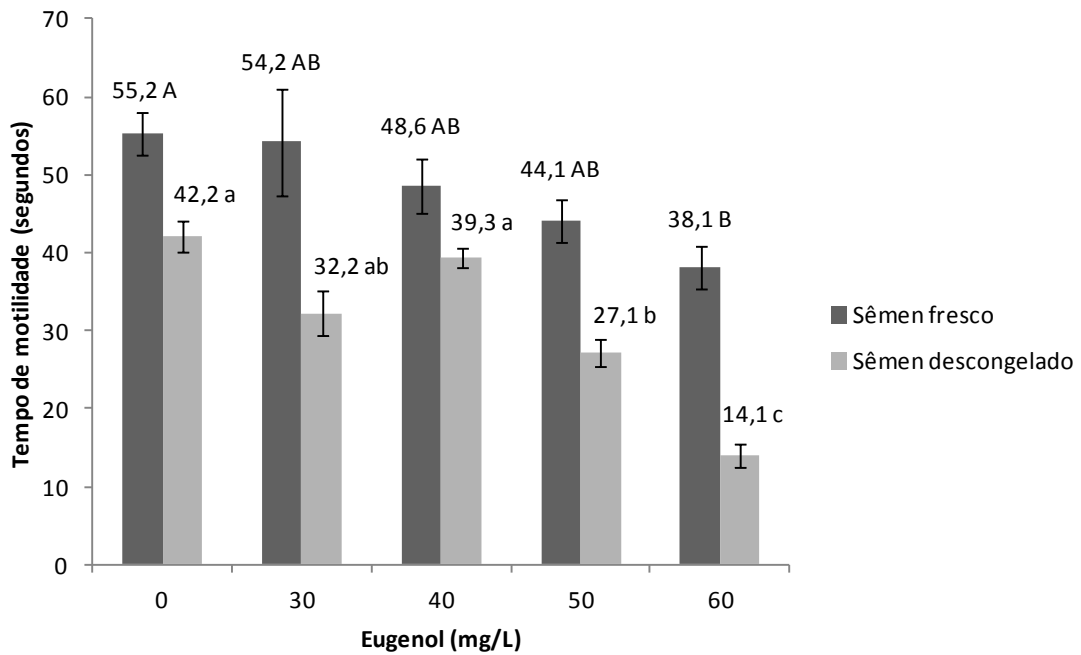


FIGURA 2. Tempo de motilidade médio do sêmen fresco e do sêmen descongelado de *R. quelen*, submetido a cinco concentrações de eugenol (0, 30, 40, 50 e 60 mg/L). *Valores com diferença estatística ($P < 0,05$) estão representados por letras diferentes. Barras de erro representam o erro padrão da média. Comparação entre médias pelo teste Kruskal-Wallis.

Não houve diferença ($P > 0,05$) entre os tratamentos utilizados na concentração espermática e na taxa de fertilização (TABELA 1).

TABELA 1. Concentração espermática ($\times 10^6$) e taxa de fertilização obtidas após tratamentos com diferentes concentrações de eugenol. Médias \pm erro padrão da média.

Variável	Eugenol (mg/L)					P*
	0	30	40	50	60	
Concentração espermática	22427 $\pm 4611,1$	22085 $\pm 2365,8$	23510 $\pm 3014,4$	18983 $\pm 2186,2$	24252 $\pm 3832,3$	NS
Taxa de fertilização	70,5 $\pm 5,1$	64,6 $\pm 6,6$	59,2 $\pm 6,7$	54,5 $\pm 8,4$	48,4 $\pm 8,0$	NS

* Comparação entre os tratamentos pelo teste Kruskal-Wallis.

A funcionalidade mitocondrial foi diferente ($P < 0,05$) apenas entre a maior (60 mg/L) e a menor (30 mg/L) concentração de eugenol utilizada nos tratamentos anestésicos (FIGURA 3).

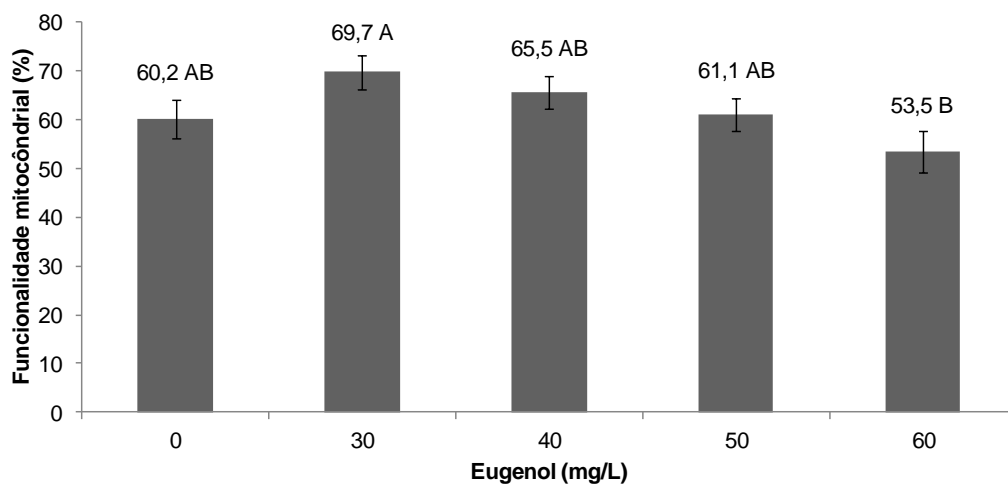


FIGURA 3. Funcionalidade mitocondrial do sêmen descongelado de *R. quelen*, submetido a cinco concentrações de eugenol (0, 30, 40, 50 e 50 mg/L). *Valores com diferença estatística ($P < 0,05$) estão representados por letras diferentes. Barras de erro representam o erro padrão da média. Comparação entre médias pelo teste Kruskal-Wallis.

Não foi observada diferença ($P > 0,05$) na integridade de membrana e de DNA. Na morfologia espermática também não houve diferença ($P > 0,05$) entre a porcentagem de espermatozoides normais entre os diferentes tratamentos utilizados (TABELA 2).

TABELA 2. Integridade de membrana, integridade de DNA e porcentagem de espermatozoides normais obtidas após tratamentos com diferentes concentrações de eugenol. Média \pm erro padrão da média.

Variável	Eugenol (mg/L)					P*
	0	30	40	50	60	
Integridade de membrana (%)	70,3 \pm 4,6	73,5 \pm 5,0	69,1 \pm 4,8	74,3 \pm 5,3	67,9 \pm 5,0	NS
Integridade de DNA (%)	98,6 \pm 0,9	96,3 \pm 2,6	99,7 \pm 0,1	99,5 \pm 0,1	99,4 \pm 0,2	NS
Espermatozoides normais (%)	50,7 \pm 5,7	51 \pm 7,0	51,7 \pm 6,8	56,8 \pm 6,5	63,5 \pm 5,9	NS

*Comparação entre os tratamentos pelo teste Kruskal-Wallis.

A concentração de cortisol plasmático foi diferente apenas entre o controle (sem o uso de anestésico) e os tratamentos que utilizaram 40 e 50 mg/L de eugenol, sendo que estes apresentaram menores valores (FIGURA 4).

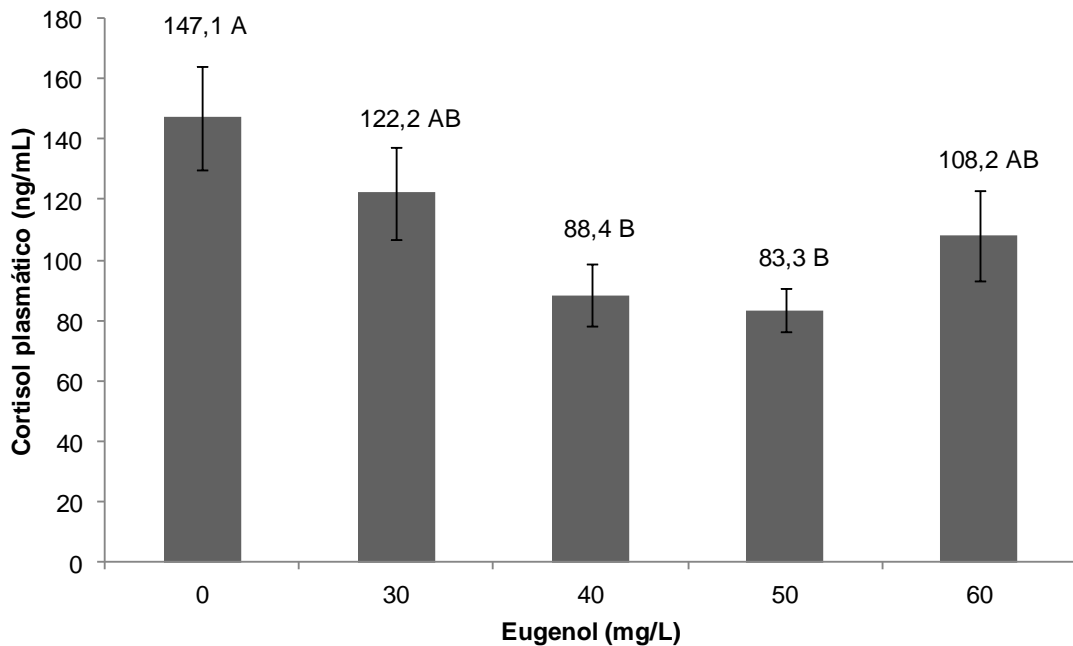


FIGURA 4. Cortisol plasmático dos reprodutores de *R. quelen*, submetidos a cinco concentrações de eugenol (0, 30, 40, 50 e 50 mg/L). *Valores com diferença estatística ($P < 0,05$) estão representados por letras diferentes. Comparação entre médias pelo teste Tukey. Barra de erro representa o erro padrão da média.

4. DISCUSSÃO

A reprodução induzida, que é um fator estressante para peixes (VIDAL *et al.*, 2007), é significativamente facilitada com o uso de anestésicos (WAGNER *et al.*, 2002). Este fato também foi evidenciado em nosso estudo, pois os animais não reagiram à manipulação, possibilitando um manejo mais fácil e rápido. O uso de anestésicos naturais em aquicultura pode ser benéfico por reduzir o estresse causado aos animais e riscos operacionais e residuais para os seres humanos (SAYDMOHAMMED & PAL, 2009), sendo o eugenol uma opção viável. De acordo com Fish *et al.* (2008), a concentração de eugenol usada deve ser entre 25 e 60 mg/L. A melhor concentração para indução e recuperação de *R. voulezi* é 50 mg/L (DIEMER *et al.*, 2012). Já, de acordo com Gomes *et al.* (2011), a sedação de *R. quelen* é alcançada com doses de 20 mg/L de eugenol, mas para anestésiar os animais, as concentrações não devem ser inferiores a 40 mg/L. Porém, Bolner e Baldisserotto (2007) usaram 32 mg/L para anestésiar juvenis dessa espécie. Quanto aos reprodutores de *R. quelen* deste estudo, o quarto estágio de anestesia, que é considerado um parâmetro que evidencia a ação anestésica, foi alcançado com todas as concentrações de eugenol utilizadas (30, 40, 50 e 60 mg/L).

Como citado anteriormente, a reprodução induzida gera estresse aos animais e como resposta primária deste processo, ocorre liberação de corticosteroides, como o cortisol (LIMA *et al.*, 2006). A concentração basal de cortisol em machos de *R. quelen* é 15,86 ng/mL, após estresse agudo a concentração passa para 158,12 ng/mL (BARCELLOS *et al.*, 2001). Os machos de *R. quelen* submetidos à reprodução induzida atingiram o pico de cortisol com 147,1 ng/mL, quando não se utilizou anestésico antes do manejo. Já as menores concentrações de cortisol, 88,4 e 83,3 ng/mL, ocorreram após o uso de 40 e 50 mg/L de eugenol, respectivamente, confirmando que o uso de anestésico no manejo reduziu o estresse causado aos reprodutores. Por outro lado, com o uso da maior concentração de eugenol, 60 mg/L, o cortisol plasmático foi 108,2 ng/mL, não havendo diferença estatística das concentrações obtidas sem o uso de anestésico e com a concentração de 30 mg/L de eugenol, portanto não reduziram o estresse induzido aos animais. O controle da resposta ao estresse depende do tipo e da concentração de anestésico utilizado, pois o próprio anestésico pode ser um fator estressante (WAGNER *et al.*, 2002), o que pode explicar os resultados obtidos após o uso da dose mais elevada de eugenol (60 mg/L) nos reprodutores de *R. quelen*. Neste caso, foram observadas menores taxa e tempo de motilidade espermática, além da funcionalidade mitocondrial reduzida, apesar de os reprodutores não terem apresentado diferença nos níveis de cortisol plasmático, quando comparados ao controle e à dose de 30 mg/L de eugenol.

Sabe-se que o cortisol induz inúmeros efeitos deletérios sobre a reprodução em machos (MILLA *et al.*, 2009), como contagem espermática reduzida em *Oncorhynchus mykiss* submetidos ao estresse agudo repetidamente (CAMPBELL *et al.*, 1992). Por outro lado, de acordo com

Campbell *et al.* (1994), o estresse crônico não alterou a contagem espermática de *O. mykiss*. No sêmen do *R. quelen*, também não foi evidente a diferença nas concentrações espermáticas, o que sugere que níveis elevados de cortisol não influenciam diretamente este parâmetro para a espécie. A taxa de fertilização também não apresentou diferença entre os tratamentos utilizados, sendo este um resultado positivo, pois não houve queda nos níveis produtivos independentemente do tratamento utilizado, possibilitando, dessa forma, conciliar a redução no cortisol plasmático dos reprodutores com a manutenção da produtividade.

De acordo com Bobe e Labbé (2010) o aumento do cortisol reduz a motilidade espermática em *O. mykiss*. Este perfil é antagônico ao observado com o sêmen fresco de *R. quelen*, pois na ausência do eugenol a concentração de cortisol sanguíneo foi mais elevada do que utilizando concentrações de 40 e 50 mg/L de eugenol e não houve diferença na motilidade espermática entre estes tratamentos. Deste modo, não é possível afirmar que a motilidade aumenta à medida que o cortisol reduz nesta espécie. Segundo Wagner *et al.* (2002) a porcentagem de espermatozoides móveis não é afetada pelo tipo e pela concentração de anestésico usado. Porém, os autores afirmam que o tempo de motilidade é inversamente proporcional à dose de eugenol utilizada. Esta relação não foi observada com clareza no presente estudo, porém quando criopreservado, o sêmen coletado após o uso da dose mais elevada de eugenol (60 mg/L) teve tempo de motilidade menor em relação às doses mais baixas do anestésico.

Embora a criopreservação de sêmen induza perda de qualidade devido ao severo estresse osmótico e térmico aos quais as células espermáticas são expostas, o comportamento da taxa e do tempo de motilidade espermática do sêmen criopreservado foram sensivelmente afetados quando os reprodutores de *R. quelen* foram expostos à concentração de 60 mg/L de eugenol. A motilidade espermática em peixes é um dos parâmetros fundamentais, se não o principal indicador qualitativo do sêmen (HONEYFIELD & KRISE, 2000). Em nosso estudo, a redução na taxa de motilidade ocorreu apenas no tratamento que utilizou 60 mg/L de eugenol para o sêmen fresco, em comparação ao controle. Já para o sêmen descongelado a taxa de motilidade foi menor nas duas concentrações mais altas (50 e 60 mg/L de eugenol) quando comparadas ao controle e a concentração intermediária de eugenol (40 mg/L). Desse modo, a utilização da concentração mais elevada de eugenol (60 mg/L) no manejo reprodutivo de *R. quelen* não é indicada de acordo com os resultados obtidos.

As mitocôndrias são as responsáveis pelo fornecimento de ATP para as células, e sabe-se que os níveis de ATP em espermatozoides de peixes são suficientes apenas para manter a motilidade de alguns segundos à no máximo alguns minutos (CABRITA *et al.*, 2010). Sabe-se, também, que a redução no número de mitocôndrias funcionais pode reduzir o ATP intracelular, que é produzido somente quando a mitocôndria está intacta. Baixos níveis de ATP podem causar funcionamento inadequado das bombas iônicas e desestabilização da membrana plasmática (BAULNY *et al.*, 1997). Este fato

reforça a possibilidade de 60 mg/L de eugenol ser um fator estressante para os peixes, pois a funcionalidade mitocondrial obtida com esse tratamento foi a única a não se igualar aos demais valores deste parâmetro, apresentando valores inferiores.

De acordo com Viveiros e Godinho (2009) a criopreservação de sêmen de *R. quelen* só havia sido testada por Fogli da Silveira *et al.*, em 1985, que afirmou ser possível a criopreservação de sêmen desta espécie utilizando como solução crioprotetora: NaCl, NaHCO₃, KCl, glicose e gema de ovo. Carneiro *et al.* (2006) testou a refrigeração ($5,7 \pm 1,2^{\circ}\text{C}$) de sêmen desta espécie durante 12 dias e obteve resultados satisfatórios. Carosfeld *et al.* (2003) recomenda como protocolo de criopreservação para peixes de couro o uso de leite em pó com glicose, como crioprotetor extracelular, combinado com metanol ou DMSO, como crioprotetor intracelular. Já o BTS é um diluente comercial desenvolvido para armazenar sêmen suíno em 15-18 °C durante três a cinco dias, mas sabe-se que tem sido usado com sucesso em sêmen de espécies nativas de peixe (MARIA *et al.*, 2006; STREIT Jr., 2013). O sêmen de *R. quelen* foi criopreservado em temperaturas de -196°C no nitrogênio líquido e manteve boa taxa e tempo de motilidade, associando-se o BTS com os crioprotetores utilizados, metanol e DMSO.

CONCLUSÃO

É possível conciliar o bem-estar dos reprodutores de *R. quelen* com bons índices reprodutivos, pois a redução no cortisol plasmático ocorreu com o uso de doses de 40 e 50 mg/L de eugenol, em comparação ao controle. Já a qualidade seminal foi comprometida apenas quando utilizadas concentrações mais elevadas de eugenol, 60 mg/L no sêmen fresco e 50 e 60 mg/L no sêmen criopreservado. Portanto, o uso de 40 mg/L de eugenol foi a concentração que apresentou resultados mais favoráveis para conciliar manejo e índices reprodutivos com a redução do estresse causado aos peixes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, W. G.; MCKINLEY, R. S.; COLAVECCHIA, M. The use of clove oil as an anesthetic for rainbow trout and its effects on swimming performance. **North American Journal of Fisheries Management**, Bethesda, v. 17, n. 2, p. 301-307, 1997.

BARCELLOS, L. J. G. et al. Plasma levels of cortisol and glucose In response to capture and tank transference in *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard), a South American catfish. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 32, n. 2, p. 121-123, 2001.

BARTON, B. A.; MORGAN, J. D.; VIJAYAN, M. M. Physiological and condition-related indicators of environmental stress in fish. In: _____ **Biological indicators of aquatic ecosystem stress**. Maryland: Adams S. M. (ed.), 2002. cap. 4, p. 111-148.

BARTON, B. A.; IWAMA, G. K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. **Annual Review of Fish Diseases**, Saskatoon, v. 1, p. 3-26, 1991.

BAULNY, B. O. et al. Flow cytometric evaluation of mitochondrial activity and membrane integrity in fresh and cryopreserved rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. **Cryobiology**, New York, v. 34, n. 2, p. 141–149, 1997.

BENCHARIF, D. et al. The advantages of combining low-density lipoproteins with glutamine for cryopreservation of canine semen. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 45, n. 2, p. 189 –200, 2010.

BILLARD, R. et al. Sperm physiology and quality, In: BROMAGE, N.; ROBERTS, R. J. (Ed.). **Broodstock Management and Egg Larval Quality**. Oxford: Blackwell Science, 1995. p. 25-52.

BOBE, J.; LABBÉ, C. Egg and sperm quality in fish. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 165, n. 3, p. 535–548, 2010.

BOLNER, K. C. S.; BALDISSEROTTO, B. Water pH and urinary excretion in silver catfish *Rhamdia quelen*. **Journal of Fish Biology**, London, v. 70, n. 1, p. 50–64, 2007.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim da Pesca e Aquicultura Brasil 2010**. Brasília: Ministério da Pesca e Aquicultura, 2012. 128 p.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura 2011**. Brasília: Ministério da Pesca e Aquicultura, 2013. 60 p.

CABRITA, E. et al. Review article: Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. **Journal of Applied Ichthyology**, Berlin, v. 26, n. 5, p. 623–635, 2010.

CAMPBELL, P. M.; POTFINGER, T. G.; SUMPTER, J. P. Stress reduces the quality of gametes produced by Rainbow Trout. **Biology of Reproduction**, New York, v. 47, n. 6, p. 1140-1150, 1992.

CAMPBELL, P. M.; POTTINGERB, T. G.; SUMPTER, J. P. Preliminary evidence that chronic confinement stress reduces the quality of gametes produced by brown and rainbow trout. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 120, n. 1-2, p. 151-169, 1994.

CARNEIRO, P. C. F. et al. Viabilidade do sêmen do jundiá, *Rhamdia quelen*, armazenado sob refrigeração. **Revista Acadêmica**, Curitiba, v. 4, n. 3, p. 11-16, 2006.

CARNEIRO, P. C. F. Tecnologias de produção e armazenamento de sêmen de peixes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 31, n. 3, p. 361-366, 2007.

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

DIEMER, O. et al. Eugenol como anestésico para jundiá (*Rhamdia voulezi*) em diferentes pesos. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 4, p. 1495-1500, 2012.

FERREIRA, A. A. et al. Avaliação qualitativa e quantitativa do sêmen do jundiá, *Rhamdia quelen*. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 57-60, 2001.

FISH, R. E. et al. Anesthesia and analgesia in laboratory animals. In: STOSKOPF, M.; POSNER, L. P. **Anesthesia and Restraint of Laboratory Fish**. Amsterdam: American College of Laboratory Animal Medicine Series, 2008. cap. 21, p. 519-533.

FOGLI DA SILVEIRA, W.; KAVAMOTO, F. T.; NARAHARA, M. Y. Avaliação da qualidade e crio-preservação em forma de “pellets” do sêmen do bagre, *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 12, n. 4, p. 7-11, 1985.

GOMES, D. P. et al. Water parameters affect anaesthesia induced by eugenol in silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 42, n. 6, p. 878-886, 2011.

GONÇALVES, A. F. N. et al. Mentol e eugenol como substituto da benzocaína na indução anestésica de juvenis de pacu. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, Maringá, v. 30, n. 3, p. 339-344, 2008.

HARRISON, R. A. P.; VICKERS, S. E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 88, n. 1, p. 343–352, 1990.

HE, S.; WOODS, L. C. Effects of dimethyl sulfoxide and glycine on cryopreservation induced damage of plasma membranes and mitochondria to striped bass (*Morone saxatilis*) sperm. **Cryobiology**, New York, v. 48, n. 3, p. 254–262, 2004.

HONEYFIELD, D. C.; KRISE, W. F. Measurement of milt quality and factors affecting viability. In: TIERSCH, T. R.; MAZIK, P. M. **Cryopreservation in aquatic species**. Baton Rouge: Journal of World Aquaculture Society, 2000. p. 49-58.

IVERSEN, M. et al. The efficacy of metomidate, clove oil, Aqui-Sk and BenzoakR as anaesthetics in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts, and their potential stress-reducing capacity. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 221, p. 549–566, 2003.

LIMA, L. C. et al. Estresse em peixes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 30, n. 3-4, p.113-117, 2006.

MARIA, A. N. et al. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 260, n. 1-4, p. 298-306, 2006.

MILLA, S. et al. Corticosteroids: Friends or foes of teleost fish reproduction? **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, Texas, v. 153, n. 3, p. 242–251, 2009.

NINHAUS-SILVEIRA, A. et al. Seminal Analysis, Cryogenic Preservation, and Fertility in Matrinxã Fish, *Brycon cephalus* (Günther, 1869). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 49, n. 4, p. 651-659, 2006.

PIRHONEN, J.; SCHRECK, C. B. Effects of anaesthesia with MS-222, clove oil and CO₂ on feed intake and plasma cortisol in steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 220, n. 1-4, p. 507-514, 2003.

RURANGWA, E. et al. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 234, n. 1-4, p. 1 – 28, 2004

SAYDMOHAMMED, M.; PAL, A. K. Anesthetic effect of eugenol and menthol on handling stress in *Macrobrahium rosenbergii*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 298, n. 1-2, p. 162–167, 2009.

SCHRECK, C. B. Stress and fish reproduction: The roles of allostasis and hormesis. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 165, n. 3, p. 549–556, 2010.

STREIT JUNIOR, D. P. Biotecnologias reprodutivas aplicadas à piscicultura. In: BARCELLOS, L. G.; FAGUNDES, M.; FERREIRA, D. **Workshop sobre jundiá - História e perspectivas**. Passo Fundo: Editora da Universidade de Passo Fundo, 2013. p. 152-163.

VIDAL, L. V. O et al. Influência do peso de juvenis de matrinxã (*Brycon cephalus*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*) à ação anestésica do eugenol. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 8, n. 3, p. 212-216, 2007.

VIVEIROS, A. T. M.; GODINHO, H. P. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. **Fish Physiology Biochemistry**, Dordrecht, v. 35, p. 137–150, 2009.

WAGNER, E.; ARNDT, R.; HILTON, B. Physiological stress responses, egg survival and sperm motility for rainbow trout broodstock anesthetized with clove oil, tricaine methanesulfonate or carbon dioxide. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 211, n. 1-4, p. 353–366, 2002.

WOODY, C. A.; NELSON, J.; RAMSTAD, K. Clove oil as an anaesthetic for adult sockeye salmon: field trials. **Journal of Fish Biology**, London, v. 60, n. 2, p. 340–347, 2002.

ZANIBONI-FILHO, E.; NUÑER, A. P. O. Fisiologia da reprodução e propagação artificial dos peixes. In: CYRINO, J. E. P. (Ed.). et al. **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, 2004, p. 45-73.

CAPÍTULO 3

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A oportunidade de desenvolver a produção de espécies nativas é evidente devido ao potencial brasileiro para a produção aquícola. Ressalta-se que o mercado consumidor tem demonstrado crescente interesse pelo bem-estar animal. Portanto, para atender a essas demandas, novos estudos se fazem necessários para identificar e reduzir o estresse causado aos peixes nos diferentes manejos adotados em pisciculturas. Dessa forma, é possível aliar os interesses do mercado consumidor com ganhos e facilidades para os produtores, pois a imobilidade dos animais no momento da coleta torna o manejo mais fácil e ágil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, W. G.; MCKINLEY, R. S.; COLAVECCHIA, M. The use of clove oil as an anesthetic for rainbow trout and its effects on swimming performance. **North American Journal of Fisheries Management**, Bethesda, v. 17, n. 2, p. 301-307, 1997.

BALDISSEROTTO, B.; RADÜNZ NETO, J. Jundiá (*Rhamdia sp.*). In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. (Org.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: Editora da UFSM, 2005. cap. 13, p. 303-319.

BARCELLOS, L. J. G.; QUEVEDO, R. M.; SILVA, L. B. Policultivo: as espécies propostas. In: BARCELLOS, L. J. G.; FAGUNDES, M. **Policultivo de jundiás, tilápias e carpas uma alternativa de produção para a piscicultura rio-grandense**. Passo Fundo: UPF Editora, 2012. cap. 4, p. 95-116.

BARCELLOS, L. J. G. et al. Plasma levels of cortisol and glucose in response to capture and tank transference in *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard), a South American catfish. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 32, n. 2, p. 121-123, 2001.

BARTON, B. A.; MORGAN, J. D.; VIJAYAN, M. M. Physiological and condition-related indicators of environmental stress in fish. In: _____ **Biological indicators of aquatic ecosystem stress**. Maryland: Adams S. M. (ed.), 2002. cap. 4, p. 111-148.

BARTON, B. A.; IWAMA, G. K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. **Annual Review of Fish Diseases**, Saskatoon, v. 1, p. 3-26, 1991.

BAULNY, B. O. et al. Flow cytometric evaluation of mitochondrial activity and membrane integrity in fresh and cryopreserved rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. **Cryobiology**, New York, v. 34, n. 2, p. 141-149, 1997.

BENCHARIF, D. et al. The advantages of combining low-density lipoproteins with glutamine for cryopreservation of canine semen. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 45, n. 2, p. 189-200, 2010.

BILLARD, R. et al. Sperm physiology and quality, In: BROMAGE, N.; ROBERTS, R. J. (Ed.). **Broodstock Management and Egg Larval Quality**. Oxford: Blackwell Science, 1995. p. 25-52.

BOBE, J.; LABBÉ, C. Egg and sperm quality in fish. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 165, n. 3, p. 535–548, 2010.

BOLASINA, S. N. Cortisol and hematological response in Brazilian codling, *Urophycis brasiliensis* (Pisces, Phycidae) subjected to anesthetic treatment. **Aquaculture International**, Oostende, v. 14, n. 6, p. 569–575, 2006.

BOLNER, K. C. S.; BALDISSEROTTO, B. Water pH and urinary excretion in silver catfish *Rhamdia quelen*. **Journal of Fish Biology**, London, v. 70, n. 1, p. 50–64, 2007.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim da Pesca e Aquicultura Brasil 2010**. Brasília: Ministério da Pesca e Aquicultura, 2012. 128 p.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura 2011**. Brasília: Ministério da Pesca e Aquicultura, 2013. 60 p.

CABRITA, E. et al. Review article: Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. **Journal of Applied Ichthyology**, Berlin, v. 26, n. 5, p. 623–635, 2010.

CAMPBELL, P. M.; POTFINGER, T. G.; SUMPTER, J. P. Stress reduces the quality of gametes produced by Rainbow Trout. **Biology of Reproduction**, New York, v. 47, n. 6, p. 1140-1150, 1992.

CAMPBELL, P. M.; POTTINGERB, T. G.; SUMPTER, J. P. Preliminary evidence that chronic confinement stress reduces the quality of gametes produced by brown and rainbow trout. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 120, n. 1-2, p. 151-169, 1994.

CARNEIRO, P. C. F. et al. Viabilidade do sêmen do jundiá, *Rhamdia quelen*, armazenado sob refrigeração. **Revista Acadêmica**, Curitiba, v. 4, n. 3, p. 11-16, 2006.

CARNEIRO, P. C. F. Tecnologias de produção e armazenamento de sêmen de peixes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 31, n. 3, p. 361-366, 2007.

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

DIEMER, O. et al. Eugenol como anestésico para jundiá (*Rhamdia voulezi*) em diferentes pesos. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 4, p. 1495-1500, 2012.

FERREIRA, A. A. et al. Avaliação qualitativa e quantitativa do sêmen do jundiá, *Rhamdia quelen*. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 57-60, 2001.

FISH, R. E. et al. Anesthesia and analgesia in laboratory animals. In: STOSKOPF, M.; POSNER, L. P. **Anesthesia and Restraint of Laboratory Fish**. Amsterdam: American College of Laboratory Animal Medicine Series, 2008. cap. 21, p. 519-533.

FOGLI DA SILVEIRA, W.; KAVAMOTO, F. T.; NARAHARA, M. Y. Avaliação da qualidade e crio-preservação em forma de “pellets” do sêmen do bagre, *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 12, n. 4, p. 7-11, 1985.

GOMES, D. P. et al. Water parameters affect anaesthesia induced by eugenol in silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 42, n. 6, p. 878-886, 2011.

GOMES, L. C. et al. Biologia do Jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 1, p. 179-185, 2000.

GONÇALVES, A. F. N. et al. Mentol e eugenol como substituto da benzocaína na indução anestésica de juvenis de pacu. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, Maringá, v. 30, n. 3, p. 339-344, 2008.

HARRISON, R. A. P.; VICKERS, S. E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 88, n. 1, p. 343–352, 1990.

HE, S.; WOODS, L. C. Effects of dimethyl sulfoxide and glycine on cryopreservation induced damage of plasma membranes and mitochondria to striped bass (*Morone saxatilis*) sperm. **Cryobiology**, New York, v. 48, n. 3, p. 254–262, 2004.

HONEYFIELD, D. C.; KRISE, W. F. Measurement of milt quality and factors affecting viability. In: TIERSCH, T. R.; MAZIK, P. M. **Cryopreservation in aquatic species**. Baton Rouge: Journal of World Aquaculture Society, 2000. p. 49-58.

IVERSEN, M. et al. The efficacy of metomidate, clove oil, Aqui-Sk and BenzoakR as anaesthetics in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts, and their potential stress-reducing capacity. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 221, p. 549–566, 2003.

JUN, L.; QINGHUA, L.; SHICUI, Z. Evaluation of the damage in fish spermatozoa cryopreservation. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, Cidade, v. 24, n. 4, p. 370-377, 2006.

KUBITZA F.; CAMPOS J. L.; BRUM, J. A. Surubim: produção intensiva no Projeto Pacu Ltda. e Agropeixe Ltda. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, v. 49, p. 25-32, 1998.

LIMA, L. C. ET AL. Estresse em peixes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 30, n. 3-4, p.113-117, 2006.

MARIA, A. N. et al. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 260, n. 1-4, p. 298-306, 2006.

MARIA, A. N.; AZEVEDO, H. C.; CARNEIRO, P. C. F. **Protocolo para Criopreservação do Sêmen de Tambaqui (*Colossoma macropomum*)**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2011. 8 p.

MILLA, S. et al. Corticosteroids: Friends or foes of teleost fish reproduction? **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, Texas, v. 153, n. 3, p. 242–251, 2009.

NINHAUS-SILVEIRA, A. et al. Seminal Analysis, Cryogenic Preservation, and Fertility in Matrinxã Fish, *Brycon cephalus* (Günther, 1869). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 49, n. 4, p. 651-659, 2006.

PEGG, D. E. Principles of Cryopreservation. In: DAY, J. G.; STACEY, G. N. (Ed.). **Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols**. New Jersey: Humana Press, 2007. p. 39-58.

PIRHONEN, J.; SCHRECK, C. B. Effects of anaesthesia with MS-222, clove oil and CO₂ on feed intake and plasma cortisol in steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 220, n. 1-4, p. 507-514, 2003.

ROUBACH, R.; GOMES, L. C. O Uso de Anestésicos Durante o Manejo de Peixes. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 66, p. 37-40, 2001.

RURANGWA, E. et al. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 234, n. 1-4, p. 1 – 28, 2004

SAYDMOHAMMED, M.; PAL, A. K. Anesthetic effect of eugenol and menthol on handling stress in *Macrobrachium rosenbergii*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 298, n. 1-2, p. 162–167, 2009.

SCHRECK, C. B. Stress and fish reproduction: The roles of allostasis and hormesis. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 165, n. 3, p. 549–556, 2010.

STREIT JUNIOR, D. P. et al. Motilidade, vigor e patologias seminal *in natura* e pós criopreservação de *Piaractus mesopotamicus*. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 35, n. 2, p. 159-167, 2009.

STREIT JUNIOR, D. P. Biotecnologias reprodutivas aplicadas à piscicultura. In: BARCELLOS, L. G.; FAGUNDES, M.; FERREIRA, D. **Workshop sobre jundiá - História e perspectivas**. Passo Fundo: Editora da Universidade de Passo Fundo, 2013. p. 152-163.

VELÍSEK, J. et al. Effects of Clove Oil Anaesthesia on European Catfish (*Silurus glanis* L.). **Acta Veterinaria Brno**, Brno, v. 75, n. 1, p. 99–106, 2006.

VELÍSEK, J.; SVOBODOVA, Z.; PIACKOVA, V. Effects of Clove Oil Anaesthesia on Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Acta Veterinaria Brno**, Brno, v. 74, p. 139-146, 2005.

VIDAL, L. V. O et al. Influência do peso de juvenis de matrinxã (*Brycon cephalus*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*) à ação anestésica do eugenol. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 8, n. 3, p. 212-216, 2007.

VIVEIROS, A. T. M.; GODINHO, H. P. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. **Fish Physiology Biochemistry**, Dordrecht, v. 35, p. 137–150, 2009.

WAGNER, E.; ARNDT, R.; HILTON, B. Physiological stress responses, egg survival and sperm motility for rainbow trout broodstock anesthetized with clove oil, tricaine methanesulfonate or carbon dioxide. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 211, n. 1-4, p. 353–366, 2002.

WOODY, C. A.; NELSON, J.; RAMSTAD, K. Clove oil as an anaesthetic for adult sockeye salmon: field trials. **Journal of Fish Biology**, London, v. 60, n. 2, p. 340–347, 2002.

ZANIBONI-FILHO, E.; NUÑER, A. P. O. Fisiologia da reprodução e propagação artificial dos peixes. In: CYRINO, J. E. P. (Ed.). et al. **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, 2004, p. 45-73.

VITA

Maira Nesello Corso, filha de Eda Nesello Corso e Mario Corso, brasileira, nascida em Caxias do Sul-RS, em 29 de agosto de 1986. Concluiu o ensino fundamental no Colégio São João Batista e o ensino médio na Escola Estadual de Ensino Médio Santa Catarina em 2003. Em 2005 ingressou no curso de Medicina Veterinária, na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Durante a graduação, foi bolsista do Setor de Aquicultura da UFRGS (AQUAM - Grupo de Pesquisa em Conservação e Produção de Organismos Aquáticos) de 2008 a 2010. Em março de 2012 foi aprovada no processo seletivo do Programa de Pós-graduação em Zootecnia da UFRGS, onde iniciou o curso de mestrado, como bolsista da CAPES.