

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP  
CAMPUS DE JABOTICABAL

Análise ultraestrutural e avaliação do sêmen de  
peixes neotropicais, *Brycon orbignyanus*, *Rhamdia*  
*quelen* e *Brycon hilarii* (Pisces, Teleostei)

**CAMILO ALBERTO PRIETO MOJICA**

Zootecnista

**Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Vicentini**

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

Jaboticabal

São Paulo – Brasil

2004

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP  
CAMPUS DE JABOTICABAL

Análise ultraestrutural e avaliação do sêmen de  
peixes neotropicais, *Brycon orbignyanus*, *Rhamdia*  
*quelen* e *Brycon hilarii* (Pisces, Teleostei)

**CAMILO ALBERTO PRIETO MOJICA**

Zootecnista

Jaboticabal  
São Paulo – Brasil  
2004

*Impossível é apenas uma palavra simples usada por gente fraca que prefere viver no mundo como está em vez de usar o poder que tem para mudá-lo. Impossível não é um fato. É uma opinião. Impossível não é uma declaração. É um desafio. Impossível é hipotético. Impossível é temporário.*

**NADA É IMPOSSÍVEL!!**

**MUHAMMAD ALI**

## DEDICATORIA

Dedico a realização deste trabalho aos meus pais, **Julio Abel** e **María Fanny** pelo apoio oferecido nesta etapa da minha vida, pelo exemplo de perseverança e integridade diante das dificuldades, com eles aprendi que as conquistas pessoais não alterarão a humildade pessoal.

Aos meus irmãos, **Andrea del Pilar** e **José Ignacio**, pelo apoio, carinho e amor recebidos durante todo o tempo que me mantive afastado.

À minha avó, **“Mamá Trina”**, por manter a família sempre unida.

Ao **“Patojo” (Carlitos)**, que nos deixou precocemente, mas soube ser, com todas as suas limitações e dificuldades, uma lição de vida.

“Que Deus e a Virgem Maria os abençoe e proteja sempre”

## **AGRADECIMENTOS**

- Ao Centro de Aqüicultura da UNESP (CAUNESP) – Campus de Jaboticabal – SP (Brasil), à sua Diretora, Profa. Dra. Elisabeth Urbinati pela oportunidade de realização deste trabalho.
- Ao Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura do CAUNESP, ao seu coordenador, Prof. Dr. Luiz Edivaldo Pezzato por possibilitar o crescimento acadêmico e intelectual na área de aqüicultura de águas continentais.
- Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Alberto Vicentini, pela oportunidade, confiança e amizade a mim concedidos para a execução deste trabalho e também pelo grande exemplo de profissionalismo.
- Aos membros da Banca examinadora: Profa. Dra. Máira Aparecida Stefanini e Profa. Dra. Silvana Martinez Baraldi Artoni, pelas valiosas sugestões para enriquecimento deste trabalho.
- À Profa. Dra. Maria Terezinha Siqueira Bombonato, pelas sugestões dadas ao trabalho na ocasião da qualificação.
- Ao Dr. José Augusto Senhorini e ao Biólogo Luis Alberto Gaspar, pesquisadores do Centro Nacional de Pesquisa em Peixes Tropicais (CEPTA) – Pirassununga – SP (Brasil), por permitir a coleta do material utilizado neste trabalho.
- Ao Prof. Dr. César Esper e à Dra. Tânia Cavalcante pela ajuda nas análises do sêmen, junto ao laboratório de Reprodução Animal da UNESP – Jaboticabal.
- Ao Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências do Câmpus de Botucatu – UNESP, pelo processamento do material e pela

disponibilidade de utilização dos equipamentos para análise ultraestrutural.

- À Profa. Dra. Irene Bastos Franceschini Vicentini, pelo grande apoio sugestões e amizade oferecidas no decorrer deste trabalho.
- Aos funcionarios do CAUNESP, Veralice, Thais, Fátima, D. Ana, Suerli, Mauro, Márcio Reche, Márcio Alves, Valdecir, Roberto, Elisandra, Mônica, Donizete e Gisele, pelo convívio, prontidão e amizade.
- A todos os Professores que ministraram disciplinas junto ao Programa de Pós – Graduação do CAUNESP, por compartilharem conhecimentos e experiências.
- Aos meus colegas: Antonio Francisco, Eduardo Abimorad, Karina Ribeiro e Eduardo Onaka, Fabiana Garcia, Mariana C. Araújo e Nilton Ishikawa, Fabiana Pilarski, Luciane Sperandio, Leonardo Takahashi, Fabiano Bendhack e Ana Paula Baldan, Luciana Ganeco e Peter Kirschnik, Michelle Vetorelli e Laurindo Rodrigues, Cristiane Fátima, Divina Suedi Godoi, Andrea, Solange Arrolho, Alessandra, Jaime Fenerick Junior, Sergio, Neidison Colombano, Luis Carlos Paggi, que direta ou indiretamente apoiaram e contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, e cada um a sua maneira, souberam me ajudar a crescer principalmente como pessoa.
- Aos Colombianos que residem e residiram em Jaboticabal, Adriana Muñoz, Camilo Ernesto, Anita, Silvia, Francisco, Henry, Diana e Javier, Andrey, Cristina, Juan Pablo, Mauricio, Olga e Juliana, por ajudar a não esquecer da nossa Colômbia.
- Agradeço especialmente a Ana Isabel Sanabria e Miguel Angel Landines, pela contribuição, ajuda e amizade oferecida sempre. Muito Obrigado!.

- À Luciene Patrici Papa, pela amizade e valiosa ajuda oferecida nas coletas do material.
  
- Aos meus amigos Fabio & Ana Ligia e Daniela & Gustavo, pelo tempo de convivência ao longo desta etapa, pelos belos e inesquecíveis momentos compartilhados. Vocês sempre vão morar no meu coração!.
  
- Ao meu grande amigo Flavião, pelas longas conversações noturnas, acompanhadas sempre de umas “geladinhos”.
  
- Aos meus amigos Profa. Dra. Ana Eliza Bacarim e seu esposo Antonio Fernando Gervásio Leonardo, pessoas inesquecíveis, obrigado pelo seu apoio, sua grande amizade, seu bom humor e suas brincadeiras alegres.
  
- Ao Marcelo Tesser, grande amigo e colega, pena que torça por um time que só faz sofrer aos seus torcedores. “Ogrão” Muito Obrigado!!.
  
- À Adriana Fernandes de Barros, “O amigo é aquele que embora o vento sopra, não se mexe. Aquele que embora não seja bem tratado, sempre está aí. Aquele que embora você esteja zangado, sempre vai ter um sorriso e uma palavra para oferecer”. Esse é você!!.
  
- E como não agradecer aos meus “amigos da pós”. Muito Obrigado!.
  
- A todos aqueles que de alguma forma participaram de minha formação e sempre me incentivaram na minha Carreira Universitária, aqui omitidos, porém não esquecidos. A todos MUITO OBRIGADO!.

## SUMÁRIO

Página

RESUMO.....	2
ABSTRACT.....	4
INTRODUÇÃO.....	6
1. Considerações Gerais.....	7
2. Características Físicas e Químicas do Sêmen em Peixes.....	14
2.1 Motilidade espermática.....	14
2.2 Concentração espermática.....	16
2.3 Viabilidade espermática.....	17
2.4 Ativação da motilidade espermática.....	18
3. Características Ultraestruturais dos Espermatozóides em Peixes.....	21
MATERIAL E MÉTODOS.....	24
1. Exemplares utilizados.....	25
2. Locais de coleta.....	25
3. Extração do sêmen.....	25
4. Avaliação seminal.....	26
4.1 Motilidade dos espermatozóides.....	26
4.2 Viabilidade dos espermatozóides.....	26
4.3 Concentração de espermatozóides.....	27
4.4 Espermatócrito.....	28
4.5 Análise do plasma seminal.....	28
4.5.1 Concentração de íons e osmolaridade.....	28
4.6 Análise estrutural e ultraestrutural dos espermatozóides.....	28
RESULTADOS.....	30
1. Características físico-químicas do sêmen.....	31
1.1. Piracanjuba.....	31
1.2. Jundiá.....	33
1.3. Piraputanga.....	33
2. Morfologia dos espermatozóides.....	34
2.1. Piracanjuba.....	34
2.2. Jundiá.....	35
2.3. Piraputanga.....	36
DISCUSSÃO.....	41
CONCLUSÕES.....	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53



## RESUMO

Amostras de sêmen e testículo foram coletadas de exemplares machos e adultos de Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*), Jundiá (*Rhamdia quelen*) e Piraputanga (*Brycon hilarii*) no Centro de Aqüicultura da UNESP (CAUNESP) – Jaboticabal – SP (Brasil) e no Centro Nacional de Pesquisa em Peixes Tropicais (CEPTA) – Pirassununga SP (Brasil). Análises macroscópicas evidenciaram características relacionadas à cor, aspecto e volume. Microscopicamente foram avaliadas: Motilidade, viabilidade e concentração dos espermatozóides. Bioquimicamente foram analisados os principais componentes do plasma seminal, íons (sódio, potássio, magnésio e cálcio), osmolaridade e concentração de glicose. Para a realização dos estudos ultraestruturais, fragmentos dos testículos foram fixados em glutaraldeído 2,5% e processados segundo rotina de microscopia eletrônica de transmissão. O objetivo deste trabalho foi analisar, comparativamente, os parâmetros seminais e a estrutura dos espermatozóides de 3 espécies de peixes neotropicais (Piracanjuba, *Brycon orbignyanus*, Piraputanga, *Brycon hilarii* e Jundiá, *Rhamdia quelen*). Na piracanjuba, o sêmen apresentou coloração amarelada e aspecto aquoso. Em jundiá a cor do sêmen é branca e o aspecto cremoso. Na piraputanga a coloração do sêmen é esbranquiçada e o aspecto leitoso. Se comparamos estas características com a concentração espermática encontrada em piracanjuba ( $2,72 \times 10^9 \pm 1,92 \times 10^9$  sp/mL), jundiá ( $4,57 \times 10^{10} \pm 1,50 \times 10^{10}$  sp/mL) e piraputanga ( $6,46 \times 10^9 \pm 2,72 \times 10^9$  sp/mL) e com os valores do espermatócrito (5,5%, 93,5% e 16,6% respectivamente), podemos concluir que quanto mais cremoso for o sêmen, maior será sua concentração espermática. A piracanjuba apresentou o menor valor de porcentagem de motilidade espermática ( $77 \pm 6,74\%$ ). Por outro lado, observou-se que a composição iônica varia entre as espécies e dentro das mesmas, devido a fatores como o meio ambiente ou época de reprodução. Ressalta-se assim a importância do conhecimento da composição do plasma seminal para o desenvolvimento de diluidores para cada espécie. Referente às características ultraestruturais dos espermatozóides de *Brycon orbignyanus*, *Rhamdia quelen* e *Brycon hilarii*, observamos que estes apresentam o padrão ancestral, característico das espécies com fecundação externa: cabeça arredondada,

sem acrossoma, peça intermediária com poucas mitocôndrias e flagelo longo. Podemos concluir que as características seminais nas três espécies analisadas são diferentes, sendo cada característica específica para cada espécie e que ultraestruturalmente, os espermatozoides de *Brycon orbignyanus*, *Rhamdia quelen* e *Brycon hilarii* apresentam características ancestrais próprias de peixes com fecundação externa classificando-os como aquaesperma do Tipo I.

**Palavras chave:** *Brycon*, *Rhamdia*, espermatozoides, sêmen, reprodução

## ABSTRACT

Semen and testes samples were collected of male adults of Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*), Jundiá (*Rhamdia quelen*) and Piraputanga (*Brycon hilarii*) in the Aquaculture Center of UNESP (CAUNESP) – Jaboticabal – SP (Brazil) and in the National Center of Research in Tropical Fish (CEPTA) – Pirassununga – SP (Brazil). Macroscopic analyses evidenced characteristics related to the color, aspect and volume. It was microscopically appraised: The motility, viability and cell concentration of the sperm. The main biochemistry components of the seminal plasm, ionic (sodium, potassium, magnesium and calcium), osmolality and glucose concentration were analyzed. For the accomplishment of the ultrastructural studies, fragments of testicular tissue were fixed in glutaraldehyde 2,5% and processed according to transmission electron microscope routine. The aim of this study was analyze comparatively, the seminal parameters and the structure of the spermatozoon of 3 neotropical fish species (Piracanjuba, *Brycon orbignyanus*, Piraputanga, *Brycon hilarii* and Jundiá, *Rhamdia quelen*). In the piracanjuba, the semen is yellowish and with aqueous aspect. In jundiá the color of the semen is white and with creamy aspect. In the piraputanga the coloration of the semen is whitish and milky aspect. Comparing these characteristics with the sperm concentration found in piracanjuba ( $2,72 \times 10^9 \pm 1,92 \times 10^9$  sp/mL), jundiá ( $4,57 \times 10^{10} \pm 1,50 \times 10^{10}$  sp/mL) and piraputanga ( $6,46 \times 10^9 \pm 2,72 \times 10^9$  sp/mL) and with the values of the spermatocrit (5,5%, 93,5% and 16,6% respectively), we can observed that the more creamy semen, the bigger the sperm concentration. The piracanjuba presented the smallest value of percentage of sperm motility ( $77 \pm 6,74\%$ ). On the other hand, it was observed that the ionic composition varies among the species and inside of the same ones, due to factors as the environment or to the reproduction season. It is stood out like this the importance of the knowledge of the composition of the seminal plasm for each species. Regarding the ultrastructural characteristics of the *Brycon orbignyanus*, *Rhamdia quelen* and *Brycon hilarii* spermatozoon, we observed that these present the ancestral pattern, characteristic of the species with external fecundation: round head, without acrosome, midpiece with little mitochondria and long flagellum. We can conclude that the seminal characteristics on the three analyzed species are

different, being each characteristic specific for each species and ultrastructurally, the spermatozoon of *Brycon orbignyanus*, *Rhamdia quelen* and *Brycon hilarii* present their own ancestral characteristics of fish with external fecundation, classifying them as aquasperm Type I.

**Key Words:** *Brycon*, *Rhamdia*, spermatozoon, sperm, reproduction

## ***Introdução***

## 1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A preservação de gametas é considerada uma importante ferramenta para laboratórios de produção de alevinos, pois haverá economia na manutenção dos reprodutores e prevenção de perdas de linhagens geneticamente melhoradas. Permitirá ainda, facilidade no transporte de material genético entre laboratórios, dentro e fora do país e maior cuidado na prevenção de transmissão de doenças, permitindo a introdução de novas linhagens com risco mínimo de patógenos, nos peixes cultivados (TIERSCH, 1995).

Para se obter sucesso no processo de congelamento de sêmen, é preciso ter material fresco e de boa qualidade, aliado a uma técnica apropriada de criopreservação. A qualidade do sêmen pode ser afetada por condições adversas, tanto no processo de espermatogênese, armazenamento intratesticular, assim como pelo tempo de permanência dos espermatozóides nos ductos testiculares (CIERESZKO *et al.*, 2000).

BILLARD & COSSON (1992), observaram que amostras coletadas no início e ao final da época de reprodução, geralmente não são de boa qualidade. A causa da baixa qualidade no início não é conhecida, entretanto, ao final da época de reprodução, esta condição pode ser ocasionada pelo envelhecimento dos espermatozóides nos testículos.

TOTH *et al.* (1997) e LAHNSTEINER (2000), ressaltaram a importância de se conhecer as características morfológicas e funcionais dos espermatozóides, para o estudo básico da biologia reprodutiva e para a produção em cativeiro de qualquer espécie íctica, assim como, para o desenvolvimento de técnicas dirigidas à conservação de espécies nativas.

O sêmen é composto pelo plasma seminal e pelos espermatozóides. Entretanto, a concentração dos componentes do plasma seminal pode variar de indivíduo para indivíduo, dentro de uma espécie. Cabe destacar, que sua

função é prover um ótimo ambiente para o armazenamento dos espermatozóides dentro e fora dos testículos (CIERESZKO *et al.*, 2000).

O plasma seminal, na maioria dos teleósteos, é um produto sintetizado nos testículos e nos ductos espermáticos (LAHNSTEINER *et al.*, 1994), considerando que muitas espécies não apresentam glândulas acessórias. Porém, algumas exceções são observadas nas subordens *Gobioidei* e *Blennioidea*, e em *Clarias gariepinus* (PATZNER, 1991). Alguns componentes do plasma seminal não são secretados, mas sim podem ser originados de células espermáticas em decomposição (CIERESZKO *et al.*, 2000).

O plasma seminal contém principalmente compostos minerais e baixas concentrações de substâncias orgânicas. Três íons predominam na sua composição: sódio, potássio e cloro. Suas concentrações podem variar entre 75 e 175 mM para o sódio, 32 e 86 mM para potássio, e 112 a 183 mM para o cloro (SUQUET *et al.*, 1994). Os íons cálcio e magnésio também contribuem significativamente na composição iônica do plasma seminal, e suas concentrações estão entre 1 a 2 mM (CIERESZKO *et al.*, 2000). Estes íons são importantes na regulação da motilidade espermática, assim como na osmolaridade do plasma seminal, além de seu efeito direto na ativação espermática (BILLARD & COSSON, 1992).

Até o momento, têm sido considerados dois mecanismos que mantêm imóveis os espermatozóides no fluido seminal, em peixes de água doce. O primeiro mecanismo, observado em salmões principalmente, está baseado na concentração do íon potássio; quando sua concentração está elevada (acima de 40 mM), a motilidade é inibida, e posteriormente ativada, quando sua concentração diminui (menor de 25 mM). O segundo mecanismo, presente na maioria das espécies, está baseado na diferença da osmolaridade do plasma seminal com a do meio ambiente. A motilidade espermática, em espécies de água doce, é inibida quando a osmolaridade do ambiente é maior em relação ao plasma seminal (acima de 300 mOsm/Kg), e ativada quando a osmolaridade ambiental é menor que 200 mOsm/Kg, (CIERESZKO *et al.*, 2000).

SUQUET *et al.* (1993), destacaram que a descrição das características físicas e químicas do plasma seminal é um pré-requisito importante no desenvolvimento de diluidores para inseminação ou armazenamento dos espermatozóides.

Os estudos realizados sobre a qualidade do sêmen em peixes, têm demonstrado variações individuais nos parâmetros avaliados, tais como: concentração espermática, motilidade, composição do plasma seminal, capacidade para fertilizar e ser armazenado. Segundo RANA (1995), estas variações podem ser ocasionadas, devido à variabilidade genética, envelhecimento dos espermatozóides, sazonalidade ou ainda, pelo tipo de técnica utilizada para se coletar o sêmen.

Em algumas espécies, como Salmão do Atlântico (*Salmo salar*) (RANA, 1995), ou na Carpa (*Cyprinus carpio*) (BILLARD *et al.*, 1995a) a contaminação com urina aumentou a variabilidade da composição do plasma seminal, além de reduzir a osmolaridade e aumentar a concentração do íon potássio. Em alguns casos como no Catfish, a urina de baixa osmolaridade (<100 mOsm/Kg), se adicionada ao sêmen, provoca um choque hiposmótico nos espermatozóides, iniciando assim sua motilidade precoce e diminuindo sua capacidade para fertilizar os ovos (SAAD & BILLARD, 1995).

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

Segundo SALISBURY & VANDERMARK (1964), o estudo do sêmen pela determinação do volume coletado, motilidade e concentração de espermatozóides, serve de base para a diluição do material fecundante e medem a capacidade de produção do sêmen, em cada reprodutor.



Trabalhos descrevendo as características seminais com espécies autóctones foram relatados por KAVAMOTO & FOGLI DA SILVEIRA (1986) em bagre, *Rhamdia hilarii*; KAVAMOTO *et al.*, (1986); KAVAMOTO *et al.*, (1996) e KAVAMOTO *et al.*, (1997) em curimatã, *Prochilodus scroffa*; FOGLI DA SILVEIRA *et al.*, (1990) em pacu, *Piaractus mesopotamicus*; ANDRADE-TAMELLI *et al.*, (2001) em piabanha, *Brycon insignis*; FERREIRA *et al.*, (2001) em Jundiá, *Rhamdia quelen* e LUZ *et al.*, (2001) em suruvi, *Steindachneridion scripta*.

É importante notar, que estes trabalhos foram feitos com o uso de indutores hormonais, com o propósito de se obter maior quantidade de material fecundante. Assim sendo, no presente trabalho objetivou-se avaliar as características seminais sem o uso de indutores, com o propósito de padronização das mesmas. Entretanto, os critérios utilizados para a avaliação do sêmen de peixes, até o presente momento, têm sido baseados em exames da motilidade, concentração espermática e porcentagem de espermatozoides vivos e mortos (KAVAMOTO *et al.*, 1985), sem levar em consideração a ocorrência de defeitos morfológicos nas células espermáticas.

Os espermatozoides de peixes teleósteos não apresentam acrossoma, e a ausência desta estrutura é compensada pela presença de uma micrópila, um orifício presente no córion dos ovos, por onde penetram os espermatozoides para começar o processo de fertilização (COSSON *et al.*, 1999).

Estudos comparativos da morfologia dos espermatozoides de peixes teleósteos permitiram distinguir três categorias de espermatozoides, de acordo com a sua forma e seu grau de evolução. O primeiro tipo é constituído de espermatozoides, como os da carpa, pouco elaborados, com cabeça ovalada, mitocôndrias e citoplasma confinados na parte posterior da cabeça, sem formação de uma peça intermediária verdadeira. O segundo tipo é constituído de espermatozoides, como os da truta, com cabeça ligeiramente alongada e peça intermediária na sua parte posterior, formada por um colar de mitocôndrias, que às vezes se encontram fundidas. O terceiro tipo, representado pelos espermatozoides de lebistes, apresentando cabeça muito

alongada, simetria bilateral, mitocôndrias organizadas na parte posterior da cabeça, constituindo a peça intermediária (BILLARD, 1970). Pode-se considerar este terceiro tipo como o mais elaborado ou o que possui maior vantagem adaptativa.

O diâmetro da cabeça pode variar de 2 a 4  $\mu\text{m}$ , segundo o descrito por LINHART *et al*, (1991), onde este comparou a morfologia dos espermatozoides de 30 espécies de peixes, encontrando algumas exceções como nos espermatozoides de enguias e de esturjão, onde observou espermatozoides com cabeças alongadas, medindo 10  $\mu\text{m}$  de comprimento e menos de 2  $\mu\text{m}$  de largura. Por outro lado, relata-se variações no comprimento dos flagelos.

A maioria dos espermatozoides são alongados, com uma peça intermediária variando em tamanho, e geralmente encontrada na parte posterior do núcleo. Em alguns espermatozoides primitivos esta pode ser tão grande quanto o núcleo (BILLARD *et al*, 1995b). O número de mitocôndrias varia entre as espécies (2 a 9 mitocôndrias por espermatozoide), e se apresentam frequentemente em forma de colar. Os espermatozoides de peixes apresentam um flagelo, porém algumas espécies como *Ictalurus punctatus* e *Poecilia reticulata*, podem apresentar dois flagelos (BILLARD *et al*, 1995b; COSSON *et al*, 1999). Esta característica está fortemente relacionada com a duração da motilidade (YAO *et al*, 1999).

Embora vários autores tenham realizado um levantamento de dados a respeito da ultraestrutura dos espermatozoides (JAMIESON, 1991; MATTEI, 1991; QUAGIO-GRASSIOTTO & CARVALHO, 2000), em diversos grupos de peixes, foi observado que ainda são escassos estudos sobre a morfologia testicular e avaliação do sêmen em teleósteos neotropicais. Por isto, a partir do conhecimento morfofuncional dos gametas, a sua biologia, fisiologia e metabolismo, é possível desenvolver biotécnicas que contribuirão para preservar e fornecer às espécies nativas alternativas para a sua produção e conservação (LAHNSTEINER, 2000; GWO *et al.*, 1999; CORLEY-SMITH & BRANDHORST, 1999).

Nos últimos anos, o cultivo e a preservação de algumas espécies nativas do Brasil, como a Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*), o Jundiá (*Rhamdia quelen*) e a Piraputanga (*Brycon hilarii*), têm sido muito relevante, não só por sua importância econômica, como também ambiental. Por isso que se faz necessária a ampliação de conhecimentos básicos que resultem na obtenção de sucesso nos processos de reprodução, crescimento em cativeiro e desenvolvimento de técnicas de conservação destas espécies.

Uma espécie que vem se destacando na piscicultura nacional é a piracanjuba, *Brycon orbignyanus*, não só por sua carne de excelente qualidade, sendo considerado um dos mais saborosos peixes de água doce, mas também por ser muito apreciada em pescas esportivas, devido ao seu comportamento agressivo quando fisgado, além de apresentar rápido crescimento e facilidade de cultivo (MENDOÇA, 1994; MELO, 1994; VAZ *et al.*, 2000). É considerada uma das principais espécies do gênero *Brycon*, apresentando ampla distribuição geográfica e sendo encontrada na bacia fluvial do Paraná e Uruguai (SACCOL, 2002).

A piracanjuba é uma espécie adaptada às temperaturas das regiões sul-sudeste brasileiras, que vem desaparecendo devido à destruição das matas ciliares, poluição, represamento de rios e diminuição de lagoas marginais, em decorrência da construção de usinas hidrelétricas e drenagem para a agricultura. (PAIVA, 1982; SENHORINI *et al.*, 1994; VAZ *et al.*, 2000).

ZAIDEN (1997) e ALTHAMER (1999), estudaram a estrutura testicular da piracanjuba, nos vários estádios do ciclo sexual apontando que os testículos desta espécie correspondem ao tipo lobular, espermatogonial irrestrito, ocorrendo nele o processo de espermição total; e que a espermatogênese ocorre de maneira sincrônica dentro dos cistos espermáticos, onde todas as células germinativas se apresentam, geralmente, na mesma fase de desenvolvimento.

ALTHAMER (1999), estudou a ultraestrutura das células de Leydig e das células císticas, bem como dos demais componentes do interstício testicular da

piracanjuba, encontrando no compartimento interlobular vasos sangüíneos, células mióides, fibras colágenas e células de Leydig, enquanto o compartimento intralobular é constituído por espermatogônias primárias isoladas, cistos de células germinativas em diferentes estádios de desenvolvimento e espermatozóides na luz do lóbulo seminífero.

GANECO (2003), fez uma análise estrutural do processo de fertilização e do desenvolvimento embrionário em piracanjuba, atentando para o fato de esta espécie apresentar dificuldades na reprodução em cativeiro, pois ocorrem bloqueios no seu ciclo gonadal, só se reproduzindo artificialmente, por meio de indução hormonal, e mesmo nestas condições sem muito sucesso. Assim, o estudo das características seminais é uma contribuição importante para às tentativas de reintrodução desta espécie nos rios.

A piraputanga, *Brycon hilarii* é uma espécie originária da Bacia Platina formada pelos rios Paraná, Paraguai, Uruguai e seus afluentes (GERY & MAHNERT, 1992) e vem despertando grande interesse devido ao sabor agradável de sua carne e seu comportamento agressivo ao ser fisgada, característica esta, essencial à pesca esportiva, sendo muito procurada em pesque-pagues (ZAIDEN, 2000).

Embora a tecnologia de reprodução artificial em espécies do gênero *Brycon* ainda não esteja totalmente desenvolvida, estas espécies, inclusive a Piraputanga, estão sendo distribuídas em várias regiões do país, sem, no entanto, existir grande conhecimento de sua biologia, sobrevivência, capacidade reprodutiva, nutrição e possibilidade ou não de adaptação em regiões diferentes da sua origem, que são aspectos de fundamental importância para a otimização do cultivo de peixes, minimizando as perdas e aumentando os lucros. (ZAIDEN, 2000).

ZAIDEN (2000), estudando a biologia reprodutiva da piraputanga através de análises morfológicas das gônadas e das várias modificações de parâmetros bioquímicos metabólicos (concentrações de carboidratos, lipídeos e proteínas, sangüíneos e teciduais) durante o ciclo reprodutivo anual de

exemplares mantidos em cativeiro, descreveu os espermatozóides de piraputanga à ultraestrutura.

O jundiá, *Rhamdia quelen*, é encontrado desde o centro da Argentina até o sul do México, e seu cultivo está aumentando no sul do Brasil. *R. quelen* pode atingir 50cm de comprimento e 3 Kg de peso, possui hábito noturno e habita locais calmos e profundos dos rios. Esse peixe é onívoro, com tendência piscívora e sua maturidade sexual é atingida no primeiro ano de vida apresentando dois picos reprodutivos por ano, um no verão e outro na primavera, e desova múltipla (DE CARVALHO GOMES et al., 2000).

Segundo, FERREIRA (2000), o cultivo de jundiá, vem crescendo ao sul do Brasil em função de seu aparente potencial de crescimento no inverno, apresentando rusticidade e resistência às baixas temperaturas.

Embora, sejam encontrados trabalhos sobre avaliação seminal em jundiá (FERREIRA et al., 2001), e em piracanjuba (BEDORE, 1999), o presente estudo traz contribuições adicionais, como avaliações bioquímicas do plasma seminal (concentração de íons, glicose e osmolaridade), provendo informações que auxiliam na melhora das condições ambientais no momento da fertilização, assim como, no desenvolvimento de metodologias para a preservação dos espermatozóides. Contudo, também objetivou-se comparar as características seminais e ultraestruturais das células espermáticas de três espécies de peixes neotropicais.

## **2. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E QUÍMICAS DO SÊMEN EM PEIXES**

Estudos sobre a composição do sêmen têm demonstrado grandes variações intraespecíficas e interespecíficas, principalmente na concentração espermática e na composição do plasma seminal. Estas variações têm sido atribuídas a fatores como variabilidade genética, envelhecimento dos espermatozóides no testículo, sazonalidade, estado reprodutivo e estratégia reprodutiva (RANA, 1995; SHANGGUAN & CRIM, 1995). A respeito da qualidade da composição do plasma seminal, LAHNSTEINER et al (1995),

estabeleceram que o sêmen apto para a criopreservação deve conter osmolaridade elevada (acima de 320 mOsm/Kg) e pH menor que 8.2.

O parâmetro mais utilizado para a avaliação seminal é a motilidade e, dentro desta variável, as células espermáticas apresentam características espécie-específicas, como por exemplo: o início, duração e padrão da motilidade (COSSON *et al*, 2000).

## **2.1. Motilidade espermática**

Os espermatozoides de peixes são imóveis e inativos enquanto permanecem na luz testicular. A motilidade ocorre após a espermição em um meio aquoso ou, em espécies com fertilização interna, dentro do trato reprodutivo feminino, sugerindo que a motilidade é inibida por fatores químicos específicos dos testículos ou do fluido seminal (STOSS, 1983; MORISAWA, 1985). Em algumas espécies, altas concentrações de cátions (Potássio), pH ácido e condições isotônicas poderiam ser os responsáveis pela inibição da motilidade espermática. Mudanças em alguns destes fatores, tais como a diluição de íons, variações de pH e o aumento da osmolaridade em teleósteos marinhos ou sua diminuição em teleósteos de água doce, ativam a motilidade (MORISAWA *et al*, 1999 apud COSSON *et al*, 2000; STOSS, 1983; MORISAWA & SUSUKI, 1980). A motilidade é o fator mais utilizado para avaliar a qualidade espermática entre as espécies, embora, espermatozoides inférteis tenham apresentado algum tipo de motilidade (BILLARD *et al*, 1995b).

Os principais problemas limitantes de pesquisas em motilidade espermática consistem em sua curta duração e na dificuldade de se obter uma mistura homogênea do sêmen com a solução ativadora no momento da análise (COSSON *et al*, 1999). A duração da motilidade pode ser de 1 hora, como observado em *Poecilia reticulata*, ou de 20 a 25 segundos, como observado em trutas (COSSON *et al*, 1999). Em algumas espécies marinhas com fertilização interna, *Macrozoarces americanus* a duração da motilidade pode exceder 48 horas (YAO *et al*, 1999).

Em outras espécies, como no esturjão, foram observadas porcentagens de motilidade de 90 a 100%, velocidade de 175  $\mu\text{m/s}$  e períodos de motilidade de 4 a 6 minutos ativados em água destilada e com duração de 7 a 8 minutos quando a solução de ativação é alterada (COSSON *et al*, 2000). Entretanto, em trutas as porcentagens de motilidade foram de 90% (GLOGOWSKI *et al*, 2000) e em *Cyprinus chalcoides*, de 73,4% e velocidade de 90,6  $\mu\text{m/s}$ . Em *Cottus hangiongensis*, as porcentagens de motilidade foram de 93,1% mas com ampla variação na duração da motilidade espermática, de 10 a 70 minutos (OHTA & SHINRIKI, 1998). No *Macrozoarces americanus* a porcentagem da motilidade variou de 50 a 70% (YAO *et al*, 2000) e em *Epinephelus malabaricus* a duração da motilidade apresentou variações de 2 a 40 minutos (GWO, 1993).

A qualidade do sêmen em termos de motilidade espermática é usualmente expressa pela percentagem de espermatozoides móveis em sêmen adequadamente ativado. Na análise da motilidade do sêmen de bagre (*Rhamdia sapo*), MAGGESE *et al.*, (1984) estabeleceram uma escala arbitrária de 0 a 2: onde, 0 indica espermatozoides imóveis, 1 – espermatozoides com movimentos vibratórios e 2 – espermatozoides com motilidade direcional. FAUVEL *et al.* (1999) basearam-se na escala de 0 a 5, na qual, 0 significa imobilidade, 1- de 0 a 20% de células móveis, 2 – de 20 a 40%, 3 – de 40 a 60%, 4 – de 60 a 80%, e 5 – de 80 a 100% de células móveis. FOGLI DA SILVEIRA *et al.* (1990) avaliaram a motilidade espermática de sêmen de pacu-caranha (*P. mesopotamicus*), estimando a percentagem de células móveis na escala de 0 a 100%. KAVAMOTO & FOGLI DA SILVEIRA (1986) também usaram o mesmo método para avaliação da motilidade do sêmen de bagre (*Rhamdia hilari*).

LAHNSTEINER *et al.* (1995), consideraram que o valor da percentagem de motilidade deveria ser exibido juntamente com o tipo de movimentação dos espermatozoides, por exemplo, percentagem de espermatozoides com movimento circular, percentagem com movimento não linear, percentagem de espermatozoides com movimento linear e dentro destes últimos, a velocidade de movimentação.

## 2.2. Concentração espermática

A concentração espermática é uma das medidas quantitativas mais importantes utilizadas na pesquisa e rotina de avaliação do sêmen de peixes de fecundação externa ou interna, para maximizar o aproveitamento do material fecundante e para se obter melhores resultados na fertilização (FOGLI DA SILVEIRA *et al.*, 1987).

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

Em peixes teleósteos, a concentração espermática pode variar de  $2 \times 10^6$  a  $6,5 \times 10^{10}$  espermatozóides por ml de sêmen, segundo dados obtidos por LEUNG & JAMIESON (1991). No peixe pá (*Chaetodipterus zonatus*) e no esturjão (*Acipenser baeri*) foram relatadas variações na concentração espermática de  $0,1 \times 10^9$  a  $4 \times 10^9$ /ml (COSSON *et al.*, 2000), em truta arco-íris de 6,03 a  $10,01 \times 10^9$ /ml (GLOGOWSKI *et al.*, 2000), e em *Epinephelus malabaricus* de 4,2 a  $8,6 \times 10^9$ /ml (GWO, 1993). Assim, observou-se nos dados acima mencionados, ampla variação da concentração espermática, devido aos fatores ambientais, hormonais ou de manejo, que influenciam na qualidade e na quantidade do sêmen.

A concentração espermática de algumas espécies neotropicais de água doce encontra-se na Tabela 1.



Tabela 1. Concentração espermática de algumas espécies neotropicais de água doce.

Família / Espécie	Nome popular	Concentração espermática (espermatozoides x 10 <sup>9</sup> /mL)	Autor(es)
<b>Família Characidae</b>			
<i>Brycon orbignyanus</i>	Piracanjuba	10 ± 4,3 – 14 ± 8,4	BEDORE (1999)
<i>Salminus maxillosus</i>	Dourado	4,3 – 10,8	GODINHO & CÓSER (1995)
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	Pacu-caranha	28,07 ± 8,2	FOGLI DA SILVEIRA <i>et al.</i> (1990)
		7,1 – 11,1	GODINHO & CÓSER (1995)
		36,6 ± 16,5 – 48,1 ± 38,6	BEDORE (1999)
<b>Família Anostomidae</b>			
<i>Leporinus elongatus</i>	Piapara	7,0 – 16,0	GODINHO & CÓSER (1995)
<i>Leporinus obtusidens</i>	Piapara	6,625 – 52,250	MURGAS <i>et al.</i> (1999)
<b>Família Prochilodontidae</b>			
<i>Prochilodus lineatus</i>	Curimatá	34,19	KAVAMOTO <i>et al.</i> (1986)
		13,3 – 20,5	GODINHO & CÓSER (1995)
<i>Prochilodus marggravii</i>	Curimatá-pacu	19,2 – 26,6	GODINHO & CÓSER (1995)
<b>Família Pimelodidae</b>			
<i>Pseudoplatystoma coruscans</i>	Surubim	8,0 – 16,0	GODINHO & CÓSER (1995)
<i>Rhamdia hilarii</i>	Bagre	55,8	FOGLI DA SILVEIRA <i>et al.</i> (1985)
		63,5	KAVAMOTO & FOGLI DA SILVEIRA (1986)

### 2.3. Viabilidade espermática

Análises microscópicas e físico-químicas do sêmen são feitas a partir de técnicas de rotina em laboratórios para o diagnóstico da infertilidade masculina. Embora essas análises convencionais permitam informações importantes, existem limitações para avaliar a capacidade de fertilização dos espermatozoides. Assim sendo, há necessidade da utilização de técnicas novas e mais eficazes para reprodução animal. (TROIANO *et al.*, 1998; GRAVANCE *et al.*, 2001).

Amplas variedades de provas e testes foram propostos recentemente para a avaliação da viabilidade espermática. O uso de testes baseados na citometria de fluxo têm sido interessante, por apresentar precisão e rapidez na obtenção dos resultados (TROIANO, *et al.*, 1998).

RODRIGUEZ-MARTINEZ *et al.*, (1997), utilizaram técnicas para verificar a integridade da membrana espermática pelo método de microscopia eletrônica (transmissão e varredura), assim como por meio de amostras fixadas com corantes supravitais e com o uso de sondas fluorescentes.

Inicialmente, GARNER *et al.*, (1986) usando uma combinação de duas sondas fluorescentes (Diacetato de Carboxifluoresceína e Iodeto de Propídio) e um citômetro de fluxo, conseguiram avaliar de forma rápida e acurada uma quantidade maior de espermatozóides, uma vez que, a maioria dos métodos de avaliação comumente usados, analisam relativamente poucas células espermáticas. O Iodeto de Propídio (IP) liga-se ao DNA celular, corando-o mas é impermeável nas membranas íntegras e, por tanto, só poderá corá-lo se esta estiver lesada. Por outro lado, o Diacetato de Carboxifluoresceína (DIC) é permeável à membrana e diesterificado no interior da célula, cujo produto resultante, se liga ao citoplasma de células intactas, causando a fluorescência verde ao longo de todo o espermatozóide. Mais tarde, HARRISON & VICKERS (1990) adaptaram o método com o uso de um microscópio de fluorescência pela adição de uma solução de formaldeído em baixa concentração à solução corante visando imobilizar os espermatozóides, possibilitando sua análise de maneira mais simples.

#### **2.4. Ativação da motilidade espermática**

A ativação da motilidade espermática ocorre em resposta a mudanças no meio externo, tais como: concentração de íons, osmolaridade e pH (HAMAMAH & GATTI, 1998; MORISAWA & SUZUKI, 1980).

Os espermatozóides dos teleósteos marinhos e de água doce permanecem imóveis em soluções com ou sem eletrólitos, quando a osmolaridade é isotônica ao plasma seminal. Entretanto, quando o sêmen encontra-se diluído em uma solução hiposmótica, para espécies de água doce, ou hiperosmótica para espécies marinhas, os espermatozóides iniciam sua motilidade (MORISAWA, 1994).

Um incremento na osmolaridade em torno dos espermatozóides provoca aumento nas concentrações intracelulares de potássio, o que afeta o axonema flagelar, induzindo o início da motilidade do flagelo, em espermatozóides de espécies marinhas. Tem-se observado que o volume celular é menor quando os espermatozóides se encontram em soluções hipertônicas, isto quer dizer, que o aumento de potássio intracelular ocorre em resposta à saída de água da célula. Nos espermatozóides de teleósteos de água doce, o volume celular aumenta em condições hipertônicas, e possivelmente, ocorre diminuição na concentração de potássio intracelular (MORISAWA *et al*, 1983).

Mudanças na osmolaridade externa é amplamente prejudicial à estrutura e função celular. Em geral a hiper ou hipo osmolaridade provocam alterações no tamanho das células, aumentando-as ou diminuindo-as (MORISAWA, 1994). Estas perturbações drásticas na homeostase das células espermáticas podem modificar as propriedades mecânico-químicas do aparelho móvel no axonema flagelar conduzindo ao início da motilidade espermática (MORISAWA, 1994).

Ainda não se conhece o mecanismo pelo qual o aumento ou a diminuição das concentrações intracelulares de potássio induzem a cascata de eventos que iniciam a motilidade espermática, em peixes de água doce e em teleósteos marinhos (ODA & MORISAWA, 1993). Estudos realizados por TSUJI *et al.*, (2000), constataram que quando há diminuição das concentrações de potássio, ocorre a ativação do movimento flagelar em espermatozóides de Ayu *Plecoglossus altivelis*, concluindo se assim que o íon potássio inibe o movimento flagelar nesta espécie.

Muitos estudos demonstram que os espermatozóides de salmonídeos são imóveis quando o sêmen é diluído em meio contendo o íon potássio, e a diminuição de sua concentração no plasma seminal artificial provoca o início da ativação do movimento flagelar (MORISAWA & SUZUKI, 1980). Em espermatozóides de truta foi observado que a liberação de potássio do espermatozóide ocasiona hiperpolarização da membrana plasmática durante o

início de sua motilidade em meios livres de potássio (BOITANO & OMOTO, 1991; GATTI *et al.*, 1990).

Os fatores mais importantes na determinação da ativação espermática são: pressão osmótica, composição iônica e o pH, sendo que a mudança na pressão osmótica é o fator que mais influencia a ativação dos espermatozoides (BILLARD *et al.*, 1995a, GWO, 1995). Todavia, foram observados em algumas espécies marinhas outros fatores que atuam no início da atividade espermática (CHAMBEYRON & ZOHAR, 1990; MORISAWA & MORISAWA, 1990; BILLARD *et al.*, 1993, VIZZIANO *et al.*, 1995). Observou-se também que em algumas espécies o CO<sub>2</sub> desempenha um papel importante na motilidade dos espermatozoides (DREANNO *et al.*, 1995). Em outras espécies, como na carpa, os níveis de ATP intracelular são importantes no início da motilidade espermática, pois se encontram elevados antes do início da motilidade, e posteriormente diminuem em decorrência da hidrólise ocasionada pela ação da Dineína ATPase (PERCHEC *et al.*, 1995).

O conhecimento sobre os mecanismos que regulam a motilidade espermática em teleósteos, e particularmente, o mecanismo intracelular que o ativa ou inativa, é muito importante para o desenvolvimento de técnicas apropriadas de manutenção e conservação do germoplasma (OHTA & SHINRIKI, 1998; PERCHEC *et al.*, 1995).

Em *Anguilla japonica*, OHTA & IZAWA, (1996) encontraram a seguinte composição iônica: Sódio 149,3 mM, Potássio 15,2 mM, Cálcio 1,3 mM, Magnésio 1,6 mM e osmolaridade de 337,7 mOsm/Kg. Em Truta foram observadas concentrações de Sódio 122,2 mM, Potássio 30,4 mM, Cálcio 1,10 mM, Magnésio 0,85 mM e osmolaridade de 322,1 mOsm/Kg (GLOGOWSKI *et al.*, 2000). Entretanto, LAHNSTEINER *et al.*, (1998) demonstraram que a mesma espécie pode apresentar diferentes concentrações de Sódio (116,5 mM) e Potássio (20,2 mM), e osmolaridade de 290,9 mOsm/Kg. Isto significa que a composição iônica varia entre as espécies e dentro das mesmas, devido a fatores como o meio ambiente e época de reprodução.

Em *Plecoglossus altivelis* a composição do plasma seminal é: Sódio 130 mM, Potássio 11,4 mM, Cálcio 0,6 mM e Magnésio 2,3 mM (OHTA *et al.*, 2001), em carpa comum: Sódio 55 mM, Potássio 82,4 mM, Cálcio 2 mM, Magnésio 0,8 mM e Bicarbonato de Sódio 20 mM (OHTA & TSUJI, 1998). EMRI *et al.*, (1998) ao submeter machos de carpa comum à adaptação em águas frias, observaram que as concentrações de Sódio 83 mM e Potássio 64 mM tiveram grande variação, evidenciando que mudanças na composição iônica podem ser ocasionadas por alterações ambientais.

### **3. CARACTERÍSTICAS ULTRAESTRUTURAIS DOS ESPERMATOZÓIDES EM PEIXES**

Durante a diferenciação das espermatídes, ou espermiogênese, ocorre a compactação do conteúdo nuclear, a formação da peça intermediária e o desenvolvimento do flagelo. Ao final da espermiogênese, as pontes citoplasmáticas e o citoplasma residual são eliminados, os processos citoplasmáticos das células de Sertoli se afastam e os espermatozóides são liberados (GRIER, 1992; SELMAN & WALLACE, 1986).

Estudos sobre as várias espécies de peixes têm mostrado que o processo de espermiogênese, os tipos de espermatozóides, assim como as estruturas espermiáticas, são usualmente conservados nos membros de uma mesma família ou subfamília e podem apresentar sinais filogenéticos (MATTEI, 1991).

JAMIESON (1991) correlacionou a ultraestrutura dos espermatozóides de peixes, e segundo o tipo de fertilização, classificando-os em “aquasperm” e “introsperm”. Os “aquasperm” estão presentes nas espécies com fertilização externa, em que os espermatozóides são liberados no ambiente aquático. Os “introsperm”, por outro lado, estão presentes nas espécies com fertilização interna, nas quais os espermatozóides são liberados dentro do trato genital feminino.

Os espermatozóides do tipo “aquasperm” podem apresentar acrossoma, as vezes pode estar ausente. E dentro dos espermatozóides

“aquasperm” que não apresentam acrossoma JAMIESON (1991), fez uma sub-divisão: Espermatozoides do tipo I os quais possuem núcleo pequeno, ovóide ou esférico; os centríolos, em ângulos retos, situam-se na fossa nuclear quando esta se encontra presente. A peça intermediária é pequena e forma um colar ao redor da região inicial do flagelo. As mitocôndrias são pouco numerosas e pequenas, situam-se no colar citoplasmático, separadas do início do flagelo por um espaço existente entre as membranas plasmática e flagelar, o canal citoplasmático. O flagelo apresenta o complexo axonemal clássico formado pelas nove duplas de microtúbulos periféricos e um par central de microtúbulos. A membrana flagelar pode apresentar ou não 1, 2 ou 3 projeções laterais ou “fins” semelhante as nadadeiras dos peixes (JAMIESON, 1991; MATTEI, 1991).

E espermatozoides do tipo II (JAMIESON, 1991), nos quais o flagelo apresenta-se paralelo à base do núcleo, sem ocorrer rotação do eixo flagelar em relação ao núcleo. Embora a fossa nuclear esteja presente nos espermatozoides, os centríolos se encontram fora dela (MATTEI, 1970). A peça intermediária pode ser muito pequena e neste caso o canal citoplasmático pode não se formar. No axonema, os tubulos A das duplas 1, 2, 5, e 6 podem apresentar material denso no lúmen, constituindo as diferenciações intratubulares (JAMIESON, 1991).

Nos peixes, a compactação progressiva da cromatina no núcleo das espermátides e sua forma final nos espermatozoides pode mostrar diferentes aspectos. Estas variações não parecem estar associadas à Ordem a que pertencem estes animais (JAMIESON, 1991). Porém, em cada Ordem, os espermatozoides das espécies pertencentes a uma mesma família podem compartilhar os mesmos caracteres ultraestruturais. O mesmo ocorre com a forma do núcleo, número e forma das mitocôndrias na peça intermediária, presença e comprimento do canal citoplasmático, número e presença de expansões laterais na membrana flagelar e número de flagelos (MATTEI, 1991; JAMIESON, 1991).

Estudos sobre a ultraestrutura da espermiogênese e dos espermatozoides de peixes da Ordem Characiformes foram realizados por POMPIANI, 2003, com ênfase à espécie *Brycon orbignyanus* observou-se que os espermatozoides têm forma esférica, com 1,5 µm de diâmetro, fossa nuclear profunda, em forma de arco simples, albergando o complexo centriolar, peça intermediária longa (3,0 µm de comprimento), com poucas mitocôndrias e um flagelo perpendicular ao núcleo, apresentando o axonema clássico 9 + 2, sem diferenciações intratubulares e sem a presença de “fins”.

## ***Material e Métodos***



## **1. Exemplares Utilizados**

No presente trabalho foram utilizados quinze exemplares de cada espécie: Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) com peso médio de  $871 \pm 46$  g, Jundiá (*Rhamdia quelen*) com peso médio de  $165 \pm 36$  g, Piraputanga (*Brycon hilarii*) com peso médio de  $422,5 \pm 26$  g, machos e adultos para a avaliação seminal e análise ultraestrutural dos espermatozoides.

## **2. Locais de Coleta**

Os exemplares de jundiá foram coletados no Centro de Aqüicultura da Universidade Estadual Paulista (CAUNESP) Campus de Jaboticabal – SP (Brasil), localizado a  $21^{\circ}15'22''$  de latitude sul,  $48^{\circ}18'58''$  de longitude oeste e a 595 m de altitude, no período de novembro a dezembro de 2002. Os exemplares de piracanjuba e piraputanga foram coletados no CEPTA/IBAMA (Centro Nacional de Pesquisa em Peixes Tropicais/Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) na cidade de Pirassununga - SP (Brasil), localizada a  $22^{\circ}00'00''$  de latitude sul,  $45^{\circ}25'42''$  de longitude oeste e a 634 m de altitude. Todas as amostras foram coletadas no período de outubro a novembro de 2003.

## **3. Extração do sêmen**

Após a captura dos peixes nos tanques, os animais foram anestesiados com solução de benzocaína (1 g de benzocaína/10 ml de álcool etílico/10 litros de água), para obtenção do sêmen. Após a anestesia, o poro genital do animal foi lavado com água destilada e cuidadosamente seco com papel absorvente visando não contaminar a amostra de sêmen com urina, fezes ou água. Posteriormente, o animal recebeu pressão abdominal, na direção antero-posterior para a coleta do material. A amostra seminal foi coletada em um tubo falcom com capacidade de 15 ml, e guardadas imediatamente em gelo para posterior análise (OHTA *et al*, 2001).

## **4. Avaliação Seminal**

A avaliação das características seminais foi realizada segundo o método descrito por RODRÍGUEZ (1992). O volume seminal foi medido por observação direta nos tubos falcom com capacidade de 15 ml; a cor foi determinada por observação direta; o pH foi medido com papel indicador e através de potenciômetro digital de alta sensibilidade; o aspecto do sêmen foi descrito como: cremoso, leitoso ou aquoso em relação à concentração de espermatozóides.

### **4.1. Motilidade dos espermatozóides**

Para determinar a motilidade dos espermatozóides, 2  $\mu$ l de sêmen fresco foi misturado juntamente com 1998  $\mu$ l de água destilada tamponada com HEPES 10 mM e com NaOH 1M a pH 7,4 (solução ativadora). Diluição final 1:1000.

A solução foi rapidamente homogeneizada, retirando-se uma amostra de 10  $\mu$ l, a qual foi colocada em uma lâmina de microscopia, e observada em microscópio óptico comum. O tempo e a porcentagem da motilidade dos espermatozóides foram registrados.

A porcentagem de motilidade foi avaliada conforme a quantidade de espermatozóides que apresentaram qualquer tipo de movimento (progressivo ou vibratório), e o tempo de motilidade começou a ser registrado desde o momento da mistura do sêmen com a solução ativadora.

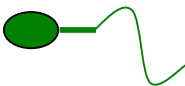
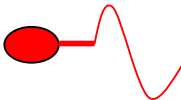
### **4.2. Viabilidade dos espermatozóides (Integridade de membrana)**

Para a análise da integridade da membrana plasmática do espermatozóide com sondas fluorescentes, 20  $\mu$ l de sêmen fresco foram diluídos em 1 ml de solução salina estoque (300 mOsm), recebendo após a homogeneização, adição de 40  $\mu$ l de solução corante, sendo então incubado em banho-maria a 33°C, durante dez minutos. A solução corante foi preparada por

meio da adição de 20 µl de solução de formaldeído, 20 µl de Diacetato de Carboxifluoresceína (DIC) e 10 µl de Iodeto de Propídio (IP) para cada mililitro (ml) de solução salina estoque.

Alíquotas de 10 µl da suspensão corante foram depositadas em lâmina, coberta com lamínulas e observadas à microscopia óptica epifluorescente (Leitz, modelo Fluovert, Germany). Para a visualização da suspensão corante, foram utilizados de modo alternado filtros de fluoresceína (luz azul) e rodamina (luz verde) para os corantes DIC e IP, respectivamente. Foram contadas 200 células tendo-se por base a seguinte classificação (Figura 1):

Figura 1. Esquema das categorias utilizadas para a análise da integridade da membrana plasmática dos espermatozóides com sondas fluorescentes.

CATEGORIAS	DIC (verde)	IP (vermelho)
1- Acúmulo de DIC ao longo da cabeça e flagelo, sem acúmulo de IP = células espermáticas com membranas plasmáticas íntegras.		
2- Acúmulo de IP ao longo da cabeça e flagelo, sem acúmulo de DIC = células espermáticas com membranas plasmáticas danificadas.		

#### 4.3. Concentração de espermatozóides

Para a determinação da concentração espermática, 2 µl de sêmen foram misturados juntamente com 998 µl de solução diluente de Coffin (fórmula mencionada abaixo). Diluição final 1:500. Este procedimento foi realizado da mesma maneira para as três espécies.

##### Diluente de Coffin:

Bicarbonato de Sódio	5 g.
Formol	1 cc
Água destilada	100 cc

Logo após a diluição, 10 µl da amostra foram colocados na câmara hematómica tipo Neubauer para realizar a contagem dos espermatozoides.

O número de Espermatozoides/ml = (Média de espermatozoides em 5 retículos) X 25 (retículos) X10 (0,1 mm, profundidade da câmara) X 500 (diluição) X $\times$ 1000 (mm<sup>3</sup> cm<sup>3</sup>).

#### **4.4. Espermatócrito**

O espermatócrito [(Volume de células agregadas/volume de sêmen total) x 100] foi determinado depois de centrifugar o sêmen em tubos para hematócrito (6000 G por 10 minutos).

#### **4.5. Análise do plasma seminal**

##### **4.5.1. Concentração de íons e osmolaridade**

O sêmen restante foi centrifugado a 1500 G por 25 minutos e o sobrenadante retirado foi mantido a 4°C.

As concentrações de Potássio, Sódio, Cálcio e Magnésio foram medidas usando o método seletivo de íons de Drake.

A glicose foi determinada pelo método GOD-ANA enzimático (Kit Labtest).

A osmolaridade do plasma seminal foi determinado através de um osmômetro de vapor de pressão marca Wescor<sup>®</sup>.

#### **4.6. Análise estrutural e ultraestrutural dos espermatozoides**

Para análise histológica dos espermatozoides das espécies utilizadas, esfregaços de sêmen foram fixados em metanol, corados com Giemsa e analisados em microscópio óptico Olympus BX50 (Tokyo, Japan).

Para realização dos estudos ultraestruturais, os animais foram sacrificados usando superdosagem de benzocaína e fragmentos de tecidos testiculares foram fixados em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato (0,1M; pH 7,2) durante 4 horas e pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% em tampão fosfato (0,1M; pH 7,2) por 3 horas. Após desidratação, o material foi incluído em araldite (Durcupan ACM, Fluka, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) e na seqüência, seções de 0,5 µm foram coradas com azul de toluidina para escolha dos campos. A seguir seções de 50 a 70 nm foram contrastadas em acetato de uranila e citrato de chumbo (REYNOLDS, 1963) para posterior análise e fotodocumentação em microscópio eletrônico de transmissão, marca CM100 (Eindhoven, The Netherlands), com utilização de filmes preto e branco 35 mm Eastman 5302 (Kodak), no Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu – UNESP.

## ***Resultados***

## 1. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO SÊMEN

### 1.1. PIRACANJUBA (*Brycon orbignyanus*)

As características físico-químicas analisadas no sêmen de piracanjuba estão sumarizadas na TABELA 2.

TABELA 2. Características físico-químicas do sêmen de Piracanjuba *Brycon orbignyanus*.

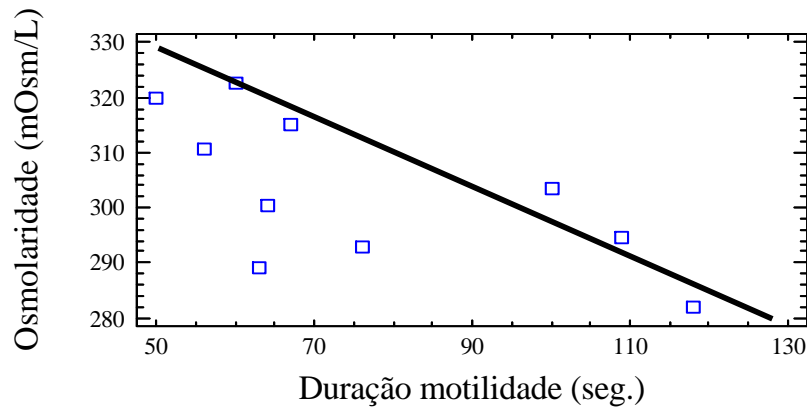
	Média	Min.	Max.
Volume (ml)	5,85 ± 3,62	1,0	10,5
Motilidade (%)	77,0 ± 6,74	60,0	80,0
Duração Motilidade (seg)	76,3 ± 23,93	50,0	118,0
Viabilidade (%)	97,5 ± 0,74	96,0	98,5
Concentração (sp/ml)	2,72 x 10 <sup>9</sup> ± 1,92 x 10 <sup>9</sup>	0,85 x 10 <sup>9</sup>	6,55 x 10 <sup>9</sup>
Espermatócrito %	5,5 ± 3,83	1,0	14,0
Osmolaridade (mOsm/l)	303,06 ± 13,69	282,0	322,5
Na <sup>+</sup> (mmol/l)	67,2 ± 11,39	48,0	85,0
K <sup>+</sup> (mmol/l)	37,2 ± 2,89	33,0	42,0
Ca <sup>++</sup> (mmol/l)	4,2 ± 1,16	2,62	6,6
Mg <sup>++</sup> (mmol/l)	1,09 ± 0,13	0,98	1,39
Glicose (mmol/l)	0,31 ± 0,14	0,11	0,54
PH	8,0	8,0	8,0
Coloração	Amarelada		
Aspecto	Aquoso		

Dados médios (± dp; n=15). Min. Valor mínimo observado. Max. Valor máximo observado para cada característica.

Encontrou-se uma correlação negativa entre a osmolaridade e a duração da motilidade ( $r=0,66$ ;  $p>0,05$ ). Os valores observados estão ilustrados na Figura 2. Pode-se observar que quando a osmolaridade é maior do que 310 mOsm/L, o tempo de motilidade tende a diminuir.

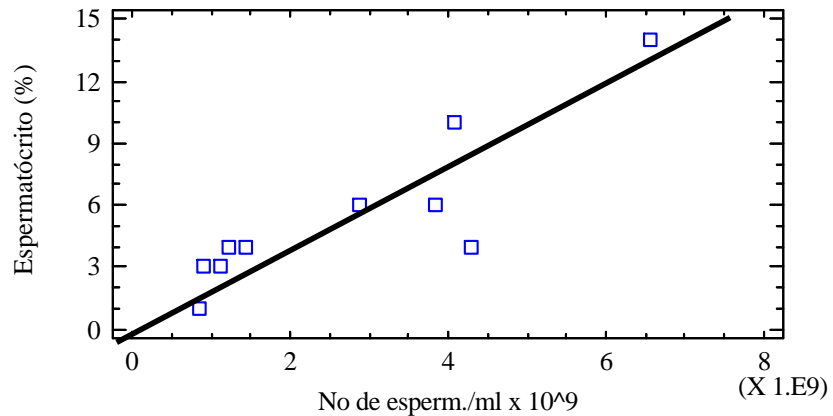
Entre os valores de espermatócrito e concentração espermática encontrou-se alta correlação ( $r=0,87$ ;  $P>0,05$ ). Os valores obtidos são mostrados na Figura 3.

Figura 2. Relação entre a osmolaridade e a duração da motilidade (n=15)



Dentro dos componentes iônicos do plasma seminal e a osmolaridade, encontrou-se correlação alta e positiva entre o íon cálcio e a osmolaridade ( $r=0,74$ ;  $P>0,05$ ). Entretanto, não encontrou-se correlação entre os componentes do plasma seminal e a porcentagem e duração da motilidade. Assim como, não se observou correlação entre a motilidade e a viabilidade dos espermatozóides.

Figura 3. Concentração espermática medida por contagem celular contra os valores de espermatócrito (n=15).





## 1.2. JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*)

As características físico-químicas analisadas no sêmen de jundiá estão sumarizadas na TABELA 3.

TABELA 3. Características físico-químicas do sêmen de Jundiá *Rhamdia quelen*.

	Média	Min.	Max.
Volume (ml)	1,03 ± 0,30	0,7	1,6
Motilidade (%)	91,6 ± 4,08	85,0	95,0
Duração Motilidade (seg)	64,33 ± 17,16	52,0	98,0
Viabilidade (%)	96,66 ± 1,47	95,0	97,0
Concentração (sp/ml)	4,57x10 <sup>10</sup> ± 1,50x10 <sup>10</sup>	3,2x10 <sup>10</sup>	6,63x10 <sup>10</sup>
Espermatócrito %	93,5 ± 1,04	92,0	95,0
Osmolaridade (mOsm/l)	300,66 ± 11,48	286,0	320,0
Na <sup>+</sup> (mmol/l)	125,66 ± 2,73	122,0	129,0
K <sup>+</sup> (mmol/l)	7,25 ± 0,84	5,80	8,20
Ca <sup>++</sup> (mmol/l)	1,01 ± 0,05	0,95	1,10
Mg <sup>++</sup> (mmol/l)	2,41 ± 0,36	1,90	3,0
Glicose (mmol/l)	0,39 ± 0,19	0,16	0,69
pH	8,0	8,0	8,0
Coloração	Branca		
Aspecto	Cremoso		

Dados médios (± dp; n=15). Min. Valor mínimo observado. Max. Valor máximo observado para cada característica.

Entre as variáveis osmolaridade e porcentagem de motilidade encontrou-se uma alta correlação ( $r = 0,78$ ;  $P > 0,05$ ). Entretanto, não encontrou-se correlação entre a concentração espermática e o espermatócrito, nem entre os componentes iônicos do plasma seminal e a osmolaridade, fato igual aconteceu entre os diferentes componentes do plasma seminal e a motilidade.

## 1.3. PIRAPUTANGA (*Brycon hilarii*)

As características físico-químicas analisadas no sêmen de piraputanga estão sumarizadas na TABELA 4.

Não se observou correlações entre a osmolaridade e a porcentagem de motilidade, nem com a duração desta motilidade. Assim como, não houve correlação entre a concentração espermática e o espermatócrito. Dentro dos

componentes do plasma, se encontrou uma correlação alta e negativa entre os níveis de magnésio e o tempo de motilidade ( $r = -0,91$ ;  $P > 0,05$ ).

TABELA 4. Características físico-químicas do sêmen de Piraputanga *Brycon hilarii*.

	Média	Min.	Max.
Volume (ml)	2,42 ± 0,37	2,0	3,0
Motilidade (%)	88,6 ± 7,89	80,0	95,0
Duração Motilidade (seg)	77,6 ± 3,71	75,0	84,0
Viabilidade (%)	94,1 ± 5,58	85,0	98,5
Concentração (sp/ml)	6,46x10 <sup>9</sup> ± 2,72x10 <sup>9</sup>	4,0x10 <sup>9</sup>	10,8x10 <sup>9</sup>
Espermatócrito %	16,6 ± 2,40	14,0	20,0
Osmolaridade (mOsm/l)	369,4 ± 28,99	329,0	398,0
Na <sup>+</sup> (mmol/l)	74,2 ± 5,49	68,0	82,0
K <sup>+</sup> (mmol/l)	28,4 ± 4,27	23,0	34,0
Ca <sup>++</sup> (mmol/l)	0,68 ± 0,18	0,48	0,84
Mg <sup>++</sup> (mmol/l)	0,93 ± 0,11	0,74	1,03
Glicose (mmol/l)	0,33 ± 0,14	0,16	0,50
pH	8,5	8,5	8,5
Coloração	Esbranquiçado		
Aspecto	Leitoso		

Dados médios (± dp; n=15). Min. Valor mínimo observado. Max. Valor máximo observado para cada característica.

## 2. MORFOLOGIA DOS ESPERMATOZÓIDES

### 2.1. PIRACANJUBA (*Brycon orbignyanus*)

Os espermatozóides de *Brycon orbignyanus* apresentam-se constituídos por três regiões distintas: cabeça, peça intermediária e cauda (Figura 4).

O núcleo é arredondado e não apresenta vesícula acrossomal (Figuras 4 e 5). É envolvido pela membrana plasmática, separando-se dela por uma fina camada de citoplasma. Contém grânulos de cromatina compactada heterogeneamente, formando pequenos grumos esparsos, entre áreas eletrólúcidas ou de cromatina difusa. Possui uma reentrância basal, ou fossa nuclear, que abriga o complexo centriolar e o início do flagelo (Figuras 10 e 11).

O centríolo proximal está conectado ao centríolo distal por fibras densas, sendo anterior e levemente oblíquo em relação ao distal. Um material eletrondenso ainda está presente ao redor do complexo centriolar (Figura 11).

A peça intermediária é longa, poucas mitocôndrias estão dispersas na região próxima ao núcleo e porção inicial da peça intermediária, separadas do flagelo por um longo canal citoplasmático. A porção posterior é caracterizada pela ausência de mitocôndrias (Figuras 11 e 12). Observa-se a presença de 1 ou 2 anéis concêntricos membranosos ao redor do canal citoplasmático (Figura 13).

O flagelo é medial e perpendicular ao núcleo e está envolvido em toda sua extensão pela membrana flagelar. O axonema tem a construção clássica 9+2 (nove duplas de microtúbulos periféricos e dois microtúbulos centrais), sem diferenciações intratubulares. O flagelo não apresenta expansões laterais da membrana ou “fins” (Figuras 12 e 14).

## **2.2. JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*)**

Os espermatozoides de *Rhamdia quelen* apresentam-se constituídos por três regiões distintas: cabeça, peça intermediária e cauda (Figura 6).

O núcleo é redondo e não apresenta vesícula acrossomal (Figuras 6 e 7). Ele é envolvido pela membrana plasmática, separando-se dela por uma fina camada de citoplasma. Apresenta cromatina densa e homogeneamente condensada. Não foi observada a presença de reentrância basal, ou fossa nuclear (Figura 15).

O centríolo proximal (cp) apresenta-se levemente oblíquo em relação ao centríolo distal (cd) (Figura 16).

A peça intermediária é muito curta, apresenta poucas mitocôndrias dispersas na região próxima ao núcleo e porção inicial da peça intermediária. A porção posterior é caracterizada pela ausência de mitocôndrias, e não foi observada a presença de canal citoplasmático entre o flagelo e a membrana citoplasmática do espermatozoide (Figuras 17 e 18).

O flagelo é medial e perpendicular ao núcleo e está envolvido em toda sua extensão pela membrana flagelar. O axonema tem a construção clássica 9+2 (nove duplas de microtúbulos periféricos e dois microtúbulos centrais), sem diferenciações intratubulares. O flagelo não apresenta expansões laterais da membrana ou “fins” (Figuras 17 e 18).

### **2.3. PIRAPUTANGA (*Brycon hilarii*)**

Os espermatozóides de *Brycon hilarii* apresentam-se constituídos por três regiões distintas: cabeça, peça intermediária e cauda (Figura 8)

O núcleo é arredondado e não apresenta vesícula acrossomal (Figuras 8 e 9). Apresenta cromatina flocular ou em grumos, ancorada no envoltório nuclear e está rodeado por uma faixa de citoplasma sem organelas (Figura 19). Apresenta uma fossa nuclear incipiente que abriga o complexo centriolar e o início do flagelo.

O centríolo proximal é anterior e levemente oblíquo em relação ao centríolo distal e encontram-se inseridos na fossa nuclear (Figura 20).

A peça intermediária é longa, mostrando poucas mitocôndrias dispersas na região próxima ao núcleo e porção inicial da peça intermediária. A porção posterior é caracterizada pela ausência de mitocôndrias, e como em *Rhamdia quelen*, não foi observada a presença de canal citoplasmático entre o flagelo e a membrana citoplasmática do espermatozóide (Figura 21).

O flagelo é medial e perpendicular ao núcleo e está envolvido em toda sua extensão pela membrana flagelar. O axonema tem a construção clássica 9+2 (nove duplas de microtúbulos periféricos e dois microtúbulos centrais), sem diferenciações intratubulares. O flagelo não apresenta expansões laterais da membrana ou “fins” (Figura 21).

**Eletromicrografias de Espermatozóides de Piracanjuba, *Brycon orbignyana***

**Figura 4.** Espermatozóide mostrando o núcleo (n), a peça intermediária (pi) e o início do flagelo (f) (42000 X).

**Figura 5.** Espermatozóides corados com Giemsa (1000 X).

**Eletromicrografias de Espermatozóides de Jundiá, *Rhamdia quelen***

**Figura 6.** Espermatozóide mostrando o núcleo (n), a peça intermediária (pi) e o flagelo (f) (31500 X).

**Figura 7.** Espermatozóides corados com Giemsa (1000X).

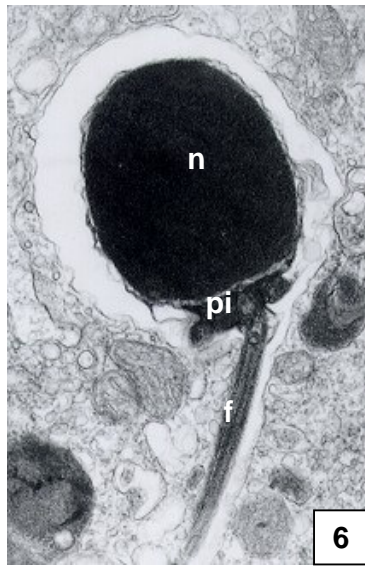
**Eletromicrografias de Espermatozóides de Piraputanga, *Brycon hilarii***

**Figura 8.** Espermatozóide mostrando o núcleo (n) e a peça intermediária (pi) (42000 X).

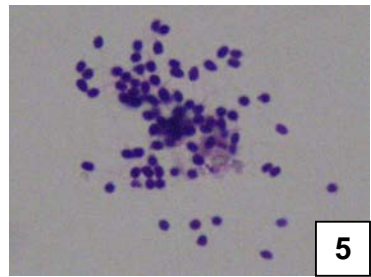
**Figura 9.** Espermatozóides corados com Giemsa (1000 X).



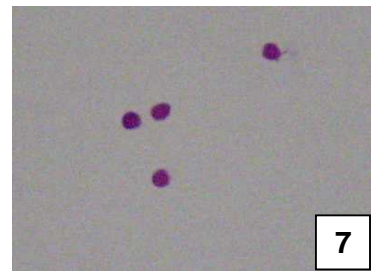
4



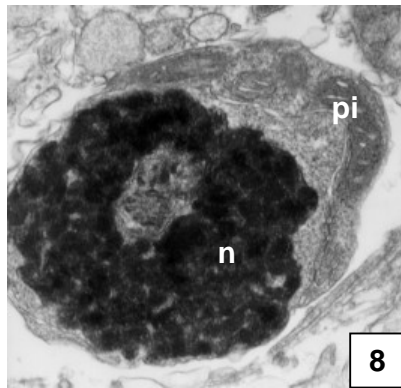
6



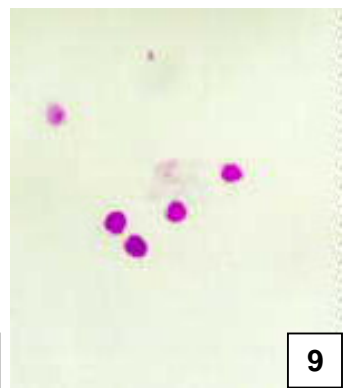
5



7



8



9

**Eletromicrografias de Espermatozóides de Piracanjuba, *Brycon orbignyana***

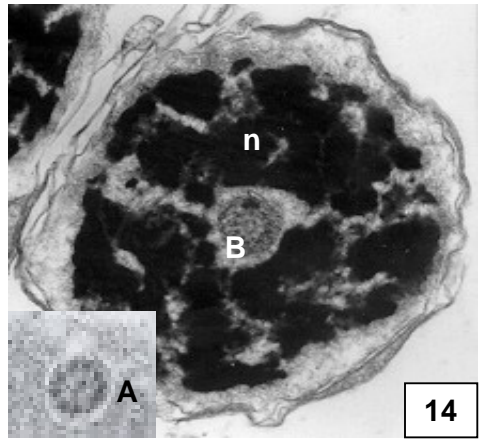
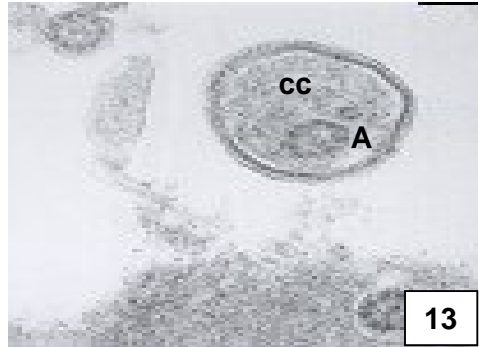
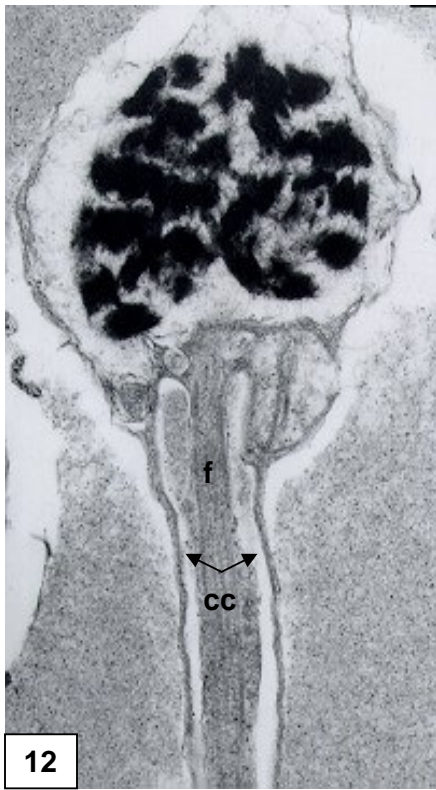
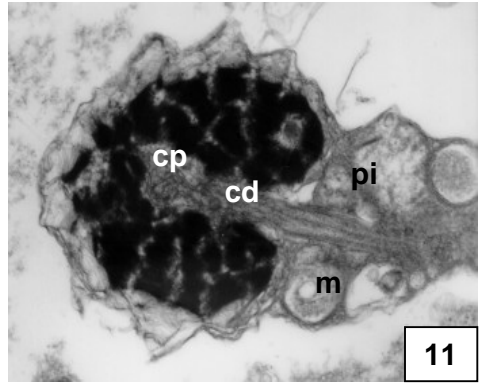
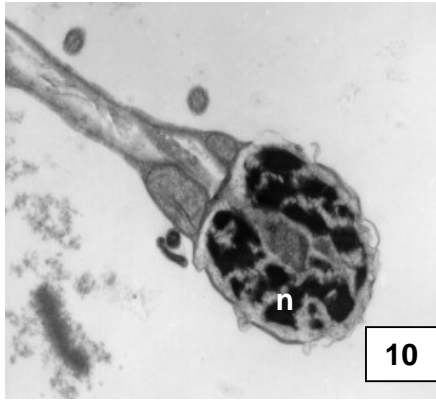
**Figura 10.** Espermatozóide mostrando a cromatina compactada heterogêneamente no núcleo (n) (23000 X).

**Figura 11.** Detalhe da fossa nuclear e posição do centríolo proximal (cp) e do centríolo distal (cd). Observar a peça intermediária (pi) com poucas mitocôndrias (m) (42000 X).

**Figura 12.** Flagelo (f) (corte longitudinal) mostrando o canal citoplasmático (cc) (31500 X).

**Figura 13.** Porção final da peça intermediária (corte transversal) mostrando o compartimento membranoso. Axonema (A). Canal citoplasmático (cc) (23000 X).

**Figura 14.** Corte transversal do núcleo (n) mostrando a placa basal (B) (23000 X) **Inset-** Flagelo em secção transversal mostrando o axonema (A) com padrão morfológico do tipo 9 + 2 (23000 X).



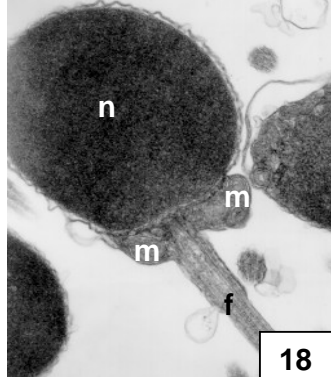
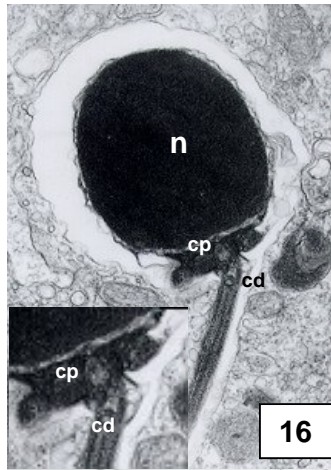
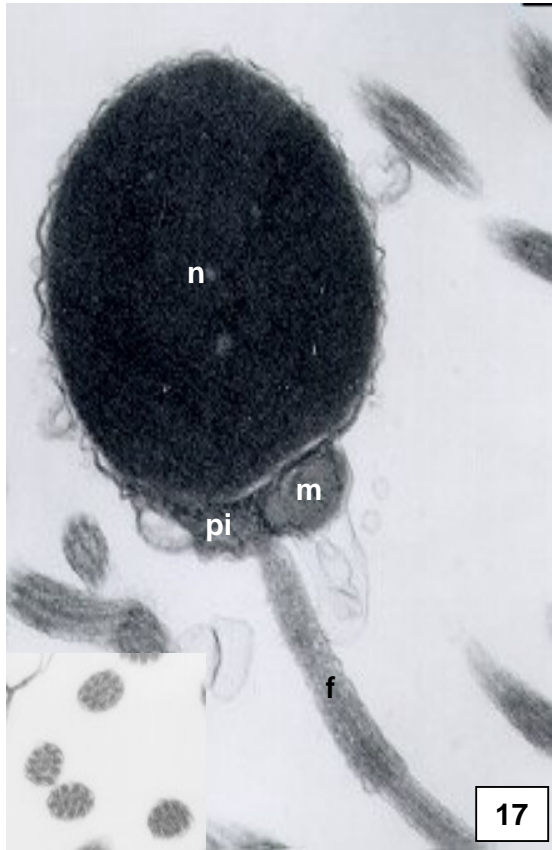
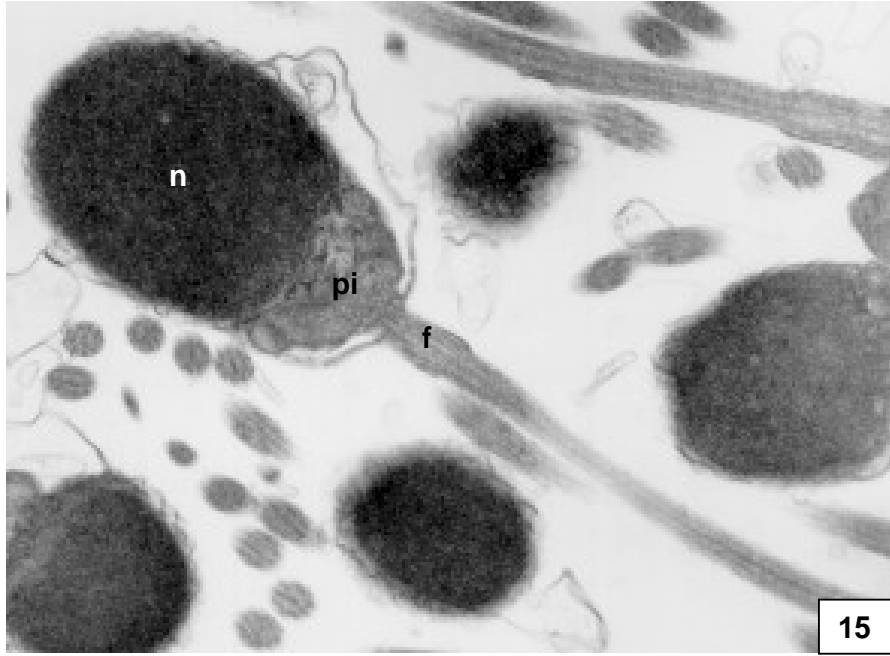


### **Eletromicrografias de Espermatozóides de Jundiá, *Rhamdia quelen***

**Figura 15.** Espermatozóide mostrando a condensação homogênea da cromatina no núcleo (n). Peça intermediária (pi) e flagelo (f) (23000 X).

**Figura 16.** Peça intermediária mostrando a posição dos centríolos proximal (cp) e distal (cd) (31500 X) **Inset-** Detalhe centríolo proximal (cp) e centríolo distal (cd).

**Figuras 17 e 18.** Detalhes de espermatozóides apresentando núcleo (n), peça intermediária (pi) com poucas mitocôndrias (m), flagelo (f) (42000 X).

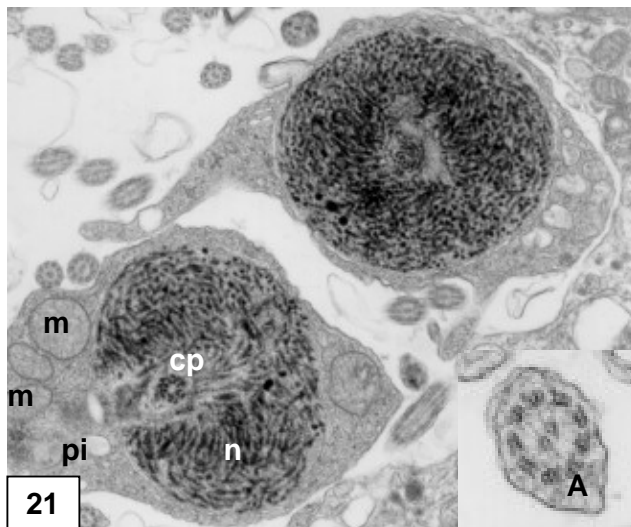
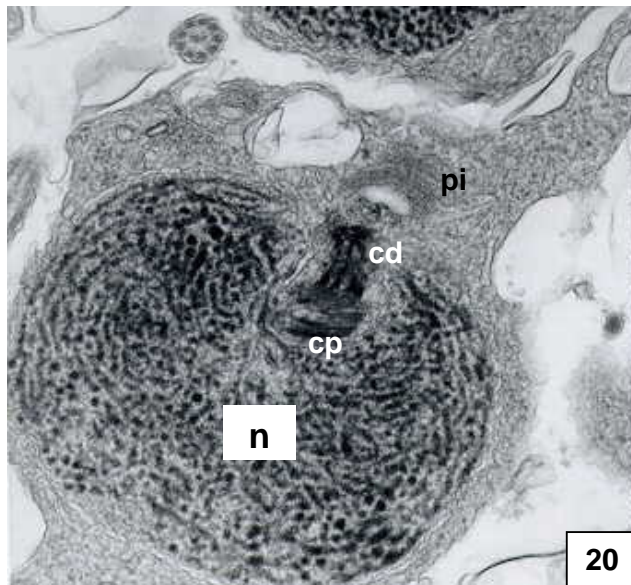
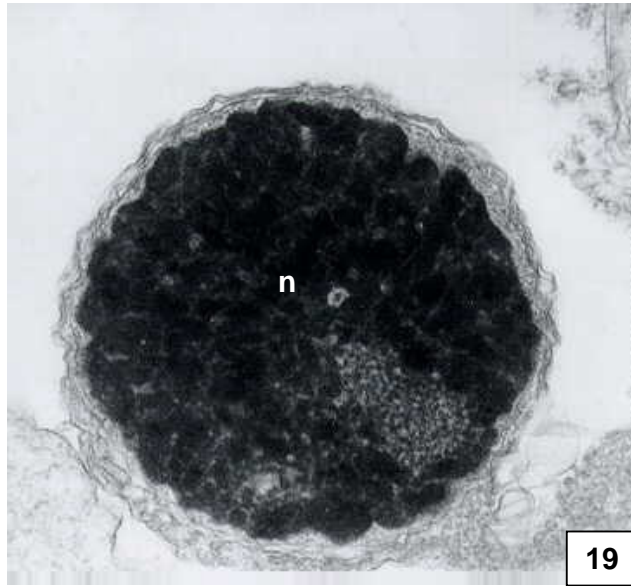


### **Eletrmicrografias de Espermatozoides de Piraputanga, *Brycon hilarii***

**Figura 19.** Espermatozóide apresentando núcleo (n) arredondado com grumos de cromatina densamente compactada (57500 X).

**Figura 20.** Espermátide mostrando o núcleo (n), a peça intermediária (pi) e a localização dos centríolos proximal (cp) e distal (cd) (42000 X).

**Figura 21.** Espermátide apresentando núcleo (n) com cromatina irregularmente compactada. Observar centríolo proximal (cp), peça intermediária (pi) com poucas mitocôndrias (23000 X) **Inset-** Flagelo em secção transversal mostrando o axonema (A) com padrão morfológico do tipo 9 + 2 (57500 X).



***Discussão***

As características de cor e aspecto do sêmen entre as três espécies estudadas são diferentes. Na Piracanjuba, o sêmen apresenta-se amarelado e com aspecto aquoso, diferente do encontrado em Jundiá, onde a cor do sêmen é branca e com aspecto cremoso. Na Piraputanga a coloração do sêmen é esbranquiçada e seu aspecto, leitoso. Em piabanha, *Brycon insignis*, ANDRADE-TALMELLI *et al.*, (2001), também descreveram a cor e o aspecto do sêmen como branca e leitoso, respectivamente.

Se comparamos estas características com a concentração espermática encontrada em Piracanjuba ( $2,72 \times 10^9 \pm 1,92 \times 10^9$  sp/ml), Jundiá ( $4,57 \times 10^{10} \pm 1,50 \times 10^{10}$  sp/ml) e Piraputanga ( $6,46 \times 10^9 \pm 2,72 \times 10^9$  sp/ml) e com os valores do Espermatócrito (5,5%, 93,5% e 16,6% respectivamente), podemos concluir que quanto mais cremoso for o sêmen, maior será sua concentração espermática. Conseqüentemente, o conteúdo de plasma seminal será menor. Observações similares foram realizadas por LUZ *et al.*, (2001), em suruvi, *Steindachneridion scripta*, onde a concentração espermática apresentou grande variação, podendo este fato estar relacionado com o aspecto visual do sêmen (aquoso/denso).

O pH é constante nos exemplares das três espécies estudadas, apresentando valores de 8,0 para a Piracanjuba e o Jundiá e de 8,5 para Piraputanga, estes valores coincidem com os encontrados em *Stizostedion vitreum* (pH 8) (BERGERON *et al.*, 2002), e resultados semelhantes aos encontrados por SANABRIA, (2002) em *Brycon cephalus* ( $7,87 \pm 0,10$ ), por DREANNO *et al.*, (1998) e por SUQUET *et al.*, (1993) em turbot, *Psetta maxima* ( $7,6 \pm 0,10$ ). Cabe destacar que a literatura relata que o pH interfere no início da motilidade espermática, e ainda que cada espécie apresenta valores específicos de pH.

Conforme destacado por SUQUET *et al.* (1993), a descrição das características físicas e químicas do plasma seminal é um pré-requisito importante no desenvolvimento de diluidores para inseminação ou armazenamento dos espermatozóides.

Segundo ROMAGOSA (1998), os machos de *Brycon cephalus*, produzem em média 7,0 ml de sêmen, após 4 horas de ação hormonal, diferente do valor encontrado por SANABRIA (2002) na mesma espécie ( $8,06 \pm 4,32$  ml). Estes valores são maiores aos encontrados neste estudo para a Piracanjuba ( $5,85 \pm 3,62$  ml) e Piraputanga ( $2,42 \pm 0,37$  ml). As diferenças de volume seminal se devem ao fato de ROMAGOSA (1998) e SANABRIA (2002) terem realizado avaliação seminal após indução hormonal. Este fato pode ser confirmado por KAVAMOTO (1993), considerando que o volume de sêmen após tratamento hormonal, superou a quantidade de sêmen obtida antes da aplicação hormonal. É importante destacar que os exemplares utilizados no presente trabalho não receberam aplicação hormonal.

Quanto aos valores de volume seminal encontrado em Jundiá ( $1,03 \pm 0,30$  ml) observamos que estes foram maiores ao encontrado por FERREIRA *et al.* (2001) na mesma espécie ( $0,41 \pm 0,37$  ml) e similares ao encontrado por FOGLI DA SILVEIRA, *et al.* (1985) em *Rhamdia hilarii* (1,15 ml).

A Piracanjuba apresenta o menor valor de porcentagem de motilidade espermática ( $77 \pm 6,74\%$ ). Isto pode estar relacionado com as baixas porcentagens de fertilização observadas em Piracanjuba (GANECO, 2003). Entretanto, os valores de porcentagens de motilidade espermática apresentam-se poucos diferenciados entre Jundiá ( $91,66 \pm 4,08\%$ ) e Piraputanga ( $88,6 \pm 7,89\%$ ). Dados semelhantes foram encontrados em pacu, *Piaractus mesopotamicus* após estimulação hormonal (89%) (KAVAMOTO, 1998), e em piabanha, *Brycon insignis* (90,9%) usando HCG como indutor hormonal.

FERREIRA, *et al.* (2001), avaliando machos de Jundiá induzidos e não induzidos hormonalmente, observaram que os machos não induzidos apresentaram menores porcentagens de motilidade ( $88,3 \pm 2,9\%$ ) comparados com os não induzidos hormonalmente ( $72,5 \pm 2,7\%$ ), sendo este último valor menor ao valor observado no presente trabalho ( $91,6 \pm 4,08\%$ ). Segundo COSSON *et al.* (1999), os principais problemas de pesquisas em motilidade espermática consistem em sua curta duração, e na dificuldade de se obter uma

mistura homogênea do sêmen com a solução ativadora, no momento da análise.

SANABRIA (2002), trabalhando com matrinxã, *Brycon cephalus*, reportou uma duração da motilidade média em torno de  $75,18 \pm 29,66$  segundos, semelhante ao encontrado neste estudo na Piracanjuba ( $76,3 \pm 23,93$  segundos) e em Piraputanga ( $77,6 \pm 3,71$  segundos). Entretanto, foram observados em piabanha, *Brycon insignis* valores menores de motilidade espermática, aproximadamente 40 segundos, (ANDRADE-TALMELLI *et al.*, 2001).

O teste para viabilidade mostra valores de  $97,5 \pm 0,74\%$  para Piracanjuba,  $96,66 \pm 1,47\%$  para Jundiá, e de  $94,1 \pm 5,58\%$  para Piraputanga. É interessante observar ainda, que os espermatozóides de Piracanjuba apresentam a membrana celular intacta, sua porcentagem de motilidade não é muito alta.

Isto quer dizer, que os espermatozóides podem precisar de algum componente na solução ativadora, para aumentar sua porcentagem de motilidade. Ou ainda, como sugeriram OHTA *et al.* (2001), as condições iônicas do meio ambiente ao redor do espermatozóide têm um efeito direto no potencial da motilidade dos espermatozóides.

HONEYFIELD & KRISE (2000), utilizando carboxifluoresceína e iodeto de propídio em espermatozóides de *Oncorhynchus mykiss*, encontraram uma correlação de 0,95 entre as porcentagens de fertilização e as porcentagens de espermatozóides viáveis. AZERÊDO (1999), trabalhando com espermatozóides de caprinos encontrou valores de 12,02% de células viáveis, usando a mesma técnica de avaliação, e atribuindo esses baixos valores, à influência da época do ano sobre a qualidade do sêmen.

Em outros trabalhos utilizando-se o método de coloração diferencial (Eosina-Nigrosina), foram relatadas as seguintes porcentagens de viabilidade espermática:  $96,95 \pm 1,22\%$  em *Brycon cephalus* (SANABRIA, 2002);  $91,21\%$



em *Brycon insignis* (ANDRADE-TALMELLI *et al.*, 2001), 86,73% em *Rahmdia hilarii* (KAVAMOTO & FOGLI DA SILVEIRA, 1986) e 93,73%, para espermatozoides de *Prochilodus scrofa* (KAVAMOTO, 1993).

Quanto às concentrações espermáticas e os valores de espermatócrito, podemos observar que a Piracanjuba apresenta os menores valores ( $2,72 \times 10^9 \pm 1,92 \times 10^9$  sp/ml e  $5,5 \pm 3,83$  %), seguido pela Piraputanga ( $6,46 \times 10^9 \pm 2,72 \times 10^9$  sp/ml e  $16,6 \pm 2,4$ %), e os maiores valores são encontrados no Jundiá ( $4,57 \times 10^{10} \pm 1,50 \times 10^{10}$  sp/ml e  $93,5 \pm 1,04$ %). FOGLI DA SILVEIRA *et al.* (1985), encontraram uma alta correlação entre os valores de espermatócrito e a concentração espermática em *Salmo irideus* ( $r= 0,85$ ,  $p<0,05$ ). Similar ao observado no presente trabalho, em Piracanjuba, onde observa-se um coeficiente de correlação de  $r=0,87$ ,  $p>0,05$ . Entretanto, nas outras duas espécies não houve correlação entre os valores de espermatócrito e concentração espermática.

Em peixes teleósteos, a concentração espermática pode variar de  $2 \times 10^6$  a  $6,5 \times 10^{10}$  espermatozoides por ml de sêmen, segundo dados obtidos por LEUNG & JAMIESON (1991), assim sendo, os resultados obtidos neste trabalho estão dentro do relatado por esses autores.

Analisando os dados obtidos por FERREIRA *et al.*(2001) em Jundiá, *Rhamdia quelen* ( $6,99 \times 10^7 \pm 3,77 \times 10^7$  sp/ml), podemos observar que estes foram muito inferiores aos encontrados no presente estudo para a mesma espécie ( $4,57 \times 10^{10} \pm 1,50 \times 10^{10}$  sp/ml), e semelhantes aos encontrados por FOGLI DA SILVEIRA *et al.* (1985) e KAVAMOTO & FOGLI DA SILVEIRA (1986) em bagre, *Rhamdia hilarii* ( $5,58 \times 10^{10}$  sp/ml e  $6,35 \times 10^{10}$  sp/ml, respectivamente).

Para Piracanjuba, BEDORE (1999), encontrou valores de concentração espermática ( $10 \times 10^9 \pm 4,3 \times 10^9$  sp/ml) superiores aos observados neste estudo para a mesma espécie ( $2,72 \times 10^9 \pm 1,92 \times 10^9$  sp/ml).

Em peixes, os fatores mais importantes na determinação da ativação espermática e duração da motilidade são a osmolaridade, a composição iônica e o pH do plasma seminal (HAMAMAH & GATTI, 1998; MORISAWA & SUZUKI, 1980). Entretanto, a mudança da osmolaridade é o fator que mais influencia na ativação dos espermatozoides (BILLARD *et al*, 1995a, GWO, 1995). O início da motilidade pode se dar por perturbações drásticas na homeostase das células espermáticas, modificando as propriedades mecânico-químicas do aparelho móvel no axonema flagelar, conduzindo ao início da motilidade espermática (MORISAWA, 1994).

Referente à estudos sobre a composição do plasma seminal não encontramos trabalhos envolvendo espécies nativas. Porém, estudos realizados no exterior apresentam as seguintes considerações à respeito das concentrações de alguns íons no plasma seminal, importantes para o potencial da motilidade espermática e nos mecanismos da ativação dos espermatozoides:

Em *Anguilla japonica*, OHTA & IZAWA (1996), foram observadas as seguintes composições de íons: Sódio 149,3 mM, Potássio 15,2 mM, Cálcio 1,3 mM, Magnésio 1,6 mM e osmolaridade de 337,7 mOsm/l. Para a truta foram verificadas as seguintes concentrações: Sódio 122,2 mM, Potássio 30,4 mM, Cálcio 1,10 mM, Magnésio 0,85 mM e osmolaridade 322,1 mOsm/l (GLOGOWSKI *et al*, 2000). Entretanto, LAHNSTEINER *et al* (1998) demonstram que a mesma espécie pode apresentar diferentes concentrações de Sódio 116,5 mM e Potássio 20,2 mM, e osmolaridade de 290,9 mOsm/l.

Em *Plecoglossus altivelis* a composição do plasma seminal foi observada nos seguintes níveis: Sódio 130 mM, Potássio 11,4 mM, Cálcio 0,6 mM e Magnésio 2,3 mM (OHTA *et al*, 2001), e em carpa comum OHTA & TSUJI (1998), reportaram as seguintes características: Sódio 55 mM, Potássio 82,4 mM, Cálcio 2 mM, Magnésio 0,8 mM e Bicarbonato de Sódio 20 mM.

Se comparamos esses resultados com os obtidos para as concentrações iônicas e para a osmolaridade nas três espécies estudadas, Piracanjuba (Sódio

67,2 ± 11,39 mmol/l, Potássio 37,2 ± 2,89 mmol/l, Cálcio 4,2 ± 1,16 mmol/l e Magnésio 1,09 ± 0,13 mmol/l, Osmolaridade 303,06 ± 13,69 mOsm/l); Jundiá (Sódio 125,66 ± 2,73 mmol/l, Potássio 7,25 ± 0,84 mmol/l, Cálcio 1,01 ± 0,05 mmol/l e Magnésio 2,41 ± 0,36 mmol/l, Osmolaridade 300,66 ± 11,48 mOsm/l) e Piraputanga (Sódio 74,2 ± 5,49 mmol/l, Potássio 28,4 ± 4,27 mmol/l, Cálcio 0,68 ± 0,18 mmol/l e Magnésio 0,93 ± 0,11 mmol/l, Osmolaridade 369,4 ± 28,9 mOsm/l) pode-se concluir que a composição iônica varia entre as espécies e dentro das mesmas, devido a fatores como o meio ambiente ou à época de reprodução. Ressalta-se assim, a importância dos estudos propostos, no sentido de contribuir com novos conhecimentos referentes à composição do plasma seminal para o desenvolvimento de diluidores para cada espécie.

Com respeito à glicose, os valores encontrados neste estudo (Piracanjuba, 0,31 ± 0,14 mM; Jundiá, 0,39 ± 0,19 mM; Piraputanga, 0,33 ± 0,14 mM) coincidem com os valores encontrados por HANSEN *et al.* (1991) em *Salmo salar* (0,45 ± 0,15 mM), e com os valores encontrados por DREANNO *et al.* (1998) trabalhando em *Psetta maxima* (0,44 ± 0,10 mM).

Cabe destacar que, para obter sucesso na criopreservação de sêmen de peixes, deve-se realizar uma diluição do sêmen com soluções contendo um crioprotector, para permitir que o crioprotector penetre nas células espermáticas antes de congelado. Estas soluções devem manter os espermatozoides imóveis durante o processo, isto é possível com o desenvolvimento de soluções específicas para cada espécie, tentando manter semelhante a composição do plasma seminal e obter assim, a máxima utilização dos gametas disponíveis (ERDAHL & GRAHAM, 1987; CIERESZKO, *et al.*, 2000).

Referente às características ultraestruturais dos espermatozoides de Piracanjuba, *Brycon orbignyanus*, Jundiá, *Rhamdia quelen* e Piraputanga, *Brycon hilarii*, observamos que estes apresentam o padrão ancestral, característico das espécies com fecundação externa, sendo muito semelhantes aos espermatozoides descritos nas demais espécies da Ordem Characiformes. Eles estão constituídos por cabeça arredondada, sem acrossoma, peça

intermediária, poucas mitocôndrias e flagelo longo, semelhante ao descrito para outros peixes teleósteos (GRIER, 1981; CRUZ LANDIM & CRUZ HÖFLING, 1986/1987; MATTEI, 1988; ROMAGOSA, 1991; AIRES, 1998; ROMAGOSA *et al.*, 1999; ZAIDEN, 2000; VICENTINI, 2002; AMARAL, 2003; POMPIANI, 2003).

A morfologia do espermatozóide reflete o modo de fertilização de cada espécie. O espermatozóide ancestral, com núcleo arredondado, foi retido pelas espécies com fecundação externa, enquanto as espécies que praticam a fecundação interna sofreram modificações na morfologia do espermatozóide, que apresenta núcleo alongado e peça intermediária bem desenvolvida (GRIER, 1981).

Segundo JAMIESON (1991), o espermatozóide dos teleósteos com fecundação externa chama-se “aquasperm” ou espermatozóide aquático, que é classificado em Tipo I e Tipo II. O Tipo I caracteriza-se por apresentar o eixo do flagelo perpendicular à base do núcleo, devido à rotação sofrida pelo núcleo, no processo da espermiogênese. O Tipo II caracteriza-se por apresentar o eixo do flagelo paralelo à base do núcleo, visto que este não sofre rotação, no decorrer da espermiogênese. Assim sendo, os espermatozóides de Piracanjuba, *Brycon orbignyanus*, Jundiá, *Rhamdia quelen* e Piraputanga, *Brycon hilarii* são classificados como “espermatozóides aquáticos do Tipo I”, pois o eixo do seu flagelo é perpendicular à base do núcleo. Por ser desprovidos de acrossoma e possuir apenas um flagelo, eles são denominados “espermatozóides aquáticos uniflagelados anacrossomais”. A ausência do acrossoma é uma característica comum aos espermatozóides de todos os teleósteos (MATTEI, 1970; NICANDER, 1970), e pode ser compensada pela presença da micrópila nos óvulos, facilitando sua penetração pelos espermatozóides (NAGAHAMA, 1983; RICARDO *et al.*, 1996).

Segundo JAMIESON (1991), a compactação progressiva da cromatina no núcleo das espermátides e sua forma final, nos espermatozóides, apresenta diferentes aspectos. Estas variações parecem ser independentes da Ordem a que pertencem estes animais. Porém, em cada Ordem, os espermatozóides

das espécies pertencentes a uma mesma família podem compartilhar os mesmos caracteres ultraestruturais.

Em Piracanjuba e Piraputanga o núcleo dos espermatozóides apresenta cromatina na forma de grumos. Esse tipo de cromatina é comum dentro da família Characidae, nas subfamílias Bryconinae (ROMAGOSA *et al.*, 1999; ZAIDEN, 2000; POMPIANI, 2003).

Os espermatozóides de Jundiá apresentam núcleo com contorno regular e cromatina compactada homoganeamente. Este tipo de compactação da cromatina é similar à descrita para outros espermatozóides de Characiformes (JAMIESON, 1991; MATOS *et al.*, 2000; ANDRADE *et al.*, 2001).

A fossa nuclear é uma depressão mais ou menos profunda na região do núcleo voltada para o flagelo. Fossa nuclear medial e superficial, somente com uma leve depressão no contorno nuclear, apresentam os espermatozóides de Jundiá no presente estudo.

A fossa nuclear pode ser ainda moderada, profunda ou ausente. A fossa é considerada moderada se tiver a metade do diâmetro nuclear em comprimento, e profunda quando tiver mais que a metade do diâmetro nuclear em comprimento. A fossa nuclear profunda foi observada nos espermatozóides de Piracanjuba e Piraputanga, iguais observações foram feitas por ROMAGOSA *et al.* (1999) para Matrinxã, *Brycon cephalus*; ZAIDEN (2000) para piraputanga, *B. hilarii* e por POMPIANI (2003) para piracanjuba, *B. orbignyanus* e *B. microlepis*.

Geralmente o desenvolvimento inicial do flagelo é lateral ao núcleo. Esta posição inicial pode mudar durante a espermiogênese, dependendo da rotação nuclear. Quando a rotação nuclear não é completa, a fossa nuclear é excêntrica e o flagelo é excêntrico e perpendicular ao núcleo. Quando a rotação é completa, a fossa nuclear é medial e o flagelo é medial e perpendicular ao núcleo. Nas três espécies estudadas, os espermatozóides apresentam flagelo na posição medial e perpendicular ao núcleo, semelhante

ao encontrado por ROMAGOSA *et al.* (1999); ZAIDEN (2000); POMPIANI (2003) e VERÍSSIMO-SILVEIRA, 2003).

Nos Characidae, o arranjo dos centríolos entre si pode ser variável e é considerado espécie-específico (MANSOUR *et al.*, 2002). Nos espermatozoides das três espécies estudadas, o centríolo proximal é observado anterior e oblíquo em relação ao centríolo distal, característica similar foi encontrada em outras espécies de peixes neotropicais (MAGALHÃES, 1998; ROMAGOSA *et al.*, 1999; ZAIDEN, 2000; POMPIANI, 2003).

Usualmente, a peça intermediária dos teleósteos é curta e contém o canal citoplasmático; porém, a peça intermediária pode ser longa, ter um longo canal citoplasmático e apresentar ou não bainha citoplasmática (JAMIESON, 1991; MATTEI, 1991). O canal citoplasmático é formado durante a espermiogênese pelo movimento do complexo centriolar em direção ao núcleo, acompanhado pela membrana plasmática e segmento inicial do flagelo (MATTEI, 1970). Em *Hoplias malabaricus* (QUAGIO-GRASSIOTTO *et al.*, 2001), a peça intermediária é curta e o canal citoplasmático formado durante a espermiogênese, não permanece no espermatozoide. Em Jundiá, *Rhamdia quelen* (presente estudo), a peça intermediária é curta e o canal citoplasmático não permanece no espermatozoide.

Entretanto em Piracanjuba, *Brycon orbignyanus* e Piraputanga, *Brycon hilarii*, a peça intermediária é longa e o canal citoplasmático é longo, similar ao observado em outras espécies das subfamílias Bryconinae (ROMAGOSA *et al.*, 1999; ZAIDEN, 2000; POMPIANI, 2003). Se comparamos o tamanho da peça intermediária com os tempos de motilidade espermática nas três espécies estudadas (*B. orbignyanus*  $76,3 \pm 23,93$  segundos, *R. quelen*  $64,33 \pm 17,16$  segundos e *B. hilarii*  $77,6 \pm 3,71$  segundos), pode-se observar que quanto menor for a peça intermediária, menor será o tempo da motilidade. Isto pode estar relacionado com o número de mitocôndrias dentro desta estrutura.

A cauda dos espermatozoides em teleosteos é basicamente composta pelo flagelo, que é responsável pela propulsão da célula. Este tem a função de manter a eficiência do movimento dos espermatozoides (BACCETTI, 1970). O flagelo dos espermatozoides de Piracanjuba, Jundiá e Piraputanga apresenta configuração clássica do tipo 9+2, similar ao encontrado em outras espécies de peixes neotropicais (ROMAGOSA, 1991; MATOS *et al.*, 1993; ROMAGOSA *et al.*, 1999; GUSMÃO *et al.*, 1999; VICENTINI, 2002; AMARAL, 2003; POMPIANI, 2003).

O flagelo pode apresentar ainda expansões membranosas laterais com comprimento variável, denominadas projeções de membrana ou "fins" e diferenciações intratubulares, que são substâncias eletrondensas em certas duplas do túbulo A dos microtúbulos que formam o axonema. No presente estudo não foram observadas estas projeções de membrana no flagelo, nem diferenciações intratubulares nos espermatozoides das três espécies estudadas.

***Conclusões***



A partir do estudo realizado com *Brycon orbignyana*, *Rhamdia quelen* e *Brycon hilarii* e com base na literatura, conclui-se que:

- 1- As características seminais nas três espécies analisadas são diferentes, sendo portanto, espécie-específicas.
- 2- Dentro das características físicas do sêmen, a cor e o aspecto estão intrinsecamente relacionadas à concentração de espermatozoides.
- 3- O uso de sondas fluorescentes (Diacetato de Carboxifluoresceína e Iodeto de Propídio), é uma ferramenta eficaz para a análise da viabilidade espermática em peixes.
- 4- O sêmen das três espécies pode ser mantido a baixas temperaturas (4°C) por períodos curtos de tempo (6 horas), sem alterar as características físicas, químicas e estruturais do sêmen e dos espermatozoides.
- 5- Ultraestruturalmente, os espermatozoides de Piracanjuba, *Brycon orbignyana*, Jundiá, *Rhamdia quelen* e Piraputanga, *Brycon hilarii* apresentam características ancestrais próprias de peixes com fecundação externa, classificando-os como “espermatozoides aquáticos uniflagelados anacrossomais” do Tipo I.
- 6- O tamanho da peça intermediária pode ter uma relação direta com a duração da motilidade espermática.

## ***Referências Bibliográficas***

**Aires, E.D.** *Características morfológicas e histofisiológicas da via espermática da Piracanjuba, Brycon orbignyana (Pisces: Teleostei). Tese (Doutorado em Anatomia) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências – Botucatu - SP. 69p., 1998.*

Althamer, B.B. **Avaliações ultraestruturais das células do interstício e císticas do testículo de Piracanjuba, Brycon orbignyana (Valenciennes, 1849) (Pisces, Characidae), durante o ciclo sexual.** Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) – Universidade Estadual Paulista, Centro de Aqüicultura – Jaboticabal - SP. 75p., 1999.

Amaral, A.A. **Aspectos ultra-estruturais da espermatogênese do piaçu Leporinus macrocephalus Garavello & Britski, 1988 (Teleostei, Characiformes, Anostomidae)** Tese (Doutorado em Aqüicultura) – Universidade Estadual Paulista, Centro de Aqüicultura – Jaboticabal - SP. 77p., 2003.

Andrade, R.F., Bazzoli, N., Rizzo, E. Continuous gametogenesis in the neotropical freshwater teleost, *Bryconops affinis* (Pisces:Characidae). **Tissue & Cell**, v.33, p.524-532. 2001.

Andrade-Talmelli, E.F., Kavamoto, E.T., Fenerich-Verani, N. Características seminais da Piabanha, *Brycon insignis* (Steindachner, 1876), após estimulação hormonal. **B. Inst. Pesca** 27(2):149-154, 2001.

Azerêdo, G. **Uso de sondas fluorescentes na valiação da integridade de membranas plasmáticas de espermatozóides de caprinos (*Capra hircus* L.), submetidos à congelação na presença e ausência de plasma seminal.** Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Jaboticabal – SP 72 p., 1999.

Baccetti, B. **Comparative spermatology.** Academic Press, New York, p.169-182, 1970.

Bedore, A.G. **Características e criopreservação do sêmen de pacu-caranha (*Piaractus mesopotamicus*) e de Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*).**

Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) – Universidade Federal de Minas Gerais - Instituto de Ciências Biológicas. Belo Horizonte – MG 53p., 1999.

Bergeron, A., Vandenberg, G., Proulx, D., Bailey, J. Comparison of extenders, dilution ratios and theophylline addition on the function of cryopreserved walleye semen. **Theriogenology**, v. 57, p. 1061-1071, 2002.

Billard, R. La spermatogênese de *Poecilia reticulata*. IV. La spermiogênese. Etude ultrastructurale. **Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys** 10:493-510, 1970.

Billard, R. Artificial Insemination in Fish. In: LAMMING, G. E. (Org.). **Marshall's Physiology of Reproduction**. 4.ed. Endinburgh, London, Melbourne and New York:

Churchill Livingstone, Chapter 9, p.870-887. 1990.

Billard, R. & M.P. Cosson. Some problems related to the assesment of sperm motility in freshwater fishes. **Journal of Experimental Zoology** 261:122-131, 1992.

Billard, R., Cosson, J., Crim, L.W. Motility of fresh and aged halibut sperm. **Aq. Liv. Res.**, v. 6, p. 67-75, 1993.

Billard, R., Cosson, M.P., Perchec, G., Linhart, O. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. **Aquaculture** 129:95-112, 1995a.

Billard, R., Cosson, J., Crim, L.W., Suquet, M. Sperm Physiology and Quality in: **Broodstock Management and Egg and Larval Quality**. Eds. Bromage, N. R. and Roberts, R.J. Blackwell Science. 424 p, 1995b.

Boitano, S. & Omoto, C.K. Membrane hiperpolarization activates trout sperm without an increase in intracelular pH. **J. Cell. Sci.** V. 98, p. 343-349, 1991

Chambeyron, F. & Zohar, Y. A diluent for sperm cryopreservation of gilthead sea bream *Spaurus aurata*. **Aquaculture**, v. 90, p. 345-352, 1990

Ciereszko, A., Glogowski, J., Dabrowski, K. Biochemical characteristics of seminal plasma and spermatozoa of freshwater fishes. In: **Cryopreservation in Aquatic Species**. Tiersch, T.R. and Mazik, P.M., Editors. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana. Pp 20-48, 2000.

Corley-Smith G. & Brandhorst, B. Preservation of endangered species and populations: A role for genome banking, somatic cell cloning, and androgenesis?. **Mol. Reprod. and Dev.** 53:363-367, 1999

Cosson, J., Billard, R., Cibert, C., Dréanno, C. Ionic factors regulating the motility of fish sperm in: **The Male Gamete**. Chapter 16:161-186, 1999

Cosson, J., Linhart, O., Mims, S., Shelton, W., Rodina, M. Analysis of motility parameters from paddlefish and shovelnose sturgeon spermatozoa. **J. Fish Biol.** v. 56, p. 1348 – 1367, 2000

Cruz-Landim, C. & Cruz-Höfling, M.A. Aspectos da espermatogênese de tucunaré, *Cichla ocellaris* Schneider, 1801 (Teleostei, Cichlidae). **Acta Amazônica**. v.16/17, p. 65-72, 1986/1987.

De Carvalho Gomes, L., Ineu Golombieski, J., Chippari Gomes, A. R., Baldisseroto, B. Biologia do Jundiá, *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae) **Ciência Rural** 30:1, 179-185, 2000

Dreanno, C., Cosson, J., Ciben, C., André, F., Suquet, M., Billard, R. CO<sub>2</sub> effects on Turbot *Scophthalmus maximus* spermatozoa motility in July Goetz, F.W. and Thomas, P. Eds. **Proceedings of the Fish International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish**. University of Texas At Austin – Austin, Texas. 1995

Dreanno, C., Suquet, M., Desbruyères, E., Cosson, J., Le Delliou, H., Billard, R. Effect of urine on semen quality in turbot (*Psetta maxima*). **Aquaculture**, v.169, p. 247-262, 1998.

Emri, M., Márián, T., Tirón, L., Balkay, L., Krasznai, Z. Temperature adaptation changes ion concentrations in spermatozoa and seminal plasma of common carp without affecting sperm motility. **Aquaculture** v. 167, p. 85-94, 1998

Erdahl, A. & Graham, E. Fertility of teleost semen as affected by dilution and storage in a seminal plasma – mimicking medium. **Aquaculture**, v. 60, p. 311-321, 1987.

Fauvel, C., Savoye, O., Dreanno, C., Cosson, J., Suquet, M. Characteristics of sperm of captive seabass in relation to its fertilization potential. **Journal of Fish Biology**, v.54, p.356-369, 1999.

Ferreira, A.A. **Influência de diferentes níveis de pH, no desempenho de ovos, larvas e pós-larvas de Jundiá (*Rhamdia quelen*)**. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC. 21p., 2000.

Ferreira, A.A., Nuñez, A.P de O., Luz, R.K., Tataje, D.A.R., Esquivel, J.R., Restrepo, J.B. Avaliação qualitativa e quantitativa do sêmen do Jundiá, *Rhamdia quelen*. **B. Inst. Pesca** 27(1):57-60, 2001.

Fogli Da Silveira, W., Kavamoto E.T., Narahara, M.Y. Avaliação da qualidade e criopreservação em forma de “pellets” do sêmen do bagre, *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840). **B. Inst. Pesca**, v.12, n.4, p.7-11, 1985.

Fogli Da Silveira, W., Kavamoto, E.T., Rigolino, M.G., Tabata, Y.A. O método espectrofotométrico na avaliação da concentração de espermatozoides da truta arco-íris, *Salmo irideus* Gibbons. **B. Inst. Pesca**, v.14, p.69-73, 1987.

Fogli Da Silveira, W.; Kavamoto, E.T.; Cestarolli, M.A.; Godinho, H.M.; Ramos, S.M.; Silveira, A.N. Avaliação espermática, preservação criogênica e fertilidade do sêmen do pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), proveniente de reprodução induzida. **B. Inst. Pesca**, São Paulo, v. 17(único), p. 1-3, 1990.

Ganeco, L.N. **Análise dos ovos de Piracanjuba, *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849), durante a fertilização e o desenvolvimento embrionário, sob condições de reprodução induzida.** Dissertação (Mestrado em Aqüicultura). Universidade Estadual Paulista – Centro de Aqüicultura, Jaboticabal – SP. 66p., 2003.

Garner, D.L., Pinkel, D., Johnson, L.A., Pace, M.M. Assessment for spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. **Biology of Reproduction**, v.34, n. 1, p. 127-138, 1986.

Gatti, J-L., Billard, R., Christen, R. Ionic regulation of the plasma membrane potential of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) spermatozoa: role in the initiation of sperm motility. **J. Cell. Physiol.** v.143, p. 546-554, 1990.

Géry, J., Mahnert, V. Notes sur quelques *Brycon* des bassins de l'Amazonie. Du Paraná-Paraguay et du sud-Est brésilien (Pisces, Characiforms, Characidae). **Rev. Suisse Zool.** 99(4):793-819, 1992.

Glogowski, J., Kwasnik, M., Piros, B., Dabrowski, K., Goryczko, K., Dobosz, S., Kuzmininski, H., Ciereszko, A. Characterization of rainbow trout milt collected with a catheter: semen parameters and cryopreservation success. **Aquaculture Research**, v. 31, p. 289-296, 2000.

Godinho, H.P., Coser, A.M.L. Bases morfofuncionais da espermatogênese e criopreservação de sêmen de peixes. In: **Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**, 11, 1995. **Anais...** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, p.16-25. 1995.

Gravance, C.G., Garner, D.L., Miller, M.G., Berger, T. Fluorescent probes and flow cytometry to assess rat sperm integrity and mitochondrial function. **Reproductive Toxicology** 15:5-10. 2001.

Grier, H.J. Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. **Amer. Zool.**, v. 21, p. 345-357, 1981.

Grier, H.J. Chordate testis: the extracellular matrix hypothesis. **J. Exp. Zool.**, v. 261, p. 151-160, 1992.

Gusmão, P., Foresti, F., Quagio-Grassiotto, I. Ultrastructure of spermiogenesis in *Plagioscion squamosissimus* (Teleostei, Perciformes, Sciaenidae). **Tiss. Cell**, v.31 (6), p. 627-633, 1999.

Gwo, J-C. Cryopreservation of Black Grouper (*Epinephelus malabaricus*) spermatozoa. **Theriogenology** v. 39, p. 1331 – 1342, 1993.

Gwo, J-C. Ultrastructural study of osmolality effect on sperm of three marine teleosts. in July Goetz, F.W. and Thomas, P. Eds. **Proceedings of the Fish International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish**. University of Texas At Austin – Austin, Texas. 1995.

Gwo, J-C., Ohta, H., Okusawa, K., Wu, H-C Cryopreservation of sperm from the endangered formosan landlocked salmon (*Oncorhynchus masou formosanus*). **Theriogenology** 51:569-582, 1999.

Hamamah, S. & Gatti, J-L. Role of the ionic environment and internal pH on sperm activity. **Hum. Rep.** v.13, Supl. 4, p. 20-30, 1998.

Hansen, G., Refstie, T., Gjerde, B. Evaluation of milt quality of Atlantic salmon. **Aquaculture**, v.95, p. 125-132, 1991.

Harrison, R.A.P. & Vickers, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 88, n. 1, p. 343-352, 1990.



Honeyfield, D.C. & Krise, W.F. Measurement of milt quality and factors affecting viability of fish spermatozoa. In: **Cryopreservation in Aquatic Species**. Tiersch, T.R & Mazik, P.M. Editors. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana. p. 49-58. 2000.

Jamieson, B.G.M. **Fish Evolution and Systematics: Evidence from spermatozoa**. Cambridge University Press. 317 p., 1991.

Kavamoto, E.T., Fogli Da Silveira, W., Rigolino, M.G., Carvalho Filho, A.C. Avaliação macro e microscópica do sêmen da truta arco-íris, *Salmo irideus* Gibbons. **B. Inst. Pesca** 12(3):73-81, 1985.

Kavamoto, E.T., Fogli Da Silveira, W. Características físicas, químicas e microscópicas de sêmen do Bagre, *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840) em condições de campo. **B. Inst. Pesca** 13(1):95-100, 1986.

Kavamoto, E.T., Fogli Da Silveira, W., Godinho, H.M. Características seminais do curimatá, *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881. **B. Inst. Pesca** 13(2):45-50, 1986.

Kavamoto, E.T. **Efeito da ação hormonal sobre as características seminais do curimatá, *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária e Zootecnia) – Universidade de São Paulo – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. São Paulo – SP 101p., 1993.

Kavamoto, E.T., Narahara, M.Y., Mainardes-Pinto, C.S.R., Andrade-Talmelli, E.F., Ferraz, E. De M. Efeito do hCG na produção de sêmen do curimatá (*Prochilodus scrofa*, Steindachner, 1881). **Revista Ceres** 43(245):76-85, 1996.

Kavamoto, E.T., Mainardes-Pinto, C.S.R., Andrade-Talmelli, E.F., Campos, D.E.S. Produção espermática do curimatá *Prochilodus scrofa*, Steindachner, 1881. **B. Inst. Pesca** 24 (único):73-78, 1997.

Kavamoto, E.T. **Efeito da estimulação hormonal sobre as características seminais, desenvolvimento dos testículos e ocorrência de células espermáticas anormais no sêmen de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887)** Tese (Doutorado em Medicina Veterinária e Zootecnia) – Universidade de São Paulo – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. São Paulo – SP 115p., 1998.

Lahnsteiner, F., Patzner R., Weismann, T. The testicular main duct and the spermatic duct in some cyprinid fishes II. Composition of the seminal fluid. **Journal of Fish Biology** 44:459-467, 1994.

Lahnsteiner, F., Berger, B., Weismann, T., Patzner, R.A. Evaluation of semen fitness of the Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* for cryopreservation by physiological and biochemical parameters. in July Goetz, F.W. and Thomas, P. Eds. **Proceedings of the Fish International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish**. University of Texas At Austin – Austin, Texas, 1995.

Lahnsteiner, F., Berger, B., Weismann, T., Patzner, R.A. Determination of semen quality of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by sperm motility, seminal plasma parameters, and spermatozoal metabolism. **Aquaculture** v. 163, p.163 – 181, 1998.

Lahnsteiner, F. Introduction to the special issue on 'cryopreservation of gametes in aquatic species'. **Aquacul. Res.**, v.31, p.229, 2000.

Leung, L.K.P. & Jamieson, B.G.M. Live preservation of fish gametes. In: **Fish Evolution and Systematics: Evidence from Spermatozoa**, (ed. B.G.M. Jamieson). Cambridge University Press, pp. 245-95, 1991.

Linhart, O., Slechta, V., Slavik, T. Fish sperm composition and biochemistry. **Bull Inst. Zool.** Academia Sinica 16:285-311, 1991.

Luz, R.K., Ferreira, A.A., Reynalte, D.A.T., Zaniboni Filho, E. Avaliação qualitativa e quantitativa do sêmen de suruvi, *Steindachneridion scripta* (Pimelodidae). **B. Inst. Pesca** 27(1):39-42, 2001.

Magalhães, A.L.B. de **Gametogênese e reprodução de *Galeocharax knerii* (Steindachner, 1879) (Pisces, Characidae) nos reservatórios de Furnas e Itumbiara: estudo biométrico, histológico e ultra-estrutural.** Tese (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas – Belo Horizonte - MG. 1998.

Maggese, M.C., Cukier, M., Cussac, V.E. Morphological changes, fertilizing ability and motility of *Rhamdia sapo* (Pisces, Pimelodidae) sperm induced by media of different salinities. **Rev. Brasl. Bio.**, v.44, n.4, p.541-546, 1984.

Mansour, N., Lahnsteiner, F., Patzner, C.A. The spermatozoon of the African catfish: fine structure, mobility, viability and behavior in seminal vesicle secretion. **Journal of Fish Biology**, v.60, p.545-560, 2002.

Matos, E., Matos, P., Oliveira, E. Ultraestrutura do espermatozóide do pacu, *Metynnis maculatus* Kner, 1860 (Pisces, Teleostei) do rio Amazonas. **Rev. Bras. Ciênc. Morfol.**, v.10, p.7-10, 1993.

Matos, E., Matos, P., Corral, L. Estrutura fina do espermatozóide de *Acestrorhyncus falcatus* Bloch (Teleostei, Characidae) da região norte do Brasil. **Rev. Brasil. Zool.**, v.17, p.747-752, 2000.

Mattei, X. Spermioogénese compare dês Poisson. In: Baccetti, B. (Ed.) **Comparative spermatology**. New York: Academic Press, p. 57-72, 1970

Mattei, X. The flagella apparatus of spermatozoa in fish. Ultrastructure and evolution. **Biol. Cell.**, v. 63, p. 151-158, 1988.

Mattei, X. Spermatozoon ultrastructure and its systematic implications in fishes. **Can. J. Zool.** V. 69, p. 3038-3055, 1991.

Melo, J.S.C. Criação de espécies do gênero *Brycon*. In: **SEMINÁRIO SOBRE CRIAÇÃO DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Brycon***, I, 1994, CEPTA, Pirassununga, SP, Anais, p. 1, 1994.

Mendoza, J.O.J. Criação de espécies do gênero *Brycon*. In: **SEMINÁRIO SOBRE CRIAÇÃO DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Brycon***, I, 1994, CEPTA, Pirassununga, SP, Anais, p. 31-48, 1994.

Morisawa, M. & Susuki, K. Osmolality and potassium ion: their roles in initiation of sperm motility in teleosts. **Science** v. 210, p. 1145-1147, 1980.

Morisawa, M., Suzuki, K., Shimizu, H., Morisawa, S., Yasuda, K. Effects of osmolality and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes. **J. Exp. Biol.** v.107, p.95-103, 1983.

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

Morisawa, M. & Morisawa, S. Acquisition and initiation of sperm motility. In: **Controls of Sperm Motility: Biological and Clinical Aspects.** (ed. C. Gagnon). CRC Press. Boca Raton. FL. p. 137-151, 1990.

Morisawa, M. Cell signalling mechanism for sperm motility. **Zool. Sci.** v.11, p. 647-662, 1994.

Murgas, L.D.S, Silva, M. O.B., Mello, C.B.M., Kabeya, D.M., Santana, G.M. Avaliação quantitativa e qualitativa do sêmen de piaparas (*Leporinus obtusidens*). **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.23, n.3, p.246-248, 1999.

Nagahama, Y. The functional morphology of teleost gonads. In Hoar, W.S., Randall, D.J., Donaldson, E.M. (ed.) **Fish Physiology.** New York, Academic Press, 1983.

Nicander, L. **Comparative studies on the fine structure of vertebrate spermatozoa.** In Bacetti, B. *Comparative Spermatology*, p.47-55, Academic Press, N. York. 1970.

Oda, S., Morisawa, M. Rises of intracellular  $Ca^{2+}$  and pH mediate the initiation of sperm motility by hypoosmolality in marine teleosts. **Cell. Motil. Cytoskel.** v. 25, p. 171-178, 1993.

Ohta, H. & Izawa, T. Diluent for cool storage of the Japanese eel (*Anguilla japonica*) spermatozoa. **Aquaculture.** v.142, p. 107 – 118, 1996.

Ohta, H. & Shinriki, Y. Changes in osmotic pressure that trigger the initiation of sperm motility in the river sculpin *Cottus hangiongensis*. **Fish Physiol. and Biochem.** v.18, p. 29-35, 1998.

Ohta, H. & Tsuji, M. Ionic environment necessary for maintenance of potential motility in the common carp spermatozoa during *in vitro* storage. **Fisheries Science.** v.64, p.547 – 552, 1998.

Ohta, H., Unuma, T., Tsuji, M., Yoshioka, M., Kashiwagi, E. Effects of bicarbonate ions and pH on acquisition and maintenance of potential for motility in ayu, *Plecoglossus altivelis* Temminck et Schlegel (Osmeridae), spermatozoa. **Aquaculture Research** v. 32, p. 385 – 392, 2001.

Paiva, M.P. **Grandes Represas do Brasil.** Brasilia: Editerra, 292p, 1982.

Patzner, R.A. Morphology of the male reproductive system of *Coralliozetus angelica* (Pisces, Blennioidei, Chaenopsidae). **J. of Fish Biology** 39:867-872, 1991.

Perchec G., Jeulin, C., Cosson, J., André, F., Billard R. Relationship between sperm ATP content and motility of carp spermatozoa **J. Cell Sci.** v.108, p. 747-753, 1995.

Pompiani, P.G. **Ultraestrutura da espermiogênese e dos espermatozóides de peixes da ordem Characiformes, família Characidae (Teleostei, Ostariophysii) : uma abordagem filogenética.** Tese (Doutorado em Ciências Biológicas. Área de Concentração: Zoologia) – Universidade Estadual Paulista – Instituto de Biociências - Botucatu – SP 86p., 2003.

Quagio-Grassiotto, I., Carvalho, E.D. Ultrastructure of *Sorubim lima* (Teleostei, Siluriformes, Pimelodidae) spermiogenesis. **J. Submicrosc. and Pathol.** 4:345-352, 2000.

Quagio-Grassiotto, I., Negrão, J.N.C., Carvalho, E.D. Ultrastructure of spermiogenic cells and spermatozoa in *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Characiformes, Erythrinidae). **Journal of Fish Biology**, v.59, p.1948-1502, 2001.

Rana, K. Preservation of Gametes in: **Broodstock Management and Egg and Larval Quality.** Eds. Bromage, N. R. and Roberts, R.J. Blackwell Science. 424 p., 1995.

Reynolds, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v.17, p. 208-212, 1963

Ricardo, M.C.P., Aguiar, C.A., Rizzo, E., Bazzoli, N. Morfologia da micrópila e da célula micropilar em teleósteos neotropicais de água doce. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 48, p. 17-24, 1996.

Rodriguez, M. **Técnicas de evaluación cuantitativa de la madurez gonádica en peces.** Ed. A.G.T. 79 p., 1992.

Rodriguez-Martinez, H., Larson, B., Pertoft, H. Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 9, n. 1-3, p. 297-308, 1997.

Romagosa, E. **Mudanças morfológicas (microscopia de luz e eletrônica) das gônadas de pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) durante**

**o ciclo reprodutivo, em condições de confinamento.** Tese – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP – Rio Claro – SP 177p., 1991.

Romagosa, E. **Desenvolvimento gonadal (morfologia; ultra-estrutura) e indução da reprodução do matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther, 1869) em cativeiro, Vale do Ribeira, São Paulo.** Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) – Universidade Federal de São Carlos – São Carlos – SP 218p., 1998.

Romagosa, E., Narahara, M.Y., Borella, M.I., Parreira, S.F., Fenerich-Verani, N. Ultrastructure of the germ cells in the testis of matrinxã, *Brycon cephalus* (Teleostei, Characidae). **Tiss. Cell.**, v.31 (6), p.540-544, 1999.

Rurangwa, E., Volckaert, F.A.M, Huyskens, Kime, G.D.E., Otlevier, F. Quality control of refrigerated and cryopreserved semen using computer-assisted sperm analysis (casa), viable staining and standardized fertilization in african catfish (*clarias gariepinus*), **Theriogenology** 55:751-769, 2001.

Saad, A., Billard, R. Production et gestion des espermatozoides chez le poisson chat europeen *Silurus glanis*. **Aquat. Living Res.** 8:323-328, 1995.

Saccol, A.P. **Larvicultura da Piracanjuba, *Brycon orbignyanus* Valenciennes, 1849 (Characiformes, Characidae) em diferentes densidades, dietas e formatos de tanque** Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Santa Catarina Florianópolis . 15 p., 2002.

Salisbury, Y.G.W. ; Vandermark, N.L. **Fisiología de la reproducción e inseminación artificial de los bóvidos.** Trad. D. José Maria Santiago Luque. Zaragoza, ACRIBIA, 707 p. 1964.

Sanabria, A.I. **Efeito da restrição alimentar no desempenho reprodutivo de machos de matrinxã, *Brycon cephalus***. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) Universidade Estadual Paulista, Centro de Aqüicultura – Jaboticabal – SP 60 p., 2002.

Selman, K. & Wallace, R.A. Gametogenesis in *Fundulus heteroclitus* **American Zoology**, v. 26, p. 173-192, 1986.

Senhorini, J.A.; Ceccarelli, P.S., Ramos, S.M. Criação de larvas de Piracanjuba, *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849, Eingeman, 1903) em viveiros. In: **SIMPÓSIO BRASILEIRO DE Aqüicultura, 8, ENCONTRO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE ORGANISMOS AQUÁTICOS, 3**, Piracicaba, SP, Resumos, p. 84, 1994.

Shangguan, B. & Crim, L.W. The effect of stripping frequency on sperm quantity and quality in winter flounder (*Pleuronectes americanus* Walbaum) in July. Goetz, F.W. and Thomas, P. Eds. **Proceedings of the Fish International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish**. University of Texas At Austin – Austin, Texas, 1995.

Stoss, J. Fish gamete preservation and spermatozoan physiology, in **Fish Fisiology**, Vol. IX B, Hoar, W.; Randall, D. And Donaldson, E., Eds. Academic Press, New York, Chap. 6, 1983.

Suquet, M., Dorange, G., Omnes, M.H., Normant, Y., Le Roux, A., Fauvel, C. Composition of the seminal fluid and ultrastructure of the spermatozoon of turbot (*scophthalmus maximus*) **Journal of Fish Biology** 42:509-516, 1993.

Suquet, M., Billard, R., Cosson, J., Dorange, G., Chauvaud, L., Mugnier, C., Fauvel, C. Sperm features in turbot *Scophthalmus maximus*: A comparison with



other freshwater and marine fish species. **Aquatic Living Resources** 7:283-294, 1994.

Tiersch, T. Cryopreservation of fish sperm: Laboratory, hatchery and field studies of twenty species. in July Goetz, F.W. and Thomas, P. Eds. **Proceedings of the Fish International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. University of Texas At Austin** – Austin, Texas 2-8, 1995

Toth, G.P., Ciereszko, A., Christ, S.A., Dabrowski, K. Objective analysis of sperm motility in the lake sturgeon, *Acipenser fulvescens*: activation and inhibition conditions. **Aquaculture** 154:337-348, 1997.

Troiano, L., Granata, A.R.M., Cossarizza, A., Kalashnikova, G., Bianchi, R., Pini, G., Tropea, F., Carani, C., Franceschi, C. Mitochondrial membrane potential and DNA stainability in human sperm cells: A flow cytometry analysis with implications for male infertility. **Experimental Cell Research** 241:384-393. 1998.

Tsuji, M., Ikeda, K., Ohta, H. Changes in ionic environment inducing ayu spermatozoa motility. **Nippon Suisan Gakkaishi** v.66, p. 55-61, 2000.

Vaz, M.M., Torquato, V.C., Barbosa, N.D.C. (Org.). **Guia Ilustrado de peixes da bacia do Rio Grande**. Belo Horizonte: CEMIG/CETEC. 2000.

Verísimo-Silveira, R. **Ciclo reprodutivo e cinética da espermatogênese do dourado, *Salminus maxillosus* (Valenciennes, 1849)** Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) – Universidade Estadual Paulista – Centro de Aqüicultura - Jaboticabal – SP. 2003.

Vicentini, C.A. **Estrutura comparativa da espermatogênese em peixes neotropicais: *Prochilodus scrofa*, *Astyanax scabripinnis* e *Phalloceros caudimaculatus* (Pisces, Teleostei)** Tese (Livre Docência) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências – Bauru - SP. 102p., 2002.

Vizziano, D., García, J.R., Carnevia, D. Effect of cations, pH and osmolality on sperm motility of male white croaker *Micropogonias furnieri* in July Goetz, F.W. and Thomas, P. Eds. **Proceedings of the Fish International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish**. University of Texas At Austin – Austin, Texas, 1995.

Yao, Z., Richardson, G., Crim, L. A diluent for prolonged motility of ocean pout (*Macrozoarces americanus* L.) sperm. **Aquaculture** 174:183–193, 1999.

Yao, Z., Crim, L., Richardson, G., Emerson, C. Motility, fertility and ultrastructural changes of ocean pout (*Macrozoarces americanus* L) sperm after cryopreservation **Aquaculture** v.181, p.361 – 375, 2000.

Zaiden, S.F. **Estrutura testicular da Piracanjuba, *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849) (Pisces, Characidae) nos vários estádios do ciclo sexual**. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) – Universidade Estadual Paulista, Centro de Aqüicultura – Jaboticabal - SP. 72p., 1997.

Zaiden, S.F. **Morfologia gonadal e metabolismo energético da Piraputanga *Brycon hilarii* (Cuvier e Valenciennes, 1849)(Pisces, Characidae), em cativero, durante o ciclo reprodutivo anual**. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Centro de Aqüicultura – Jaboticabal - SP. 152p., 2000.