

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

RONAN MACIEL MARCOS

Parâmetros seminais e espermáticos, estocagem e criopreservação do sêmen do
surubim do Iguaçu, *Steindachneridion melanoderdatum* (Garavello, 2005)

Toledo

2012

RONAN MACIEL MARCOS

Parâmetros seminais e espermáticos, estocagem e criopreservação do sêmen do surubim do Iguaçu, *Steindachneridion melanoderdatum* (Garavello, 2005)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca – Nível de Mestrado, do Centro de Engenharias e Ciências Exatas, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

Área de concentração: Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

Orientador: Prof. Dr. Robie Allan Bombardelli

Toledo

2012

Marcos, Ronan Maciel

M321p Parâmetros seminais e espermáticos, estocagem e criopreservação do sêmen do Surubim do Iguaçu, *Steindachneridion melanoderdatum* (Garavello, 2005) / Ronan Maciel Marcos. - Toledo, PR: Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2012.
71 f.

Orientador: Prof. Dr. Robie Allan Bombardelli
Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca) – Universidade Estadual do Oeste Do Paraná. Centro de Engenharias e Ciências Exatas, 2012.

1. Aquicultura. 2. Surubim do Iguaçu (Peixe) – sêmen 3. Surubim do Iguaçu (Peixe) – criopreservação. 4. Surubim do Iguaçu (Peixe) – Espermatozóide. I. Bombardelli, Robie Allan. II. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. III. Título.

CDD 22. ed. 597

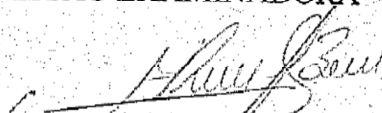
FOLHA DE APROVAÇÃO

RONAN MACIEL MARCOS

Parâmetros seminais e espermáticos, estocagem e criopreservação do sêmen do surubim do Iguaçu, *Steindachneridion melanoderdatum* (Garavello, 2005)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca – Nível de Mestrado, do Centro de Engenharias e Ciências Exatas, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca, pela Comissão Examinadora composta pelos membros:

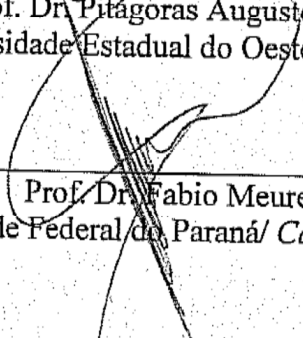
COMISSÃO EXAMINADORA



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



Prof. Dr. Pitágoras Augusto Piana
Universidade Estadual do Oeste do Paraná



Prof. Dr. Fabio Meurer
Universidade Federal do Paraná/ Campus Palotina

Aprovado em: 24 de fevereiro de 2012.

Local de defesa: auditório do GERPEL - Unioeste/Campus de Toledo.

DEDICATÓRIA

A família e amigos.

AGRADECIMENTOS

À minha família pelo apoio incondicional.

À Marisa pelo apoio e companheirismo.

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná e todos os seus professores e servidores.

Ao orientador e amigo Robie Allan Bombardelli, pela orientação e conselhos durante estes anos.

Aos amigos e colegas do LATRAAC em especial à Cesar, Giovano, Eduardo, Fernando, Lucélia e Eduardo, pelo apoio na execução deste trabalho.

Aos professores Fábio Meurer, Gilmar Baumgartner e Pitágoras Augusto Piana pelas avaliações e sugestões.

Aos amigos e funcionários da Companhia Paranaense de Energia – COPEL, Eder, Eder Felipe e Luiz.

Ao apoio institucional da Companhia Paranaense de Energia – COPEL.

A todos os meus amigos e pessoas com quem convivo.

Parâmetros seminais e espermáticos, estocagem e criopreservação do sêmen do surubim do Iguaçu, *Steindachneridion melanodermatum* (Garavello, 2005)

RESUMO

Os objetivos deste estudo foram: avaliar os parâmetros seminais e espermáticos de *Steindachneridion melanodermatum*, bem com o efeito da diluição, da temperatura e tempo de estocagem do sêmen, além de avaliar a motilidade e descrever a cinética da ativação de células espermáticas de *S. melanodermatum* criopreservadas em diferentes soluções diluidoras. Para a realização do trabalho este foi dividido em duas seções: a) Parâmetros seminais e espermáticos do surubim do Iguaçu e estocagem do sêmen por curto prazo e b) Motilidade e cinética da ativação de células espermáticas criopreservadas em diferentes diluidores. No primeiro ensaio foi coletado o sêmen de nove machos, induzidos hormonalmente. Avaliou-se os parâmetros: motilidade espermática (MOT), velocidade curvilínea (VCL), velocidade em linha reta (VLR), velocidade média de deslocamento (VMD), velocidade espermática (VE), tempo total de ativação espermática (TEMP), concentração espermática (CONC), índice de normalidade morfológica dos espermatozoides (NORM), osmolaridade do plasma seminal (OSM) e pH do sêmen (pH). Amostras do sêmen foram estocadas em microtubos para a avaliação do efeito da diluição (solução aquosa contendo 5% de frutose e 5% de leite em pó), temperatura (10 e 25°C) e tempo de estocagem (0, 5, 9, 18, 27, 36, 45, 54 horas) do sêmen sobre a MOT, VCL, VLR, VMD, TEMP. Os machos liberaram em média $10,57 \pm 6,28$ mL e os espermatozoides apresentaram $99,86 \pm 0,31\%$ de MOT, $185,58 \pm 14,11 \mu\text{m.s}^{-1}$ de VCL, $49,15 \pm 4,66 \mu\text{m.s}^{-1}$ de VLR, $87,02 \pm 4,13 \mu\text{m.s}^{-1}$ de VMD, $106,52 \pm 4,45 \mu\text{m.s}^{-1}$ de VE, $79,31 \pm 5,62$ s de TEMP, $1,03 \times 10^{10} \pm 3,65 \times 10^9$ células.mL⁻¹ de CONC, $75,81 \pm 5,71\%$ de NORM, $258,78 \pm 29,36$ mOsm de OSM e $7,11 \pm 0,31$ de pH. No segundo ensaio foram coletadas amostras de sêmen de cinco machos, induzidos hormonalmente, que foram submetidas protocolo de criopreservação com a utilização de doze soluções diluidoras, formuladas com a utilização de glicose, frutose, leite em pó, DMSO, propileno glicol e metanol. O sêmen criopreservado foi descongelado e avaliado quanto aos parâmetros: motilidade espermática (10s após a ativação), motilidade inicial teórica, velocidade espermática, índice de normalidade, e os tempos decorridos para que 75%, 50% e 25% dos espermatozoides permanecessem móveis. O sêmen fresco foi avaliado em relação aos mesmos parâmetros. A solução contendo 2,5% frutose, 5% leite em pó e 10% metanol

apresentou maior ($P < 0,05$) índice de normalidade ($71,13 \pm 4,79\%$) e maior motilidade inicial ($85,56 \pm 15,31\%$). Com a utilização da solução contendo 5% frutose, 5% leite em pó e 10% metanol foram encontrados maiores médias para os parâmetros: motilidade espermática em 10s após a ativação ($78,99 \pm 27,20\%$), velocidade espermática ($75,62 \pm 18,76 \mu\text{m.s}^{-1}$) e esta solução prolongou a ativação espermática. As amostras de sêmen estocadas não diluídas e mantidas a 10 ou 25°C apresentaram maiores médias para MOT. Indica-se a estocagem do sêmen *S. melanoderdatum* não diluído por até 27 horas e a criopreservação com a utilização de solução crioprotetora contendo 5% frutose, 5% de leite em pó e 10% de metanol em solução aquosa.

Palavras-chave: Reprodução. espermatozóide. CASA

Spermatic and seminal parameters, storage and criopreservation of semen of surubim do Iguaçu, *Steindachneridion melanoderdatum* (Garavello, 2005)

ABSTRACT

The aim of this work were: evaluate sperm and seminal parameters of surubim-do-Iguaçu males and evaluate the effect of dilution, temperature and storage time of semen on them, besides determine the viability and describe the kinetics of activation of sperm cells of *S. melanoderdatum* cryopreserved in different extenders. For the realization this work was divided into two sections: a) Spermatic and seminal parameters of surubim do Iguaçu, and short-term semen storage. It was collected semen from nine males hormonally induced. The spermatic parameters evaluated were: sperm motility (MOT), curvilinear velocity (VCL), straight-line velocity (VSL), average path velocity (VAP), sperm velocity (SV), time total of sperm activation (TEMP), sperm concentration (CONC), normal sperm morphology index (NORM), seminal plasma osmolality (OSM) and pH of semen (pH). Samples of semen were stored in microtubes to evaluate the effect of dilution (aqueous solution containing 5% fructose and 5% milk powder), temperature (10 and 25°C) and storage time (0, 5, 9, 18, 27, 36, 45, 54 hours) on the MOT, VCL, VSL, VAP and TEMP. Males released on average 10.57 ± 6.28 mL and the sperm showed $99.86 \pm 0.31\%$ of MOT, $185.58 \pm 14.11 \mu\text{m.s}^{-1}$ of VCL, $49.15 \pm 4.66 \mu\text{m.s}^{-1}$ of VSL, $87.02 \pm 4.13 \mu\text{m.s}^{-1}$ of VAP, $106.52 \pm 4.45 \mu\text{m.s}^{-1}$ of VE, 79.31 ± 5.62 s of TEMP, $1.03 \times 10^{10} \pm 3.65 \times 10^9$ células.mL⁻¹ of CONC, $75.81 \pm 5.71\%$ of NORM, 258.78 ± 29.36 mOsm of OSM and 7.11 ± 0.31 of pH. b) Motility and kinetics activation of sperm cells cryopreserved in different extenders. Were collected semen samples from five males, hormonally induced, these submitted to the protocol of cryopreservation with the use of twelve extenders, formulated with the use of glucose, fructose, milk powder, DMSO, propylene glycol and methanol. The cryopreserved semen was thawed and evaluated for the parameters: sperm motility (in 10 seconds after activation), theoretical initial motility, sperm velocity, index of normality and the elapsed times for 75%, 50% and 25% of the sperm stay mobile. The fresh semen was evaluated for the same parameters. The solution containing 2.5% fructose, 5% milk powder and 10% methanol had higher ($P < 0.05$) rate of normality ($71.13 \pm 4.79\%$) and higher initial motility ($85.56 \pm 15.31\%$). By using the solution containing 5% fructose, 5% milk powder and 10% methanol was found highest averages for

the parameters: sperm motility in 10s after activation ($78.99 \pm 27.20\%$), sperm velocity ($75.62 \pm 18.76 \mu\text{m.s}^{-1}$) and this solution prolonged the sperm activation. The semen samples stored undiluted and maintained at 10 or 25°C showed higher averages for MOT. Is indicated storage of semen *S. melanoderdatum* un diluted until 27 hours and cryopreservation using the extender solution containing 5% fructose, 5% milk powder and 10% methanol in aqueous solution.

Keywords: CASA, spermatozoa, reproduction.

SUMÁRIO

Introdução	11
A espécie estudada	11
Biotécnicas reprodutivas aplicadas à reprodução de peixes	13
Caracterização seminal e espermática em peixes	14
Estocagem de sêmen de peixes	15
Criopreservação de sêmen de peixes	16
Referências bibliográficas	17
Parâmetros seminais e espermáticos do surubim do Iguaçu, <i>Steindachneridion melanoderdatum</i> (Garavello, 2005) e estocagem do sêmen por curtos períodos	21
Introdução	23
Material e métodos	24
Resultados	28
Discussão	30
Referencias bibliográficas	35
Motilidade e cinética da ativação de células espermáticas de <i>Steindachneridion melanoderdatum</i> (Garavello, 2005) criopreservadas em diferentes diluidores	46
Introdução	48
Material e métodos	49
Resultados	54
Discussão	62
Referências bibliográficas	65

Introdução

A espécie estudada

O gênero *Steindachneridion* pertencente à família Pimelodidae possui distribuição restrita a algumas bacias da América do Sul. Existem cinco espécies registradas correspondentes a este gênero, todas endêmicas de regiões distintas. Algumas espécies: *Steindachneridion scripta* dos rios Paraná e Uruguai; *Steindachneridion doceanum*, do rio Doce; *Steindachneridion parahybae* do rio Paraíba; *Steindachneridion amblyurum* do rio Jequitinhonha; e *Steindachneridion melanodermatum* do rio Iguaçu (GARAVELLO, 2005).

O surubim do Iguaçu, *Steindachneridion melanodermatum*, (GARAVELLO, 2005) é um bagre de grande porte, atingindo até 532 mm de comprimento total (GARAVELLO, 2005) Possui hábito carnívoro (ZANIBONI FILHO, MEURER *et al.*, 2004). A espécie é nativa da América do Sul com distribuição restrita a bacia do rio Iguaçu (FROESE & PAULY, 2012).

O rio Iguaçu é um afluente do rio Paraná e também o maior rio do estado do Paraná, Brasil. Os desníveis que originaram as quedas d'água fizeram este rio ser um dos maiores rios brasileiros na contribuição da geração de energia elétrica. Existem no seu percurso cinco represas para aproveitamento hidroelétrico (GUBIANI, FRANA *et al.*, 2010).

A região de ocorrência desta espécie na bacia do rio Iguaçu encontra-se altamente impactada, em decorrência de diversos represamentos e pela ocupação antrópica da região, fato que coloca esta espécie em risco de extinção (SANTT'ANA,

2009). Outro fato que contribui para o aumento do risco de extinção da espécie é o grande interesse que a espécie desperta para a pesca e para a piscicultura (ZANIBONI FILHO, MEURER *et al.*, 2004).

Outras espécies do mesmo gênero encontram-se em risco de extinção são elas: *Steindachneridion amblyura*, *Steindachneridion doceana*, *Steindachneridion parahybae* e *Steindachneridion scripta* (ROSA & LIMA, 2008). Sendo a produção total da pesca extrativa das diversas espécies de surubim é estimada em 8.361,5 toneladas, com capturas concentradas nos estados das regiões Norte, Nordeste e Sudeste (IBAMA, 2007).

O surubim do Iguaçu (*Steindachneridion melanoderdatum*, GARAVELLO, 2005) apresenta características de interesse zootécnico sendo elas: ótima qualidade de carne, ausência de espinhos intramusculares, bom rendimento de carcaça e exemplares selvagens com ótima adaptação ao cativeiro e às dietas artificiais. (FEIDEN, 2006; SANTT'ANA, 2009). LUDWIG, *et al.* (2009) destacam a importância de conhecer aspectos básicos da biologia das espécies nativas de peixes brasileiros, a exemplo da sua reprodução, para a manutenção e recuperação da diversidade e riqueza destas espécies.

Nas fêmeas aptas a reprodução observa-se um aumento do volume abdominal, flacidez da região ventral e papila urogenital hiperemiada (bem irrigada de sangue), enquanto nos machos se observa a fluidez do sêmen. Frequentemente animais com mais de um ano de vida e um quilo de peso vivo já possuem maturidade sexual (LUDWIG, GOMES *et al.*, 2009).

Após a aplicação de extrato hipofisário em duas doses os autores LUDWIG, GOMES *et al.*, (2009) descrevem a ocorrência de desova, que nesta espécie é total, ocorrida entre 260 ± 20 horas-grau e os ovos eclodiram após 18 horas de incubação. Os ovos recém fecundados apresentam diâmetro médio de 3,02mm e as larvas eclodem

com cerca de 4,67mm de comprimento padrão (NAKATANI *et al.*, 2001). Machos de surubim do Iguaçu podem ser considerados de fácil liberação de sêmen mediante estímulo hormonal (SANTT'ANA, 2009)

Em experimento realizado em tanques de piscicultura utilizando-se machos com peso entre 1,1 e 2,4 kg, submetidos ao tratamento de hipofisação, SANTT'ANA (2009) descreve que o volume de sêmen coletado variou entre 0,4 a 2,5 ml. A motilidade dos espermatozoides após a coleta manteve-se entre 85 a 292 segundos, quando ativada com água do tanque, e de 66 e 268 segundos, quando ativada em água destilada. Para a concentração espermática, os valores oscilaram entre 28 e 88 x 10⁶ espermatozoides/mm³.

Biotécnicas reprodutivas aplicadas à reprodução de peixes

Biotecnia por definição é arte de utilizar os animais e os vegetais, obtendo o maior proveito possível. Desta maneira utilização e o desenvolvimento de biotécnicas da reprodução animal são condições indispensáveis para o aumento da eficiência produtiva (FIGUEIREDO, 2007). O autor FIGUEIREDO (2008) considera que de forma geral são vantagens da sua utilização: ferramenta importante para compreensão da fisiologia reprodutiva; permite a multiplicação de animais geneticamente superiores; permite a formação de bancos de germoplasma animal; possibilita a reposição de espécies ameaçadas de extinção. Porém existem riscos envolvidos como: levar a perda de variabilidade genética quando utilizada de maneira indiscriminada e o risco de uma ruptura de barreiras éticas quando a manipulação da vida torna-se algo banal.

Caracterização seminal e espermática em peixes

Estudos de aspectos reprodutivos em peixes são fundamentais para o desenvolvimento e otimização dos cultivos, pois permitem o aproveitamento racional de gametas com boa qualidade e a identificação de reprodutores realmente eficazes (COWARD, BROMAGE *et al.*, 2002). No entanto, a mensuração destes parâmetros leva em conta somente a qualidade inicial dos ovócitos, ignorando em muitas ocasiões a qualidade do sêmen (RURANGWA, KIME *et al.*, 2004).

Neste sentido, com a caracterização seminal e espermática em peixes é possível a racionalização da utilização dos reprodutores através da utilização de uma dose inseminante adequada (BOMBARDELLI, MORSCHBACHER *et al.*, 2006); (STREIT JR., SIROL, *et al.*, 2008). Estas informações também servem como potencial ferramenta para a otimização do uso de sêmen criopreservado (SUQUET, DREANNO *et al.*, 2000). Além de contribuírem no desenvolvimento de tecnologias aplicadas na formação de bancos genéticos *in vivo* ou *in vitro* (ZANIBONI-FILHO & SCHULZ, 2003) destinados para fins de conservação da biodiversidade genética de espécies ou até mesmo em programas de melhoramento genético em fazendas de cultivo.

Diversos trabalhos têm sido realizados com o objetivo de estudar características seminais e espermáticas de espécies de peixes brasileiros, são algumas espécies: cascudo-preto (*Rhinelepis aspera*) (SANCHES, BOMBARDELLI, *et al.*, 2011); suruvi, (*Steindachneridion scripta*) (LUZ, FERREIRA, *et al.*, 2001), dourado (*Salminus brasiliensis*) (STREIT JR., SIROL, *et al.*, 2008a) e piapara (*Leporinus elongatus*) (STREIT JR., SIROL, *et al.*, 2008b)

Estocagem de sêmen de peixes

O objetivo da utilização de técnicas de estocagem de sêmen é a preservação de gametas por um curto período com um baixo custo, possibilitando a reprodução artificial de peixes em casos de liberação assincrônica de gametas (SANCHES, NEUMANN *et al.*, 2011).

A estocagem do sêmen pode ser realizada sob diversas condições, as principais variáveis que tem efeito sobre o processo de estocagem são: temperatura (SANCHES, NEUMANN *et al.*, 2011), atmosfera (DILAURO, KRISE *et al.*, 1994; MARQUES & GODINHO, 2004; SANCHES E CERQUEIRA, 2010), diluição em soluções específicas (MURGAS, MILIORINI *et al.*, 2004), presença de antioxidantes (Lahnsteiner & Mansour, 2010) e a utilização de antibióticos (VIVEIROS, ISAU *et al.*, 2010).

Diversos autores descrevem o processo de estocagem de sêmen de peixes por curtos períodos. O sêmen das espécies *Brycon lundii*, *Piaractus mesopotamicus*, *Leporinus elongatus*, *Leporinus friderici*, *Prochilodus lineatus* e *Prochilodus marggravii*, foi estocado por curtos períodos de tempo sob refrigeração, e possibilitou a manutenção da viabilidade espermática por até 20 horas (MARQUES & GODINHO, 2004). O sêmen de bagre africano foi estocado diluído em diversas soluções sob refrigeração, e não foram observadas reduções de motilidade espermática até 24 horas de estocagem, porém após 48 horas a motilidade espermática foi reduzida significativamente (KIME, EBRAHIMI *et al.*, 1996).

Criopreservação de sêmen de peixes

A criopreservação de sêmen pode ser utilizada para suprir diversas necessidades incluindo a obtenção de sêmen em tempos e locais diferentes e utilização em programas de melhoramento genético (GODINHO, AMORIM *et al.*, 2003). Além de possibilitar a preservação da heterogeneidade genética de uma espécie (MURGAS, FRANCISCATTO *et al.*, 2003)

Em procedimentos de criopreservação de células espermáticas de peixes, os principais componentes das soluções crioprotetoras são: a) diluidores - apresentam basicamente a função de evitar a ativação espermática e b) crioprotetores - impedem as crio-injúrias (VIVEIROS, OLIVEIRA *et al.*, 2009). Entretanto, existem variações quanto o tipo de componente e suas concentrações nestas soluções (CAROLSFELDT, GODINHO *et al.*, 2003).

A criopreservação de sêmen de peixes neotropicais tem sido bastante estudada nos últimos anos e protocolos efetivos tem sido determinados para o pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) (CAROLSFELDT, GODINHO *et al.*, 2003); o jundiá (*Rhamdia hillari*). (FOGLI DA SILVEIRA, KAVAMOTO *et al.*, 1985) e o curimba (*Prochilodus lineatus*) (MILIORINI, MURGAS *et al.*, 2011).

Referências bibliográficas

- BATISTA M., A. *et al.* A morphological classification proposal for curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm damages after cryopreservation. **Aquaculture Research**, v. 42, n. 2, p. 177-187, 2011.
- BOMBARDELLI, R. A. *et al.* Insemination dose for artificial fertilization of grey jundia oocytes, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimardm, 1824). **Revista Brasileira De Zootecnia-Brazilian Journal of Animal Science**, v. 35, n. 4, p. 1251-1257, 2006.
- CAROLSFELDT, J. *et al.* Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. **Journal of Fish Biology**, v. 63, n. 2, p. 472-489, 2003.
- DILAURO, M. N. *et al.* SHORT-TERM COLD-STORAGE OF ATLANTIC STURGEON SPERM. **Progressive Fish-Culturist**, v. 56, n. 2, p. 143-144, 1994.
- FEIDEN, A.; HAYASHI, C.; BOSCOLO, W. R. Development of Iguacu surubim (*Steindachneridion melanodermatum*) larvae fed different diets. **Revista Brasileira De Zootecnia**, v. 35, n. 6, p. 2203-2210, 2006.
- FIGUEIREDO, J.R., *et al.* Importância da biotécnica de MOIFOPA para o estudo da foliculogênese e produção in vitro de embriões em larga escala. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.2, p.143-152, 2007.
- FIGUEIREDO, J.R. Bioética: repensando o uso das biotécnicas reprodutivas. **Ciências Veterinárias nos Trópicos** v. 11, p.116-118, 2008.
- FOGLI DA SILVEIRA, W.; KAVAMOTO, E. T.; NARAHARA, M. Y. Avaliação da qualidade e criopreservação em forma de "pellets" do sêmen de bagre *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 12 n. 4: p.7-11, 1985.
- FROESE, R. PAULY, D. Editores. **FishBase**. Publicação eletrônica. Disponível em <www.fishbase.org>, acesso em 25/01/2012, versão (12/2011), 2012

GARAVELLO, J. C. Revision of genus *Steindachneridion* (Siluriformes: Pimelodidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 3, n. 4, p. 607-623, 2005.

GODINHO, H. P.; AMORIM, V.; PEIXOTO, M. T. D. Cryopreservation of the semen of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*, var. Chitralada: Cryoprotectants, spermatozoa activating solutions and cryogenic refrigerator. **Revista Brasileira De Zootecnia- Brazilian Journal of Animal Science**, v. 32, n. 6, p. 1537-1543, 2003.

GUBIANI, E. A. *et al.* Occurrence of the non-native fish *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1816), in a global biodiversity ecoregion, Iguaçu River, Paraná River basin, Brazil. **Aquatic Invasions**, v. 5, n. 2, p. 223-227, 2010.

Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA. **ESTATÍSTICA DA PESCA**. 2007. 151p.

KIME, D. E. *et al.* Use of computer assisted sperm analysis (CASA) for monitoring the effects of pollution on sperm quality of fish; Application to the effects of heavy metals. **Aquatic Toxicology**, v. 36, n. 3-4, p. 223-237, 1996.

LAHNSTEINER, F.; MANSOUR, N. A comparative study on antioxidant systems in semen of species of the Percidae, Salmonidae, Cyprinidae, and Lotidae for improving semen storage techniques. **Aquaculture**, v. 307, n. 1-2, p. 130-140, 2010.

LUDWIG, L. A. M.; GOMES, E.; ARTONI, R. F. Um método de reprodução induzida para o surubim *Steindachneridion melanoderdatum* (siluriformes, pimelodidae) do rio Iguaçu. Publicatio **UEPG: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 11, n. 3, 2009.

MARQUES, S.; GODINHO, H. P. Short-term cold storage of sperm from six Neotropical Characiformes fishes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, n. 5, p. 799-804, 2004.

MURGAS, L. D. S.; FRANCISCATTO, R. T.; SANTOS, A. G. O. Sperm evaluation of Piracanjuba fish (*Brycon orbignyanus*, Valenciennes, 1849), after thawing. **Revista**

Brasileira De Zootecnia-Brazilian Journal of Animal Science, v. 32, n. 6, p. 1810-1814, 2003.

MURGAS, L. D. S. *et al.* Spermatic viability of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen cooled at 4 degrees C. **Revista Brasileira De Zootecnia-Brazilian Journal of Animal Science**, v. 33, n. 6, p. 1361-1365, 2004.

NAKATANI, K. AGOSTINHO, A.A. BAUMGARTNER, G. *et al.* Ovos e larvas de peixes de água doce. Desenvolvimento e manual de identificação. Maringá: **EDUEM**, 2001. 378p.

RONALD KENNEDY, L. U. Z. *et al.* Avaliação qualitativa e quantitativa do sêmen de suruvi, *Steindachneridion scripta* (Pimelodidae). **Boletim do Instituto de Pesca, São Paulo**, v. 27, n. 1, p. 39-42, 2001.

ROSA, S. R. e LIMA, F. C. T. Os peixes brasileiros ameaçados de extinção. In: Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. In: Machado, A. B., G. M. Drumond & A. P. Paglia (Orgs). 2008. Brasília, D.F.: **Ministério do Meio Ambiente**, p. 9-275. 2008.

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

SANCHES, E. A. *et al.* Características seminais do cascudo-preto (*Rhinelepis aspera*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, n.3, p.357-362, 2011.

SANCHES, E. A. *et al.* Temperature and storage period over spermatic parameters of jundiá, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824). **Aquaculture Research**, p. 1365-2109, 2011.

SANCHES, E. G.; CERQUEIRA, V. R. Refrigeração do sêmen do ariocó *Lutjanus synagris*. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 36, n. 4, p. 293-305, 2010.

SANTT'ANA, J. F. M. Variáveis reprodutivas do surubim do iguaçu (*Steindachneridion melanodermatum*) e comparação do desenvolvimento ontogenético com o jundiá (*Rhamdia quelen*). 2009. 72pp. Dissertação de mestrado - Pós - Graduação em Biologia Evolutiva. Ponta Grossa - **Universidade Estadual de Ponta Grossa & Universidade do Centro Oeste do Paraná.**

STREIT, D. P., JR. *et al.* Qualitative parameter of dourado (*Salminus maxillosus*) semen in captivity. **Boletim Do Instituto De Pesca**, v. 34, n. 3, p. 337-344, 2008a.

STREIT, D. P., JR. *et al.* Qualitative parameters of the piapara semen (*Leporinus elongatus* Valenciennes, 1850). **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, n. 2, p. 373-377, 2008b.

SUQUET, M. *et al.* Cryopreservation of sperm in marine fish. **Aquaculture Research**, v. 31, n. 3, p. 231-243, 2000.

VIVEIROS, A. T. M. *et al.* Gentamycin controls bacterial growth during refrigerated storage of piracanjuba, *Brycon orbignyanus*, semen. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 41, p. 57-65, 2010.

VIVEIROS, A. T. M. *et al.* Sensitivity of dourado (*Salminus brasiliensis*) spermatozoa to different cryoprotectant solutions. **Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinaria E Zootecnia**, v. 61, n. 4, p. 883-889, 2009.

ZANIBONI FILHO, E. *et al.* Catálogo ilustrado de peixes do alto rio Uruguai. **Editora da UFSC**, Florianópolis, 2004.

ZANIBONI-FILHO, E.; SCHULZ, U. H. Migratory Fishes of the Uruguay River. In: CAROSFELD, J.; HARVEY, B., *et al* (Ed.). Migratory Fishes of South América – Biology, Fisheries and Conservations Status: **Ottawa: International Development Research Center**, p.157 – 194, 2003.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34

Capitulo elaborado e formatado conforme as
normas da publicação científica *Aquaculture*.
Disponível em:
<<http://www.journals.elsevier.com/aquaculture/>>*

**Parâmetros seminais e espermáticos e resfriamento do sêmen do surubim do Iguaçu,
Steindachneridion melanodermatum (Garavello, 2005)**

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar os parâmetros seminais e espermáticos do *Steindachneridion melanodermatum* e os efeitos da diluição, da temperatura e do tempo de estocagem do sêmen sobre os parâmetros espermáticos. Foram coletados o sêmen de nove machos, induzidos hormonalmente. No sêmen fresco foram avaliados os parâmetros: osmolaridade do plasma seminal (OSM), pH do sêmen (pH), motilidade (MOT) e velocidades espermáticas (VCL, VLR, VMD, VE), tempo total de ativação espermática (TEMP), concentração espermática e índice de normalidade espermática (NORM). Amostras do sêmen fresco e outras diluídas em solução contendo 5% de frutose e 5% de leite em pó foram armazenadas a 10 e 25°C e as MOT, VCL, VLR, VMD, TEMP foram mensuradas após 0, 5, 9, 18, 27, 36, 45, 54 horas. Os machos liberaram $11,74 \pm 5,38$ mL de sêmen com, $258,78 \pm 29,36$ mOsm e pH de $7,11 \pm 0,31$. No sêmen $99,86 \pm 0,31\%$ dos espermatozóides eram móveis e apresentavam $185,58 \pm 14,11 \mu\text{m.s}^{-1}$ para VCL, $49,15 \pm 4,66 \mu\text{m.s}^{-1}$ para VLR, $87,02 \pm 4,13 \mu\text{m.s}^{-1}$ para VMD, $106,52 \pm 4,45 \mu\text{m.s}^{-1}$ para VE, $79,31 \pm 5,62$ s TEMP, $1,03 \times 10^{10} \pm 3,65 \times 10^9$ espermatozóides.mL⁻¹ e $75,81 \pm 5,71\%$ de NORM. A motilidade, as velocidades e o tempo total de ativação espermática foram influenciados ($p < 0,05$) pela diluição, pelas temperaturas e tempos de armazenamento. Quando for necessário o emprego da estocagem do sêmen, este poderá ser realizado sem diluição e preferencialmente resfriado a 10°C. Ainda, pelo período de até 27 horas, o sêmen pode ser mantido não diluído, sob temperatura ambiente (25°C) sem prejuízos para a motilidade espermática.

Palavras-chave: CASA, espermatozoide, macho, reprodução, sêmen

Seminal and spermatic parameters and sperm cooling of Iguaçu sorubim, *Steindachneridion melanoderdatum* (Garavello, 2005)

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the seminal and spermatic parameters as well as the effects of dilution, temperature and storage period over spermatic parameters in semen of *Steindachneridion melanoderdatum*. Sperm samples were collected from nine hormonally-induced males. The following parameters were analyzed in fresh sperm: osmolality of seminal plasma (OSM), pH, motility (MOT), spermatic velocity (CVV, SLV, APV, SV), time of spermatic activation (TEMP), spermatic concentration and index of spermatic normality (NORM). Fresh and diluted semen samples in 5% fructose and 5% milk powder solution were stored at 10 and 25°C followed by analyses of MOT, CVV, SLV, APV and TEMP after 0, 5, 9, 18, 27, 36, 45, 54 hours. Males released 11.74 ± 5.38 mL of sperm with 258.78 ± 29.36 mOsm and pH of 7.11 ± 0.31 . The sperm presented $99.86 \pm 0.31\%$ of motile spermatozoa at a concentration of $1.03 \times 10^{10} \pm 3.65 \times 10^9$ spermatozoa.mL⁻¹ with CVV of 185.58 ± 14.11 μm.s⁻¹, SLV of 49.15 ± 4.66 μm.s⁻¹, APV of 87.02 ± 4.13 μm.s⁻¹, SV of 106.52 ± 4.45 μm.s⁻¹, TEMP of 79.31 ± 5.62 s, and NORM of $75.81 \pm 5.71\%$. Motility, spermatic velocity and total time of spermatic activation were affected by dilution, temperature and storage period ($p < 0.05$). If semen storage is necessary, the procedure should be performed with undiluted sperm cooled at 10°C. Moreover, the sperm might be kept, without dilution, at room temperature (25°C) for a period of up to 27 hours with no damages over spermatic motility.

Keywords: CASA, male, reproduction, semen, spermatozoon

84 **Introdução**

85 O surubim do Iguaçu, *Steindachneridion melanoderdatum* (Garavello, 2005), é um
86 bagre nativo da América do Sul, endêmico da bacia do rio Iguaçu (FroeseandPauly, 2012).
87 Este peixe é um carnívoro (Zaniboni Filho et al, 2004) considerado de grande porte
88 (comprimento <532 mm) (Garavello, 2005) e ameaçado de extinção (Sereia, 2010).

89 O desenvolvimento de técnicas reprodutivas é o primeiro passo para promover a
90 propagação artificial de peixes (Romagosa et al, 2010) e a formação de bancos genéticos *in*
91 *vivo* ou *in vitro* (Zaniboni Filho and Schulz, 2003). Contudo, não existem informações sobre
92 os aspectos reprodutivos do *S. melanoderdatum* em cativeiro, tão pouco sobre biotécnicas
93 efetivas voltadas a manipulação e a conservação de seus gametas. Os poucos trabalhos
94 disponíveis retratam informações superficiais sobre o processo de liberação de sêmen e
95 poucos aspectos espermáticos (Ludwig et al, 2005; Santt´ana, 2009).

96 Conhecer os parâmetros seminais e espermáticos permite o aproveitamento racional de
97 gametas com boa qualidade e a identificação de reprodutores realmente eficazes (Coward et
98 al, 2002). Estas informações possibilitam racionalizar o uso de reprodutores por meio da
99 utilização de doses inseminantes adequadas (Bombardelli et al, 2006; Streit et al, 2008),
100 viabilizar o emprego de sêmen criopreservado em procedimentos de fertilização artificial
101 (Suquet et al, 2000) ou o desenvolvimento de tecnologias aplicadas na formação de bancos
102 genéticos *in vivo* ou *in vitro* (Zaniboni Filho and Schulz, 2003), destinados para a conservação
103 da biodiversidade ou para programas de melhoramento genético.

104 O desenvolvimento de técnicas voltadas a conservação de gametas de peixes
105 neotropicais tem sido foco de pesquisas (Viveiros et al, 2010), visto a rápida perda de
106 viabilidade após a ovulação ou espermição (Rizzo et al, 2003). Além da criopreservação,
107 técnicas de estocagem de sêmen sob resfriamento podem contribuir para a preservação de
108 gametas por curtos períodos de tempo (JenkinsandTiersch, 1997). Os empregos destes

procedimentos podem garantir a reprodução artificial em casos de liberação assincrônica de gametas (Sanches et al, 2011a), permitir a troca ou a comercialização de sêmen fresco entre diferentes laboratórios e empresas ou, em programas de conservação da diversidade genética, manter a viabilidade dos gametas entre o momento da coleta em ambientes naturais remotos e o seu posterior processamento em laboratório.

O objetivo deste estudo foi avaliar os parâmetros seminais e espermáticos do surubim do Iguaçu (*Steindachneridion melanoderdatum*) e os efeitos da diluição, da temperatura e do tempo de estocagem do sêmen sobre os parâmetros espermáticos.

Material e métodos

O experimento foi realizado no mês de outubro de 2010, na Estação Experimental de Estudos Ictiológicos da Companhia Paranaense de Energia, na Usina Hidrelétrica Governador Ney Braga (EEEI – Copel) em Reserva do Iguaçu, Paraná, Brasil e no Laboratório de Tecnologia da Reprodução de Animais Aquáticos Cultiváveis (LATRAAC), instalado no Instituto de Pesquisa em Aquicultura Ambiental (InPAA), da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil.

O grupo de reprodutores da EEEI – Copel foi mantido ao longo do ano em tanques escavados revestidos de concreto nas laterais e fundo de terra. O abastecimento da água foi mantido para reposição de água perdida com a evaporação e infiltração. Os animais foram alimentados com ração extrusada comercial contendo 32% de proteína bruta a uma taxa de arraçoamento de 1% do peso vivo ao dia. Ainda, foi fornecido aos reprodutores alimento vivo na forma de peixes de pequeno porte. Deste grupo, foram selecionados nove machos (1.857,22±774,60g) que liberavam esperma por meio de leve pressão abdominal. Os machos selecionados foram transferidos para o laboratório de reprodução artificial, estocados em

tanques de alvenaria revestidos com azulejo, dotados de renovação constante de água e controle da temperatura da água ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) por meio de aquecimento elétrico.

Os machos receberam tratamento hormonal para promover o aumento da produção de sêmen (Sanches et al, 2010), por meio de aplicação via intra-muscular de 3,0 mg de extrato pituitário de carpa (EPC).kg de reprodutor⁻¹(Bombardelli, et al, 2006; Urbinati and Gonçalves, 2005; Weingartner and Zaniboni, 2005).

O sêmen foi coletado após 260 horas-grau (Ludwig et al, 2005), por meio de massagem abdominal no sentido céfalo-caudal. Para tanto, os peixes foram anestesiados por meio de imersão em solução aquosa contendo 75mg de benzocaína.L de água⁻¹ (Okamura et al, 2010). As primeiras parcelas do sêmen liberado foram desprezadas para evitar a possível contaminação com fezes ou urina (Poupard et al, 1998). O volume de sêmen liberado por cada um dos peixes foi mensurado em tubos de ensaio graduados, com precisão de $\pm 0,1\text{mL}$.

Amostras do sêmen de cada macho foram avaliadas imediatamente após a coleta para determinação dos parâmetros seminais e espermáticos. Foram avaliados: osmolaridade do plasma seminal (OSM), pH seminal (pH), motilidade espermática (MOT), velocidade espermática curvilinear (VCL), velocidade espermática em linha reta (VLR), velocidade espermática média de deslocamento (VMD), tempo total de ativação espermática (TEMP), concentração espermática (CONC) e índice de normalidade morfológica dos espermatozóides (NORM).

Para a determinação da osmolaridade do plasma seminal (OSM), amostras de 2,5 mL de sêmen foram submetidas à centrifugação a 3.500rpm por 10 minutos. Em seguida o plasma seminal foi separado e conservado a -5°C . Para a determinação da osmolaridade, as amostras foram analisadas em osmômetro crioscópico (PLZ, modelo PLZ-1000) (Alavi et al, 2010).

O pH seminal foi determinado pelo método colorimétrico em papel tornassol (Merck). Uma gota de sêmen foi colocada sobre o papel e a coloração resultante comparada com uma escala (1-14) fornecida pelo fabricante.

Para a avaliação dos parâmetros motilidade espermática (MOT), velocidade espermática curvilinear (VCL), velocidade espermática em linha reta (VLR) e velocidade espermática média de deslocamento (VMD) foi utilizado o *Computer Assisted Sperm Analysis* (CASA), adaptado para a espécie, utilizando-se intervalos de 1s de imagens, 10 segundos após o início da ativação espermática (Tessaro et al, 2012). Para tanto, alíquotas de sêmen foram ativadas com água destilada empregando-se a diluição de 1:50 μ L. Parcelas de 10 μ L do material diluído foram dispostas em câmara hematimétrica de Neubauer espelhada e visualizadas em microscópio óptico (Nikon® Eclipse E200) (40X), acoplado a uma câmera de filmagem Basler® a602-f. As imagens foram obtidas com a taxa de 100 quadros por segundo e armazenadas em disco rígido para posterior análise (Sanches et al, 2010).

Os resultados de VCL, VLR e VMD, devido a sua correlação, foram agrupados através de análise de componentes principais (PCA), sendo o índice calculado denominado Velocidade Espermática (VE) (Tessaro et al, 2012) por meio da equação:

$$VE = (a/a+b+c).VCL + (a/a+b+c).VMD + (a/a+b+c).VLR$$

Onde: VE = Velocidade espermática ($\mu\text{m.s}^{-1}$); VCL = Velocidade espermática Curvilinear ($\mu\text{m.s}^{-1}$); VMD = Velocidade espermática média de deslocamento ($\mu\text{m.s}^{-1}$); VLR = Velocidade espermática em linha reta ($\mu\text{m.s}^{-1}$); a = Fator de contribuição da VCL para a formação da VE; b = Fator de contribuição da VMD para a formação da VE; c = Fator de contribuição da VLR para a formação da VE;

O tempo total de ativação espermática (TEMP) foi mensurado por meio dos vídeos de movimento espermático, considerando-se o tempo necessário para a perda de motilidade de 100% das células.

A mensuração da concentração espermática (CONC) (Billard et al, 1995) foi realizada, individualmente e em triplicatas, em microscópio de luz (40X) pelo método de contagem de células espermáticas em câmara hematóimétrica de Neubauer (Mylonas et al, 1997; Wirtz and Steinmann, 2006). Para tanto, amostras de sêmen fresco foram fixadas em solução de formol salina tamponada (Streit et al, 2004; Streit et al, 2006) a uma diluição de 1:1000 (Bombardelli et al, 2006).

Para a avaliação e mensuração do índice de normalidade morfológica dos espermatozoides (NORM), foram preparados dois esfregaços com o material anteriormente fixado em solução de formol salina tamponado (Rurangwa et al, 2004). As lâminas obtidas com os esfregaços foram submetidas à coloração em Rosa de Bengala (Hafez and Hafez, 2004; Streit et al, 2004) e analisadas em microscópio de luz (40X). Foi avaliado um total de 400 espermatozoides de cada colheita proveniente de um único peixe. Os espermatozoides avaliados foram classificados como normais ou anormais (CBRA, 1998; Chenoweth, 2005; Streit et al, 2006).

Ainda, amostras de sêmen de cada um dos reprodutores foram submetidas ao ensaio de conservação e estocagem ao longo do tempo sob diferentes condições de armazenamento. O ensaio foi realizado utilizando um delineamento experimental inteiramente casualizado, organizado em esquema fatorial 2x2x8. Foram testadas: a) a estocagem do sêmen não diluído e diluído na proporção de 1:3 em solução aquosa composta de 5% de frutose e 5% de leite em pó (previamente determinada em ensaio piloto), e b) a variação da temperatura de estocagem considerando a temperatura ambiente (25°C) e resfriado a 10°C. Ainda, a qualidade espermática foi aferida em oito momentos após o início da estocagem do sêmen, correspondentes a 0, 5, 9, 18, 27, 36, 45, 54 horas. Foi considerado como unidade experimental uma amostra de 2mL de sêmen proveniente de um único reprodutor, contida em microtubos do tipo eppendorf de 2,5mL.

Os parâmetros avaliados ao longo do ensaio de estocagem do sêmen foram: motilidade espermática (MOT), velocidade espermática (VE) e tempo total de ativação espermática (TEMP), conforme descrito anteriormente.

As médias e os desvios padrão dos parâmetros seminais e espermáticos do sêmen fresco foram calculados com a utilização do software STATISTICA 7.0[®]. Os resultados dos parâmetros espermáticos avaliados no ensaio de estocagem do sêmen foram submetidos à *Factorial ANOVA* e quando constatado efeito entre os tratamentos foi aplicado o teste de comparação múltipla de médias de Duncan. O processamento estatístico também foi realizado com a utilização do software STATISTICA 7.0[®].

Resultados

Os machos do *S. melanodermatum* liberaram em média 11,74±5,38 mL de sêmen, com $1,03 \times 10^{10} \pm 3,65 \times 10^9$ espermatozóides.mL⁻¹ e 75,81±5,71% de espermatozóides normais. Em média, o sêmen apresentou pH de 7,11±0,31 e o plasma seminal com 258,78±29,36mOsm (Tabela 1).

Logo após a liberação e a coleta do sêmen dos reprodutores, 99,86±0,31% dos espermatozóides apresentavam-se móveis, com velocidades de deslocamento correspondentes a 185,58±14,11µm.s⁻¹ para velocidade curvilínea, 49,15 ±4,66µm.s⁻¹ para velocidade em linha reta e 87,02±4,13 µm.s⁻¹ para velocidade média de deslocamento (Tabela 1).

As velocidades espermáticas curvilínea (VCL), em linha reta (VLR) e média de deslocamento (VMD) foram altamente correlacionadas (r=97, r=100 e r=98, respectivamente) e o seu agrupamento por meio da análise de componentes principais resultou na equação: $VE = 0,325244.VCL + 0,343368.VMD + 0,331388.VLR$. A velocidade espermática

estimada no sêmen fresco foi de $106,52 \pm 4,45 \mu\text{m.s}^{-1}$ e o tempo total de ativação espermática de $79,31 \pm 5,62\text{s}$ de tempo total de ativação espermática (Tabela 1).

Imediatamente após a diluição do sêmen, foi observada a presença de espermatozóides móveis, contudo, este parâmetro não foi quantificado pelo sistema CASA devido a elevada concentração celular. A diluição do sêmen, o tempo e a temperatura de estocagem influenciaram ($p < 0,05$) a motilidade espermática do sêmen de *S. melanoderdatum* (Fig. 1). Até o tempo de 18 horas de estocagem não foram observadas diferenças ($p > 0,05$) em função das diferentes temperaturas ou a diluição (Fig. 1). Após 27 horas de estocagem o sêmen diluído e mantido a 25°C perdeu completamente a motilidade e entre os demais tratamentos não foi notada diferença entre os percentuais de espermatozóides móveis ($p > 0,05$) (Fig. 1). Decorridas 36 horas de estocagem o sêmen não diluído e mantido a 25°C apresentou superior média de espermatozóides móveis ($p < 0,05$) (Fig. 1). Após 45 horas de estocagem, os percentuais de espermatozóides móveis permaneceram iguais ($p < 0,05$), independentemente da temperatura ou da diluição (Fig. 1).

A velocidade espermática sofreu influencia ($p < 0,05$) da diluição, da temperatura e do tempo de estocagem. Após 5 horas de estocagem, a velocidade espermática no sêmen mantido a 10°C foi reduzida ($p < 0,05$), independente da utilização ou não da diluição (Fig. 2). Entre 9 e 45 horas de estocagem do sêmen as maiores médias de velocidade espermática foram constatadas para aquele estocado a 10°C diluído ou não diluído e para o material mantido a 25°C não diluído (Fig. 2). Após 54 horas de estocagem o material mantido a 10°C , diluído ou não diluído, apresentou maior ($p < 0,05$) velocidade espermática.

O tempo total de ativação espermática do sêmen do surubim do Iguaçu sofreu influencia ($p < 0,05$) do tempo, da temperatura de estocagem e da diluição (Fig. 3). Após cinco horas de estocagem o material mantido resfriado a 10°C reduziu ($p < 0,05$) o tempo total de ativação espermática em relação ao sêmen fresco (Fig. 3). Entre 9 e 36 horas de estocagem

não foi constatado efeito ($p>0,05$) dos diferentes tratamentos sobre o tempo total de ativação, exceto para as amostras do sêmen diluído e mantido a 25°C, que a partir de 9 horas de estocagem teve o tempo total de ativação reduzido ($p<0,05$) e a partir de 27 horas não apresentou mais viabilidade (Fig. 3). Em 54 horas de estocagem o sêmen diluído e mantido a 10°C apresentou maior média para tempo total de ativação (Fig. 3).

Discussão

Conhecer as características seminais e espermáticas é fundamental na rotina de reprodução artificial (Sanches et al, 2011b) e permite a utilização racional do sêmen e dos reprodutores (Bombardelli et al, 2006). Apesar de parâmetros seminais e espermáticos do *S. melanodermatum*, como volume seminal, cor e viscosidade seminal, concentração espermática e tempo de ativação espermática, terem sido determinados por meio de métodos subjetivos por Santt'ana (2009), o presente experimento é o pioneiro em caracterizar os parâmetros seminais e espermáticos do surubim do Iguaçu com a utilização de análise computadorizada.

Os valores determinados para o volume de sêmen, concentração espermática (CONC) e tempo total de ativação espermática (TEMP) diferem dos encontrados por (Santt'ana, 2009) que trabalhou com sêmen proveniente de 11 machos no mês de janeiro. O autor obteve as médias de $1,39\pm0,75\text{mL}$, $52,20\pm21,58\times10^9\text{células.mL}^{-1}$ e $154,40\pm72,57\text{s}$, para volume total de sêmen liberado, concentração espermática e tempo total de ativação espermática, respectivamente. Estas diferenças podem ocorrer devido a variação da época do ano quando foi realizada a coleta, diferenças na dosagem hormonal empregada (Godinho, 2007) e, especificamente sobre os parâmetros de motilidade, devido ao método de ativação espermática empregado.

Devido a inexistência de informações sobre a espécie, os parâmetros de motilidade espermática (MOT), velocidade espermática curvilinear (VCL), velocidade espermática em

linha reta (VLR), velocidade espermática média de deslocamento (VMD), velocidade espermática (VE), índice de normalidade morfológica (NORM), pH e osmolaridade seminal (OSM), serão comparados com o jundiá (*Rhamdia quelen*), bagre nativo da mesma região de ocorrência do *S. melanodermatum* (Gomes et al, 2000).

Sanches et al. (2010) determinaram os parâmetros motilidade espermática (MOT), velocidade espermática curvilinear (VCL), velocidade espermática em linha reta (VLR) e velocidade espermática média de deslocamento (VMD) para machos de jundiá utilizando análise computadorizada. Às médias determinadas foram de $71.23 \pm 12.01\%$, $89.25 \pm 22.37 \mu\text{m.s}^{-1}$, $42.25 \pm 5.94 \mu\text{m.s}^{-1}$ e $56.51 \pm 8.21 \mu\text{m.s}^{-1}$ para MOT, VCL, VLR e VMD, respectivamente. Tessaro et al (2012) determinaram a velocidade espermática (VE) para machos de jundiá (*Rhamdia quelen*), obtendo valores entre 50.32 ± 2.09 e $53.43 \pm 1.89 \mu\text{m.s}^{-1}$ entre os meses de outubro e fevereiro. A motilidade espermática é considerada como fator importante no processo de reprodução artificial de peixes e também como o principal parâmetro utilizado na aferição da viabilidade espermática (Glogowski et al, 2002; Urbanyi et al, 1999), pois este parâmetro apresenta relação direta com as taxas de fertilização (Tuset et al, 2008a). Tessaro et al (2012) afirmam que a velocidade espermática pode ter relação com a fertilidade dos espermatozóides, porém o mecanismo de influencia ainda não foi elucidado. Análises computadorizadas são ferramentas importantes por apresentarem informações rápidas e precisas sobre as condições do sêmen a ser utilizado no processo de reprodução artificial (Sanches et al, 2011c).

Os autores Tessaro et al. (2012) determinaram o índice de normalidade morfológica dos espermatozóides no sêmen do jundiá (*Rhamdia quelen*) e as médias variam entre 56.25 ± 4.16 e $80.71 \pm 1.47\%$, entre os meses de outubro e fevereiro. A relação deste parâmetro com a motilidade espermática, bem como o seu impacto sobre a fertilização artificial, ainda gera intrigas no meio científico, pois a sua relação não é clara (Tuset et al, 2008b).

O pH seminal apresenta importância por estar diretamente relacionado ao início da ativação espermática (Alavi and Cosson, 2005). Hilbig et al (2008) determinaram o pH do fluido seminal do jundiá correspondente a $8,6 \pm 0,2$.

A osmolaridade do plasma seminal do *S. melanoderdatum* foi próxima aos valores determinados por Farias et al (2009) para o sêmen do tambaqui (*Colossoma macropomum*), correspondente a 247 ± 58 mOsm, quando aplicado tratamento hormonal. A osmolaridade do plasma seminal tem influencia direta sobre a ativação espermática, visto que este processo somente ocorre depois da diluição do sêmen e exposição dos espermatozóides a meios hipotônicos (Linhart et al, 1999).

Não existem relatos de ensaios de estocagem de sêmen do *S. melanoderdatum*, sendo este o estudo pioneiro para a espécie. A estocagem de sêmen é uma alternativa indispensável na seleção de peixes e sincronização da disponibilidade de gametas (Rurangwa et al, 2004). De modo geral, o sêmen do *S. melanoderdatum* pode ser estocado diluído ou não, em temperatura de 10°C por períodos de até 27 horas sem prejuízos na motilidade espermática. Kime et al (1996) encontraram resultados semelhantes quando estocaram o sêmen de bagre africano (*Clarias gariepinus*) diluído em diversas soluções e armazenado sob refrigeração. Estes autores não observaram reduções de motilidade espermática em até 24 horas de estocagem, porém, após 48 horas a motilidade espermática foi reduzida significativamente. Rurangwa et al (2001) constataram prejuízos na motilidade espermática após 48 horas de estocagem do sêmen de bagre africano (*Clarias gariepinus*), diluído em solução contendo DMSO e glicerol e mantidos sob refrigeração.

A perda de motilidade espermática ao longo do tempo de estocagem é verificada por diversos autores (Fauvelet al., 2010; Rizzo et al, 2003). O presente experimento verificou que o sêmen do *S. melanoderdatum* quando diluído em solução aquosa contendo 5% de frutose e 5% de leite em pó e estocado em temperatura ambiente, apresentou uma rápida perda de

viabilidade das células espermáticas. Isto possivelmente está associado ao fato da temperatura elevada ter acelerado o metabolismo espermático ou ao fato do diluente ter agido como meio nutritivo que, associado a temperatura, promoveu o desenvolvimento de micro-organismos. Ao longo do tempo, foi verificada nos vídeos de motilidade espermática, a ocorrência de organismos em movimento junto aos espermatozóides (parâmetro não quantificado). Apesar de não ter sido objeto de estudo, supôs-se que eram micro-organismos que se desenvolveram devido às condições favoráveis. O desenvolvimento destes micro-organismos no sêmen pode reduzir a motilidade espermática. Viveiros et al (2010) observaram que o aumento do número de bactérias presentes em amostras de sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) diluído em NaCl-tris, causou uma diminuição no percentual de motilidade espermática, provocando a redução de 93 para 1%, enquanto a população bacteriana aumentou de 10^4 a 10^7 UFC.mL de sêmen diluído⁻¹, durante 8 dias de armazenamento,

A utilização de diferentes soluções diluidoras e métodos diferenciados de armazenamento podem ser mais efetivos na manutenção da qualidade seminal durante a estocagem, porém devem ser observados aspectos relativos à toxicidade destes diluidores (Sanches et al, 2011a) e a sua capacidade de manter as células espermáticas inativas (Viveiros et al, 2009). Ensaios de estocagem do sêmen de peixes neotropicais por curtos períodos de tempo, foram efetivos na manutenção da qualidade espermática quando utilizados o BTS e o KCl para a piracanjuba (*Brycon orbignyanus*), mantido sobre refrigeração (4°C) e diluído na proporção 1:3 (sêmen:diluidor) (Murgas et al, 2004) e, o BTS para a pirapitinga (*Brycon nattereri*), mantido sob refrigeração (4-6°C) diluído na proporção de 1:10 (sêmen:diluidor) (Oliveira et al, 2007). O observado no presente experimento contrapõe os resultados obtidos para outras espécies, pois a utilização de diluidor não promoveu melhorias na qualidade espermática. Além da suposta atividade microbiana, o efeito da temperatura (Billard et al, 1995) pode ter sido um fator responsável pela perda de viabilidade espermática.

Os efeitos da temperatura de estocagem sobre a viabilidade espermática do *S. melanoderdatum* são corroborados pelos resultados da estocagem do sêmen a 10°C, que prolonga a viabilidade das células tanto no sêmen diluído quanto naquele não diluído. Sanches et al. (2011a) também sugerem que a estocagem do sêmen de jundiá (*Rhamdia quelen*) em altas temperaturas promove prejuízos a motilidade espermática.

A velocidade espermática foi mantida constante entre os tratamentos, exceto para o sêmen estocado diluído a 25°C que rapidamente perdeu a viabilidade. Este efeito pode ter sido causado pela diminuição das reservas de energia celular devido a maior atividade metabólica e limitação de recursos energéticos (Bobe and Labbe, 2010). O mesmo efeito da temperatura pode ter sido responsável pela prolongação do tempo total de motilidade espermática no sêmen resfriado e diluído, visto a possível redução da atividade metabólica dos espermatozóides (Billard et al, 1995), que promoveu um consumo mais lento da energia disponível aos espermatozóides.

De modo geral, a solução contendo 5% de frutose e 5% de leite em pó não se mostrou promissora para o emprego em procedimentos de diluição e estocagem do sêmen do *S. melanoderdatum*. Apesar da inexistência de informações e por ser o primeiro trabalho realizado com foco na estocagem do sêmen desta espécie, antes que novas pesquisas determinem protocolos mais efetivos, quando for necessário o emprego da estocagem do sêmen, este poderá ser realizado sem diluição e preferencialmente resfriado a 10°C. Ainda, pelo período de até 27 horas, o sêmen pode ser mantido não diluído, sob temperatura ambiente (25°C) sem prejuízos para a motilidade espermática.

Agradecimentos

377 A Companhia Paranaense de Energia – COPEL, a Estação Experimental de Estudos
 378 Ictiológicos da Companhia Paranaense de Energia, na Usina Hidrelétrica Governador Ney
 379 Braga (EEEI – Copel).

380

381 **Referências**

382 Alavi, S.M.H., Cosson, J., 2005. Sperm motility in fishes. I. Effects of temperature and pH: a
 383 review. Cell Biology International 29, 101–110.

384 Alavi, S.M.H., Jorfi, E., Hatef, A., Mortezaei, S.A.S., 2010. Sperm motility and seminal
 385 plasma characteristics in *Barbus sharpeyi* (Gunther, 1874). Aquaculture Research 41,
 386 688-694.

387 Billard, R., Cosson, J., Crim, L.W., 1995. Sperm physiology and quality. In: Bromage, N.R.,
 388 Roberts, R.J. (Eds.), Broodstock management and egg and larval quality. Blackwell
 389 Science Ltd, London, pp. 25–52

390 Bobe, J., Labbé, C., 2009. Egg and sperm quality in fish. General Comparative Endocrinology
 391 165, 535-548.

392 Bombardelli, R.A., Mörschbacher, E.F.; Campagnolo, R.; Sanches, E.A., Syperreck, M.A.,
 393 2006. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá
 394 *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824). Revista Brasileira de Zootecnia 35, 1251-
 395 1257.

396 CBRA. 1998. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. Colégio
 397 Brasileiro de Reprodução Animal, Belo Horizonte, pp. 49.

398 Chenoweth, P.J., 2005. Genetic sperm defects. Theriogenology 64, 457-468.

- 399 Coward, K., Bromage, N.R., Hibbitt, O., Parrington, J., 2002. Gamete physiology, fertilization
400 and egg activation in teleost fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 12, 33–58.
- 401 Farias, J.O., Nunes, J.F., Carvalho, M.A.M., Salgueiro, C.C.M., 1999. Avaliação "In Vitro" e"
402 In Vivo" do Sêmen de Tambaqui (*Colossoma macropomum*) Conservado a
403 Temperatura Ambiente e Criopreservado em Água de Coco. *Revista Científica de*
404 *Produção Animal*. 1, 144-148.
- 405 Froese, R., Pauly, D., 2012. FishBase: World Wide Web electronic publication.
406 <<<http://www.fishbase.org>>>. Access in: 27/04/2010.
- 407 Garavello, J.C., 2005. Revision of genus *Steindachneridion* (Siluriformes: Pimelodidae).
408 *Neotropical Ichthyology*. 3, 607-623.
- 409 Glogowski, J., Kolman, R., Szczepkowski, M., Horvath, A., Urbanyi, B., Sieczynski, P.,
410 Rzemieniecki, A., Domagala, J., Demianowicz, W., Kowalski, R., Ciereszko, A.,
411 2002. Fertilization rate of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*, Brandt) milt
412 cryopreserved with methanol. *Aquaculture*. 211, 367-373.
- 413 Godinho, H.P., 2007. Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: bases para o
414 desenvolvimento de tecnologias de produção. *Revista Brasileira de Reprodução*
415 *Animal*. 31, 351-360.
- 416 Gomes, L.C., Golombieski, J.I., Gomes, A.R.C., Baldisserotto, B., 2000. Biology of *Rhamdia*
417 *quelen* (Teleostei, Pimelodidae). *Ciência Rural*. 30, 179-185.
- 418 Hafez, E.S.E., Hafez, B., 2004. *Reprodução Animal*, seventh ed. Original Renato Campanarut
419 Barnabe, Barueri

- 420 Hilbig, C.C., Bombardelli, R.A., Sanches, E.A., Oliveira, J.D., Baggio, D.M., Souza, B.E.,
421 2008. Efeito do chumbo sobre a fertilização artificial e incubação de ovos de jundiá
422 cinza (*Rhamdia quelen*). ActaScientiarum, Animal Sciences30, 217-224.
- 423 Kime, D.E., Ebrahimi, M., Nysten, K., Roelants, I., Rurangwa, E., Moore, H.D.M., Ollevier,
424 F., 1996. Use of computer assisted sperm analysis (CASA) for monitoring the effects
425 of pollution on sperm quality of fish; Application to the effects of heavy metals.
426 Aquatic Toxicology 36, 223-237.
- 427 Linhart, O., Walford, J., Sivaloganathan, B., Lam, T.J., 1999. Effects of osmolality and ions
428 on the motility of stripped and testicular sperm of freshwater- and seawater-acclimated
429 tilapia, *Oreochromis mossambicus*. Journal of Fish Biology 55, 1344-1358.
- 430 Ludwig, L.A.M., Gomes, E., Artoni, R.F., 2005. Um método de reprodução induzida para o
431 surubim *Steindachneridion melanoderdatum* (siluriformes, pimelodidae) do rio
432 iguaçu. Publicatio UEPG Ciências Biológicas e Saúde 11, 23-27.
- 433 Murgas, L.D.S., Miliorini, A.B., Franciscatto, R.T., Maria, A.N., 2004. Spermatic viability of
434 piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen cooled at 4 degrees C. Revista Brasileira de
435 Zootecnia 33, 1361-1365.
- 436 Mylonas, C.C., Gissis, A., Magnus, Y., Zohar, Y., 1997. Hormonal changes in male white
437 bass (*Morone chrysops*) and evaluation of milt quality after treatment with a
438 sustained-release GnRHa delivery system. Aquaculture. 153, 301-313.
- 439 Okamura, D., de Araujo, F.G., Vieira e Rosa, P., Fonseca de Freitas, R.T., Solis Murgas,
440 L.D., Cesar, M.P., 2010. Effect of benzocaine concentration and fish size on
441 anesthesia and recovery in Nile tilapia. Revista Brasileira de Zootecnia 39, 971-976.

- 442 Oliveira, A.V., Viveiros, A.T.M., Maria, A.N., Freitas, R.T.F., Izau, Z.A., 2007. Sucess of
 443 cooling and freezing of pirapitinga (*Brycon nattereri*) semen. Arquivo Brasileiro de
 444 Medicina Veterinaria e Zootecnia 59, 1509-1515.
- 445 Poupard, G.P., Paxion, C., Cosson, J., Jeulin, C., Fierville, F., Billard, R., 1998. Initiation of
 446 carp spermatozoa motility and early ATP reduction after milt contamination by urine.
 447 Aquaculture 160, 317-328.
- 448 Romagosa, E., Souza, B.E., Sanches, E.A., Baggio, D.M., Bombardelli, R.A., 2010. Sperm
 449 motility of *Prochilodus lineatus* in relation to dilution rate and temperature of the
 450 activating medium. Journal of Applied Ichthyology 26, 678-681.
- 451 Rurangwa, E., Kime, D.E., Ollevier, F., Nash, J.P., 2004. The measurement of sperm motility
 452 and factors affecting sperm quality in cultured fish. Aquaculture 234, 1–28.
- 453 Rurangwa, E., Volckaert, F.A.M., Huyskens, G., Kime, D.E., Ollevier, F., 2001. Quality
 454 control of refrigerated and cryopreserved semen using computer-assisted sperm
 455 analysis (CASA), viable staining and standardized fertilization in African catfish
 456 (*Clarias gariepinus*). Theriogenology 55, 751-769.
- 457 Sanches, E.A., Bombardelli, R. A., Baggio, D.M., Sykora, R.M. ; Xaxier, A.M.M.,
 458 2011b. Características seminais do cascudo-preto (*Rhinelepis aspera*). Revista
 459 Brasileira de Reprodução Animal 35, 357-362.
- 460 Sanches, E.A., Bombardelli, R.A., Marcos, R.M., Neumann, G., Toledo, C.P.R., Romagosa,
 461 E., 2010. Sperm motility of *Rhamdia quelen* studied using computer-assisted analysis
 462 by open-source software. Aquaculture Research 1–4.

- 463 Sanches, E.A., Marcos, R.M., Baggio, D.M., Tessaro, L., Balen, R.E., Bombardelli, R.A.,
 464 2011c. Sperm concentration estimate of fish semen using spermatocrit method.
 465 Revista Brasileira de Zootecnia 40, 1163-1167.
- 466 Sanches, E.A., Neumann, G., Toledo, C.P.R., Bombardelli, R.A., Piana, P.A., Romagosa, E.,
 467 2011a. Temperature and storage period over spermatoc parameters of jundiá, *Rhamdia*
 468 *quelen* (Quoy & Gaimard, 1824). AquacultureResearch. doi: 10.1111/j.1365-
 469 2109.2011.03056.x
- 470 Santt'ana, J.F.M., 2009. Variáveis reprodutivas do surubim do iguaçu (*Steindachneridion*
 471 *melanodermatum*) e comparação do desenvolvimento ontogenético com o jundiá
 472 (*rhamdia quelen*). Dissertação de mestrado - Pós - Graduação em Biologia Evolutiva.
 473 Ponta Grossa - Universidade Estadual de Ponta Grossa & Universidade do Centro
 474 Oeste do Paraná., pp. 72.
- 475 Sereia, D.A.O., 2010 Caracterização do desenvolvimento ontogenético de *Steindachneridion*
 476 *melanodermatum* (Garavello, 2005) (Pisces: siluriforme) da bacia do rio Iguaçu,
 477 Brasil. Dissertação de mestrado - Pós-graduação em zootecnia. Marechal Candido
 478 Rondon - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, pp. 41.
- 479 Stasoft.Inc., 2005.Statistic (data analysis software system).Version 7.1. Tulsa, USA.
- 480 Streit Jr, .D.P., Moraes G.V., Ribeiro R.P., Povh J.A., Souza E.D., Oliveira C.A.L., 2004.
 481 Avaliação de diferentes técnicas para coloração de sêmen de peixes. Arquivos de
 482 Ciências Veterinárias e Zoologia. UNIPAR7, 157-162.
- 483 Streit Jr., D.P., Ribeiro, R.P., Moraes, G.V., 2006. Características qualitativas do sêmen de
 484 pacu (*Piaractus mesopotamicus*) após indução hormonal. Bioscience Journal 22, 119–
 485 125.

- 486 Streit, D.P., Jr., Sirol, R.N., Ribeiro, R.P., de Moraes, G.V., Galo, J.M., Digmayer, M., 2008.
 487 Qualitative parameter of dourado (*Salminus maxillosus*) semen in captivity. Boletim
 488 do Instituto De Pesca 34, 337-344.
- 489 Suquet, M., Dreanno, C., Fauvel, C., Cosson, J., Billard, R., 2000. Cryopreservation of sperm
 490 in marine fish. Aquaculture Research. 31, 231-243.
- 491 Tessaro, L., de Toledo, C.P.R., Neumann, G., Krause, R.A., Meurer, F., Natali, M.R.M.,
 492 Bombardelli, R.A., 2012. Growth and reproductive characteristics of *Rhamdia quelen*
 493 males fed on different digestible energy levels in the reproductive phase. Aquaculture
 494 326, 74-80.
- 495 Tuset, V.M., Dietrich, G.J., Wojtczak, M., Słowinska, M., Monserrat, J., Ciereszko, A., 2008a.
 496 Relationships between morphology, motility and fertilization capacity in rainbow trout
 497 (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. Journal of Applied Ichthyology 24, 393–397.
- 498 Tuset, V.M., Trippel, E.A., Monserrat, J., 2008b. Sperm morphology and its influence on
 499 swimming speed in Atlantic cod. Journal of Applied Ichthyology 24, 398–405.
- 500 Urbanyi, B., Horvath, A., Varga, Z., Horvath, L., Magyary, I., Radics, F., 1999. Effect of
 501 extenders on sperm cryopreservation of African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell).
 502 Aquaculture Research. 30, 145-151.
- 503 Urbinati, E.C., Gonçalves, F.D., 2005. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). in: Baldisseroto, B.,
 504 Gomes, L.C. (Eds.), Espécies nativas para a piscicultura no Brasil. Editora UFSM,
 505 Santa Maria, pp. 225 - 255.

- 506 Viveiros, A.T.M., Isau, Z.A., Figueiredo, H.C.P., Leite, M.A.S., Maria, A.N., 2010.
 507 Gentamycin Controls Bacterial Growth during Refrigerated Storage of Piracanjuba,
 508 *Brycon orbignyanus*, semen. Journal of the World Aquaculture Society 41, 57-65.
- 509 Viveiros, A.T.M., Oliveira, A.V., Maria, A.N., Orfao, L.H., Souza, J.C., 2009. Sensitivity of
 510 dourado (*Salminus brasiliensis*) spermatozoa to different cryoprotectant solutions.
 511 Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia. 61, 883-889.
- 512 Weingartner, M., Zaniboni, E., Filho, 2005. Dourado. in: Baldisserotto, B., Gomes, L.C.
 513 (Eds.), Espécies nativas para a piscicultura no Brasil. Editora UFSM, Santa Maria, pp.
 514 257-286.
- 515 Wirtz, S., Steinmann, P., 2006. Spermcharacteristics in perch *Perca fluviatilis* L. J FishBiol68,
 516 1896-1902.
- 517 Zaniboni Filho, E., Meurer, S., Shibata, O.A., Nuner, A.P.O., 2004. Catálogo ilustrado de
 518 peixes do alto rio Uruguai. Editora da UFSC, Florianópolis pp..
- 519 Fauvel, C., Suquet, M., Cosson, J. 2010., Evaluation of fish sperm quality. Journal of Applied
 520 Ichthyology 26, 636–643.
- 521 Jenkins J.A. &Tiersch T.R. (1997) A preliminary bacteriological study of refrigerated channel
 522 catfish sperm. Journal of the World Aquaculture Society 28, 282–288.
- 523 Rizzo, E., Godinho, H.P., Sato, Y., 2003. Short-term storage of oocytes from the neotropical
 524 teleost fish *Prochilodusmarggravii*. Theriogenology 60, 1059-1070.
- 525 Zaniboni Filho, E., Schulz, U.H., 2003. Migratory Fishes of the Uruguay River. in: Carosfeld,
 526 J., Harvey, B., Ross, C., *al, e.* (Eds.), Migratory Fishes of South América – Biology,

Fisheries and Conservations Status. Ottawa: International Development Research Center, pp. 157 – 194.

Figuras

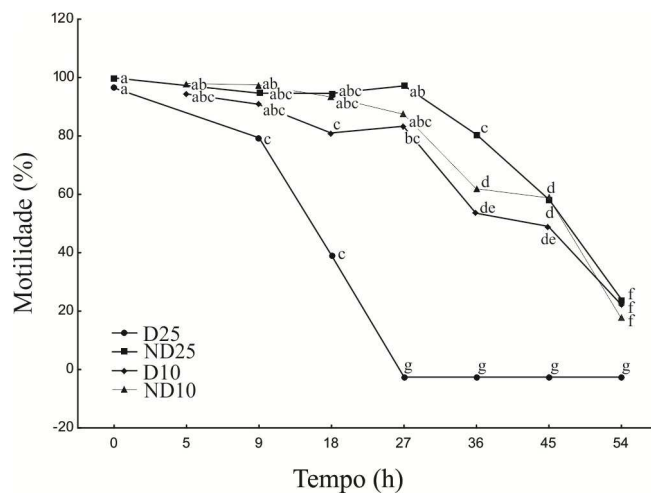


Fig1. Motilidade espermática ao longo do tempo em sêmen de *S. melanoderdatum*, estocado a 25°C ou 10°C e diluído ou não diluído em solução aquosa contendo 5% de frutose e 5% de leite em pó.

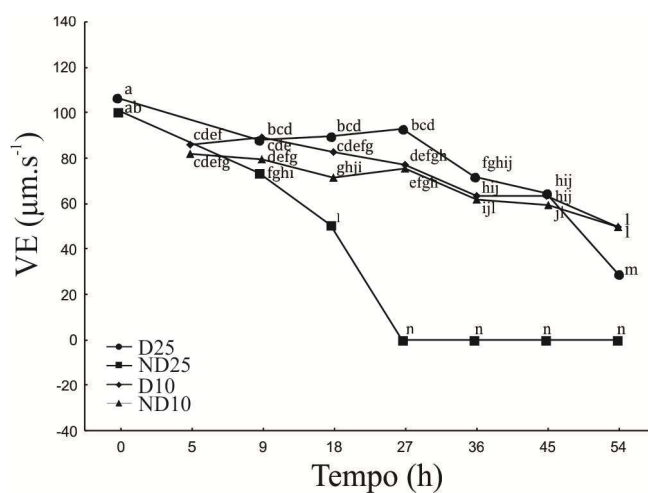
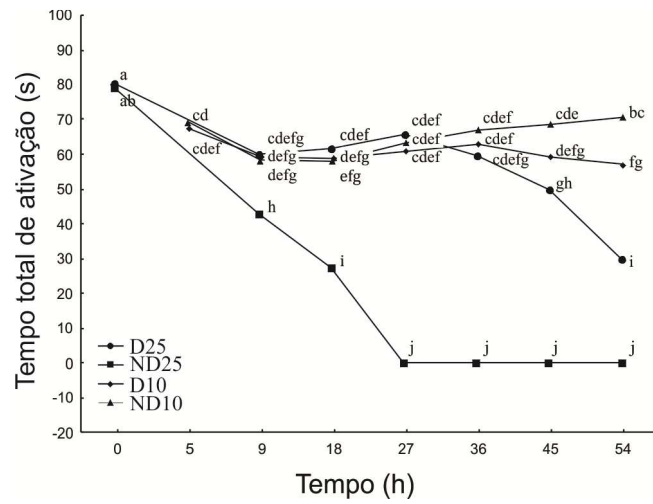


Fig2. Velocidade espermática ao longo do tempo em sêmen de *S. melanoderdatum*, estocado a 25°C ou 10°C e diluído ou não diluído em solução aquosa contendo 5% de frutose e 5% de leite em pó.



539

540 Fig3. Tempo total de ativação espermática ao longo do período de estocagem do sêmen de *S.*
 541 *melanodermatum*, a 25°C ou 10°C e diluído ou não diluído em solução aquosa contendo 5%
 542 de frutose e 5% de leite em pó.

Tabela 1 - Parâmetros seminais e espermáticos de machos de surubim do Iguaçu (*Steindachneridion. melanoderdatum*) submetidos a

indução hormonal com 3,0 mg de extrato pituitário de carpa.kg de reprodutor⁻¹.

Parâmetro	Macho									Média ± desvio padrão
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Volume (mL)	11,2	6,8	7,6	11,4	17,2	7,2	13,5	22,8	8	11,74 ± 5,38
OSM (mOsm)	217,00	276,00	208,00	277,00	303,00	254,00	246,00	264,00	284,00	258,78 ± 29,36
pH seminal	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	8,00	7,00	7,11 ± 0,31
CONC (células.mL ⁻¹)	6,58 x10 ⁹	7,30 x10 ⁹	7,18 x10 ⁹	1,71 x10 ¹⁰	1,24 x10 ¹⁰	7,90 x10 ⁹	7,28 x10 ⁹	1,44 x10 ¹⁰	1,26 x10 ¹⁰	1,03x10 ¹⁰ ± 3,65x10 ⁹
NORM (%)	71,33	80,00	78,33	69,67	73,00	76,33	66,67	82,67	84,33	75,81 ± 5,71
MOT (%)	99,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	99,75	100,00	99,86 ± 0,31
VCL (µm.s ⁻¹)	158,87	181,93	167,65	182,92	203,13	203,13	185,95	194,27	192,34	185,58 ± 14,11
VLR (µm.s ⁻¹)	59,60	50,95	46,53	44,14	44,82	49,06	48,78	45,20	53,26	49,15 ± 4,66
VMD (µm.s ⁻¹)	92,66	88,13	80,60	83,75	83,07	85,98	88,41	86,52	94,07	87,02 ± 4,13
VE (µm.s ⁻¹)	103,24	106,32	97,62	102,88	109,44	111,85	107,00	107,87	112,51	106,52 ± 4,45
TEMP (s)	90,50	74,67	78,00	74,67	72,00	84,67	78,00	77,00	84,33	79,31 ± 5,62

OSM - osmolaridade do plasma seminal, pH seminal, CONC - concentração espermática, NORM - percentual de espermatozóides morfolologicamente normais, MOT -motilidade espermática, VCL - velocidade espermática curvilínea, VLR - velocidade espermática em linha reta, VMD - velocidade espermática média de deslocamento, VE – velocidade espermática, TEMP - tempo total de ativação espermática.

548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581

Capítulo elaborado e formatado conforme as
normas da publicação científica
Theriogenology. Disponível em: <
<http://ees.elsevier.com/therio/>>*

Motilidade e cinética da ativação de células espermáticas de *Steindachneridion melanoderdatum* (Garavello, 2005) criopreservadas em diferentes diluidores.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi determinar a motilidade e descrever a cinética da ativação de células espermáticas de *S. melanoderdatum* criopreservadas em diferentes soluções, empregando-se o método CASA e modelos não lineares. Foram coletadas amostras de sêmen de cinco machos, induzidos hormonalmente, que foram submetidas ao protocolo de criopreservação com a utilização de doze soluções diluidoras constituídas por diferentes concentrações de glicose e frutose, 5% leite em pó e, 10% de DMSO ou propilenoglicol ou metanol. O sêmen fresco de cada um dos machos foi avaliado quanto aos parâmetros: motilidade espermática (10s após a ativação), motilidade inicial teórica, velocidade espermática, índice de normalidade espermática e, os tempos decorridos para que 75%, 50% e 25% dos espermatozóides permanecessem móveis. As amostras de sêmen criopreservadas foram descongeladas e avaliadas quanto aos mesmos parâmetros. A solução contendo 2,5% frutose, 5% leite em pó e 10% metanol apresentou maior ($p<0,05$) índice de normalidade espermática ($71,13\pm4,79\%$) e maior motilidade espermática inicial ($85,56\pm15,31\%$). Com a utilização da solução contendo 5% frutose, 5% leite em pó e 10% metanol foram encontrados maiores médias ($p<0,05$) de motilidade espermática em 10s após a ativação ($78,99\pm27,20\%$) e de velocidade espermática ($75,62\pm18,76 \mu\text{m.s}^{-1}$), além do que, esta solução prolongou a ativação espermática. Desse modo, o sêmen de *S. melanoderdatum* pode ser criopreservado com sucesso em solução aquosa contendo 5% frutose, 5% de leite em pó e 10% de metanol.

Palavras-chave: CASA; Espermatozoide; Peixe; Reprodução.

Motility and kinetics activation of sperm cells from *Steindachneridion melanoderdatum* (Garavello, 2005) cryopreserved in different extenders.

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the viability and describe the kinetics of activation of sperm cells of *S. melanoderdatum* cryopreserved in different extenders, by measuring the motility parameters by CASA method. Were collected semen samples from five males, hormonally induced, these submitted to the protocol of cryopreservation with the use of twelve dilutive solutions, formulated with the use of glucose, fructose, milk powder, DMSO, propylene glycol and methanol. containing 5% fructose, 5% milk powder and 10% methanol in aqueous solution. The cryopreserved semen was thawed and evaluated for the parameters: sperm motility (in 10 seconds after activation), theoretical initial motility, sperm velocity, index of normality and the elapsed times for 75%, 50% and 25% of the sperm stay mobile. The fresh semen was evaluated for the same parameters. The solution containing 2.5% fructose, 5% milk powder and 10% methanol had higher ($P < 0.05$) rate of normality ($71.13 \pm 4.79\%$) and higher initial motility ($85.56 \pm 15.31\%$). By using the solution containing 5% fructose, 5% milk powder and 10% methanol was found highest averages for the parameters: sperm motility in 10s after activation ($78.99 \pm 27.20\%$), sperm velocity ($75.62 \pm 18.76 \mu\text{m.s}^{-1}$) and this solution prolonged the sperm activation. Thus, the sperm of *S. melanoderdatum* can be successfully cryopreserved using the extender solution containing 5% fructose, 5% milk powder and 10% methanol in aqueous solution.

Keywords: CASA; Espermatozoa; Fish; Reproduction.

Introdução

O surubim do Iguaçu, *Steindachneridion melanoderdatum*, é um bagre nativo da América do Sul, endêmico da bacia do rio Iguaçu [1]. É um peixe carnívoro [2], considerado de grande porte em sua região de origem (comprimento <532 mm) [3]. Sua região de ocorrência encontra-se altamente impactada em decorrência de fatores como os diversos represamentos, a ocupação antrópica da região [4] e a sobrepesca, o que contribui para o aumento do impacto sobre as populações desta espécie [2], colocando-a em risco de extinção. O *S. melanoderdatum* também é bastante procurado para consumo, visto as características organolépticas de sua carne, a ausência de espinhos intramusculares e seu rendimento de carcaça [5]. Associado a estas características, a espécie apresenta potencial para a aquicultura, pois apresenta fácil adaptação ao cativeiro e as dietas artificiais [5, 4, 6].

O desenvolvimento de biotécnicas reprodutivas é o primeiro passo para promover a propagação artificial de peixes [7] e a formação de bancos genéticos *in vivo* ou *in vitro* [8]. Estas biotécnicas são importantes ferramentas aplicadas em programas voltados à conservação da biodiversidade [8, 9] ou voltados ao melhoramento genético em aquiculturas comerciais [10], onde a criopreservação assume um importante papel por garantir o armazenamento de material biológico por períodos indeterminados de tempo [11].

Um dos aspectos básicos do processo de criopreservação está na elaboração de soluções crioprotetoras que apresentem a capacidade de diluir o sêmen sem promover a ativação espermática e, ainda, prevenir as células contra as injúrias provocadas pelo processo de congelamento [12]. Apesar da disponibilidade de formulações destas soluções para algumas espécies neotropicais como o *Salminus brasiliensis* [12] e o *Prochilodus lineatus* [13], existem variações quanto o tipo de componente e suas

concentrações nestas soluções [14]. Açúcares como a glicose e frutose são empregados nestas soluções para promover o aumento da osmolaridade da solução, e por consequência evitar a ativação espermática, enquanto que substâncias como o metanol, DMSO e propilenoglicol são espécie específicos em garantir a integridade das membranas celulares [12].

Poucas são as informações disponíveis sobre os aspectos reprodutivos do *S. melanodermatum* em cativeiro, tão pouco descrições de biotécnicas efetivas voltadas a manipulação e a preservação de seus gametas. Os poucos trabalhos disponíveis relatam informações superficiais sobre o processo de liberação de sêmen e poucos aspectos espermáticos do sêmen fresco ou *in natura* [15]. Neste sentido, este é o primeiro trabalho voltado à criopreservação do sêmen e ao estudo da cinética da ativação espermática do *S. melanodermatum*.

O objetivo desta pesquisa foi avaliar a motilidade e descrever a cinética da ativação de células espermáticas de *S. melanodermatum* criopreservadas em diferentes soluções, empregando-se o método CASA e modelos não lineares.

Material e métodos

O experimento foi realizado no período de outubro a dezembro de 2010, na Estação Experimental de Estudos Ictiológicos da Companhia Paranaense de Energia (EEEI – Copel), em Reserva do Iguaçu, Paraná, Brasil e no Laboratório de Tecnologia da Reprodução de Animais Aquáticos Cultiváveis (LATRAAC), instalado no Instituto de Pesquisa em Aquicultura Ambiental (InPAA), da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil.

Os reprodutores foram mantidos em tanques escavados revestidos de concreto na lateral e fundo de terra. O abastecimento da água foi mantido para compensar as perdas

pela evaporação e infiltração. Os peixes foram alimentados com ração extrusada comercial contendo 32% de proteína bruta, à uma taxa de arraçoamento de 1% do peso vivo ao dia e, com peixes forrageiros de pequeno porte. Deste grupo, foram selecionados cinco machos ($3.014,20 \pm 670,48\text{g}$) que liberavam esperma por meio de leve pressão abdominal. Os machos selecionados foram transferidos para o laboratório de reprodução artificial, estocados em tanques de alvenaria (3m^3) revestidos com azulejo, com renovação constante de água ($0,25\text{m}^3.\text{hora}^{-1}$) e controle da temperatura da água ($26,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$) por meio de aquecimento elétrico. Foi feita indução hormonal pela aplicação intra-muscular de $3,0\text{mg}$ de extrato pituitário de carpa (EPC).kg de reprodutor⁻¹[16].

Após 260 horas-grau (10 horas; água a 26°C) [15], os peixes foram sedados por meio da imersão em solução aquosa contendo 75mg de benzocaína. L^{-1} [17] e submetidos a coleta do sêmen por meio de massagem abdominal no sentido céfalo-caudal. As primeiras parcelas do material liberado foram desprezadas para evitar a possível contaminação com fezes ou urina [18]. O volume de sêmen liberado por cada um dos peixes foi mensurado em tubo de ensaio graduado, com precisão de $\pm 0,1\text{mL}$. Durante a manipulação do sêmen e a avaliação das características seminais e espermáticas de cada um dos reprodutores, o sêmen foi conservado sob refrigeração ($\pm 12^\circ\text{C}$) [19, 20].

Para a determinação da osmolaridade do plasma seminal, amostras de $2,5\text{mL}$ de sêmen foram submetidas à centrifugação a 3.500rpm por 10 minutos. Em seguida o plasma seminal foi separado e conservado a -5°C , sendo determinada a osmolaridade em osmômetro crioscópico (PLZ, modelo PLZ-1000) [21].

O pH seminal foi determinado pelo método colorimétrico com a utilização de papel tornassol (Merck) [22].

Os parâmetros de motilidade e velocidade espermática foram avaliados pelo *Computer Assisted Sperm Analysis (CASA)* por meio do *software ImageJ* (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>), adaptado para a espécie, utilizando-se intervalos de 1s de imagens [19], 10 segundos após o início da ativação espermática e, posteriormente a cada 5 segundos até o término da motilidade espermática. Para tanto, utilizou-se diluição de 1:50 (sêmen:água destilada). As análises foram realizadas em microscópio óptico (Nikon® Eclipse E200) (40X), acoplado a uma câmera de filmagem Basler® a602-f (100fps, 656x490 pixels) [19].

Também foram obtidas alíquotas do sêmen fresco de cada um dos peixes para avaliação dos demais parâmetros espermáticos. O índice de sobrevivência espermática foi mensurado pelo método de coloração eosina-nigrosina [16, 23]. Em seguida, amostras de sêmen fresco foram fixadas em solução de formol salina tamponada [24, 25] a uma diluição de 1:1000 [16] e submetidas a mensuração da concentração espermática [26]. A mensuração da concentração espermática foi realizada, individualmente e em triplicata, em microscópio de luz em objetiva de 40X pelo método de contagem de células espermáticas em câmara Hematimétrica de Neubauer [27, 28]. Para a avaliação e mensuração do índice de normalidade morfológica dos espermatozoides, foram preparados dois esfregaços com o material anteriormente fixado em solução de formol salina tamponado [29, 30]. As lâminas obtidas com os esfregaços foram submetidas à coloração em Rosa de Bengala [31, 24] e em seguida, os espermatozóides classificados como normais ou anormais [25, 32, 33].

Após a avaliação dos parâmetros seminais e espermáticos do sêmen fresco, amostras de sêmen foram submetidas à criopreservação utilizando um delineamento experimental em blocos inteiramente casualizado composto por 12 tratamentos e cinco repetições (Tabela 1). Foram consideradas como tratamentos as 12 diferentes soluções e

739 cada macho como um bloco. Cada repetição foi constituída pela média proveniente de
740 três sub-amostras.

741 Tabela 1 – Composição e osmolaridade das soluções diluidoras utilizadas na
742 criopreservação de sêmen de *S. melanoderdatum*.

Solução	Composição do diluidor	Osmolaridade
7,5GL - DMSO	7,5% glicose + 5% leite em pó + 10% DMSO	282 mOsm
7,5GL - MET	7,5% glicose + 5% leite em pó + 10% metanol	282 mOsm
7,5GL - PGL	7,5% glicose + 5% leite em pó + 10% propileno glicol	282 mOsm
10GL - DMSO	10% glicose + 5% leite em pó + 10% DMSO	351 mOsm
10GL - MET	10% glicose + 5% leite em pó + 10% metanol	351 mOsm
10GL - PGL	10% glicose + 5% leite em pó + 10% propileno glicol	351 mOsm
2,5 FRU - DMSO	2,5% frutose + 5% leite em pó + 10% DMSO	247 mOsm)
2,5 FRU - MET	2,5% frutose + 5% leite em pó + 10% metanol	247 mOsm
2,5 FRU - PGL	2,5% frutose + 5% leite em pó + 10% propileno glicol	247 mOsm
5 FRU - DMSO	5% frutose + 5% leite em pó + 10% DMSO	401 mOsm
5 FRU - MET	5% frutose + 5% leite em pó + 10% metanol	401 mOsm
5 FRU - PGL	5% frutose + 5% leite em pó + 10% propileno glicol	401 mOsm

743
744 O sêmen de cada reprodutor foi diluído na proporção de 1:3 (sêmen:diluidor),
745 envasado em palhetes de volume correspondente a 0,25mL e submetido ao pré-
746 congelamento em botijão de vapor de nitrogênio por 18 horas. Em seguida, os palhetes
747 foram transferidos e estocados em nitrogênio líquido [14]. Após 24 horas, o sêmen foi
748 descongelado pela imersão dos palhetes em água a temperatura ambiente (25°C) por 10
749 segundos [14]. Do sêmen descongelado foram avaliados os parâmetros: índice de
750 normalidade morfológica dos espermatozoides, motilidade e velocidade espermática
751 (velocidade em linha reta, velocidade curvilínea e velocidade média de deslocamento),
752 conforme procedimentos descritos anteriormente. Para a ativação espermática do sêmen
753 criopreservado foi utilizado água destilada atendendo a diluição de 1:5 (sêmen:água
754 destilada).

Os resultados de velocidade espermática em linha reta, velocidade curvilinear e velocidade média de deslocamento foram agrupados através da análise de componentes principais (PCA), sendo o índice calculado denominado Velocidade Espermática (V.E.), por meio da equação [34]:

$$VE = (a/a+b+c).VCL+(a/a+b+c).VMD+(a/a+b+c).VLR \quad (1)$$

Onde: VE = Velocidade espermática ($\mu\text{m.s}^{-1}$); VCL = Velocidade espermática Curvilinear ($\mu\text{m.s}^{-1}$); VMD = Velocidade espermática média de deslocamento ($\mu\text{m.s}^{-1}$); VLR = Velocidade espermática em linha reta ($\mu\text{m.s}^{-1}$); a = Fator de contribuição da VCL para a formação da VE; b = Fator de contribuição da VMD para a formação da VE; c = Fator de contribuição da VLR para a formação da VE.

Os dados referentes aos parâmetros de motilidade espermática ao longo do tempo foram ajustados a um modelo matemático não linear, gerando uma representação senoidal descrita por:

$$\text{Motilidade (t)} = 1/(1-h_0) \cdot \exp(-r(t)) \quad (2)$$

Sendo: Motilidade (t) – motilidade calculada para um instante (t) qualquer; h_0 parâmetro relacionado a motilidade inicial ($t=0\text{s}$); r – parâmetro relacionado a taxa de decréscimo da motilidade.

A partir da equação resultante (2) foi calculado o percentual inicial de espermatozoides móveis, correspondente ao instante teórico igual a 0 segundos após o início da ativação espermática. Em seguida foi estimado o período de tempo decorrido para que 75% (t_{75}), 50% (t_{50}) e 25% (t_{25}) dos espermatozóides permanecessem ativos.

Após a avaliação da normalidade e homocedasticidade dos dados, os resultados foram submetidos a ANOVA de efeitos principais (*Main effects* ANOVA) ao nível de 5% de significância. Constatado efeito entre os tratamentos foi aplicado o teste de comparação múltipla de médias de Duncan entre os tratamentos e, posteriormente o

teste de Dunnet para a comparação dos tratamentos com o sêmen fresco. Todas as análises foram realizadas com a utilização do software Statistica 7,0[®].

Resultados

Os reprodutores liberaram em média $9,20 \pm 4,65$ mL de sêmen, com pH de $7,40 \pm 0,49$ e osmolaridade de 220 ± 20 mOsm. A concentração espermática do sêmen dos reprodutores foi de $1,42 \times 10^{10} \pm 7,65 \times 10^9$ células.mL⁻¹, com $98,16 \pm 2,49\%$ de espermatozóides vivos.

Após o descongelamento do sêmen, a solução contendo 2,5% frutose, 5% leite em pó e 10% metanol apresentou maior ($p < 0,05$) percentual de espermatozoides normais (Norm) ($71,13 \pm 4,79\%$) e estas médias também foram semelhantes ($p < 0,05$) ao percentual de espermatozoides normais verificada no sêmen fresco ($76,70 \pm 6,96\%$) (Tabela 2). Esta mesma solução diluidora também apresentou maior ($p < 0,05$) percentual teórico de espermatozoides móveis ($85,56 \pm 15,31\%$) no momento imediatamente após o início da ativação espermática (Mot0) (Tabela 2). Este parâmetro também foi semelhante ($p < 0,05$) aos verificados para o sêmen fresco ($97,08 \pm 3,19\%$) (Tabela 2).

Os resultados de velocidade espermática em linha reta, velocidade curvilinear e velocidade média de deslocamento para o sêmen fresco ou criopreservado apresentaram-se altamente correlacionadas ($r=99$, $r=100$ e $r=99$). O agrupamento destes parâmetros por meio da análise de componentes principais (PCA) gerou a equação que descreve a velocidade espermática pela expressão: $VE = 0,329604 * VCL + 0,338681 * VMD + 0,331714 * VLR$.

O sêmen de *S. melanoderdatum* submetido à criopreservação com a solução contendo 5% frutose, 5% leite em pó e 10% metanol apresentou melhores ($p < 0,05$) resultados para motilidade (Mot 10) ($78,99 \pm 27,20\%$) e velocidade (VE) ($75,62 \pm 18,76$ $\mu\text{m.s}^{-1}$) espermática no intervalo de 10 a 11 segundos após o início da ativação (Tabela

2). Estes resultados também foram semelhantes ($p < 0,05$) a motilidade ($92,90 \pm 13,81\%$) e a velocidade ($91,33 \pm 24,36 \mu\text{m.s}^{-1}$) espermática verificada para o sêmen fresco (Tabela 2).

A solução contendo 5% frutose, 5% leite em pó e 10% metanol também prolongou ($p < 0,05$) a ativação dos espermatozóides, levando mais tempo ($30,22 \pm 5,32\text{s}$) para que pelo menos 75% das células permanecessem móveis (t_{75}) (Tabela 2). Estes resultados também foram semelhantes ($p < 0,05$) aos valores encontrados para o sêmen fresco ($28,11 \pm 11,12\text{s}$) (Tabela 3).

Todas as soluções diluidoras contendo frutose, independentemente do crioprotetor intracelular e a solução contendo 10% de glicose, 5% de leite em pó e 10% de metanol apresentaram-se mais eficientes ($p < 0,05$) em prolongar a ativação espermática até o momento em que 50% das células permanecessem com movimento (t_{50}) (Tabelas 2 e 3; Figura 1). Estas soluções também foram semelhantes ($p < 0,05$) ao sêmen fresco ($38,85 \pm 12,70\text{s}$) para t_{50} (Tabela 2). Contudo, apesar da solução contendo 5% frutose, 5% leite em pó e 10% propilenoglicol ter numericamente promovido o prolongamento do tempo para que até 50% das células permanecessem ativas ($43,44 \pm 5,23\text{s}$), nesta solução, o sêmen de apenas dois (02) machos apresentaram espermatozoides móveis em t_{50} (Tabela 2). Por outro lado, as amostras de sêmen de todos os cinco (05) machos criopreservadas com a solução contendo 2,5% frutose, 5% leite em pó e 10% metanol e de quatro (04) machos quando criopreservadas com a solução contendo 5% frutose, 5% leite em pó e 10% metanol apresentaram movimento em t_{50} (Tabelas 2 e 3; Figura 1). O período de tempo decorrido para que 50% dos espermatozoides permaneçam ativos (t_{50}), não foi calculado para as soluções 7,5GL - PGL, 10GL - PGL e 2,5 FRU - PGL devido ao fato dos espermatozóides não

829 apresentarem motilidade quando ativados ou a motilidade inicial ser menor que 50%
830 (Tabelas 2 e 3; Figura 1).

831 Todas as soluções contendo frutose em sua constituição, as soluções formuladas
832 com 10% de glicose e DMSO ou metanol e aquela contendo 7,5% de glicose e DMSO
833 prolongaram ($p < 0,05$) o período de tempo decorrido para que 25% dos espermatozoides
834 continuassem ativos (t_{25}). Estas soluções apresentaram o mesmo ($p < 0,05$) tempo para
835 t_{25} que o sêmen fresco (Tabela 2), contudo, apenas as soluções contendo 2,5 e 5,0% de
836 frutose e 10% de metanol e a solução contendo 10% de glicose e 10% de metanol
837 garantiram a movimentação espermática no sêmen de todos os machos (Tabela 2). Não
838 foram calculados os períodos de tempo decorrido para que 25% dos espermatozoides
839 permaneçam ativos (t_{25}) para o sêmen criopreservado com a utilização das soluções
840 10GL – PGL e 2,5FRU - PGL devido ao fato de não haver ativação espermática.

841 O parâmetro h_0 das curvas de ativação variou entre -2,6838 e -0,0091 (Tabela
842 03). Já o parâmetro r variou entre 0,035178 e 0,142684 (Tabela 03). Para o coeficiente
843 de correlação (r^2) a variação verificada foi de 0,81 a 0,99 (Tabela 03).

Tabela 02 - Parâmetros espermáticos (média±desvio padrão) de *S. melanoderdatum* avaliados no sêmen fresco e após a criopreservação em diferentes soluções diluidoras.

Solução	Osm-Sol	Mot 10			V.E.			Norm			Mot0			t75			t50			t25		
		Média±DP	n		Média±DP	n		Média±DP	N		Média±DP	n		Média±DP	n		Média±DP	n		Média±DP	n	
SF		92,90±13,81	*	5	91,33±24,36	*	5	76,70±6,96	*	5	97,08±3,19	*	5	28,11±11,12	*	5	38,85±12,70	*	5	49,60±14,39	*	5
7,5GL - DMSO	282	34,89±33,83	bcd	5	31,03±28,58	cde	5	63,21±11,83	ab*	5	40,7±38,27	bcd	5	2,46	c	1	20,00±15,95	ac	3	45,00±22,14	ab*	3
7,5GL - MET	282	32,59±24,09	bcd	5	40,94±23,61	bce	5	50,47±6,36	bcd	5	42,53±28,23	bcd	5	3,13	c	1	11,25±14,75	c	2	23,56±11,26	b	4
7,5GL - PGL	282	17,38±12,87	cd	4	32,94±22,05	cde	4	59,40±18,68	ab*	5	24,72±17,22	cd	4	-			-			9,32±8,03	c	3
10GL - DMSO	351	20,39±28,64	cd	5	21,39±29,48	de	5	49,80±12,24	bcd	5	24,65±34,02	cd	5	-			13,37±10,71	c	2	43,10±12,83	ab*	2
10GL - MET	351	68,10±28,03	ab*	5	61,80±14,89	abc*	5	51,27±19,90	bcd	5	77,76±21,37	ab*	5	20,25±1,83	abc*	3	32,72±8,61	ab*	4	44,11±18,00	ab*	5
10GL - PGL	351	0	d	5	0	d	5	39,00±13,93	cd	5	0	d	5	-			-			-		
2,5 FRU - DMSO	247	14,37±32,13	cd	5	12,08±27,01	de	5	62,80±17,82	ab*	5	16,78±37,52	cd	5	10,98	bc*	1	32,84	ab*	1	54,69	a*	1
2,5 FRU - MET	247	77,69±21,66	ab*	5	72,44±13,37	ab*	5	71,13±4,79	a*	5	85,56±15,31	a*	5	23,35±13,56	ab*	4	34,74±15,97	ab*	5	53,79±11,22	a*	5
2,5 FRU - PGL	247	0	d	5	0	d	5	59,13±14,07	ab*	5	0	d	5	-			-			-		
5 FRU - DMSO	401	44,46±40,66	abc	5	42,77±39,13	bce	5	33,60±13,69	d	5	51,85±47,35	abc	5	12,73±2,21	abc	3	31,32±1,19	ab*	3	49,91±0,84	a*	3
5 FRU - MET	401	78,99±27,24	a*	4	75,62±18,76	a*	4	52,87±12,78	abc	5	67,95±41,76	ab*	4	30,22±5,32	a*	3	36,84±23,14	ab*	4	54,45±24,02	a*	4
5 FRU - PGL	401	43,61±50,47	abc	4	36,61±42,28	ce	4	63,60±9,10	ab*	5	36,72±50,31	bcd	4	23,90±6,30	ab*	2	43,44±5,23	ab*	2	62,97±4,17	a*	2
<i>f-valor</i>		6,0269			5,9133			3,259			7,4793			4,05272			4,7941			8,2717		

Letras diferentes na mesma coluna indicam médias semelhantes ($p < 0,05$) de acordo com o teste de comparação de médias de Duncan. Asteriscos indicam médias semelhantes ($p < 0,05$) ao sêmen fresco de acordo com o teste de médias de Dunnett. Osm – Sol - osmolaridade da solução diluidora; Mot 10 – percentual de espermatozoides móveis 10 segundos após a ativação (%); VE - Velocidade espermática ($\mu\text{m.s}^{-1}$); Norm – índice de normalidade; Mot0 - percentual inicial de espermatozoides móveis (calculado); t75 - período de tempo decorrido para que 75% dos espermatozoides permanecessem ativos; t50 - período de tempo decorrido para que 50% dos espermatozoides permanecessem ativos; t25 - período de tempo decorrido para que 25% dos espermatozoides permanecessem ativos. SF – Sêmen fresco; 10GL - DMSO - 10% glicose + 5% leite em pó + 10% DMSO; 10GL - MET - 10% glicose + 5% leite em pó + 10% metanol; 10GL - PGL - 10% glicose + 5% leite em pó + 10% propileno glicol; 7,5GL - DMSO - 7,5% glicose + 5% leite em pó + 10% DMSO; 7,5GL - MET - 7,5% glicose + 5% leite em pó + 10% metanol; 7,5GL - PGL - 7,5% glicose + 5% leite em pó + 10% propilenoglicol; 2,5 FRU - DMSO - 2,5% frutose + 5% leite em pó + 10% DMSO; 2,5 FRU - MET - 2,5% frutose + 5% leite em pó + 10% metanol; 2,5 FRU - PGL - 2,5% frutose + 5% leite em pó + 10% propilenoglicol; 5 FRU - DMSO - 5% frutose + 5% leite em pó + 10% DMSO; 5 FRU - MET - 5% frutose + 5% leite em pó + 10% metanol; 5 FRU – PGL - 5% frutose + 5% leite em pó + 10% propilenoglicol.

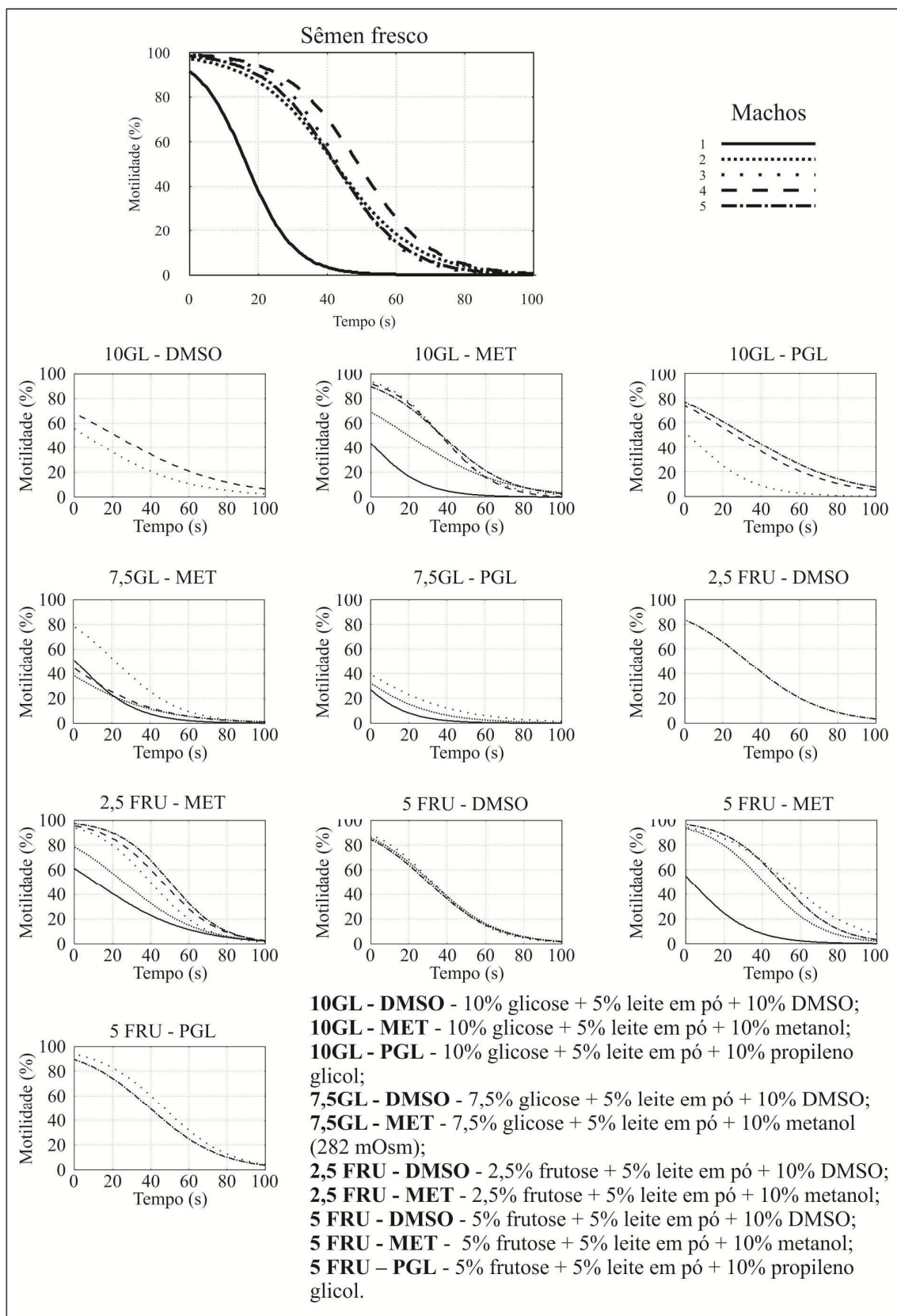
857 Tabela 03 – Equações de predição das curvas de ativação espermática, coeficientes de
 858 ajuste (r^2) e parâmetros espermáticos do *S. melanodermatum*, mensurados e estimados
 859 no sêmen fresco e criopreservado em diferentes soluções diluidoras.

Trat	Rep	h0	r	r^2	Mot0	t75	t50	t25	Mot 10	V.E.	Norm
SF	1	-0,09255	0,142684	0,98	91,53	8,98	16,68	24,38	68,22	49,24	83,33
	2	-0,02823	0,083866	0,91	97,25	29,44	42,54	55,64	98,34	92,56	76,58
	3	-0,0091	0,108295	0,94	99,1	33,25	43,4	53,54	99,79	105,94	80,49
	4	-0,00919	0,095283	0,96	99,09	37,65	49,17	60,68	99,75	109,13	77,98
	5	-0,01579	0,097631	0,96	98,45	31,24	42,49	53,74	98,37	99,76	65,13
7,5GL - DMSO	1	Sem ativação	Sem ativação	-	0	-	-	-	0	0	56,36
	2	Sem ativação	Sem ativação	-	0	-	-	-	0	0	71,33
	3	-0,89033	0,061254	0,85	52,9	-	1,9	19,83	39,55	45,53	46
	4	-0,35295	0,039846	0,98	73,91	-	26,14	53,71	67,19	54,36	74,67
	5	-0,3041	0,037244	0,98	76,68	2,46	31,96	61,46	67,71	55,27	67,67
7,5GL - MET	1	-0,94874	0,064455	0,97	51,32	-	0,82	17,86	34,26	47,79	50
	2	-1,603	0,039499	0,88	38,42	-	-	15,87	28,87	47,56	54,33
	3	-0,27686	0,059237	0,97	78,32	3,13	21,68	40,23	67,83	61,2	43,33
	4	-1,2429	0,043421	0,84	44,59	-	-	20,29	32	48,14	59
	5	Sem ativação	Sem ativação	-	0	-	-	-	0	0	45,67
7,5GL - PGL	1	-2,6838	0,071449	0,91	27,15	-	-	1,56	16,21	41,17	75
	2	-2,0817	0,048535	0,94	32,45	-	-	7,53	23,44	45,86	66
	3	-1,545	0,03839	0,9	39,29	-	-	17,29	29,89	44,72	55,67
	4	Sem ativação	Sem ativação	-	0	-	-	-	0	0	28,67
	5	Não disponível	Não disponível	-	-	-	-	-	-	-	71,67
10GL - DMSO	1	Sem ativação	Sem ativação	-	0	-	-	-	0	0	29
	2	Sem ativação	Sem ativação	-	0	-	-	-	0	0	55,33
	3	-0,79803	0,038921	0,91	55,62	-	5,8	34,02	41,89	48,79	50
	4	-0,4787	0,035178	0,88	67,63	-	20,94	52,17	60,04	58,16	60,67
	5	Sem ativação	Sem ativação	-	0	-	-	-	0	0	54
10GL - MET	1	-1,2783	0,06805	0,81	43,89	-	-	12,54	28,24	41,76	21
	2	-0,44387	0,040984	0,91	69,26	-	19,82	46,62	50,9	51,66	52,67
	3	-0,07513	0,070836	0,98	93,01	21,03	36,54	52,05	93,74	72,05	48
	4	-0,07378	0,069933	0,96	93,13	21,56	37,27	52,98	91,15	78,05	75,67
	5	-0,11732	0,057505	0,96	89,5	18,16	37,26	56,37	76,49	65,5	59
10GL - PGL	1	Sem ativação	Sem ativação	-	0	-	-	-	0	0	28,67
	2	Sem ativação	Sem ativação	-	0	-	-	-	0	0	29,33
	3	Sem ativação	Sem ativação	-	0	-	-	-	0	0	28,67
	4	Sem ativação	Sem ativação	-	0	-	-	-	0	0	52
	5	Sem ativação	Sem ativação	-	0	-	-	-	0	0	56,33
2,5 FRU - DMSO	1	Sem ativação	Sem ativação	-	0	-	-	-	0	0	62,67
	2	Sem ativação	Sem ativação	-	0	-	-	-	0	0	90,67
	3	Sem ativação	Sem ativação	-	0	-	-	-	0	0	60,67
	4	Sem ativação	Sem ativação	-	0	-	-	-	0	0	41
	5	-0,19192	0,050271	0,96	83,9	10,98	32,84	54,69	71,85	60,39	59

Tabela 3 – continuação...

2,5 FRU - MET	1	-0,63213	0,041595	0,83	61,68	-	11,44	37,85	44,84	56,02	67
	2	-0,27026	0,050589	0,94	78,72	4,15	25,86	47,58	66,55	65,05	77,33
	3	-0,0622	0,069501	0,98	94,14	24,15	39,96	55,77	87,98	68,91	72,33
	4	-0,04427	0,067433	0,97	95,76	29,94	46,23	62,52	94,75	84,52	73,33
	5	-0,02563	0,072992	0,95	97,5	35,15	50,2	65,25	94,34	87,7	65,67
2,5 FRU - PGL	1	Sem ativação	Sem ativação	-	0	-	-	-	0	0	80,67
	2	Sem ativação	Sem ativação	-	0	-	-	-	0	0	59,33
	3	Sem ativação	Sem ativação	-	0	-	-	-	0	0	59,67
	4	Sem ativação	Sem ativação	-	0	-	-	-	0	0	41,67
	5	Sem ativação	Sem ativação	-	0	-	-	-	0	0	54,33
5 FRU - DMSO	1	Sem ativação	Sem ativação	-	0	-	-	-	-	0	14,67
	2	-0,16319	0,057232	0,93	85,97	12,48	31,68	50,87	76,19	67,53	50
	3	-0,12781	0,063707	0,95	88,67	15,05	32,29	49,54	76,1	75	29
	4	Sem ativação	Sem ativação	-	0	-	-	-	0	0	31
	5	-0,18193	0,056816	0,93	84,61	10,66	29,99	49,33	70,02	71,32	43,33
5 FRU - MET	1	-0,81897	0,06541	0,98	54,98	-	3,05	19,85	38,4	48,36	58
	2	-0,06873	0,065493	0,98	93,57	24,11	40,88	57,66	88,6	79,51	72,33
	3	-0,05834	0,053183	0,98	94,49	32,77	53,43	74,09	92,93	83,9	43,33
	4	Não disponível	Não disponível	-	-	-	-	-	-	-	50
	5	-0,03377	0,06777	0,98	96,73	33,78	50	66,21	96,05	90,74	40,67
5 FRU - PGL	1	Sem ativação	Sem ativação	-	0	-	-	-	0	0	60,67
	2	Sem ativação	Sem ativação	-	0	-	-	-	0	0	62
	3	-0,06342	0,058511	0,99	94,04	28,36	47,14	65,91	91,25	74,02	72,67
	4	Não disponível	Não disponível	-	-	-	-	-	-	-	50,67
	5	-0,11626	0,054156	0,97	89,58	19,45	39,74	60,02	83,2	72,43	72

860 Trat – tratamento; Rep – Repetição; h0 – parâmetro da equação relacionado a
 861 motilidade inicial; r – parâmetro da equação relacionado a txa de decréscimo da
 862 motilidade espermática; r² - coeficiente de correlação; Mot0 - percentual inicial de
 863 espermatozoides móveis (calculado); Mot0 - percentual inicial de espermatozoides
 864 móveis (calculado); t75 - período de tempo decorrido para que 75% dos
 865 espermatozoides permanecessem ativos; t50 - período de tempo decorrido para que 50%
 866 dos espermatozoides permanecessem ativos; t25 - período de tempo decorrido para que
 867 25% dos espermatozoides permanecessem ativos; Mot 10 – percentual de
 868 espermatozoides móveis 10 segundos após a ativação (%); VE - Velocidade espermática
 869 ($\mu\text{m.s}^{-1}$); Norm – índice de normalidade; SF – Sêmen fresco; 10GL - DMSO - 10%
 870 glicose + 5% leite em pó + 10% DMSO; 10GL - MET - 10% glicose + 5% leite em pó +
 871 10% metanol; 10GL - PGL - 10% glicose + 5% leite em pó + 10% propilenoglicol;
 872 7,5GL - DMSO - 7,5% glicose + 5% leite em pó + 10% DMSO; 7,5GL - MET - 7,5%
 873 glicose + 5% leite em pó + 10% metanol; 7,5GL - PGL - 7,5% glicose + 5% leite em pó
 874 + 10% propilenoglicol; 2,5 FRU - DMSO - 2,5% frutose + 5% leite em pó + 10%
 875 DMSO; 2,5 FRU - MET - 2,5% frutose + 5% leite em pó + 10% metanol; 2,5 FRU -
 876 PGL - 2,5% frutose + 5% leite em pó + 10% propilenoglicol; 5 FRU - DMSO - 5%
 877 frutose + 5% leite em pó + 10% DMSO; 5 FRU - MET - 5% frutose + 5% leite em pó +
 878 10% metanol; 5 FRU – PGL - 5% frutose + 5% leite em pó + 10% propilenoglicol.



879

880 **Figura 1**– Curvas de ativação espermática ao longo do tempo para sêmen fresco de *S.*881 *melanodermatum* fresco e criopreservado em diferentes soluções diluidoras.

Discussão

A criopreservação de sêmen de peixes neotropicais tem sido estudada com eficiência para diversas espécies como o pintado (*Pseudoplatystomacorruscans*) [14]; o jundiá (*Rhamdia hillari*) [35] e o curimba (*Prochilodus lineatus*) [13]. Por outro lado, não existem pesquisas relacionadas com a criopreservação de sêmen do *S. melanoderdatum*.

Os resultados do presente experimento sugerem a influência direta dos componentes das soluções crioprotetoras sobre os parâmetros de motilidade espermática do *S. melanoderdatum*. Soluções contendo 2,5% de frutose ou 5% frutose adicionadas de 5% leite em pó e 10% metanol se mostraram mais eficientes em garantir a viabilidade espermática após o descongelamento. Em geral, a motilidade espermática é um dos principais parâmetros mensurados para avaliar a fertilidade e o sucesso da criopreservação dos espermatozóides, visto a sua importância no processo da reprodução artificial de peixes [36, 37] e sua relação direta com as taxas de fertilização [38].

A frutose empregada nos diluentes voltados a criopreservação pode apresentar efeitos benéficos aos espermatozóides, como o aumento da osmolaridade da solução para garantir a inativação espermática e evitar os prejuízos devido à ativação precoce [12]. Neste sentido, como a motilidade espermática depende das reduzidas reservas de ATP, que depois de consumido é ressintetizado a uma taxa muito lenta [33], a inibição da motilidade espermática causada pela frutose evita que estas reservas sejam perdidas em momentos inadequados. Além disso, a frutose também pode contribuir para o rápido condicionamento do metabolismo celular devido a absorção da frutose em nível celular [39]. Em analogia ao observado em hepatócitos criopreservados de ratos ou humanos, no sêmen criopreservado a frutose-1-fosfato pode entrar na via glicolítica no

nível de triose fosfato permitindo um alto grau de atividade glicolítica, aumentando a viabilidade destas células que se encontram em plena atividade e necessitam de energia para sua manutenção [39]. A frutose pode aumentar a concentração da ribose 5-fosfato em duas vezes. Este metabólito pode ser convertido em glicose-6-fosfato, podendo contribuir para a geração de NADPH. Assim, é notada uma vantagem das células tratadas com frutose sobre as tratadas com glicose, já que eles podem usar a ribose-5-fosfato acumulada como uma fonte adicional para a geração de redutores equivalentes ou NADPH [40].

Além disso, o emprego adequado do crioprotetor intracelular garante a manutenção da integridade celular durante a criopreservação, já que promovem a desidratação da célula e impedem a formação de cristais de gelo, contudo deve possuir baixa toxicidade [41]. Neste experimento os diferentes crioprotetores intracelulares não interferiram sobre a manutenção da integridade dos espermatozóides, especialmente no que se refere à normalidade da cauda. Contudo, os danos causados pela criopreservação nas células espermáticas podem estar associados a outros compartimentos celulares a exemplo cabeça, da peça intermediária ou do material nuclear [42]. Mesmo assim, pouco pode ser falado sobre as alterações morfológicas causadas aos espermatozóides, uma vez que a relação entre a morfologia e a motilidade espermática, bem como o impacto dessas relações sobre a fertilização em peixes, ainda não é clara [43]. De modo geral o sucesso do uso do metanol como agente crioprotetor para espermatozóides de peixes têm sido descrito para o *Pseudoplatystoma corruscans* [14], o *Oreochromis niloticus* [44] e o *Acipenser baeri* [36]. Contudo não foi observada nenhuma relação entre o índice de normalidade e os demais parâmetros aferidos. Como este é um trabalho pioneiro, novos estudos com o *S. melanoderdatum* devem ser realizados para melhor elucidar estas relações..

A motilidade espermática pode ser mensurada por meio de métodos subjetivos [16] ou objetivos [19, 45]. Contudo, esta avaliação é feita normalmente em momentos instantâneos, determinados arbitrariamente após o início da ativação espermática. Por outro lado, a cinética da ativação espermática depende de diversos fatores, onde o tempo é determinante [4] e este parâmetro tem influencia sobre a taxa de fertilização [6]. Com a análise da cinética da ativação espermática foi possível observar que o sêmen criopreservado além de manter a mesma qualidade inicial, manteve a mesma qualidade ao longo do tempo, se comparado com o sêmen fresco. Desta maneira a utilização do estudo de cinética de ativação espermática pode ter grande importância para a avaliação da viabilidade do sêmen descongelado. De forma geral o emprego de análises objetivas e de modelos matemáticos podem se caracterizar como ferramentas poderosas aplicadas em procedimentos de avaliação seminal ou espermática. Como foi observado neste estudo a utilização do modelo matemático não linear apresentou bons níveis de ajuste, variando entre 83 e 98%, o que indica a viabilidade do emprego em estudos de cinética de ativação espermática.

Os parâmetros de velocidade espermática também podem ser empregados na avaliação do sucesso da criopreservação, visto a relação direta com as taxas de fertilização [43, 46]. No presente experimento, a motilidade e a velocidade espermática demonstraram as mesmas tendências em função das diferentes soluções empregadas na criopreservação do sêmen do *S. melanodermatum* e possivelmente os efeitos da frutose sobre a melhora na qualidade espermática podem estar relacionados com a maior disponibilidade de energia após o descongelamento. Apesar das evidências da relação da velocidade espermática com a fertilidade dos espermatozóides, os mecanismos que governam estes processos ainda necessitam ser elucidados [34].

O sêmen criopreservado com a solução formulada com 2,5% de frutose, 5% de leite em pó e 10% de metanol apresentou melhores resultados para a motilidade inicial (Mot 0), porém as taxas de ativação espermática são reduzidas com maior velocidade. Em contraposição o sêmen criopreservado com solução contendo 5% frutose, 5% de leite em pó e 10 de metanol apresentou menor média para a motilidade inicial, entretanto esta solução prolongou o tempo de ativação espermática e demonstrou menor velocidade de perda da motilidade espermática.

A solução contendo 5% de frutose, 5% de leite em pó e 10 % de metanol, além de apresentar melhores resultados dos parâmetros relacionados com a motilidade espermática, também possuem efeito sobre a cinética de ativação espermática. As curvas de ativação espermática sugerem que esta solução promove uma menor taxa de perda da motilidade espermática. Este é um parâmetro importante visto que além da motilidade, o tempo total de ativação espermática também tem influencia sobre a taxa de fertilização [23], especialmente em sêmen criopreservado onde a cinética de ativação espermática pode ter sido influenciada pela osmolaridade da solução diluidora.

A solução formulada com 2,5% de frutose, 5% de leite em pó e 10% de metanol apresentou osmolaridade de 247mOsm, enquanto a solução contendo 5% de frutose, 5% de leite em pó e 10% de metanol apresentou osmolaridade 401 mOsm. A concentração osmótica influenciou a cinética de ativação prolongando a ativação espermática nas soluções com maior osmolaridade. Provavelmente porque a ativação espermática não foi completada imediatamente após a ativação, em função da alta concentração osmótica do meio e da diluição utilizada no processo de ativação [26].

O sêmen de *S. melanoderdatum* pode ser criopreservado com sucesso com a utilização de solução crioprotetora contendo 5% frutose, 5% de leite em pó e 10% de metanol em solução aquosa.

Referências bibliográficas

1. Froese, R. & Pauly, D. (2009). FishBase. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org, version(12/2011).
2. ZANIBONI FILHO E, MEURER S, SHIBATTA OA, NUÑER APdO. Catálogo ilustrado de peixes do alto rio Uruguai. Florianópolis: Ed. Da UFSC: Tractebel Energia, 2004; 128.
3. GARAVELLO JC. Revision of genus *Steindachneridion* (Siluriformes: Pimelodidae). Neotropical Ichthyology 3;2005;607-623.
4. Santt'ana JFM. Variáveis reprodutivas do surubim do iguaçu (*Steindachneridion melanodermatum*) e comparação do desenvolvimento ontogenético com o jundiá (*Rhamdia quelen*). Dissertação de mestrado - Pós - Graduação em Biologia Evolutiva. Ponta Grossa - Universidade Estadual de Ponta Grossa & Universidade do Centro Oeste do Paraná. 2009;72.
5. Feiden A, Hayashi C, Boscolo WR. Development of Iguacu surubim (*Steindachneridion melanodermatum*) larvae fed different diets. Revista Brasileira De Zootecnia-Brazilian Journal of Animal Science 2006;35:2203-2210.
6. Klein S, Feiden F, Boscolo WR, Reidel A, Signor A, Signor AA. Chemical products for *Ichthyophthirius multifiliis*, Fouquet (1876) controll in surubim do Iguacu *Steindachneridion sp.*, Garavello (1991). Semina: Ciências Agrárias, 2004;25;51-58.
7. Romagosa E, Souza BE, Sanches EA, Baggio DM, Bombardelli RA. Sperm motility of *Prochilodus lineatus* in relation to dilution rate and temperature of the activating medium. Journal of Applied Ichthyology 2010;26:678-681.

- 1007 8. Zaniboni Filho E, Schulz UH. Migratory Fishes of the Uruguay River. In:
1008 Carosfeld J, Harvey B, Ross C, (eds), Migratory Fishes of South América –
1009 Biology, Fisheries and Conservations Status: Ottawa: International Development
1010 Research Center, 2003.

- 1011 9. GODINHO HP. Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: bases
1012 para o desenvolvimento de tecnologias de produção. Revista Brasileira de
1013 Reprodução Animal 2007;31:351-360.

- 1014 10. Butts IAE, Babiak I, Ciereszko A, Litvak MK, Slowinska M, Soler C, Trippel
1015 EA. Semen characteristics and their ability to predict sperm cryopreservation
1016 potential of Atlantic cod, *Gadus morhua*. Theriogenology 2011;75:1290-1300.

- 1017 11. Linhart O, Rodina M, Flajshans M, Gela D, Kocour M. Cryopreservation of
1018 European catfish *Silurus glanis* sperm: Sperm motility, viability, and hatching
1019 success of embryos. Cryobiology 2005;51:250-261.

- 1020 12. Viveiros ATM, Oliveira AV, Maria AN, Orfao LH, Souza JC. Sensitivity of
1021 dourado (*Salminus brasiliensis*) spermatozoa to different cryoprotectant
1022 solutions. Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinaria E Zootecnia
1023 2009;61:883-889.

- 1024 13. Batista AM, Murgas LDS, Rosa PV, Oberlender G, Pereira GJM, Vicente da
1025 Costa D. A morphological classification proposal for curimba (*Prochilodus*
1026 *lineatus*) sperm damages after cryopreservation. Aquaculture Research
1027 2011;42:177-187.

- 1028 14. Carolsfeldt J, Godinho HP, Zaniboni E, Harvey BJ. Cryopreservation of sperm
1029 in Brazilian migratory fish conservation. Journal of Fish Biology 2003;63:472-
1030 489.

- 1031 15. Ludwig LAM, Gomes E, Artoni RF. Um método de reprodução induzida para o
1032 surubim *Steindachneridion melanodermatum* (siluriformes, pimelodidae) do rio
1033 iguaçu. Publ UEPG Ci Biol Saúde 2005;11:23-27.

- 1034 16. Bombardelli RA, Morschbacher EF, Campagnolo R, Sanches EA, Syperreck
 1035 MA. Insemination dose for artificial fertilization of grey jundia oocytes,
 1036 *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimardm, 1824). Revista Brasileira De Zootecnia-
 1037 Brazilian Journal of Animal Science 2006;35:1251-1257.

- 1038 17. Okamura D, de Araujo FG, Vieira e Rosa P, Fonseca de Freitas RT, Murgas
 1039 LDS, Cesar MP. Effect of benzocaine concentration and fish size on anesthesia
 1040 and recovery in Nile tilapia. Revista Brasileira De Zootecnia-Brazilian Journal
 1041 of Animal Science 2010;39:971-976.

- 1042 18. Poupard GP, Paxion C, Cosson J, Jeulin C, Fierville F, Billard R. Initiation of
 1043 carp spermatozoa motility and early ATP reduction after milt contamination by
 1044 urine. Aquaculture 1998;160:317-328.

- 1045 19. Sanches EA, Bombardelli RA, Marcos RM, Neumann G, de Toledo CPR,
 1046 Romagosa E. Sperm motility of *Rhamdia quelen* studied using computer-
 1047 assisted analysis by open-source software. Aquaculture Research 2010;42:153-
 1048 156.

- 1049 20. Sanches EA, Baggio DM, Piana PA, de Souza BE, Bombardelli RA. Artificial
 1050 fertilization of oocytes and sperm activation in pacu: effects of the
 1051 spermatozoa:oocyte ratio, water volume, and in natura semen preservation. -
 1052 Brazilian Journal of Animal Science 2011;40:1-6.

- 1053 21. Alavi SMH, Jorfi E, Hatef A, Mortezaei SAS. Sperm motility and seminal
 1054 plasma characteristics in *Barbus sharpeyi* (Gunther, 1874). Aquaculture
 1055 Research 2010;41: e688-e694.

- 1056 22. Bombardelli RA, Hayashi C, Natali MRM, Sanches EA, Piana PA. Níveis de
 1057 energia digestível sobre os desempenhos reprodutivo e zootécnico e a deposição
 1058 de lipídios nos hepatócitos de machos de tilápia-do-nilo. Brazilian Journal of
 1059 Animal Science 2010; 39; 941-949.

- 1060 23. Kavamoto ET, Fogli da Silveira W. Características físicas, químicas e
1061 microscópicas do sêmen do bagre, *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840) em
1062 condições de campo. Bol Inst Pesca 1986;13:95-100.
- 1063 24. Streit DP, Jr., Moraes GV, Ribeiro RP, Povh JA, Souza ED, Oliveira CAL.
1064 Avaliação de diferentes técnicas para coloração de sêmen de peixes. Arquivos de
1065 Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR. Umuarama, 2004;7;157-162.
- 1066 25. Streit DP, Jr., Ribeiro RP, Moraes GV. Características qualitativas do sêmen de
1067 pacu (*Piaractus mesopotamicus*) após indução hormonal. Bioscience Journal
1068 2006;22:119-125.
- 1069 26. Billard R., Cosson J., Crim L.W. & Suquet M. (1995) Sperm physiology and
1070 quality. In: Brood Stock Management and Egg and Larval Quality (ed. by N.R.
1071 Bromage & R.J. Roberts), pp. 25–52. Blackwell Science, Oxford, UK.
- 1072 27. Mylonas CC, Gissis A, Magnus Y, Zohar Y. Hormonal changes in male white
1073 bass (*Morone chrysops*) and evaluation of milt quality after treatment with a
1074 sustained-release GnRHa delivery system. Aquaculture 1997;153:301-313.
- 1075 28. Wirtz S, Steinmann P. Sperm characteristics in perch *Perca fluviatilis* L. Journal
1076 of Fish Biology 2006;68:1896-1902.
- 1077 29. Rurangwa E, Kime DE, Ollevier F, Nash JP. The measurement of sperm motility
1078 and factors affecting sperm quality in cultured fish. Aquaculture 2004;234: 1-28.
- 1079 30. Streit DP, Jr., Moraes GV, Ribeiro RP, al. e. Effects of three different sources of
1080 pituitary extract on gonadal inducer in male and female pacu (*Piaractus*
1081 *mesopotamicus*). Acta Scientiarum Animal Science 2005;27:439-447.
- 1082 31. Hafez ESE, Hafez B. Reprodução Animal, 7th ed. .Barueri: Manole; 2004.
- 1083 32. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal – CBRA (1998). Manual para exame
1084 andrológico e avaliação de sêmen animal. 49pp. CBRA, Belo Horizonte, BR.

- 1085 33. Dreanno C, Suquet M, Quemener L, Cosson J, Fierville F, Normant Y, Billard
1086 R. Cryopreservation of turbot (*Scophthalmus maximus*) spermatozoa.
1087 Theriogenology 1997;48:589-603.
- 1088 34. Tessaro L, de Toledo CPR, Neumann G, Krause RA, Meurer F, Natali MRM,
1089 Bombardelli RA. Growth and reproductive characteristics of *Rhamdia*
1090 *quelen* males fed on different digestible energy levels in the reproductive phase.
1091 Aquaculture 2012;326-329;74-80.
- 1092 35. Fogli da Silveira W, Kavamoto ET, Narahara MY. Avaliação da qualidade e
1093 criopreservação em forma de "pellets" do sêmen de bagre *Rhamdia*
1094 *hilarii* (Valenciennes, 1840). Bol. Inst. Pesca, 12;1985;7-11.
- 1095 36. Glogowski J, Kolman R, Szczepkowski M, Horvath A, Urbanyi B, Sieczynski P,
1096 Rzemieniecki A, Domagala J, Demianowicz W, Kowalski R, Ciereszko A.
1097 Fertilization rate of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*, Brandt) milt
1098 cryopreserved with methanol. Aquaculture 2002;211:367-373.
- 1099 37. Urbanyi B, Horvath A, Varga Z, Horvath L, Magyary I, Radics F. Effect of
1100 extenders on sperm cryopreservation of African catfish, *Clarias gariepinus*
1101 (Burchell). Aquaculture Research 1999;30:145-151.
- 1102 38. Tuset VM, Dietrich GJ, Wojtczak M, Slowinska M, de Monserrat J, Ciereszko
1103 A. Relationships between morphology, motility and fertilization capacity in
1104 rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. Journal of Applied
1105 Ichthyology 2008;24:393-397.
- 1106 39. Terry C, Dhawan A, Mitry RK, Lehec SC, Hughes RD. Preincubation of rat and
1107 human hepatocytes with cytoprotectants prior to cryopreservation can improve
1108 viability and function upon thawing. Liver Transplantation 2005;11:1533-1540.
- 1109 40. Jochen FA, Richter J, Eschrich K. Fructose inhibits apoptosis induced by
1110 reoxygenation in rat hepatocytes by decreasing reactive oxygen species via
1111 stabilization of the glutathione pool. Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular
1112 Cell Research 2002;1542:82-94. Suquet M, Dreanno C, Fauvel C, Cosson J,

- 1113 Billard R. Cryopreservation of sperm in marine fish. *Aquaculture Research*
1114 2000;31:231-243.
- 1115 41. Câmara DR, Guerra MMP. Ram semen cooling and criopreservation: damage
1116 inherent to technique and influence of medium supplementation with
1117 antioxidants at the sperm quality. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*
1118 2011; 35:33-40.
- 1119 42. Tuset VM, Trippel EA, de Monserrat J. Sperm morphology and its influence on
1120 swimming speed in Atlantic cod. *Journal of Applied Ichthyology* 2008;24:398-
1121 405.
- 1122 43. Godinho HP, Amorim V, Peixoto MTD. Cryopreservation of the semen of Nile
1123 tilapia *Oreochromis niloticus*, var. Chitralada: Cryoprotectants, spermatozoa
1124 activating solutions and cryogenic refrigerator. *Revista Brasileira De Zootecnia-*
1125 *Brazilian Journal of Animal Science* 2003;32:1537-1543.
- 1126 44. Wilson-Leedy JG, Ingermann RL. Development of a novel CASA system based
1127 on open source software for characterization of zebrafish sperm motility
1128 parameters. *Theriogenology* 2007;67:661-672.
- 1129 45. Linhart O, Alavi SMH, Rodina M, Gela D, Cosson J. Comparison of sperm
1130 velocity, motility and fertilizing ability between firstly and secondly activated
1131 spermatozoa of common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Applied Ichthyology*
1132 2008;24:386-392.