



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP



**METODOLOGIAS DE AVALIAÇÃO DE SÊMEN
E PROCEDIMENTOS DE FERTILIZAÇÃO
ARTIFICIAL DE SURUBIM-DO-PARAÍBA,
*Steindachneridion parahybae***

Eduardo Antônio Sanches

Jaboticabal, São Paulo
2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA -UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP



**METODOLOGIAS DE AVALIAÇÃO DE SÊMEN
E PROCEDIMENTOS DE FERTILIZAÇÃO
ARTIFICIAL DE SURUBIM-DO-PARAÍBA,
*Steindachneridion parahybae***

Eduardo Antônio Sanches

Orientadora Dra. Elizabeth Romagosa

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura, do Centro de Aquicultura da UNESP - CAUNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor.

Jaboticabal, São Paulo
2012

Sanches, Eduardo Antônio
S211m Metodologias de avaliação de sêmen e procedimentos de fertilização artificial de surubim-do-paraíba, *Steindachneridion parahybae* / Eduardo Antônio Sanches. -- Jaboticabal, 2012
xv, 137f. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2012

Orientadora: Elizabeth Romagosa

Banca examinadora: Adilson Reidel, Laura Helena Órfão, Luis David Solis Murgas, Marcos Weingartner

Bibliografia

1. Espermatozóide. 2. Fertilização artificial. 3. Ovócitos. 4. Reprodução de peixes. 5. Sêmen. 6. Surubim. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 636.3.034.2

e-mail:eduanches@hotmail.com

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

- ¹Tu que habitas sob a proteção do Altíssimo, que moras à sombra do Onipotente,
²dize ao Senhor: Sois meu refúgio e minha cidadela, meu Deus, em que eu confio.
³É ele quem te livrará do laço do caçador, e da peste perniciosa.
⁴Ele te cobrirá com suas plumas, sob suas asas encontrarás refúgio. Sua fidelidade te
será um escudo de proteção.
⁵Tu não temerás os terrores noturnos, nem a flecha que voa à luz do dia,
⁶nem a peste que se propaga nas trevas, nem o mal que grassa ao meio-dia.
⁷Caiam mil homens à tua esquerda e dez mil à tua direita, tu não serás atingido.
⁸Porém verás com teus próprios olhos, contemplarás o castigo dos pecadores,
⁹porque o Senhor é teu refúgio. Escolheste, por asilo, o Altíssimo.
¹⁰Nenhum mal te atingirá, nenhum flagelo chegará à tua tenda,
¹¹porque aos seus anjos ele mandou que te guardem em todos os teus caminhos.
¹²Eles te sustentarão em suas mãos, para que não tropeces em alguma pedra.
¹³Sobre serpente e víbora andarás, calcarás aos pés o leão e o dragão.
¹⁴Pois quem se uniu a mim, eu o livrarei; e o protegerei, pois conhece o meu nome.
¹⁵Quando me invocar, eu o atenderei; na tribulação estarei com ele. Hei de livrá-lo e o
cobrirei de glória.
¹⁶Será favorecido de longos dias, e mostrar-lhe-ei a minha salvação.

Salmo 90 (Salmo de Confiança)

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	v
AGRADECIMENTOS	vi
BIOGRAFIA DO AUTOR	ix
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xii
RESUMO.....	1
ABSTRACT	2
1) INTRODUÇÃO.....	3
2) REVISÃO DE LITERATURA.....	6
2.1) <i>Steindachneridion parahybae</i> : Características da espécie.....	6
2.1.1) Classificação taxonômica e distribuição geográfica.....	6
2.1.2) Biologia reprodutiva e reprodução artificial	8
2.1.3) Estado atual.....	10
2.2) Gametas de peixes de água doce.....	12
2.3) Implicações na utilização de doses inseminantes	16
2.4) Conservação de gametas.....	18
2.4.1) Ovócitos.....	19
2.4.2) Sêmen	20
2.5) Referências bibliográficas.....	21
3) OBJETIVOS GERAIS.....	35
3.1) Objetivos específicos.....	35
4) ARTIGO 01: PARÂMETROS ESPERMÁTICOS DE <i>Steindachneridion parahybae</i> USANDO SISTEMA COMPUTADORIZADO DE CÓDIGO ABERTO..	36
4.1) Resumo.....	37
4.2) Abstract.....	38
4.3) Introdução.....	39
4.4) Material e Métodos	41
4.4.1) Padronização de configurações do plugin CASA.....	43
4.4.2) Número de frames utilizada para realização das análises	45
4.4.3) Motilidade entre 10 e 20s pós-ativação com análise a cada 1s	45
4.4.4) Motilidade entre 10 e 50s pós-ativação com análise a cada 10s	46
4.5) Resultados	46
4.5.1) Padronização de configurações do plugin CASA.....	46
4.5.2) Número de frames utilizada para realização das análises	48
4.5.3) Motilidade entre 10 e 20s pós-ativação com análise a cada 1s	50

4.5.4) Motilidade entre 10 e 50s pós-ativação com análise a cada 10s	51
4.6) Discussão	54
4.7) Conclusão.....	58
4.8) Agradecimentos.....	58
4.9) Referências	59
5) ARTIGO 02: DOSE INSEMINANTE E VOLUME DE ÁGUA APLICADA À FERTILIZAÇÃO ARTIFICIAL DE <i>Steindachneridion parahybae</i>	64
5.1) Resumo.....	65
5.2) Abstract.....	66
5.3) Introdução.....	67
5.4) Material e Métodos	68
5.4.1) Local e seleção dos reprodutores	68
5.4.2) Indução hormonal	69
5.4.3) Coleta e avaliação de características seminais.....	69
5.4.4) Coleta e avaliação de ovócitos.....	71
5.4.5) Delineamento experimental	72
5.4.6) Fertilização Artificial.....	73
5.4.7) Análises estatísticas	74
5.5) Resultados	74
5.6) Discussão	77
5.7) Conclusão.....	79
5.8) Agradecimentos.....	80
5.9) Referências	80
6) ARTIGO 03: ESTOCAGEM DE OVÓCITOS DE <i>Steindachneridion parahybae</i> EM DIFERENTES TEMPERATURAS	86
6.1) Resumo.....	87
6.2) Abstract.....	88
6.3) Introdução.....	89
6.4) Material e Métodos	90
6.5) Resultados	94
6.6) Discussão	98
6.7) Conclusão.....	101
6.8) Agradecimentos.....	102
6.9) Referências	102
7) ARTIGO 04: CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS DE <i>Steindachneridion parahybae</i> AO LONGO DE 112 HORAS DE ESTOCAGEM EM QUATRO TEMPERATURAS.....	106
7.1) Resumo.....	107

7.2) Abstract.....	108
7.3) Introdução.....	109
7.4) Material e Métodos	110
7.5) Resultados	115
7.6) Discussão	122
7.7) Conclusão.....	127
7.8) Agradecimentos.....	127
7.9) Referências	128
8) CONSIDERAÇÕES FINAIS	135
9) ANEXO 1. A-Reprodutor de <i>Steindachneridion parahybae</i> ; B-Estação de Hidrobiologia e Aquicultura/CESP, Paraibuna/SP; C-Captura dos reprodutores no tanque de cultivo; D-Seleção de reprodutores; E-Canulação; F-Ovócitos com núcleo evidente; G-Ovócitos retirados pela canulação; H-Indução hormonal; I-Coleta de sêmen; J-Coleta de ovócitos; K-Pesagem dos ovócitos.	136
10) ANEXO 2. A-Sêmen sendo dosado; B-Copos plásticos utilizados na fertilização; C-Unidades experimentais; D-Sistema de incubação; E-Formato das incubadoras; F-Movimento dos ovos; G-H-Espermatozóides;I-Espermatozóides defeituosos; J-Ovo normal, 95% de epibolia; K-Ovo não fertilizado (gorado); L-Embriões normais; M-Larvas recém eclodidas; N-Larvas normais e defeituosas.	137

DEDICATÓRIA

Ao meu pai Altair e a minha mãe Regina pelo início de tudo.

Às minhas avós Deonila (in memoriam) e Arnalda pelos ensinamentos, orações e apoios em minhas decisões.

Aos meus queridos irmãos Anderson e Guilherme e a minha querida irmã Fernanda, pelo incentivo, apoio e companheirismo.

À minha esposa Franciele, pelo amor, companheirismo e incentivo.

Às minhas sobrinhas Sthefani e Larissa, pelo carisma e sinceridade repassados em suas risadas, atos e palavras.

A todos os meus familiares amigos.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida e pela presença em todos os momentos.

(Tudo posso naquele que me fortalece. Filipenses:4,13)

A minha família, em especial aos meus pais que acreditaram, incentivaram e ajudaram em todos os momentos.

À minha esposa Franciele, pelo amor, compreensão, paciência, apoio, dedicação, companheirismo, incentivo, pelos grandiosos ensinamentos e pelos inúmeros momentos de felicidade que compartilhamos. Muito obrigado por ser uma pessoa muito especial na minha vida, a quem tenho muito orgulho de estar ao lado. Você é minha inspiração para chegar cada vez mais longe, enfrentar os desafios e superá-los sempre confiante, pois tudo dará certo.

Eu te Amo!!!

À Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho (UNESP), em especial ao Centro de Aquicultura (CAUNESP) pela infra-estrutura, suporte técnico e apoio durante o Doutorado.

À Companhia Energética de São Paulo (CESP) por disponibilizar para a execução dos experimentos a infra-estrutura, material biológico e suporte técnico da Estação de Hidrobiologia e Aquicultura (EHA) de Paraibuna/SP

À Fundação de Amparo e Pesquisa de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudos durante 32 meses de Doutorado (Processo nº 2009/18609-6) e auxílio a pesquisa (Processo nº 2011/02818-5).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio à pesquisa (Processo nº 478347/2009-0) e pela concessão de bolsa de estudos durante quatro meses de Doutorado.

Ao Laboratório de Tecnologia da Reprodução de Animais Aquáticos Cultiváveis (LATRAAC) da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), pelo suporte oferecido durante a execução dos experimentos e análises.

À Prof^ª. Dra. Elizabeth Romagosa, pela amizade, paciência, ensinamentos, conselhos e companheirismo durante sua dedicada orientação. Durante estes anos tive a grande felicidade de compartilhar vários momentos com a senhora, que além de uma excelente pesquisadora, é acima de tudo, uma pessoa de caráter admirável, na qual sempre me inspira em seguir em frente. A senhora é um grande exemplo profissional e pessoal para todos.

Muito obrigado por confiar em mim.

Ao Prof. Dr. Robie Allan Bombardelli, pela amizade, ensinamentos, conselhos e companheirismo durante sua dedicada co-orientação.

Ao meu amigo Danilo Caneppele pela paciência, companheirismo, ensinamentos e por abrir as portas CESP/EHA de Paraibuna/SP para a execução do trabalho.

Aos amigos que foram determinantes na execução dos experimentos: Danilo Caneppele, Renan Yoshiharu Okawara, Danielle Zanerato Damasceno, Rafael Venâncio Araújo, Taís da Silva Lopes, Robie Allan Bombardelli, Giovano Neumann, Ronan Maciel Marcos e César Pereira Rebechi de Toledo, pela grandiosa ajuda, ensinamentos, companheirismo e por compartilharem inúmeros momentos de alegrias antes, durante e após os experimentos.

Aos funcionários da Estação de Hidrobiologia e Aquicultura da CESP de Paraibuna/SP: Edmur, Benedito, Milton, Vicente, Ielzo, Diego, César, José Adriano e José Donizetti, pelos grandiosos ensinamentos, imensa ajuda desde seleção de matrizes à confecção de incubadoras, além dos inúmeros momentos de alegrias compartilhados.

A todos os professores que contribuíram muito para minha formação. Em especial aos Professores Dr. George Shigueki Yasui e Dr. Eduardo de Medeiros Ferraz que participaram da banca examinadora de qualificação. Aos Professores Dr.

Marcos Weingartner, Dra. Laura Helena Órfão, Dr. Luis David Solis Murgas, Dr. Adilson Reidel que participaram como titulares da banca examinadora da tese, aos Professores Dr. Pitágoras Augusto Piana, Dr. Ricardo Pereira Ribeiro, Dr. Gentil Vanini de Moraes, Dr. George Shigueki Yasui, Dr. Fábio Bittencourt que participaram como membros suplentes da banca examinadora da tese e aos Professores Dr. Danilo Pedro Streit Jr., Dr. Ana Tereza Mendonça Viveiros, Dr. Alexandre Nizio Maria, Dr. Rafael Venâncio Araújo, Dr. Alexandre Ninhaus-Silveira, Dr. José Augusto Senhorini e Dr. Sérgio Ricardo Batlouni, que aceitaram o convite para participação da banca, entretanto não puderam participar devido motivos pessoais e data da defesa. A todos, muito obrigado pelas grandiosas contribuições, dicas, ensinamentos e oportunidades.

Aos funcionários da Pós-Graduação do CAUNESP, Veralice e David, que sempre estavam dispostos a me atender e ajudar quando precisei.

Aos demais professores e funcionários da UNESP, CAUNESP, CESP e UNIOESTE, que contribuíram de forma direta ou indireta na minha formação.

Aos demais colegas e amigos do CAUNESP, pelas alegrias e conhecimentos compartilhados, em especial ao Alexandre Oliveira (Bauru), Bruno Preto (Brunão), Fábio Bittencourt (Fabão), Fábio Zanuzo (Spinha), Rafael Lopes (Sansão), Luiz Gianechini (Pastor) e Luis Maniak (Rhosa), por dividirem espaço na república biozona, por compartilharem conhecimentos e momentos de descontração, em festas, churrascos e bares de Jaboticabal/SP.

À todos os amigos de Paraibuna: Danilo, Grillo, Xinguá, Rogérião, Dirley, Cintia, Ney, Marcelo, Fabinho, Cacéco, Cavera, Clara, Tucão, Batoré, Gordinho, Miguel, Juliano, Felipe, Luizão, Bilú, Simão, Seco, Túlio, Joninha, Ana Eliza, Jabá, Sayuri, França, Priscila, Arieli, enfim, a todas as pessoas maravilhosas que eu tive a felicidade de conhecer, além dos inúmeros momentos de alegrias compartilhados em churrascos, festas, aventuras e no famoso bar do Danilo e da Néia.

MUITO OBRIGADO A TODOS!!!

BIOGRAFIA DO AUTOR

EDUARDO ANTÔNIO SANCHES, filho de Altair José Sanches e Raimunda Regina Sanches, nasceu em Toledo, Paraná, no dia 05 de maio de 1985.

Em março de 1991, iniciou o ensino básico na Escola Municipal Antônio Scain, em Toledo, PR.

Em março de 1996, iniciou o ensino fundamental no Colégio Estadual Dr. João Cândido Ferreira, em Toledo, PR.

Em março de 2000, iniciou o ensino médio no Colégio Estadual Presidente Castelo Branco “PREMEN”, em Toledo, PR.

Em 05 de maio de 2003, ingressou no Curso de Engenharia de Pesca da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE – *Campus* de Toledo, PR.

No dia 05 de novembro de 2007, submeteu-se a banca para defesa da Monografia, para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Pesca, Toledo, PR.

Em 05 de março de 2008 iniciou o Mestrado em Aquicultura pela Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Jaboticabal, SP.

No dia 21 de agosto de 2009, submeteu-se a banca para a defesa da Dissertação de Mestrado em Aquicultura, Jaboticabal, SP.

Em 28 de Agosto de 2009 iniciou o Doutorado em Aquicultura pela Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Jaboticabal, SP.

Em 30 de julho de 2012 submeteu-se a banca para a qualificação da Tese de Doutorado, São Paulo, SP.

No dia 07 de novembro de 2012, submeteu-se a banca para a defesa da Tese de Doutorado em Aquicultura, Jaboticabal, SP.

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA:

Tabela 1. Características seminais e espermáticas de *Steindachneridion parahybae* (Fonte: Caneppele, 2011)..... 10

ARTIGO 01: PARÂMETROS ESPERMÁTICOS DE *Steindachneridion parahybae* USANDO SISTEMA COMPUTADORIZADO DE CÓDIGO ABERTO

Tabela 1. Configurações empregadas na caixa de diálogo do plugin CASA/ImageJ para avaliação dos parâmetros espermáticos em *Steindachneridion parahybae* com vídeo gravado em objetiva de 40x a 100 fps (656x490pixels). Configurações para avaliação de 0,5s de vídeo ou 50 frames. Taxa de motilidade (MOT), velocidade curvilínea (VCL), velocidade média de deslocamento (VAP), velocidade em linha reta (VSL), retilinearidade (STR) e oscilação (WOB). 47

Tabela 2. Parâmetros espermáticos (média±desvio padrão) de *Steindachneridion parahybae* obtidos em objetiva de 40x e a partir da utilização de diferentes números de frames. Taxa de motilidade (MOT), velocidade curvilínea (VCL), velocidade em linha reta (VSL), retilinearidade (STR) e número de espermatozoides (NSPZ). 49

Tabela 3. Variação dos parâmetros espermáticos de 13 machos de *Steindachneridion parahybae* em 10 segundos após ativação. Taxa de motilidade (MOT), velocidade curvilínea (VCL), velocidade média de deslocamento (VAP), velocidade em linha reta (VSL), retilinearidade (STR) e oscilação (WOB). 53

Tabela 4. Correlação linear de Pearson entre os parâmetros espermáticos de *Steindachneridion parahybae* obtidos entre 10 a 50 segundos após ativação. Valores em negrito indicam correlação linear significativa ($P < 0,05$). Taxa de motilidade (MOT), velocidade curvilínea (VCL), velocidade média de deslocamento (VAP), velocidade em linha reta (VSL), retilinearidade (STR), oscilação (WOB) e número de espermatozoides (NSPZ). 53

ARTIGO 02: DOSE INSEMINANTE E VOLUME DE ÁGUA APLICADA À FERTILIZAÇÃO ARTIFICIAL DE *Steindachneridion parahybae*

Tabela 1. Parâmetros seminais e espermáticos em *Steindachneridion parahybae* (média±desvio padrão) (n=2) 75

Tabela 2. Parâmetros mensurados da qualidade de água empregada na fertilização de ovócitos e incubação dos ovos de *Steindachneridion parahybae* (média±desvio padrão) (n=3)..... 75

ARTIGO 03: ESTOCAGEM DE OVÓCITOS DE *Steindachneridion parahybae* EM DIFERENTES TEMPERATURAS

Tabela 1. Parâmetros seminais e espermáticos (média±desvio padrão) de *Steindachneridion parahybae* no início e final dos dois ensaios experimentais. 95

ARTIGO 04: CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS DE *Steindachneridion parahybae* AO LONGO DE 112 HORAS DE ESTOCAGEM EM QUATRO TEMPERATURAS

Tabela 1. Protocolo experimental empregado para exposição de sêmen *in natura* de *Steindachneridion parahybae* ao longo de 112 horas em quatro temperaturas. 111

Tabela 2. Peso dos machos e parâmetros espermáticos observados em *Steindachneridion parahybae* imediatamente após coleta do sêmen. 115

Tabela 3. Coeficientes de correlação linear de Pearson entre parâmetros espermáticos de *Steindachneridion parahybae* (n=153) obtidos ao longo de 112h de estocagem. 122

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA:

- Figura 1. Fêmea de surubim-do-paraíba, *Steindachneridion parahybae* com 52cm de comprimento total (Honji 2011)..... 6
- Figura 2. Localização da bacia hidrográfica do Rio Paraíba do Sul, abrangendo os estados de SP, RJ e MG. Fonte: ANA,(2012) 8
- Figura 3. Cascata de eventos desencadeadores da motilidade espermática em peixes de água doce. Adaptado de Alavi & Cosson (2006)..... 14

ARTIGO 01: PARÂMETROS ESPERMÁTICOS DE *Steindachneridion parahybae* USANDO SISTEMA COMPUTADORIZADO DE CÓDIGO ABERTO

- Figura 1. Imagens geradas pelo plugin CASA (A) e IMAGEJ em *Image/Stacks/Z Project/Projection Type: max intensity* (B). Setas finas pretas (A) indicam espermatozóides em movimento lento considerados como imóveis. Setas largas (1B) representam espermatozóides não considerados na análise do plugin CASA, as brancas representam espermatozóides que saíram do campo de visualização e as cinzas espermatozóides que se colidiram no momento da avaliação. 44
- Figura 2. Trajetórias individuais de espermatozóides de *Steindachneridion parahybae* e utilizadas pelo plugin CASA para a avaliação da velocidade curvilínea (VCL), velocidade média de deslocamento (VAP) e velocidade em linha reta (VSL). Linha contínua preta representa a posição no plano cartesiano dos espermatozóides ponto a ponto nos 50 frames utilizados para o cálculo da VCL. Linha seccionada preta representa trajetória gerada pelo plugin CASA e utilizada para avaliação da VAP. Linha contínua cinza representa trajetória utilizada para avaliação da VSL. Ponto preto grande representa início da trajetória. Eixo x (*x-axis*); Eixo y (*y-axis*). Trajetórias: (A) perfeitamente retilínea; (B) completamente errática; (C) parcialmente errática; (D) parcialmente retilínea. 48
- Figura 3. Comportamento de um espermatozóide de *Steindachneridion parahybae* com movimento circular em um plano cartesiano [eixo x (*x-axis*); eixo y (*y-axis*)] e indicação do cálculo da velocidade curvilínea (VCL), velocidade média de deslocamento (VAP) e velocidade em linha reta (VSL) em 50 frames (A) e 100 frames (B). (A) VCL $94,65 \mu\text{m s}^{-1}$, VAP $50,88 \mu\text{m s}^{-1}$, VSL $47,28 \mu\text{m s}^{-1}$, retilinearidade (STR) 92,92%, oscilação (WOB) 53,75%. (B) VCL $85,49 \mu\text{m s}^{-1}$, VAP $47,64 \mu\text{m s}^{-1}$, VSL $35,69 \mu\text{m s}^{-1}$, STR 74,91%, WOB 55,73%. 49
- Figura 4. Motilidade espermática (MOT), velocidade curvilínea (VCL), velocidade média de deslocamento (VAP) velocidade em linha reta (VSL) in *Steindachneridion parahybae* entre 10 e 20s após ativação (média e desvio padrão). Análise de variância (ANOVA). Análise de regressão

- linear (REG). Diferentes letras indicam diferença significativa ($P<0,05$) de acordo com o teste de Duncan..... 50
- Figura 5. Taxa de motilidade (MOT) de *Steindachneridion parahybae* entre 10 e 50 segundos após ativação (*time after activation*). (A) Média e desvio padrão, letras diferentes representam diferença significativa ($P<0,05$) de acordo com teste de comparação de médias de Duncan; (B) Modelo não-linear utilizado para estimar a queda da motilidade, detalhe que em 23,65 segundos apenas 50% dos espermatozóides estão móveis; (C) comportamento da motilidade dos 13 machos; (D) comportamento relativo da motilidade dos 13 machos utilizando o ponto inicial como ponto de partida de 100%. 51
- Figura 6. Velocidade curvilínea (VCL), velocidade média de deslocamento(VAP) e velocidade em linha reta(VSL), reilinearidade (STR), oscilação (WOB) e número de espermatozóides de *Steindachneridion parahybae* observados entre 10 e 50 segundos após ativação. Médias e desvio padrão. Diferentes letras indicam diferença significativa ($P<0,05$) de acordo com o teste de Duncan. 52
- ARTIGO 02: DOSE INSEMINANTE E VOLUME DE ÁGUA APLICADA À FERTILIZAÇÃO ARTIFICIAL DE *Steindachneridion parahybae*
- Figura 1. Valores das taxas de fertilização (Fert) de *S. parahybae* com relação às diferentes doses inseminantes *versus* volume de água. Esquerda – representação gráfica em 3D. Direita – representação gráfica em 2D. Espermatozóides ovócito⁻¹ (spz ovc⁻¹). $r^2=77,47\%$ 76
- Figura 2. Comportamento dos valores das taxas de eclosão (Eclos) de *S. parahybae* com relação às diferentes doses inseminantes *versus* volume de água. Esquerda – representação gráfica em 3D. Direita – representação gráfica em 2D. Espermatozóides ovócitos⁻¹ (spz ovc⁻¹). $r^2=72,29\%$ 76
- ARTIGO 03: ESTOCAGEM DE OVÓCITOS DE *Steindachneridion parahybae* EM DIFERENTES TEMPERATURAS
- Figura 1. Superfície de resposta das taxas de fertilização (Fert) de ovócitos de *Steindachneridion parahybae* em relação à temperatura de exposição durante 355 minutos. Esquerda – representação gráfica em 3D. Direita – representação gráfica em 2D. 96
- Figura 2. Taxas de fertilização de ovócitos de *Steindachneridion parahybae* em relação à temperatura de exposição durante 355 minutos. Letras diferentes nas colunas indicam ($P<0,05$) de acordo com o teste de comparação de médias de Duncan. 96
- Figura 3. Taxas de fertilização de ovócitos de *Steindachneridion parahybae* expostos em três temperaturas durante 110 minutos. Letras diferentes

	nas colunas indicam ($P < 0,05$) de acordo com o teste de comparação de médias de Duncan.....	97
Figura 4.	Taxas de eclosão de ovos a partir de exposição de ovócitos de <i>Steindachneridion parahybae</i> em três temperaturas durante 110 minutos. Letras diferentes nas colunas indicam ($P < 0,05$) de acordo com o teste de comparação de médias de Duncan.	97
Figura 5.	Taxas de larvas normais a partir de exposição de ovócitos de <i>Steindachneridion parahybae</i> em três temperaturas durante 110 minutos. Letras diferentes nas colunas indicam ($P < 0,05$) de acordo com o teste de comparação de médias de Duncan.	98
ARTIGO 04: CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS DE <i>Steindachneridion parahybae</i> AO LONGO DE 112 HORAS DE ESTOCAGEM EM QUATRO TEMPERATURAS		
Figura 1.	Taxas de motilidade espermática de <i>Steindachneridion parahybae</i> após exposição do sêmen <i>in natura</i> a quatro temperaturas durante 112 horas. (Valores médios e erro padrão).....	117
Figura 2.	Taxas de motilidade espermática (MOT) de <i>Steindachneridion parahybae</i> após exposição do sêmen <i>in natura</i> a quatro temperaturas durante 112 horas. Esquerda – Representação gráfica em 3D; Direita – Representação gráfica em 2D. ($n=225$, $r^2=66,43\%$).....	117
Figura 3.	Velocidade espermática de espermatozóides de <i>Steindachneridion parahybae</i> após exposição do sêmen <i>in natura</i> a quatro temperaturas durante 112 horas. (Valores médios e erro padrão).....	118
Figura 4.	Velocidade espermática (VE) de espermatozóides de <i>Steindachneridion parahybae</i> após exposição do sêmen <i>in natura</i> a quatro temperaturas durante 112 horas. Esquerda – Representação gráfica em 3D; Direita – Representação gráfica em 2D. ($n=164$, $r^2=44,64\%$).....	118
Figura 5.	Taxas de retilinearidade de espermatozóides de <i>Steindachneridion parahybae</i> após exposição do sêmen <i>in natura</i> a quatro temperaturas durante 112 horas. (Valores médios e erro padrão).....	119
Figura 6.	Taxas de retilinearidade (RET) de espermatozóides de <i>Steindachneridion parahybae</i> após exposição do sêmen <i>in natura</i> a quatro temperaturas durante 112 horas. Esquerda – Representação gráfica em 3D; Direita – Representação gráfica em 2D. ($n=164$, $r^2=18,54\%$).....	119
Figura 7.	Taxas de espermatozóides normais de <i>Steindachneridion parahybae</i> após exposição do sêmen <i>in natura</i> a quatro temperaturas durante 112 horas. (Valores médios e erro padrão).....	120
Figura 8.	Taxas de espermatozóides normais (NOR) de <i>Steindachneridion parahybae</i> após exposição do sêmen <i>in natura</i> a quatro temperaturas	

durante 112 horas. Esquerda – Representação gráfica em 3D; Direita – Representação gráfica em 2D. (n=198, $r^2=49,17\%$)..... 120

Figura 9. Taxas de sobrevivência espermática de *Steindachneridion parahybae* após exposição de sêmen *in natura* a quatro temperaturas durante 112 horas. (Valores médios e erro padrão)..... 121

Figura 10. Taxas de sobrevivência espermática (Sob) de *Steindachneridion parahybae* após exposição *in natura* a quatro temperaturas durante 112 horas. Esquerda – Representação gráfica em 3D; Direita – Representação gráfica em 2D. (n=201, $r^2=55,53\%$)..... 121

RESUMO

O objetivo do trabalho foi de adaptar metodologias de análises espermáticas e aprimorar o processo de fertilização artificial e condições de estocagem de gametas de surubim-do-paraíba, *Steindachneridion parahybae*: espécie de peixe criticamente ameaçada de extinção. Para tanto, foram realizados quatro ensaios experimentais: (1) validação de método e avaliação dos parâmetros espermáticos por meio de *software* livre. (2) determinação da dose inseminante e volume de água empregados na fertilização artificial; (3) estocagem de ovócitos *in natura* em quatro temperaturas ao longo de 355 minutos; (4) estocagem do sêmen *in natura* em quatro temperaturas ao longo 112h. Observou-se que o método de análise espermática utilizando o *software* de código aberto ImageJ/*plugin* CASA é uma ferramenta eficiente, exata, objetiva e barata, além de possibilitar uma nova perspectiva de análises em peixes nativos. As configurações estabelecidas no presente trabalho poderão servir de base para novos trabalhos relacionados às análises espermáticas do surubim-do-paraíba, bem como de outras espécies. Verificou-se que a quantidade de espermatozóides e o volume de água interferem diretamente no procedimento de fertilização artificial, com melhores resultados na utilização de $5,5 \times 10^6$ espermatozóides ovócito⁻¹ e 1,0mL de água g⁻¹ de ovócitos. Foi observado que a estocagem de ovócitos e sêmen de forma *in natura* não é recomendada em ambientes com temperaturas superiores a 25°C e inferiores a 15°C. Temperaturas intermediárias (15-25°C) possibilitam melhores condições e prolongam a qualidade dos gametas, entretanto, recomenda-se em procedimentos de fertilização artificial da espécie, a coleta do sêmen antes que os ovócitos. Os resultados obtidos no presente trabalho além de proporcionarem aumento das taxas de fertilização e eclosão, também permitem a otimização dos gametas pela utilização de forma controlada, e permitem utilizá-los com qualidades satisfatórias por mais tempo após a coleta. Além disso, servirão de base para futuras pesquisas, contribuindo para o desenvolvimento de novas estratégias biotecnológicas aplicadas à conservação do *S. parahybae*.

Palavras-Chave: espermatozóides, fertilização artificial, ovócitos, reprodução de peixes, sêmen, surubim

ABSTRACT

The aim was to adapt methodologies of sperm analysis and to improve the artificial fertilization process and gamete storage conditions of surubim-of-paraiba, *Steindachneridion parahybae*: critically endangered fish species. So that, four experimental tests were performed: (1) validation of method and evaluation of sperm parameters using free software. (2) determination of the inseminating dose and water volume used in artificial fertilization, (3) storage of fresh oocytes into four temperatures over 355 minutes, (4) storage of fresh semen into four temperatures over 112h. It was observed that the sperm analysis method using open source software ImageJ/plugin CASA is an effective tool, accurate, objective and inexpensive, besides enables a new perspective of the analysis on the native fish. The settings established in this study could serve as a basis for further work related at sperm analysis of surubim-do-paraiba and other species. It was found that sperm quantity and water volume interfere directly in the procedure of artificial fertilization, with improved results on usage of 5.5×10^6 spermatozoa oocyte⁻¹ and 1.0 ml of water g⁻¹ of oocyte. It was observed that the fresh oocytes and sperm storage is not recommended in environments with temperatures above 25°C and below 15°C. Intermediate temperatures (15-25°C) enable better results and prolong the gametes quality, however, it is recommended in the artificial fertilization procedures the semen collection before the oocytes. The results obtained in this study providing increased rates of fertilization and hatching, besides to allow gametes optimization through of the utilization of controlled manner, and with satisfactory quality for more time after collection. Besides, these results provide a basis for future research, contributing to the development of new biotech strategic applied to conservation of *S. parahybae*.

Key-words: artificial fertilization, catfish, fish reproduction, oocytes, semen, spermatozoa

1) INTRODUÇÃO

O surubim-do-Paraíba, *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes: Pimelodidae) é um bagre cinza com pintas escuras ao longo do corpo (Anexo1-A), endêmico da bacia do rio Paraíba do Sul inserida em três Estados, Rio de Janeiro, Minas Gerais e São Paulo (Garavello 2005), e vem sofrendo explorações desordenadas, desde a década de 50 onde foram capturadas aproximadamente $2.000\text{kg}\cdot\text{ano}^{-1}$ (Machado & Abreu 1952). Atualmente esta espécie encontra-se na lista do livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção (MMA 2008) e é definida como umas das espécies que está em estado crítico de extinção (IBGE 2009), sendo considerada regionalmente extinta no Estado de São Paulo (Hilsdorf & Petreire Jr 2002). Atualmente poucos reprodutores nativos são capturados e o estoque de animais nativos mantidos em cativeiro é limitada (Caneppele, 2011).

Caneppele et al. (2009) realizaram a reprodução artificial do surubim-do-Paraíba por meio de agentes indutores, sendo empregada à fertilização artificial à “seco” (Ihering 1937) que consiste na liberação dos gametas (por meio de extrusão), homogeneização na ausência de água e adição de água somente no momento da ativação dos espermatozóides e, a seguir, fertilização dos ovócitos. Caneppele et al. (2009) observaram ovulação no período de 250 horas-grau, com repostas satisfatórias (85% ovócitos fertilizados). Caneppele (2011) verificou que os machos apresentam liberação constante de sêmen ao longo da estação reprodutiva (out-mar) e com qualidades satisfatórias para o procedimento de reprodução artificial da espécie. Estes resultados vêm sendo utilizados em programas de recuperação da ictiofauna local e servem de base para futuros estudos de conservação da biodiversidade genética em programas de criopreservação (Honji et al. 2009). Entretanto, para o estabelecimento de estratégias de preservação e reconstituição da espécie, estudos refinados sobre biologia e biotécnicas reprodutivas em cativeiro, caracterização de gametas e padronização de protocolos durante o processo de fertilização artificial devem ser realizados.

Um dos principais aspectos para a intensificação da produção piscícola, acompanhada da sustentabilidade tanto econômica como ambiental, é a utilização

da propagação artificial ou reprodução induzida (Romagosa, 2006). Para tal, devem-se utilizar gametas de qualidade promovendo máxima fertilização e subsequente desenvolvimento normal do embrião (Bobe & Labbe 2010; Romagosa et al. 2010). Uma das formas de se determinar o potencial de desenvolvimento é estimá-lo por meio de medidas/estimativas diretas (tamanho, fertilização, eclosão, percentual de larvas normais)(Brooks et al. 1997; Sanches et al. 2009; Bobe & Labbe 2010).

Dentre os parâmetros citados, a estimativa das taxas de fertilização vem sendo uma das mais empregadas como indicativo da qualidade dos ovócitos. Entretanto, parâmetros físicos e químicos da água, procedimentos de fertilização e incubação dos ovos podem ser controladas favorecendo condições propícias no desenvolvimento dos mesmos (Brooks et al. 1997; Chereguini et al. 1999; Bobe & Labbe 2010; Coward et al. 2002). Todavia, além das taxas de fertilização, parâmetros de qualidade espermática, tais como, taxas de motilidade, taxas de sobrevivência, velocidades e anormalidades morfológicas (Fogli da Silveira et al. 1988; Billard & Cosson 1992; Billard et al. 1995; Ravinder et al. 1997; Rurangwa et al. 2004; Tuset et al. 2008) também são empregadas.

Métodos subjetivos têm sido utilizados para avaliar a qualidade do sêmen dos peixes, dentre eles, a motilidade espermática progressiva e o vigor espermático (Sanches et al., 2009; Viveiros et al., 2010; Weingartner, 2010). Estas mensurações têm levantado dúvidas referentes à sua validação, pois, por dependerem de critérios subjetivos, apresentam variações dos valores obtidos. Recentemente, por meio de softwares específicos, vem-se utilizando programas computadorizados tais como, *computer assisted sperm analysis (CASA)*, método que consiste na determinação dos padrões de movimentação espermática (Ravinder et al. 1997; Sanches et al. 2010a; Wilson-Leedy & Ingermann 2007).

As avaliações da movimentação espermática por métodos computadorizados apresentam vantagens por oferecerem resultados confiáveis. Entretanto, para estes métodos serem eficientes são necessários conhecimentos básicos sobre configurações e parâmetros utilizados nas análises, tais como taxa de frames, tempo de vídeo e instante da avaliação. Além disso, programas necessitam de padronização especial para cada espécie de peixe, como é o caso

da utilização do *software* livre ImageJ/plugin CASA (Sanches et al. 2010a; Wilson-Leedy & Ingermann 2007).

Estes parâmetros são empregados em diversos estudos com peixes de água doce, como por exemplo, na estimativa da viabilidade de gametas estocados em condições adversas. Baseado na hipótese de que os ovócitos e o sêmen da ictiofauna nativa do continente sul-americano podem perder a viabilidade ao longo do tempo (Viveiros & Godinho 2009; Sanches et al. 2011b; Sanches et al. 2011c) recomenda-se a rápida homogeneização dos gametas (fertilização artificial, por extrusão). Neste sentido, conhecer os mecanismos de perda de viabilidade e ampliar métodos que garantam a longevidade dos gametas apontam para a otimização do uso dos reprodutores e técnicas de propagação artificial de peixes (Rana 1995; Babin et al. 2007; Fornari et al. 2011;).

Segundo Suquet et al., (1999), Rizzo et al., (2003) e Viveiros et al., (2010a) a conservação dos gametas tem sido realizada, a curto prazo (temperaturas próximas a zero), utilizando-se ou não diluentes, garantindo assim, sua viabilidade por horas ou dias. Uma das vantagens no emprego dessa técnica é aproveitar os gametas ao máximo em ocasiões em que ocorre assincronismo dos reprodutores principalmente, quando se utiliza de terapias hormonais (Rana 1995; Marques & Godinho 2004). Outra vantagem em determinadas espécies é por não necessitar de soluções crioprotetoras no resfriamento em temperaturas de refrigeração (1-15°C), facilitando a eficiência do manejo reprodutivo e, principalmente, por se tratar de um procedimento de custos reduzidos (Sanches et al. 2011b; Sanches et al. 2011c).

2) REVISÃO DE LITERATURA

2.1) *Steindachneridion parahybae*: Características da espécie

2.1.1) *Classificação taxonômica e distribuição geográfica*

O surubim-do-Paraíba, *Steindachneridion parahybae* (Steindachner, 1877) é um bagre (peixe de couro sem escamas) cinza, com manchas pretas espalhadas ao longo do corpo (Figura 1). De acordo com Garavello (2005) foi classificado por Steindachner (1877), chamado inicialmente de *Platystoma parahybae* e, posteriormente renomeado por Eignenmann e Eignenmann em 1888, para *Steindachneridion parahybae* (Garavello 2005).

Reino: Animalia;

Filo: Chordata;

Classe: Actinopterygii;

Ordem: Siluriformes;

Família: Pimelodidae;

Gênero: *Steindachneridion*;

Espécie: *Steindachneridion parahybae*



Figura 1. Fêmea de surubim-do-paraíba, *Steindachneridion parahybae* com 52cm de comprimento total (Honji 2011).

De acordo com Garavello (2005) atualmente existem seis espécies de bagres pertencentes ao gênero *Steindachneridion* classificadas como endêmicas,

ou seja, área de ocorrência delimitada na mesma bacia hidrográfica. Além do *S. parahybae* também são encontradas as espécies *S. punctatum* e *S. scriptum* nomeados por Miranda Ribeiro, em 1918, com ocorrência nas bacias hidrográficas dos rios Uruguai e Alto Rio Paraná. O *S. ambryurum* e o *S. doceanum* nomeados por Engenmann e Engenmann, em 1889, de ocorrência nos rios Jequitinhonha e Doce, respectivamente. A espécie mais recente, revisada por Garavello (2005) o *S. melanodermatum* nativo da bacia do Rio Iguaçu.

A espécie *S. parahybae* é definida de grande porte, com comprimento padrão podendo ultrapassar 60cm, com hábito alimentar carnívoro, com dietas a base de peixes e crustáceos possuindo hábitos noturnos (Oliveira & Moraes Jr 1997). Entretanto, apresenta biologia pouco conhecida (Honji et al. 2009), principalmente pelas dificuldades de ser capturado em ambientes naturais (PAN 2011).

É uma espécie endêmica da bacia do rio Paraíba do Sul (20 ° 26 'e 23 ° 39'S e 41 ° e 46 ° 30'W) inserida em três Estados, Rio de Janeiro, Minas Gerais e São Paulo (Figura 2). O rio Paraíba do Sul caracteriza-se por se localizar na região mais industrializada e povoada do país, abastecendo a população aproximada de 15 milhões de habitantes. Ao longo de seu percurso estima-se que foram instaladas cerca de 6.100 indústrias que contribuem para a contínua deteriorização dos rios da região, como por exemplo, o lançamento diário de um bilhão de litros de esgoto doméstico e sete toneladas de efluentes industriais sem tratamento adequado (Hilsdorf & Petreire Jr 2002; Brandão 2004; Marengo & Alves 2005; Araújo et al. 2009). Além disso, o rio caracteriza-se por grandes desastres ambientais, como por exemplo, o vazamento em 2008 de quase oito mil toneladas do produto endosulfan, em que a empresa Servatis S.A. se responsabilizou pelo acidente que matou toneladas de peixes ao longo de 400km de rio, entre eles, espécies que estão em estado crítico de extinção (Araújo et al. 2009; PAN 2011). Em razão da relação diretamente proporcional do aumento no número de estabelecimentos industriais e a redução dos estoques pesqueiros, acredita-se que a poluição seja um dos principais fatores que contribuam para redução de espécies de peixes na bacia hidrográfica (Iacone Santos et al. 2010; PAN 2011).

Outras ações antrópicas contribuem para a redução dos estoques pesqueiros, como a captura de peixes que não atingiram à maturação gonadal (Petreire et al. 2004), construção de barragens e introdução de espécies exóticas como por exemplo, o bagre-africano, e alóctones, como o dourado (Hilsdorf & Petreire Jr 2002; Teixeira et al. 2005; PAN 2011). Conseqüentemente, estes fatores contribuíram para a desestruturação da ictiofauna local, reduzindo drasticamente populações de peixes menos tolerantes, hoje restritas somente em pontos da bacia do Paraíba do Sul menos impactados pela ação antrópica (Araujo et al. 2009; Iacone Santos et al. 2010).

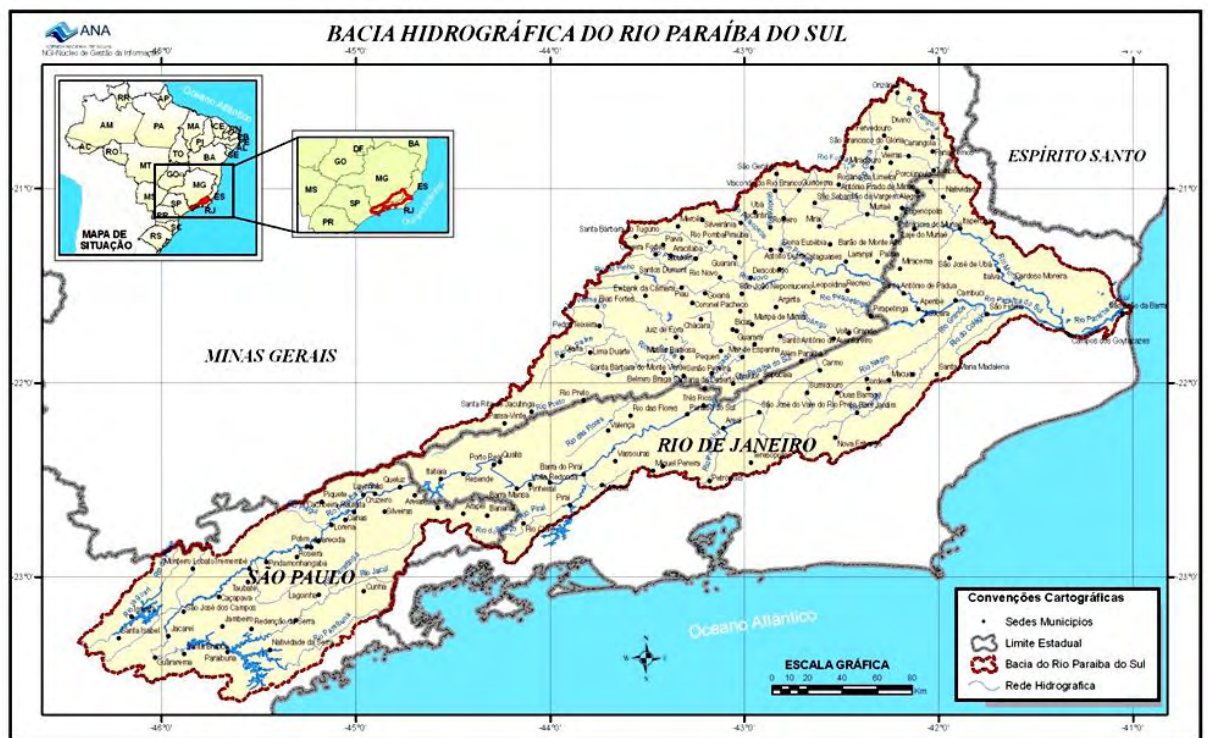


Figura 2. Localização da bacia hidrográfica do Rio Paraíba do Sul, abrangendo os estados de SP, RJ e MG. Fonte: ANA,(2012) .

2.1.2) *Biologia reprodutiva e reprodução artificial*

Estudos sobre a biologia reprodutiva do gênero *Steindachneridion* se restringem a duas espécies mais estudadas das bacias dos rios Iguaçu e Uruguai, *S. melanodermatum* e *S. scriptum*, respectivamente (Zaniboni-Filho et al. 2010),

entretanto, recentes avaliações de parâmetros reprodutivos de *S. parahybae* em cativeiro foram realizadas por Honji et al. (2009), Caneppele et al. (2009), Araújo (2011), Caneppele (2011), e Honji (2011). O *S. parahybae* apresenta comportamento semelhante aos peixes migradores (Garavello 2005), entretanto, estudos sobre a reprodução natural são inexistentes (Caneppele 2011). Recentes pesquisas com peixes em cativeiro na cidade de Paraibuna, SP (mantidos em tanques escavados revestido de concreto nas extremidades fundo de terra, com alimentação a base de ração extrusada para peixes carnívoros, 40% de PB, oferecidas na proporção de 5% da biomassa semana⁻¹ em três dias da semana, temperatura média anual da água 22°C), indicam que a espécie apresenta desova parcelada, respondendo positivamente à indução hormonal mais de uma vez durante um ciclo reprodutivo (comunicação pessoal¹). Em cativeiro, o período reprodutivo da espécie é amplo, e varia entre final de setembro a final de março, entretanto, pode variar conforme as condições ambientais do ano e condições de estocagem dos animais (comunicação pessoal¹)

De acordo com Honji (2011) os ovários do *S. parahybae* são semelhantes à outros siluriformes, com órgãos pares alongados e dispostos na cavidade celomática, entre o tubo digestório, rins e vesícula gasosa. Os ovários apresentam duas extremidades, as anteriores que terminam em fundo cego e as posteriores, em união por meio de um ducto que liga ao poro genital. Assim como os ovários, os testículos são órgãos pares e localizam-se na mesma posição, a superfície apresenta “franjas” de diferentes formatos e tamanhos onde o sêmen é estocado.

Em cativeiro, fêmeas da espécie responde positivamente ao processo convencional de indução hormonal com extrato bruto de hipófise de carpa (duas dosagens, 1ª de 0,5 mg kg⁻¹ 12h antes da 2ª com 5,0mg kg⁻¹). Okawara (2012) verificou em ovulação entre 174-360 horas-grau, sendo que esta amplitude pode variar entre as matrizes e o período reprodutivo. Caneppele et al. (2009) verificaram ovulação entre 240-250 horas-grau e a partir de 200 horas-grau é possível visualizar comportamento agressivo e grande movimentação dos casais. A fertilização é realizada artificialmente pelo “método a seco” (Ihering 1937) que consiste na liberação dos gametas (por meio de extrusão), homogeneizados na

¹ Caneppele “comunicação pessoal”, Paraibuna, São Paulo - CESP

ausência de água e adição de água somente no momento da ativação dos gametas. Após realizar a fertilização, os ovos são incubados em incubadoras cônicas de 60L até eclosão das larvas (48h em água a 24°C) (Caneppele et al. 2009).

Caneppele et al. (2009) verificaram fecundidade entre 9.000 e 10.000 ovócitos.kg⁻¹ de fêmea e cada grama da desova contendo 324 ovócitos. Conforme os autores, os ovócitos são esféricos, amarelos e com cerca de 1,90mm de diâmetro.

A produção de sêmen é contínua durante o período reprodutivo, sendo que o mesmo macho pode ser utilizado mais que uma vez nos procedimentos de reprodução (Caneppele 2011). Além disso, Caneppele (2011) verificou que a indução hormonal em machos é desnecessária, pois não aumenta a quantidade de sêmen e nem melhora a qualidade espermática. De acordo com o autor, os valores de produção seminal e a qualidade espermática são variáveis entre os machos e com grandes amplitudes (Tabela 1).

Tabela 1. Características seminais e espermáticas de *Steindachneridion parahybae* (Fonte: Caneppele, 2011).

Parâmetros	n	Média	dp	Mínimo	Máximo
Peso dos machos (g)	156	501,06	119,18	270,00	965,00
Volume seminal relativo (mL kg ⁻¹)	150	9,63	9,60	0,00	60,67
Taxa de motilidade subjetiva (%)	134	80,41	13,95	36,67	100,00
Tempo de motilidade de 50% dos móveis (s)	134	39,35	6,35	25,93	54,31
Espermatozoides normais (%)	133	66,95	13,44	20,00	86,89
Concentração espermática (x10 ⁹ spz mL ⁻¹)	134	9,00	6,10	0,95	37,76
Osmolaridade do plasma (mOsm kg ⁻¹)	91	261,20	21,02	204,00	325,00
pH do plasma	91	7,28	0,36	6,67	8,31

n=número de amostras avaliadas; dp=desvio padrão

2.1.3) Estado atual

A partir da década de 50 onde foram capturadas aproximadamente 2.000kg ano⁻¹ desta espécie, em 10 municípios do Estado de São Paulo (Machado & Abreu 1952), o *S. parahybae* vem sofrendo explorações

desordenadas. Este fato, juntamente com a poluição e construção de barramentos ao longo do rio Paraíba do Sul, contribuiu pela redução de populações selvagens da espécie, que atualmente, encontra-se na lista do livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção (MMA 2008) e é definida como umas das espécies que está em estado crítico de extinção (IBGE 2009), sendo considerada regionalmente extinta no Estado de São Paulo (Hilsdorf & Petrere Jr 2002; Honji et al. 2009; PAN 2011).

Conforme Caneppele (2011) o *S. parahybae* era capturado com certa frequência até 2002 em corredeiras no rio Pomba, próximo à cidade de Laranjal (MG), entretanto, atualmente, é encontrado raramente em alguns pontos do canal principal do rio Paraíba de Sul no Estado do Rio de Janeiro. Em novembro de 2010 a equipe da Estação de Hidrobiologia e Aquicultura de Paraibuna, vinculada à Companhia Energética de São Paulo – CESP, capturaram um exemplar no município de Lavrinhas (SP), entretanto, esta captura isolada não caracteriza uma população resistente no local (Caneppele 2011).

Ações mitigadoras envolvendo a espécie estão sendo realizadas. A CESP vem contribuindo nos últimos anos, com a coleta de reprodutores nativos (F0), manutenção de plantel de F0 e sua prole (F1), solturas de juvenis em áreas estratégicas da bacia, doação de peixes para instituições de pesquisa e estabelecendo parcerias com Institutos e Universidades para realizações de pesquisas com a espécie. Além disso, o Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais (CEPTA) vinculado ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), juntamente com seus parceiros, elaboraram recentemente um Plano de Ação Nacional Para a Conservação das Espécies Aquáticas Ameaçadas de Extinção da Bacia do Rio Paraíba do Sul (PAN 2011), que tem por objetivo mudar positivamente o patamar de conservação das espécies e/ou seus habitats, através de identificação de ameaças e estabelecimento de diretrizes que visam a minimização das ameaças e ações em diferentes escalas da sociedade. Apesar destas iniciativas, muitas ações devem ser realizadas, para que a longo prazo, a espécie volte a ser registrada em capturas em vários pontos da bacia.

2.2) Gametas de peixes de água doce

Para a obtenção de sucesso na reprodução de peixes é necessário a utilização de gametas de boa qualidade (Rurangwa et al. 2004; Bobe & Labbe 2010), entretanto, as questões de como e qual o padrão para definir a qualidade ainda gera dúvidas, principalmente metodológicas e rotineiramente aplicáveis. É sabido que para um espermatozóide ser considerado de boa qualidade, ele deve fertilizar um ovócito, que por sua vez, deve apresentar desenvolvimento embrionário normal (Fogli da Silveira et al. 1988; Billard & Cosson 1992; Billard et al. 1995; Brooks et al. 1997; Bobe & Labbe 2010). Porém, os desafios são: 1) Metodologias de coleta e avaliação de gametas; 2) Elucidação de fatores que afetam a qualidade dos gametas; 3) Estratégias de otimização.

A qualidade dos gametas pode ser estimada por meio de medidas/estimativas diretas ou indiretas. Para os ovócitos comumente avalia-se as estimativas diretas de tamanho, valores das taxas de fertilização, eclosão e larvas normais, aparência e facilidade de coleta (Romagosa 2006, 2008), ou indiretas, através de parâmetros físicos e químicos do fluido ovariano (Brooks et al. 1997; Bobe & Labbe 2010;), como por exemplo, o pH, quando baixo, pode indicar a má qualidade dos ovócitos em *Oncorhynchus mykiss* (Lahnsteiner 2000). Estas características podem também, variar em função de fatores como, organização estrutural dos ovos e constituição do fluido perivitelínico (Laale 1980), poluição das águas (Jones & Reynolds 1997), condição das matrizes em relação ao estado nutricional (Izquierdo et al. 2001), período reprodutivo (Brown et al. 2006), idade (Coward et al. 2002), processo de maturação (Lessman 2009), estágio de desenvolvimento gonadal (West 1990), fatores genéticos, fisiológicos e endocrinológicos (Brooks et al. 1997), sanidade (Coward et al. 2002) e condições laboratoriais (Sanches et al. 2011b). Apesar disso, a experiência do técnico do laboratório, muitas vezes empírica, é fundamental para obtenção de sucesso nos procedimentos de reprodução artificial.

Dentre os parâmetros citados, as taxas de fertilização e eclosão são os mais utilizados para indicar a qualidade dos ovócitos, entretanto, algumas variáveis, tais como, parâmetros físicos e químicos da água e estruturas utilizadas no processo de fertilização e incubação dos ovos, devem ser controladas a fim de

otimizar o desenvolvimento dos mesmos (Brooks et al. 1997; Coward et al. 2002; Romagosa 2008; Bobe & Labbe 2010; Sanches et al. 2011b).

Para se determinar a viabilidade espermática alguns parâmetros são utilizados, como parâmetros de motilidade, sobrevivência, anormalidades morfológicas e composição bioquímica do plasma seminal podem se correlacionarem com as taxas de fertilização (Fogli da Silveira et al. 1988; Billard & Cosson 1992; Billard et al. 1995; Rurangwa et al. 2004; Babiak et al. 2006b; Tuset et al. 2008; Cosson 2010; Araújo 2011).

Os espermatozoides de peixes de água doce são ativados quando entram em contato com uma solução que apresenta características propícias para servir como ativadoras, como é o caso da osmolaridade inferior a do plasma que é próximo a 300 mOsm kg^{-1} (Alavi & Cosson 2006). A ativação espermática é realizada através da troca de íons entre a solução e o espermatozoide por meio de diferença osmótica. Como a solução é hiposmótica em relação ao espermatozoide, ocorre um influxo de água para dentro das células, que posteriormente utilizam os íons K^+ , Na^+ e Ca^{2+} como gatilhos para liberação de energia conforme a espécie (Cierszko et al. 2011). A porção espermática responsável pela liberação de ATP é a mitocôndria, está diretamente ligada ao flagelo que por sua vez é o responsável por dar movimento à célula (Cosson 2010). Logo após o contato do espermatozoide com a água ocorre uma cascata de eventos que ainda não estão bem claros devido à diversidade de fatores que influenciam no processo de ativação, entretanto, os principais eventos do processo de ativação podem ser observados no primeiro segundo após contato com água (Figura 3).

As estimativas da taxa de motilidade vêm sendo avaliadas observando-se a movimentação dos espermatozoides imediatamente após a introdução da solução ativadora, pois o tempo de motilidade geralmente é curto, em torno de um minuto (Billard & Cosson 1992). Em trabalhos com peixes nativos, métodos subjetivos foram empregados (Murgas et al. 2004; Hilbig et al. 2008; Sanches et al. 2009; Viveiros et al. 2009; Orfao et al. 2010; Romagosa et al. 2010; Caneppele 2011; Maria et al. 2010; Witeck et al. 2011). Entretanto, estas mensurações têm levantado dúvidas quanto a sua validação, pois, dependem basicamente da experiência do observador. Este método consiste em estimar os valores das taxa

de espermatozoides móveis presentes no sêmen por um observador treinado. São estipuladas escalas arbitrárias de 0, 1, 2, 3, 4 e 5 correspondentes a 0-5, 6-20, 21-40, 41-60, 61-80 e 81-100% dos espermatozoides móveis respectivamente, ou simplesmente pela atribuição da porcentagem logo após a ativação (Carolsfeld et al. 2003). Outro parâmetro subjetivo, o tempo de duração da motilidade espermática pode representar sua qualidade (Murgas et al. 2004; Streit Jr. et al. 2006a; Hilbig et al. 2008). Tais mensurações podem ser realizadas em relação ao percentual de espermatozoides que pararam de se movimentar: 100% (Streit Jr. et al. 2006b; Streit Jr. et al. 2008); 90% (Murgas et al. 2003; Borges et al. 2005) e 50% (Hilbig et al. 2008; Sanches et al. 2009).

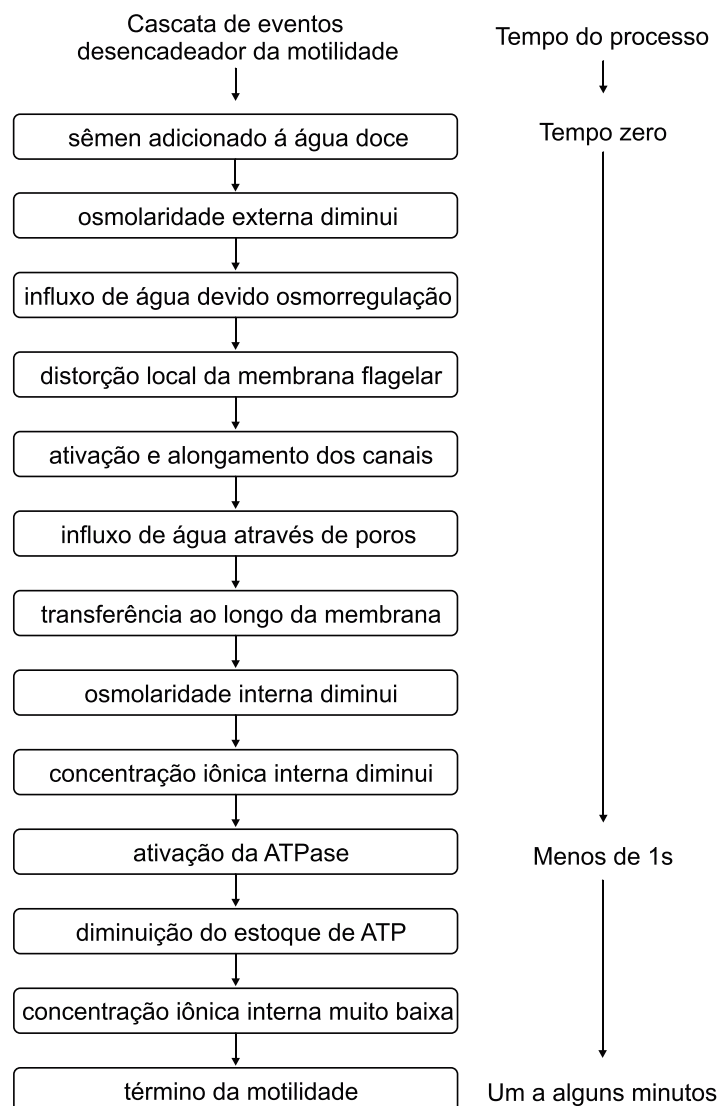


Figura 3. Cascata de eventos desencadeadores da motilidade espermática em peixes de água doce. Adaptado de Alavi & Cosson (2006).

Recentemente, por meio de *softwares* específicos, vem-se utilizando programas computacionais tais como, *computer assisted sperm analysis* (CASA), aplicado em avaliações espermáticas de peixes nativos (Nascimento et al. 2010; Sanches et al. 2010; Viveiros et al. 2010b; Araújo 2011; Marcos 2012).

A motilidade espermática computadorizada é uma importante ferramenta de avaliação espermática e pode auxiliar na otimização de gametas e reprodutores identificando quais animais do plantel são realmente eficazes, possibilitando assim, a redução dos custos na piscicultura (Ravinder et al. 1997; Rurangwa et al. 1998; Rurangwa et al. 2001). Além disso, a utilização de *softwares* indicam parâmetros que visualmente não são observados, auxiliando em testes de poluição aquática (Kime et al. 2001). Os *softwares* indicam a quantidade de espermatozóides que apresentam movimentos progressivos, ou não-progressivos, velocidade espermática, linearidade, retilinearidade, oscilação, progressão e frequência de batimentos (Ravinder et al. 1997; Rurangwa et al. 2001; Wilson-Leedy & Ingermann 2007).

A qualidade espermática também pode ser avaliada por meio da integridade de membrana espermática, um indicativo da taxa de espermatozóides vivos e que apresenta relação direta com a taxa de motilidade espermática (Kavamoto & Fogli da Silveira 1986). A integridade pode ser avaliada pelo método de coloração dos espermatozóides como, eosina-nigrosina (Blom 1950; Kavamoto & Fogli da Silveira 1986; Murgas et al. 2003). Neste método, quando o sêmen é homogeneizado ao corante os espermatozóides mortos coram-se em rosa, devido à permeabilidade ao corante, enquanto que as células vivas permanecem incolores (Hilbig et al. 2008).

Alterações morfológicas da estrutura dos espermatozóides podem também ter influência direta na fertilidade do reprodutor (Toniolli 1999; Rurangwa et al. 2004), podendo levar o animal à esterilidade absoluta (Mies-Filho 1987; Hafez & Hafez 2004). Tais alterações podem atingir estruturas, tais como, o núcleo, peça intermediária e cauda (Mies-Filho 1987; Batista Millorini et al. 2011). O Colégio Brasileiro de Reprodução Animal recomenda que reprodutores que possuem acima de 30% de anormalidades para bovinos, 40% para equinos e 20% para suínos, ovinos e caprinos, possuem capacidade reduzida de fertilização e são inviáveis em programas de reprodução (CBRA 1998). Para peixes não há índices

morfológicos que possam indicar até que ponto os reprodutores são viáveis, contudo, podem contribuir para a manutenção de estoques de reprodutores geneticamente viáveis.

A qualidade seminal de peixes teleósteos pode variar conforme o tamanho do indivíduo (Rakitin et al. 1999a; Luz et al. 2001); idade dos reprodutores (Bastardo et al. 2004); aplicação hormonal ou não (Kavamoto & Fogli da Silveira 1986; Godinho 2007; Caneppele 2011); tipo de hormônio (Streit Jr. et al. 2003; Streit Jr. et al. 2004; Bombardelli et al. 2006b); alimentação dos reprodutores (Bombardelli et al. 2010; Tessaro et al. 2012); época (Rakitin et al. 1999b; Borges et al. 2005), procedimento (Ferreira et al. 2001) coletas seminais sucessivas (Kavamoto et al. 1997; Caneppele 2011) do tempo pós coleta (Babiak et al. 2006a; Sanches et al. 2011c) e presença de produtos mutagênicos, tais como agrotóxicos, esgotos e metais pesados (Lahnsteiner et al., 2004; Rurangwa et al. 2004).

2.3 Implicações na utilização de doses inseminantes

Para os procedimentos de inseminação artificial serem economicamente sustentáveis, devem-se otimizar a utilização de gametas disponíveis. Isto significa fertilizar o maior número de ovócitos com a menor quantidade de espermatozóides (Bombardelli et al. 2006a). Fogli da Silveira et al. (1988) e Sanches et al. (2009) enfatizam a grande importância dos estudos que utilizam um número mínimo de espermatozóides para fertilizar o máximo de ovócitos.

Estudos relacionados ao número ideal de espermatozóides ovócito⁻¹ ou doses inseminantes são aplicados em várias espécies nativas brasileiras, como o *Rhamdia quelen* (Bombardelli et al. 2006a), *Piaractus mesopotamicus* (Sanches et al. 2011a), *Rhinelepis aspera* (Baggio et al. 2007), *Brycon insignis* (Shimoda et al. 2007), *Salminus brasiliensis* (Sanches et al. 2009; Weingartner 2010) e *Brycon orbignyanus* (Felizardo et al. 2010b). Observa-se que cada espécie apresenta um comportamento distinto dos valores das taxas de fertilização com relação às doses inseminantes aplicadas. Este fato indica que as doses inseminantes são

espécie-específicas e, devido a isso, avaliações com diferentes espécies de peixes não estudadas até o momento tornam-se necessários.

Altos valores das taxas de fertilização podem ser alcançados dentro de um amplo intervalo de doses inseminantes (Rurangwa et al. 1998; Tvedt et al. 2001; Sanches et al. 2009). De acordo com os autores, além do número dos espermatozóides empregados, os valores das taxas de fertilização podem sofrer influência do tempo de contato entre os gametas, a qualidade do sêmen e o protocolo de fertilização empregado. Outros fatores como, as diferentes diluições empregadas na ativação dos gametas (Chereguini et al. 1999) também interferem na eficiência do processo. Tais diluições apresentam duas importantes implicações: a) uso de pouca água pode causar reduzida taxa de diluição do meio e, conseqüentemente, uma ineficiente redução de sua osmolaridade, comprometendo a ativação dos espermatozóides, ou não proporcionar um meio adequado para o encontro dos gametas (Chereguini et al. 1999) e, b) o excessivo volume de água, pode diluir excessivamente o meio, impedindo o espermatozóide de alcançar a micrópila, durante o curto período de tempo de ativação que os mesmos adquirem (Chereguini et al. 1999).

O conhecimento do número de espermatozóides ovocito⁻¹ é de fundamental importância na rotina de reprodução artificial de peixes, pois revela a possibilidade de limitar o estoque de machos na piscicultura intensiva, proporcionando uma exploração mais racional de reprodutores geneticamente selecionados e uma redução nos custos de produção (Fogli da Silveira et al. 1988). Além disso, podem ser fundamentais em programas de criopreservação de espécies de peixes que estão ameaçadas de extinção, pois proporcionam a otimização de estruturas utilizadas no congelamento, além de utilizar de forma racional o valioso material congelado (Sanches et al. 2009; Weingartner 2010; Araújo 2011). Principalmente, quando há poucos machos nativos em cativeiro ou em ambiente natural disponíveis para os procedimentos de reprodução artificial como é o caso do *S. parahybae* (Caneppele 2011).

2.4) Conservação de gametas

Durante o procedimento de fertilização artificial, os gametas são retirados dos reprodutores utilizando-se a técnica de extrusão, posteriormente o sêmen é adicionado aos ovócitos homogeneizando-os, após este procedimento, é adicionada água para ocorrer a ativação dos gametas, esta técnica é conhecida mundialmente como fertilização à seco (Ihering 1937). Neste procedimento, logo após a extrusão, os gametas ficam expostos às condições ambientais do laboratório e sua viabilidade reduz gradativamente ao longo do tempo (Sanches et al. 2011b; 2011c), assim, medidas que prolongam sua viabilidade são imprescindíveis. As técnicas de preservação dos gametas *in natura* objetivam aumentar sua longevidade por meio de estocagem em temperaturas de refrigeração, permitindo assim, a utilização dos gametas por mais tempo (Rana 1995).

Além da estocagem a curto prazo, outras práticas são utilizadas na conservação de gametas, como por exemplo a criopreservação de sêmen (Carolsfeldt et al. 2003), e o resfriamento de embriões (El-Battawy & Linhart 2009; Fornari et al. 2011; Lopes et al. 2011). A criopreservação consiste no congelamento do sêmen, em nitrogênio líquido, mantendo-se a qualidade por período indeterminado (Billard 1990) apresentando vantagens na conservação durante longo prazo. No entanto, é um método com elevados custos de manutenção (Rana 1995) e devido a grande diversidade de espécies nativas os protocolos existentes não são todos eficientes para atendê-las (Viveiros & Godinho 2009). Protocolos de resfriamento de embriões a temperaturas abaixo de zero são efetuados, no entanto, com sucesso restrito, e com conhecimento reduzido sobre as diferentes espécies de peixes (Fornari et al. 2011; Lopes et al. 2011; Streit Jr. et al. 2007)

A conservação de gametas a curto prazo consiste na exposição de sêmen e/ou ovócitos a temperaturas adequadas, utilizando-se ou não de diluentes, durante horas ou dias (Billard 1990; Rana 1995; Babiak et al. 2006a). Ela pode ser realizada em condições de assincronismo dos reprodutores durante o processo de ovulação quando realizada a desova induzida (Marques & Godinho 2004). É um procedimento de baixo custo, não necessita de soluções

crioprotetoras, possibilitando o resfriamento em temperaturas de refrigeração (1-15°C), facilitando o manejo reprodutivo e aumentando a eficiência da reprodução artificial (Sanches et al. 2011b; 2011c).

2.4.1) Ovócitos

Dificuldades de preparação de soluções crioprotetoras que não promovem a hidratação dos ovócitos e que não sejam tóxicas para o congelamento são verificadas (Billard 1990), assim a conservação dos ovócitos tem sido realizada somente a curto prazo (Rana 1995).

A temperatura é o principal fator que parece afetar a qualidade dos ovócitos estocados *in vitro* (Sanches et al. 2011b), sendo a estocagem realizada em temperaturas próximas a zero para reduzir sua carga metabólica (Rana 1995). Além disso, a estocagem em ambientes contendo certos níveis de oxigênio, antibióticos e soluções semelhantes ao fluido ovariano também vem sendo estudada, no entanto, os resultados variam entre as espécies de peixes e protocolos empregados (Rana 1995).

A estocagem de ovócitos a curto-prazo em espécies de clima temperado foram verificadas para o *Psetta máxima* (Suquet et al. 1999), para a *Oncorhynchus mykiss* (Goetz & Coffman 2000; Holcomb et al. 2005; Niksirat et al. 2007), para o *Cyprinus carpio* (Rothbard et al. 1996) e para o *Acipenser persicus* (Sohrabnezhad et al. 2006). Para espécies de clima tropical, Weingartner (2010) estudou o *Salminus brasiliensis*, Rizzo et al. (2003), o *Prochilodus marginatus* e Sanches et al. (2011b) para o *Rhamdia quelen*. Estes estudos preliminares com algumas espécies de peixes de regiões temperadas e outras tropicais levantaram informações com relação à conservação de ovócitos em curto prazo e descrevem algumas metodologias que podem ser aplicadas com relativo sucesso. Entretanto, a conservação e a manutenção da viabilidade de ovócitos por um longo período é um procedimento difícil de ser realizado, pois vários fatores podem influenciar na viabilidade. Desta forma, a conservação a curto-prazo ainda deve ser cuidadosamente examinada para diferentes espécies de peixes, pois estas contêm características específicas e, portanto, difíceis de generalizar.

2.4.2) Sêmen

A estocagem de sêmen se baseia na criopreservação e na preservação a curto prazo (Rana 1995). Para a criopreservação, o sêmen deve ser previamente diluído em soluções que garantam a proteção intra e extracelular das células espermáticas (Viveiros & Godinho 2009; Cabrita et al. 2010). Geralmente, o método aplicado é a exposição de palhetas contendo sêmen diluído, em nitrogênio a vapor, por um período de 12-24 horas, transferidas ao nitrogênio líquido em temperaturas de -196°C, podendo nestas condições, permanecerem por períodos indeterminados (Carolsfeldt et al. 2003). O descongelamento é realizado por meio de banho-maria, em água em diferentes temperaturas (30-65°C), durante alguns segundos (5-15s) (Viveiros & Godinho 2009).

A estocagem de sêmen por curto-período é frequentemente avaliada em peixes nativos por se tratar de uma técnica simples, custos reduzidos e, facilmente, aplicados em sistemas comerciais de cultivo (Marques & Godinho 2004; Romagosa et al. 2010; Viveiros et al. 2010a; Sanches et al. 2011c). As avaliações a curto prazo foram realizadas do sêmen *in natura* (Luz et al. 2001; Carneiro et al. 2006; Romagosa et al. 2010; Sanches et al. 2011a), com suplementação de oxigênio (Marques & Godinho 2004), e com adição de diluidores específicos (Murgas et al. 2004; Maria et al. 2006; Oliveira et al. 2007; Orfão et al. 2010; Viveiros et al. 2010a). A adição destes diluidores além de proporcionarem maior tempo de viabilidade espermática em determinadas situações, também servem de base para estudos com criopreservação (Maria et al. 2006; Ninhaus-Silveira et al. 2006; Viveiros & Godinho 2009; Felizardo et al. 2010a; Nascimento et al. 2010; Orfão et al. 2011; Batista Millorini et al. 2011). Além disso, a estocagem de sêmen a curto prazo possibilita o máximo aproveitamento dos gametas em ocasiões em que ocorre assincronismo dos reprodutores após utilização de terapias hormonais (Rana 1995). Possibilita também o transporte de gametas do campo para laboratórios e entre pisciculturas (Sanches et al. 2011c) e reduz a necessidade de coletas seminais frequentes (Babiak et al. 2006a) principalmente, em espécies de peixes ameaçadas de extinção (Caneppele 2011).

Os resultados oriundos de investigações revelam a possibilidade da realização da conservação do sêmen de espécies de peixes nativos durante curto prazo, como uma alternativa simples, barata e, tecnicamente de fácil aplicação em sistemas comerciais de cultivo. No entanto, a utilização de diluentes específicos pode aumentar a durabilidade dos espermatozóides (Billard & Cosson 1992). Todavia, o fator temperatura deve receber atenção especial, sendo um dos principais responsáveis pela viabilidade dos espermatozóides (Billard 1990; Sanches et al. 2011c).

2.5) Referências bibliográficas

- Agência Nacional de Águas - ANA. 2012. Bacia hidrográfica do Rio Paraíba do Sul.
- Alavi, S. M. H., and J. Cosson. 2006. Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: A review. *Cell Biology International* **30**:1-14.
- Araujo, F. G., B. C. Teixeira Pinto, and T. P. Teixeira. 2009. Longitudinal patterns of fish assemblages in a large tropical river in southeastern Brazil: evaluating environmental influences and some concepts in river ecology. *Hydrobiologia* **618**:89-107.
- Araújo, R. V. 2011. Motilidade, velocidade e fertilidade do sêmen de surubim-do-paraíba *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes) criopreservado em diferentes diluidores. 91p. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- Babiak, I., O. Ottesen, G. Rudolfson, and S. Johnsen. 2006a. Chilled storage of semen from Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L. - I: Optimizing the protocol. *Theriogenology* **66**:2025-2035.
- Babiak, I., O. Ottesen, G. Rudolfson, and S. Johnsen. 2006b. Quantitative characteristics of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L., semen throughout the reproductive season. *Theriogenology* **65**:1587-1604.
- Babin, P., J. Cerdà, and E. Lubzens 2007. The fish oocyte from basic studies to biotechnological applications. Springer, Dordrecht.

- Baggio, D. M., E. A. Sanches, R. M. Sykora, R. A. Bombardelli, B. E. Souza, and E. Vidal. 2007. Relação espermatozóide:ovócito na fertilização de ovócitos do cascudo-preto (*Rhinelepis aspera*) in Embrapa, editor. Congresso Brasileiro de Produção de Peixes Nativos de Água Doce, Dourados.
- Bastardo, H., C. Guedez, and M. León. 2004. Características del semen de trucha arco-iris de diferentes edades, bajo condiciones de cultivo en Mérida, Venezuela. *Zootecnia Tropical* **22**:277-288.
- Batista Miliorini, A., L. D. Solis Murgas, P. V. Rosa, G. Oberlender, G. J. Machado Pereira, and D. Vicente da Costa. 2011. A morphological classification proposal for curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm damages after cryopreservation. *Aquaculture Research* **42**:177-187.
- Billard, R. 1990. Artificial insemination in fish. Pages 870-888 in G. E. Lamming, editor. *Marshall's Physiology of Reproduction*. Churchill Livingstone, Edinburgh.
- Billard, R., J. Cosson, G. Perchec, and O. Linhart. 1995. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. *Aquaculture* **129**:95-112.
- Billard, R., and M. P. Cosson. 1992. Some problems related to the assessment of sperm motility in fresh-water fish. *Journal of Experimental Zoology* **261**:122-131.
- Blom, E. 1950. A One-minute live-dead sperm stain by means of Eosin-Nigrosin. *Fertility and Sterility* **1**:176-177.
- Bobe, J., and C. Labbe. 2010. Egg and sperm quality in fish. *General and Comparative Endocrinology* **165**:535-548.
- Bombardelli, R. A., C. Hayashi, M. R. M. Natali, E. A. Sanches, and P. A. Piana. 2010. Digestible energy level on reproductive and zootechnical performance and lipids deposition in hepatocytes of the Nile tilapia males. *Revista Brasileira De Zootecnia-Brazilian Journal of Animal Science* **39**:941-949.
- Bombardelli, R. A., E. F. Morschbacher, R. Campagnolo, E. A. Sanches, and M. A. Sypperreck. 2006a. Insemination dose for artificial fertilization of grey jundia

- oocytes, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824). *Revista Brasileira De Zootecnia-Brazilian Journal of Animal Science* **35**:1251-1257.
- Bombardelli, R. A., M. A. Syperrek, and E. A. Sanches. 2006b. Hormônio liberador de gonadotrofinas em peixes: aspectos básicos e suas aplicações. *Arquivo de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar* **9**:59-65.
- Borges, A., D. R. Siqueira, D. F. Jurinitz, R. Zanini, F. do Amaral, M. L. Grillo, E. R. Oberst, and G. F. Wassermann. 2005. Biochemical composition of seminal plasma and annual variations in semen characteristics of jundia *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, Pimelodidae). *Fish Physiology and Biochemistry* **31**:45-53.
- Brandão, T. A. 2004. Paraíba, rio que corre para a morte. O Globo, Rio de Janeiro.
- Brooks, S., C. R. Tyler, O. Carnevali, K. Coward, and J. P. Sumpter. 1997. Molecular characterisation of ovarian cathepsin D in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gene* **201**:45-54.
- Brown, N. P., R. J. Shields, and N. R. Bromage. 2006. The influence of water temperature on spawning patterns and egg quality in the Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Aquaculture* **261**:993-1002.
- Cabrita, E., C. Sarasquete, S. Martinez-Paramo, V. Robles, J. Beirao, S. Perez-Cerezales, and M. P. Herraes. 2010. Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. *Journal of Applied Ichthyology* **26**:623-635.
- Caneppele, D. 2011. *Steindachneridion parahybae* (STEINDACHNER, 1876) (SILURIFORMES: PIMELODIDAE): produção espermática ao longo de um ciclo reprodutivo. 60p. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura e Pesca. Instituto de Pesca, APTA-SAA, São Paulo.
- Caneppele, D., R. M. Honji, A. W. S. Hilsdorf, and R. G. Moreira. 2009. Induced spawning of the endangered Neotropical species *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes: Pimelodidae). *Neotropical Ichthyology* **7**:759-762.
- Carneiro, P. C. F., M. S. Segui, C. R. Ióris Filho, and J. D. Mikos. 2006. Viabilidade do sêmen do jundiá, *Rhamdia quelen*, armazenado sob refrigeração. *Revista Acadêmica* **4**:11-16.

- Carolsfeld, J., H. P. Godinho, E. Zaniboni, and B. J. Harvey. 2003. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. *Journal of Fish Biology* **63**:472-489.
- CBRA 1998. Manual para exames andrológicos e avaliação de sêmen animal. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, Belo Horizonte.
- Chereguini, O., I. G. de la Banda, I. Rasines, and A. Fernandez. 1999. Artificial fertilization in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.): different methods and determination of the optimal sperm-egg ratio. *Aquaculture Research* **30**:319-324.
- Cierszko, A., J. Glogowski, and K. Dabrowski. 2011. Biochemical Characteristics of Seminal Plasma and Spermatozoa of Freshwater Fishes. Pages 46-79 in T. R. Tiersch, and C. C. Green, editors. *Cryopreservation in Aquatic Species*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana.
- Cosson, J. 2010. Frenetic activation of fish spermatozoa flagella entails short-term motility, portending their precocious decadence. *Journal of Fish Biology* **76**:240-279.
- Coward, K., N. R. Bromage, O. Hibbitt, and J. Parrington. 2002. Gamete physiology, fertilization and egg activation in teleost fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **12**:33-58.
- El-Battawy, K. A., and O. Linhart. 2009. Preliminary Studies on Cryopreservation of Common Tench (*Tinca tinca*) Embryos (Work in Progress). *Reproduction in Domestic Animals* **44**:718-723.
- Felizardo, V. O., R. A. Mello, L. D. S. Murgas, E. S. Andrade, M. M. Drumond, and P. V. Rosa. 2010a. Effect of cryopreservant combinations on the motility and morphology of curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm. *Animal Reproduction Science* **122**:259-263.
- Felizardo, V. O., L. D. S. Murgas, M. M. Drumond, and J. A. Silva. 2010b. Dose inseminante utilizada na fertilização artificial de ovócito de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). *Revista Ceres* **57**:648-652.

- Ferreira, A. A., A. P. O. Nuñez, R. K. Luz, D. Reynalte-Tataje, J. R. Esquivel, and J. B. Restrepo. 2001. Avaliação qualitativa e quantitativa do sêmen de jundiá, *Rhamdia quelen*. Boletim do Instituto de Pesca **27**:57-60.
- Fogli da Silveira, W., E. T. Kavamoto, M. G. Rigolino, and Y. A. O. Tabata. 1988. Fertilidade do sêmen de truta arco-íris, *Salmo irideus gibbons*, em diferentes concentrações de espermatozoides por óvulo. Boletim do Instituto de Pesca **15**:51-54.
- Fornari, D. C., R. P. Ribeiro, D. P. Streit, Jr., L. Vargas, N. M. Lopera Barrero, and G. V. de Moraes. 2011. Freezing injuries in the embryos of *i.* Zygote **19**:345-350.
- Garavello, J. C. 2005. Revision of genus *Steindachneridion* (Siluriformes: Pimelodidae). Neotropical Ichthyology **3**:607-623.
- Godinho, H. P. 2007. Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. Revista Brasileira de Reprodução Animal **31**:351-360.
- Goetz, F. W., and M. A. Coffman. 2000. Storage of unfertilized eggs of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in artificial media. Aquaculture **184**:267-276.
- Hafez, E. S. E., and B. Hafez 2004. Reprodução Animal. Manole, Barueri.
- Hilbig, C. C., R. A. Bombardelli, E. A. Sanches, J. D. Oliveira, D. M. Baggio, and B. Souza. 2008. Efeito do chumbo sobre a fertilização artificial e incubação de ovos de jundiá cinza (*Rhamdia quelen*). Acta Scientiarum, Animal Sciences **30**:217-224.
- Hilsdorf, A. W. S., and M. Petrere Jr. 2002. Conservação de Peixes na Bacia do Rio Paraíba do Sul. Ciência Hoje **30**:62-65.
- Holcomb, M., J. G. Cloud, and R. L. Ingermann. 2005. Impact of bacteria on short-term storage of salmonid eggs. Aquaculture Research **36**:1555-1561.
- Honji, R. M. 2011. Controle do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas do surubim-do-paraíba *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes:Pimelodidae) em relação ao ciclo reprodutivo e à reprodução induzida em cativeiro. 300p. Programa de Pós-graduação em Ciências. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo.

- Honji, R. M., D. Caneppele, A. W. S. Hilsdorf, and R. G. Moreira. 2009. Threatened fishes of the world: *Steindachneridion parahybae* (Steindachner, 1877) (Siluriformes: Pimelodidae). *Environmental Biology of Fishes* **85**:207-208.
- Iacone Santos, A. B., B. d. F. Terra, and F. G. Araujo. 2010. Influence of the river flow on the structure of fish assemblage along the longitudinal gradient from river to reservoir. *Zoologia* **27**:732-740.
- IBGE. 2009. Fauna Ameaçada de Extinção, Invertebrados Aquáticos e Peixes – 2009. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.
- Ihering, R. V. 1937. A method for inducing fish to spawn. *The Progressive Fish-Culturist* **34**:15-16.
- Izquierdo, M. S., H. Fernandez-Palacios, and A. G. J. Tacon. 2001. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture* **197**:25-42.
- Jones, J. C., and J. D. Reynolds. 1997. Effects of pollution on reproductive behaviour of fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **7**:463-491.
- Kavamoto, E., and W. Fogli da Silveira. 1986. Características físicas, químicas e microscópicas do sêmen do bagre, *Rhamdia hilarii*. *Boletim do Instituto de Pesca* **13**:95-100.
- Kavamoto, E. T., C. S. R. Mainardes-Pinto, E. F. Andrade-Talmelli, and B. E. S. Campos. 1997. Produção espermática do curimatá *Prochilodus scrofa*. Steindachner, 1881. *Boletim do Instituto de Pesca* **24**:73-78.
- Kime, D. E., K. J. W. Van Look, B. G. McAllister, G. Huyskens, E. Rurangwa, and F. Ollevier. 2001. Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* **130**:425-433.
- Laale, H. W. 1980. The perivitelline space and egg envelopes of bony fishes - a review. *Copeia*:210-226.
- Lahnsteiner, F. 2000. Morphological, physiological and biochemical parameters characterizing the over-ripening of rainbow trout eggs. *Fish Physiology and Biochemistry* **23**:107-118.

- Lahnsteiner, F., N. Mansour and B. Berger. 2004. The effect of inorganic and organic pollutants on sperm motility of some freshwater teleosts. *Journal of Fish Biology* **65**:1283-1297.
- Lessman, C. A. 2009. Oocyte maturation: Converting the zebrafish oocyte to the fertilizable egg. *General and Comparative Endocrinology* **161**:53-57.
- Lopes, T. D., E. Romagosa, D. P. Streit, R. P. Ribeiro, and M. Digmayer. 2011. Cooling of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) embryos at various stages of development for 6 or 10 hours. *Theriogenology* **75**:570-576.
- Luz, R. K., A. A. Ferreira, D. A. Reynalte-Tajate, and E. Zaniboni Filho. 2001. Avaliação qualitativa e quantitativa do sêmen do suruvi, *Steindachneridion scripta* (Pimelodidae). *Boletim do Instituto de Pesca* **27**:39-42.
- Machado, C. E. M., and H. C. F. Abreu. 1952. Notas preliminares sobre a caça e a pesca no Estado de São Paulo – A Pesca no Vale do Paraíba. *Boletim de Indústria Animal* **13**:145-160.
- Marcos, R. M. 2012. Parâmetros seminais e espermáticos, estocagem e criopreservação do sêmen do surubim do Iguaçu, *Steindachneridion melanodermatun* (Garavelo, 2005). 80p. Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo.
- Marengo, J. A., and L. M. Alves. 2005. Tendências hidrológicas da bacia do rio Paraíba do Sul. *Revista Brasileira de Meteorologia* **20**:215-226.
- Maria, A. N., H. C. Azevedo, J. P. Santos, C. A. Silva, and P. C. F. Carneiro. 2010. Semen characterization and sperm structure of the Amazon tambaqui *Colossoma macropomum*. *Journal of Applied Ichthyology* **26**:779-783.
- Maria, A. N., A. T. M. Viveiros, R. T. F. Freitas, and A. V. Oliveira. 2006. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. *Aquaculture* **260**:298-306.
- Marques, S., and H. P. Godinho. 2004. Short-term cold storage of sperm from six Neotropical Characiformes fishes. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **47**:799-804.

- Mies-Filho, A. 1987. Inseminação artificial. Sulina, Porto Alegre.
- MMA 2008. Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. Ministério do Meio Ambiente.
- Murgas, L. D. S., R. T. Franciscatto, and A. G. O. Santos. 2003. Sperm evaluation of Piracanjuba fish (*Brycon orbignyanus*, Valenciennes, 1849), after thawing. *Revista Brasileira De Zootecnia-Brazilian Journal of Animal Science* **32**:1810-1814.
- Murgas, L. D. S., A. B. Miliorini, R. T. Franciscatto, and A. N. Maria. 2004. Spermatic viability of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen cooled at 4 degrees C. *Revista Brasileira De Zootecnia-Brazilian Journal of Animal Science* **33**:1361-1365.
- Nascimento, A. F., A. N. Maria, N. O. Pessoa, M. A. M. Carvalho, and A. T. M. Viveiros. 2010. Out-of-season sperm cryopreserved in different media of the Amazonian freshwater fish pirapitinga (*Piaractus brachypomus*). *Animal Reproduction Science* **118**:324-329.
- Niksirat, H., K. Sarvi, B. Mojazi Amiri, and A. Hatef. 2007. Effects of storage duration and storage media on initial and post-eyeing mortality of stored ova of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* **262**:528-531.
- Ninhaus-Silveira, A., F. Foresti, Y. A. Tabata, M. G. Rigolino, and R. Verissimo-Silveira. 2006. Cryopreservation of semen from functional sex-reversed genotypic females of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **49**:73-77.
- Okawara, R. Y. 2012. Efeito das unidades térmicas acumuladas na ovulação e desenvolvimento inicial de larvas do surubim-do-paraíba, *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes: Pimelodidae). 49p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca - APTA - Secretaria de Agricultura e Abastecimento. São Paulo, 2012.
- Oliveira, A. V., A. T. M. Viveiros, A. N. Maria, R. T. F. Freitas, and Z. A. Izau. 2007. Sucess of cooling and freezing of pirapitinga (*Brycon nattereri*) semen. *Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinaria E Zootecnia* **59**:1509-1515.

- Oliveira, J. C., and D. F. Moraes Jr. 1997. Dados adicionais à descrição do *Steindachneridion parahybae* (Steindachner, 1877) (Teleostei, Siluroidae, Pimelodidae). *Boletim do Museu Nacional* **384**:1-11.
- Orfão, L. H., A. N. Maria, A. F. Nascimento, Z. A. Isau, and A. T. M. Viveiros. 2010. Sperm fertility of the subtropical freshwater streaked prochilod *Prochilodus lineatus* (Characiformes) improved after dilution and cold storage. *Aquaculture Research* **41**:e679-e687.
- Orfão, L. H., A. F. Nascimento, F. M. Correa, J. Cosson, and A. T. M. Viveiros. 2011. Extender composition, osmolality and cryoprotectant effects on the motility of sperm in the Brazilian endangered species *Brycon opalinus* (Characiformes). *Aquaculture* **311**:241-247.
- PAN 2011. Plano de ação nacional para a conservação das espécies aquáticas ameaçadas de extinção da Bacia do Rio Paraíba do Sul. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, ICMBio, Brasília.
- Petriere, M., R. B. Barthem, E. A. Cordoba, and B. C. Gomez. 2004. Review of the large catfish fisheries in the upper Amazon and the stock depletion of piraiba (*Brachyplatystoma filamentosum* Lichtenstein). *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **14**:403-414.
- Rakitin, A., M. M. Ferguson, and E. A. Trippel. 1999a. Sperm competition and fertilization success in Atlantic cod (*Gadus morhua*): effect of sire size and condition factor on gamete quality. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **56**:2315-2323.
- Rakitin, A., M. M. Ferguson, and E. A. Trippel. 1999b. Spermatocrit and spermatozoa density in Atlantic cod (*Gadus morhua*): correlation and variation during the spawning season. *Aquaculture* **170**:349-358.
- Rana, K. 1995. Preservation of gametes. Pages 53-75 in N. R. Bromage, and R. J. Roberts, editors. *Broodstock management and egg and larval quality*. Blackwell Science, London.
- Ravinder, K., K. Nasaruddin, K. C. Majumdar, and S. Shivaji. 1997. Computerized analysis of motility, motility patterns and motility parameters of spermatozoa

- of carp following short-term storage of semen. *Journal of Fish Biology* **50**:1309-1328.
- Rizzo, E., H. P. Godinho, and Y. Sato. 2003. Short-term storage of oocytes from the neotropical teleost fish *Prochilodus marggravii*. *Theriogenology* **60**:1059-1070.
- Romagosa, E. 2006. Biologia reprodutiva e fisiologia de peixes em confinamento: o cachara *Pseudoplatystoma fasciatum* como modelo. Pages 108-116 in J. E. P. Cyrino, and E. C. Urbinati, editors. *Tópicos Especiais em Biologia Aquática e Aqüicultura*. AQUABIO, Jaboticabal.
- Romagosa, E. 2008. Avanços na reprodução de peixes migradores. Pages 1-16 in J. E. P. Cyrino, W. M. Furuya, R. P. Ribeiro, and J. D. Scorvo Filho, editors. *Tópicos Especiais em Biologia Aquática e Aquicultura III*. AQUABIO, Jaboticabal.
- Romagosa, E., B. E. Souza, E. A. Sanches, D. M. Baggio, and R. A. Bombardelli. 2010. Sperm motility of *Prochilodus lineatus* in relation to dilution rate and temperature of the activating medium. *Journal of Applied Ichthyology* **26**:678-681.
- Rothbard, S., I. Rubinshtein, and E. Gelman. 1996. Storage of common carp, *Cyprinus carpio* L., eggs for short durations. *Aquaculture Research* **27**:175-181.
- Rurangwa, E., D. E. Kime, F. Ollevier, and J. P. Nash. 2004. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture* **234**:1-28.
- Rurangwa, E., I. Roelants, G. Huyskens, M. Ebrahimi, D. E. Kime, and F. Ollevier. 1998. The minimum effective spermatozoa : egg ratio for artificial insemination and the effects of mercury on sperm motility and fertilization ability in *Clarias gariepinus*. *Journal of Fish Biology* **53**:402-413.
- Rurangwa, E., F. A. M. Volckaert, G. Huyskens, D. E. Kime, and F. Ollevier. 2001. Quality control of refrigerated and cryopreserved semen using computer-assisted sperm analysis (CASA), viable staining and standardized

- fertilization in African catfish (*Clarias gariepinus*). *Theriogenology* **55**:751-769.
- Sanches, E. A., D. M. Baggio, P. A. Piana, B. E. de Souza, and R. A. Bombardelli. 2011a. Artificial fertilization of oocytes and sperm activation in pacu: effects of the spermatozoa:oocyte ratio, water volume, and in natura semen preservation. *Revista Brasileira De Zootecnia-Brazilian Journal of Animal Science* **40**:1-6.
- Sanches, E. A., R. A. Bombardelli, D. M. Baggio, and B. E. de Souza. 2009. Insemination dose for artificial fertilization of dourado oocytes. *Revista Brasileira De Zootecnia-Brazilian Journal of Animal Science* **38**:2091-2098.
- Sanches, E. A., R. A. Bombardelli, R. M. Marcos, G. Neumann, C. P. R. de Toledo, and E. Romagosa. 2010. Sperm motility of *Rhamdia quelen* studied using computer-assisted analysis by open-source software. *Aquaculture Research* **42**:153-156.
- Sanches, E. A., G. Neumann, D. M. Baggio, R. A. Bombardelli, P. A. Piana, and E. Romagosa. 2011b. Time and temperature on the storage of oocytes from jundia catfish, *Rhamdia quelen*. *Aquaculture* **319**:453-458.
- Sanches, E. A., G. Neumann, C. P. R. Toledo, R. A. Bombardelli, P. A. Piana, and E. Romagosa. 2011c. Temperature and storage period over spermatoc parameters of jundiá, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824). *Aquaculture Research* **published online**:1-8.
- Shimoda, E., D. R. Andrade, M. V. Vidal, H. P. Godinho, and G. S. Yasui. 2007. Determination of the optimum ratio of spermatozoa per oocyte of the piabanha *Brycon insignis*. *Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinaria E Zootecnia* **59**:877-882.
- Sohrabnezhad, M., M. R. Kalbassi, R. M. Nazari, and M. Bahmani. 2006. Short-term storage of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) ova in artificial media and coelomic fluid. *Journal of Applied Ichthyology* **22**:395-399.
- Streit, D. P., R. N. Sirol, R. P. Ribeiro, G. V. Moraes, L. D. M. Vargas, and A. L. Watanabe. 2008. Qualitative parameters of the piapara semen (*Leporinus elongatus* Valenciennes, 1850). *Brazilian Journal of Biology* **68**:373-377.

- Streit Jr., D. P., C. Benites, G. V. Moraes, R. P. Ribeiro, E. S. Sakaguti, and R. F. Caldieri. 2006a. Características qualitativas do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) após indução hormonal. *Bioscience Journal* **22**:119-125.
- Streit Jr., D. P., C. Benites, G. V. Moraes, R. P. Ribeiro, E. S. Sakaguti, and R. F. Caldieri. 2006b. Sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) criopreservado com diluentes utilizados para sêmen de suínos. *Ciência Animal Brasileira* **7**:289-297.
- Streit Jr., D. P., M. Digmayer, R. P. Ribeiro, R. N. Sirol, G. V. de Moraes, and J. M. Galo. 2007. Pacu embryos submitted to different cooling protocols. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* **42**:1199-1202.
- Streit Jr., D. P., G. V. Moraes, R. P. Ribeiro, W. C. Caçador, E. S. Sakaguti, J. A. Povh, and E. D. Souza. 2003. Estudo comparativo da indução hormonal da espermição em piavuçu (*Leporinus macrocephalus*) com extrato de hipófise de frango, coelho e carpa. *Acta Scientiarum. Animal Sciences* **25**:261-266.
- Streit Jr., D. P., G. V. Moraes, R. P. Ribeiro, E. D. Sakaguti, E. D. Souza, J. A. Povh, and W. Caçador. 2004. Comparação do sêmen de Curimbá (*Prochilodus lineatus*) induzido por extrato de hipófise de frango, coelho ou carpa. *Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science* **41**:147-153.
- Suquet, M., O. Chereguini, M. H. Omnes, I. Rasines, Y. Normant, I. P. Souto, and L. Quemener. 1999. Effect of temperature, volume of ova batches, and addition of a diluent, an antibiotic, oxygen and a protein inhibitor on short-term storage capacities of turbot, *Psetta maxima*, ova. *Aquatic Living Resources* **12**:239-246.
- Teixeira, T. P., B. C. T. Pinto, B. F. Terra, E. O. Estiliano, D. Gracia, and F. G. Araújo. 2005. Diversidade das assembléias de peixes nas quatro unidades geográficas do rio Paraíba do Sul. *Iheringia* **95**:347-357.
- Tessaro, L., Toledo C. P. R., Neumann, G., Krause, R. A., Meurer, F., Natali, M. R. N., Bombardelli, R. A. Growth and reproductive characteristics of *Rhamdia quelen* males fed of different digestible energy levels in the reproductive phase. *Aquaculture* **326-329**: 74-80

- Toniolli, R. 1999. Morfologia dos Espermatozoides de Suíno, diluídos no Diluidor de Beltsville (Bts) Adicionados do Ácido 3-Indol Acético. *Ciência Animal* **9**:61-65.
- Tuset, V. M., G. J. Dietrich, M. Wojtczak, M. Slowinska, J. de Monserrat, and A. Ciereszko. 2008. Relationships between morphology, motility and fertilization capacity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Journal of Applied Ichthyology* **24**:393-397.
- Tvedt, H. B., T. J. Benfey, D. J. Martin-Robichaud, and J. Power. 2001. The relationship between sperm density, spermatocrit, sperm motility and fertilization success in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*. *Aquaculture* **194**:191-200.
- Viveiros, A. T. M., and H. P. Godinho. 2009. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. *Fish Physiology and Biochemistry* **35**:137-150.
- Viveiros, A. T. M., Z. A. Isau, H. C. P. Figueiredo, M. A. S. Leite, and A. N. Maria. 2010a. Gentamycin Controls Bacterial Growth during Refrigerated Storage of Piracanjuba, *Brycon orbignyanus*, Semen. *Journal of the World Aquaculture Society* **41**:57-65.
- Viveiros, A. T. M., A. F. Nascimento, L. H. Orfão, and Z. A. Isau. 2010b. Motility and fertility of the subtropical freshwater fish streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) sperm cryopreserved in powdered coconut water. *Theriogenology* **74**:551-556.
- Viveiros, A. T. M., A. V. Oliveira, A. N. Maria, L. H. Orfão, and J. C. Souza. 2009. Sensitivity of dourado (*Salminus brasiliensis*) spermatozoa to different cryoprotectant solutions. *Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinaria E Zootecnia* **61**:883-889.
- Weingartner, M. 2010. Aperfeiçoamento das técnicas de fertilização de ovócitos de dourado, *Salminus brasiliensis* Cuvier, 1816 (Characiformes: Characidae), utilizando sêmen fresco e congelado durante o processo de reprodução induzida. 81p. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

- West, G. 1990. Methods of assessing ovarian development in fishes a review. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research* **41**:199-222.
- Wilson-Leedy, J. G., and R. L. Ingermann. 2007. Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. *Theriogenology* **67**:661-672.
- Witeck, L., R. A. Bombardelli, E. A. Sanches, J. D. S. de Oliveira, D. M. Baggio, and B. E. de Souza. 2011. Sperm motility, oocyte fertilization and egg hatching on jundia catfish in cadmium contaminated water. *Revista Brasileira De Zootecnia-Brazilian Journal of Animal Science* **40**:477-481.
- Zaniboni-Filho, E., S. S. Reynalte-Tataje, and S. Hermes-Silva. 2010. Cultivo de bagres do gênero *Steindacneridion*. Pages 363-382 in B. Baldiserotto, and L. C. Gomes, editors. *Espécies Nativas para Piscicultura no Brasil*. UFSM, Santa Maria.

3) OBJETIVOS GERAIS

Padronizar metodologias de avaliação espermática computadorizada e aprimorar os procedimentos de reprodução artificial e condições de estocagem de gametas de *Steindachneridion parahybae*.

3.1) Objetivos específicos

Padronizar a utilização de *software* de código aberto ImageJ/*plugin* CASA para avaliação dos parâmetros de motilidade espermática de *S. parahybae*. Avaliar a motilidade espermática computadorizada ao decorrer do tempo pós-ativação, e as correlações entre os parâmetros avaliados bem como os diferentes comportamentos espermáticos.

Determinar o efeito da dose inseminante e do volume de água sobre as taxas de fertilização, eclosão e larvas normais de *S. parahybae*.

Avaliar os valores das taxas de fertilização, eclosão e larvas normais de *S. parahybae* após estocagem *in natura* de ovócitos em quatro temperaturas durante 355 minutos.

Avaliar a qualidade espermática de *S. parahybae* após estocagem do sêmen de forma *in natura* ao longo de 112h em quatro temperaturas.

**4) ARTIGO 01: PARÂMETROS ESPERMÁTICOS DE
Steindachneridion parahybae USANDO SISTEMA
COMPUTADORIZADO DE CÓDIGO ABERTO**

PARÂMETROS ESPERMÁTICOS DE *Steindachneridion parahybae* USANDO SISTEMA COMPUTADORIZADO DE CÓDIGO ABERTO

4.1) Resumo

Objetivou-se avaliar a motilidade espermática de 13 machos de surubim-do-Paraíba, *Steindachneridion parahybae*, utilizando sistema computadorizado de código aberto (software ImageJ/plugin CASA). Quatro fases experimentais foram definidas a partir dos vídeos provenientes de cada macho: 1) padronização da caixa de diálogo do plugin CASA; 2) número frames utilizados para realização das análises; 3) motilidade entre 10 e 20s pós-ativação com análise a cada 1s; 4) motilidade entre 10 e 50s pós-ativação com análise a cada 10s. Foi observado que as configurações utilizadas na caixa de diálogo do CASA foram satisfatórias e os resultados coerentes. Estas análises devem ser realizadas utilizando-se 50 frames e, logo após, a ativação espermática, pois os espermatozóides perdem o vigor rapidamente. Em 10s após a ativação espermática observou-se 89,1 % de espermatozóides móveis, 107,2 $\mu\text{m s}^{-1}$ de velocidade curvilínear, 83,6 $\mu\text{m s}^{-1}$ de velocidade média de deslocamento, 77,1 $\mu\text{m s}^{-1}$ de velocidade em linha reta, 91,6% de retilinearidade e 77,1% de oscilação. O plugin CASA utilizando o *software* ImageJ pode ser aplicado em análise espermática para a espécie, a partir das configurações estabelecidas.

Palavras chave: CASA, espermatozoide, ImageJ, sêmen, surubim-do-paraiba, qualidade espermática

SPERM MOTILITY PARAMETERS FOR *Steindachneridion parahybae* BASED ON OPEN-SOURCE SOFTWARE

4.2) Abstract

The objective of this work was to evaluate the sperm motility of 13 males of *Steindachneridion parahybae* using open-source software (ImageJ/CASA plugin). Four experimental steps were defined from the captured videos of each male as follows: 1) standardization of a dialog box generated by the CASA plugin within ImageJ; 2) frame numbers used to perform the analysis; 3) post-activation motility between 10 and 20 s with analysis at each 1 s; and 4) post-activation motility between 10 and 50 s with analysis at each 10 s. The settings in the dialog box used to CASA were effective and satisfactory. Better results were obtained using 50 frames and just after sperm activation, because the sperm show rapid decrease of the motility. At 10 seconds after activation sperm 89.1% of motile sperm was observed, $107.2\mu\text{m s}^{-1}$ of curvilinear velocity, $83.6\mu\text{m s}^{-1}$ average path velocity, $77.1\mu\text{m s}^{-1}$ straight line velocity, 91.6% of straightness and 77.1% of wobble. The CASA plugin using the ImageJ software may be applicable for sperm analysis in this species using the obtained configuration set.

Key-words: CASA, ImageJ, spermatozoa, sperm quality, semen, surubim-do-paraiba

4.3) Introdução

A qualidade espermática pode ser estimada por meio da motilidade, concentração, morfologia e coloração diferencial, integridade do DNA e avaliação de estoques energéticos (Bobe & Labbe 2010; Fauvel et al. 2010; Perchee et al. 1995). Apesar disso, em muitas ocasiões a estimativa da qualidade do processo de reprodução artificial leva em conta somente a qualidade dos ovócitos ignorando o sêmen (Rurangwa et al. 2004), que por sinal pode interferir diretamente sobre as taxas de fertilização (Billard et al. 1995; Billard & Cosson 1992; Tuset et al. 2008).

Métodos subjetivos têm sido utilizados para avaliar a qualidade do sêmen dos peixes, dentre eles, a motilidade espermática progressiva e o vigor espermático (Sanches et al., 2009; Viveiros et al., 2010; Weingartner, 2010). Estas mensurações têm levantado dúvidas referentes à sua validação, pois, por dependerem de critérios subjetivos, apresentam variações dos valores obtidos. Recentemente, por meio de softwares específicos, vem-se utilizando programas computadorizados tais como, *computer assisted sperm analysis* (CASA), método que consiste na determinação dos padrões de movimentação espermática (Ravinder et al. 1997; Sanches et al. 2010a; Wilson-Leedy & Ingermann 2007).

As avaliações da movimentação espermática por métodos computadorizados apresentam vantagens por oferecerem resultados confiáveis. Entretanto, para estes métodos serem eficientes são necessários conhecimentos básicos sobre configurações e parâmetros utilizados nas análises, tais como taxa de frames, tempo de vídeo e instante da avaliação. Além disso, programas necessitam de padronização especial para cada espécie de peixe, como é o caso da utilização do *software* livre ImageJ/plugin CASA (Sanches et al. 2010a; Wilson-Leedy & Ingermann 2007).

O uso do *software* de código aberto ImageJ tem vantagens em testes espermáticos, pois está disponível na Internet sem custo adicional, não exigem computadores com configurações avançadas, a análise pode ser repetida em qualquer lugar do mundo sem restrições de informação e a avaliação pode ser realizada conforme as condições laboratoriais. Este *software* também dá ao

pesquisador a liberdade de escolha de configurações a serem testadas no mesmo vídeo, como o número de quadros e momentos ocasionais ao longo do tempo o movimento dos espermatozoides. A desvantagem deste método é a necessidade de realizar todos os passos manualmente para obter os resultados, ao contrário de *softwares* pagos, onde os resultados são obtidos rapidamente.

A aplicação do software ImageJ para a avaliação dos parâmetros espermáticos foi realizada com eficiência para espécies de peixes tais como, *Danio rerio* (Ingermann et al. 2011; Kanuga et al. 2011; Wilson-Leedy & Ingermann 2007; Wilson-Leedy et al. 2009), steelhead, *Oncorhynchus mykiss* (Ingermann et al. 2010), *Pimephales promelas*, (Murack et al. 2011), *Rhamdia quelen* (Sanches et al. 2010a), *Steindachneridion melanodermatum* (Bombardelli et al. 2011). Além de peixes, o método também foi aplicado para o *Mytilus edulis*, *M. trossulus* (Liu et al. 2011) e *Passer domesticus* (Helfenstein et al. 2010). Para realizar as avaliações iniciais em cada espécie foi necessário padronizar parâmetros e configurar a caixa de diálogo do plugin CASA.

As análises computadorizadas também ajudam a estabelecer o padrão de movimento espermático em cada espécie de peixe, contribuindo desta forma em estudos, tais como: bioindicadores de poluição ambiental (Kime et al. 2001) e procedimentos de criopreservação (Viveiros & Godinho 2009), principalmente para a conservação de material genético de espécies de peixes ameaçados de extinção (Mariante et al. 2011). Este é o caso do surubim-do-Paraíba, *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes: Pimelodidae), espécie endêmica da bacia do rio Paraíba-do-Sul e que atualmente, encontra-se no livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção (MMA 2008), definida como umas das espécies que está em estado crítico de extinção (IBGE 2009). Diante da preocupação com a conservação e recuperação de estoques naturais, viu-se a necessidade de realizar estudos preliminares com a reprodução artificial desta espécie, contribuindo em programas de recuperação da ictiofauna local (Caneppele et al. 2009; Honji et al. 2009). Entretanto, estudos sobre a biologia de gametas *S. parahybae* ainda são necessários, e a partir destes, novas perspectivas poderão ser tomadas durante o processo de reprodução artificial e conservação dessa espécie de peixe.

O objetivo deste estudo foi padronizar e validar as configurações da caixa de diálogo do *plugin* CASA do *software* ImageJ, avaliar o número de frames e o comportamento espermático após ativação e as correlações entre os parâmetros espermáticos de *Steindachneridion parahybae*.

4.4) Material e Métodos

O experimento foi realizado na Estação de Hidrobiologia e Aquicultura (EHA) da Companhia Energética de São Paulo (CESP), na cidade de Paraibuna/São Paulo/Brasil (23°24'54"S; 45°35'52"W). Em novembro de 2010 foram selecionados nos tanques de criação 13 machos de *S. parahybae* (639,6±104,2 g) (geração F1) de sete anos de idade que apresentaram liberação de sêmen sob leve pressão abdominal. Os reprodutores estavam acondicionados em tanques de alvenaria e fundo de areia (200m²), e foram alimentados com ração comercial extrusada, contendo 40% de proteína bruta, alimentados duas vezes ao dia na proporção de 3% da biomassa dia⁻¹.

De cada macho foi coletado 1,0 mL de sêmen ($3,54 \times 10^{10} \pm 2,5 \times 10^{10}$ espermatozoides mL⁻¹), evitando a contaminação por urina. Após coleta individual do sêmen, realizou-se a ativação espermática e a captura dos vídeos antes da coleta seminal do próximo macho. Para cada macho foram realizadas três análises (três vídeos).

Para a ativação espermática foi empregado água destilada como ativador em temperatura ambiente (≈27°C). Para o processo de ativação em tubos eppendorfs de 1,5 mL, foi utilizado 5μL de sêmen e 200μL de água destilada (proporção de 1:40 para sêmen:água) correspondendo à $8,86 \times 10^8 \pm 6,25 \times 10^8$ espermatozoides mL⁻¹ de água. Logo após a ativação 5μL de sêmen e água foram adicionados em uma câmara de Neubauer espelhada (100 μm profundidade), coberta por lamínula de vidro (24x24mm). A câmara foi imediatamente levada ao microscópio de luz trinocular (Nikon, modelo e200) previamente focado em objetiva de 40x para captura de imagens. Para tanto, utilizou-se uma câmera Basler 602fc, conectada ao computador (intel core i7[®] CPU 2,3 GHz, 4Gb de Ram), sistema operacional Microsoft Windows XP[®], 2002).

Os vídeos foram capturados pelo software AMCAP (*noeld.com*) a 100 fps (656×490 pixels) em formato *.avi, editados no Virtualdub-1.9.0 (*virtualdub.org*), e exportados como seqüência de imagens em formato *.jpg, para um diretório específico. As imagens correspondentes foram abertas, editadas no ImageJ (National Institutes of Health, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) e compiladas por meio do plugin CASA (University of California and Howard Hughes Medical Institute, USA) conforme Wilson-Leedy & Ingermann (2007) e Sanches et al. (2010a).

O processamento dos vídeos foi realizado baseado na descrição dos componentes necessários para a utilização do aplicativo CASA por meio de software livre disponível em <<<http://rsbweb.nih.gov/ij/plugins/docs/CASAIstructions.pdf>>> (Wilson-Leedy & Ingermann 2006). Os parâmetros espermáticos calculados pelo CASA livre foram: taxas de motilidade (MOT), velocidade curvilínea (VCL – velocidade entre cada frame avaliado), velocidade média do deslocamento (VAP – velocidade entre cada frame utilizando-se o deslocamento médio na taxa de 1/6 da taxa de frames utilizados), velocidade em linha reta (VSL – velocidade entre o primeiro e o último frame analisado), oscilação (*wobble*: WOB - obtido pela divisão de VAP por VCL) e número de espermatozoides (NSZP) conforme Wilson-Leedy & Ingermann (2007). O parâmetro linearidade (LIN - obtido pela divisão de VSL por VAP), publicado pelo código original do programa, foi renomeado conforme Wilson-Leedy et al. (2009) para retilinearidade (*straightness*: STR) sendo definido através da nomenclatura consistente já estabelecida na literatura. Diante disso, foi adotado *straightness* no presente trabalho. Os parâmetros *progression* e *beat cross frequency* gerados pelo programa não foram utilizados.

Após o procedimento de gravação e edição dos vídeos o experimento foi dividido em quatro fases: 1) padronização de configurações do plugin CASA; 2) números de frames utilizados para realização das análises; 3) motilidade entre 10 e 20s pós-ativação com análise a cada 1s e, 4) motilidade entre 10 e 50s pós-ativação com análise a cada 10s.

4.4.1) Padronização de configurações do plugin CASA

Para a padronização das configurações utilizadas na caixa de diálogo do plugin CASA foram utilizados duas formas de avaliação: (i) visual e (ii) comparativamente entre os resultados gerados pelo aplicativo com os obtidos matematicamente.

(i) visualmente pelas imagens geradas pelo plugin CASA do trajeto percorrido pelos espermatozoides (Figura 1A). Estas imagens foram comparadas com as imagens geradas pelo *software* ImageJ em *Image/Stacks/Z Project/Projection Type: max intensity* (Figura 1B), representando todos os pontos das imagens compiladas. A partir disso, diferentes configurações foram testadas com o intuito de aumentar a capacidade do plugin em identificar espermatozoides com movimento lento. A identificação de espermatozoides considerados móveis e estáticos foi realizada com base na cor de suas trajetórias, onde espermatozoides considerados estáticos apresentaram trajetória em cinza e os móveis em preto (Figura 1A). Desta forma, pôde-se identificar os espermatozoides móveis através da comparação das trajetórias gerados pelo plugin CASA e pelo *Stacks/ImageJ*. Para a realização destes testes um vídeo de cada macho foi utilizado, sendo avaliadas as imagens correspondentes a 0,5s de vídeo (50 imagens) em 10s pós-ativação. Além de espermatozoides imóveis, as imagens revelaram quais espermatozoides saíram do campo de visualização e quais foram desconsiderados devido às colisões (Figura 1B).

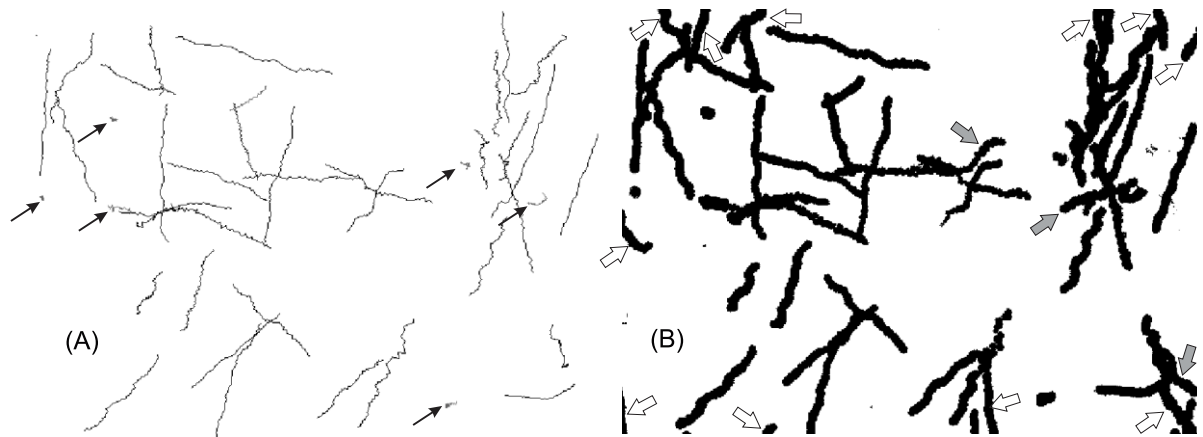


Figura 1. Imagens geradas pelo plugin CASA (A) e IMAGEJ em *Image/Stacks/Z Project/Projection Type: max intensity* (B). Setas finas pretas (A) indicam espermatozoides em movimento lento considerados como imóveis. Setas largas (1B) representam espermatozoides não considerados na análise do plugin CASA, as brancas representam espermatozoides que saíram do campo de visualização e as cinzas espermatozoides que se colidiram no momento da avaliação.

(ii) realizada para verificar a capacidade de cálculo de velocidades do aplicativo, para tanto, as configurações determinadas anteriormente, pela comparação de imagens (i), foram utilizadas para gerar os resultados de velocidades. Nesta avaliação utilizaram-se três vídeos de cinco machos, sendo 50 imagens (0,5s) para cada vídeo. Para avaliar a velocidade de um único espermatozóide as imagens foram editadas e cinco espermatozoides por vídeo (n=75) foram selecionados individualmente através da opção *Edit/Clear* e posteriormente avaliado por meio do aplicativo CASA utilizando-se as configurações estabelecidas anteriormente. Os parâmetros espermáticos foram obtidos por dois métodos: (1) resultados gerados pelo plugin CASA e, (2) calculados as distâncias entre dois pontos utilizando-se o Teorema de Pitágoras ($a^2=b^2+c^2$) com o uso do software Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA) por meio dos pares ordenados gerados pelo aplicativo CASA a partir do plano original dos espermatozoides (opção “s” das configurações =1) conforme equação:

$$Velocidade = \frac{\sqrt{\Delta x^2 + \Delta y^2}}{\Delta t}$$

Onde: Δx = Variação da posição do espermatozóide no eixo ‘x’

Δy = Variação da posição do espermatozóide no eixo ‘y’

Δt = Variação do tempo entre os pontos

Os resultados dos parâmetros VCL, VAP e VSL foram submetidos a análise de variância de um fator (*one-way ANOVA*) sobre os dois métodos de avaliação.

4.4.2) Número de frames utilizada para realização das análises

Após captura e edição dos vídeos, 800 imagens correspondentes aos três vídeos de cinco machos foram editadas (*Image/Adjust/Brightness-Contrast* e *Image/Adjust/Threshold*) e salvas em um diretório específico. Após este procedimento o número de imagens: 25, 50, 75, 100, 150, 200, 400 e 800, correspondentes aos tempos de 0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 1,50; 2,00; 4,00 e 8,00 segundos de vídeo, respectivamente, contados a partir dos 10s pós-ativação, foram importadas e avaliadas no plugin CASA. Para tanto, em cada tempo foi criada um novo macro (*Plugins/New/Macro*) com as especificações necessárias para cada tempo (opção “c” = “número de frames a ser avaliado”). Os resultados de MOT, VCL, VSL e NSPZ foram comparados pela análise de variância de componentes principais (*main effects ANOVA*) e as médias comparadas utilizando o teste de Duncan a 5% de significância. Neste caso, os machos foram considerados como o fator bloco.

4.4.3) Motilidade entre 10 e 20s pós-ativação com análise a cada 1s

Para esta fase foram utilizados resultados obtidos das análises anteriores, incluindo-se todos os reprodutores com três vídeos cada. As imagens correspondentes a 0,5 s de vídeo (50 frames) foram editadas e avaliadas nos tempos de 10 a 20 segundos após ativação em intervalos de um segundo cada. Os resultados de MOT, VCL, VAP e, VSL foram submetidos à análise de variância de componentes principais (*main effects ANOVA*) e posteriormente ao teste de comparação de médias de Duncan a 5% de significância. Além disso, os resultados foram submetidos à análise de regressão linear simples ao mesmo nível de significância.

4.4.4) Motilidade entre 10 e 50s pós-ativação com análise a cada 10s

Esta fase foi semelhante à anterior, entretanto, os parâmetros espermáticos foram avaliados entre 10 a 50 segundos após ativação em intervalos de 10 segundos cada. Os resultados de MOT, VCL, VAP, VSL, STR e WOB foram submetidos a análise de variância de componentes principais (*main effects ANOVA*) e o teste de comparação de médias de Duncan a 5% de significância. Posteriormente aplicou-se análise de estimativa não-linear para os resultados de motilidade.

Todos resultados de MOT, VCL, VAP, VSL, STR, WOB e NSPZ obtidos nos tempos de 10, 20, 30, 40 e 50s após ativação foram reunidos e submetidos ao teste de correlação linear de Pearson ao nível de 5% de significância.

Para análises estatísticas foi utilizado o *software* Estatística 7.0 (Stasoft 2005). Os pressupostos foram checados conforme Quinn & Keough (2002).

4.5) Resultados

4.5.1) Padronização de configurações do plugin CASA

As configurações empregadas na caixa de diálogo do plugin CASA (Tabela 1) foram eficientes para definir espermatozóides móveis e estáticos (Figura 1). Não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) dos parâmetros espermáticos obtidos diretamente pelo plugin CASA e por cálculo. Os valores (média \pm desvio padrão) verificados para os 75 espermatozóides avaliados foram $103,01 \pm 25,40 \mu\text{m s}^{-1}$, $85,76 \pm 30,60 \mu\text{m s}^{-1}$, $81,95 \pm 29,97 \mu\text{m s}^{-1}$, $95,19 \pm 2,35 \%$ e $81,32 \pm 13,85\%$ para VCL, VAP, VSL, STR e WOB, respectivamente.

As trajetórias dos espermatozóides avaliadas pelo plugin CASA (Figura 2) apresentaram na maioria dos espermatozóides movimento em linha reta ou aleatória, todavia, os movimentos circulares foram pouco evidentes.

Tabela 1. Configurações empregadas na caixa de diálogo do plugin CASA/ImageJ para avaliação dos parâmetros espermáticos em *Steindachneridion parahybae* com vídeo gravado em objetiva de 40x a 100 fps (656x490pixels). Configurações para avaliação de 0,5s de vídeo ou 50 frames. Taxa de motilidade (MOT), velocidade curvilínea (VCL), velocidade média de deslocamento (VAP), velocidade em linha reta (VSL), retilinearidade (STR) e oscilação (WOB).

Parâmetros de entrada	Valores de entrada
A. <i>Minimum sperm size (pixels):</i>	1
B. <i>Maximum sperm size (pixels):</i>	150
C. <i>Minimum track length (frames):</i>	50
D. <i>Maximum sperm velocity between frames (pixels):</i>	15
E. <i>Minimum VSL for motile ($\mu\text{m/s}$):</i>	3
F. <i>Minimum VAP for motile ($\mu\text{m/s}$):</i>	20
G. <i>Minimum VCL for motile ($\mu\text{m/s}$):</i>	25
H. <i>Low VAP speed ($\mu\text{m/s}$):</i>	5
I. <i>Maximum percentage of path with zero VAP:</i>	1
J. <i>Maximum percentage of path with low VAP:</i>	25
K. <i>Low VAP speed 2 ($\mu\text{m/s}$):</i>	25
L. <i>Low VCL speed ($\mu\text{m/s}$):</i>	35
M. <i>High WOB (percent VAP/VCL):</i>	80
N. <i>High LIN (percent VSL/VAP):</i>	80
O. <i>High WOB two (percent (VAP/VCL)):</i>	50
P. <i>High LIN two (percent VSL/VAP):</i>	60
Q. <i>Frame rate (frames per second):</i>	100
R. <i>Microns per 1000 pixels:</i>	258
S. <i>Print xy co-ordinates for all tracked sperm?</i>	0
T. <i>Print motion characteristics for all motile sperm?</i>	0
U. <i>Print median values for motion characteristics?</i>	0

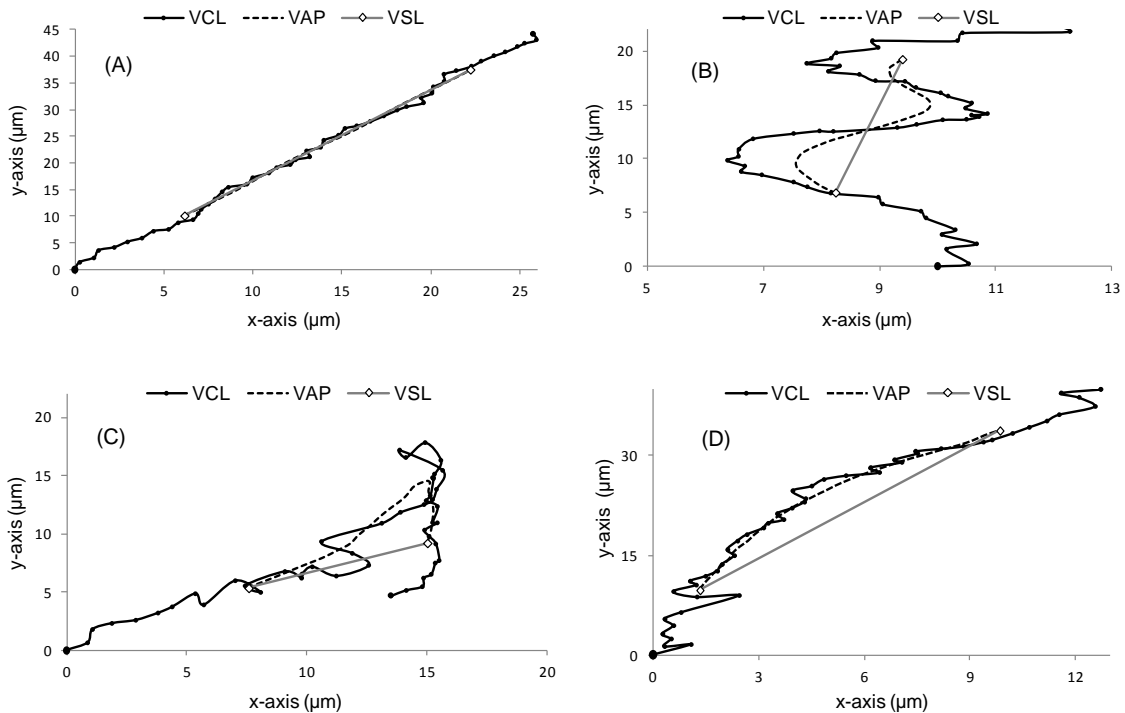


Figura 2. Trajetórias individuais de espermatozoides de *Steindachneridion parahybae* e utilizadas pelo plugin CASA para a avaliação da velocidade curvilínea (VCL), velocidade média de deslocamento (VAP) e velocidade em linha reta (VSL). Linha contínua preta representa a posição no plano cartesiano dos espermatozoides ponto a ponto nos 50 frames utilizados para o cálculo da VCL. Linha seccionada preta representa trajetória gerada pelo plugin CASA e utilizada para avaliação da VAP. Linha contínua cinza representa trajetória utilizada para avaliação da VSL. Ponto preto grande representa início da trajetória. Eixo x (*x-axis*); Eixo y (*y-axis*). Trajetórias: (A) perfeitamente retilínea; (B) completamente errática; (C) parcialmente errática; (D) parcialmente retilínea.

4.5.2) Número de frames utilizada para realização das análises

Os parâmetros espermáticos avaliados foram influenciados ($P < 0,05$) pelos números de frames utilizados na realização das análises (Tabela 2).

Observou-se que a utilização de mais frames para realização das análises é importante para definir espermatozoides que apresentam movimentos circulares, e avaliações com menos frames podem mascarar este tipo de movimentação (Figura 3).

Tabela 2. Parâmetros espermáticos (média±desvio padrão) de *Steindachneridion parahybae* obtidos em objetiva de 40x e a partir da utilização de diferentes números de frames. Taxa de motilidade (MOT), velocidade curvilínear (VCL), velocidade em linha reta (VSL), retilinearidade (STR) e número de espermatozóides (NSPZ).

Frames	Parâmetros				
	MOT (%)	VCL($\mu\text{m s}^{-1}$)	VSL ($\mu\text{m s}^{-1}$)	STR (%)	NSPZ
	$F_{(7, 96)}= 12,21$ $p<0,01$	$F_{(6, 90)}= 15,00$ $p<0,01$	$F_{(6, 90)}= 27,95$ $p<0,01$	$F_{(6, 90)}= 24,41$ $p<0,01$	$F_{(7, 108)}= 41,58$ $p<0,01$
25	79,48±13,77 ^a	105,15±14,96 ^a	67,39±16,86 ^a	82,86±0,54 ^b	75±41 ^a
50	80,04±15,39 ^a	100,57±14,81 ^a	70,89±22,66 ^a	92,40±3,45 ^a	51±27 ^b
75	76,38±17,41 ^a	96,18±14,85 ^{ab}	64,14±22,91 ^a	89,20±7,41 ^{ab}	38±22 ^c
100	72,45±24,05 ^a	87,15±9,84 ^{bc}	49,53±14,02 ^b	83,16±7,97 ^b	29±17 ^{cd}
150	71,84±22,61 ^a	82,54±12,44 ^c	39,92±10,47 ^{bc}	74,24±10,50 ^{bc}	18±12 ^{de}
200	69,45±27,14 ^a	78,38±14,06 ^c	34,69±10,96 ^c	71,24±12,54 ^c	12±8 ^{ef}
400	53,25±37,12 ^b	66,62±15,01 ^d	18,55±5,79 ^d	52,13±21,08 ^d	3±3 ^f
800	0,00 ^c	-	-	-	1±1 ^f

Diferentes letras na mesma coluna representam diferença significativa ($P<0,05$), de acordo com o teste de comparação de médias de Duncan.

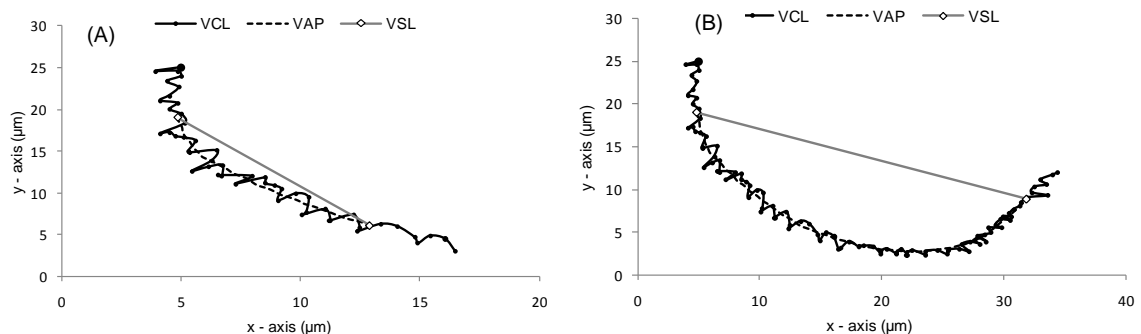


Figura 3. Comportamento de um espermatozóide de *Steindachneridion parahybae* com movimento circular em um plano cartesiano [eixo x (x -axis); eixo y (y -axis)] e indicação do cálculo da velocidade curvilínear (VCL), velocidade média de deslocamento (VAP) e velocidade em linha reta (VSL) em 50 frames (A) e 100 frames (B). (A) VCL $94,65 \mu\text{m s}^{-1}$, VAP $50,88 \mu\text{m s}^{-1}$, VSL $47,28 \mu\text{m s}^{-1}$, retilinearidade (STR) 92,92%, oscilação (WOB) 53,75%. (B) VCL $85,49 \mu\text{m s}^{-1}$, VAP $47,64 \mu\text{m s}^{-1}$, VSL $35,69 \mu\text{m s}^{-1}$, STR 74,91%, WOB 55,73%.

4.5.3) Motilidade entre 10 e 20s pós-ativação com análise a cada 1s

Os parâmetros espermáticos foram diferentes entre os tempos de 10 a 20s após ativação ($P<0,05$), apresentando maiores em 10s e menores em 20s, além disso, os parâmetros avaliados apresentaram relação inversamente proporcional ($P<0,05$) com o tempo (Figura 4).

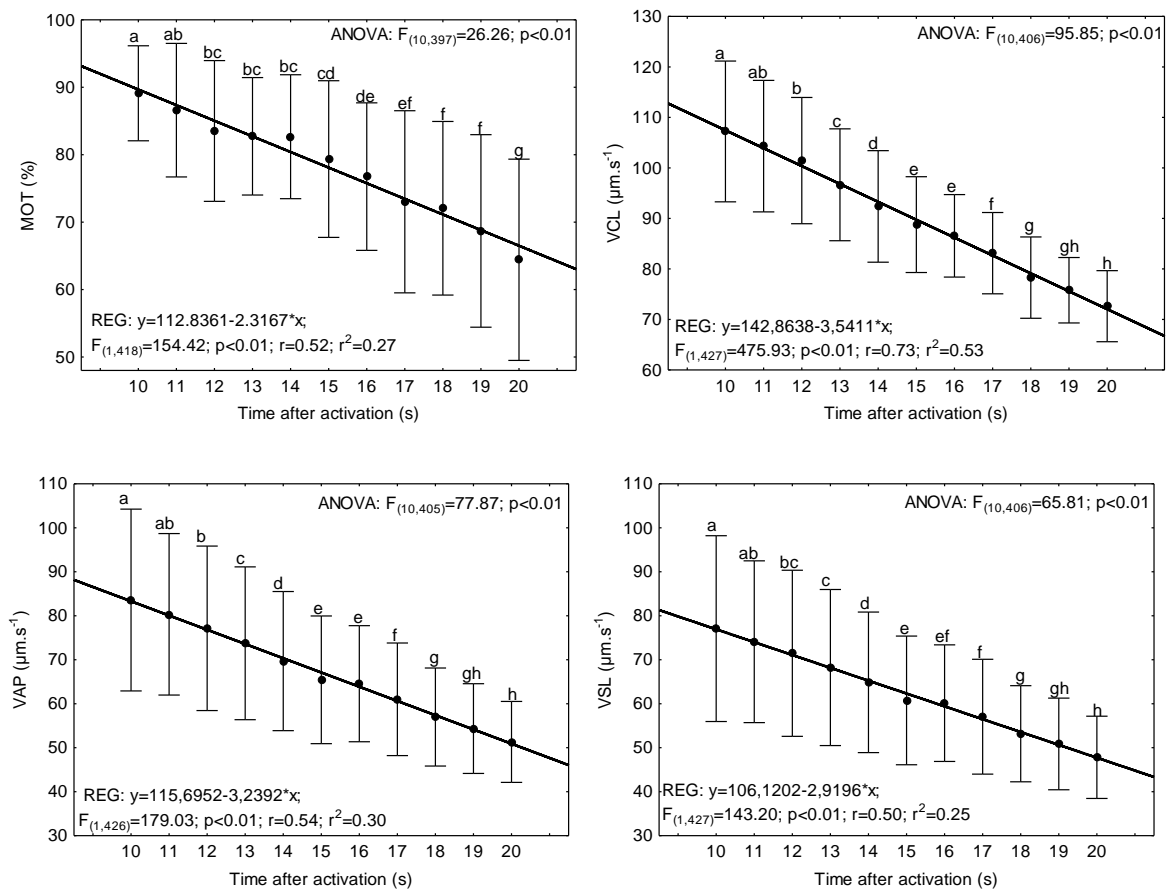


Figura 4. Motilidade espermática (MOT), velocidade curvilinear (VCL), velocidade média de deslocamento (VAP) velocidade em linha reta (VSL) in *Steindachneridion parahybae* entre 10 e 20s após ativação (média e desvio padrão). Análise de variância (ANOVA). Análise de regressão linear (REG). Diferentes letras indicam diferença significativa ($P<0,05$) de acordo com o teste de Duncan.

4.5.4) Motilidade entre 10 e 50s pós-ativação com análise a cada 10s

Os parâmetros espermáticos avaliados sofreram alterações ($P<0,05$) entre os 10 e 50s após ativação (Figura 5 e 6). Observou-se uma acentuada queda da motilidade no tempo avaliado (Figura 5A), diante disso, foi estimado um modelo não linear (Figura 5B), a partir deste modelo, pôde-se observar que em 23,65s apenas a metade (50%) dos espermatozoides estavam móveis. Além disso, a taxa de motilidade também foi diferente ($P<0,05$) entre os machos, onde cada macho teve um comportamento distinto da motilidade (Figura 5C e 5D).

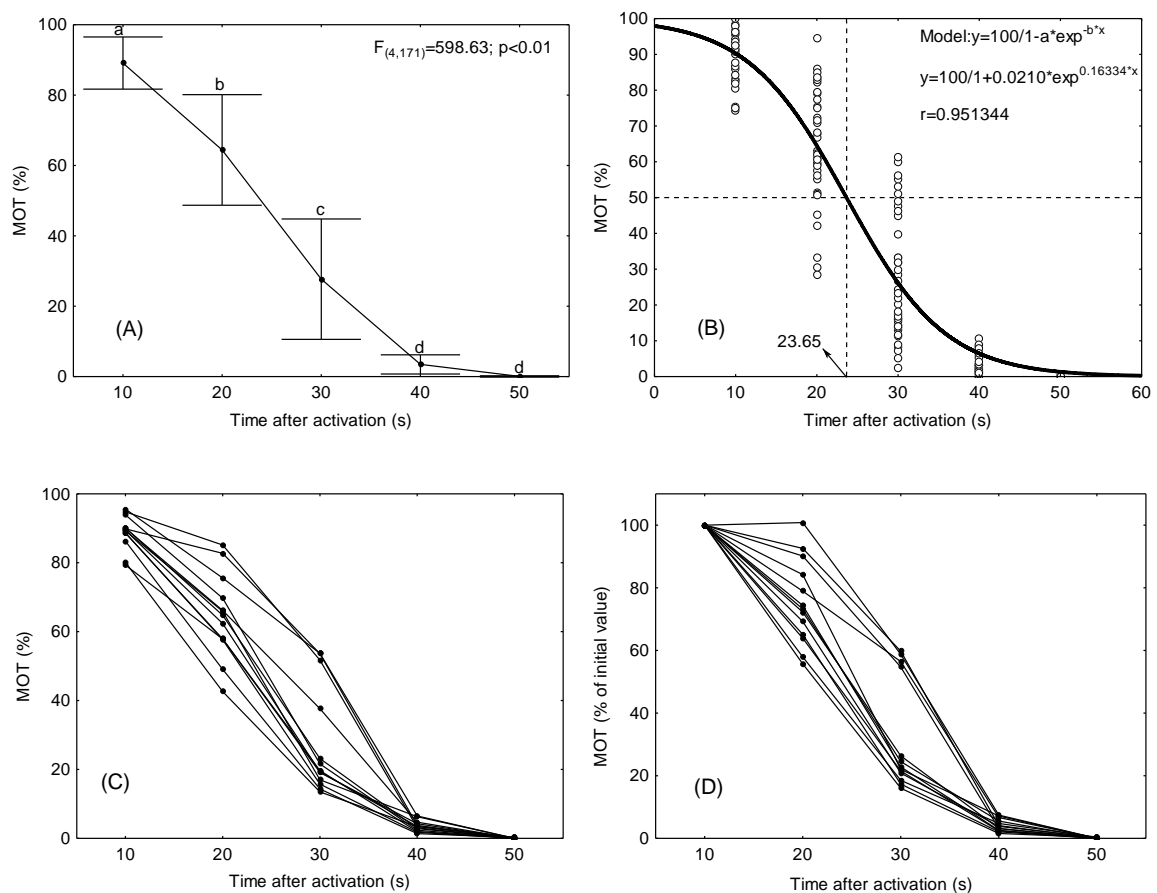


Figura 5. Taxa de motilidade (MOT) de *Steindachneridion parahybae* entre 10 e 50 segundos após ativação (*time after activation*). (A) Média e desvio padrão, letras diferentes representam diferença significativa ($P<0,05$) de acordo com teste de comparação de médias de Duncan; (B) Modelo não-linear utilizado para estimar a queda da motilidade, detalhe que em 23,65 segundos apenas 50% dos espermatozoides estão móveis; (C) comportamento da motilidade dos 13 machos; (D) comportamento relativo da motilidade dos 13 machos utilizando o ponto inicial como ponto de partida de 100%.

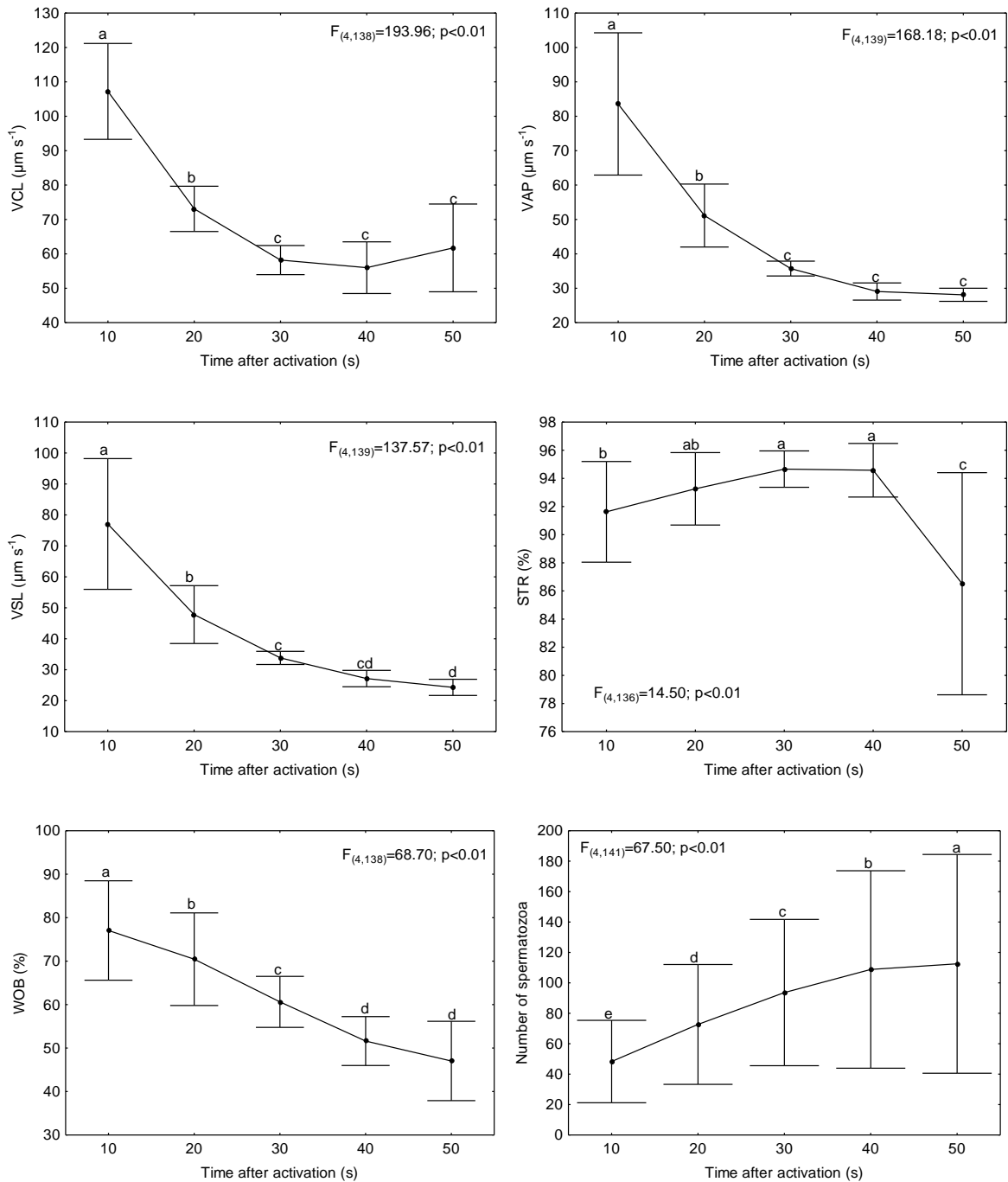


Figura 6. Velocidade curvilínea (VCL), velocidade média de deslocamento(VAP) e velocidade em linha reta(VSL), reilinearidade (STR), oscilação (WOB) e número de espermatozoides de *Steindachneridion parahybae* observados entre 10 e 50 segundos após ativação. Médias e desvio padrão. Diferentes letras indicam diferença significativa ($P < 0,05$) de acordo com o teste de Duncan.

Foi observado efeito dos machos ($P < 0,05$) sobre os parâmetros espermáticos avaliados nas fases experimentais 2, 3 e 4, com distinto comportamento para cada parâmetro. Para os 13 machos avaliados nas fases 2 e

3 foram constatados maiores variações para as velocidades e WOB no tempo de 10 segundos, no entanto, para a MOT e STR a variação foi menor (Tabela 3).

Tabela 3. Variação dos parâmetros espermáticos de 13 machos de *Steindachneridiuon parahybae* em 10 segundos após ativação. Taxa de motilidade (MOT), velocidade curvilínea (VCL), velocidade média de deslocamento (VAP), velocidade em linha reta (VSL), retilinearidade (STR) e oscilação (WOB).

Parâmetros	N	\bar{X}	DP(±)	CV(%)
MOT (%)	35	89,11	7,41	8,32
VCL ($\mu\text{m s}^{-1}$)	39	107,23	14,68	13,69
VAP ($\mu\text{m s}^{-1}$)	39	83,58	21,76	26,03
VSL ($\mu\text{m s}^{-1}$)	39	77,08	22,23	28,84
STR (%)	39	91,62	3,77	4,11
WOB (%)	39	77,06	12,04	15,63

N – número de amostras, \bar{X} – média, DP – Desvio padrão, CV – Coeficiente de variação

Os parâmetros espermáticos avaliados entre 10 e 50s após ativação apresentaram correlação linear de Pearson significativa ($P < 0,05$) (Tabela 4), com exceção para STR×MOT, STR×VAP e STR×VSL.

Tabela 4. Correlação linear de Pearson entre os parâmetros espermáticos de *Steindachneridion parahybae* obtidos entre 10 a 50 segundos após ativação. Valores em negrito indicam correlação linear significativa ($P < 0,05$). Taxa de motilidade (MOT), velocidade curvilínea (VCL), velocidade média de deslocamento (VAP), velocidade em linha reta (VSL), retilinearidade (STR), oscilação (WOB) e número de espermatozoides (NSPZ).

Parâmetros	MOT	VCL	VAP	VSL	STR	WOB	NSPZ
MOT	1,00						
VCL	0,75	1,00					
VAP	0,79	0,92	1,00				
VSL	0,77	0,90	1,00	1,00			
STR	-0,09	-0,26	*	*	1,00		
WOB	0,74	*	*	0,85	0,36	1,00	
NSPZ	-0,56	-0,39	-0,54	-0,55	-0,29	-0,65	1,00

* Estatística não avaliada devido os parâmetros STR e WOB serem obtidos a partir das relações dos parâmetros.

4.6) Discussão

Foi observado que as configurações empregadas no plugin CASA, em especial a máxima velocidade entre frames, mínima VCL, VAP e VSL, são fundamentais para a avaliação dos parâmetros espermáticos e que a visualização subjetiva da coloração que difere espermatozoides móveis dos totalmente parados (estáticos) é uma ótima ferramenta de controle das configurações testadas. Além disso, constatou-se que o número de frames, qualidade do vídeo, objetiva do microscópio e o número de imagens avaliadas são determinantes para realização das análises. Diferentes configurações na caixa de diálogo do plugin CASA também foram estabelecidas para outras espécies nativas brasileiras e espécies de clima temperado e foram ajustadas conforme as características dos espermatozoides (Bombardelli et al. 2011; Ingermann et al. 2010; Sanches et al. 2010a; Wilson-Leedy & Ingermann 2007).

A objetiva de 40x utilizada para a captura dos vídeos foi o principal fator que influenciou diretamente nas configurações estabelecidas para a realização das análises, proporcionando a visualização dos espermatozoides mais clara e evidente, entretanto, quando comparada com objetiva de 10x, o campo de visualização reduziu 75%, facilitando a saída dos espermatozoides deste campo.

Foi verificado que quanto mais frames utilizados nas análises, menores são as taxas de motilidade e velocidades. Entretanto, constatou-se que o parâmetro que descreve o movimento linear (*Straightness*) em espermatozoides que apresentam trajetórias circulares, é de certa forma mascarado quando se utiliza menos frames para realização das análises. A exemplo disso isolou-se um espermatozoide com movimento circular e observou-se 92,9% de movimentação linear ao utilizar 50 frames enquanto para 100 frames 74,9%. Como os espermatozoides de *S. parahybae* apresentam comportamento altamente retilíneo e poucos com trajetória circular, decidiu-se realizar o restante das análises utilizando-se 50 imagens (0,5s). Todavia, quando se utilizou maior tempo para as análises, poucos espermatozoides foram observados no campo de visualização. Isso ocorre porque espermatozoides saem do campo de visualização, e não são considerados nas análises, bem como os espermatozoides que entram no campo após iniciar as análises (Wilson-Leedy & Ingermann 2007).

A aplicação de cálculo matemático para determinar a velocidade espermática e compará-la com os resultados gerados pelo plugin CASA também foi verificada por Wilson-Leedy and Ingermann (2007) para o zebrafish, que não verificaram diferenças entre as duas formas de avaliação (ImageJ e cálculo matemático). Para *Zebrafish*, Pavlov (2006) observou que o cálculo utilizando planilha de excel é uma ótima ferramenta para avaliação das velocidades espermáticas em peixes. Para suas avaliações o autor utilizou o plugin MTrak2, pelo software ImageJ para gerar os pares ordenados necessários para os cálculos.

Para o surubim-do-Iguaçu, *Steindachneridion melanodermatum*, Bombardelli et al. (2011) utilizaram o plugin CASA/ImageJ para avaliação de sêmen fresco e observaram $92,9 \pm 6,0\%$, $169,5 \pm 25,4 \mu\text{m s}^{-1}$ e $38,5 \pm 1,3 \mu\text{m s}^{-1}$ de MOT, VCL e VSL, respectivamente. Para o *S. parahybae* Carvalho et al. (2011) observaram que velocidade dos espermatozoides criopreservados variou conforme o crioprotetor empregado no processo de congelamento. Os autores verificaram de $62,6$ a $81,5 \mu\text{m s}^{-1}$ de VCL, $44,9$ a $72,0 \mu\text{m s}^{-1}$ de VAP e $26,6$ a $60,0 \mu\text{m s}^{-1}$ de VSL. Possivelmente, o fato dos espermatozoides terem sido congelados foi determinante para obtenção de menores velocidades do que observado no presente experimento. Este fato corrobora aos descritos por Bombardelli et al., (2011) para o *S. melanodermatum*, que observaram variações das VCL e VSL em função de diferentes crioprotetores testados, além disso, verificaram redução destas velocidades em comparação ao sêmen fresco.

O comportamento dos espermatozoides de *S. parahybae* entre 10 a 20s (Figura 4) e 10 a 50s (Figura 5 e 6) após a ativação indicam uma contínua redução da qualidade espermática em função do tempo. Para espermatozoides de peixes a redução da movimentação frenética se deve à redução de reservas energéticas após início da movimentação (Cosson 2010). Estes resultados são similares aos observados por Sanches et al. (2010a) para o *Rhamdia quelen*, outro bagre sul-americano, onde ocorre a redução da motilidade e velocidade espermática logo após a ativação. Diante disso, sugere-se a avaliação dos parâmetros espermáticos em *S. parahybae* imediatamente após a ativação, onde possivelmente podem-se registrar as maiores taxas de motilidade e velocidade. Entretanto, tempos menores são difíceis de serem obtidos e variam conforme a

experiência de quem está realizando as análises. Medidas das características seminais em peixes de água doce normalmente são limitadas pelo curto tempo de motilidade dos espermatozóides (Billard & Cosson 1992). Este fator é limitante principalmente, em análises espermáticas computadorizadas que requerem padronização de métodos para espécies de peixes nativas de água doce (Sanches et al. 2010a).

A diminuição da motilidade e velocidade após ativação é normalmente observada em peixes de água doce (Fauvel et al. 2010) e são diretamente proporcionais aos estoques de energia espermática (Perchec et al. 1995). Além disso, a utilização de água destilada para ativação é outro fator que promove a precoce imobilidade espermática. Isso ocorre porque a baixa osmolaridade da água destilada (0 mOsm kg^{-1}) é extremamente prejudicial à membrana espermática, os quais apresentam alta pressão intracitoplasmática. Este fato pode prevenir a propagação de onda (Cosson 2010), e também, promove o encurtamento do flagelo e a curvatura em forma de laço (Alavi et al. 2009). De acordo com Alavi et al. (2009) a utilização de soluções específicas contendo íons de (K^+ , Na^+ e Ca^{+2}) com baixa osmolaridade pode promover mais tempo de motilidade espermática e inibir defeitos em espermatozóides de peixes de água doce. Entretanto, os efeitos destas soluções para os espermatozóides de *S. parahybae* não são conhecidos e podem ser testadas em futuros experimentos.

A variação dos parâmetros espermáticos entre os exemplares indica que a quantidade de machos utilizados é importante e deve ser considerada em experimentos com sêmen de peixes. A variação das taxas de motilidade entre os machos nos tempos de 10 a 50 segundos indica claramente uma variação individual, conforme destacado também por Wilson-Leedy & Ingermann (2007) para o zebrafish. Além disso, cabe ressaltar que os espermatozóides de *S. parahybae* apresentam grande variação de VAP e VSL entre os machos, isso foi evidente nos resultados do coeficiente de variação observados nestas variáveis em relação aos demais parâmetros de motilidade. Estes resultados indicam que a VAP e VSL apresentam a peculiaridade de grande variação, sendo esta, normal para a espécie.

O modelo matemático aplicado ($y=100/1+a*e^{-bx}$) para a motilidade (Figura 5B) representou 95,13% dos dados observados. A partir deste modelo pôde-se

estimar que 50% dos espermatozoides tinham cessado o movimento em 23,65s após a ativação com água destilada. Para o *S. parahybae*, Sanches et al. (2010b) observaram subjetivamente que 50% dos espermatozoides cessaram a movimentação em $39,74 \pm 3,55$ s. Diante destas diferenças, sugere-se que o modelo proposto pode ser aplicado em futuros experimentos destinados a qualidade seminal e a validação de métodos subjetivos, além de estimativas da motilidade espermática em tempos distintos após sua ativação.

A partir das correlações entre os parâmetros espermáticos avaliados sugerem-se duas hipóteses: (i) Correlação inversamente proporcional entre a taxa de motilidade e o número de espermatozoides. Esta correlação pode representar que quanto mais espermatozoides no campo de visualização, maior é a probabilidade de colisões e, conseqüentemente, os espermatozoides móveis serão desconsiderados das análises e/ou a menor motilidade se deve ao maior número de espermatozoides parados no campo de visualização. (ii) Correlações inversamente proporcionais entre o número de espermatozoides e os parâmetros de velocidade, sugerem que com menor velocidade, menos espermatozoides saem do campo de visualização e, conseqüentemente, são considerados nas análises.

Logo, se os espermatozoides foram considerados nas análises, as altas concentrações de espermatozoides não provocaram a redução da motilidade por colisões e sim, pelo maior número de espermatozoides estáticos presentes no campo de visualização do programa.

Para zebrafish a utilização de 6 a 344 espermatozoides no campo de visualização não influenciou os parâmetros de motilidade, apesar disso, concentrações extremamente altas ou baixas podem interferir nas avaliações espermáticas e devem ser evitadas em análises computadorizadas (Wilson-Leedy & Ingermann 2007).

Babiak et al. (2006) verificaram para o *Hippoglossus hippoglossus* que a concentração espermática teve correlação inversamente proporcional com a MOT, VCL, VSL e Linearidade e, relação proporcional com o percentual de espermatozoides de movimentos lentos e estáticos. Para evitar que a concentração de espermatozoides interferisse nas análises computadorizadas, os autores descartaram as imagens que apresentaram o número de

espermatozóides superior a 200 por campo de visualização. Apesar deste procedimento ser aplicado à uma espécie marinha, ele pode ser uma alternativa na rotina de avaliação espermática computadorizada em peixes de água doce a fim de evitar possíveis erros nas análises.

4.7) Conclusão

A implantação de sistemas computadorizados em análises espermáticas em peixes está se tornando prática de rotina em investigações, entretanto, a aquisição de softwares comerciais é relativamente dispendiosa, desta forma, a utilização do pacote *CASA free* (plugin *CASA/ImageJ*) é uma ótima ferramenta para descrever o comportamento dos espermatozóides. No presente experimento, observou-se que o *CASA free* é um método eficiente, exato e objetivo na avaliação dos parâmetros espermáticos em surubim-do-paráíba, *Steindachneridion parahybae*. Além disso, observou-se que as análises espermáticas utilizando objetiva de 40x devem ser realizadas utilizando-se 25 ou 50 imagens. A melhor qualidade espermática foi observada imediatamente após a ativação com água destilada e após 50s quase todos os espermatozóides pararam seu movimento. Este comportamento pode ser representado pelo modelo não linear $y=100/1+0.0210*\exp^{0.16334*x}$.

4.8) Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (nº 478347/2009-0), ao Fundo de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (nº 2009/18609-6 e 2010/02818-5) e à Companhia Energética de São Paulo - CESP.

4.9) Referências

- Alavi, S. M. H., M. Rodina, T. Policar, and O. Linhart. 2009. Relationship between semen characteristics and body size in *Barbus barbus* L. (Teleostei: Cyprinidae) and effects of ions and osmolality on sperm motility. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology* **153**:430-437.
- Babiak, I., O. Ottesen, G. Rudolfson, and S. Johnsen. 2006. Quantitative characteristics of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L., semen throughout the reproductive season. *Theriogenology* **65**:1587-1604.
- Billard, R., J. Cosson, G. Perchee, and O. Linhart. 1995. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. *Aquaculture* **129**:95-112.
- Billard, R., and M. P. Cosson. 1992. SOME Problems related to the assessment of sperm motility in fresh-water fish. *Journal of Experimental Zoology* **261**:122-131.
- Bobé, J., and C. Labbe. 2010. Egg and sperm quality in fish. *General and Comparative Endocrinology* **165**:535-548.
- Bombardelli, R. A., E. F. Mörschbacher, E. Gomes, G. Neumann, R. M. Marcos, C. P. R. d. Toledo, L. Tessaro, F. Mertenz, and E. Sanches. 2011. Milt cryopreservations protocols to iguaçu surubim (*Steindachneridion melanodermatum*). Page 157 in WAS, editor. *World Aquaculture 2011*. WAS, Natal, Brazil.
- Caneppele, D., R. M. Honji, A. W. S. Hilsdorf, and R. G. Moreira. 2009. Induced spawning of the endangered Neotropical species *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes: Pimelodidae). *Neotropical Ichthyology* **7**:759-762.
- Carvalho, I. C., R. V. Araújo, D. Caneppele, and A. T. M. Viveiros. 2011. Motilidade e velocidades espermáticas do sêmen criopreservado de surubim-do-Paraíba, *Steindachneridion parahybae*, avaliado através do Sistema Computadorizado (CASA) in UFLA, editor. III Conferência Latinoamericana Sobre Cultivo de Peixes Nativos e III Congresso Brasileiro de Produção de Peixes Nativos. UFLA, Lavras, Brazil.

- Cosson, J. 2010. Frenetic activation of fish spermatozoa flagella entails short-term motility, portending their precocious decadence. *Journal of Fish Biology* **76**:240-279.
- Fauvel, C., M. Suquet, and J. Cosson. 2010. Evaluation of fish sperm quality. *Journal of Applied Ichthyology* **26**:636-643.
- Helfenstein, F., M. Podelvin, and H. Richner. 2010. Sperm morphology, swimming velocity, and longevity in the house sparrow *Passer domesticus*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **64**:557-565.
- Honji, R. M., D. Caneppele, A. W. S. Hilsdorf, and R. G. Moreira. 2009. Threatened fishes of the world: *Steindachneridion parahybae* (Steindachner, 1877) (Siluriformes: Pimelodidae). *Environmental Biology of Fishes* **85**:207-208.
- IBGE. 2009. Fauna Ameaçada de Extinção, Invertebrados Aquáticos e Peixes – 2009. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.
- Ingermann, R. L., M. K. Kanuga, and J. G. Wilson-Leedy. 2010. Effect of blood plasma on motility of steelhead sperm. *Aquaculture Research* **41**:1107-1112.
- Ingermann, R. L., C. L. F. Schultz, M. K. Kanuga, and J. G. Wilson-Leedy. 2011. Metabolism of motile zebrafish sperm. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology* **158**:461-467.
- Kanuga, M. K., M. J. Benner, J. A. Doble, J. G. Wilson-Leedy, B. D. Robison, and R. L. Ingermann. 2011. Effect of Aging on Male Reproduction in Zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Experimental Zoology Part a-ecological Genetics and Physiology* **315A**:156-161.
- Kime, D. E., K. J. W. Van Look, B. G. McAllister, G. Huyskens, E. Rurangwa, and F. Ollevier. 2001. Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* **130**:425-433.
- Liu, G., D. Innes, and R. J. Thompson. 2011. Quantitative Analysis of Sperm Plane Circular Movement in the Blue Mussels *Mytilus edulis*, *M. trossulus*

- and Their Hybrids. *Journal of Experimental Zoology Part a-Ecological Genetics and Physiology* **315A**:280-290.
- Mariante, A. S., M. S. M. Albuquerque, and A. F. Ramos. 2011. Criopreservação de recursos genéticos animais brasileiros. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* **35**:64-68.
- MMA 2008. Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. Ministério do Meio Ambiente.
- Murack, P. J., J. Parrish, and T. P. Barry. 2011. Effects of progesterone on sperm motility in fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquatic Toxicology* **104**:121-125.
- Pavlov, D. A. 2006. A Method for the Assessment of Sperm Quality in Fish. *Journal of Ichthyology* **46**:391-398.
- Perchee, G., C. Jeulin, J. Cosson, F. Andre, and R. Billard. 1995. Relationship between sperm ATP content and motility of carp spermatozoa. *Journal of Cell Science* **108**:747-753.
- Quinn, G. P., and M. J. Keough 2002. *Experimental Design and Data Analysis for Biologists*. Cambridge University Press.
- Ravinder, K., K. Nasaruddin, K. C. Majumdar, and S. Shivaji. 1997. Computerized analysis of motility, motility patterns and motility parameters of spermatozoa of carp following short-term storage of semen. *Journal of Fish Biology* **50**:1309-1328.
- Rurangwa, E., D. E. Kime, F. Ollevier, and J. P. Nash. 2004. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture* **234**:1-28.
- Sanches, E. A., R. A. Bombardelli, D. M. Baggio, and B. E. de Souza. 2009. Insemination dose for artificial fertilization of dourado oocytes. *Revista Brasileira De Zootecnia-Brazilian Journal of Animal Science* **38**:2091-2098.
- Sanches, E. A., R. A. Bombardelli, R. M. Marcos, G. Neumann, C. P. R. de Toledo, and E. Romagosa. 2010a. Sperm motility of *Rhamdia quelen* studied using computer-assisted analysis by open-source software. *Aquaculture Research* **42**:153-156.

- Sanches, E. A., D. Caneppele, D. R. d. Santos, R. A. Bombardelli, P. A. Piana, and E. Romagosa. 2010b. Artificial fertilization of oocytes from surubim-do-paraíba, *Steindachneridion parahybae*, with different insemination doses and water volume. Pages 1166-1167 in WAS, editor. Aquaculture Europe 2010, Porto, Portugal.
- Stasoft, I. 2005. Statistic (data analysis software system) Version 7.1. STATSOFT.
- Tuset, V. M., G. J. Dietrich, M. Wojtczak, M. Slowinska, J. de Monserrat, and A. Ciereszko. 2008. Relationships between morphology, motility and fertilization capacity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Journal of Applied Ichthyology* **24**:393-397.
- Viveiros, A. T. M., and H. P. Godinho. 2009. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. *Fish Physiology and Biochemistry* **35**:137-150.
- Viveiros, A. T. M., A. F. Nascimento, L. H. Orfao, and Z. A. Isau. 2010. Motility and fertility of the subtropical freshwater fish streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) sperm cryopreserved in powdered coconut water. *Theriogenology* **74**:551-556.
- Weingartner, M. 2010. Aperfeiçoamento das técnicas de fertilização de ovócitos de dourado, *Salminus brasiliensis* Cuvier, 1816 (Characiformes: Characidae), utilizando sêmen fresco e congelado durante o processo de reprodução induzida. 81p. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- Wilson-Leedy, J. G., and R. L. Ingermann. 2006. Manual for CASA plugin for Image J.
- Wilson-Leedy, J. G., and R. L. Ingermann. 2007. Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. *Theriogenology* **67**:661-672.
- Wilson-Leedy, J. G., M. K. Kanuga, and R. L. Ingermann. 2009. Influence of osmolality and ions on the activation and characteristics of zebrafish sperm motility. *Theriogenology* **71**:1054-1062.

**5) ARTIGO 02: DOSE INSEMINANTE E VOLUME DE ÁGUA
APLICADA À FERTILIZAÇÃO ARTIFICIAL DE
*Steindachneridion parahybae***

DOSE INSEMINANTE E VOLUME DE ÁGUA APLICADA À FERTILIZAÇÃO ARTIFICIAL DE *Steindachneridion parahybae*

5.1) Resumo

Objetivou-se avaliar doses inseminantes e volume de água sobre os valores das taxas de fertilização, eclosão e larvas normais em *Steindachneridion parahybae*. Foram utilizados gametas provenientes de quatro reprodutores, dois machos ($1,95 \pm 0,50$ kg) e duas fêmeas ($2,30 \pm 0,42$ kg). A taxa de motilidade ($87,10 \pm 6,67\%$) e concentração espermática ($1,696 \times 10^{10}$ espermatozoides mL^{-1}) foram avaliadas antes da realização do ensaio de fertilização. Para tanto, realizou-se a coleta do sêmen ($26,80 \pm 7,07$ mL) antes que os ovócitos (287 ± 7 ovócitos g^{-1}). Estimou-se a quantidade de espermatozoides móveis ($1,477 \times 10^{10}$ células mL^{-1}) e o volume de sêmen necessário para a aplicação das doses inseminantes, utilizando-se um delineamento experimental fatorial (4×4), com quatro doses inseminantes: $1,0 \times 10^4$; $1,0 \times 10^5$; $1,0 \times 10^6$; $1,0 \times 10^7$ espermatozoides ovócito $^{-1}$ e quatro volumes de água: 1; 35; 65 e 95mL de água g^{-1} de ovócitos em triplicatas ($n=48$). Cada incubadora (1,5L de volume útil) contendo 1g de ovócitos foi considerada como uma unidade experimental. Os valores das taxas de fertilização (FER), eclosão (ECL) e larvas normais (LN) foram submetidos à análise de superfície de resposta ao nível de 5% de significância. Interações significativas ($P < 0,05$) para FERT e efeito quadrático ($P < 0,05$) para ECL foram verificadas. As dosagens e os volumes aplicados não influenciaram no percentual de LN ($87,70 \pm 5,06\%$). As melhores FER foram encontradas por meio da aplicação de $5,4 \times 10^6$ espermatozoides ovócito $^{-1}$ em 1mL de água g^{-1} de ovócitos e $6,4 \times 10^6$ espermatozoides ovócito $^{-1}$ em 95mL de água g^{-1} de ovócitos. Os maiores valores ECLOS foram observados na aplicação de $5,5 \times 10^6$ espermatozoides ovócito $^{-1}$ entre 1mL e 95mL de água g^{-1} de ovócitos. Recomenda-se a aplicação de $5,5 \times 10^6$ espermatozoides ovócito $^{-1}$ e a utilização de 1mL de água g^{-1} de ovócitos no procedimento de fertilização artificial *in vitro*. Estes resultados permitiram desenvolver novas estratégias biotecnológicas aplicadas na conservação do *S. parahybae*.

Palavras chave: espermatozoides, ovócitos, peixe de água doce, reprodução artificial, sêmen, surubim-do-paraíba

INSEMINATING DOSE AND WATER VOLUME APPLIED TO THE ARTIFICIAL FERTILIZATION OF *Steindachneridion parahybae*

5.2) Abstract

The aim of this study was to assess insemination doses and water volume upon the fertilization, hatching rates and percentage of normal larvae in *Steindachneridion parahybae*. Gametes from four breeders were used, two males ($1.95\pm 0.50\text{kg}$) and two females ($2.30\pm 0.42\text{kg}$). The motility rate ($87.10\pm 6.67\%$) and sperm concentration (1.696×10^{10} spermatozoa mL^{-1}) were evaluated before the fertilization trials, so, the collection of semen ($26.80\pm 7.07\text{mL}$) was carried before than oocytes (287 ± 7 oocytes g^{-1}). Was estimated the number of motile sperm (1.477×10^{10} cells mL^{-1}) and semen volume necessary for the implementation of insemination, using a factorial experimental design (4×4) with four insemination doses: 1.0×10^4 , 1.0×10^5 , 1.0×10^6 , 1.0×10^7 spermatozoa oocyte $^{-1}$ and four volumes of water: 1, 35, 65 and 95ml of water g^{-1} of oocytes in triplicates ($n=48$). Each incubator (1.5L of useful volume) with 1g of oocytes was considered as an experimental unit. The fertilization, hatching rates and percentage of normal larvae were analyzed by response surface at 5% significance level. Significant interactions ($P<0.05$) to fertilization rates and quadratic effect ($P<0.05$) to hatching rates were observed. The doses and volumes did not influence the percentage of normal larvae ($87.70\pm 5.06\%$). The best fertilization rates were found at 5.4×10^6 spermatozoa oocyte $^{-1}$ in 1 ml of water g^{-1} of oocytes and 6.4×10^6 spermatozoa oocyte $^{-1}$ in 95ml of water g^{-1} of oocytes. The highest hatching rates were observed at 5.5×10^6 spermatozoa oocyte $^{-1}$ in 1ml or 95ml of water g^{-1} of oocytes. It is recommended that the usage of 5.5×10^6 spermatozoa oocyte $^{-1}$ and using 1mL of water g^{-1} of oocytes during *in vitro* fertilization procedure. These results allowed us to develop new biotechnological strategies applied to the conservation of *S. parahybae*.

Keywords: sperm, oocytes, freshwater fish, artificial reproduction, semen, surubim-do-paraiba

5.3) Introdução

O surubim-do-Paraíba, *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes: Pimelodidae), é um bagre endêmico da bacia do rio Paraíba do Sul (Garavello 2005). O estoque pesqueiro desta espécie no ambiente natural sofreu grandes reduções desde a década de 1950 (Machado and Abreu 1952, Hilsdorf and Petrere Jr 2002, Caneppele et al. 2009) principalmente devido à pesca desordenada e ações antrópicas, como construções de barragens e excesso de poluição (Araujo et al. 2009). Atualmente, o *S. parahybae* é uma espécie de peixe que se encontra na lista vermelha dos animais brasileiros ameaçados de extinção (MMA 2008), sendo considerado regionalmente extinto no estado de São Paulo (PAN 2011).

Caneppele et al. (2009) realizaram a reprodução artificial do surubim-do-Paraíba por meio de agente indutores, sendo empregada à fertilização artificial à “seco” (Ihering 1937). Os autores verificaram a ovulação no período de 250 horas-grau com 85% ovócitos fertilizados. Estes resultados preliminares vêm sendo utilizados em programas de recuperação da ictiofauna local (Honji et al. 2009, Araújo 2011). Entretanto, estudos de caracterização dos gametas e manejos reprodutivos durante o processo de fertilização artificial, bem como as biotécnicas reprodutivas em cativeiro desta espécie são necessários para maximizar o sucesso reprodutivo e contribuir para sua preservação. Estes podem contribuir diretamente para o uso racional de gametas aumentando o sucesso da propagação artificial, como no caso da aplicação de doses inseminantes (Rurangwa et al. 2004).

Doses inseminantes foram aplicadas com sucesso em outras espécies de peixes nativos sul-americanos, proporcionando condições adequadas para promover a máxima fertilização, a exemplo do *Salminus brasiliensis* (Sanches et al. 2009, Weingartner 2010), *Rhamdia quelen* (Bombardelli et al. 2006), *Brycon insignis* (Shimoda et al. 2007) e *Piaractus mesopotamicus* (Sanches et al. 2011a). A aplicação de doses inseminantes adequadas durante os procedimentos de fertilização artificial apresenta importantes implicações, tais como, maiores valores das taxas de fertilização, otimização de gametas e reprodutores e, serve de base em programas de criopreservação, possibilitando o descongelamento

somente da quantidade de espermatozóides necessária para fertilizar a quantidade de ovócitos desejada (Fogli da Silveira et al. 1988, Rurangwa et al. 1998, Chereguini et al. 1999, Bombardelli et al. 2006, Sanches et al. 2009, Sanches et al. 2011a, Yasui et al. 2009).

Diante disso, objetivou-se avaliar as doses inseminantes *versus* volume de água sobre os valores das taxas de fertilização, eclosão e larvas normais em *Steindachneridion parahybae*, mantidos em viveiros escavados.

5.4) Material e Métodos

5.4.1) Local e seleção dos reprodutores

O experimento foi conduzido na Estação de Hidrobiologia e Aquicultura da Companhia Energética de São Paulo - EHA/CESP, Paraibuna/SP/BR (Anexo1-B) (23°24'54''S; 45°35'52''W), utilizando-se reprodutores de *S. parahybae* provenientes de ambiente natural (F0) e de reprodução induzida realizada na própria estação a partir de exemplares selvagens (F1).

Os peixes foram mantidos em dois tanques escavados revestidos de concreto e fundo de areia (200m²), receberam ração comercial extrusada para peixes carnívoros, com 40% de proteína bruta na proporção de 5% da biomassa semana⁻¹, sendo à refeição fornecida em duas porções às 08h00min e 16h00min em três dias da semana.

No período reprodutivo (out-fev/2011-2012) foram selecionados reprodutores aptos à desova no próprio tanque (Anexo1-C) a partir de leve pressão abdominal. Selecionou-se machos apresentando liberação de sêmen e fêmeas com ventre ligeiramente abaulado (Anexo1-D) e com liberação de uma pequena parcela de ovócitos de tamanho uniforme (Caneppele et al. 2009). Além disso, nas fêmeas, realizou-se a retirada de uma pequena parcela de ovócitos por meio de biópsia, empregando-se um cateter de 2,0mm e sucção (Anexo1-E), esta parcela foi imersa em solução de serra (Lemanova and Sakun 1975) para aferição do percentual de ovócitos com vesícula germinal migrada ($\geq 65\%$ de núcleo

periférico) (Anexo1-F, G). Selecionaram-se oito fêmeas ($1.350\pm 661\text{g}$), sendo quatro F0 e quatro F1 e seis machos F0 ($1.659\pm 550\text{g}$). Após a seleção, as fêmeas foram transferidas para o laboratório e mantidas em aquários (500L) dotadas de aeração, durante 26h (tempo transcorrido entre a primeira dosagem hormonal e a coleta dos ovócitos). Os machos foram transferidos para um tanque revestido de concreto (12m^2) próximo ao laboratório com renovação constante de água (3.600L h^{-1}). A água utilizada para a estocagem e manejo dos reprodutores, fertilização e incubação de ovos foi proveniente do reservatório da CESP de Paraibuna/SP.

5.4.2) Indução hormonal

Foi realizada indução hormonal das fêmeas (Anexo1-H) por meio da aplicação de extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC) com duas doses, a primeira de $0,5\text{mg}$ de EBHC kg^{-1} e a segunda de $5,0\text{mg}$ de EBHC kg^{-1} em um intervalo de 12 horas, diluídas em soro fisiológico (0,9% NaCl) conforme Caneppele et al. (2009). As aplicações foram realizadas na parte superior da nadadeira dorsal, intramuscular. Os machos não foram submetidos ao processo de indução hormonal (Caneppele 2011).

5.4.3) Coleta e avaliação de características seminais

Para a coleta do sêmen, os peixes foram contidos e secos (panos e papel toalha) e submetidos à pressão abdominal no sentido céfalo-caudal. A primeira gota de sêmen foi desprezada para evitar possível contaminação com urina. O restante de sêmen foi coletado em tubos de ensaio graduados ($\pm 0,1\text{ mL}$) e, posteriormente conservados à temperatura ambiente ($\approx 25^\circ\text{C}$) durante uma hora (tempo necessário para a avaliação dos parâmetros espermáticos e realização da fertilização artificial). No momento da liberação do sêmen evitou-se a contaminação das amostras com sangue e urina.

Após a coleta seminal, realizou-se de cada macho, uma avaliação prévia de motilidade subjetiva sobre a qualidade espermática conforme Sanches et al.

(2009). Foram selecionados para o experimento, sêmen proveniente de dois machos ($1.950 \pm 495g$) que apresentavam acima de 80% de motilidade.

Após a escolha dos machos, realizaram-se análises de concentração espermática e análises de motilidade espermática computadorizada conforme Sanches et al. (2010). Estes resultados foram empregados para estimar as dosagens de sêmen em função da quantidade de espermatozóides móveis. Além disso, avaliou-se a taxa de alterações morfológicas e de sobrevivência espermática.

Para mensuração da concentração espermática foram utilizadas duas amostras, em cada uma utilizou-se 5 μL do sêmen diluído em 5.000 μL de formol salino tamponado, resultando em uma diluição de 1:1.000. Uma câmara hematimétrica de Neubauer (espermatozóides mL^{-1}) foi utilizada para a contagem de células espermáticas (Sanches et al. 2011b).

Do mesmo sêmen fixado em formol salino foram preparadas três lâminas com espermatozóides corados com rosa de bengala (Streit Jr. et al. 2004) para avaliar as possíveis alterações morfológicas dos espermatozóides. Para tanto, adaptou-se a metodologia empregada por Streit Jr. et al. (2006) e Bombardelli et al. (2010) para confecção de lâminas. Utilizou-se 500 μL de espermatozóides+formol salino tamponado (diluição 1:1000 de espermatozóides:fixador) foram mantidos em tubos eppendorf (1,5 mL) e posteriormente, adicionou-se 10 μL de corante. Após homogeneização, 10 μL de fixador+espermatozóides+corante foram acrescentados em uma extremidade da lâmina de vidro. A lâmina foi elevada obliquamente ao ângulo de 45° para deslizamento desta gotícula até outra extremidade. As lâminas foram secas ao ar livre e após 24h, analisadas em microscópio de luz (obj. 40x) (Hafez and Hafez 2004), com avaliação de 200 espermatozóides (CBRA 1998) (Anexo 2-G, H, I).

A avaliação da viabilidade espermática foi realizada pelo método de coloração eosina-nigrosina (Adaptado de Blom 1950), utilizando-se 30 μL de sêmen, 90 μL de eosina amarela (3%) e 90 μL de nigrosina (5%). Vinte e quatro horas após o processamento das lâminas, 200 espermatozóides (CBRA, 1998) foram analisados em microscópio de luz (obj. 40x) (Sanches et al. 2009), sendo considerados mortos os espermatozóides corados e vivos os incolores (Kavamoto and Fogli da Silveira 1986).

As avaliações da motilidade espermática pelo método computadorizado foram realizadas conforme descrito por Wilson-Leedy and Ingermann (2007) e Sanches et al. (2010) utilizando-se *softwares* livres. O processo de ativação foi realizado em tubos tipo eppendorf (1,5mL), utilizando-se 1µL de sêmen e 1.000µL de água proveniente do sistema de incubação. As imagens foram obtidas através da utilização de um microscópio de luz trinocular Nikon (modelo e50i) previamente focado (obj. 10x) acoplado com uma câmera Prosilica GE680c (<http://www.alliedvisiontec.com>), conectada ao computador (intel core i7[®] CPU 2,3 GHz, 4Gb de Ram), sistema operacional Microsoft Windows 7[®]. Os vídeos foram capturados pelo *software* AVTUniversalPackage a 101fps (640x480 pixels) em formato *.avi, editados no *software* VIRTUALDUB-1.9.0 (virtualdub.org), e exportados como seqüência de imagens em formato *.jpg, para um diretório específico. As imagens correspondentes foram abertas, editadas no IMAGEJ (*National Institutes of Health, USA, <http://rsbweb.nih.gov/ij/>*) e compiladas por meio do plugin CASA (*University of California and Howard Hughes Medical Institute, USA, <http://rsbweb.nih.gov/ij/plugins/casa.html>*).

O processamento dos vídeos foi realizado baseado na descrição dos componentes necessários para a utilização do aplicativo CASA por meio de *software* livre (Wilson-Leedy and Ingermann 2006), entretanto, as configurações utilizadas foram adaptadas para espécie. Os parâmetros espermáticos obtidos a partir de quatro réplicas foram: taxas de motilidade (MOT), velocidade curvilínea (VCL), velocidade média do deslocamento (VMD), velocidade em linha reta (VLR), retilinearidade (RET) e progressão (PROG).

5.4.4) Coleta e avaliação de ovócitos

Os ovócitos foram coletados após um período de 320 horas-grau (13,9h a 23°C), sendo registradas a partir da última aplicação hormonal (Caneppele et al. 2009). A coleta foi realizada por meio de extrusão, que consiste na massagem abdominal no sentido encéfalo caudal (Anexo 1-J). Os ovócitos foram coletados em almofariz de porcelana e, posteriormente, pesados ($\pm 0,1g$) para a estimativa do número de ovócitos produzidos por grama de fêmea. Todavia, para a

estimativa do número total de ovócitos em cada unidade experimental foi realizada a contagem de quatro sub-amostras de um grama de ovócitos de cada fêmea.

Após à extrusão dos ovócitos, utilizou-se como pré-requisito, uma aferição subjetiva (macroscópica) da qualidade, com relação à uniformidade no tamanho, cor amarela e ausência de sangue. Diante disso, utilizaram-se ovócitos provenientes de duas fêmeas F0 (2.300 ± 424 g). A seguir, 30 gramas de ovócitos das duas fêmeas foram homogeneizados, dando origem a uma amostra composta “pool” de ovócitos que posteriormente foi empregada ao experimento de fertilização. Uma parcela de 1g de ovócito foi submetida à imersão em solução de Gilson (Simpson 1951) para avaliação do diâmetro dos ovócitos (estereomicroscópio, 20 \times). Para a fertilização, foram empregadas quantidades de ovócitos pré-estabelecidas por peso (1g) em cada unidade experimental (Anexo 1-K).

5.4.5) Delineamento experimental

As doses inseminantes (espermatozóides ovócito⁻¹) e volume de água (mL g⁻¹ de ovócitos) empregadas foram determinadas por meio da realização de três ensaios pilotos.

Os gametas selecionados foram distribuídos em um delineamento experimental fatorial 4 \times 4. Os tratamentos foram compostos por quatro doses inseminantes de $1,0 \times 10^4$, $1,0 \times 10^5$, $1,0 \times 10^6$ e $1,0 \times 10^7$ espermatozóides ovócito⁻¹, quatro volumes de água de 1, 35, 65 e 95mL de água g⁻¹ de ovócitos e três réplicas (48 unidades experimentais). Foi considerada como uma unidade experimental uma incubadora cônica (1,5L), contendo 1,0g (287 ± 7 ovócitos) fertilizados com suas respectivas doses inseminantes e volume de água. Para minimizar o efeito do tamanho do recipiente em relação ao volume de água realizaram-se as fertilizações em diferentes copos plásticos com os seguintes volumes de 50, 100, 150 e 250mL para os respectivos volumes de água de 1, 35, 65 e 95mL g⁻¹ de ovócitos.

5.4.6) Fertilização Artificial

A fertilização artificial dos ovócitos do *S. parahybae* foi realizada pelo método a “seco” (Ihering 1937) com homogeneização dos gametas na ausência de água. Posteriormente, a água foi adicionada para ativação dos gametas com as qualidades e quantidades pré-estabelecidas descritas acima.

Os gametas masculinos foram dosados com micropipetas automáticas (Anexo 2-A), e os femininos, baseados na quantidade de ovócitos correspondentes a 1g. O processo de fertilização foi realizado em recipientes plásticos de 50, 100, 150 e 250mL (Anexo 2-B), utilizando-se água do sistema de incubação artificial.

Após a adição de água, os recipientes plásticos foram agitados durante um minuto e logo em seguida, os ovos foram transferidos para incubadoras experimentais (1,5L) com fluxo de água suficiente para movimentação dos ovos, e distribuídas aleatoriamente em cinco sistemas de recirculação de água de 300L (Anexo 2-C, D, E, F) de modo que, quatro sistemas foram compostos por 10 incubadoras e um sistema com oito. A temperatura, pH, potencial de oxirredução, condutividade elétrica, oxigênio dissolvido, saturação de oxigênio e sólidos totais dissolvidos da água do sistema de incubação foram monitorados três vezes entre o momento da fertilização até a eclosão total dos ovos em cada sistema de recirculação. Para tanto, utilizou-se o aparelho multiparâmetro Horiba (Modelo U-50).

Onze horas após a fertilização, correspondente ao final do movimento de epibolia ou fechamento do blastóporo (Honji 2011) foram estimadas o percentual de ovos fertilizados a partir da contagem de todos os ovos de cada unidade experimental. Considerou-se ovos fertilizados, aqueles que se apresentavam translúcidos e com desenvolvimento embrionário aparentemente normal (Anexo 2-J) e os não-fertilizados (=gorados, opacos ou brancos) (Anexo 2-K). Após a eclosão dos ovos (1.320 horas-grau) estimaram-se os valores das taxas de eclosão, para tanto, todas larvas recém eclodidas de cada unidade experimental

foram anestesiadas com benzocaína (50mg L⁻¹) (Anexo 2-M), para posterior classificação em normais e anormais (Anexo 2-N) sob estereomicroscópio (10x).

5.4.7) Análises estatísticas

As possíveis influências das doses inseminantes (DI) e volumes de água (VA) sobre as variáveis respostas (VR) foram avaliadas por meio do modelo de superfície de resposta:

$$VR = \partial_0 + \partial_1 DI + \partial_2 VA + \partial_3 (DI * VA) + \partial_4 (DI)^2 + \partial_5 (VA)^2 + \epsilon$$

onde: ∂i = constantes; ϵ = erro com $\sim N(0, \partial^2)$

Os parâmetros não significativos ($P > 0,05$) foram removidos progressivamente nos termos de ordens superiores pelo método *backward stepwise*. Os pressupostos foram seguidos conforme sugerido por Myers (1990) e Quin & Keough (2002). As análises foram realizadas utilizando-se o *software Statistica*© (Stasoft 2005).

5.5) Resultados

As fêmeas liberaram 73,55±7,00g de ovócitos, correspondendo à fecundidade de 9.418±2.610 ovócitos kg⁻¹ de reprodutor. Logo após a extrusão, os ovócitos apresentaram diâmetro médio de 1,70±0,07mm. Os parâmetros seminais e espermáticos avaliados estão apresentados na Tabela 1 e os parâmetros de qualidade de água na Tabela 2.

Tabela 1. Parâmetros seminais e espermáticos em *Steindachneridion parahybae* (média±desvio padrão) (n=2).

Parâmetros	Valores
Volume coletado (mL)	26,80±7,07
Volume relativo (mL kg ⁻¹)	14,68±7,35
Taxa de motilidade (%)	87,10±6,69
Velocidade curvilínea - VCL (µm s ⁻¹)	132,71±11,99
Velocidade média de descolamento - VMD (µm s ⁻¹)	103,65±11,32
Velocidade em linha reta – VLR (µm s ⁻¹)	91,06±9,05
Retilinearidade - RET (%)	87,94±1,79
Progressão – PROG (µm)	3.870±372
Concentração espermática (espermatozóides mL ⁻¹)	1,70×10 ¹⁰
Espermatozóides vivos (%)	88,83±4,86
Espermatozóides normais (%)	52,49±1,54

Tabela 2. Parâmetros mensurados da qualidade de água empregada na fertilização de ovócitos e incubação dos ovos de *Steindachneridion parahybae* (média±desvio padrão) (n=3)

Parâmetros	Valores
Temperatura (°C)	22,96±0,41
pH	7,07±0,17
Potencial de oxirredução (ORPmV)	308,07±13,08
Condutividade elétrica (mS cm ⁻¹)	0,04±0,03
Oxigênio dissolvido (mg L ⁻¹)	6,19±0,47
Saturação de oxigênio (%)	74,06±5,46
Sólidos totais dissolvidos (g L ⁻¹ TDS)	0,03±0,02

Os valores das taxas de fertilização apresentaram efeito interativo ($P < 0,05$) das doses inseminantes e volume de água aplicado (Figura 1). Os maiores valores podem ser verificadas na aplicação das doses inseminantes de $5,4 \times 10^6$ espermatozóides ovócito⁻¹ em 1,0mL de água.g⁻¹ de ovócitos até $6,4 \times 10^6$ espermatozóides ovócito⁻¹ em 95,0mL de água.g⁻¹ de ovócitos (Figura 1). Em volumes intermediários (x), os maiores valores das taxas de fertilização podem ser obtidos na dose inseminante (y) obtida conforme a equação $y = 5.423.431,90 + 10.674,42 * x$ (Figura 1).

Os valores das taxas de eclosão apresentaram comportamentos semelhantes às taxas de fertilização, entretanto, não foi verificada interação entre as doses inseminantes e o volume de água, apenas efeito quadrático ($P < 0,05$) (Figura 2). As maiores taxas de eclosão foram encontradas na dose inseminante de $5,5 \times 10^6$ espermatozóides ovócitos⁻¹ independentemente do volume de água

(Figura 2). Assim como notado para as taxas de fertilização, o menor volume de água também promoveu as maiores taxas de eclosão ($P < 0,05$) (Figura 2).

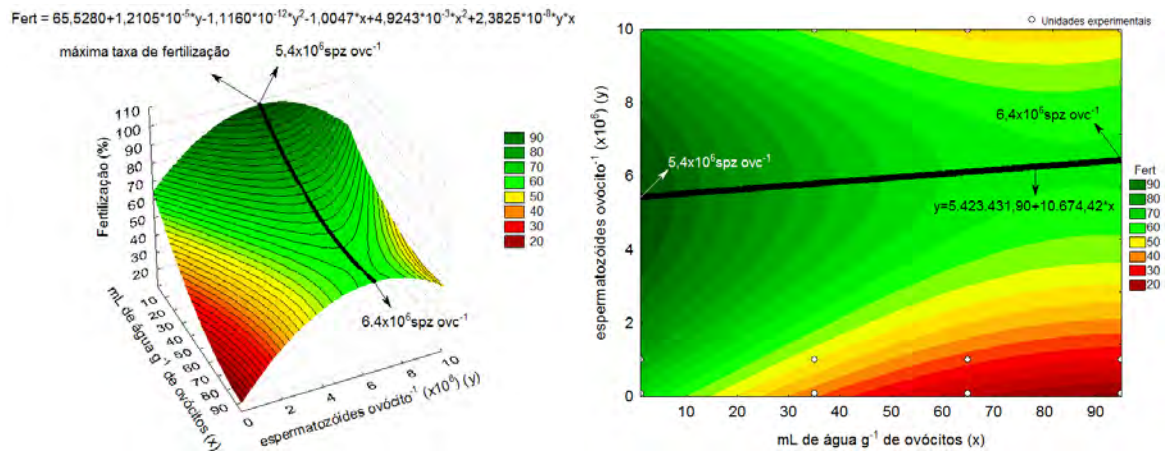


Figura 1. Valores das taxas de fertilização (Fert) de *S. parahybae* com relação às diferentes doses inseminantes versus volume de água. Esquerda – representação gráfica em 3D. Direita – representação gráfica em 2D. Espermatozoides ovócito⁻¹ (spz ovc^{-1}). $r^2 = 77,47\%$

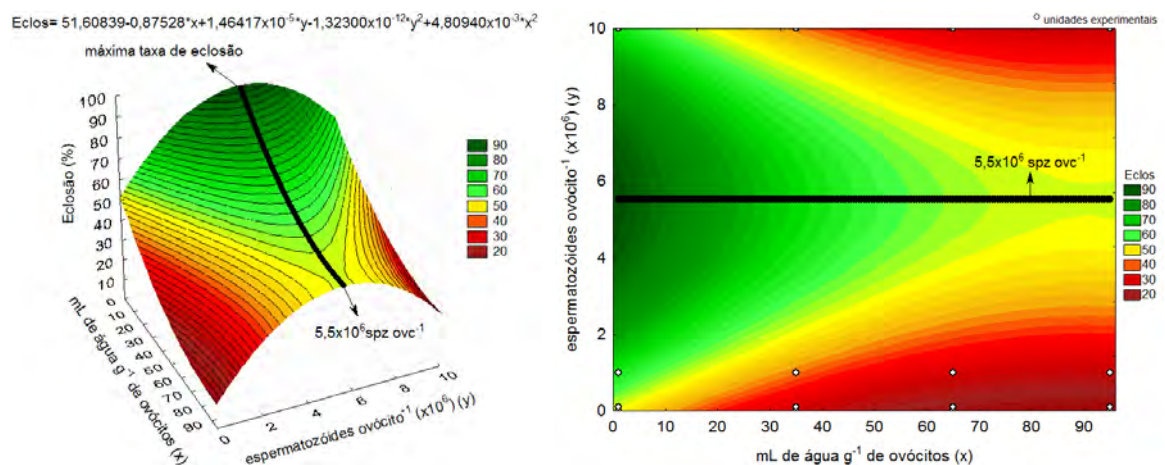


Figura 2. Comportamento dos valores das taxas de eclosão (Eclos) de *S. parahybae* com relação às diferentes doses inseminantes versus volume de água. Esquerda – representação gráfica em 3D. Direita – representação gráfica em 2D. Espermatozoides ovócitos⁻¹ (spz ovc^{-1}). $r^2 = 72,29\%$.

O porcentual de larvas normais não apresentou efeito da dose e volume ($P > 0,05$), entretanto, apresentaram médias de $87,70 \pm 5,06\%$.

5.6) Discussão

A produção espermática verificada foi superior às verificadas para a mesma espécie por Caneppele (2011) e as características espermáticas computadorizadas foram superiores às verificadas por Sanches et al., (2011c) para sêmen *in natura* e por Araújo (2011) para sêmen criopreservado, sendo, portanto, satisfatórias para reprodução artificial realizada em rotinas laboratoriais. A produção de ovos e o diâmetro foram semelhantes aos encontrados por Caneppele et al. (2009), com produção entre 9.000 e 10.000 ovócitos kg^{-1} de fêmea e diâmetro em torno de 1,90mm.

O comportamento dos valores das taxas de fertilização e eclosão observadas no presente experimento foi diferente aos encontrados em outras espécies de peixes nativos sul-americanos. Para o *Brycon insignis*, Shimoda et al. (2007) observaram um comportamento de *plateau* dos valores das taxas de fertilização a partir da dosagem de $3,1 \times 10^5$ espermatozóides ovócito⁻¹. Sanches et al. (2009), observaram para o *Salminus brasiliensis*, um comportamento quadrático, com melhores doses na aplicação de $3,1 \times 10^4$ espermatozóides ovócito⁻¹. Para o *Piaractus mesopotamicus*, Sanches et al. (2011a) constataram influência nos valores das taxas de fertilização apenas em super dosagens seminais. Os autores verificaram que a dose inseminante de $7,0 \times 10^7$ espermatozóides ovócito⁻¹ reduziu os valores das taxas em comparação às dosagens entre $7,0 \times 10^3$ a $7,0 \times 10^6$ espermatozóides ovócito⁻¹. Também verificaram que o volume de água influenciou nas taxas, sendo que pouca água no procedimento ($0,5 \text{ mL mL}^{-1}$ de ovócitos) influencia negativamente nos valores das taxas de fertilização e a utilização de 15 a 60 mL mL^{-1} de ovócitos não interferiu. A utilização de grandes quantidades de água em procedimentos de fertilização artificial também foi relatada por Weingartner (2010) para o *S. brasiliensis*, aumentando quatro vezes as taxas de fertilização na aplicação de 50 ao invés de $10 \text{ mL } 10 \text{ g}^{-1}$ de ovócitos. A utilização de grandes quantidades de água pode ajudar na diluição de algum componente tóxico, como por exemplo, magnésio, cálcio e potássio (provenientes do fluido ovariano ou da utilização de crioprotetores), que em determinadas quantidades, podem proporcionar redução da qualidade espermática e conseqüentemente menor fertilização (Yasui et al. 2012).

No presente experimento a utilização de grandes quantidades de água influenciaram negativamente os valores das taxas de fertilização e eclosão, sendo o volume de $1,0\text{mL g}^{-1}$ de ovócitos mais recomendado. Possivelmente a utilização de grandes quantidades de água diluiu excessivamente o meio inseminante, que mesmo em grandes quantidades de espermatozóides, pode ter proporcionado uma condição inapropriada para a entrada dos espermatozóides na micrópila (Chereguini et al. 1999, Sanches et al. 2009). Por outro lado a utilização de pouca água pode comprometer a ativação espermática e posteriormente, as taxas de fertilização (Billard and Cosson 1992).

Observou-se que os melhores valores de fertilização e eclosão podem ser obtidos na utilização de dosagens seminais próximas à $5,5 \times 10^6$ espermatozóides ovócito⁻¹. Entretanto, dosagens ideais podem variar conforme a qualidade dos gametas (Bobe and Labbe 2010) e do procedimento empregado para a realização da fertilização (Rurangwa et al. 2004).

Em geral, o tempo de ativação espermática em peixes de água doce é curto, sendo outro fator que pode influenciar nos valores das taxas de fertilização (Cosson 2010). Para o *S. parahybae* Caneppele (2011) observou que o tempo necessário para perda de movimentação de aproximadamente 50% dos espermatozóides é de $38,76 \pm 0,74$ segundos, sendo que em torno de um minuto todos cessam o movimento. A utilização de ativadores específicos pode garantir maior tempo de movimentação espermática para o *S. parahybae* (Araújo 2011), entretanto, a influência destes sobre os valores das taxas de fertilização é desconhecida.

Além disso, outros fatores podem variar, como por exemplo, o diâmetro dos ovócitos, pois quanto maiores, mais espermatozóides são necessários para circundar o perímetro do ovócito e atingirem micrópila. Este fato pode ser observado quando comparado com outras espécies, como por exemplo, o *Rhamdia quelen*, que apresenta ovócitos com diâmetro médio de $1,0\text{mm}$ (Pereira et al. 2006) a $1,5\text{mm}$ (Amorim et al. 2009), 1.141 ovócitos g^{-1} e dose inseminante mínima de $8,9 \times 10^4$ espermatozóides ovócito⁻¹ (Bombardelli et al. 2006). Para esta espécie Sanches et al. (2010) observaram em 15s pós ativação a VMD de $58,67 \pm 9,01 \mu\text{m s}^{-1}$ e progressão de $1.202,80 \pm 163,89 \mu\text{m}$. Diferentemente do *S. parahybae*, que apesar de apresentar ovócitos maiores, também apresentam

maiores VMD e PROG e, mesmo assim, necessita de doses inseminantes superiores, logo, mais estudos são necessários para elucidar estes efeitos na espécie.

Sabe-se que as velocidades curvilínea (VCL) e média de deslocamento (VMD) são fatores que interferem na fertilização do *S. parahybae* (Araújo 2011). O autor observou correlação linear positiva entre estas velocidades e os valores de fertilização, indicando que espermatozóides mais rápidos apresentam maiores chances de encontrar a micrópila antes de seu fechamento ou, antes de cessar seu movimento. Com isso, sugere-se, que espermatozóides que apresentam movimentos circulares apresentam maior capacidade de fertilização. Esta hipótese é corroborada por Tused et al. (2008), aos quais verificaram para *Oncorhynchus mykiss* correlação positiva entre os valores das taxas de fertilização com a VCL e correlação negativa com a velocidade em linha reta (VLR). Estes resultados indicam que os maiores valores de fertilização podem ser observados quanto menor a VLR, uma vez que a VLR é um indicativo de retilinearidade (correlação positiva) (Tuset et al. 2008).

Os valores das taxas de fertilização e eclosão verificadas a partir das doses inseminantes e volumes de água testados no presente experimento apresentam importantes implicações na reprodução artificial de surubim-do-Paraíba. Novos estudos poderão complementar a eficiência reprodutiva com a finalidade de aproveitamento de material genético, maximização dos reprodutores e emprego de programas de criopreservação. Além disso, poderão contribuir em estudos voltados à caracterização dos gametas e suas possíveis influências na fertilização.

5.7) Conclusão

De acordo com as características seminais e espermáticas observadas no presente experimento, as maiores taxas de fertilização de ovócitos e eclosão de ovos de surubim-do-Paraíba, *Steindachneridion parahybae*, podem ser obtidas utilizando-se a dose inseminante de $5,5 \times 10^6$ espermatozóides ovócito⁻¹ e o volume

de água de 1,0mL g⁻¹ de ovócitos, correspondendo para cada 10g de ovócitos, 10mL de água e 1,0mL de sêmen.

5.8) Agradecimentos

Aos funcionários da Estação de Hidrobiologia e Aquicultura da Companhia Energética de São Paulo-CESP de Paraibuna/SP. À Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP (processos n^{os}: 2009/18609-6 e 2010/02818-5). Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq (processo n^o 478347/2009-0).

5.9) Referências

- Amorim, M. P., Campos Gomes, B. V., Martins, Y. S., Sato, Y., Rizzo, E. & Bazzoli, N. 2009. Early development of the silver catfish *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) (Pisces:Heptapteridae) from the Sao Francisco River Basin, Brazil. *Aquaculture Research*, 40, 172-180.
- Araujo, F. G., Teixeira Pinto, B. C. & Teixeira, T. P. 2009. Longitudinal patterns of fish assemblages in a large tropical river in southeastern Brazil: evaluating environmental influences and some concepts in river ecology. *Hydrobiologia*, 618, 89-107.
- Araújo, R. V. 2011. Motilidade, velocidade e fertilidade do sêmen de surubim-do-paraíba *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes) criopreservado em diferentes diluidores. 91p. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- Billard, R. & Cosson, M. P. 1992. Some problems related to the assessment of sperm motility in fresh-water fish. *Journal of Experimental Zoology*, 261, 122-131.
- Blom, E. 1950. A One-minute live-dead sperm stain by means of Eosin-Nigrosin. *Fertility and Sterility*, 1, 176-177.

- Bobe, J. & Labbe, C. 2010. Egg and sperm quality in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165, 535-548.
- Bombardelli, R. A., Hayashi, C., Natali, M. R. M., Sanches, E. A. & Piana, P. A. 2010. Digestible energy level on reproductive and zootechnical performance and lipids deposition in hepatocytes of the Nile tilapia males. *Revista Brasileira De Zootecnia-Brazilian Journal of Animal Science*, 39, 941-949.
- Bombardelli, R. A., Morschbacher, E. F., Campagnolo, R., Sanches, E. A. & Syperreck, M. A. 2006. Insemination dose for artificial fertilization of grey jundia oocytes, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimardm, 1824). *Revista Brasileira De Zootecnia-Brazilian Journal of Animal Science*, 35, 1251-1257.
- Caneppele, D. 2011. *Steindachneridion parahybae* (STEINDACHNER, 1876) (SILURIFORMES: PIMELODIDAE): produção espermática ao longo de um ciclo reprodutivo. 60p. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura e Pesca. Instituto de Pesca, APTA-SAA, São Paulo.
- Caneppele, D., Honji, R. M., Hilsdorf, A. W. S. & Moreira, R. G. 2009. Induced spawning of the endangered Neotropical species *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes: Pimelodidae). *Neotropical Ichthyology*, 7, 759-762.
- CBRA 1998. Manual para exames andrológicos e avaliação de sêmen animal, Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, Belo Horizonte.
- Chereguini, O., de la Banda, I. G., Rasines, I. & Fernandez, A. 1999. Artificial fertilization in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.): different methods and determination of the optimal sperm-egg ratio. *Aquaculture Research*, 30, 319-324.
- Cosson, J. 2010. Frenetic activation of fish spermatozoa flagella entails short-term motility, portending their precocious decadence. *Journal of Fish Biology*, 76, 240-279.
- Fogli da Silveira, W., Kavamoto, E. T., Rigolino, M. G. & Tabata, Y. A. O. 1988. Fertilidade do sêmen de truta arco-íris, *Salmo irideus* gibbons, em

- diferentes concentrações de espermatozoides por óvulo. Boletim do Instituto de Pesca, 15, 51-54.
- Garavello, J. C. 2005. Revision of genus *Steindachneridion* (Siluriformes: Pimelodidae). Neotropical Ichthyology, 3, 607-623.
- Hafez, E. S. E. & Hafez, B. 2004. Reprodução Animal, Manole, Barueri.
- Hilsdorf, A. W. S. & Petrere Jr, M. 2002. Conservação de Peixes na Bacia do Rio Paraíba do Sul. Ciência Hoje, 30, 62-65.
- Honji, R. M. 2011. Controle do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas do surubim-do-paráiba *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes:Pimelodidae) em relação ao ciclo reprodutivo e à reprodução induzida em cativeiro. 300p. Programa de Pós-graduação em Ciências. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Honji, R. M., Caneppele, D., Hilsdorf, A. W. S. & Moreira, R. G. 2009. Threatened fishes of the world: *Steindachneridion parahybae* (Steindachner, 1877) (Siluriformes: Pimelodidae). Environmental Biology of Fishes, 85, 207-208.
- Ihering, R. V. 1937. A method for inducing fish to spawn. The Progressive Fish-Culturist, 34, 15-16.
- Kavamoto, E. & Fogli da Silveira, W. 1986. Características físicas, químicas e microscópicas do sêmen do bagre, *Rhamdia hilarii*. Boletim do Instituto de Pesca, 13, 95-100.
- Lemanova, N. A. & Sakun, O. F. 1975. Metodischeskoje posobie pogor monamoi stimulaciji proizvoditelei karpa pre rannom polucenii licinok. Izvestiya Gosudartvennogo Nauchno – Isseledivatel Skogo Instituta, 88, 3-23.
- Machado, C. E. M. & Abreu, H. C. F. 1952. Notas preliminares sobre a caça e a pesca no Estado de São Paulo – A Pesca no Vale do Paraíba. Boletim de Indústria Animal, 13, 145-160.
- MMA 2008. Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção, Ministério do Meio Ambiente.
- Myers, R. H. 1990. Classical and modern regression with applications, Duxbury Press, Belmont.

- PAN 2011. Plano de ação nacional para a conservação das espécies aquáticas ameaçadas de extinção da Bacia do Rio Paraíba do Sul, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, ICMBio, Brasília.
- Pereira, C. R., Barcellos, L. J. G., Kreutz, L. C., Quevedo, R. M., Ritter, F. & Silva, L. B. 2006. Embryonic and larval development of jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy & Gaimard, 1824, Pisces, Teleostei), a South American catfish. *Brazilian Journal of Biology*, 66, 1057-1063.
- Quinn, G. P. & Keough, M. J. 2002. *Experimental Design and Data Analysis for Biologists*, Cambridge University Press.
- Rurangwa, E., Kime, D. E., Ollevier, F. & Nash, J. P. 2004. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture*, 234, 1-28.
- Rurangwa, E., Roelants, I., Huyskens, G., Ebrahimi, M., Kime, D. E. & Ollevier, F. 1998. The minimum effective spermatozoa : egg ratio for artificial insemination and the effects of mercury on sperm motility and fertilization ability in *Clarias gariepinus*. *Journal of Fish Biology*, 53, 402-413.
- Sanches, E. A., Baggio, D. M., Piana, P. A., de Souza, B. E. & Bombardelli, R. A. 2011a. Artificial fertilization of oocytes and sperm activation in pacu: effects of the spermatozoa:oocyte ratio, water volume, and in natura semen preservation. *Revista Brasileira De Zootecnia-Brazilian Journal of Animal Science*, 40, 1-6.
- Sanches, E. A., Bombardelli, R. A., Baggio, D. M. & de Souza, B. E. 2009. Insemination dose for artificial fertilization of dourado oocytes. *Revista Brasileira De Zootecnia-Brazilian Journal of Animal Science*, 38, 2091-2098.
- Sanches, E. A., Bombardelli, R. A., Marcos, R. M., Neumann, G., de Toledo, C. P. R. & Romagosa, E. 2010. Sperm motility of *Rhamdia quelen* studied using computer-assisted analysis by open-source software. *Aquaculture Research*, 42, 153-156.
- Sanches, E. A., Marcos, R. M., Baggio, D. M., Tessaro, L., Balen, R. E. & Bombardelli, R. A. 2011b. Sperm concentration estimate of fish semen

using spermatocrit method. *Revista Brasileira De Zootecnia-Brazilian Journal of Animal Science*, 40, 1163-1167.

- Sanches, E. A., Okawara, R. Y., Caneppele, D., Bombardelli, R. A. & Romagosa, E. 2011c. Sperm motility parameters of *Steindachneridion parahybae* studied by means of casa open source software. Pages 1002 in WAS editor. The Annual International Conference of World Aquaculture Society. Natal.
- Shimoda, E., Andrade, D. R., Vidal, M. V., Godinho, H. P. & Yasui, G. S. 2007. Determination of the optimum ratio of spermatozoa per oocyte of the piabanha *Brycon insignis*. *Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinaria E Zootecnia*, 59, 877-882.
- Simpson, A. C. 1951. The fecundity of the plaice. *Fish Investigation*, 17, 1-27.
- Stasoft, I. 2005. Statistic (data analysis software system) Version 7.1, STATSOFT.
- Streit Jr., D. P., Benites, C., Moraes, G. V., Ribeiro, R. P., Sakaguti, E. S. & Caldieri, R. F. 2006. Características qualitativas do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) após indução hormonal. *Bioscience Journal*, 22, 119-125.
- Streit Jr., D. P., Moraes, G. V., Ribeiro, R. P., Povh, J. A., Souza, E. D. & Oliveira, C. A. L. 2004. Avaliação de diferentes técnicas para coloração de sêmen de peixes. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar*, 7, 157-162.
- Tuset, V. M., Dietrich, G. J., Wojtczak, M., Slowinska, M., de Monserrat, J. & Ciereszko, A. 2008. Relationships between morphology, motility and fertilization capacity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Journal of Applied Ichthyology*, 24, 393-397.
- Weingartner, M. 2010. Aperfeiçoamento das técnicas de fertilização de ovócitos de dourado, *Salminus brasiliensis* Cuvier, 1816 (Characiformes: Characidae), utilizando sêmen fresco e congelado durante o processo de reprodução induzida. 81p. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

- Wilson-Leedy, J. G. & Ingermann, R. L. 2006. Manual for CASA plugin for Image J.
- Wilson-Leedy, J. G. & Ingermann, R. L. 2007. Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. *Theriogenology*, 67, 661-672.
- Yasui, G. S., Arias-Rodriguez, L., Fujimoto, T. & Arai, K. 2009. A sperm cryopreservation protocol for the loach *Misgurnus anguillicaudatus* and its applicability for other related species. *Animal Reproduction Science*, 116, 335-345.
- Yasui, G. S., Fujimoto, T., Arias-Rodriguez, L., Takagi, Y. & Arai, K. 2012. The effect of ions and cryoprotectants upon sperm motility and fertilization success in the loach *Misgurnus anguillicaudatus*. *Aquaculture*, 344, 147-152.

6) ARTIGO 03: ESTOCAGEM DE OVÓCITOS DE *Steindachneridion parahybae* EM DIFERENTES TEMPERATURAS

ESTOCAGEM DE OVÓCITOS DE *Steindachneridion parahybae* EM DIFERENTES TEMPERATURAS

6.1) Resumo

Objetivou-se avaliar a temperatura e o tempo de exposição de ovócitos de surubim-do-Paraíba, *Steindachneridion parahybae* sobre os valores das taxas de fertilização, eclosão e larvas normais. Para tanto, realizaram-se dois ensaios: (1) avaliou-se os valores das taxas de fertilização de ovócitos expostos nas temperaturas de 5; 15; 28 (ambiente) e 35°C nos tempos após a liberação de: 15 (controle), 115, 235 e 355min. com três repetições cada; (2) avaliou-se os valores das taxas de fertilização, eclosão e larvas normais de ovócitos expostos nas temperaturas de 14, 17 e 20°C durante 20 (controle), 50, 80 e 110min. pós-extrusão. Foi considerado como uma unidade experimental uma incubadora (1,5L) contendo 195 ± 38 e 321 ± 47 ovócitos para o 1º e 2º ensaios, respectivamente. Os ovócitos foram estocados em tubos eppendorfs (2,0mL), para cada temperatura de exposição. Para o 1º ensaio verificou-se efeito ($P<0,05$) quadrático para o tempo e temperatura de exposição, com maiores taxas de fertilização constatadas na temperatura teórica de 17,25°C. Os maiores valores das taxas de fertilização ($P<0,05$) foram obtidos no tratamento controle (15min, 28°C), com $74,34\pm 5,48\%$, indicando perda de viabilidade em função do tempo pós-coleta. Para o 2º ensaio, foi observado redução ($P<0,05$) das taxas de fertilização nas temperaturas e tempos testados, entretanto, para as taxas de eclosão em 110 minutos apenas a temperatura de 14°C proporcionou menores valores ($P<0,05$). A temperatura de 14°C proporcionou redução de larvas normais ($P<0,05$). Sugere-se a fertilização artificial de ovócitos de *S. parahybae* logo após sua coleta e, caso haja a necessidade de estocagem, que seja realizada entre 17 e 20°C.

Palavra-chave: exposição de gametas, fertilização artificial, larva, ovos, peixes, surubim-do-paraiba

STORAGE OF *Steindachneridion parahybae* OOCYTES IN DIFFERENT TEMPERATURES

6.2) Abstract

The aim of this study was to evaluate the effects of temperature and incubation period upon the storage ability of surubim-do-Paraíba, *Steindachneridion parahybae*, oocytes, by means of fertilization, hatching and normal larvae rates. Two experiments were performed: (1) evaluation of fertilization rates of oocytes stored at 5, 15, 28 (environment) and 35°C during 15 (control), 115, 235 and 355min. after sampling (2) evaluation of fertilization, hatching and normal larvae rates derived from oocytes stored at 14, 17 and 20°C for 20 (control), 50, 80 and 110min. after sampling. Each 1,5L incubator (containing 195 ± 38 and 321 ± 47 oocytes for the 1st and 2nd trials, respectively) was considered an experimental unit. Oocytes were placed in 2.0mL minitubes eppendorfs for each experiment. Was found a quadratic effect ($P<0.05$) of time and temperature of exposure for the 1st experiment. The highest values of fertilization rate ($P<0.05$) were obtained in the control treatment (15 min, 28°C), with $74.34\pm5.48\%$, indicating decrease on the viability at increasing of time post-collection. In addition, the highest rates were found in the estimated temperature of 17.25°C. For the 2nd experiment, a reduction ($P<0.05$) of fertilization rates was found in the temperatures and times tested, however, for the hatching rates in just 110 minutes at a temperature of 14°C gave lower values ($P<0.05$). The temperature of 14°C caused a reduction of normal larvae ($P<0.05$). It is suggested that the artificial fertilization of eggs of *S. parahybae* is optimized immediately after collection and, if there is a need for storage, which is performed between 17 and 20°C.

Key-words: artificial fertilization, egg, fish, gametes exposure, larva, surubim-do-paraiba

6.3) Introdução

A utilização da propagação artificial é um dos principais aspectos para a intensificação da produção piscícola (Romagosa 2006). Para tal, devem-se utilizar gametas de qualidade promovendo máxima fertilização e, subsequentemente, desenvolvimento normal do embrião (Bobe & Labbe 2010; Romagosa 2008). Uma das formas de se determinar o potencial de desenvolvimento é estimá-lo por meio de medidas/estimativas diretas (tamanho, fertilização, eclosão, percentual de larvas normais) (Bobe & Labbe 2010; Brooks et al. 1997; Coward et al. 2002).

De um modo geral, encontram-se poucas informações na literatura mencionando o tempo de viabilidade *ex situ* dos gametas da ictiofauna neotropical. O procedimento recomendado é a rápida homogeneização dos gametas (fertilização artificial, por extrusão) baseada na hipótese de que os ovócitos e o sêmen podem perder a viabilidade ao longo do tempo (Sanches et al. 2011b; 2011c). Neste sentido, é importante conhecer os mecanismos de perda de viabilidade e desenvolver métodos que garantam a longevidade dos gametas visando à otimização do uso racional dos reprodutores e das técnicas de propagação artificial de peixes (Babin et al. 2007; Fornari et al. 2011; Rana 1995).

A temperatura é o principal fator que parece afetar a qualidade dos ovócitos estocados *in vitro* (Sanches et al. 2011b), sendo a estocagem realizada em temperaturas próximas a zero para reduzir sua carga metabólica (Rana 1995). O resfriamento em curto-prazo é uma técnica simples, de custos reduzidos e facilmente aplicados em sistemas comerciais de cultivo (Sanches et al. 2011b). Além disso, possibilita o máximo aproveitamento dos gametas em ocasiões em que ocorre assincronismo dos reprodutores após utilização de terapias hormonais (Rana 1995).

O surubim-do-Paraíba, *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes: Pimelodidae), é um bagre cinza com pintas escuras ao longo do corpo (Anexo1-A), endêmico da bacia do rio Paraíba do Sul (Garavello 2005). Esta espécie de peixe vem sofrendo explorações desordenadas, desde a década de 50, onde foram capturadas aproximadamente 2.000kg ano⁻¹ (Machado & Abreu 1952). Atualmente, esta espécie encontra-se na lista vermelha da fauna brasileira

ameaçada de extinção (IBGE 2009; MMA 2008) e é definida como umas das espécies que está em estado crítico de extinção (IBGE 2009), sendo considerada regionalmente extinta no Estado de São Paulo (Caneppele 2011; Hilsdorf & Petreire Jr 2002; Honji et al. 2009). Assim, devem ser adotadas estratégias para a propagação artificial, incluindo o manejo de gametas para a fertilização *in vitro*.

O objetivo foi determinar o efeito de diferentes temperaturas e tempo na estocagem de ovócitos de *S. parahybae* estocados *in natura*.

6.4) Material e Métodos

O experimento foi conduzido na Estação de Hidrobiologia e Aquicultura da Companhia Energética de São Paulo - EHA/CESP, Paraibuna/SP/BR (23°24'54''S; 45°35'52''W), utilizando-se reprodutores de *S. parahybae* selvagens (F0) e provenientes de reprodução induzida realizada na própria estação a partir de exemplares selvagens (F1).

Os peixes foram mantidos em dois tanques escavados revestidos de concreto e fundo de areia (200m²), receberam ração comercial extrusada para peixes carnívoros, com 40% de proteína bruta na proporção de 5% da biomassa semana⁻¹, sendo à refeição fornecida em duas porções às 08h00min e 16h00min em três dias da semana.

Para avaliar os efeitos da temperatura sobre os ovócitos pós-extrusão realizaram-se dois ensaios experimentais: 1º) quatro temperaturas durante 355 minutos; 2º) três temperaturas durante 110 minutos. O segundo ensaio foi realizado com intuito de complementar os resultados obtidos no primeiro.

No período reprodutivo (out-fev/2010-2011 e out-fev/2011-2012) foram selecionados reprodutores aptos à desova no próprio tanque conforme Caneppele et al. (2009). Nos machos verificou-se a liberação de sêmen e as fêmeas avaliadas conforme características externas como, ventre ligeiramente abaulado, liberação de uma pequena parcela de ovócitos após leve pressão abdominal. Após a seleção, os reprodutores foram transferidos para o laboratório, onde foram

pesados e separados em aquários (500L), dotadas de aeração, permanecendo neste ambiente durante o tempo de manipulação hormonal e extrusão (~24h).

Para o 1º ensaio utilizou-se uma amostra composta (*pool*) de ovócitos provenientes de três fêmeas (1.400±600g) sendo duas F0 e uma F1 e três machos F1 (607±32g). Para o 2º ensaio foi utilizado outro *pool* de ovócitos provenientes de duas fêmeas F0 (2.450±212g) e de sêmen de quatro machos F0 (2.133±635g).

Após a pesagem, foi realizada a indução hormonal das fêmeas por meio de aplicação de extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC) diluídas em soro fisiológico (0,9% de NaCl), em duas dosagens (0,5 e 5,0 mg de EBHC kg⁻¹), em um intervalo de 12 horas (Caneppele et al. 2009). Os machos não foram submetidos ao processo de indução hormonal (Caneppele 2011).

Os ovócitos foram coletados somente quando constatado fácil liberação a partir de leve pressão abdominal. A coleta dos gametas foi realizada após um período de 240 (9,8h a 24,56±0,44°C) e 300 horas-grau (11,9h a 25,11±3,39°C), para o 1º e 2º ensaio, respectivamente (Caneppele et al. 2009). As coletas foram realizadas a partir de massagem abdominal no sentido crânio-caudal (por extrusão). A coleta do sêmen foi realizada 15 minutos antes dos ovócitos, a fim de estimar sua qualidade (Sanches et al. 2011b).

A qualidade espermática foi estimada por meio das análises espermáticas computadorizadas utilizando o *software* IMAGEJ (*National Institutes of Health, USA, <http://rsbweb.nih.gov/ij/>*) por meio do *plugin* CASA (*University of California and Howard Hughes Medical Institute, USA, <http://rsbweb.nih.gov/ij/plugins/casa.html>*) conforme Wilson-Leedy & Ingermann (2007) e Sanches et al. (2010). Os parâmetros dos valores das taxas de motilidade, velocidade curvilínea, velocidade em linha reta e retilinearidade foram avaliados em dois momentos, no início (imediatamente após a coleta) e ao fim do tempo de exposição dos ovócitos (correspondendo aos tempos de 375 e 120 minutos pós-coleta para o 1º e 2º ensaios, respectivamente).

Além dos parâmetros espermáticos de motilidade, avaliou-se para cada ensaio o volume de sêmen liberado e a concentração espermática utilizando-se a contagem em câmara hematimétrica de Neubauer (Sanches et al. 2011a)

Para o 1º ensaio utilizou-se um delineamento experimental fatorial (4×3) considerando-se a exposição dos ovócitos após a coleta nas temperaturas de 5; 15; 28 (ambiente) e 35°C nos tempos de 115; 235 e 355 minutos, além de um tratamento controle constituído pela fertilização artificial à 15 minutos após a extrusão na temperatura ambiente de 28°C. Todas combinações experimentais foram realizadas em triplicata, totalizando 39 unidades experimentais. Foi considerado como uma unidade experimental uma incubadora (1,5L) contendo 195 ± 38 ovócitos, fertilizados com 50µL de sêmen e 5mL de água do sistema de incubação ($25,95 \pm 1,72^\circ\text{C}$; $7,32 \pm 0,17$ de pH; $6,30 \pm 1,00$ mg de oxigênio dissolvido L^{-1}).

O 2º ensaio foi realizado utilizando os resultados obtidos no 1º ensaio, a partir de então, determinou-se as temperaturas e os tempos testados no 2º ensaio. Utilizou-se um delineamento experimental fatorial (3×3) considerando-se as temperaturas de 14; 17 e 20°C e o tempo de exposição dos ovócitos após a coleta de 50; 80 e 110 minutos, além de um tratamento controle constituído pela fertilização de ovócitos em 20 minutos após a extrusão em temperatura ambiente de 23°C (30 unidades experimentais). Foi considerado como uma unidade experimental uma incubadora (1,5L) contendo 321 ± 47 ovócitos, fertilizados com 100µL de sêmen e 10mL de água do sistema de incubação ($22,07 \pm 0,28^\circ\text{C}$; $6,96 \pm 0,24$ de pH; $6,89 \pm 0,34$ mg de oxigênio dissolvido L^{-1}).

Para cada tratamento foram utilizados ovócitos provenientes do “pool” dos ovócitos fertilizados com o “pool” de sêmen conservados à temperatura ambiente durante o tempo de experimento.

Para o 1º ensaio utilizou-se como sistemas de resfriamento dois refrigeradores contendo termostato ($\pm 1,0^\circ\text{C}$) um a 5°C e outro a 15°C. A temperatura de 28°C foi utilizada a temperatura ambiente (interior do laboratório). Para o sistema de aquecimento com temperatura de 35°C foi utilizado um sistema de termostato ($\pm 1,0^\circ\text{C}$) instalado em uma caixa de madeira e aquecido por meio de lâmpada incandescente (240W). As temperaturas foram monitoradas frequentemente, por meio de termômetros de mercúrio (máxima e mínima). Os ovócitos foram adicionados em tubos eppendorfs (2,0mL) fechados e mantidos em suportes de isopor e, posteriormente, submetidos aos seus respectivos sistemas de controle de temperatura.

No 2º ensaio utilizaram-se três sistemas de resfriamento da água composto por caixas de isopor contendo água e gelo. A temperatura foi mantida e monitorada com auxílio de termômetro digital (máxima e mínima) para os três sistemas. Neste caso, os ovócitos foram adicionados em tubos eppendorfs (2,0 mL), estes foram fechados e submersos em água para exposição nas temperaturas propostas.

O efeito das temperaturas de estocagem foi determinado apenas com base nas estimativas dos valores das taxas de fertilização dos ovócitos para o 1º ensaio, sendo considerado como experimento piloto. Para o 2º ensaio, avaliou-se os valores das taxas de fertilização de ovócitos, eclosão dos ovos e percentual de larvas normais.

Os percentuais de fertilização obtidas no 1º ensaio foram submetidos à análise de regressão do modelo de superfície de resposta. As possíveis influências do tempo de exposição (T), temperatura de exposição (TE) e sobre as taxas de fertilização (TF) foram avaliadas por meio do modelo de superfície de resposta:

$$TF = \theta_0 + \theta_1 T + \theta_2 TE + \theta_3 (T * TE) + \theta_4 (T)^2 + \theta_5 (TE)^2 + \epsilon$$

onde: θ_i = constantes; ϵ = erro com $\sim N(0, \sigma^2)$

Os parâmetros de ordens superiores não significativos ($P > 0,05$) foram removidos progressivamente pelo método *backward stepwise*. Em caso de efeito significativo do modelo de superfície de resposta realizou-se derivadas parciais (Quinn & Keough 2002) do modelo estatístico para obtenção da linha de máximo. Além da análise de regressão realizou-se para os valores das taxas de fertilização obtidas no primeiro ensaio, a análise de variância fatorial (*factorial ANOVA*) ao mesmo nível de significância e, em caso, de efeito aplicou-se o teste de comparação de médias de Duncan.

As taxas de fertilização, eclosão e larvas normais obtidas no 2º ensaio foram submetidas à análise de variância de um fator (*one-way ANOVA*) ao nível de 5% de significância, para tanto, considerou-se como um fator a combinação de temperatura *versus* tempo de exposição. Em caso de efeito significativo aplicou-se o teste de comparação de médias de Duncan ao mesmo nível de significância. Os parâmetros seminais obtidos no início e no fim de cada ensaio foram

submetidos à análise de variância de um fator (*one-way ANOVA*) ao nível de 5% de significância e, em caso, de efeito aplicou-se o teste de comparação de médias de Duncan.

As análises estatísticas foram realizadas pelo *software Statistica*® (Stasoft 2005). Os pressupostos foram checados nos resíduos conforme sugerido por Myers (1990) e Quin & Keough (2002).

6.5) Resultados

No 1º ensaio as fêmeas liberaram $29,44 \pm 13,38$ g de ovócitos, com 278 ovócitos g^{-1} , correspondendo à 6.145 ± 2.200 ovócitos kg^{-1} . No 2º ensaio constatou-se a liberação de $64,21 \pm 3,60$ g, com 294 ovócitos g^{-1} correspondendo à 7.752 ± 1.103 ovócitos kg^{-1} .

Observou-se o efeito do tempo após coleta ($P < 0,05$) apenas para a velocidade curvilínea no 1º ensaio (Tabela 1). Para os demais parâmetros espermáticos não foi verificado efeito ($P > 0,05$) do tempo de exposição em temperatura ambiente (Tabela 1).

As taxas de fertilização obtidas no 1º ensaio apresentaram efeito quadrático ($P < 0,05$) para o tempo e a temperatura de exposição (Figura 1). Observou-se que a temperatura teórica que proporcionou maiores resultados foi de $17,25^{\circ}C$ desde o início (tempo zero) e final de exposição de 355 minutos (Figura 1).

Tabela 1. Parâmetros seminais e espermáticos (média±desvio padrão) de *Steindachneridion parahybae* avaliados no início e no final dos dois ensaios experimentais.

Parâmetros	Ensaio 01		Ensaio 02	
	Início	Final01	Início	Final02
MOT(%)	65,23±13,91	72,06±8,58	52,23±18,55	45,06±13,95
VCL ($\mu\text{m s}^{-1}$)*	109,78±9,27 ^a	88,05±6,32 ^b	62,13±13,41	64,70±6,16
VLR ($\mu\text{m s}^{-1}$)	73,18±6,22	60,42±11,01	26,25±6,07	28,49±6,72
RET (%)	89,22±2,25	92,28±1,54	83,71±3,64	82,25±4,39
VOL (mL)	7,63±3,90		10,15±4,49	
CSPZ (spz mL ⁻¹)	2,28x10 ⁹		34,68x10 ⁹	

Início=imediatamente após a coleta; Final01=análise realizada 375min após coleta; Final02=Análise realizada 120min após coleta. *Letras diferentes na mesma linha indicam $P<0,05$ conforme com o teste de Duncan. MOT=taxas de motilidade, VCL=velocidade curvilinear, VLR=velocidade em linha reta, RET=retilinearidade, VOL=Volume de sêmen liberado, CSPZ=concentração espermática, SPZ= espermatozoides.

No 1º ensaio os valores das taxas de fertilização obtidas nos tempos testados foram diferentes em relação ao controle ($P<0,05$), entretanto, a maior redução da qualidade dos ovócitos é evidente em temperaturas extremas (5 e 35°C) (Figura 2). Apesar da maior redução dos valores de fertilização em 115 minutos com relação à temperatura de 28°C, a temperatura de 15°C proporcionou maiores taxas no tempo de 235 e 355 minutos (Figura 2).

Para o 2º ensaio verificou-se o efeito ($P<0,05$) do tempo e temperatura sobre a fertilização (Figura 3), eclosão (Figura 4) e larvas normais (Figura 5). Constatou-se redução da fertilização após o início da exposição (50min) nas diferentes temperaturas testadas, entretanto, observaram-se em 80min a 14°C valores estatisticamente semelhantes aos do controle, assim como em 110min na temperatura de 17°C (Figura 3).

As taxas de eclosão apresentaram-se semelhantes entre os tratamentos aplicados e o controle. Em 110 minutos de exposição nas temperaturas de 17 e 20°C verificaram-se taxas iguais ($P>0,05$) quando comparadas ao tratamento controle. Houve redução das taxas de eclosão após 110min de exposição dos ovócitos quando submetidos à 14°C (Figura 4).

Para o percentual de larvas normais constatou-se que 14°C proporcionou maiores percentuais de larvas defeituosas ($P<0,05$), entretanto, para 17 e 20°C os valores foram iguais para os tempos testados (Figura 5).

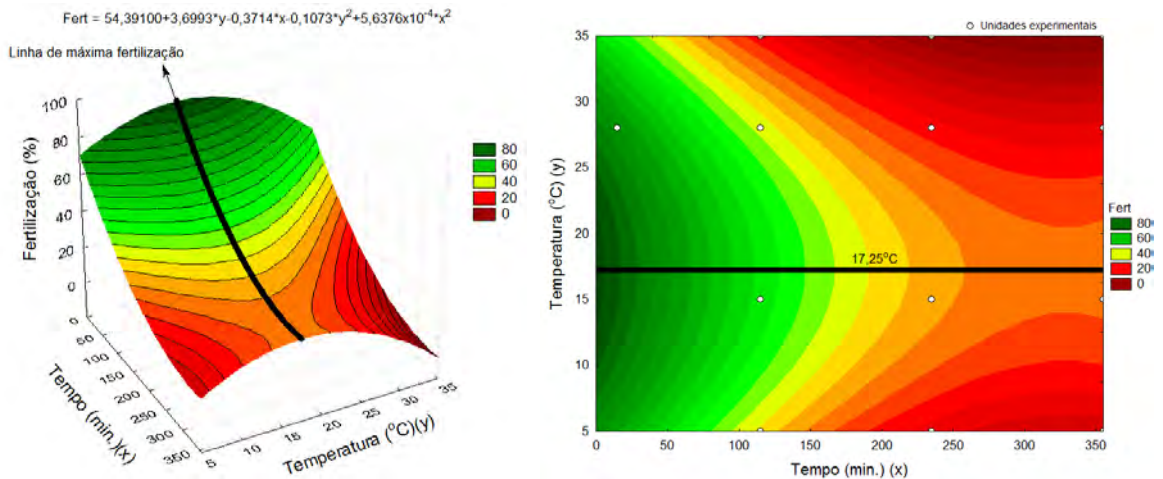


Figura 1. Superfície de resposta das taxas de fertilização (Fert) de ovócitos de *Steindachneridion parahybae* em relação à temperatura de exposição durante 355 minutos. Esquerda – representação gráfica em 3D. Direita – representação gráfica em 2D.

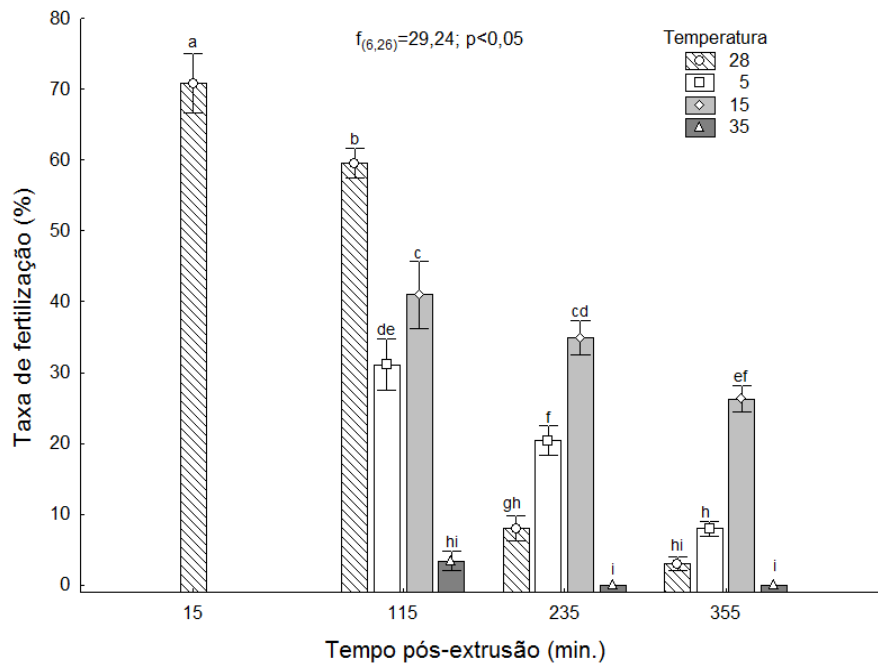


Figura 2. Taxas de fertilização de ovócitos de *Steindachneridion parahybae* em relação à temperatura de exposição durante 355 minutos. Letras diferentes nas colunas indicam ($P<0,05$) de acordo com o teste de comparação de médias de Duncan.

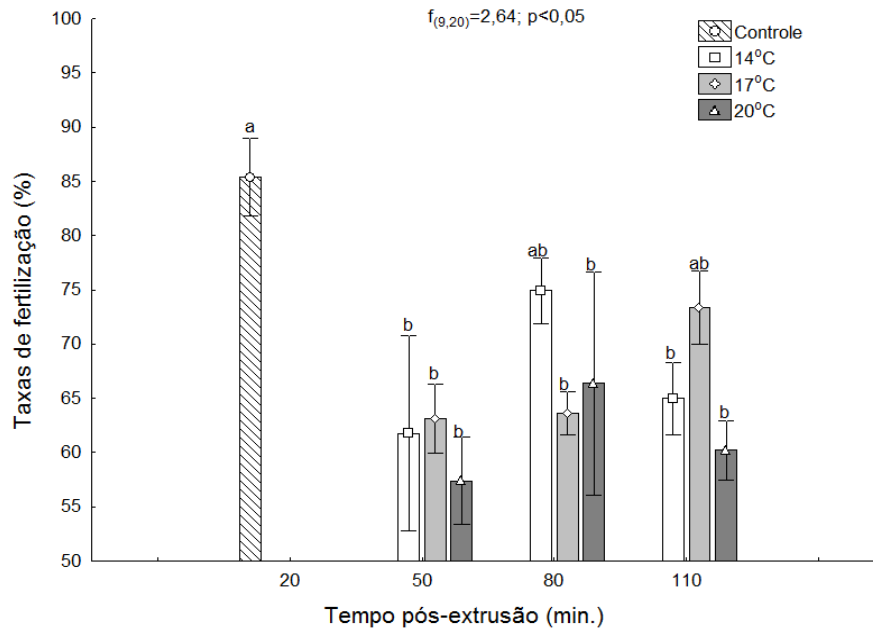


Figura 3. Taxas de fertilização de ovócitos de *Steindachneridion parahybae* expostos em três temperaturas durante 110 minutos. Letras diferentes nas colunas indicam ($P<0,05$) de acordo com o teste de comparação de médias de Duncan.

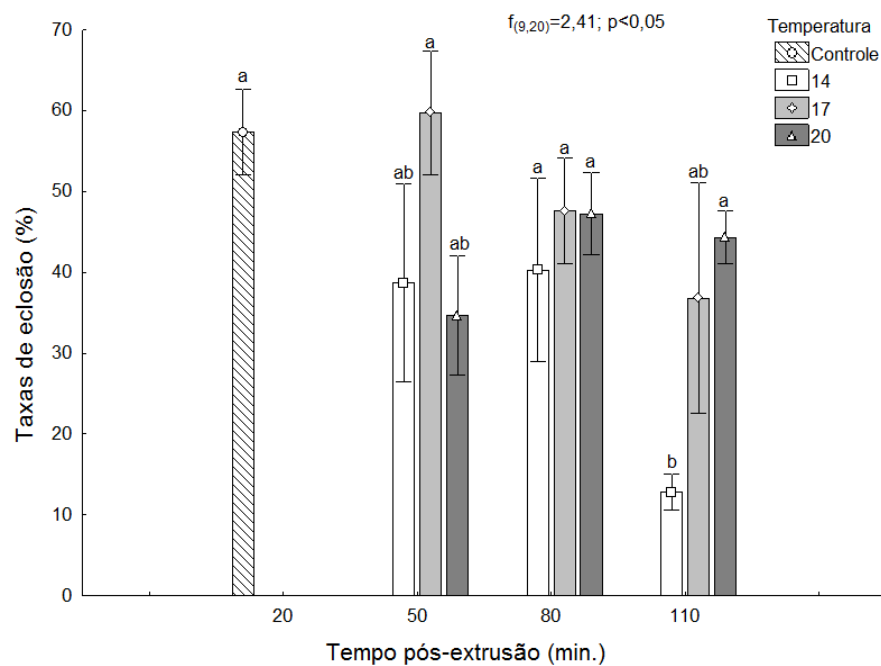


Figura 4. Taxas de eclosão de ovos a partir de exposição de ovócitos de *Steindachneridion parahybae* em três temperaturas durante 110 minutos. Letras diferentes nas colunas indicam ($P<0,05$) de acordo com o teste de comparação de médias de Duncan.

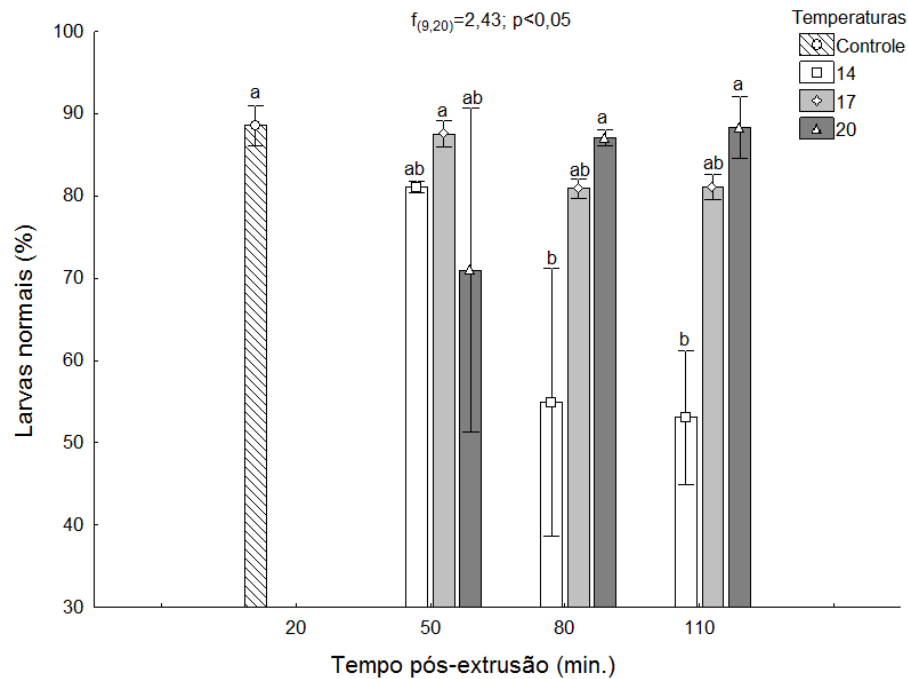


Figura 5. Taxas de larvas normais a partir de exposição de ovócitos de *Steindachneridion parahybae* em três temperaturas durante 110 minutos. Letras diferentes nas colunas indicam ($P < 0,05$) de acordo com o teste de comparação de médias de Duncan.

6.6) Discussão

A produção de ovócitos obtida no presente experimento foi inferior à verificada por Caneppele et al. (2009) para o *S. parahybae* com produção entre 9.000 e 10.000 ovócitos.kg⁻¹. Entretanto, é sabido que a quantidade de ovócitos de peixes nativos sul-americanos pode variar conforme a época do ano, estágio de maturação, estado nutricional e hormônios utilizados nos reprodutores (Romagosa 2008; 2010).

A produção de sêmen e concentração espermática foi semelhante à observada por Caneppele (2011) com exemplares de *S. parahybae* não-induzidos hormonalmente, com 9,39±1,19mL de sêmen liberado e com concentração de 9,39x10⁹±0,88x10⁹ espermatozóides mL⁻¹. Os parâmetros espermáticos avaliados apresentaram resultados inferiores aos encontrados por Sanches et al. (2011d) para o *S. parahybae* em sêmen fresco, com 89,11±1,25%, 107,23±2,35µm s⁻¹, 77,08±3,56µm s⁻¹ para motilidade, velocidade curvilínea e velocidade em linha reta, respectivamente. Entretanto, estes resultados possivelmente não interferiram

no processo de fertilização, visto que, mesmo com valores menores no início do 2º ensaio as taxas de fertilização do controle foram superiores ($85,37 \pm 6,16\%$). Neste mesmo sentido, a redução da velocidade curvilínea no 1º ensaio após 375 minutos da coleta provavelmente, não influenciou sobre os valores das taxas de fertilização.

Os valores das taxas de fertilização obtidas no 1º ensaio reduziram em função do tempo pós-coleta, e os maiores resultados foram obtidos imediatamente após a extrusão. Caso haja necessidade de conservação dos ovócitos, estes devem ser estocados respeitando a linha teórica de máxima fertilização. Esta linha obtida no 1º ensaio sugere a temperatura teórica de $17,25^\circ\text{C}$ como temperatura indicada entre o tempo experimental testado, corroborando os resultados do 2º ensaio, em que as temperaturas de 17°C e 20°C proporcionaram melhores condições para a exposição *in natura* dos ovócitos. No 1º ensaio, embora a temperatura de 15°C ter proporcionado a redução mais rápida dos valores das taxas de fertilização em comparação à temperatura de 28°C , ela proporcionou maiores valores a partir de 235 minutos quando comparada com as demais. A temperatura de 35°C proporcionou rápida queda dos valores das taxas de fertilização indicando que em elevadas temperaturas ocorre uma maior degradação dos ovócitos e, conseqüentemente, redução dos valores das taxas de fertilização.

Em outras espécies de peixes nativos sul-americanas foram constatadas a relação da viabilidade *ex-situ* dos ovócitos por curto prazo, como é o caso do *Salminus brasiliensis*, que apresentou redução da viabilidade dos ovócitos na temperatura de $22,8^\circ\text{C}$ após 30 minutos de exposição (Weingartner 2010). Além disso, Weingartner (2010) observou que a qualidade dos ovócitos provenientes de diferentes fêmeas interfere no tempo de viabilidade *ex-situ*, pois ovócitos melhores apresentam maior resistência ao tempo de exposição. Para ovócitos de *Prochilodus marginatus*, Rizzo et al. (2003) verificaram que a temperatura de 26°C promove maior viabilidade dos ovócitos do que em 18°C , bem como, a estocagem *ex-situ* em relação à *in-situ*, entretanto, a partir de 60 e 30 minutos em 26°C e 18°C ocorre redução das taxas de fertilização, respectivamente. Além disso, os autores verificaram que as quedas da viabilidade em ambas as temperaturas não estão relacionadas ao fechamento da micrópila, mas sim, às mudanças da

organização espacial dos filamentos do citoesqueleto dos ovócitos. Estas mudanças não interferem diretamente na fertilização, mas prejudicam o desenvolvimento embrionário, levando à morte. Os diferentes comportamentos da viabilidade *ex-situ* de ovócitos *in-natura* para as diferentes espécies tropicais podem estar relacionada às diferentes composições citoquímicas dos ovócitos que as espécies apresentam (Bazzoli & Rizzo 1990), entretanto, estudos devem ser realizados para elucidar estes efeitos.

Diferentes resultados da exposição dos ovócitos a curto-prazo também foram examinados em espécies de peixes temperados. Para ovócitos *Psetta máxima* expostos em três temperaturas e em diferentes condições contendo oxigênio, ar atmosférico e antibióticos Suquet et al. (1999) não verificaram diferenças da temperatura para os valores das taxas de fertilização, entretanto, as taxas de eclosão foram ligeiramente superiores em temperaturas de 13 e 8°C ao invés de 3°C. Em *Cyprinus carpio* (koi), Rothbard et al. (1996) observaram mais de 50% de embriões e larvas vivas quando os ovócitos foram expostos durante 6h em 22-24°C, enquanto que temperatura entre 6-9°C a sobrevivência não ultrapassou os 30%. Para ovócitos de *Acipenser persicus* a temperatura de 18°C apresentou condição de estocagem mais propícia ao invés de 4°C (Sohrabnezhad et al. 2006). Apesar destes estudos indicarem alguns resultados satisfatórios, contradições entre as metodologias empregadas na estocagem de ovócitos de espécies temperadas e tropicais são observadas, sendo que investigações práticas e objetivas são necessárias para encontrar a condição ideal de estocagem para cada espécie.

A utilização de fluido ovariano ou fluido artificial e adição de antibióticos foram aplicados para obtenção de relativo sucesso na preservação em curto prazo de ovos de *Oncorhynchus mykiss* (Goetz & Coffman 2000; Holcomb et al. 2005; Niksirat et al. 2007). Entretanto, o efeito destes componentes sobre os ovócitos de *S. parahybae* ainda é desconhecido e devem ser estudados a fim de aumentar a viabilidade *ex situ*.

Sanches et al., (2011b) verificaram que os ovócitos expostos à 35°C ficavam envoltos por um denso fluído, e quando submetidos à temperatura de 5°C, adquiriam o aspecto de desidratação. Os autores sugerem que durante o processo de exposição em 35°C, os ovócitos podem ter se degenerado, fechando

a micrópila e impedindo a entrada dos espermatozoides. O ressecamento, por sua vez, pode ter originado mudanças dos filamentos do citoesqueleto e, posteriormente, interferido na fertilização, como observado por Rizzo et al., (2003).

O percentual de larvas normais registradas no 2º ensaio foi menor em 14°C do que em 17 e 20°C, indicando que as temperaturas mais baixas proporcionaram menores taxas de eclosão, todavia, as larvas que eclodem apresentam-se com menores valores das taxas de larvas normais e com menos chances de atingir a fase adulta.

Visto que, o sêmen não perde a qualidade em curto-tempo de exposição em temperatura ambiente e, os ovócitos perdem rapidamente sua viabilidade após coleta, sugere-se em rotinas de reprodução artificial de *S. parahybae* a realização da coleta seminal antes que os ovócitos. Resultados fundamentais em rotinas de reprodução artificial da espécie, pois podem possibilitar maior aproveitamento do material fertilizante, principalmente em laboratórios em que a amplitude térmica durante o período reprodutivo seja ampla. Além disso, podem ser aplicados em transporte a curtas distâncias, em ocasiões em que não ocorra sincronia da ovulação e espermição, e também, em rotinas experimentais com inúmeras réplicas a serem realizadas ao mesmo tempo.

6.7) Conclusão

Os ovócitos de surubim-do-Paraíba, *Steindachneridion parahybae*, perdem a qualidade ao longo do tempo após a coleta sendo, portanto, recomendada a fertilização artificial imediatamente após a coleta. Sugere-se a coleta do sêmen antes que os ovócitos. Caso haja a necessidade de estocagem de ovócitos, esta deve ser realizada entre 17 e 20°C.

6.8) Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (nº 478347/2009-0), ao Fundo de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (nº 2009/18609-6 e 2010/02818-5) e à Companhia Energética de São Paulo - CESP.

6.9) Referências

- Babin, P., J. Cerdà, and E. Lubzens 2007. The fish oocyte from basic studies to biotechnological applications. Springer, Dordrecht.
- Bazzoli, N., and E. Rizzo. 1990. A comparative cytological and cytochemical study of the oogenesis in ten Brazilian teleost fish species. *European Archives of Biology* **101**:399-410.
- Bobé, J., and C. Labbe. 2010. Egg and sperm quality in fish. *General and Comparative Endocrinology* **165**:535-548.
- Brooks, S., C. R. Tyler, O. Carnevali, K. Coward, and J. P. Sumpter. 1997. Molecular characterisation of ovarian cathepsin D in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gene* **201**:45-54.
- Caneppele, D. 2011. *Steindachneridion parahybae* (STEINDACHNER, 1876) (SILURIFORMES: PIMELODIDAE): produção espermática ao longo de um ciclo reprodutivo. Page 60. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura e Pesca. Instituto de Pesca, APTA-SAA, São Paulo.
- Caneppele, D., R. M. Honji, A. W. S. Hilsdorf, and R. G. Moreira. 2009. Induced spawning of the endangered Neotropical species *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes: Pimelodidae). *Neotropical Ichthyology* **7**:759-762.
- Coward, K., N. R. Bromage, O. Hibbitt, and J. Parrington. 2002. Gamete physiology, fertilization and egg activation in teleost fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **12**:33-58.

- Fornari, D. C., R. P. Ribeiro, D. P. Streit, Jr., L. Vargas, N. M. Lopera Barrero, and G. V. de Moraes. 2011. Freezing injuries in the embryos of *Piaractus mesopotamicus*. *Zygote* **19**:345-350.
- Garavello, J. C. 2005. Revision of genus *Steindachneridion* (Siluriformes: Pimelodidae). *Neotropical Ichthyology* **3**:607-623.
- Goetz, F. W., and M. A. Coffman. 2000. Storage of unfertilized eggs of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in artificial media. *Aquaculture* **184**:267-276.
- Hilsdorf, A. W. S., and M. Petrere Jr. 2002. Conservação de Peixes na Bacia do Rio Paraíba do Sul. *Ciência Hoje* **30**:62-65.
- Holcomb, M., J. G. Cloud, and R. L. Ingermann. 2005. Impact of bacteria on short-term storage of salmonid eggs. *Aquaculture Research* **36**:1555-1561.
- Honji, R. M., D. Caneppele, A. W. S. Hilsdorf, and R. G. Moreira. 2009. Threatened fishes of the world: *Steindachneridion parahybae* (Steindachner, 1877) (Siluriformes: Pimelodidae). *Environmental Biology of Fishes* **85**:207-208.
- IBGE. 2009. Fauna Ameaçada de Extinção, Invertebrados Aquáticos e Peixes – 2009. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.
- Machado, C. E. M., and H. C. F. Abreu. 1952. Notas preliminares sobre a caça e a pesca no Estado de São Paulo – A Pesca no Vale do Paraíba. *Boletim de Indústria Animal* **13**:145-160.
- MMA 2008. Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. Ministério do Meio Ambiente.
- Myers, R. H. 1990. Classical and modern regression with applications. Duxbury Press, Belmont.
- Niksirat, H., K. Sarvi, B. M. Amiri, M. Karami, and A. Hatef. 2007. In vitro storage of unfertilized ova of endangered Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*) in artificial media. *Animal Reproduction Science* **100**:356-363.
- Quinn, G. P., and M. J. Keough 2002. Experimental Design and Data Analysis for Biologists. Cambridge University Press.

- Rana, K. 1995. Preservation of gametes. Pages 53-75. Broodstock management and egg and larval quality. Blackwell Science, London.
- Rizzo, E., H. P. Godinho, and Y. Sato. 2003. Short-term storage of oocytes from the neotropical teleost fish *Prochilodus marginatus*. *Theriogenology* **60**:1059-1070.
- Romagosa, E. 2006. Biologia reprodutiva e fisiologia de peixes em confinamento: o cachara *Pseudoplatystoma fasciatum* como modelo. Pages 108-116 in J. E. P. Cyrino, and E. C. Urbinati, editors. Tópicos Especiais em Biologia Aquática e Aqüicultura. AQUABIO, Jaboticabal.
- Romagosa, E. 2008. Avanços na reprodução de peixes migradores. Pages 1-16 in J. E. P. Cyrino, W. M. Furuya, R. P. Ribeiro, and J. D. Scorvo Filho, editors. Tópicos Especiais em Biologia Aquática e Aquicultura III. AQUABIO, Jaboticabal.
- Romagosa, E. 2010. Reproductive status in females of the Brazilian catfish, *Pseudoplatystoma fasciatum* reared in cages. *Journal of Applied Ichthyology* **26**:806-811.
- Rothbard, S., I. Rubinshtein, and E. Gelman. 1996. Storage of common carp, *Cyprinus carpio* L., eggs for short durations. *Aquaculture Research* **27**:175-181.
- Sanches, E. A., R. A. Bombardelli, R. M. Marcos, G. Neumann, C. P. R. de Toledo, and E. Romagosa. 2010. Sperm motility of *Rhamdia quelen* studied using computer-assisted analysis by open-source software. *Aquaculture Research* **42**:153-156.
- Sanches, E. A., R. M. Marcos, D. M. Baggio, L. Tessaro, R. E. Balen, and R. A. Bombardelli. 2011a. Sperm concentration estimate of fish semen using spermatocrit method. *Revista Brasileira De Zootecnia-Brazilian Journal of Animal Science* **40**:1163-1167.
- Sanches, E. A., G. Neumann, D. M. Baggio, R. A. Bombardelli, P. A. Piana, and E. Romagosa. 2011b. Time and temperature on the storage of oocytes from jundia catfish, *Rhamdia quelen*. *Aquaculture* **319**:453-458.

- Sanches, E. A., G. Neumann, C. P. R. Toledo, R. A. Bombardelli, P. A. Piana, and E. Romagosa. 2011c. Temperature and storage period over spermatid parameters of jundiá, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824). *Aquaculture Research* **published online**:1-8.
- Sanches, E. A., R. Y. Okawara, D. Caneppele, R. A. Bombardelli, and E. Romagosa. 2011d. Sperm motility parameters of *Steindachneridion parahybae* studied by means of casa open source software. Page 1002 in WAS, editor. The Annual International Conference of World Aquaculture Society, Natal.
- Sohrabnezhad, M., M. R. Kalbassi, R. M. Nazari, and M. Bahmani. 2006. Short-term storage of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) ova in artificial media and coelomic fluid. *Journal of Applied Ichthyology* **22**:395-399.
- Stasoft, I. 2005. Statistic (data analysis software system) Version 7.1. STATSOFT.
- Suquet, M., O. Chereguini, M. H. Omnes, I. Rasines, Y. Normant, I. P. Souto, and L. Quemener. 1999. Effect of temperature, volume of ova batches, and addition of a diluent, an antibiotic, oxygen and a protein inhibitor on short-term storage capacities of turbot, *Psetta maxima*, ova. *Aquatic Living Resources* **12**:239-246.
- Weingartner, M. 2010. Aperfeiçoamento das técnicas de fertilização de ovócitos de dourado, *Salminus brasiliensis* Cuvier, 1816 (Characiformes: Characidae), utilizando sêmen fresco e congelado durante o processo de reprodução induzida. Page 81. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- Wilson-Leedy, J. G., and R. L. Ingermann. 2007. Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. *Theriogenology* **67**:661-672.

7) ARTIGO 04: CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS DE *Steindachneridion parahybae* AO LONGO DE 112 HORAS DE ESTOCAGEM EM QUATRO TEMPERATURAS

CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS DE *Steindachneridion parahybae* AO LONGO DE 112 HORAS DE ESTOCAGEM EM QUATRO TEMPERATURAS

7.1) Resumo

Objetivou-se avaliar o efeito da temperatura de estocagem de sêmen de *Steindachneridion parahybae* sobre a qualidade espermática durante 112 horas de exposição *in natura*. O sêmen proveniente de cinco machos foi distribuído em um delineamento experimental em esquema fatorial (12×4). Os fatores foram constituídos pelos tempos de exposição do sêmen de: 0 (controle); 1; 2; 4, 8, 16, 24, 36, 48, 64, 88 e 112 horas pós-coleta, nas temperaturas (Média±DP) de 5,15±3,44; 12,92±1,61 24,38±1,68 e 34,90±1,09°C. Avaliaram-se os seguintes parâmetros espermáticos do sêmen proveniente de cinco machos: taxa de motilidade (MOT), velocidade curvilínea (VCL), velocidade média de deslocamento (VMD) velocidade em linha reta (VLR), retilinearidade (RET), taxa de espermatozoides normais (NOR) e taxa de sobrevivência (SOB). Os parâmetros VCL, VMD e VLR foram agrupados para formação da velocidade espermática (VE) através da análise de componentes principais. Os parâmetros avaliados apresentaram efeito ($P<0,05$) da temperatura e do tempo de exposição. Para os parâmetros, RET, NOR e SOB, foram observados efeitos interativos entre a temperatura e o tempo ($P<0,05$) e para MOT e VE, observou-se efeito quadrático dos fatores ($P<0,05$). Verificou-se entre os parâmetros avaliados, correlação linear de Pearson ($P<0,05$), indicando que MOT, VCL e RET são bons indicadores de qualidade espermática. Constatou-se que o procedimento de resfriamento em temperaturas próximas a 5°C e aquecimento em temperaturas próximas à 35°C é prejudicial aos espermatozoides de *S. parahybae*. Sugere-se, caso haja a necessidade de estocagem de sêmen por curto-período, que seja realizado entre 15 a 25°C.

Palavras-chave: CASA, espermatozoide, estocagem a curto prazo, parâmetros espermáticos, peixe; surubim-do-paraíba

SPERM CHARACTERISTICS OF *Steindachneridion parahybae* ALONG 112 HOURS OF STORAGE AT FOUR TEMPERATURES

7.2) Abstract

The aim of this study was to evaluate the effect of temperature upon the storage of semen from *Steindachneridion parahybae*. Semen from five males was allotted to a factorial experimental design (12×4). The factors consisted of the semen storage period: 0 (control), 1, 2, 4, 8, 16, 24, 36, 48, 64, 88 and 112 hours post-collection, at temperatures (means±SD) of 5.15±3.44, 12.92±1.61 24.38±1.68 and 34.90±1.09°C. The following sperm parameters were evaluated: motility rate (MOT), curvilinear velocity (VCL), average path velocity (VAP) straight line velocity (VSL), straightness (STR), the proportion of normal spermatozoa (NOR) and survival (SOB). The VCL, VAP and VSL were grouped to formation of sperm velocity (SV) by principal components analysis. All sperm parameters showed effects ($P<0.05$) of temperature and exposure time. The parameters STR, NOR and SOB, interactive effects between temperature and time ($P<0.05$) were observed and for MOT and SV a quadratic trend was observed ($P<0.05$). MOT, VCL, and STR correlated significantly with motility parameters and may be used for the prediction of sperm quality. Additionally, cooling procedure at temperatures around 5°C or heating at 35°C is detrimental for the sperm of *S. parahybae*. The sperm quality is optimized immediately after sampling or stored between 15-25°C.

Key-words: CASA, fish, short-term storage, spermatozoa, sperm parameters; surubim-do-Paraíba

7.3) Introdução

A qualidade espermática em peixes pode ser estimada com base nos valores de motilidade, integridade de membrana, integridade de DNA, anormalidades morfológicas, estoques energéticos (Fogli da Silveira et al. 1988; Billard & Cosson 1992; Billard et al. 1995b; Perchec et al. 1995; Rurangwa et al. 2004; Tuset et al. 2008a; Tuset et al. 2008b; Fauvel et al. 2010; Mansour et al. 2011). Baseado na hipótese que o espermatozóide perde qualidade ao longo do tempo após a coleta, são aplicados métodos de estocagem que garantam a longevidade, proporcionando a otimização do uso dos reprodutores e aumentando a eficiência dos procedimentos empregados na propagação artificial (Rana 1995; Marques & Godinho 2004; Babiak et al. 2006a; Sanches et al. 2011c).

A estocagem de sêmen é frequentemente avaliada em peixes nativos por se tratar de uma técnica simples, custos reduzidos e facilmente aplicados em sistemas comerciais de cultivo (Marques & Godinho 2004; Romagosa et al. 2010; Viveiros et al. 2010; Sanches et al. 2011c), podendo ser realizada do sêmen *in natura* (Luz et al. 2001; Carneiro et al. 2006; Sanches et al. 2011a; Sanches et al. 2011c), com suplementação de oxigênio (Marques & Godinho 2004), e com adição de diluidores específicos (Murgas et al. 2004; Maria et al. 2006; Oliveira et al. 2007; Orfão et al. 2010; Viveiros et al. 2010). Além disso, a estocagem de sêmen por curto período possibilita o máximo aproveitamento dos gametas em ocasiões em que ocorre assincronismo dos reprodutores após utilização de terapias hormonais (Rana 1995). Possibilita também o transporte de gametas do campo para laboratórios e entre pisciculturas (Sanches et al. 2011c) e reduz a necessidade de coletas seminais frequentes (Babiak et al. 2006b) principalmente, em espécies de peixes ameaçadas de extinção (Mariante et al. 2011), como é o caso do surubim-do-Paraíba, *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes: Pimelodidae) (Caneppele 2011).

O *S. parahybae* é um bagre cinza com pintas escuras ao longo do corpo (Anexo1-A), endêmico da bacia do rio Paraíba do Sul (Garavello 2005). Esta espécie de peixe vem sofrendo explorações desordenadas, desde a década de 50 onde foram capturadas aproximadamente 2.000kg.ano⁻¹ (Machado & Abreu 1952). Atualmente esta espécie encontra-se na lista da fauna brasileira ameaçada

de extinção (MMA 2008) e é definida como umas das espécies que está em estado crítico de extinção (IBGE 2009), sendo considerada regionalmente extinta no Estado de São Paulo (Hilsdorf & Petrere Jr 2002; Honji et al. 2009). Diante disso, objetivou-se avaliar o efeito de quatro temperaturas de estocagem *ex situ* sobre as características espermáticas de *S. parahybae* durante 112 horas.

7.4) Material e Métodos

O experimento foi conduzido na Estação de Hidrobiologia e Aquicultura da Companhia Energética de São Paulo - EHA/CESP, Paraibuna/SP/BR (23°24'54"S; 45°35'52"W), utilizando-se reprodutores de *S. parahybae* de nove anos de idade e provenientes de reprodução induzida realizada na própria estação a partir de exemplares selvagens (F1).

Durante a fase que antecedeu o período reprodutivo, os peixes utilizados no experimento foram mantidos em dois tanques escavados de paredes de concreto e fundo de areia de 200m² e, receberam quantidades pré-determinadas de ração comercial extrusada para peixes carnívoros, com 40% de proteína bruta na proporção de 5% da biomassa semana⁻¹, sendo à refeição fornecida em duas porções às 08h00min e 16h00min em três dias da semana.

No período reprodutivo (out-fev/2010-2011) foram selecionados no próprio tanque cinco machos aptos à reprodução (Anexo1-C). Verificou-se a liberação de sêmen a partir de leve pressão abdominal (Caneppele et al. 2009). Após a seleção, os reprodutores foram transferidos para o laboratório, onde foram pesados e separados em aquários (500L), dotados de aeração constante. Os peixes não foram submetidos ao processo convencional de indução hormonal (Caneppele 2011). A coleta de sêmen foi realizada individualmente por meio de massagem abdominal no sentido crânio-caudal. Para tanto, os peixes foram secos com panos e papéis toalha. A primeira gota de sêmen liberada foi descartada a fim de evitar contaminação com urina ou fezes. No primeiro sinal de sangue a coleta foi interrompida, para evitar possíveis influências sobre os tratamentos e lesões aos reprodutores. Os parâmetros seminais avaliados foram

o volume liberado, concentração espermática e a osmolaridade do plasma seminal.

O sêmen proveniente dos cinco machos foi distribuído em um delineamento experimental em esquema fatorial (12x4). Os fatores foram constituídos pelos tempos de exposição do sêmen de: 0 (controle); 1; 2; 4, 8, 16, 24, 36, 48, 64, 88 e 112 horas pós-coleta, nas temperaturas de 5,15±3,44; 12,92±1,61; 24,38±1,68 e 34,90±1,09°C (Tabela 1). O sêmen proveniente de cada macho foi considerado como réplica e os parâmetros espermáticos foram avaliados em triplicata para cada macho. Após iniciar o procedimento de estocagem do sêmen de um único macho, realizou-se a coleta seminal do próximo macho, intercalando sequencialmente os horários de análises. Para a exposição do sêmen utilizaram-se microtubos eppendorfs de 1,5mL contendo 0,1mL de sêmen para cada temperatura e instante (n total=225) constituindo uma unidade experimental cada.

Tabela 1. Protocolo experimental empregado para exposição de sêmen *in natura* de *Steindachneridion parahybae* ao longo de 112 horas em quatro temperaturas.

Tempo (h)	Temperaturas de exposição (°C) (média±desvio padrão)			
	5,15±3,44	12,92±1,61	24,38±1,68	34,90±1,09
0			x	
1	x	x	x	x
2	x	x	x	x
4	x	x	x	x
8	x	x	x	x
16	x	x	x	x
24	x	x	x	x
36	x	x	x	x
48	x	x	x	x
64	x	x	x	x
88	x	x	x	x
112	x	x	x	x

Tempo (h) – Tempo de exposição do sêmen; x - combinação dos fatores experimentais utilizado em cada unidade experimental.

Nos ambientes de 5,15±3,44 e 12,92±1,61°C foram utilizados refrigeradores contendo termostato para controle de temperatura. O valor médio da temperatura de 24,38±1,68°C foi considerada a temperatura ambiente (interior

do laboratório). Para o sistema de aquecimento com temperatura de $34,90 \pm 1,09^\circ\text{C}$ foi utilizado um sistema de termostato instalado em uma caixa de madeira e aquecida por meio de lâmpada incandescente (240W). As temperaturas foram monitoradas constantemente com a utilização de termômetro de mercúrio (máxima e mínima). O efeito da temperatura durante o tempo de exposição foi mensurado com base nas taxas de espermatozóides normais, sobrevivência e parâmetros de motilidade espermática computadorizada.

O volume seminal liberado foi mensurado utilizando-se tubos de ensaio graduados ($10,0 \pm 0,1\text{mL}$). A osmolaridade foi realizada utilizando-se plasma proveniente de centrifugação (4000rpm durante 20min), por um osmômetro microprocessado (modelo PZL-1000, PZL Tecnologia em Equipamentos). Para mensuração da concentração espermática foi utilizada uma amostra para cada macho, para tanto, utilizou-se $5\mu\text{L}$ do sêmen diluído em $5.000\mu\text{L}$ de formol salino tamponado, resultando em uma diluição de 1:1.000. Uma câmara hematimétrica de Neubauer foi utilizada para a contagem de células espermáticas (Sanches et al. 2011b).

Para avaliar as possíveis alterações morfológicas dos espermatozóides (NOR) submetidos aos fatores experimentais fixou-se o sêmen em formol salino tamponado e, posteriormente, os espermatozóides foram corados com rosa de bengala (Streit Jr. et al. 2004). Entretanto, adaptou-se a metodologia empregada por Streit Jr. et al. (2006) e Bombardelli et al. (2010) para a confecção das lâminas. Para tanto, $500\mu\text{L}$ de espermatozóides+formol salino tamponado (diluição 1:1.000 de sêmen:fixador) foram adicionados em microtubo eppendorf ($1,5\text{mL}$) e, posteriormente, adicionou-se $10\mu\text{L}$ de corante. Após homogeneização, $10\mu\text{L}$ de fixador+espermatozóides+corante foram adicionados em uma extremidade da lâmina de vidro. A lâmina foi elevada obliquamente, ao ângulo de 45° para deslizamento desta gotícula até outra extremidade. Após a realização deste procedimento as lâminas foram secas ao ar livre e, em seguida, analisadas em microscópio de luz (aumento de $400\times$) (Hafez & Hafez 2004), com avaliação de 200 espermatozóides (CBRA 1998). As lâminas foram realizadas em triplicata e os espermatozóides classificados como normais e defeituosos.

A avaliação da taxa de sobrevivência (SOB) espermática foi realizada pelo método de coloração eosina-nigrosina (adaptado de Blom 1950), utilizando-se

30µL de sêmen, 90µL de eosina amarela (3%) e 90µL de nigrosina (5%). Após o processamento das lâminas, 200 espermatozóides por lâmina (CBRA 1998) foram analisados em microscópio de luz (aumento de 400x) (Sanches et al. 2009), sendo considerados mortos espermatozóides corados e os vivos incolores (Kavamoto & Fogli da Silveira 1986).

Os parâmetros de motilidade espermática foram avaliados pelo método CASA (*Computer Assisted Sperm Analysis*). Para tal, empregou-se o procedimento adotado por Wilson-Leedy & Ingermann (2007) para análises a partir de *softwares* de código aberto.

Para a ativação espermática foi empregado água destilada como ativador em temperatura ambiente ($24,38 \pm 1,68^\circ\text{C}$). Para o processo de ativação foi utilizado 10µL de sêmen e 500µL de água (proporção de 1:50 de sêmen:água), em tubos eppendorfs (1,5mL). Após a ativação, 10µL de sêmen e água foram adicionados em uma câmara de Neubauer espelhada (100µm profundidade), coberta por lamínula de vidro (24x24mm) e levada ao microscópio de luz trinocular Nikon (modelo e200) previamente focado (obj. 40x) para captura de imagens. Para tanto, foi utilizada uma câmera Basler 602fc (*Basler Vision Technologies*), conectada ao computador (intel core i7[®] CPU 2,3 GHz, 4Gb de Ram), sistema operacional Microsoft Windows XP[®] (*Microsoft Corporation*).

As capturas dos vídeos de movimentação espermática e edição dos vídeos foram realizadas conforme metodologia descrita por Sanches et al. (2010) com configurações adaptadas para o *S. parahybae*. Os vídeos foram capturados no *software* AMCAP (<http://noeld.com>), a uma taxa de 100 frames por segundo (656x490pixels), processados no *software* VIRTUALDUB (<http://virtualdub.org>). Os vídeos foram editados, convertidos em seqüência de imagem e 50 imagens, correspondentes a 0,5s de vídeo, foram gravados em diretório específico. Após este procedimento elas foram analisadas no *software* IMAGEJ (*National Institutes of Health, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>*) por meio do aplicativo CASA (*University of California e Howard Hughes Medical Institute, <http://rsbweb.nih.gov/ij/plugins/casa.html>*). Os parâmetros espermáticos avaliados foram: taxas de motilidade (MOT), velocidade curvilinear (VCL), velocidade média do deslocamento (VMD), velocidade em linha reta (VLR) e retilinearidade (RET). O parâmetro linearidade (LIN - obtido pela divisão de VSL por VAP), publicado

pelo código original do programa (Wilson-Leedy & Ingermann 2006), foi renomeado conforme Wilson-Leedy et al. (2009) para retilinearidade e definido de acordo com a nomenclatura estabelecida na literatura. Os parâmetros oscilação, progressão e frequência de batimento cruzado gerados pelo programa não foram utilizados. Para estas avaliações utilizaram-se 30 ± 16 espermatozoides para cada vídeo.

O resultados de VCL, VMD e VSL obtidos, foram submetidos a análise de componentes principais (PCA) e agrupados para formação de uma nova variável denominada velocidade espermática (VE) ($VE = a \cdot VCL + b \cdot VMD + c \cdot VLR$) conforme Marcos (2012) e Tessaro et al. (2012). Onde, *a*, *b* e *c* representam as contribuições das correlações das variáveis VCL, VMD, e VLR, respectivamente.

Posteriormente, os parâmetros espermáticos, MOT, VE, RET, SOB e NOR foram submetidos à análise de regressão do modelo de superfície de resposta do *software Statistica*® (Stasoft 2005). As possíveis influências do tempo de exposição (T), temperatura de exposição (TE) e sobre as variáveis respostas (VR) foram avaliadas através do modelo de superfície de resposta:

$$VR = \theta_0 + \theta_1 T + \theta_2 (T)^2 + \theta_3 TE + \theta_4 (TE)^2 + \theta_5 (T \cdot TE) + \theta_6 B + \epsilon$$

onde: θ_i = constantes; **B** = efeito do bloco (machos); ϵ = erro com $\sim N(0, \sigma^2)$

Os parâmetros de ordens superiores não significativos ($P > 0,05$) foram removidos progressivamente pelo método *backward stepwise*. Os pressupostos foram checados nos resíduos conforme sugerido por Myers (1990) e Quin & Keough (2002). Em caso de efeito significativo do modelo de superfície de resposta realizou-se as derivadas parciais do modelo estatístico em relação às variáveis significativas e posteriormente estimou-se a linha de máximos valores das VR conforme Sanches et al. (2011c).

Posteriormente, os parâmetros espermáticos obtidos ao longo de 112h de estocagem foram submetidos ao teste de correlação linear de Pearson ao nível de 5% de significância.

7.5) Resultados

O peso médio dos machos e os parâmetros espermáticos observados imediatamente após coleta estão descritos na Tabela 2.

Verificou-se forte correlação linear ($P < 0,05$) entre as velocidades espermáticas $VCL \times VMD$, $VCL \times VLR$, $VMD \times VLR$, com coeficiente de correlação (r) de 96,97, 95,16 e 99,58%, respectivamente. O agrupamento destas variáveis gerou a equação que descreve o parâmetro velocidade espermática: $VE = 0,327949 * VCL + 0,338073 * VMD + 0,333978 * VLR$.

Constatou-se o efeito ($P < 0,05$) interativo entre o tempo após a coleta e a temperatura do ambiente para os parâmetros: retilinearidade, taxa de espermatozóides normais e sobrevivência. Para os parâmetros motilidade e velocidade espermática verificou-se efeito ($P < 0,05$) quadrático de ambas as variáveis.

Tabela 2. Peso dos machos e parâmetros espermáticos observados em *Steindachneridion parahybae* imediatamente após coleta do sêmen.

Parâmetros	n	Med	Min	Max	DP
Peso dos reprodutores (kg)	5	717,04	437,00	1.243,00	311,25
Volume de sêmen liberado (mL)	5	16,80	6,00	27,00	8,64
Volume seminal relativo (mL kg ⁻¹)	5	25,11	9,25	38,42	13,63
Concentração (espermatozóides mL ⁻¹) (x10 ⁹)	5	9,31	3,20	19,00	5,87
Osmolaridade (mOsm kg ⁻¹)	5	287,25	228,00	322,00	23,60
Motilidade espermática (%)	5	84,71	73,33	99,33	10,26
Velocidade curvilínear (µm s ⁻¹)	5	122,16	111,84	130,67	6,85
Velocidade média de deslocamento (µm s ⁻¹)	5	103,18	94,10	113,18	7,95
Velocidade em linha reta (µm s ⁻¹)	5	94,39	83,08	104,53	8,25
Velocidade espermática (µm s ⁻¹)	5	106,52	99,10	116,08	6,93
Retilinearidade (%)	5	91,38	88,35	93,17	1,84
Sobrevivência espermática (%)	5	89,33	83,27	94,51	5,08
Espermatozóides normais (%)	5	68,91	56,33	81,20	11,78

n=número de amostras; Med=médias; Min=valores mínimos obtidos; Max=valores máximos obtidos; DP=desvio padrão

Para a motilidade espermática verificou-se que altas e baixas temperaturas promoveram precoce redução das taxas de motilidade quando comparado com as temperaturas intermediárias (Figura 1). A temperatura teórica que proporcionaram maiores valores de motilidade foi de 19,74°C, conforme representado pela linha de máxima motilidade teórica (Figura 2).

A estocagem seminal em 5,15±3,44°C promoveu menores valores de velocidade espermática (Figura 3). Os maiores valores foram verificados na temperatura teórica de 23,98°C, sendo que temperaturas de estocagem superiores e inferiores promoveram menores valores (Figura 4).

A retilinearidade apresentou resultados diferenciados em relação à motilidade e velocidade, com efeito interativo para o tempo e temperatura ($P<0,05$). Ocorrendo elevação dos valores em função do tempo de estocagem (Figura 5). Neste caso os menores valores foram constatados conforme a combinação do tempo e temperatura, sendo esta combinação representada pela equação linear $y=21,7530-0,1789*x$ em que y =temperatura (°C) e x =tempo(h) (Figura 6).

O percentual de espermatozóides normais apresentou efeito interativo ($P<0,05$) do tempo e temperatura. Diferente dos demais parâmetros, as maiores taxas não puderam ser determinadas em função da temperatura e tempo devido o comportamento dos resultados, desta forma, observou-se que os maiores valores foram encontrados até 8h de exposição (Figura 7) e, posteriormente a isso, as maiores taxas foram observadas em temperaturas baixas (Figura 8).

A taxa de sobrevivência espermática apresentou efeito interativo ($P<0,05$) entre o tempo e a temperatura de exposição. O comportamento foi semelhante ao observado pela taxa de espermatozóides normais, com maiores resultados observados logo após a coleta e redução em função do tempo (Figura 9). Além disso, as temperaturas de 34,9 e 24,4°C proporcionaram menores taxas de sobrevivência (Figura 10).

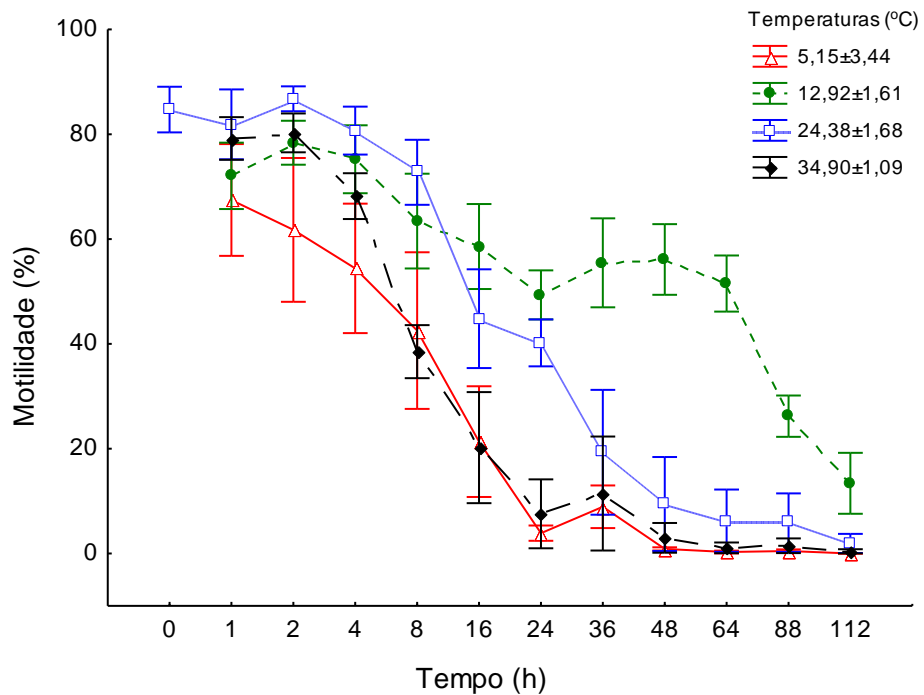


Figura 1. Taxas de motilidade espermática de *Steindachneridion parahybae* após exposição do sêmen *in natura* a quatro temperaturas durante 112 horas. (Valores médios e erro padrão).

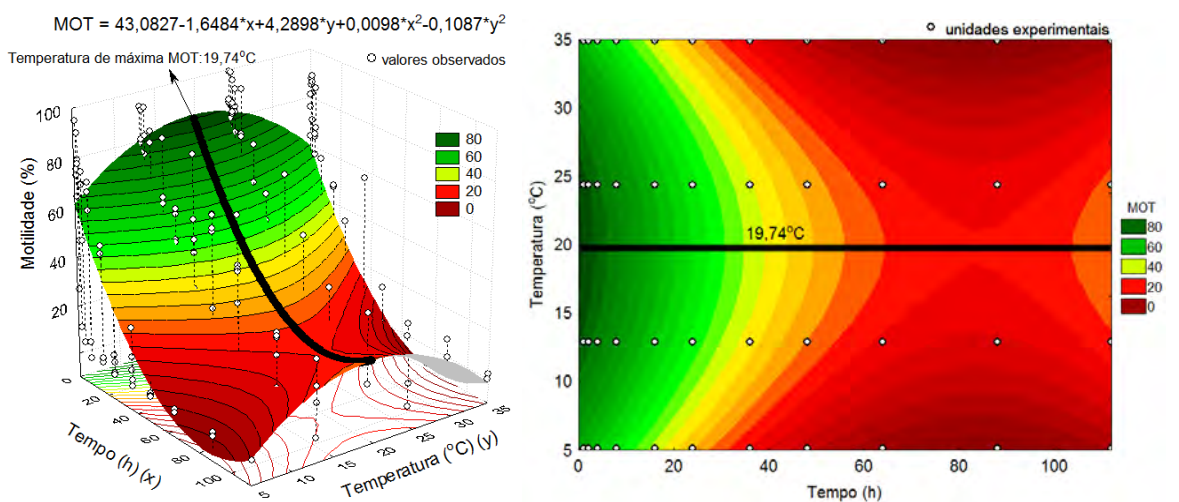


Figura 2. Taxas de motilidade espermática (MOT) de *Steindachneridion parahybae* após exposição do sêmen *in natura* a quatro temperaturas durante 112 horas. Esquerda – Representação gráfica em 3D; Direita – Representação gráfica em 2D. (n=225, r²=66,43%).

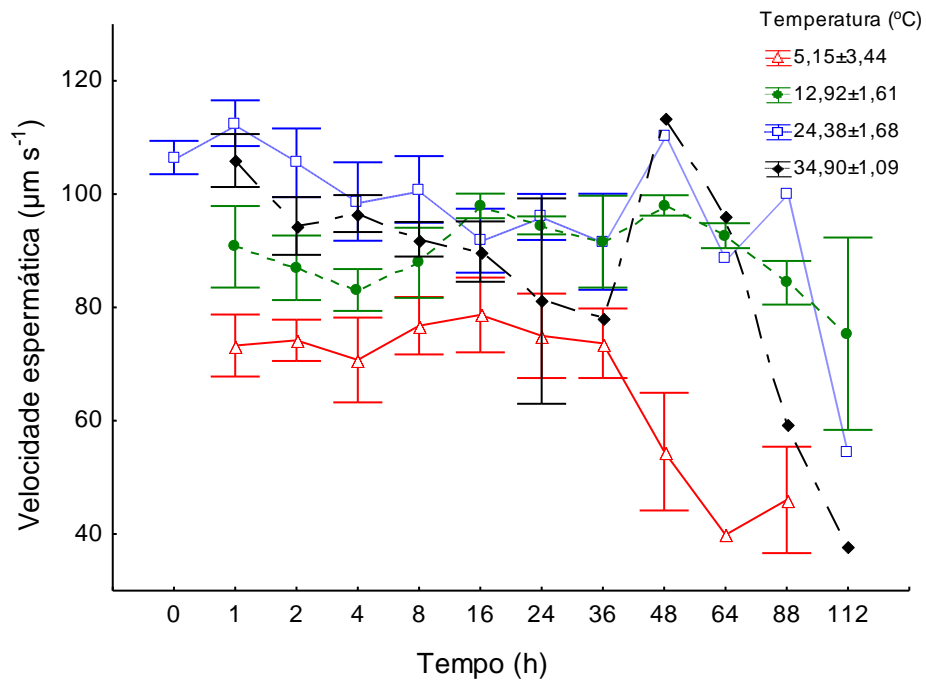


Figura 3. Velocidade espermática de espermatozoides de *Steindachneridion parahybae* após exposição do sêmen *in natura* a quatro temperaturas durante 112 horas. (Valores médios e erro padrão).

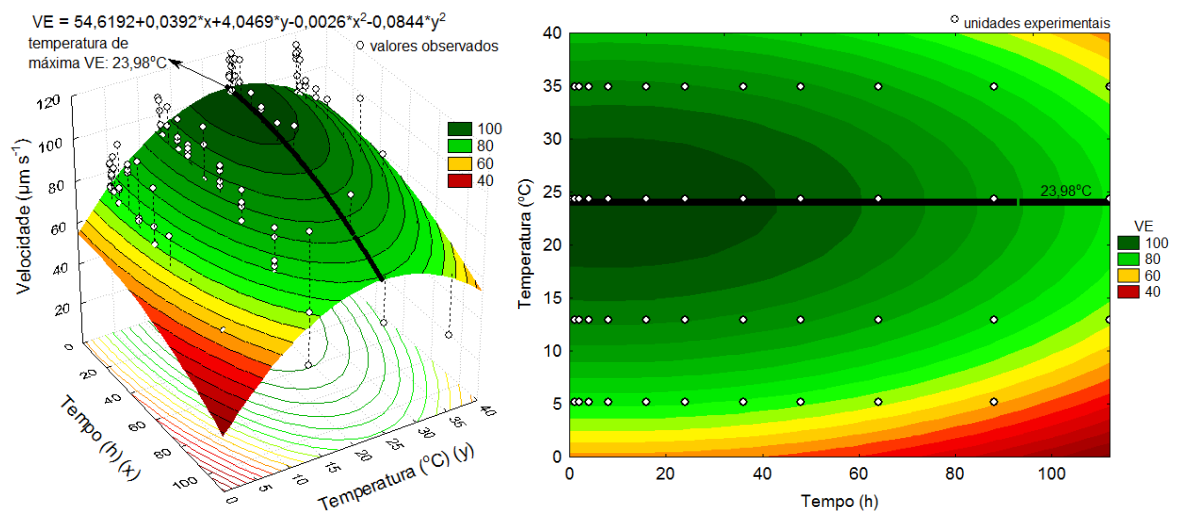


Figura 4. Velocidade espermática (VE) de espermatozoides de *Steindachneridion parahybae* após exposição do sêmen *in natura* a quatro temperaturas durante 112 horas. Esquerda – Representação gráfica em 3D; Direita – Representação gráfica em 2D. (n=164, r²=44,64%).

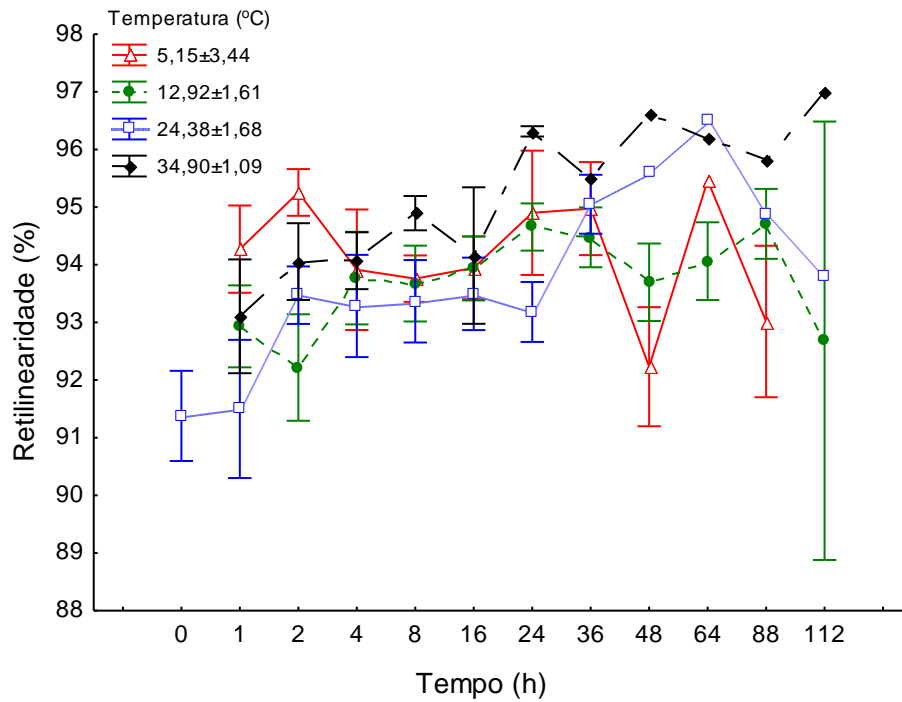


Figura 5. Taxas de retilinearidade de espermatozóides de *Steindachneridion parahybae* após exposição do sêmen *in natura* a quatro temperaturas durante 112 horas. (Valores médios e erro padrão).

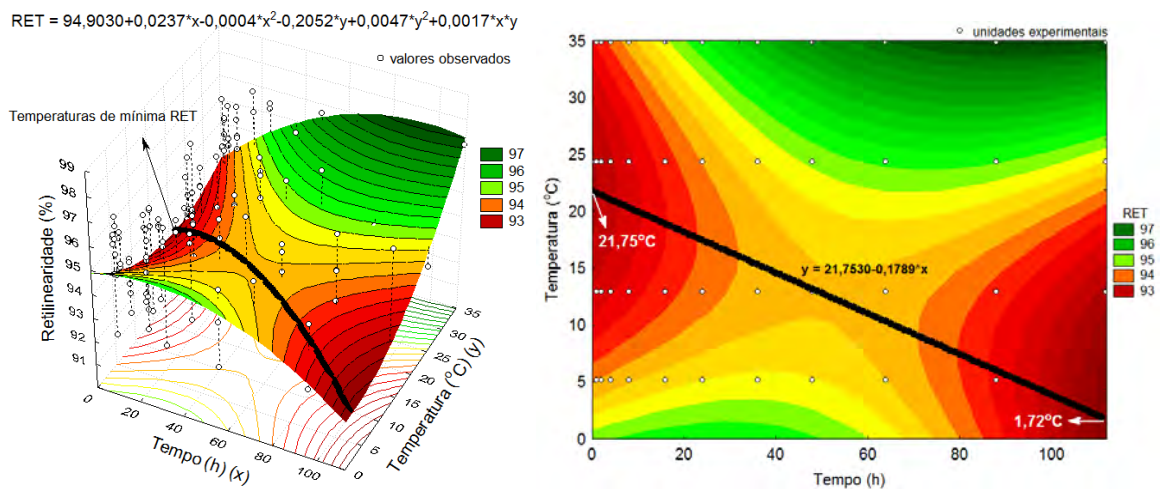


Figura 6. Taxas de retilinearidade (RET) de espermatozóides de *Steindachneridion parahybae* após exposição do sêmen *in natura* a quatro temperaturas durante 112 horas. Esquerda – Representação gráfica em 3D; Direita – Representação gráfica em 2D. (n=164, r²=18,54%).

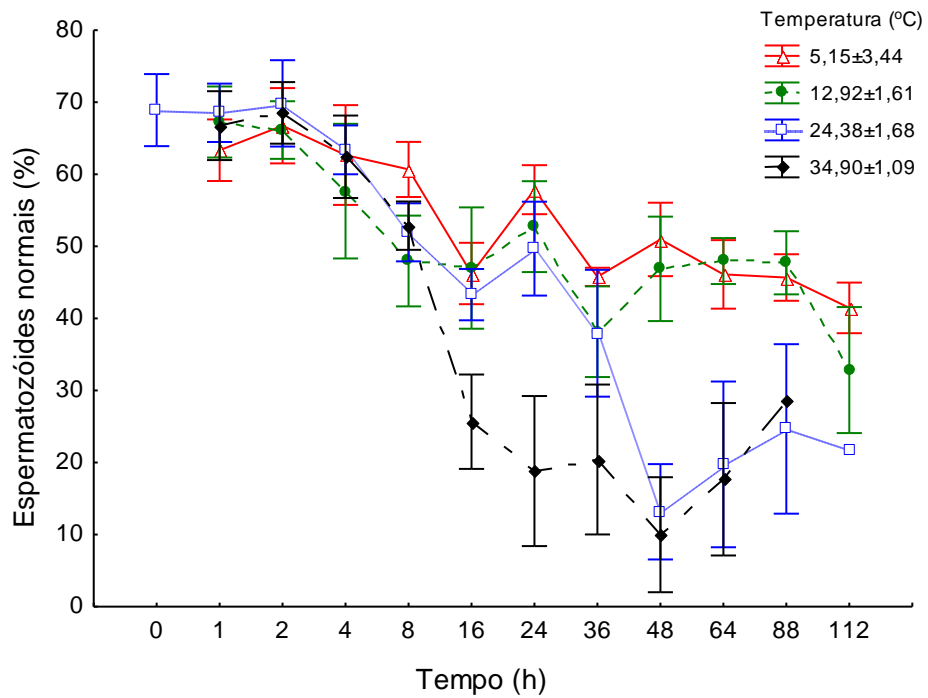


Figura 7. Taxas de espermatozoides normais de *Steindachneridion parahybae* após exposição do sêmen *in natura* a quatro temperaturas durante 112 horas. (Valores médios e erro padrão).

$$NOR = 63,4165 - 0,6161 * x + 0,0055 * x^2 + 0,3898 * y - 0,01364 * y^2 - 0,0157 * x * y$$

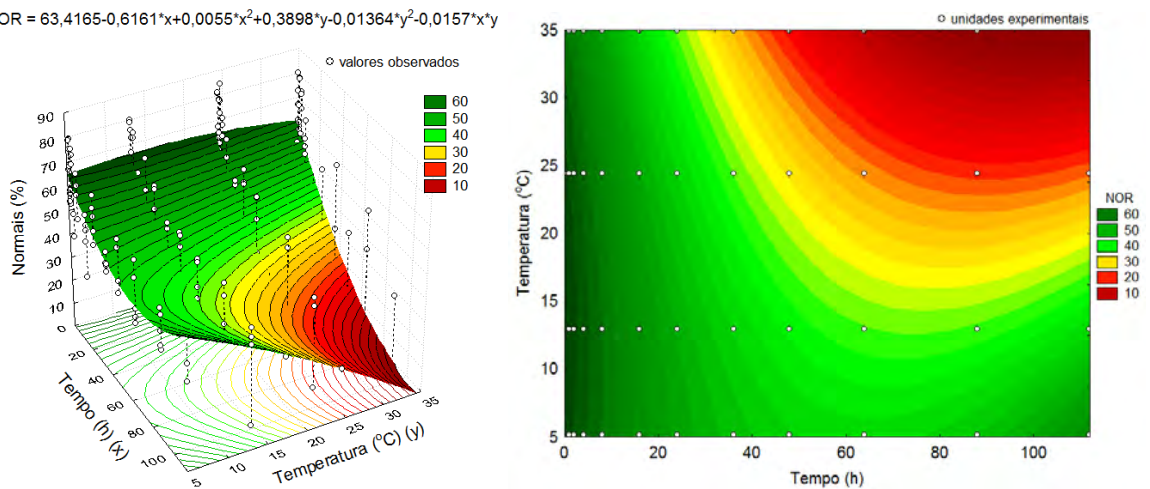


Figura 8. Taxas de espermatozoides normais (NOR) de *Steindachneridion parahybae* após exposição do sêmen *in natura* a quatro temperaturas durante 112 horas. Esquerda – Representação gráfica em 3D; Direita – Representação gráfica em 2D. (n=198, r²=49,17%).

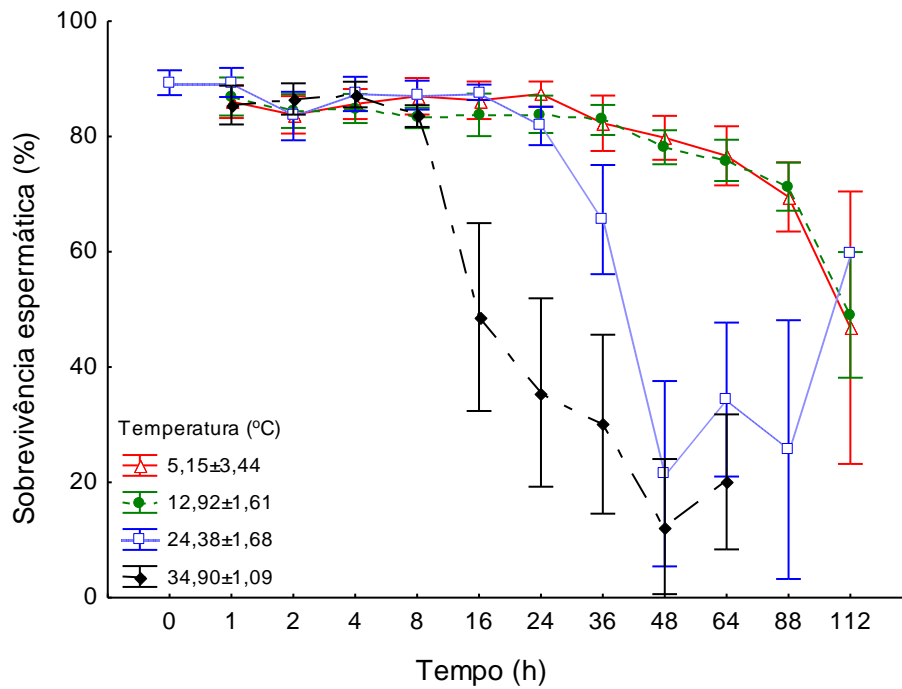


Figura 9. Taxas de sobrevivência espermática de *Steindachneridion parahybae* após exposição de sêmen *in natura* a quatro temperaturas durante 112 horas. (Valores médios e erro padrão).

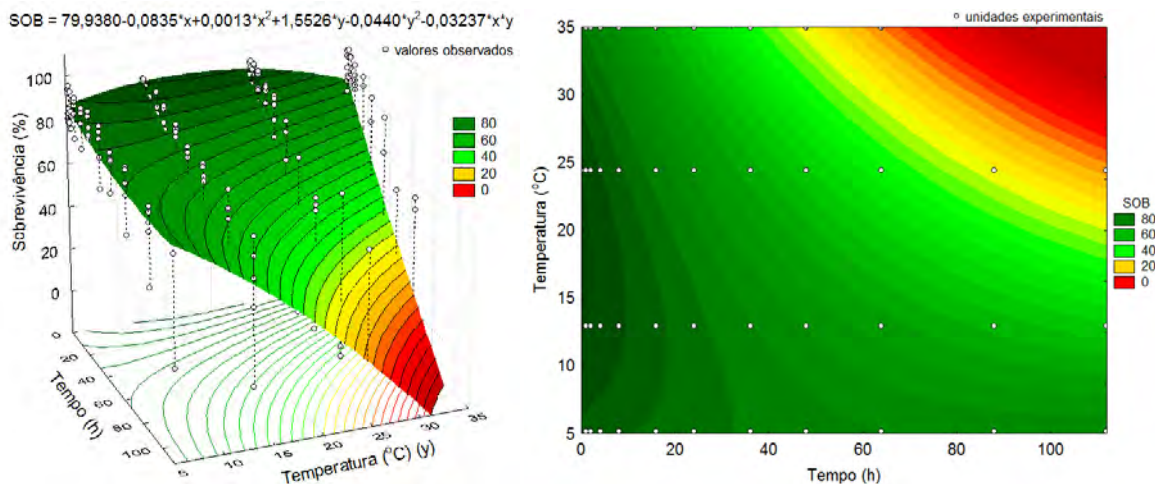


Figura 10. Taxas de sobrevivência espermática (Sob) de *Steindachneridion parahybae* após exposição *in natura* a quatro temperaturas durante 112 horas. Esquerda – Representação gráfica em 3D; Direita – Representação gráfica em 2D. (n=201, r²=55,53%).

Em relação às correlações lineares de Pearson não verificou-se efeito (P>0,05) entre taxas de sobrevivência e as velocidades VCL, VMD e VLR, e entre taxas de espermatozoides normais e as velocidades VMD e VLR (Tabela 3). Os

demais parâmetros espermáticos apresentaram correlação linear significativa ($P < 0,05$) (Tabela 3).

Tabela 3. Coeficientes de correlação linear de Pearson entre parâmetros espermáticos de *Steindachneridion parahybae* (n=153) obtidos ao longo de 112h de estocagem.

Parâmetros	MOT	VCL	VMD	VLR	RET	SOB	NOR
MOT	<u>1,00</u>						
VCL	<u>0,59</u>	<u>1,00</u>					
VMD	<u>0,52</u>	<u>0,97</u>	<u>1,00</u>				
VLR	<u>0,48</u>	<u>0,95</u>	<u>1,00</u>	<u>1,00</u>			
RET	<u>-0,46</u>	<u>-0,32</u>	*	*	<u>1,00</u>		
SOB	<u>0,40</u>	0,12	0,08	0,06	<u>-0,21</u>	<u>1,00</u>	
NOR	<u>0,42</u>	<u>0,17</u>	0,10	0,08	<u>-0,29</u>	<u>0,39</u>	<u>1,00</u>

Valores em negrito e sublinhados representam correlação linear significativa ($P < 0,05$). Motilidade (MOT); Velocidade curvilínea (VCL); Velocidade média de deslocamento (VMD); velocidade em linha reta (VSL); Retilinearidade (RET); Taxa de sobrevivência (SOB); Taxa de espermatozoides normais (NOR). *Dados não submetidas à análise de correlação, pois o parâmetro RET é gerado através da relação entre as velocidades, $RET = VLR/VMD$.

7.6) Discussão

A produção seminal relativa observada no presente experimento ($25,11 \text{ mL kg}^{-1}$) foi superior aos encontrados por Caneppele (2011) e Araújo (2011) para peixes não-induzidos hormonalmente, os autores verificaram produção seminal de $9,39 \pm 1,19 \text{ mL kg}^{-1}$ e $3,3 \text{ mL kg}^{-1}$, respectivamente. Tais diferenças são comumente verificadas para a espécie, pois a produção seminal pode variar conforme a época do ano (Caneppele 2011). Para o surubim-do-Iguaçu, *Steindachneridion melanodermatum*, a produção seminal foi de $3,05 \text{ mL kg}^{-1}$ (Marcos 2012). Bombardelli et al., (2006) constataram para o jundiá, *Rhamdia quelen*, produção de $36 \pm 8 \text{ mL kg}^{-1}$. Tais diferenças inter-específicas são comumente percebidas em peixes nativos sul-americanos, e variam de acordo com época, metodologia de coleta e procedimentos de indução hormonal (Caneppele 2011; Viveiros & Godinho 2009).

Além do volume relativo, Caneppele (2011) também verificou $9,24 \pm 0,88 \times 10^9$ espermatozoides.mL⁻¹, $79,05 \pm 1,85\%$ de motilidade subjetiva, $263,21 \pm 2,40$ mOsm kg⁻¹ de osmolaridade e Araújo (2011) encontrou $10,4 \pm 1,5 \times 10^9$ espermatozoides.mL⁻¹, $80 \pm 10\%$ de motilidade subjetiva e 283 ± 7 mOsm kg⁻¹ de osmolaridade. Sanches et al., (2011d) observaram os parâmetros computadorizados para o *S. parahybae* de $89,11 \pm 1,25\%$, $107,23 \pm 2,35 \mu\text{m s}^{-1}$, $83,58 \pm 3,48 \mu\text{m s}^{-1}$, $77,08 \pm 3,56 \mu\text{m s}^{-1}$, para MOT VCL, VMD e VLR, respectivamente. Tais características são semelhantes às observadas no início do presente experimento, indicando que o sêmen utilizado apresentou qualidade satisfatória para a espécie e adequadas para a realização do mesmo.

O agrupamento das velocidades espermáticas através de análises de componentes principais para gerar a variável velocidade espermática foi uma ferramenta útil e possibilitou a representação de três variáveis por apenas uma. Agrupamento semelhante destas variáveis foi realizado com sucesso para outros dois bagres sul-americanos, o *R. quelen* (Tessaro et al., 2012) e o *S. melanodermatum* (Marcos, 2012) e apresenta a vantagem de otimizar as análises, diminuindo espaço e tempo para avaliação.

A taxa de motilidade e a velocidade espermática apresentaram maiores valores durante todo tempo de estocagem nas temperaturas teóricas de $19,74$ e $23,98^\circ\text{C}$, respectivamente, indicando, que estas temperaturas podem proporcionar melhores condições de estocagem para o sêmen desta espécie. A retilinearidade apresentou os mínimos valores em temperaturas diferentes ao longo do tempo de estocagem, com temperatura no tempo inicial (zero) de $21,75^\circ\text{C}$ e final (112h) de $1,72^\circ\text{C}$, indicando que a redução da temperatura de estocagem em função do tempo pode promover melhores condições para obtenção deste tipo de comportamento espermático, apesar disso, a função desta variável é pouca conhecida e seus efeitos devem ser mais estudados.

As taxas de espermatozoides normais e vivos observadas no presente experimento apresentaram comportamento semelhante, com efeito interativo do tempo e temperatura e com maiores valores em temperaturas baixas. Em comparação a $34,90 \pm 1,09^\circ\text{C}$, a temperatura de $5,15 \pm 3,44^\circ\text{C}$, proporcionou após 112h menores alterações morfológicas e mortalidade das células. Possivelmente em baixas temperaturas as células espermáticas apresentam menor metabolismo

e degradação (Billard & Cosson 1992; Rana 1995) em relação às temperaturas mais altas, entretanto, os mecanismos e os fatores que levam a este comportamento devem ser mais estudados em *S. parahybae*.

Verificou-se que $12,92\pm 1,61^{\circ}\text{C}$ e $24,38\pm 1,68^{\circ}\text{C}$ proporcionaram melhores condições de estocagem do que as temperaturas extremas ($5,15\pm 3,44$ e $34,90\pm 1,09^{\circ}\text{C}$). Resultados semelhantes foram observados por Sanches et al. (2011c) durante a estocagem *ex situ* de sêmen *in natura* de *R. quelen* ao longo de 48h, em que maiores valores das características espermáticas foram verificados em temperaturas intermediárias, entre $25,5^{\circ}\text{C}$ e $10,5^{\circ}\text{C}$. Para o suruvi, *Steindachneridion scripta*, Luz et al. (2001) observaram que o sêmen *in natura* permanece com motilidade até 6h de exposição a 25°C .

A redução da qualidade espermática em temperaturas elevadas verificada no presente experimento pode estar associada ao aumento das taxas metabólicas das células espermáticas quando submetidas em altas temperaturas (Billard et al. 1995a), ou talvez, à maior colonização de bactérias (Jenkins & Tiersch 1997). Lahnsteiner et al. (1998) observaram que a qualidade espermática está diretamente relacionada com atividade enzimática de aspartato aminotransferase, atividade de respiração e malato dihidrogenase. Como estas enzimas podem ser responsáveis por condições anóxicas especialmente, durante a estocagem com condições inapropriadas de suplementação energética (Lahnsteiner et al. 1998) e como a atividade enzimática está diretamente relacionada com a temperatura (Nelson & Cox 2008), possivelmente, estes fatores proporcionaram o rápido decréscimo da qualidade espermática nas temperaturas mais altas no presente experimento. Viveiros et al., (2010) verificaram que a perda da motilidade de espermatozoides estocados *ex situ* está diretamente relacionada com o aumento do número de colônias de bactérias presentes no sêmen, sendo esta inibida por meio da utilização de soluções diluidoras contendo antibióticos. Jenkins & Tiercsh (1997) atribuem a redução da qualidade espermática principalmente pelo fato das bactérias contribuírem na produção extracelular de enzimas e consumo de oxigênio Além da utilização de diluidores contendo antibióticos, cuidados durante a coleta ajudam a reduzir a contaminação bacteriana, tais como, evitar contato com a urina, material fecal, sangue, muco e água (Maria et al. 2006).

Mansour et al. (2002) verificaram para o bagre africano, *Clarias gariepinus*, motilidade espermática por mais de sete dias em sêmen estocado 4°C enquanto para 25°C até 3 dias, ambos com adição de diluente. Os autores atribuem a diminuição das taxas metabólicas e redução do consumo de energia quando o sêmen é estocado em temperaturas mais baixas. Além disso, observaram que sêmen não diluído quando estocado a 4°C não apresentava mais motilidade após o terceiro dia, isso pode ter ocorrido devido à menor suplementação de oxigênio ou pela alta atividade proteolítica do plasma testicular.

Babiak et al (2006a) verificaram que a viabilidade do sêmen de peixes pode ser mantida por vários dias, entretanto, vários fatores como interações biológicas múltiplas, fatores físicos e técnicos, variabilidade do machos, procedimentos na espermição e condições de estocagem são determinantes para manter a viabilidade. Os autores verificaram viabilidade espermática *ex situ* de halibut do atlântico, *Hippoglossus hippoglossus* por até 79 dias em 0-1°C utilizando diluidor HBSS (*Hanks Balanced Salt Solution*) mais antibióticos na proporção de 1:5 (sêmen:diluidor) e presença de ar atmosférico. Além disso, verificaram vantagem na utilização de diluidores e ar atmosférico em relação ao sêmen *in natura* e com oxigênio. Segundo os autores, a exposição de sêmen não diluído causa perda da viabilidade espermática devido à depleção de oxigênio e, a presença de ar atmosférico, tem vantagem por proporcionar condições de baixa taxa de metabolismo e estresse oxidativo ao longo da membrana dos espermatozóides.

Apesar da influência de diluidores, enzimas, bactérias, taxas metabólicas, consumo de oxigênio e parâmetros bioquímicos influenciarem a qualidade espermática em várias espécies de peixes, seus efeitos sobre a qualidade espermática de *S. parahybae* ainda é desconhecida. Contudo, estes estudos possibilitam novas perspectivas sobre as possíveis influências destes parâmetros sobre a qualidade espermática do surubim-do-Paraíba, e podem ser testadas em futuros estudos de estocagem de sêmen desta espécie.

Verificou-se que a MOT apresentou correlação com todos os parâmetros espermáticos avaliados, sendo a única correlação inversamente proporcional com a RET, parâmetro que representa a quantidade de espermatozóides com movimento reto. Portanto, quando a MOT é alta, mais espermatozóides com movimentos circulares ou ao acaso são verificados e quando MOT baixa os

espermatozóides com movimento reto prevalecem. De acordo com esta correlação, constata-se que os espermatozóides que apresentam movimento reto acabam morrendo e não participam da motilidade. Esta hipótese é corroborada pela correlação inversamente proporcional entre a SOB e a RET, ou seja, espermatozóides que poderiam apresentar movimento reto também são os espermatozóides mortos. Possivelmente, a mortalidade pode ocorrer devido à presença de alterações morfológicas, pois a RET também apresentou correlação inversamente proporcional com a NOR, que por sua vez correlacionou-se positivamente com a SOB e a MOT. Além disso, a RET também apresentou correlação inversamente proporcional com a VCL, indicando que espermatozóides que apresentam movimento reto, são também os mais lentos. A VCL por sua vez correlacionou-se positivamente com a MOT e com a NOR. De acordo com estas correlações, a retilinearidade é um bom indicativo de qualidade espermática, pois quando baixa, melhor é a qualidade espermática. Cosson (2010) recomenda que a motilidade espermática e a linearidade (parâmetro que descreve o percentual de movimento linear) são bons indicativos de qualidade, e representam uma extensa descrição das características de movimentação dos espermatozóides.

A partir destas evidências, observou-se que espermatozóides com movimentos retílineos não são interessantes para proporcionar alta qualidade seminal e, conseqüentemente, alta fertilização. Esta afirmação é corroborada por Araújo (2011) para o *S. parahybae*, que verificou correlação linear diretamente proporcional entre a VCL e VMD com as taxas de fertilização. Desta forma, é clara a evidência de que espermatozóides com movimento circular ou ao acaso são mais desejáveis para a reprodução artificial desta espécie. Relação semelhante foram observadas por Tused et al. (2008a) para a truta arco-íris, *Onchorynchus mykiss*, os autores observaram relação inversamente proporcional entre taxas de fertilização e VLR e relação diretamente proporcional entre a fertilização com a VCL, sugerindo que espermatozóides com movimento reto são os espermatozóides que apresentam menos capacidade de fertilizar um ovócito. Segundo os autores, a morfologia do flagelo interfere no movimento, sendo que espermatozóides que apresentam flagelo mais comprido são os que também

apresentam mais movimentos retilíneos, por sua vez, menor capacidade de fertilização.

Como o verificado no presente experimento, Caneppele (2011) também observou em *S. parahybae* correlação entre a taxa de motilidade com a quantidade de espermatozóides normais. Além disso, constatou correlação negativa entre a motilidade e a quantidade de espermatozóides com mais de uma alteração considerada grave, indicando que o tipo de alteração morfológica também interfere na motilidade.

7.7) Conclusão

A melhor qualidade espermática foi observada imediatamente após a coleta. Caso haja a necessidade de estocagem, que seja realizada entre 15°C e 25°C. O resfriamento abaixo de 10°C não é indicado, bem como, à exposição em temperaturas acima de 25°C. As velocidades espermáticas, VCL, VMD e VLR, podem ser agrupadas por análises de componentes principais para gerar uma variável que represente-as, chamada velocidade espermática (VE). O parâmetro motilidade, velocidade curvilínea e a retilinearidade são bons indicativos de qualidade espermática.

7.8) Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (nº 478347/2009-0), ao Fundo de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (nº 2009/18609-6 e 2010/02818-5) e à Companhia Energética de São Paulo - CESP.

7.9) Referências

- Araújo, R. V. 2011. Motilidade, velocidade e fertilidade do sêmen de surubim-do-paraíba *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes) criopreservado em diferentes diluidores. 91p. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- Babiak, I., O. Ottesen, G. Rudolfsen, and S. Johnsen. 2006a. Chilled storage of semen from Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L. - I: Optimizing the protocol. *Theriogenology* **66**:2025-2035.
- Babiak, I., O. Ottesen, G. Rudolfsen, and S. Johnsen. 2006b. Quantitative characteristics of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L., semen throughout the reproductive season. *Theriogenology* **65**:1587-1604.
- Billard, R., J. Cosson, L. W. Crim, and M. Suquet. 1995a. Sperm physiology and quality. Pages 25-52 in N. R. Bromage, and R. J. Roberts, editors. *Broodstock management and egg and larval quality*. Blackwell Science, London.
- Billard, R., J. Cosson, G. Perchee, and O. Linhart. 1995b. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. *Aquaculture* **129**:95-112.
- Billard, R., and M. P. Cosson. 1992. Some problems related to the assessment of sperm motility in fresh-water fish. *Journal of Experimental Zoology* **261**:122-131.
- Blom, E. 1950. A One-minute live-dead sperm stain by means of Eosin-Nigrosin. *Fertility and Sterility* **1**:176-177.
- Bombardelli, R. A., C. Hayashi, M. R. M. Natali, E. A. Sanches, and P. A. Piana. 2010. Digestible energy level on reproductive and zootechnical performance and lipids deposition in hepatocytes of the Nile tilapia males. *Revista Brasileira De Zootecnia-Brazilian Journal of Animal Science* **39**:941-949.
- Bombardelli, R. A., E. F. Morschbacher, R. Campagnolo, E. A. Sanches, and M. A. Syperreck. 2006. Insemination dose for artificial fertilization of grey jundia

- oocytes, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimardm, 1824). Revista Brasileira De Zootecnia-Brazilian Journal of Animal Science **35**:1251-1257.
- Caneppele, D. 2011. *Steindachneridion parahybae* (STEINDACHNER, 1876) (SILURIFORMES: PIMELODIDAE): produção espermática ao longo de um ciclo reprodutivo. 60p. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura e Pesca. Instituto de Pesca, APTA-SAA, São Paulo.
- Caneppele, D., R. M. Honji, A. W. S. Hilsdorf, and R. G. Moreira. 2009. Induced spawning of the endangered Neotropical species *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes: Pimelodidae). Neotropical Ichthyology **7**:759-762.
- Carneiro, P. C. F., M. S. Segui, C. R. Lóris Filho, and J. D. Mikos. 2006. Viabilidade do sêmen do jundiá, *Rhamdia quelen*, armazenado sob refrigeração. Revista Acadêmica **4**:11-16.
- CBRA 1998. Manual para exames andrológicos e avaliação de sêmen animal. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, Belo Horizonte.
- Cosson, J. 2010. Frenetic activation of fish spermatozoa flagella entails short-term motility, portending their precocious decadence. Journal of Fish Biology **76**:240-279.
- Fauvel, C., M. Suquet, and J. Cosson. 2010. Evaluation of fish sperm quality. Journal of Applied Ichthyology **26**:636-643.
- Fogli da Silveira, W., E. T. Kavamoto, M. G. Rigolino, and Y. A. O. Tabata. 1988. Fertilidade do sêmen de truta arco-íris, *Salmo irideus gibbons*, em diferentes concentrações de espermatozóides por óvulo. Boletim do Instituto de Pesca **15**:51-54.
- Garavello, J. C. 2005. Revision of genus *Steindachneridion* (Siluriformes: Pimelodidae). Neotropical Ichthyology **3**:607-623.
- Hafez, E. S. E., and B. Hafez 2004. Reprodução Animal. Manole, Barueri.
- Hilsdorf, A. W. S., and M. Petrer Jr. 2002. Conservação de Peixes na Bacia do Rio Paraíba do Sul. Ciência Hoje **30**:62-65.
- Honji, R. M., D. Caneppele, A. W. S. Hilsdorf, and R. G. Moreira. 2009. Threatened fishes of the world: *Steindachneridion parahybae*

- (Steindachner, 1877) (Siluriformes: Pimelodidae). *Environmental Biology of Fishes* **85**:207-208.
- IBGE. 2009. Fauna Ameaçada de Extinção, Invertebrados Aquáticos e Peixes – 2009. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.
- Jenkins, J. A., and T. R. Tiersch. 1997. A preliminary bacteriological study of refrigerated channel catfish sperm. *Journal of the World Aquaculture Society* **28**:282-288.
- Kavamoto, E., and W. Fogli da Silveira. 1986. Características físicas, químicas e microscópicas do sêmen do bagre, *Rhamdia hilarii*. *Boletim do Instituto de Pesca* **13**:95-100.
- Lahnsteiner, F., B. Berger, T. Weismann, and R. A. Patzner. 1998. Determination of semen quality of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by sperm motility, seminal plasma parameters, and spermatozoal metabolism. *Aquaculture* **163**:163-181.
- Luz, R. K., A. A. Ferreira, D. A. Reynalte-Tajate, and E. Zaniboni Filho. 2001. Avaliação qualitativa e quantitativa do sêmen do suruvi, *Steindachneridion scripta* (Pimelodidae). *Boletim do Instituto de Pesca* **27**:39-42.
- Machado, C. E. M., and H. C. F. Abreu. 1952. Notas preliminares sobre a caça e a pesca no Estado de São Paulo – A Pesca no Vale do Paraíba. *Boletim de Indústria Animal* **13**:145-160.
- Mansour, N., F. Lahnsteiner, M. A. McNiven, G. F. Richardson, and C. S. Pelletier. 2011. Relationship between fertility and fatty acid profile of sperm and eggs in Arctic char, *Salvelinus alpinus*. *Aquaculture* **318**:371-378.
- Mansour, N., F. Lahnsteiner, and R. A. Patzner. 2002. The spermatozoon of the African catfish: fine structure, motility, viability and its behaviour in seminal vesicle secretion. *Journal of Fish Biology* **60**:545-560.
- Marcos, R. M. 2012. Parâmetros seminais e espermáticos, estocagem e criopreservação do sêmen do surubim do Iguaçu, *Steindachneridion melanodermatum* (Garavelo, 2005). Page 80. Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo.

- Maria, A. N., A. T. M. Viveiros, R. T. F. Freitas, and A. V. Oliveira. 2006. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. *Aquaculture* **260**:298-306.
- Mariante, A. S., M. S. M. Albuquerque, and A. F. Ramos. 2011. Criopreservação de recursos genéticos animais brasileiros. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* **35**:64-68.
- Marques, S., and H. P. Godinho. 2004. Short-term cold storage of sperm from six Neotropical Characiformes fishes. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **47**:799-804.
- MMA 2008. Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. Ministério do Meio Ambiente.
- Murgas, L. D. S., A. B. Miliorini, R. T. Franciscatto, and A. N. Maria. 2004. Spermatic viability of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen cooled at 4 degrees C. *Revista Brasileira De Zootecnia-Brazilian Journal of Animal Science* **33**:1361-1365.
- Myers, R. H. 1990. Classical and modern regression with applications. Duxbury Press, Belmont.
- Nelson, D. L., and M. M. Cox 2008. Lehninger, Principles of Biochemistry. W.H Freeman and Company, New York.
- Oliveira, A. V., A. T. M. Viveiros, A. N. Maria, R. T. F. Freitas, and Z. A. Izau. 2007. Sucess of cooling and freezing of pirapitinga (*Brycon nattereri*) semen. *Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinaria E Zootecnia* **59**:1509-1515.
- Orfao, L. H., A. N. Maria, A. F. Nascimento, Z. A. Isau, and A. T. M. Viveiros. 2010. Sperm fertility of the subtropical freshwater streaked prochilod *Prochilodus lineatus* (Characiformes) improved after dilution and cold storage. *Aquaculture Research* **41**:e679-e687.
- Perchec, G., C. Jeulin, J. Cosson, F. Andre, and R. Billard. 1995. Relationship between sperm ATP content and motility of carp spermatozoa. *Journal of Cell Science* **108**:747-753.

- Quinn, G. P., and M. J. Keough 2002. *Experimental Design and Data Analysis for Biologists*. Cambridge University Press.
- Rana, K. 1995. Preservation of gametes. Pages 53-75 in N. R. Bromage, and R. J. Roberts, editors. *Broodstock management and egg and larval quality*. Blackwell Science, London.
- Romagosa, E., B. E. Souza, E. A. Sanches, D. M. Baggio, and R. A. Bombardelli. 2010. Sperm motility of *Prochilodus lineatus* in relation to dilution rate and temperature of the activating medium. *Journal of Applied Ichthyology* **26**:678-681.
- Rurangwa, E., D. E. Kime, F. Ollevier, and J. P. Nash. 2004. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture* **234**:1-28.
- Sanches, E. A., D. M. Baggio, P. A. Piana, B. E. de Souza, and R. A. Bombardelli. 2011a. Artificial fertilization of oocytes and sperm activation in pacu: effects of the spermatozoa:oocyte ratio, water volume, and in natura semen preservation. *Revista Brasileira De Zootecnia-Brazilian Journal of Animal Science* **40**:1-6.
- Sanches, E. A., R. A. Bombardelli, D. M. Baggio, and B. E. de Souza. 2009. Insemination dose for artificial fertilization of dourado oocytes. *Revista Brasileira De Zootecnia-Brazilian Journal of Animal Science* **38**:2091-2098.
- Sanches, E. A., R. M. Marcos, D. M. Baggio, L. Tessaro, R. E. Balen, and R. A. Bombardelli. 2011b. Sperm concentration estimate of fish semen using spermatocrit method. *Revista Brasileira De Zootecnia-Brazilian Journal of Animal Science* **40**:1163-1167.
- Sanches, E. A., G. Neumann, C. P. R. Toledo, R. A. Bombardelli, P. A. Piana, and E. Romagosa. 2011c. Temperature and storage period over spermatoc parameters of jundiá, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824). *Aquaculture Research* **published online**:1-8.
- Sanches, E. A., R. Y. Okawara, D. Caneppele, R. A. Bombardelli, and E. Romagosa. 2011d. Sperm motility parameters of *Steindachneridion parahybae* studied by means of casa open source software. Page 1002 in

- WAS, editor. The Anual International Conference of World Aquaculture Society, Natal.
- Stasoft, I. 2005. Statistic (data analysis software system) Version 7.1. STATSOFT.
- Streit Jr., D. P., C. Benites, G. V. Moraes, R. P. Ribeiro, E. S. Sakaguti, and R. F. Caldieri. 2006. Características qualitativas do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) após indução hormonal. Bioscience Journal **22**:119-125.
- Streit Jr., D. P., G. V. Moraes, R. P. Ribeiro, J. A. Povh, E. D. Souza, and C. A. L. Oliveira. 2004. Avaliação de diferentes técnicas para coloração de sêmen de peixes. Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar **7**:157-162.
- Tessaro, L., Toledo C. P. R., Neumann, G., Krause, R. A., Meurer, F., Natali, M. R. N., Bombardelli, R. A. Growth and reproductive characteristics of *Rhamdia quelen* males fed of different digestible energy levels in the reproductive phase. Aquaculture **326-329**: 74-80.
- Tuset, V. M., G. J. Dietrich, M. Wojtczak, M. Slowinska, J. de Monserrat, and A. Ciereszko. 2008a. Relationships between morphology, motility and fertilization capacity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. Journal of Applied Ichthyology **24**:393-397.
- Tuset, V. M., E. A. Trippel, and J. de Monserrat. 2008b. Sperm morphology and its influence on swimming speed in Atlantic cod. Journal of Applied Ichthyology **24**:398-405.
- Viveiros, A. T. M., and H. P. Godinho. 2009. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. Fish Physiology and Biochemistry **35**:137-150.
- Viveiros, A. T. M., Z. A. Isau, H. C. P. Figueiredo, M. A. S. Leite, and A. N. Maria. 2010. Gentamycin Controls Bacterial Growth during Refrigerated Storage of Piracanjuba, *Brycon orbignyanus*, Semen. Journal of the World Aquaculture Society **41**:57-65.
- Wilson-Leedy, J. G., and R. L. Ingermann. 2006. Manual for CASA plugin for Image J.

Wilson-Leedy, J. G., and R. L. Ingermann. 2007. Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. *Theriogenology* **67**:661-672.

Wilson-Leedy, J. G., M. K. Kanuga, and R. L. Ingermann. 2009. Influence of osmolality and ions on the activation and characteristics of zebrafish sperm motility. *Theriogenology* **71**:1054-1062.

8) CONSIDERAÇÕES FINAIS

Observou-se que a utilização do pacote CASA *free* é um método eficiente, exato e objetivo na avaliação dos parâmetros espermáticos em surubim-do-paraíba, *Steindachneridion parahybae* e as configurações estabelecidas neste trabalho servirão de base para futuros estudos relacionados à qualidade espermática desta espécie. Além disso, a metodologia poderá ser empregada em estudos para outras espécies de peixes, bem como para a definição de qual característica espermática tem maior importância no procedimento de fertilização.

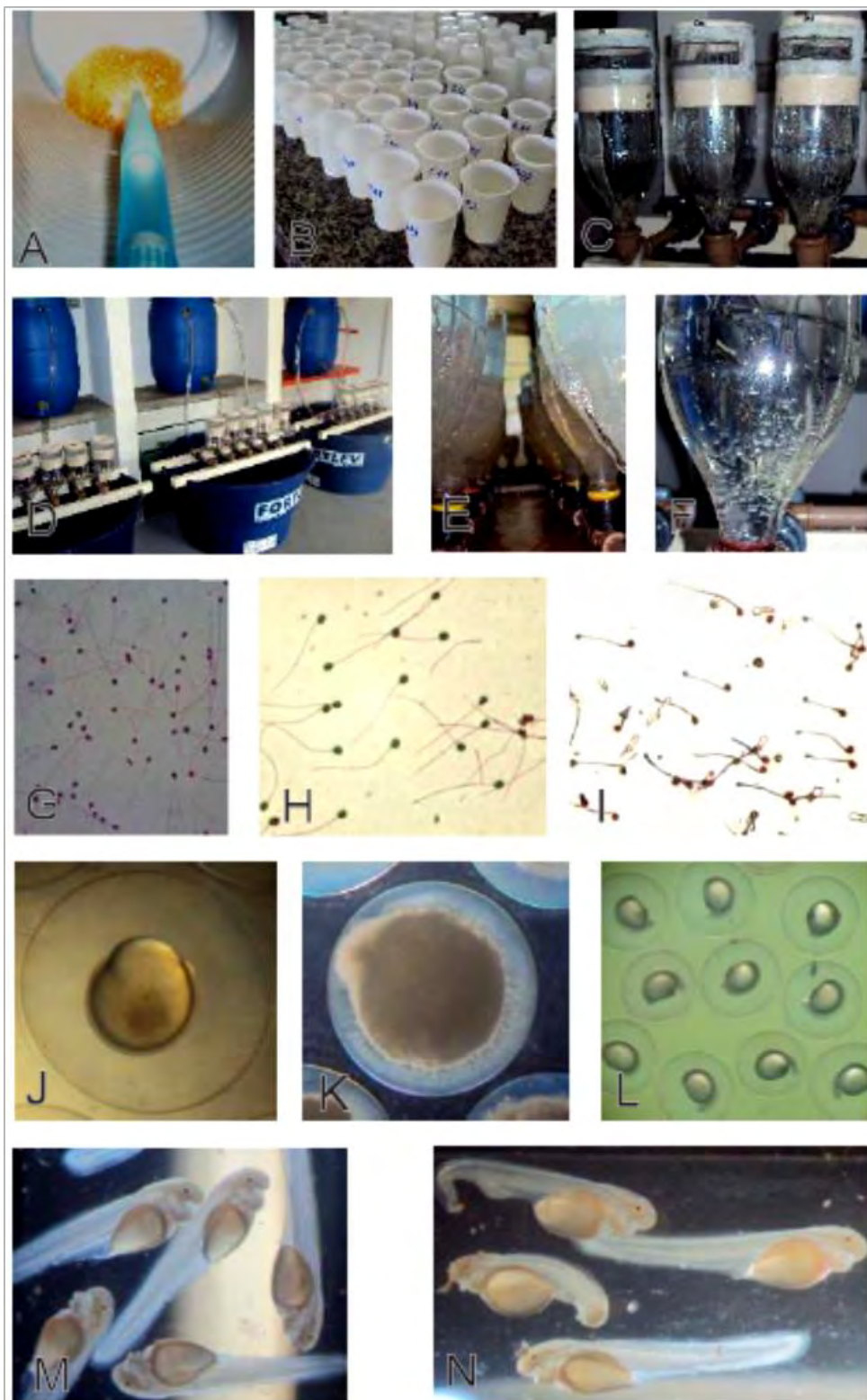
Os resultados das doses inseminantes e do volume de água obtidos são importantes na rotina de reprodução artificial da espécie, em que as quantidades de gametas e água são aplicados de forma empírica. Com a utilização das doses e volumes recomendados, além de melhorar as taxas de fertilização e eclosão de ovos, também podem ser empregados para otimização de material genético, bem como a quantidade de reprodutores. Além disso, servem de base para futuros procedimentos de criopreservação, em que deve-se ter o conhecimento da quantidade de espermatozóides congelados para posterior fertilização.

A estocagem de gametas *ex situ* de forma *in natura* é uma técnica simples e facilmente aplicada em sistemas de cultivo, e possibilita ao produtor o aproveitamento de gametas, que geralmente são descartados devido à assincronia dos reprodutores no momento da ovulação e/ou espermição, ou ao excesso de produção, no caso de sêmen. Os resultados obtidos possibilitam a manutenção da qualidade espermática e de ovócitos durante maior tempo, e ao contrário do que se esperava, o resfriamento em temperaturas baixas ($\pm 5^{\circ}\text{C}$) resulta em efeitos negativos. Diante disso, recomenda-se em rotinas de reprodução do surubim-do-paraíba a coleta do sêmen antes que os ovócitos, sendo que a qualidade pode ser prolongada em temperatura ambiental intermediária (20 a 25°C).

9) ANEXO 1.



A-Reprodutor de *Steindachneridion paraguayense*; B-Estação de Hidrobiologia e Aquicultura/CEP, Paraibuna/SP; C-Captura dos reprodutores no tanque de cultivo; D-Seleção de reprodutores; E-Canulação; F-Ovócitos com núcleo evidente; G-Ovócitos retirados pela canulação; H-Indução hormonal; I-Coleta de sêmen; J-Coleta de ovócitos; K-Pesagem dos ovócitos.

10)ANEXO 2.

A-Sêmen sendo dosado; B-Copos plásticos utilizados na fertilização; C-Unidades experimentais; D-Sistema de incubação; E-Formato das incubadoras; F-Movimento dos ovos; G-H-Espermatozóides;I-Espermatozóides defeituosos; J-Ovo normal, 95% de epibolia; K-Ovo não fertilizado (gorado); L-Embrões normais; M-Larvas recém eclodidas; N-Larvas normais e defeituosas.