

Caio Cesar França Magnotti

Espermatologia e conservação do sêmen da tainha (*Mugil liza*)

Tese submetida ao Programa de Pós  
Graduação em Aquicultura da Universidade  
Federal de Santa Catarina para a obtenção  
do Grau de Doutor em Aquicultura

Orientador: Dr. Vinicius Ronzani Cerqueira

Florianópolis  
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária  
da UFSC.

Magnotti, Caio

Espermatologia e conservação do sêmen da tainha  
(Mugil liza) / Caio Magnotti ; orientador, Vinicius  
Cerqueira, 2017.

93 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de  
Pós-Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. Espermatozoide. 3. Gameta. 4.  
Piscicultura. 5. Reprodução. I. Cerqueira, Vinicius.  
II. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. III. Título.

# Espermatologia e conservação do sêmen da tainha (*Mugil liza*)

Por

CAIO CESAR FRANÇA MAGNOTTI

Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do título de

## **DOUTOR EM AQUICULTURA**

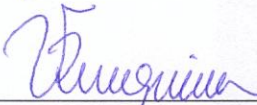
e aprovada em sua forma final pelo Programa de  
Pós-Graduação em Aquicultura.



---

Prof. Alex Pires de Oliveira Nuñez, Dr.  
Coordenador do Programa

Banca Examinadora:



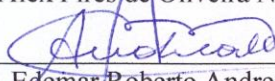
---

Dr. Vinícius Ronzani Cerqueira – *Orientador*



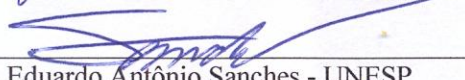
---

Dr. Alex Pires de Oliveira Nuñez - UFSC



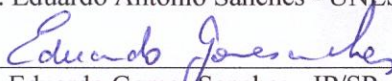
---

Dr. Edegar Roberto Andreatta - UFSC



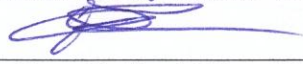
---

Dr. Eduardo Antônio Sanches - UNESP



---

Eduardo Gomes Sanches - IP/SP



---

Dr. Evoy Zaniboni Filho - UFSC



Este trabalho é dedicado a  
minha filha Sofia Magnotti.



## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que direta e indiretamente influenciaram e participaram da minha escolha para formação acadêmica.

Agradeço ao Dr. Vinicius Ronzani Cerqueira por me orientar durante o doutorado, e contribuir com seu amplo conhecimento sobre reprodução de peixes marinhos.

Ao Dr. Eduardo Gomes Sanches por apresentar os fundamentos e proporcionar o primeiro contato com as técnicas de refrigeração e criopreservação de sêmen de peixes marinhos no ano de 2014.

Aos colegas chilenos, Msc. Elias Figueroa, Msc. Claudia Ubilla Madrid, Dr. Ivan Valdebenito Isler e Dr. Jorge Farias, da Universidad Católica de Temuco (UCT) e Universidad de La Frontera (UFRO), por me acolherem durante um período do ano de 2015 e me passarem muito conhecimento sobre conservação e análise de sêmen de peixes. Também por ajudar durante estes últimos anos no planejamento e discussão dos trabalhos resultantes desta pesquisa.

Agradeço todos os amigos e pesquisadores do LAPMAR que estiveram presentes nos momentos de estresse e tranquilidade durante todo este período e foram parceiros de inúmeras discussões técnicas e científicas. Aos amigos da Aquicultura, PPG-AQI e de outros PPG do Centro de Ciências Agrárias pelos momentos de descontração, churrascos, praias, festas, “cazona”, pescarias..... essenciais para o equilíbrio da vida e bom desenvolvimento pessoal durante estes últimos anos.

Aos professores do Departamento de Aquicultura que me passaram as bases do conhecimento e indicaram os caminhos para o desenvolvimento de novas pesquisas e pensamentos.

Agradeço especialmente a minha família, que me possibilitaram a vinda para a UFSC em 2006, e minha manutenção no curso no período de graduação e início do mestrado.

Aos membros titulares e suplentes da banca: Dr. Evoy Zaniboni Filho, Dr. Alex Pires de Oliveira Nuñez, Dr. Giuliano Palemão Carlos Maia Huergo, Dr. Edeimar Roberto Andreatta, Dr. Eduardo Gomes Sanches, Dr. Eduardo Antônio Sanches e Dr. José Luiz Pedreira Mouriño, pela disponibilidade e dedicação em avaliar a tese e pelas considerações que ajudaram muito na publicação dos artigos científicos.





## RESUMO

O método de estocagem em temperaturas reduzidas é uma alternativa para disponibilizar sêmen de boa qualidade para inseminação artificial. Para este procedimento, é necessário definir protocolos específicos para a conservação do sêmen de cada espécie. No primeiro experimento foram analisados 15 machos selvagens ( $51,5 \pm 2,2$  cm e  $1390,0 \pm 187,2$  g) e 15 de cativeiro ( $28,3 \pm 1,5$  cm e  $231,9 \pm 34,0$  g) de *M. liza* que apresentavam espermição após massagem abdominal. Foram encontradas diferenças significativas no volume de sêmen, na densidade dos espermatozoides, espermatócrito, na vitalidade espermática e na morfometria. Os resultados demonstram que a idade dos peixes e as características individuais influenciam diretamente na qualidade do sêmen. Ativando os espermatozoides com soluções de diferentes salinidades e pH, o melhor tempo de motilidade foi obtido na salinidade 34,8 ( $189 \pm 15$  seg.) e melhor porcentagem de motilidade na salinidade 34,6 ( $95 \pm 10\%$ ), sendo que a variação de salinidade entre 30 e 35 não gerou prejuízos significativos na motilidade dos espermatozoides da *M. liza*. O pH de 8,5 propiciou o maior tempo de motilidade ( $218 \pm 13$  seg.) e 8,7 a melhor taxa de motilidade ( $93 \pm 12\%$ ). No experimento dois foi realizado teste de refrigeração do sêmen da espécie. Amostras de sêmen foram mantidas diluídas com CF-HBSS na proporção 1:3 (v:v) e *in natura*, a  $4 \pm 2$  °C por 96 horas. Durante este período, foi verificado aumento significativo no tempo de motilidade por 18 h, melhor taxa de vitalidade por 48 h e melhor taxa de ativação dos espermatozoides por 96 h de armazenamento quando utilizado o diluidor espermático. Estes resultados demonstram que mesmo sem diluentes o sêmen da tainha apresenta motilidade após 96 horas. A utilização do diluente gera uma melhora no desempenho de motilidade, podendo ser uma alternativa para aumentar o tempo de viabilidade do sêmen refrigerado de *M. liza*. Para os próximos estudos, é recomendável utilizar outras substâncias diluidoras, adicionar à diluição compostos suplementares (vitaminas, antioxidantes, açúcares) e substâncias crioprotetoras e verificar sua influencia no tempo de estocagem dos espermatozoides. Testar novas composições de ativadores espermáticos, testes de fertilização, análises de motilidade computadorizadas e análises fisiológicas mais aprofundadas também são essenciais para o desenvolvimento das técnicas de conservação de sêmen.

Palavras-chave: Aquicultura; Espermatozoide; Gameta; Piscicultura; Reprodução



## ABSTRACT

The low temperature storage method is an alternative to provide good quality semen for artificial insemination. For this procedure, it is necessary to define specific protocols for semen conservation of each species. In the first experiment 15 wild males ( $51.5 \pm 2.2$  cm and  $1390.0 \pm 187.2$  g) and 15 cultured males ( $28.3 \pm 1.5$  cm and  $231.9 \pm 34.0$  g) of *M. liza* which presented spermiation after abdominal massage, significant differences were found in semen volume, as well as sperm density, spermatocrit, vitality and morphometry. These results demonstrate that fish age and individual characteristics directly influence semen quality. After testing spermatozoa activation with different salinities and pH solutions, the best motility time was obtained at salinity 34.8 ( $189 \pm 15$  sec) and a better percentage of motility at salinity 34.6 ( $95 \pm 10\%$ ). Salinity variations between 30 and 35 did not cause significant losses in spermatozoa motility of *M. liza*. The pH of 8.5 provided the highest motility time ( $218 \pm 13$  sec) and 8.7 the best motility rate ( $93 \pm 12\%$ ). In the experiment two was performed the refrigeration tests with this species semen, samples diluted with CF-HBSS in a ratio of 1:3 (v:v) and *in natura* were maintained at  $4 \pm 2$  °C for 96 hours. There was a significant increase in motility time for 18 h, better vitality rate for 48 h and better sperm activation rate for 96 h of storage when the spermiatic diluent was used. Even without diluents the semen show motility after 96 h. The use of the HBSS-CF (1:3) diluent is a good alternative to increase the viability of the refrigerated semen of *M. liza*. In future studies, it is advisable using other diluting substances, adding supplementary compounds (vitamins, antioxidants, sugars) and cryoprotective substances and verifying their influence on spermatozoa storage time. Testing new compositions of sperm activators, fertilization tests, computerized motility analyzes, and more in-depth physiological analyzes are also relevant to the development of semen conservation techniques.

Keywords: Aquaculture; Sperm; Gametes; Fish farming; Reproduction



## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO

- Figura 1. Tainha (*Mugil liza*). ..... 20
- Figura 2. Evolução da produção artesanal de tainha (*M. liza*), demonstrando as diferentes bases de dados, entre 1980 e 2013. Em vermelho, a linha de tendência de produção da espécie gerada a partir do banco de dados selecionado (modificado de MPA; MMA, 2015). ..... 21
- Figura 3. Evolução da produção industrial de tainha (*M. liza*), demonstrando as diferentes bases de dados, entre 1980 e 2012. Em vermelho, a linha de tendência de produção da espécie gerada a partir do banco de dados selecionado (modificado de MPA; MMA, 2015). ..... 22
- Figura 4. (a) A congelação equilibrada implica o uso de crioprotectores e congelação lenta para produzir desidratação e contração celular. Os crioprotectores permeáveis (○) diminuem o ponto de congelação da solução e prolongam o tempo de desidratação durante a congelação, minimizando assim o choque osmótico e evitando a desidratação excessiva das células. Os crioprotectores não permeáveis (●) auxiliam a desidratação celular e estabilizam a membrana durante a criopreservação. Uma vez que os primeiros cristais de gelo extracelulares formam ( ) à medida que a temperatura cai, mais água é incorporada nos cristais. Estes crescem, criando uma condição hipertônica que produz desidratação osmótica. A combinação do aumento dos solutos intracelulares e da redução da temperatura aumenta a viscosidade da solução até atingir a temperatura eutética (-40° C). Neste ponto, a solução descongelada remanescente solidifica (vitrificação parcial). (B) A vitrificação sem equilíbrio envolve a utilização de concentrações elevadas de crioprotectores para desidratar a célula e substituir a água intracelular antes da congelação começar. A congelação ultrarápida evita a formação de cristais de gelo nas células e no meio circundante durante a congelação. O resultado é que a solução se solidifica no estado vítreo, sem formação de cristais (vitrificação total). (Modificado de Magnotti *et al.*, 2016). ..... 30

## **CAPÍTULO 1 - ESPERMATOLOGIA DA TAINHA *Mugil liza* (VALENCIENNES, 1836) SELVAGEM E DE CATIVEIRO: MORFOMETRIA E EFEITOS DO PH E SALINIDADE NA MOTILIDADE ESPERMÁTICA**

Figura 1. Desenho esquemático das medidas realizadas e espermatozoides de tainha ( <i>Mugil liza</i> ) corados com rosa bengala 3%, analisado por microscopia ótica (1000x).....	44
Figura 2. Tempo de motilidade (s) e porcentagem de motilidade (%) obtidos após a ativação dos espermatozoides dos machos de tainha ( <i>Mugil liza</i> ) (n=15). .....	46
Figura 3. Correlação dos parâmetros de porcentagem de motilidade e integridade da membrana plasmática dos espermatozoides dos machos de cativeiro (A) e machos selvagens (B) de tainha <i>M. liza</i> (n=15).....	47
Figura 4. Correlação entre espermatócrito e concentração espermática dos machos de cativeiro (A) e machos selvagens (B) de tainha <i>M. liza</i> (n=15).....	48
Figura 5. Influência do pH e salinidade no tempo de motilidade (♦) e porcentagem de motilidade (□) dos espermatozoides de tainha ( <i>Mugil liza</i> ) de cativeiro (n=5).....	50

## **CAPÍTULO 2 - REFRIGERAÇÃO DO SÊMEN DA TAINHA *IN NATURA* E DILUÍDO COM CF-HBSS**

Figura 1. Tempo de motilidade (A), porcentagem de motilidade (B) e taxa de vitalidade (C) dos espermatozoides de tainha ( <i>Mugil liza</i> ) estocados durante 96 horas a $4 \pm 2$ °C <i>in natura</i> e diluído 1:3 (v:v) com CF-HBSS. * indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) verificados com ANOVA uma via e teste de Tukey.....	68
Figura 2. Correlação entre porcentagem de células móveis (%) e integridade da membrana plasmática (%) durante o período de 96h de refrigeração do sêmen da tainha <i>M. liza in natura</i> (♦) e diluído 1:3 com CF-HBSS (□).....	69

## LISTA DE TABELAS

### INTRODUÇÃO

Tabela 1. Publicações sobre conservação de sêmen em peixes marinhos com ocorrência em águas brasileiras. .... 35

### **CAPÍTULO 1 - ESPERMATOLOGIA DA TAINHA *Mugil liza* (VALENCIENNES, 1836) SELVAGEM E DE CATIVEIRO: MORFOMETRIA E EFEITOS DO PH E SALINIDADE NA MOTILIDADE ESPERMÁTICA**

Tabela 1. Parâmetros zootécnicos e seminais dos machos de diferentes origens de tainha (*Mugil liza*) (n=15). .... 45

Tabela 2. Parâmetros morfométricos dos espermatozoides de tainha (*Mugil liza*) em primeira maturação de cativeiro e selvagem. .... 49





## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>19</b>
<b>2. ESPÉCIE ALVO</b> .....	<b>20</b>
<b>3. MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO DO SÊMEN</b> .....	<b>24</b>
3.1 REFRIGERAÇÃO DO SÊMEN .....	24
3.2 CRIOPRESERVAÇÃO E VITRIFICAÇÃO DE SÊMEN DE PEIXES (PUBLICADO EM MAGNOTTI <i>et al.</i> , 2016) .....	25
3.2.1 Protocolos de criopreservação .....	27
3.2.2 Congelação lenta.....	27
3.2.3 Congelação ultrarápida (vitrificação).....	31
3.2.4 Perspectivas futuras.....	33
<b>4. CONSERVAÇÃO DO SÊMEN DE ESPÉCIES DE PEIXES     MARINHOS COM OCORRÊNCIA NO BRASIL</b> .....	<b>34</b>
<b>5. CARACTERIZAÇÃO DO SÊMEN</b> .....	<b>36</b>
<b>6. OBJETIVOS</b> .....	<b>37</b>
6.1 OBJETIVO GERAL .....	37
6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	37
<b>7. FORMATAÇÃO DOS ARTIGOS</b> .....	<b>38</b>
<b>8. CAPÍTULO 1 - ESPERMATOLOGIA DA TAINHA <i>Mugil liza</i>     (VALENCIENNES, 1836) SELVAGEM E DE CATIVEIRO:     MORFOMETRIA E EFEITOS DO PH E SALINIDADE NA     MOTILIDADE ESPERMÁTICA</b> .....	<b>39</b>
RESUMO .....	39
ABSTRACT.....	40
INTRODUÇÃO.....	40
MATERIAL E MÉTODOS .....	41
RESULTADOS .....	45
DISCUSSÃO .....	50
CONCLUSÃO .....	54
AGRADECIMENTOS .....	54
REFERÊNCIAS .....	55
<b>9. CAPÍTULO 2 - REFRIGERAÇÃO DO SÊMEN DA TAINHA     <i>IN NATURA</i> E DILUÍDO COM CF-HBSS</b> .....	<b>62</b>
RESUMO .....	62
ABSTRACT.....	63
INTRODUÇÃO.....	63
MATERIAL E MÉTODOS .....	64
RESULTADOS .....	67

DISCUSSÃO .....	69
CONCLUSÃO .....	73
AGRADECIMENTOS .....	73
REFERÊNCIAS .....	73
<b>10. CONCLUSÃO GERAL .....</b>	<b>80</b>
<b>11. REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO .....</b>	<b>81</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A piscicultura marinha com produção de algumas espécies em grande escala teve seu início no Japão por volta da década de 60, com o desenvolvimento de técnicas de alimentação, manejo e larvicultura (CERQUEIRA, 2004; COSTA FILHO *et al.* 2013). Em 2014 a produção mundial de peixes de escama chegou a um total de 49,8 milhões de toneladas (99,2 bilhões de dólares), sendo que a produção marinha representa apenas 6,3 milhões de toneladas, ou seja, 12.64% (FAO, 2016). No Brasil o cultivo de peixes marinhos existiu no nordeste no século XVII, onde juvenis de diversas espécies eram introduzidos em viveiros estuarinos abastecidos de água com a variação das marés (CERQUEIRA, 2004). Atualmente, a produção se baseia somente em instituições de pesquisa e fazendas experimentais, sem expressividade para a balança comercial (CAVALLI; HAMILTON, 2009; CAVALLI *et al.* 2011; FAO, 2016). Entretanto, a atividade apresenta grande tendência de crescimento (COSTA FILHO *et al.* 2013), pois mais de 30% dos estoques de peixes marinhos monitorados pela FAO são considerados sobre explorados (FAO, 2016).

Ao longo da costa brasileira são encontradas muitas espécies de peixes marinhos com características favoráveis para a aquicultura (CAVALLI *et al.* 2011). Até o início dos anos 2000, o desenvolvimento da atividade foi restringido pela falta de oferta de formas jovens (CERQUEIRA, 2004) e devido a grande deficiência de informações sobre a biologia e a tecnologia de cultivo (CAVALLI; HAMILTON, 2009). Para a maioria das espécies esta característica se mantém até os dias atuais. Entretanto, já existem empresas no Estado de São Paulo e Rio de Janeiro que possuem estrutura física e conhecimento técnico para a produção em grande escala de juvenis de bijupirá (*Rachycentron canadum*) e da garoupa verdadeira (*Epinephelus marginatus*) e manter o fornecimento contínuo para os criadores de peixes.

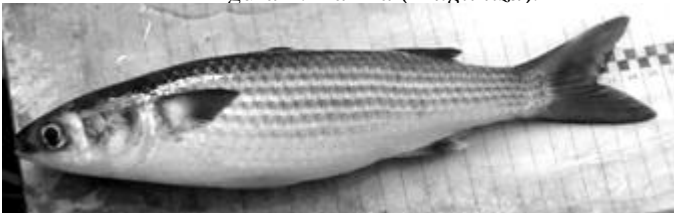
Cavalli & Hamilton (2009) e Cavalli *et al.* (2011) destacam como espécies de grande potencial: robalo-peva (*Centropomus parallelus*), robalo-flecha (*Centropomus undecimalis*), linguado (*Paralichthys orbignyanus*), sardinha (*Sardinella brasiliensis*), tainha (*Mugil liza*), cioba (*Lutjanus analis*), ariocó (*Lutjanus synagris*), garoupa verdadeira (*E. marginatus*), pampo (*Trachinotus marginatus*), peixe-rei (*Odonthestes argentinensis*), bijupirá (*R. canadum*), arabaiana (*Seriola dumerili*), pargo-rosa (*Pagrus pagrus*), dourado (*Coryphaena hippurus*), carapeba (*Eugerres brasilianus*), mero (*Epinephelus itajara*) e o badejo (*Mycteroperca bonaci*).

## 2. ESPÉCIE ALVO

As espécies do gênero *Mugil* pertencem à família Mugilidae, da ordem Perciformes e classe Actinopterygii. A tainha *M. liza* (Valenciennes, 1836) (Fig. 1) é encontrada desde o Caribe até a Argentina (FROESE; PAULY, 2008; MENEZES *et al.*, 2010; DURAND *et al.*, 2012; LEMOS, 2014). São peixes catádromos, com recrutamento dos juvenis em lagoas e estuários, seguido de um período de migração no mar para reprodução (VIEIRA, 1991; VIEIRA; SCALABRIN, 1991, ALBIERI; ARAUJO, 2010; LEMOS *et al.* 2014). O período de migração reprodutiva é de abril a julho, onde a maior parte dos indivíduos do Sul e Sudeste do Brasil são oriundos da Argentina (38° S) e da Lagoa dos Patos no Rio Grande do Sul (32° S) (VIEIRA, 1991; VIEIRA; SCALABRIN, 1991; LEMOS *et al.* 2014). Os grupos de peixe migram ao norte por mais de 1000 km e apresentam pico de desova no nordeste do Estado de Santa Catarina e Estado do Paraná (26° S) (LEMOS *et al.* 2014). Porém, um número decrescente de peixes se move até o Estado de São Paulo (24° S) (VIEIRA, 1991).

Recentemente, o gênero teve o seu status taxonômico revisado (FRAGA *et al.*, 2007; MENEZES *et al.*, 2010; DURAND *et al.*, 2012). FRAGA *et al.* (2007) sugeriram que *Mugil liza* e *M. platanus* poderiam ser consideradas uma só espécie, ou consideradas como famílias da *M. cephalus* (espécimes coletados no Chile). MENEZES *et al.* (2010) analisando merística e morfometricamente espécimes coletados do Uruguai e Argentina até a Venezuela sugeriram que nesta região existe somente uma espécie, denominada *M. liza*, e que não podem ser consideradas *M. cephalus* (indivíduo tipo do mar Mediterrâneo Linnaeus, 1758). DURAND *et al.* (2012), corroborando com MENEZES *et al.* (2010), analisaram exemplares de mugilídeos de todo o mundo encontraram que *M. cephalus* pode ser dividida em até 14 espécies, entre elas a *M. cephalus* (indivíduos tipo coletados no mar Mediterrâneo) e *M. liza* (Indivíduos coletados no Uruguai, Guiana Francesa e Venezuela).

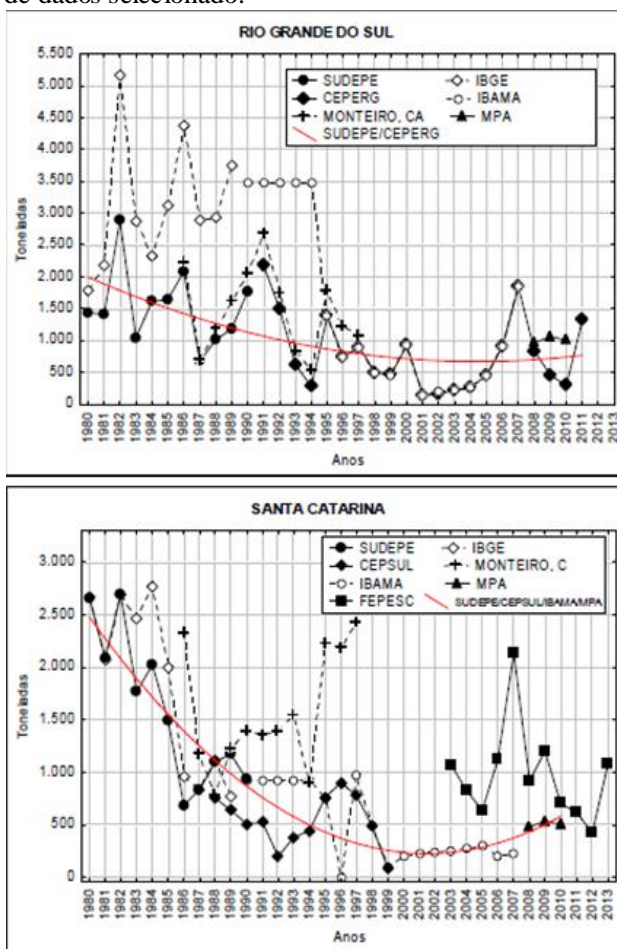
Figura 1. Tainha (*Mugil liza*).



Fonte: Caio Magnotti

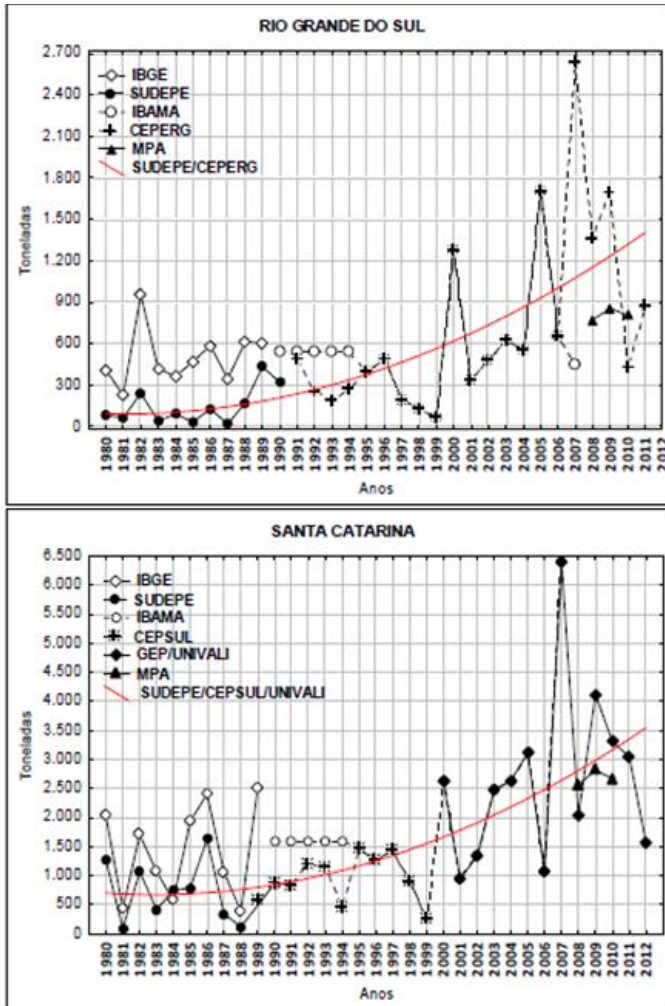
Os peixes desta família, conhecidos popularmente como tainhas ou paratis, possuem grande importância na pesca comercial e artesanal na costa brasileira. A tainha está associada historicamente à subsistência e à cultura de comunidades de pescadores artesanais em regiões costeiras (REIS; D'INCAO, 2000).

Figura 2. Evolução da produção artesanal de tainha (*M. liza*), demonstrando as diferentes bases de dados, entre 1980 e 2013. Em vermelho, a linha de tendência de produção da espécie gerada a partir do banco de dados selecionado.



(Fonte: modificado de MPA; MMA, 2015).

Figura 3. Evolução da produção industrial de tainha (*M. liza*), demonstrando as diferentes bases de dados, entre 1980 e 2012. Em vermelho, a linha de tendência de produção da espécie gerada a partir do banco de dados selecionado



(Fonte: modificado de MPA; MMA, 2015).

Nos últimos 30 anos, a estatística pesqueira demonstra que a pesca artesanal teve tendência de queda nas capturas de tainha, enquanto a pesca industrial, uma tendência de aumento nas capturas (MPA;

MMA, 2015) (Fig. 2 e Fig. 3). Fato pode ser explicado pelas características de cada modalidade. A pesca artesanal é um evento tradicional, onde as técnicas de captura e os apetrechos de pesca adotados (canoas a remo e redes de arrasto) são os mesmos ou possuem as mesmas características dos utilizados há 50 anos. Já na pesca industrial, durante estes 30 anos de estatística pesqueira o esforço de pesca também cresceu. As embarcações ficaram maiores, com redes mais longas e de menor arrasto, adicionado as novas tecnologias instaladas nas embarcações (sonar, radar, GPS, entre outros) (MPA; MMA, 2015).

Em 2004 a tainha foi classificada como sobreexplorada (IBAMA, 2007). Atualmente é categorizada no Brasil como espécie quase ameaçada de extinção (NT) segundo a IUCN (International Union for Conservation of Nature), passa por avaliação de seu estado de conservação populacional para definição de estratégias de manejo e ordenamento pesqueiro (MPA; MMA, 2015). Por outro lado, a espécie apresenta características que a qualifica com uma alternativa para a piscicultura, tais como: ampla tolerância a salinidade (0 a 90) e a temperatura (3 a 36°C), elevada robustez e fácil manejo alimentar, pois aceita com facilidade a dieta inerte (NETO; SPACH, 1998; SAMPAIO *et al.*, 2001; SAMPAIO *et al.*, 2002; CERQUEIRA, 2004; MIRANDA-FILHO *et al.*, 2010).

Apesar de todas estas características favoráveis ao cultivo da espécie, existem poucos relatos sobre sua reprodução, desova e larvicultura em cativeiro. Os primeiros relatos são da década de 80 no Rio de Janeiro e em Santa Catarina (Benetti; Fagundes Netto 1980; Andreatta *et al.* 1981; Andreatta *et al.* 1983; Benetti; Fagundes Netto 1983). No mesmo período, Alvarez-Lajonchere *et al.* (1988) realizaram a desova e larvicultura da *M. liza* em Havana – Cuba. Na década de 90 estudos foram desenvolvidos pelo Instituto de Pesca de São Paulo, entre eles: Yamanaka *et al.* (1992) e Godinho *et al.* (1993). Posteriormente, no Rio de Janeiro, Monteiro-Ribas & Bonecker (2001) induziram a desova e realizaram estudos sobre o desenvolvimento larval da *M. liza* durante 29 dias. Nos últimos cinco anos estudos vem sendo realizados na Universidade Federal de Santa Catarina, no Laboratório de Piscicultura Marinha (LAPMAR). Neste laboratório foram realizadas pesquisas relativas a captura, transporte e adaptação de reprodutores selvagens em cativeiro, indução hormonal, desova e larvicultura (De CARVALHO *et al.*, 2014; PASSINI *et al.*, 2015).

Godinho *et al.* (1993) após realizarem o procedimento de inseminação artificial, verificaram que parcela significativa dos

procedimentos não apresentaram resultado positivo, mesmo quando os ovócitos apresentam padrão morfológico definido como viável. Provavelmente uma parcela significativa deste insucesso está relacionado com a qualidade sub-ótima dos espermatozoides utilizados nos procedimentos (OTSUBO, 2010). Andrade-Talmelli *et al.* (1996) capturaram indivíduos ao longo de dois ciclos reprodutivos e observaram que no início do cada período os machos maduros eram maioria nas capturas, cedendo seu predomínio para as fêmeas e desaparecendo no final da temporada. Resultados semelhantes foram descritos por Albieri & Araujo (2010), em peixes capturados na baía de Sepetiba, RJ. Baseado nessas evidências, o método de estocagem do sêmen em temperaturas reduzidas e/ou criogênicas, tem sido indicado como uma boa alternativa para disponibilizar o sêmen em protocolos de inseminação artificial da espécie (OTSUBO, 2010).

### **3. MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO DO SÊMEN**

#### **3.1 REFRIGERAÇÃO DO SÊMEN**

Dentro dos futuros estudos em reprodução de peixes, o desenvolvimento de programa de conservação de gametas poderá ser de grande valia. A conservação de sêmen é uma importante ferramenta para a reprodução de peixes e de grande interesse para a piscicultura, e pode ser utilizada como rotina nos laboratórios de reprodução (MARIA; CARNEIRO, 2012), mas ainda é pouco utilizada em peixes marinhos no Brasil (SANCHES *et al.*, 2013). O crescente interesse pelo aprimoramento da técnica tem levado cada vez mais ao aumento no número de estudos sobre o tema (CAROSFELD *et al.*, 2003; MARIA; CARNEIRO, 2012), fazendo com que na atualidade, já seja possível o início do uso do sêmen preservado na rotina de produção de alevinos em alguns laboratórios públicos e privados de reprodução de peixes (MARIA; CARNEIRO, 2012).

Esta ferramenta pode ser aplicada a curto prazo, pelo processo de resfriamento, e a longo prazo, por meio da criopreservação (OLIVEIRA *et al.* 2007). A curto prazo, a conservação de sêmen consiste em manter a viabilidade espermática por um período de horas ou dias sob refrigeração a 4 °C, para posterior utilização na fertilização. Os métodos de conservação apresentam diversas vantagens como: conservação de material genético de animais selvagens oriundos de locais distantes e de difícil acesso; eliminação do problema causado pela assincronia na maturidade gonadal entre machos e fêmeas; utilização de gametas de animais selecionados em programas de melhoramento ou manipulados



geneticamente (triplóides, clones e transgênicos); diminuição de custos e riscos de transporte de animais vivos; e estabelecimento de programas de hibridização utilizando peixes com períodos reprodutivos diferentes (SUQUET *et al.* 2000; LINHART *et al.*, 2005; TIERSCH *et al.* 2007; MARIA *et al.*, 2009; GWO, 2011). RURANGAWA *et al.*, 2004). Informações relevantes e a descrição mais detalhada sobre os métodos de conservação de sêmen de peixes, comparações entre as técnicas e suas peculiaridades podem ser encontradas nas revisões publicadas por Suquet *et al.* (2000), Viveiros & Godinho (2009), Zaniboni Filho & Baldisserotto (2015), Magnotti *et al.* (2016)

O sucesso na aplicação destas técnicas não depende somente da qualidade dos espermatozoides (OTSUBO, 2010). Cuidados como redução da temperatura, fornecimento e troca de gases, prevenção do desenvolvimento bacteriano e prevenção da desidratação são determinantes para o sucesso do resfriamento (PEÑARANDA *et al.*, 2010). A composição dos diluentes, diluição do sêmen, tipo e concentração dos crioprotetores, tipo e concentração dos ativadores espermáticos também são de grande importância. Para isso, deve-se definir protocolos específicos para a conservação de sêmen de cada espécie, pois tendem a apresentar diferentes sensibilidades de seus espermatozoides a estas diluições e substâncias (MURGAS *et al.*, 2007).

### 3.2 CRIOPRESERVAÇÃO E VITRIFICAÇÃO DE SÊMEN DE PEIXES (PUBLICADO EM MAGNOTTI *et al.* 2016)

O primeiro trabalho com congelamento de sêmen de peixes foi realizado em 1953 por Blaxter e viabilizou o cruzamento de populações diferentes do arenque do Atlântico (*Clupea harengus*) que possuem desova em épocas diferentes do ano (SUQUET *et al.*, 2000; LIU *et al.*, 2006). Protocolos de conservação de sêmen foram experimentalmente determinados para mais de 200 espécies de peixes (BILLARD; ZHANG, 2001; GWO, 2011), sendo aproximadamente 40 espécies de peixes marinhos (SUQUET *et al.*, 2000; GWO, 2011).

A criopreservação de semen de peixes marinhos normalmente apresenta melhores resultados de taxa de motilidade e capacidade de fertilização após descongelamento, como em sea bass e turbot, que apresentam média de sobrevivência embrionária de 80% após fecundação com sêmen criopreservado, enquanto para espécies como salmão do Atlântico, truta arco-íris e carpa apresentam médias de 65% de sobrevivência (SCOTT; BAYNES, 1980; SUQUET *et al.*, 2000; GWO, 2011). Estes resultados provavelmente estão relacionados à

adaptação das espécies marinhas a elevadas pressões osmóticas (CUEVAS-URIBE *et al.*, 2013).

Nos últimos anos, devido ao rápido desenvolvimento da aquicultura e aos problemas de conservação enfrentados por algumas espécies de peixes, a criopreservação tem desempenhado um papel importante na congelação de gametas para proteger peixes de alto valor econômico e biológico. Entre os salmonídeos, estão incluídos a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), truta marrom (*Salmo trutta*), brook trout (*Salvelinus fontinalis*) e charr (*Salvelinus alpinus*) (LAHNSTEINER *et al.*, 1996; CABRITA *et al.*, 1998; MARTÍNEZ-PÁRAMO *et al.*, 2009). Outras espécies de interesse comercial e que necessitam de proteção como os esturjões: beluga (*Huso huso*), sterlet (*Acipenser ruthenus*), pallid (*Scaphirhynchus albus*) Siberiano, Europeu e Russo (*Aythya baeri*, *Acipenser sturio*, *Acipenser gueldenstaedtii*) e os shortnose (*Acipenser brevirostrum*) (GLOGOWSKI *et al.*, 2002; HORVÁTH *et al.*, 2005, 2006; HORVÁTH *et al.*, 2008; CABRITA *et al.*, 2010); alguns catfish como o African e o European catfish (*Clarias gariepinus*, *Silurus glanis*) e carpas como a carpa comum (*Cyprinus carpio*) e a carpa prateada (*Hypophthalmichthys molitrix*) (HORVÁTH; URBANYI, 2000; SUQUET *et al.* 2000; ÁLVAREZ *et al.*, 2008; MAISSE *et al.*, 2008; VIVEIROS; KOMEN, 2008; CABRITA *et al.*, 2010).

No entanto, a maioria desses estudos é projetada para selecionar parâmetros técnicos, analisando a viabilidade e qualidade espermática para obter maior viabilidade do que em estudos feitos em peixes de água doce. Vários fatores como a taxa de congelação ou descongelação, os efeitos da concentração de crioprotetores sobre a fertilização, o tempo de equilíbrio e os métodos de aquecimento não foram medidos, relatados ou rigorosamente testados em algumas espécies (LIU *et al.*, 2006; GWO, 2011). De acordo com Suquet *et al.* (2000) esta tendência está em consonância com os padrões mundiais: existe uma falta de investigação que dê descrições completas das alterações morfológicas e metabólicas geradas pelas técnicas de conservação do sêmen. Gwo (2011) observa que a maioria dos trabalhos ainda é realizada empiricamente, com base em resultados obtidos por tentativa e erro, e que não foi produzido nenhum protocolo padronizado. Muitas questões não resolvidas ainda permanecem sobre as técnicas de criopreservação dos espermatozoides de peixes marinhos de interesse econômico e ambiental (CAROLSFELD *et al.*, 2003).

### 3.2.1 Protocolos de criopreservação

A criopreservação é a conservação de material biológico em nitrogênio líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ , o que teoricamente permite que sua viabilidade seja mantida indefinidamente (CAROLSFELD *et al.*, 2003; BAKHACH, 2009). A esta temperatura, a estrutura eo funcionamento das células e tecidos vivos são mantidos, mantendo-os geneticamente viáveis e reversivelmente inativos, a partir de uma perspectiva metabólica (PEGG, 2007; BAKHACH, 2009). Este método pode ser utilizado reduzindo a temperatura do material lentamente (método tradicional) ou rapidamente (vitrificação) (MERINO *et al.*, 2012; CUEVAS-URIBE *et al.*, 2013; FIGUEROA *et al.*, 2015).

A diferença prática entre eles é que o método comum de criopreservação faz com que os cristais de gelo se formem no meio extracelular, enquanto que não se formam cristais na vitrificação (CUEVAS-URIBE *et al.*, 2013). Entre 2000 e 2015 foram estudados os parâmetros para a criopreservação por congelação lenta e vitrificação em 32 espécies de peixes marinhos de interesse comercial ou em perigo de extinção.

### 3.2.2 Congelamento lento

Maria & Carneiro (2012) citam que a sequência de eventos normalmente relacionados à criopreservação de sêmen de peixes envolve etapas como: 1. Coleta do sêmen; 2. Avaliação microscópica da qualidade seminal; 3. Adição de diluidores e crioprotetores; 4. Envase; 5. Congelamento e armazenamento; 6. Descongelamento; 7. Fertilização e acompanhamento do desenvolvimento embrionário e larval. Segundo Gwo (2011) as possíveis variáveis que podem influenciar na capacidade de fertilização dos espermatozoides criopreservados são: 1. diluidores; 2. diluições; 3. crioprotetores; 4. concentração dos crioprotetores; 5. tempo de equilíbrio; 6. velocidade de congelamento; 7. método de congelamento; 8. temperatura de descongelamento; 9. qualidade do espermatozoide; 10. qualidade dos ovócitos e 11. relação espermatozoide/ovócitos. Estes onze pontos listados por Gwo (2011) são importantes, pois as espécies de peixe tendem a apresentar diferentes sensibilidades de seus espermatozoides as diluições e substâncias empregadas na criopreservação de sêmen, sendo necessário desenvolver protocolos específicos para cada uma (MURGAS *et al.*, 2007; TIERSCH *et al.*, 2007). Suquet *et al.* (2000) apresentam uma tabela com os diluentes mais utilizados antes dos anos 2000 para espécies marinhas, enquanto Cabrita *et al.* (2010), Gwo (2011) e Figueroa *et al.* (2015) apresentam atualizações das tabelas e resultados de fertilização, com os protocolos e

fórmulas dos diluidores utilizados, crioprotetores e sobre o uso de plasma seminal, mas principalmente para espécies de água doce.

O primeiro passo para desenvolver um protocolo de criopreservação é escolher a composição apropriada para o diluidor, normalmente uma solução salina ou solução de glicose com osmolalidade apropriada, e um agente crioprotetor (VIVEIROS *et al.*, 2012). A característica mais importante de um diluidor é que não inicie a motilidade dos espermatozoides (GWO, 2011), que seja estável ao longo do armazenamento e estéril. Esta solução tem o propósito de diluir o sêmen dos peixes, que normalmente apresentam alta viscosidade e em alguns casos pequeno volume.

Nos últimos anos, a maioria dos diluidores usados em peixes marinhos apresentam em sua composição sais, buffer tris (estabilizador de pH), pequena quantidade de açúcar mono ou dissacarídeos (glicose, sacarose, frutose, lactose, trealose e outros) e proteína (*bovine serum albumin* (BSA)) com pH entre 7.0 e 8.2 e osmolalidade entre 205 a 400 mOsMol kg<sup>-1</sup> (MAGNOTTI *et al.*, 2016). A adição de um açúcar facilmente metabolizável no diluidor tem o objetivo fornecer energia para os espermatozoides e é naturalmente encontrado no plasma seminal de mamíferos, insetos, nematóides e peixes (GREGORY, 1968; DZIEWULSKA *et al.*, 2008; BOZKURT *et al.*, 2009). A BSA tem papel de antioxidante eliminando os radicais livres gerados por estresse oxidativo e protege a integridade da membrana celular da peroxidação dos lipídios, também interage diretamente com as membranas e impede a aderência de espermatozóides entre si (aglutinação) (LEWIS *et al.*, 1997).

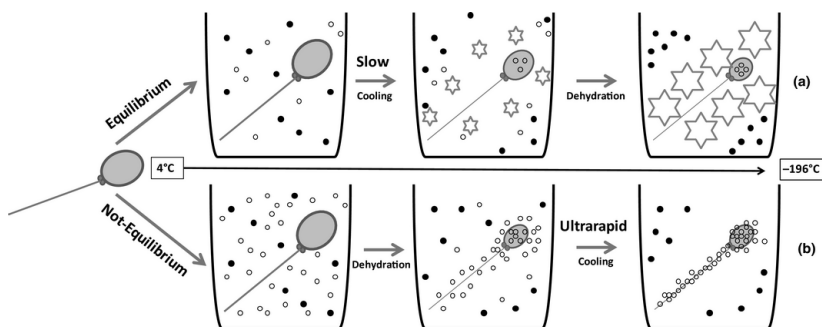
Algumas outras substâncias podem ser adicionadas para melhorar a proteção das células contra os efeitos da congelção, parâmetros fisiológicos pós aquecimento e ativação dos espermatozoides. Ácidos orgânicos em baixa concentração, 1 mM de taurina or hipotaurina, aumentaram a motilidade, a velocidade e linearidade no movimento dos espermatozoides de European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) criopreservados em meio NAM e 10% DMSO pós ativação e analisados com CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) (MARTÍNEZ-PÁRAMO *et al.*, 2013). Substâncias antioxidantes como o ácido ascórbico, vitamina E, glutatona reduzida e metionina reduzida, carnitina e ácido úrico podem ser adicionados com objetivo de eliminar radicais dos tipos superóxido, peróxido e hidróxido que conduzem a peroxidação dos fosfolipídios na mitocôndria, causando a morte da célula espermática (CIERESZCO; DABROWSKI, 1995; ANGHEL *et al.*, 2010). Sua efetividade foi comprovada para peixes teleostes

dulcícolas por Lahnsteiner (2009), Lahnsteiner *et al.* (2010), Lahnsteiner & Mansour (2010) e Ubilla & Valdebenito (2011).

O crioprotetor tem a função de proteger a célula contra a formação de cristais de gelo intracelular e a excessiva desidratação, que produzem quebras irreversíveis nas membranas plasmática e nuclear (danificando o DNA) e alterações nas organelas da célula (CABRITA *et al.*, 2005). Os crioprotectores podem ser divididos em dois grupos: ação intracelular e ação extracelular. Os do primeiro grupo são capazes de permear a membrana celular; São geralmente de baixo peso molecular (PM: 400 Da), não eletrolíticos e altamente solúveis em água (BAKHACH, 2009; CUEVAS-URIBE; TIERSCH, 2011). Os compostos mais comuns são: dimetilsulfoxido (DMSO), dimetilacetamida (DMA), glicerol (Gly), 1-2 propanediol, etileno glicol (EG), metil glicol (2-methoxyethanol), propileno glicol (PG), metanol (MeOH) e 2.3-butanediol (BD). Porém, a maioria destas substâncias são tóxicas e sua concentração e tempo de equilíbrio pode causar efeitos negativos na fisiologia espermática, como um choque osmótico ou problemas bioquímicos, (TIERSCH, 2011). De acordo com Suquet *et al.* (2000) e Liu *et al.* (2006) o dimetilsulfoxido (DMSO) é considerado um crioprotetor que apresenta bons resultados para a maioria das espécies de peixes. Nos últimos quinze anos de pesquisa, o DMSO também foi testado e aprovado para a maioria das espécies marinhas estudadas, assim como o crioprotetor propilenoglicol (PG). O intervalo de concentração que apresentaram melhores resultados na maioria das pesquisas foi de 5 a 15%, com predominância nos 10% em relação ao volume final das (MAGNOTTI *et al.*, 2016).

O segundo grupo é composto por substâncias não permeáveis de grande peso molecular e podem ser açúcares mono, di e polissacarídeos, macromoléculas como a polyvinyl pyrrolidone (PVP) e hydroxyethyl starch (HES) (BAKHACH, 2009), lipoproteínas e proteínas derivadas do leite, gema de ovo e óleos vegetais (MORAES *et al.*, 1998). As macromoléculas possuem duas funções, aumentar a osmolalidade do espaço extracelular fazendo com que ocorra a desidratação das células durante o resfriamento e prevenir o inchaço osmótico excessivo durante o aquecimento (CUEVAS-URIBE; TIERSCH, 2011; Figura 4). O mecanismo pelo qual os açúcares atuam para bio-estabilizar a célula e como substrato energético (por exemplo, glicose, trealose, sacarose, etc.) e a modulação efetuada pela sua concentração ainda precisam de ser elucidados e devem ser sistematicamente avaliados (CUEVAS-URIBE *et al.*, 2013; CIERESZKO *et al.*, 2014).

Figura 4. (a) A congelação equilibrada implica o uso de crioprotectores e congelação lenta para produzir desidratação e contração celular. Os crioprotectores permeáveis (○) diminuem o ponto de congelação da solução e prolongam o tempo de desidratação durante a congelação, minimizando assim o choque osmótico e evitando a desidratação excessiva das células. Os crioprotectores não permeáveis (●) auxiliam a desidratação celular e estabilizam a membrana durante a criopreservação. Uma vez que os primeiros cristais de gelo extracelulares formam (☆) à medida que a temperatura cai, mais água é incorporada nos cristais. Estes crescem, criando uma condição hipertônica que produz desidratação osmótica. A combinação do aumento dos solutos intracelulares e da redução da temperatura aumenta a viscosidade da solução até atingir a temperatura eutética ( $-40^{\circ}\text{C}$ ). Neste ponto, a solução descongelada remanescente solidifica (vitrificação parcial). (B) A vitrificação sem equilíbrio envolve a utilização de concentrações elevadas de crioprotectores para desidratar a célula e substituir a água intracelular antes da congelação começar. A congelação ultrarrápida evita a formação de cristais de gelo nas células e no meio circundante durante a congelação. O resultado é que a solução se solidifica no estado vítreo, sem formação de cristais (vitrificação total).



(Fonte: Modificado de Magnotti *et al.*, 2016)

Quando o plasma seminal é incorporado na criopreservação reduz os efeitos nocivos dos crioprotectores e aparece como um agente crioprotetor e antioxidante que protege a função do esperma em peixes (ALVAREZ *et al.*, 1987; FIGUEROA *et al.*, 2015). Uma série de substâncias antioxidantes são encontradas no plasma seminal (ácido ascórbico, carnitina, glutathione, metionina, tacoferol e ácido úrico) e enzimas de defesa oxidativa (catalase, glutathione redutase, peroxidase e superóxido dismutase) que poderiam ajudar a proteger as células

criopreservadas (LAHNSTEINER *et al.*, 2007; LAHNSTEINER, 2009; LAHNSTEINER *et al.*, 2010; LAHNSTEINER; MANSOUR, 2010).

Lahnsteiner *et al.* (2010) e Lahnsteiner & Mansour (2010) relatam que o ácido úrico é o principal antioxidante encontrado no sêmen de burbot (*Lota lota*), perch (*Perca fluviatilis*), bleak (*Alburnus alburnos*) e truta marrom (*Salmo trutta*) e que é capaz de aumentar a motilidade espermática e a integridade das membranas. Liu *et al.* (1995) sugerem que a proteção antioxidante para os espermatozoides de mamíferos também está relacionada a proteínas do plasma seminal, e Sasaki *et al.* (1996) atribui a frações de proteínas de baixo peso molecular. Segundo Lahnsteiner (2007), lipoproteínas do plasma seminal de truta arco-íris são capazes de manter a composição lipídica da membrana citoplasmática e aumentar a crioestabilidade dos espermatozoides. Porém a capacidade antioxidante do plasma seminal é insuficiente para prevenir a peroxidação dos lipídios durante a congelamento, devendo ser suplementados pelo diluidor e outros crioprotetores (FIGUEROA *et al.*, 2015).

### 3.2.3 Congelamento ultrarrápida (vitrificação)

O método de vitrificação consiste na imersão direta das amostras de pequeno volume no nitrogênio líquido e já foi aplicada com sucesso em espermatozoides de peixes como a truta arco-íris e o salmão do Atlântico (MERINO *et al.*, 2011; MERINO *et al.*, 2012; CUEVAS-URIBE *et al.*, 2013; FIGUEROA *et al.*, 2013; FIGUEROA *et al.*, 2015). Entretanto, até o momento somente Cuevas-Urbe *et al.* (2013) aplicaram a técnica para sêmen de peixes marinhos.

Saragusty & Arav (2011) relatam que a simplicidade e velocidade são os maiores benefícios desta técnica, quando comparada à criopreservação tradicional. A vitrificação não necessita de equipamentos especializados e pode facilmente ser aplicada em procedimentos dentro de plantas de produção e trabalho de campo em áreas de difícil acesso. Para a sua aplicação, além dos onze pontos críticos existentes na criopreservação de sêmen, existem outros de grande importância: 1. Número de passos para adicionar e remover o crioprotetor; 2. Técnica utilizada para a vitrificação (influenciam sobre a taxa de resfriamento e o tamanho da capa de vapor); 3. Viscosidade e volume das amostras (YAVIN; ARAV, 2007); 4. Pressão absoluta (pressões hidrostáticas elevadas diminuem a temperatura homogênea de nucleação e aumentam a temperatura de transição vítrea) (RABIN; STEIF, 2009). A diferença básica da vitrificação para a técnica de criopreservação lenta, é que durante a imersão direta em nitrogênio

líquido, a viscosidade do meio é aumentada e as moléculas de água presentes na amostra não conseguem se arranjar para a formação de uma estrutura cristalina, formando assim uma forma amorfa de água sólida (vitrificada) (CUEVAS-URIBE; TIERSCH, 2011).

O objetivo do método é alcançar a transição vítrea o mais rápido possível por meio de um resfriamento rápido ou aumentando a concentração de crioprotetores (CUEVAS-URIBE; TIERSCH, 2011). Porém, o aumento da concentração dos crioprotetores gera mais efeitos tóxicos para as células como choque osmótico, modificações na permeabilidade da membrana celular e elevadas taxas de fragmentação do DNA. Geralmente uma mistura de crioprotetores com características diferentes é mais recomendada para a técnica. Deste modo, é possível utilizá-los em baixas concentrações e obter boa formação vítrea, com baixa toxicidade devido à soma das propriedades dos crioprotetores. (SARAGUSTY; ARAV, 2011). Por exemplo, HSA (human serum albumin) + 0.25 M sacarose são utilizados como crioprotetores não permeáveis com sucesso na vitrificação de sêmen de humanos pela técnica de gotejamento em nitrogênio líquido (ISACHENKO *et al.*, 2008).

Cuevas-Urbe *et al.* (2013) testaram oito crioprotetores em diferentes concentrações e verificaram que a mistura de substâncias permeáveis e não permeáveis propicia melhores resultados do que usar somente um crioprotetor em elevadas concentrações. Neste experimento a mistura 15% DMSO + 15% EG + 10% Gly + 1% X-1000™ (X) + 1% Z-1000™ (Z) resultou em uma melhor taxa de vitrificação, motilidade e integridade da membrana do sêmen de red snapper (*Lutjanus campechanus*), spotted seatrout (*Cynoscion nebulosus*) e red drum (*Sciaenops ocellatus*). Porém, também obtiveram elevada porcentagem de vitrificação com bons resultados de motilidade e integridade da membrana utilizando a mistura de outros compostos permeáveis e não permeáveis (ex: 10% DMSO + 30% EG + 0.25 M trealose).

Mais recentemente, o plasma seminal foi empregado como crioprotetor na vitrificação de sêmen de salmonídeos com sucesso. Merino *et al.* (2011) e Merino *et al.* (2012) usaram diluidor Cortland® + 1% BSA e substituíram o crioprotetor permeável por 40% de plasma seminal na vitrificação do sêmen de truta arco-íris (*O. mykiss*), obtendo >80% de motilidade, >82% de integridade da membrana plasmática e 55% de integridade no potencial da membrana mitocondrial. Figueroa *et al.* (2013) e Figueroa *et al.* (2015) utilizaram diluidor Cortland® + 10% DMSO + 2% BSA + 0.13M sucrose + 30, 40 ou 50% de plasma seminal na vitrificação do sêmen de truta arco-íris com sexo revertido (*O. mykiss*) e salmão do Atlântico (*S. salar*), respectivamente. Os autores



conseguiram melhores resultados de motilidade, integridade da membrana plasmática, potencial da membrana mitocondrial e fertilização quando adicionado 50% de plasma seminal como crioprotetor. De modo geral os peixes marinhos produzem sêmen com maior viscosidade, e menor volume do que peixes dulcícolas, entretanto o uso da porção total do plasma seminal, frações ou de proteínas extraídas e purificadas, deverão ser considerados e testados futuramente como crioprotetores para a criopreservação do sêmen de espécies de peixes marinhos.

### 3.2.4 Perspectivas futuras

Nos últimos anos a pesquisa com conservação de sêmen de peixes marinhos tem se intensificado. Entretanto, a maior parte delas aborda somente questões técnicas modificando diluidores e crioprotetores e seu resultado na motilidade dos espermatozoides. Poucos apresentam uma abordagem mais aprofundada para compreender os efeitos na fisiologia e morfologia das células causados por estas substâncias químicas e pela conservação via criopreservação por congelamento lento “slow freezing” e vitrificação. No futuro, técnicas celulares e moleculares terão que ser usadas para caracterizar os criodanos (FIGUEROA *et al.*, 2014). Técnicas para verificar a integridade da membrana plasmática (ex: citometria de fluxo (SYBR 14/PI) e microscopia óptica (eosina)), fragmentação do DNA (ex: TUNEL) e para verificar a integridade mitocondrial via análise de potencial de membrana mitocondrial (ex: microscopia de epifluorescência e citometria de fluxo (Rhodamine and JC-1) são recomendadas por Figueroa *et al.* (2014). Outra tecnologia, como o CASA, tem sido utilizada para avaliar os padrões de motilidade em espermatozoides criopreservados como o objetivo de avaliar os efeitos de diferentes crioprotetores e caracterizar diferentes subpopulações de espermatozoides em amostras de sêmen, bem como avaliar o efeito da criopreservação na estrutura espermática (BILLARD *et al.* 1993; COSSON *et al.* 2008; COSSON 2010).

A adição de novas substâncias aos diluentes e aos novos crioprotetores também é recomendada para se obter progresso nessas técnicas. A aplicação de substâncias já experimentadas e testadas em espécies de água doce pode produzir bons resultados em espécies marinhas. Por exemplo, suplementação de diluentes com antioxidantes e adição de ácidos orgânicos, e utilização de plasma seminal macromolecular como um crioprotetor não permeável na criopreservação e vitrificação.

#### 4. CONSERVAÇÃO DO SÊMEN DE ESPÉCIES DE PEIXES MARINHOS COM OCORRÊNCIA NO BRASIL

Para peixes marinhos com ocorrência no Brasil, as técnicas foram aplicadas para poucas espécies (Tabela 1). Desta maneira, ainda há muitas questões quanto as metodologias de conservação de sêmen de muitas espécies de interesse econômico e ambiental que não foram respondidas (CAROSFELD *et al.*, 2003).

Para mugilideos alguns trabalhos nesta linha de pesquisa foram inicialmente realizados no Laboratório Marinho de Tungking, que pertence ao Instituto de pesquisa de Tungking - Taiwan. Neste laboratório foram feitos experimentos com a espécie *Mugil cephalus*, onde definiram as características biológicas do sêmen, de sua ativação e os efeitos dos crioprotetores (CHAO *et al.*, 1973), o efeito da diluição e dos crioprotetores na motilidade e fertilidade dos espermatozoides (CHAO *et al.*, 1974) e posterior divulgação dos resultados por Hwang *et al.* (1972) e Chao *et al.* (1975).

Para a espécie *Mugil liza*, Serralheiro *et al.* (1992) fizeram o primeiro relato de criopreservação do sêmen, Serralheiro *et al.* (1999) testaram três substâncias diluidoras para a refrigeração e Otsubo (2010) utilizou sêmen fresco e criopreservado na inseminação artificial da espécie com sucesso. Porém, estes autores só executaram testes para encontrar o melhor diluidor, e a concentração ideal do crioprotetor, adotando as técnicas definidas para outras espécies marinhas nas outras variáveis existentes no método de criopreservação: diluição, tipo de diluente, tipo de crioprotetor e características de ativador espermático.

Tabela 1. Publicações sobre conservação de sêmen em peixes marinhos com ocorrência em águas brasileiras.

Nome comum	Espécie	Método	Autor
cioba, mutton snapper	<i>Lutjanus analis</i>	Refrigeração	Sanches & Cerqueira (2011)
-	-	Criopreservação	Sanches <i>et al.</i> (2013)
ariocó, lane snapper	<i>Lutjanus synagris</i>	Refrigeração	Sanches & Cerqueira (2010)
-	-	Criopreservação	Sanches <i>et al.</i> (2015); Gaitan-Espitia <i>et al.</i> (2013)
garoupa verdadeira, dusky grouper	<i>Epinephelus marginatus</i>	Criopreservação	Sanches <i>et al.</i> (2009); Cabrita <i>et al.</i> (2009)**
robalo flecha, common snook, camurim	<i>Centropomus undecimalis</i>	Refrigeração e Criopreservação	Tiersch <i>et al.</i> (2004)
robalo peva, fat snook	<i>Centropomus parallelus</i>	Criopreservação	Serralheiro <i>et al.</i> (2003); Serralheiro <i>et al.</i> (2004); Tiba <i>et al.</i> (2009)
linguado, Brazilian flounder	<i>Paralichthys orbignyanus</i>	Criopreservação	Lanes <i>et al.</i> (2008)
bijupira, cobia	<i>Rachycentron canadum</i>	Criopreservação	Caylor <i>et al.</i> (1994)*
pescada amarela, acoupa weakfish	<i>Cynoscion acoupa</i>	Refrigeração	Castro <i>et al.</i> (2014a); Castro <i>et al.</i> (2014b)
tainha, lebranche mullet, lisa	<i>Mugil liza</i> / <i>Mugil platanus</i>	Refrigeração	Serralheiro <i>et al.</i> (1999)
-	-	Criopreservação	Serralheiro <i>et al.</i> (1992); Otsubo (2010)

\* criopreservação a -80°C; \*\* Peixes sexo invertido

## 5. CARACTERIZAÇÃO DO SÊMEN

Os espermatozoides dos peixes ficam estocados no trato genital, mesclados ao fluido seminal. Eles só se tornam móveis e são ativados metabolicamente após contato com a água (RURANGAWA *et al.*, 2004; FIGUEROA *et al.*, 2014). Muitos estudos foram realizados em espécies de peixes de água doce, mas ainda são poucas as informações quanto as características do sêmen de peixes marinhos. Neste último grupo, a ativação da motilidade ocorre imediatamente após o contato com a água salgada, um meio com maior osmolalidade do que o fluido seminal. (COSSON *et al.* 2008).

A caracterização do sêmen de uma espécie é de grande importância para o desenvolvimento de técnicas de fertilização *in vitro* e de manejo e conservação. Diversos autores já descreveram as diferenças de qualidade no sêmen entre indivíduos de uma mesma espécie, devido idade diferente, fase do ciclo reprodutivo, fatores nutricionais, genética, entre outros (RANA, 1995; DREANNO *et al.*, 1999; SUQUET *et al.*, 2000; CABRITA *et al.*, 2014; VALDEBENITO *et al.*, 2015), que podem influenciar diretamente nos resultados de fertilização.

A qualidade do sêmen pode ser determinada pela avaliação de parâmetros como: motilidade e vitalidade espermática, volume ejaculado, pH e osmolalidade do plasma, a concentração de espermatozoides, morfologia espermática, entre outros, sendo a motilidade espermática o fator mais utilizado para esta avaliação (BILLARD *et al.*, 1995; COSSON *et al.*, 1999; SALGUEIRO; NUNES, 1999; RURANGAWA *et al.*, 2004). Conhecendo estes parâmetros é possível escolher os indivíduos mais adequados, que possuem o sêmen com as características desejadas, para o seu uso durante o procedimento de reprodução e serve de base para a escolha de um diluidor e/ou ativador espermático para a espécie. A importância de cada um destes fatores para a análise de qualidade do sêmen é descrita por Rurangawa *et al.* (2004) e os métodos analíticos atualmente utilizados para avaliar cada fator é bem detalhado e discutido por Fauvel *et al.* (2010), Cabrita *et al.* (2014), Figueroa *et al.* (2016).

Para mugilídeos existem poucos trabalhos publicados com as características básicas do sêmen e de sua ativação. Para *Mugil cephalus*, Chao *et al.* (1975) analisaram 8 peixes entre 36 e 46 cm, com 0,85 a 2 kg e descreveram que o sêmen é viscoso com pequena quantidade de plasma, tem pH 7,4, densidade média de  $5,3 \times 10^{10}$  sptz mL<sup>-1</sup> e a cabeça do espermatozoide mede 2,3x1,4 µm. Yeganeh *et al.* (2008) utilizando machos de *M. cephalus* de 7-8 anos e peso médio 0,95 kg obtiveram

aproximadamente 3 minutos (117 seg) de motilidade e melhor tempo de motilidade na salinidade 32. A ultraestrutura da *M. cephalus* foi analisada por Kumar *et al.* (2015). Zaki *et al.* (1993) verificaram tempo de motilidade de até 7 minutos após ativação dos espermatozoides de *Liza ramada* com água do mar. Para *Mugil capito* a ativação ocorre entre pH 5,5 e 10, tendo como ótimo o pH 7 (HINES; YASHOUV, 1971 apud COSSON, 2004). Para *Mugil liza* e *Mugil platanus* Eiras-Stofella & Gremski (1991) analisaram a ultraestrutura dos espermatozoides, assim como em 1993 para *Mugil curema*. Otsubo *et al.* (2010) observaram em *M. liza* volume de  $4,4 \pm 1,02$  mL, densidade espermática média de  $4,4 \times 10^{10}$  cel mL<sup>-1</sup>, motilidade de 99% e tempo de motilidade médio de 458 seg (7 min e 38 seg).

Para *M. liza* não existem relatos para outros parâmetros de ativação dos espermatozoides e morfológicos. Conhece-los é o primeiro passo para fundamentar e entender o desenvolvimento das técnicas de reprodução e de conservação de gametas.

## 6. OBJETIVOS

### 6.1 OBJETIVO GERAL

Produzir informações sobre as características do espermatozoide e métodos de conservação de sêmen da tainha, *Mugil liza*, para otimizar a sua produção em cativeiro

### 6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar e descrever as diferenças nos parâmetros seminais e morfométricos dos espermatozoides da tainha de cativeiro e selvagem.

Verificar se existem diferenças nos parâmetros seminais e de ativação dos espermatozoides entre indivíduos de um mesmo grupo (cativeiro e selvagem).

Verificar se a salinidade e o pH do ativador espermático influenciam a porcentagem de células móveis e o tempo de motilidade dos espermatozoides.

Verificar o a integridade da membrana plasmática durante a estocagem do espermatozoide de tainha sob refrigeração a 4 °C

Verificar se a diluição de 1:3 com diluidor CF-HBSS propicia melhor resultado na refrigeração do sêmen a 4 °C, do que a estocagem *in natura*.

## **7. FORMATAÇÃO DOS ARTIGOS**

O desenvolvimento da tese está dividido em dois capítulos, onde o capítulo 1 foi redigido seguindo as regras da revista *Aquaculture Research* (JCR 1,606, Qualis A2), submetido no dia 23 de dezembro de 2016. O capítulo 2 foi redigido seguindo as regras da revista *Boletim do Instituto de Pesca* (JCR 0,525, Qualis B1) dia 24 de abril de 2017, respectivamente, e se encontram sob análise dos revisores

## 8. CAPÍTULO 1 - ESPERMATOLOGIA DA TAINHA *Mugil liza* (VALENCIENNES, 1836) SELVAGEM E DE CATIVEIRO: MORFOMETRIA E EFEITOS DO PH E SALINIDADE NA MOTILIDADE ESPERMÁTICA

Spermatology of lebranche mullet *Mugil liza* (Valenciennes, 1836) in the wild and captive states: Morphometry and effects of pH and salinity on sperm motility.

Caio Magnotti<sup>1</sup>, Vinicius Cerqueira<sup>1</sup>, Osvaldo Merino<sup>4</sup>, Ricardo de Souza<sup>5</sup>  
Jorge Farias<sup>3</sup>, Ivan Valdebenito<sup>2</sup>, Elias Figueroa<sup>2,3</sup>.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Aquicultura, Laboratório de Piscicultura Marinha, Florianópolis, SC, CEP 88062-601, Brasil. <sup>2</sup> Escuela de Acuicultura, Núcleo de Investigación en Producción Alimentaria, Universidad Católica de Temuco, Temuco, Chile. <sup>3</sup> Departamento de Ingeniería, Facultad de Ingeniería y Ciencias, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile. <sup>4</sup> BIOREN – Center for Biotechnology in Reproduction, La Frontera University, Temuco, Chile. <sup>5</sup> Universidade de São Paulo, Escola de Ciências Farmacêuticas.

Running head: Espermatologia de *Mugil liza*

### RESUMO

O trabalho teve como objetivo descrever aspectos da biologia espermática da tainha (*Mugil liza*) selvagem e de cativeiro em primeira maturação, e os efeitos de soluções ativadoras com diferentes salinidades (0, 10, 20, 30, 35, 40, 50 e 60) e pH (6, 7, 8, 9 e 10) na porcentagem de ativação e tempo de motilidade dos espermatozoides. Foram encontradas diferenças significativas no volume de sêmen, na densidade dos espermatozoides, espermátócrito, na integridade da membrana plasmática e na morfometria entre os grupos amostrados, demonstrando que a idade dos peixes e as características individuais influenciam diretamente na qualidade do sêmen. O melhor tempo de motilidade foi obtido na salinidade 34,8 (189±15 s) e melhor porcentagem de células móveis na salinidade 34,6 (95±10%), sendo que a variação de salinidade entre 30 e 35 não gera prejuízos significativos na motilidade dos espermatozoides da *M. liza*. Salinidades próximas a 20 e 50 acarretam na perda de aproximadamente 40 s de tempo de motilidade e 50% na porcentagem de células móveis. O pH de 8,5 propiciou o maior tempo de motilidade (218±13 s) e 8,7 a

melhor porcentagem de cél. móveis ( $93\pm 12\%$ ). A diminuição do tempo de motilidade também foi verificada em pH igual ou inferior a 7 e igual a 10, com perdas superiores a 50 s.

Palavra chave: Espermatozoologia, Morfologia, Motilidade, pH, Osmolalidade

## ABSTRACT

The object of the present work was to describe the sperm biology of lebranche mullet (*Mugil liza*) in the wild and in captivity at the time of first sexual maturity, and the effects produced by activating solutions with different levels of salinity (0, 10, 20, 30, 35, 40, 50 and 60 g L<sup>-1</sup>) and pH (6, 7, 8, 9 and 10) on the sperm activation period and rate. Significant differences were found in volume of semen, sperm density, spermatocrit, sperm viability and morphometry between the groups studied, showing that the origin, age and individual characteristics of the fish have a direct influence on sperm quality. The longest motility period was obtained with a salinity of 34.8 g L<sup>-1</sup> ( $189\pm 15$  s); the highest motility rate (percentage) was recorded with salinity 34.6 g L<sup>-1</sup> ( $95\pm 10\%$ ); varying the salinity between 30 and 35 g L<sup>-1</sup> did not produce any significant alterations in the motility of *M. liza* spermatozoa. Salinities between 20 and 50 g L<sup>-1</sup> led to a loss of approximately 40 seconds in motility time and 50% in motility rate. pH 8.5 produced the longest motility period ( $218\pm 13$  s) and pH 8.7 the highest motility rate ( $93\pm 12\%$ ). Reduced motility time was found with pH lower than or equal to 7 and equal to 10, with losses of more than 50 s in the flagellar activation period.

Key words: Spermatology, Morphology, Motility, pH, Osmolality

## INTRODUÇÃO

A família Mugilidae é representada por 66 espécies e 17 gêneros, com distribuição em todo o mundo em zonas tropicais, subtropicais e temperadas (Monteiro-Ribas and Bonecker, 2001). A tainha *Mugil liza* (Valenciennes, 1836) é a sétima espécie mais capturada no Brasil (MPA, 2011) e se mantém, desde 2004, classificada como sobreexplorada (IBAMA, 2007). Atualmente categorizada no Brasil como espécie quase ameaçada de extinção (NT) segundo a IUCN, passa por avaliação de seu estado de conservação populacional para definição de estratégias de manejo e ordenamento pesqueiro (MPA e MMA, 2015)

O êxito na reprodução de qualquer espécie em cativeiro inclui a devida análise da qualidade do sêmen, para assegurar a eficiência da



fertilização (Rurangwa *et al.*, 2004). Características como o volume de sêmen, concentração de espermatozoides e sua motilidade, são fatores importantes para avaliar a capacidade reprodutiva de uma espécie ou de um indivíduo (Maria *et al.*, 2010).

Os únicos estudos com os gametas masculinos da tainha foram realizados por Eiras-Stofella & Gremski (1991), que descreveram a ultraestrutura dos espermatozoides, Serralheiro *et al.* (1992) fizeram o primeiro relato de criopreservação do sêmen, Serralheiro *et al.* (1999) testaram três substâncias diluidoras para a refrigeração e Otsubo (2010) realizou estudos com três diluidores para a criopreservação do sêmen da espécie. Não existem relatos sobre a fisiologia, morfometria e fatores que induzem a ativação dos espermatozoides desta espécie.

Desta maneira, definir as características morfológicas dos gametas e da ativação dos espermatozoides da espécie é de fundamental importância para melhorar as técnicas de reprodução em cativeiro e desenvolver protocolos de manejo *in vitro* e conservação de sêmen. Este é o primeiro estudo da biologia do espermatozoide de reprodutores de *Mugil liza* nascidos em cativeiro, e comparando com espécimes selvagens.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Grupo de peixes**

Os indivíduos de cativeiro são resultantes de desovas no ano de 2014, provenientes de peixes selvagens capturados e mantidos no Laboratório de Piscicultura Marinha (LAPMAR – UFSC) e descrito por Passini *et al.* (2015). Foram mantidos em tanques circulares alocados dentro de uma estufa, com sistema de fluxo contínuo de água a uma taxa de troca de 100-300%. A água foi bombeada diretamente do oceano, com ponto de sucção na praia do Moçambique, Florianópolis – Brasil (27° 34' 02" S, 48° 25' 44" W). Os peixes se encontravam em água com temperatura entre 28 °C no verão e 17 °C no inverno e fotoperíodo natural (14h luz no verão, 10h luz no inverno). Foram alimentados três vezes ao dia até a saciedade com dieta comercial de 45% de proteína bruta e 8% de lipídios. No período reprodutivo de 2015 (junho – julho) os peixes tinham 11 meses de idade e os machos apresentavam sinais de maturação gonadal com liberação de sêmen após leve pressão abdominal.

Para comparar os resultados, também foram extraídas amostras de sêmen de peixes selvagens. Os peixes foram capturados com redes de arrasto pelos pescadores artesanais da região da Barra da Lagoa, Florianópolis – Brasil (27° 34' 26" S, 48° 25' 27" W) em 29 de junho. Os indivíduos foram manipulados imediatamente após a captura. Todos os

procedimentos foram previamente aprovados e autorizados pelo comitê de ética e uso de animais – CEUA pelo projeto n° PP00861.

#### Coleta do sêmen

Um total de 35 peixes de cativeiro foram anestesiados com 50 ppm de Benzocaína. Depois da anestesia, a região abdominal e genital foram limpas com água deionizada e secas com papel toalha. O sêmen foi coletado com seringas de 1 mL (com escala de 0,02 mL) depois de uma leve pressão abdominal, e imediatamente guardados a  $4\pm 1$  °C e protegidos da luz e analisados após 30 minutos. Amostras contaminadas com excremento e urina (identificado pela cor e pela variação de viscosidade) foram descartadas. A coleta e análise do sêmen dos peixes selvagens seguiram os mesmos procedimentos, exceto a etapa da anestesia. As amostras foram identificadas de acordo com o macho doador, e 15 de cada grupo foram analisadas individualmente para a motilidade, vitalidade, densidade espermática e espermatócrito, seis amostras de machos de cada grupo foram utilizados para avaliar a morfometria e cinco amostras de machos de cativeiro para avaliar os diferentes ativadores espermáticos. Todos os indivíduos foram pesados (g) com balança digital e medidos (cm) com uma trena.

#### Análise da motilidade espermática

O sêmen de ambos os grupos de reprodutores foi ativado com proporção de 1:10 (v:v) com uma solução de 35 de salinidade, pH 9 e  $4\pm 1$  °C, feita com água deionizada e sal marinho artificial (Blue Treasure Reef Sea Salt, Quingdao Sea-Salt Aquarium Technology Co., ltd., China). Imediatamente depois da ativação, foi examinado com microscópio óptico (Leica LCC50HD) (400x) por uma única pessoa, em um campo de visão selecionado aleatoriamente e intensidade de luz constante. O período de atividade flagelar foi medido com cronômetro desde o momento da ativação até a imobilidade de todos os espermatozoides. Para identificar a porcentagem de células móveis (%MC) foi utilizada uma escala com valores de 0 a 5 como sugerido por Fauvel, Savoye, Dreanno, Cosson & Suquet (1999), onde: 0 = 100% de espermatozoides imóveis, e 1 = 0–20%; 2 = 20–40%; 3 = 40–60%; 4 = 60–80%; 5 = 80–100% de espermatozoides móveis. Foram realizadas 4 repetições para cada macho testado

#### Concentração espermática

A concentração espermática foi avaliada por meio da contagem em microscópio óptico (400x, Leica LCC50HD) das células espermáticas presentes nas amostras de sêmen, previamente diluídas (1:1000) em

solução tamponada de formol a 4%, em câmara hematimétrica de Neubauer ( $1 \text{ mm}^3$ ). Foram feitas 4 contagens para cada macho. Para determinação e comparação da concentração espermática, foi empregada a técnica de espermócrito. O sêmen foi colocado em capilares de hematócrito, com uma das extremidades selada com plastilina, e submetido à centrifugação 18.000 g por 25 minutos, em centrífuga para capilares. A rotação e tempo foram determinados em um experimento prévio. A leitura da massa celular das amostras centrifugadas e do volume de plasma seminal foi realizada com régua graduada, sendo os valores obtidos expressos em porcentagem

### Integridade da membrana plasmática

Amostras de sêmen foram submetidas a avaliação da integridade da membrana plasmática pelo método da eosina-nigrosina, realizada de acordo com Maria *et al.* (2010). Para isso, o sêmen *in natura* foi depositado na proporção 1:5 (sêmen:corante) em uma lâmina e realizado esfregaço. Com tempo menor que 60 s foram fotografados 3 campos aleatórios de cada lâmina, com uma câmera digital acoplada ao microscópio Leica LCC50HD (400x). As imagens foram posteriormente analisadas com software Leica Application Suite LAS EZ com a contagem de 500 células por lâmina, diferenciando pigmentadas e não pigmentadas. Os valores foram demonstrados em porcentagem de células vivas (não pigmentadas).

### Parâmetros morfométricos dos espermatozoides

O sêmen de cada macho foi diluído em meio C-F HBSS ( $5,26 \text{ g L}^{-1}$  NaCl,  $0,26 \text{ g L}^{-1}$  KCl,  $0,33 \text{ g L}^{-1}$   $\text{NaHCO}_3$ ,  $0,04 \text{ g L}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $0,04 \text{ g L}^{-1}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $0,13 \text{ g L}^{-1}$   $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $0,66 \text{ g L}^{-1}$  glucose;  $200 \text{ mOsMol kg}^{-1}$ ) na proporção 1:1000 (v:v). Posteriormente foram realizados dois esfregaços de cada macho e corados com solução de rosa bengala a 3% (Maria *et al.*, 2010) (Fig. 1). Com a câmera do microscópio Leica LCC50HD (1000x), foram feitas 10 fotografias dos esfregaços e posteriormente analisados com software Leica Application Suite LAS EZ. 15 espermatozoides de cada esfregaço (30 espermatozoides por macho) foram medidos quanto ao comprimento da cabeça + peça intermediária (CC+PI), largura da cabeça (LC), comprimento do flagelo (CF). O comprimento total (CT) foi calculado pela soma CF+(CC+PI). A circularidade foi calculada pela equação  $4 \times (\text{área} / (\text{perímetro})^2)$  e a elipticidade pela equação  $(\text{CC} + \text{PI}) \times \text{LC}^{-1}$  de acordo com Tuset, Trippel & Montserrat (2008).

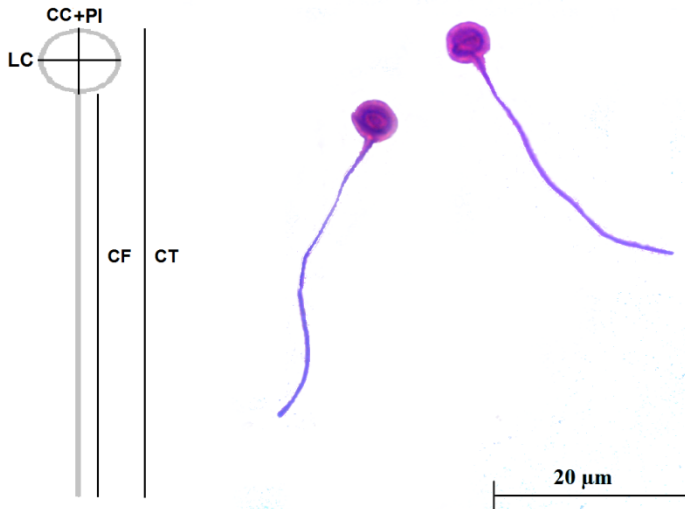


Figura 1. Desenho esquemático das medidas realizadas e espermatozoides de tainha (*Mugil liza*) corados com rosa bengala 3%, analisado por microscopia óptica (1000x).

### Ativadores espermáticos

Foram feitas soluções com sal marinho artificial (Blue Treasure Reef Sea Salt, Qingdao Sea-Salt Aquarium Technology Co., ltd., China) e água deionizada com as salinidades de 0, 10, 20, 30, 35, 40, 50 e 60 e pH 9 a  $4 \pm 1$  °C para as análises de ativação com diferentes salinidades. Para a ativação com diferentes pH, foi utilizada solução com 35 de salinidade e pH 6, 7, 8, 9 e 10 a  $4 \pm 1$  °C. Os valores foram medidos com pH-metro digital (YSI pH10A) e ajustados adicionando HCL [1%] para diminuir e NaOH [1%] para elevar o pH. Foram feitas 4 medições para cada tratamento.

### Análise estatística

Os resultados da influência do pH e salinidade no tempo de motilidade e taxa de motilidade dos espermatozoides foram submetidos a análise de regressão polinomial quadrática ( $y=ax^2+bx+c$ ) e identificação do ponto máximo da curva pela equação  $W=-b(2*a)^{-1}$ . A correlação entre o espermatócrito e concentração espermática, e entre a integridade da membrana plasmática e porcentagem de células móveis foram determinados por análise de regressão linear ( $y=a+bx$ ) e demonstrados de

acordo com seu coeficiente de determinação ( $R^2$ ). Os valores em porcentagem foram transformados para arco-seno ( $y^{0,5}$ ) antes da análise estatística. Os demais resultados foram submetidos a ANOVA de uma via ( $p < 0,05$ ). Teste Levene foi utilizado para verificar a homocedasticidade e o teste Shapiro Wilk para verificar a normalidade. Quando diferenças significativas foram identificadas na análise de variância, o teste Tukey de separação de médias foi aplicado com a ajuda do software Statistica 7.0.

## RESULTADOS

Durante o período de amostragem, o sêmen de todos os indivíduos apresentou coloração branca e elevada viscosidade. Foram encontradas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) para o volume de sêmen, concentração de espermatozoides, espermatócrito e integridade da membrana plasmática entre os grupos testados (Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros zootécnicos e seminais dos machos de diferentes origens de tainha (*Mugil liza*) (n=15).

	Cativeiro	Selvagem
Comprimento (cm)	28,3 ± 1,5 <sup>b</sup>	51,5 ± 2,2 <sup>a</sup>
Peso (g)	231,9 ± 34,0 <sup>b</sup>	1390,0 ± 187,2 <sup>a</sup>
Vol. sêmen (µL)	45,3 ± 33,4	> 2000
Conc. espermática (x10 <sup>9</sup> mL <sup>-1</sup> )	31,8 ± 2,9 <sup>a</sup>	24,9 ± 5,3 <sup>b</sup>
Espermatócrito (%)	85,9 ± 12,6 <sup>b</sup>	98,3 ± 1,6 <sup>a</sup>
Integridade da memb. plasmática (%)	96,9 ± 1,4 <sup>a</sup>	79,5 ± 12,9 <sup>b</sup>

Letras sobre-escritas diferentes demonstram diferença significativa no teste Anova uma via ( $p < 0,05$ )

Houve diferença significativa entre o tempo médio de motilidade entre os grupos, 183±38 s para cativeiro e 411±125 s para selvagem ( $p < 0,05$ ), sem diferença significativa entre a porcentagem de células móveis, 83,6±15,7% e 79,1±16,3%, respectivamente. Também foram observadas diferenças significativas nos resultados dos parâmetros entre os machos de cada grupo (Fig. 2). Porém, o grupo de cativeiro apresentou uma maior uniformidade nos resultados dos parâmetros de tempo de motilidade com desvio padrão médio de 38 s, enquanto o grupo dos peixes selvagens apresentou desvio padrão de 125 s ( $p < 0,05$ ).

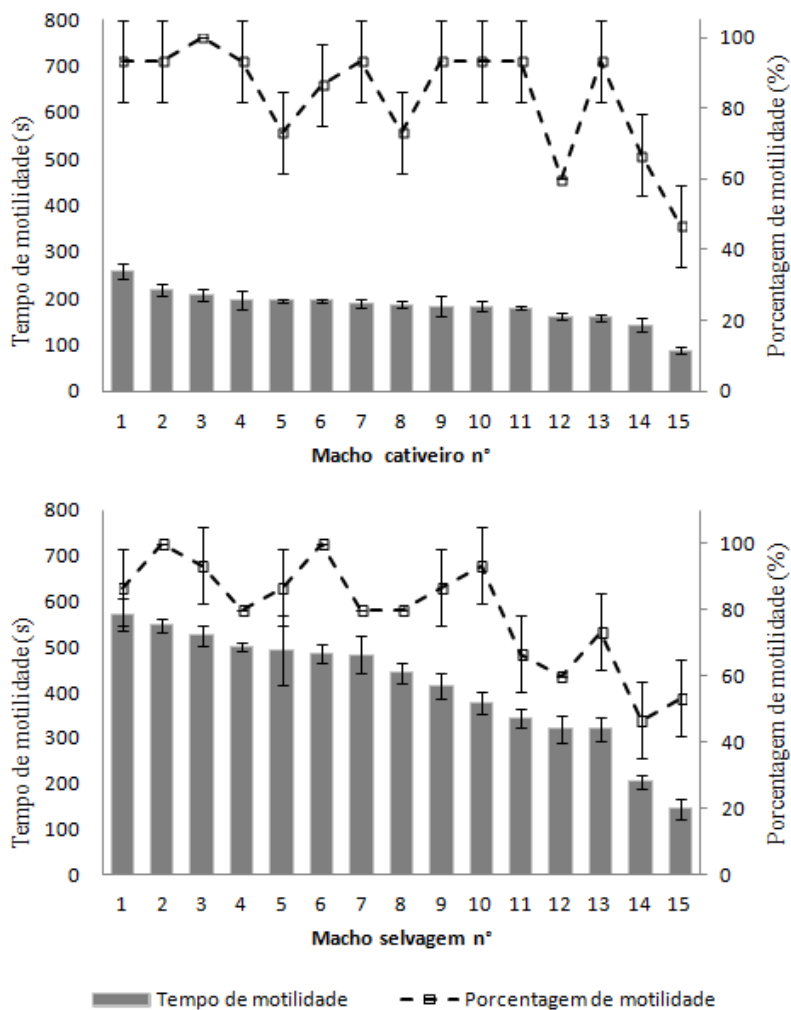


Figura 2. Tempo de motilidade (s) e porcentagem de motilidade (%) obtidos após a ativação dos espermatozoides dos machos de tainha (*Mugil liza*) (n=15).

Os resultados de integridade da membrana plasmática e porcentagem de células móveis apresentaram correlação positiva para os machos selvagens ( $R^2 = 0,83$ ) e de cativeiro ( $R^2 = 0,81$ ) (Fig. 3). Também foi verificada correlação positiva para os valores de concentração espermática e espermatócrito para machos de cativeiro ( $R^2 = 0.84$ ), mas não para os machos selvagens ( $R^2 = 0.02$ ) (Fig. 4).

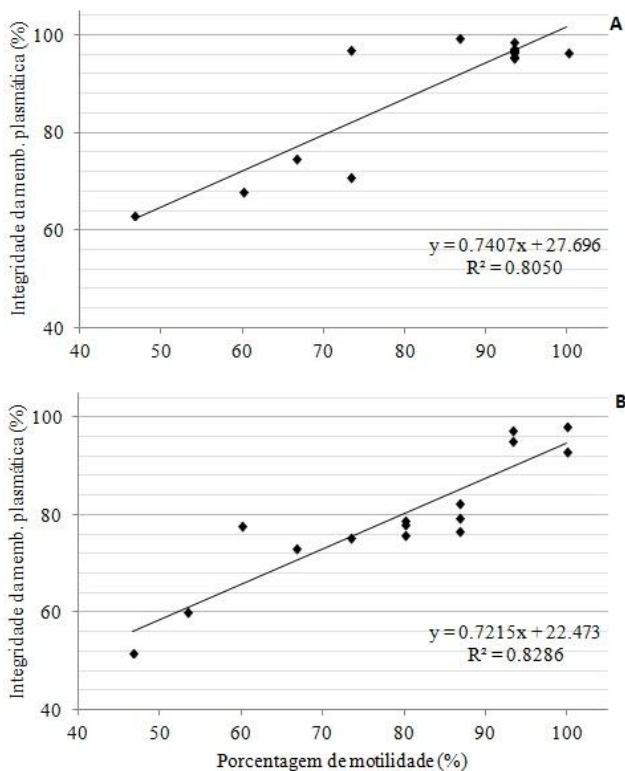


Figura 3. Correlação dos parâmetros de porcentagem de motilidade e integridade da membrana plasmática dos espermatozoides dos machos de cativeiro (A) e machos selvagens (B) de tainha *M. liza* (n=15).

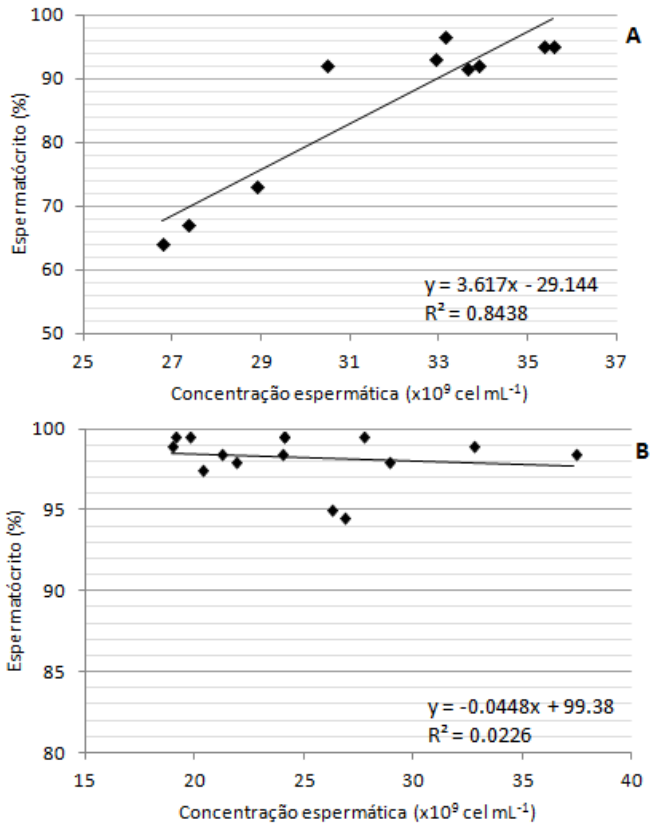


Figura 4. Correlação entre espermatócrito e concentração espermática dos machos de cativo (A) e machos selvagens (B) de tainha *M. liza* (n=15).

Foram verificadas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) na morfometria dos espermatozoides dos grupos analisados (Tabela 2). Os machos de cativo apresentaram espermatozoides com maior comprimento de cabeça (CC+PI), largura de cabeça (LC), comprimento de flagelo (CF), comprimento total (CT) e circularidade ( $p < 0,05$ ), não houve diferença significativa para elipticidade da cabeça ( $p > 0,05$ ). Também foram observadas diferenças significativas para os parâmetros morfométricos entre indivíduos do mesmo grupo ( $p < 0,05$ ).



Para os testes de ativação dos espermatozoides com diferentes soluções a  $4 \pm 1$  °C, foi obtido um maior tempo de motilidade na salinidade 34,8 e uma maior porcentagem de células móveis na salinidade 34,6 (Fig. 5). Salinidades entre 20 e 50 implicam na perda de aproximadamente 40 s no tempo de motilidade e 50% na taxa de motilidade. Em salinidade menor a 10 e maior de 60, os espermatozoides apresentam motilidade. O pH 8,5 proporcionou o maior tempo de motilidade e 8,7 a melhor porcentagem de células móveis. Foi verificado a piora dos parâmetros de motilidade em pH igual ou menor de 7 e igual a 10, com perda de mais de 50 s de motilidade.

Tabela 2. Parâmetros morfométricos dos espermatozoides de tainha (*Mugil liza*) em primeira maturação de cativo e selvagem.

	Cativo	Selvagem
Comprimento da cabeça ( $\mu\text{m}$ )	$2.02 \pm 0.12^a$	$1.95 \pm 0.10^b$
Largura da cabeça ( $\mu\text{m}$ )	$2.40 \pm 0.10^a$	$2.29 \pm 0.07^b$
Circularidade da cabeça	$1.19 \pm 0.10^a$	$1.10 \pm 0.08^b$
Elipticidade da cabeça	$0.84 \pm 0.06^a$	$0.85 \pm 0.04^a$
Comprimento flagelo ( $\mu\text{m}$ )	$34.62 \pm 2.26^a$	$32.83 \pm 2.33^b$
<u>Comprimento total (<math>\mu\text{m}</math>)</u>	<u><math>36.64 \pm 2.28^a</math></u>	<u><math>34.78 \pm 2.38^b</math></u>

Valores apresentados com média  $\pm$  desvio padrão. Letras minúsculas sobreescritas diferentes indicam diferença significativa entre as médias dos parâmetros analisados. Todos os valores foram analisados com ANOVA simples e posterior aplicação do teste Tukey ( $p < 0,05$ ).

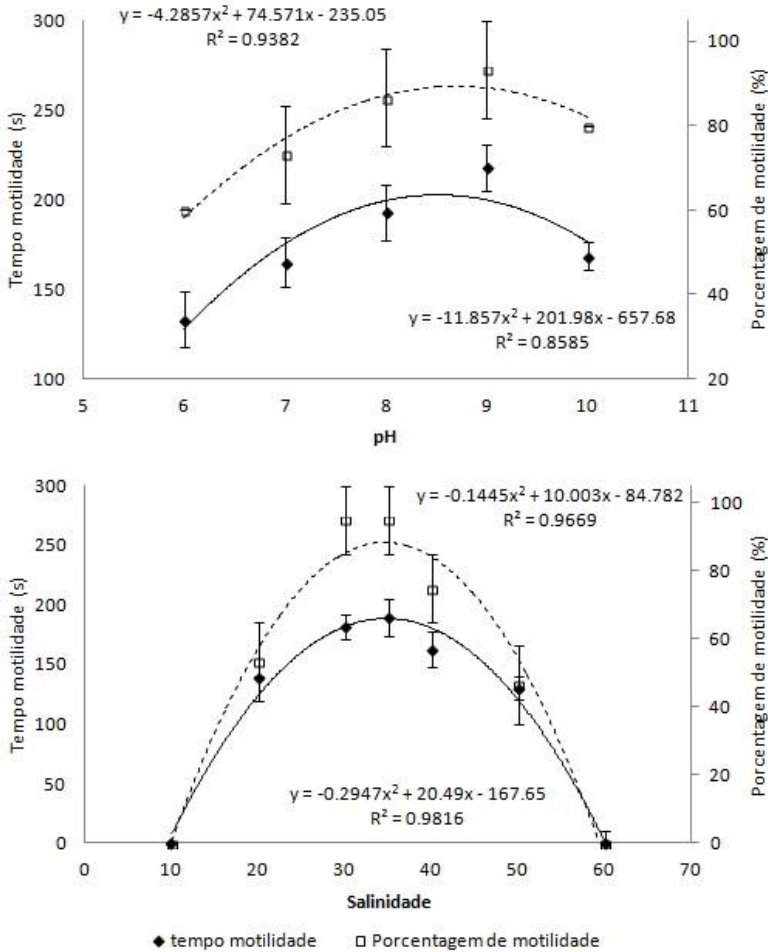


Figura 5. Influência do pH e salinidade no tempo de motilidade (◆) e porcentagem de motilidade (□) dos espermatozoides de tainha (*Mugil liza*) de cativeiro (n=5).

## DISCUSSÃO

A diferença entre os parâmetros de qualidade de sêmen entre machos selvagens e de cativeiro pode ser explicada pela diferença de idade e etapa do ciclo reprodutivo em que se encontram. A idade dos reprodutores tem influência significativa na qualidade do esperma (Valdebenito *et al.*, 2015; Vuthiphandchai and Zohar, 1999).

Vuthiphandchai & Zohar (1999) reportam que os reprodutores de 3 anos de idade de striped bass, *Morone saxatilis*, produziam sêmen com melhor qualidade do que os de 1 e 12 anos. A idade dos peixes selvagens era superior a 6 anos, pois apresentam média de comprimento total de  $51 \pm 2,2$  cm, enquanto o tamanho médio de indivíduos de 5-6 anos é de 40,8 cm (Gonzalez-Castro et al., 2009; Garbin et al., 2014), enquanto os de cativeiro tinham 11 meses.

Para as espécies que tem ciclo reprodutivo anual como a *M. liza*, a qualidade do esperma também pode variar em função da época de reprodução e da frequência da desova (Rurangwa et al., 2004). A correlação positiva entre densidade espermática e espermátocrito observada no grupo de cativeiro ( $R^2 = 0,84$ ) pode sinalizar que eles estavam sincronizados quanto a madurez das gonadas e aptos para reprodução. Os peixes selvagens não apresentaram essa correlação entre estes parâmetros ( $R^2 = 0,02$ ), influenciado pela pequena porção de plasma encontrada em todos os indivíduos ( $\pm 1,5\%$ ) mesmo quando apresentavam diferentes densidades espermáticas. Esta característica é um indício de que os peixes selvagens capturados durante a sua migração reprodutiva, ainda não apresentam total desenvolvimento gonadal, e precisariam de um tempo e/ou distância maior de migração para estarem totalmente maduros. O local de captura, Florianópolis – Santa Catarina, está localizado no trajeto migratório das tainhas, a aproximadamente 350 km ao sul das áreas de pico de desova, que foram identificadas no nordeste dos Estados de Santa Catarina e Paraná (Lemos et al. 2014).

O aumento do volume do plasma seminal durante o período reprodutivo foi verificado no Brazilian flounder, *Paralichthys orbignyanus* (Lanes et al., 2010). Mudanças em outros parâmetros de qualidade de semen durante a temporada de reprodução também foram observadas em turbot, *Psetta maxima* (Suquet et al., 1998); sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Dreanno et al., 1999; Fauvel et al., 1999); red porgy, *Pagrus pagrus* (Mylonas et al., 2003) e Senegalese sole, *Solea senegalensis* (Cabrita et al., 2006). Porém não é possível identificar um padrão definido nestas variações dos parâmetros seminais, demonstrando que esta característica é espécie-específica (Lanes et al., 2010).

Os resultados também demonstram diferenças morfométricas e nos parâmetros de qualidade de sêmen entre os machos de cada grupo. Estas variações individuais são bem descritas para peixes (Dreanno et al., 1999; Rana, 1995) e podem estar relacionadas com o estado de

maturação das gônadas, genética, manejo e fatores nutricionais (Cabrita *et al.*, 2014; Suquet *et al.*, 2000; Valdebenito *et al.*, 2015).

A morfometria do espermatozoide pode ser utilizada como ferramenta para verificar a qualidade do sêmen, onde serve de base para identificação de má formações morfológicas correlacionada com a funcionalidade da célula *in natura* e após criopreservação (Figuerola *et al.*, 2016; Maroto-Morales *et al.*, 2016). Para mamíferos (Thompson *et al.*, 1994; Hidalgo *et al.*, 2001; Gravance *et al.*, 2009) foi verificada redução significativa no tamanho da cabeça dos espermatozoides após criopreservação, que pode estar relacionado a danos gerados pelo procedimento. Também foram identificados variações morfológicas e morfométricas na cabeça, peça media e flagelo para os peixes: ocean pout, *Macrozoarces americanus* (Yao *et al.*, 2000); porgy, *Diplodus puntazzo* (Taddei *et al.*, 2001); red seabream, *Pagrus major* (Liu *et al.*, 2007); European seabass, *Dicentrarchus labrax* (Peñaranda *et al.*, 2008) e para o longtooth grouper, *Epinephelus bruneus* (Lim and Le, 2013). Além de ser uma ferramenta para identificar os melhores tratamentos para a conservação de gametas, Maroto-Morales *et al.* (2016) sugerem as diferenças morfométricas individuais podem ser usadas como ferramenta de seleção de reprodutores, pois seria possível identificar indivíduos que apresentam menor variação do tamanho da cabeça dos espermatozoides antes e depois da criopreservação e classificá-los como mais resistentes e aptos ao procedimento de conservação de sêmen.

A correta avaliação das características de qualidade do sêmen é considerada como um fator chave para melhorar o desempenho na reprodução de peixes (Alavi and Cosson, 2006). O pH do meio de ativação gera efeitos diretos e indiretos sobre a ativação dos espermatozoides (Alavi and Cosson, 2005), determinando a duração e a porcentagem de espermatozoides móveis. O pH junto de outros fatores externos, como a salinidade e a temperatura, possuem papel muito importante na fisiologia espermática (Aral *et al.*, 2007; Billard *et al.*, 1995). Desta maneira, é muito importante avaliar a influência destes parâmetros sobre a motilidade espermática de tainha, observando o potencial para o uso de meios diluidores ou de ativadores espermáticos na piscicultura.

O plasma seminal possui uma composição bioquímica única que propicia a normalidade das funções dos espermatozoides (Ciereszko, 2008). Neste estudo, a porcentagem de espermatozoides móveis e a duração da motilidade mostraram padrões de mudança específicos de acordo com os valores de salinidade e pH do ativador. Foi encontrada correlação positiva entre a salinidade e a porcentagem de

espermatozoides móveis ( $R^2=0,98$ ) e duração da motilidade ( $R^2=0,97$ ) assim como entre o pH e estes parâmetros com  $R^2=0,94$  e  $R^2=0,86$ , respectivamente (Fig. 3).

Os resultados estão de acordo ao descrito em outras espécies de água doce e salgada, onde são encontradas correlações significativas entre a porcentagem de espermatozoides móveis e tempo de duração da motilidade com pH, salinidade e osmolalidade: sea bass, *Dicentrarchus labrax* e sea bream, *Sparus auratus* (Billard, 1978); flounders, *Limanda yokohamae* e *Kareius bicoloratus* (Morisawa and Suzuki, 1980); Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (Billard et al., 1993); American paddlefish, *Polyodon spathula* (linhart et al., 1995); common bleak, *Alburnus alburnus* (Lahnsteiner et al., 1996); truta arco iris, *Oncorhynchus mykiss* (Lahnsteiner et al., 1998); salmão Chinook, *Oncorhynchus tshawytscha* (Ingermann et al., 2003); grey mullet, *Mugil cephalus* (Yeganeh et al., 2008) e southern hake, *Merluccius australis* (Effer et al., 2013).

Em peixes, as correlações significativas entre a porcentagem de espermatozoides móveis, duração de motilidade com o pH e a salinidade, sugerem que alguns componentes orgânicos (mono e polissacarídeos, proteínas, triglicerídeos, fosfolipídios) e inorgânicos ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{+2}$ ,  $Cl^-$ ,  $Mg^{+2}$ ) do plasma seminal afetam a motilidade dos espermatozoides antes de serem liberados ao meio ambiente (Alavi and Cosson, 2006; Hajirezaee et al., 2010; Lahnsteiner et al., 2004; Lahnsteiner et al., 1993). Estes componentes são essenciais no plasma seminal, podendo afetar a maturação final dos gametas (Lahnsteiner et al., 1998), e devem ser considerados na elaboração de meios de diluição e de ativação espermática (Figueroa et al., 2016; Valdebenito et al., 2009).

As características químicas do meio de ativação de motilidade determinam essencialmente a duração da motilidade e velocidade do espermatozoide (Groison et al., 2010). No meio externo, o qual estas células enfrentam após a liberação em condições naturais (águas oceânicas) ou depois da diluição nos meios de fecundação artificial, a salinidade e o pH são cruciais. Estes parâmetros modificam a osmolalidade, a concentração dos sais inorgânicos do meio, principalmente de  $Na^+$ ,  $K^+$  e  $Ca^{+2}$ , e sua permeabilidade na membrana celular dos espermatozoides. Cosson (2004) e Alavi & Cosson (2005, 2006) descreveram que os sais inorgânicos são responsáveis pela variação da atividade dos canais iônicos da membrana celular, o pH pela sua permeabilidade, e junto da mudança de um meio hipo para um

hiperosmótico, são os principais fatores desencadeantes para a motilidade dos espermatozoides de peixes marinhos.

As concentrações inadequadas de sais, pH e osmolalidade podem despolarizar a membrana celular e afetar a atividade flagelar dos espermatozoides de uma espécie (Morisawa and Suzuki, 1980; Morisawa *et al.*, 1983), diminuindo a duração da motilidade depois da ativação e sua capacidade de fecundação (Billard *et al.*, 1995; Cosson, 2004; Cosson *et al.*, 1999; Cosson *et al.*, 1985; Stoss, 1983). Neste sentido, a medição dos componentes orgânicos e inorgânicos no plasma seminal de peixes selvagens e a determinação das relações fisiológicas com a motilidade dos espermatozoides podem ser utilizadas como biomarcadores de sua qualidade, ajudando na fecundação artificial, formulação de diluentes para criopreservação e armazenamento a curto prazo dos espermatozoides (Valdebenito *et al.*, 2009).

Em peixes marinhos com fertilização externa, o movimento dos espermatozoides é ativado mediante a transferência do sêmen para a água do mar, que representa um meio externo hostil (Cosson, 2008). A *M. liza* é uma espécie catádroma, com recrutamento dos juvenis em lagoas e estuários, eurialinos (0 a 90) e euritêrmicos (3 a 36 °C) (Cerqueira, 2004). Entretanto, os reprodutores realizam migração para um curto período de desova em alto mar, onde as condições de pH e salinidade são estáveis (Albieri *et al.*, 2010). Esta estabilidade da coluna de água e a alimentação adequada nos estuários antes da migração reprodutiva podem ser identificados como fatores importantes que influenciam na reprodução da espécie.

## **CONCLUSÃO**

A salinidade e o pH podem modular a motilidade dos espermatozoides de tainha. Foi encontrado que no intervalo entre 34,6 a 34,8 de salinidade e pH 8,5 a 8,7 favorecem o melhor desempenho de ativação dos espermatozoides de *Mugil liza*. A a idade dos peixes e as características individuais podem gerar diferenças na morfometria e na ativação dos espermatozoides.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a toda equipe do LAPMAR – UFSC, a UFRO, a comunidade de pescadores artesanais de Florianópolis que deram suporte para que o trabalho fosse realizado e a CAPES projeto n° 23038.004323/2014-54 pelo apoio financeiro nos itens de custeio.

## REFERÊNCIAS

- Agarwal, N.K., Saini, V., Raghuvanshi, S.K., 2013. Characterization and short-term storage of semen of a coldwater Himalayan fish species. *Biojournal* 8, 1-8.
- Alavi, S.M.H., Cosson, J., 2005. Sperm motility in fishes I. Effects of temperature and pH: a review. . *Cell Biology International* 29, 101-110.
- Alavi, S.M.H., Cosson, J., 2006. Sperm motility in fishes II. Effects of ions and osmolality: a review. *Cell Biology International* 30, 1-14.
- Albieri, R.J., Araujo, F.G., Uehara, W., 2010. Differences in reproductive strategies between two co-occurring mullets *Mugil curema* Valenciennes 1836 and *Mugil liza* Valenciennes 1836 (Mugilidae) in a tropical bay. *Trop Zool* 23, 51-62.
- Aral, F., Sahinoz, E., dogu, Z., 2007. A study on the milt quality of *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1972) and *Carasobarbus luteus* (Heckel, 1843) in Ataturk Dam Lake, Southeastern Turkey. *Turk J Fish Aquat Sc* 7, 41-44.
- Billard, R., 1978. Changes in structure and fertilizing ability of marine and fresh water fish spermatozoa diluted in media of various salinities. *Aquaculture*, 187-198.
- Billard, R., Cosson, J., Crim, L., 1993. Motility of fresh and aged halibut sperm. *Aquat Living Resour* 6, 67-75.
- Billard, R., Cosson, J., Crim, L., Suquet, M., 1995. Sperm physiology and quality, in: Bromage, N.R., Roberts, R.J. (Eds.), *Broodstock management and egg and larval quality*. Blackwell Science, Boston, pp. 25-52.
- Billard, R., Cosson, M.P., 1986. Sperm motility in rainbow trout, *Parasalmo mykiss*; effect of pH and temperature. *Reproduction in fish - Basic and applied aspects in endocrinology and genetics* 10-12, 161-167.
- Cabrera, E., Martinez-Paramo, S., Gavaia, P.J., Riesco, M.F., Valcarce, D.G., Sarasquete, C., Herraiz, M.P., Robles, V., 2014. Factors enhancing fish sperm quality and emerging tools for sperm analysis. *Aquaculture* 432, 389-401.

Cabrita, E., Soares, F., Dinis, M.T., 2006. Characterization of Senegalese sole, *Solea senegalensis*, male broodstock in terms of sperm production and quality. *Aquaculture* 261, 967-975.

Cerqueira, V.R., 2004. Cultivo de peixes marinhos, in: Poli, C.R., Poli, A.T., Andreatta, E.R., Beltrame, E. (Eds.), *Aquicultura experiências brasileiras*. UFSC, Florianópolis.

Ciereszko, A., 2008. Chemical composition of seminal plasma and its physiological relationship with sperm motility, fertilizing and cryopreservation success in fish, in: Alavi, S.M.H., Cosson, J., Coward, K., Rafiee, R. (Eds.), *Fish spermatology*. Alpha Science, Oxford, pp. 215-240.

Cosson, J., 2004. The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa. *Aquacult Int* 12, 69-85.

Cosson, J., 2008. The motility apparatus of fish spermatozoa, in: Alavi, S.M.H., Cosson, J., Coward, K., Rafiee, R. (Eds.), *Fish Spermatology*. Alpha Science, Oxford, pp. 281-316.

Cosson, J., Billard, R., Cibert, C., Dreanno, C., Suquet, C., 1999. Ionic factors regulating the motility of fish sperm, in: Gagnon, C. (Ed.), *The male gamete: from basic knowledge to clinical applications*. Cache River Press, Paris, pp. 161-186.

Cosson, M.P., Billard, R., Gatti, J., Christen, R., 1985. Rapid and quantitative assessment of trout spermatozoa motility using stroboscopy. *Aquaculture* 46, 71-75.

Dreanno, C., Suquet, M., Fauvel, C., Le Coz, J.R., Dorange, G., Quemener, L., Billard, R., 1999. Effect of the aging process on the quality of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) semen. *Journal of Applied Ichthyology-Zeitschrift Fur Angewandte Ichthyologie* 15, 176-180.

Effer, B., Figueroa, E., Augsburger, A., Valdebenito, I., 2013. Sperm biology of *Merluccius australis*: Sperm structure, semen characteristics and effect of pH, temperature and osmolality on sperm motility. *Aquaculture* 408-409, 147-151.

Eiras-Stofella, D.R., Gremski, W., 1991. Ultrastructural analysis of the mullet *Mugil liza* and *Mugil platanus* (Teleostei, Mugilidae) spermatozoa. *Microscopia Electronica y Biologia Celular* 15, 173-178.



- Fauvel, C., Savoye, O., Dreanno, C., Cosson, J., Suquet, M., 1999. Characteristics of sperm of captive seabass in relation to its fertilization potential. *J Fish Biol* 54, 356-369.
- Figuroa, E., Valdebenito, I., Farias, J., 2016. Technologies used in the study of sperm function in cryopreserved fish spermatozoa. *Aquac Res* 47, 1691-1705.
- Garbin, T., Castello, J.P., Kinas, P.G., 2014. Age, growth, and mortality of the mullet *Mugil liza* in Brazil's southern and southeastern coastal regions. *Fish Res* 149, 61-68.
- Gonzalez-Castro, M., Abachian, V., Perrota, R., 2009. Age and growth of the striped mullet, *Mugil platanus* (Actinopterygii, Mugilidae), in a southwestern Atlantic coastal lagoon (37°32'S-57°19'W): a proposal for a life-history model. *J Appl Ichthyol* 25, 61-66.
- Gravance, C.G., Casey, M.E., Case, P.J., 2009. Pre-freeze bull sperm head morphometry related with post-thaw fertility. *Anim Reprod Sci* 114, 81-88.
- Groison, A., Suquet, M., Cosson, J., Mayer, I., Severe, A., Bouquet, J., Geffen, A., Utne-Palm, A.C., Kjesbu, O.S., 2010. Sperm motility in European hake, *Merluccius merluccius*, and characterization of its spermatozoa concentration and volume, spermatocrit, osmolality and pH. *Aquaculture* 301, 31-36.
- Hajirezaee, S., Mojazi, B., Mirvaghefi, A.R., 2010. Relationships between the chemical properties of seminal fluid and the sperm motility characteristics of Caspian brown trout, *Salmo trutta caspius* (a critically endangered salmonid fish). *Research Journal of Fisheries and Hydrobiology* 5, 27-31.
- Hidalgo, M., Rodriguez, I., Dorado, J.M., 2001. The effect of cryopreservation on sperm head morphometry in Florida male goat related to sperm freezability. *Anim Reprod Sci* 100, 61-72.
- IBAMA, 2007. Relatório de reunião Técnica para ordenamento da pesca da tainha (*Mugil platanus*, *M. liza*) na região Sudeste/Sul do Brasil, in: IBAMA (Ed.). Instituto brasileiro do meio ambiente e dos recursos naturais renováveis, Itajaí, p. 85.
- Ingermann, R.L., Robinson, M.L., Cloud, J.G., 2003. Respiration of steelhead trout sperm: sensitivity to pH and carbon dioxide. *J Fish Biol* 62, 13-23.

Lahnsteiner, F., Berger, B., Weismann, T., Patzner, R.A., 1996. Motility of spermatozoa of *Alburnus alburnus* (Cyprinidae) and its relationship to seminal plasma composition and sperm metabolism. *Fish Physiol Biochem* 15, 167-179.

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

Lahnsteiner, F., Mansour, N., Berger, B., 2004. Seminal plasma proteins prolong the viability of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Theriogenology* 62, 801-808.

Lahnsteiner, F., Patzner, R.A., Weismann, T., 1993. Energy resources of spermatozoa of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Pisces, Teleostei). *Reproduction Nutrition Development* 33, 349-360.

Lanes, C.F.C., Okamoto, M.H., Bianchini, A., Marins, L.F., Sampaio, L.A., 2010. Sperm quality of Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* throughout the reproductive season. *Aquac Res* 41, 199-207.

Lemos, V.M., Varela, A.S., Schwingel, P.R., Muelbert, J.H., Vieira, J.P., 2014. Migration and reproductive biology of *Mugil liza* (Teleostei: Mugilidae) in south Brazil. *J Fish Biol* 85, 671-687.

Lim, H.K., Le, M.H., 2013. Evaluation of extenders and cryoprotectants on motility and morphology of longtooth grouper (*Epinephelus bruneus*) sperm. *Theriogenology* 79, 867-871.

linhart, O., Mims, S.D., Shelton, W.L., 1995. Motility of spermatozoa from Shovelnose sturgeon, *Scaphirhynchus platyrhynchus*, and Paddlefish, *Polyodon spathula*. *J Fish Biol* 47, 902-909.

Liu, Q.H., Li, J., Zhang, S.C., Xiao, Z.Z., Ding, F.H., Yu, D.D., Xu, X.Z., 2007. Flow cytometry and ultrastructure of cryopreserved red seabream (*Pagrus major*) sperm. *Theriogenology* 67, 1168-1174.

Maria, A.N., Azevedo, H.C., Santos, J.P., Silva, C.A., Carneiro, P.C.F., 2010. Semen characterization and sperm structure of the Amazon tambaqui *Colossoma macropomum*. *J Appl Ichthyol* 26, 779-783.

Maroto-Morales, A., García-Álvarez, O., Ramón, M., Martínez-Pastor, F., Fernandes-Santos, M.R., Soler, A.J., Garde, J.J., 2016. Current status

and potential of morphometric sperm analysis. *Asian Journal of Andrology* 18, 863-870.

Mattei, X., 1991. Spermatozoon ultrastructure and its systematic implications in fishes. *Canadian Journal of Zoology* 69, 3038-3055.

Monteiro-Ribas, W.M., Bonecker, A.C.T., 2001. Artificial fertilization and development in laboratory of *Mugil liza* (Valenciennes, 1836) (Osteichthyes, Mugilidae). *B Mar Sci* 68, 427-433.

Morisawa, M., Suzuki, K., 1980. Osmolality and potassium ion: their roles in initiation of sperm motility in teleost. *Science* 210, 1145-1147.

Morisawa, M., Suzuki, K., Morisawa, S., 1983. Effects of potassium an osmolality on spermatozoan motility of salmonid fishes. *J Exp Biol* 107, 105-113.

MPA, 2011. Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura, in: MPA (Ed.). Ministério da pesca e aquicultura, Brasília, p. 60.

Mylonas, C.C., Papadaki, M., Divanach, P., 2003. Seasonal changes in sperm production and quality in the red porgy *Pagrus pagrus* (L.). *Aquac Res* 34, 1161-1170.

Otsubo, R.I., 2010. Inseminação artificial da tainha *Mugil Liza* com a utilização de sêmen fresco e criopreservado, Programa de Pós graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca, São Paulo.

Passini, G., Carvalho, C., Sterzelecki, F., Baloi, M., Magnotti, C., Pedrotti, F., Cerqueira, V.R., 2015. Reprodução e larvicultura da tainha (*Mugil liza*) no Estado de Santa Catarina, FENACAM & LACQUA/SARA (WAS), Brazil.

Peñaranda, D.S., Pérez, L., Fakriadis, G., Mylonas, C.C., Asturiano, J.F., 2008. Effects of extenders and cryoprotectant combinations on motility and morphometry of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) spermatozoa. *J Appl Ichthyol* 24, 450-455.

Rana, K., 1995. Preservation of gametes, in: Bromage, N.R., Roberts, R.J. (Eds.), *Broodstock management and egg and larval quality*. Cambridge University, Cambridge.

Rurangwa, E., Kime, D.E., Ollevier, F., Nash, J.P., 2004. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture* 234, 1-28.

Serralheiro, P.C.S., Fogli da Silveira, W., Godinho, H.M., Oliveira, I.R., 1999. O uso de três soluções diluidoras em sêmen de tainha – *Mugil platanus*, Gunther, 1880, resfriado em container de vapor de nitrogênio líquido, Encontro Brasileiro de Ictiologia, Sao Carlos, p. 508.

Serralheiro, P.C.S., Fogli da Silveira, W., Kavamoto, E.T., Godinho, H.M., Ferraz, E., 1992. Criopreservação do sêmen da tainha *Mugil platanus* em “macro-paillets”, Reunião anual do Instituto de Pesca, São Paulo, p. 59.

Stoss, J., 1983. Fish gamete preservation and spermatozoan physiology, in: Hoar, W.S., Randall, D.J., Donaldson, E.M. (Eds.), *Fish physiology*. Academic Press, New York, pp. 305-350.

Suquet, M., Dreanno, C., Dorange, G., Normant, Y., Quemener, L., Gaignon, J.L., Billard, R., 1998. The ageing phenomenon of turbot spermatozoa: effects on morphology, motility and concentration, intracellular ATP content, fertilization, and storage capacities. *J Fish Biol* 52, 31-41.

Suquet, M., Dreanno, C., Fauvel, C., Cosson, J., Billard, R., 2000. Cryopreservation of sperm in marine fish. *Aquac Res* 31, 231-243.

Taddei, A.R., Barbato, F., Abelli, L., Canese, S., Moretti, F., Rana, K.J., Fausto, A.M., Mazzini, M., 2001. Is cryopreservation a homogeneous process? Ultrastructure and motility of untreated, prefreezing, and postthawed spermatozoa of *Diplodus puntazzo* (Cetti). *Cryobiology* 42, 244-255.

Thompson, L.A., Brook, P.F., Warren, M., Barrat, C., Cooke, I., 1994. A morphometric comparison of the nuclear morphology of fresh and frozen-thawed human zona-bound and unbound sperm. *Journal of Andrology* 15, 337-342.

Tuset, V.M., Trippel, E.A., de Monserrat, J., 2008. Sperm morphology and its influence on swimming speed in Atlantic cod. *J Appl Ichthyol* 24, 398-405.

Valdebenito, I., Fletcher, C., Vera, V., Fernandez, J., 2009. Factores fisicoquímicos que regulan la motilidad espermática en peces: aspectos básicos y aplicados. Una revisión. *Arch Med Vet* 47, 97-106.

Valdebenito, I., Gallegos, P.C., Effer, B.R., 2015. Gamete quality in fish: evaluation parameters and determining factors. *Zygote* 23, 177-197.

Vuthiphandchai, V., Zohar, Y., 1999. Age-related sperm quality of captive striped bass *Morone saxatilis*. *J World Aquacult Soc* 30, 65-72.

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

Yeganeh, S., Amiri, B.M., Alavi, S.M.H., 2008. Motility of *Mugil cephalus* L. spermatozoa in coelomic fluid, seminal fluid and saline media. *J Appl Ichthyol* 24, 517-518.

## 9. CAPÍTULO 2 - REFRIGERAÇÃO DO SÊMEN DA TAINHA *IN NATURA* E DILUÍDO COM CF-HBSS

Caio Cesar Franca MAGNOTTI<sup>1\*</sup>, Jorgélia de Jesus Pinto CASTRO<sup>1</sup>,  
Fabiola Santiago PEDROTTI<sup>1</sup>, Eduardo Gomes SANCHES<sup>2</sup>, Vinicius  
Ronzani CERQUEIRA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias,  
Departamento de Aquicultura, Laboratório de Piscicultura Marinha,  
Florianópolis, SC, CEP 88062-601, Brasil. <sup>2</sup>Instituto de Pesca de São  
Paulo, Ubatuba, SP, CEP 11680-000, Brasil.

\*corresponding author: Tel.: +55 48 37216386

E-mail: caio.magnotti@ufsc.br (C. Magnotti)

### RESUMO

As características de ativação dos espermatozoides da tainha *in natura* e diluídos com CF-HBSS 1:3 (v:v) foram definidas por 96h de refrigeração a 4±2 °C. O sêmen foi coletado de oito peixes selvagens em Florianópolis – SC (27°S) no mês de Maio, durante a migração reprodutiva. Amostras com porcentagem de células móveis superior a 80% foram selecionadas para o pool de sêmen. Aliquotas em triplicata foram divididas para os tratamentos: *in natura* e diluído com CF-HBSS 1:3. As amostras foram ativadas com água oceânica (34 de salinidade e pH 8,7) e determinada porcentagem de células móveis, concentração espermática, espermatócrito e integridade da membrana plasmática. O sêmen *in natura* apresentou viabilidade durante as 96h de refrigeração, com perda pequena de qualidade de sêmen para o tempo 24h, porém com resultado inferior ao tratamento com diluidor (p<0,05). A diluição com CF-HBSS 1:3 propiciou o aumento no tempo de motilidade do sêmen diluído (15-20% para 6, 12 e 18h), maior porcentagem de células móveis (p<0,05) (±30% maior, para 12, 18 e 24h) e maior integridade de membrana (15-20% maior para 6 a 48h) (p<0,05). Também foi verificada correlação positiva entre a integridade da membrana plasmática e a porcentagem de motilidade nos dois tratamentos.

Palavras chave: Conservação de gametas; Sêmen; Espermatozoide; Aquicultura; Piscicultura marinha

## SHORT-TERM STORAGE OF LEBRANCHE MULLET SEMEN *IN NATURA* AND DILUTED WITH CF-HBSS

### ABSTRACT

The activation characteristics of the mullet spermatozoa *in natura* and diluted with CF-HBSS 1:3 (v:v) were defined for 96h of refrigeration at  $4 \pm 2$  °C. Semen was collected from eight wild fish in Florianópolis - SC (27 °S) in May, during reproductive migration. Samples with percentage of mobile cells greater than 80% were selected for the semen pool. Triplicate aliquots were divided for the treatments: *in natura* and diluted with CF-HBSS 1:3. The samples were activated with ocean water (salinity of 34 and pH 8.7) to determine percentage of moving cells, sperm concentration, spermatocrit and plasma membrane integrity. The semen *in natura* presented viability during 96 h of refrigeration, with small loss of semen quality at 24 h, but it was worse than the treatment with diluent ( $p < 0.05$ ). Dilution with CF-HBSS 1:3 increased motile time of diluted semen (15-20% for 6, 12 and 18 h), percentage of mobile cells ( $p < 0.05$ ) ( $\pm 30\%$  for 12, 18 and 24 h) and membrane integrity (15-20% higher for 6 to 48 h) ( $p < 0.05$ ). There was a positive correlation between plasma membrane integrity and percentage of motility in both treatments.

Keywords: Gamete conservation; Milt; Spermatozoa; Aquaculture; Marine fish farming

### INTRODUÇÃO

A tainha *Mugil liza* (Valenciennes, 1836) é a sétima espécie mais capturada no Brasil (MPA, 2011) e está classificada como sobre-explotada desde 2004 (IBAMA, 2007). Atualmente categorizada no Brasil como espécie quase ameaçada de extinção (NT) segundo a IUCN, passa por avaliação de seu estado de conservação populacional para definição de estratégias de manejo e ordenamento pesqueiro (MPA e MMA, 2015)

Por ser uma espécie euritérmica, eurihalina, onívora e requerer fácil manejo alimentar apresenta características favoráveis para a aquicultura (NETO e SPACH, 1998; CERQUEIRA, 2004; MIRANDA-FILHO *et al.*, 2010). Estudos com a reprodução da espécie em cativeiro foram iniciados nos anos 1980. Entretanto, os únicos relatos que descrevem o espermatozoide e a conservação de sêmen da tainha são de EIRAS-STOFELLA e GREMSKI (1991), SERRALHEIRO *et al.* (1992), SERRALHEIRO *et al.* (1999) e OTSUBO (2010).

A conservação de sêmen é uma ferramenta útil para preservar genes de interesse, colaborar com a propagação artificial na ausência de sincronização de desova, reduzir custos e riscos de transporte de animais vivos, estabelecer programas de hibridização e melhoramento genético, bem como para auxiliar na manutenção e proteção das espécies (SUQUET *et al.*, 2000; RURANGWA *et al.*, 2004; GWO, 2011). A refrigeração do sêmen para temperaturas próximas a 4°C é uma das técnicas de conservação, proporcionando o prolongamento da viabilidade temporal do sêmen não diluído por algumas horas ou dias. Esse feito pode ser explicado pela redução da atividade metabólica dos espermatozoides a temperaturas abaixo da fisiológica.

O uso de soluções diluidoras e imobilizadoras da motilidade que mimetizam a composição iônica e a osmolalidade do plasma seminal tem sido efetivo em potencializar a longevidade, sem promover mudanças significativas da qualidade do sêmen (PEÑARANDA *et al.*, 2010; GWO, 2011; UBILLA *et al.*, 2015). Os diluidores desenvolvidos para espécies marinhas geralmente apresentam em sua composição sais inorgânicos, *buffer tris* (estabilizador de pH), pequenas quantidades de monossacarídeos ou açúcares dissacarídeos (glicose, sacarose, frutose, lactose, trealose, etc.) e proteína (BSA – albumina do soro bovino) com pH de 7,0 a 8,2 e osmolalidade entre 205 e 400 mOsMol.kg<sup>-1</sup> (SUQUET *et al.*, 2000; MAGNOTTI *et al.*, 2016). Com composição iônica e osmolalidade similar a do sangue e plasma seminal da espécie (MORISAWA e SUZUKI, 1980), têm a função de diluir, nutrir e proteger os espermatozoides de produtos tóxicos do metabolismo celular e de variação brusca de temperatura (STOSS, 1983; VALDEBENITO *et al.*, 2009; UBILLA e VALDEBENITO, 2011). O primeiro passo para o desenvolvimento de protocolos de conservação de sêmen de uma espécie é determinar qual a composição mais adequada do diluente (VIVEIROS *et al.*, 2012).

Desta maneira, definir as características de ativação dos espermatozoides da espécie mantidos *in natura* e com um diluente espermático durante o período de refrigeração é fundamental para a melhoria das técnicas de reprodução em cativeiro, bem como para o desenvolvimento de protocolos de manejo e estocagem do sêmen.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Coleta de sêmen**

O material biológico utilizado foi coletado de peixes selvagens, capturados com redes de arrasto por pescadores artesanais da região da Barra da Lagoa, Florianópolis (27° 34' 26" S, 48° 25' 27" W) no dia 23



de maio, durante o período reprodutivo da espécie (LEMOS *et al.*, 2014). Oito peixes foram manejados imediatamente após a captura, verificando-se o comprimento total (cm) e peso (g). Para a coleta do sêmen, as regiões abdominal e genital dos indivíduos foram limpas com água deionizada e secas com papel toalha. O sêmen, coletado com seringas de 3 mL após suave pressão abdominal, foi imediatamente estocado em um recipiente térmico com gelo (sem contato direto com as seringas) com temperatura interna de  $4\pm 2$  °C e proteção de luz. Amostras contaminadas com fezes e urina (checado pela cor e variação na viscosidade) foram descartadas. Identificadas de acordo com o macho doador, as amostras foram analisadas individualmente quanto à motilidade espermática. Os procedimentos realizados durante o experimento foram previamente aprovados e autorizados pelo comitê de ética e uso de animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA - UFSC) pelo projeto n° PP00861.

#### Refrigeração do sêmen

Para a realização dos testes de refrigeração foi realizado um *pool* com as amostras que apresentaram motilidade superior a 80%, correspondente ao nível 5 da escala proposta por FAUVEL *et al.* (1999). Neste *pool*, foram homogeneizados volumes iguais de sêmen (400 µL) de cada macho selecionado e posteriormente distribuídos entre os tratamentos, estocados em tubos *ependorf* 1mL, com volume de 100 µL de sêmen para cada repetição. Testaram-se dois tratamentos: sêmen *in natura* e diluído com CF-HBSS. O diluïdor CF-HBSS (5.26 g L<sup>-1</sup> NaCl, 0.26 g L<sup>-1</sup> KCl, 0.33 g L<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub>, 0.04 g L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.04 g L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.13 g L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 0.66 g L<sup>-1</sup> glicose; 200 mOsMol kg<sup>-1</sup>) foi aplicado na proporção 1:3 (v:v) e cada tratamento foi realizado em triplicata. Após divisão do *pool* de sêmen nos tubos *ependorf*, estes foram mantidos a  $4\pm 2$ °C sem iluminação, manejados somente no momento das análises de ativação dos espermatozoides (tempo 0, 6, 12, 18, 24, 36, 48, 72 e 96h).

#### Análise da motilidade espermática

O sêmen foi ativado na proporção 1:10 (v:v) com água oceânica a 34 de salinidade e pH 8,7 a  $4\pm 2$ °C. O recipiente que continha a água utilizada como ativador espermático foi mantido por pelo menos 24h sob refrigeração a  $4\pm 2$ °C e transferido para um recipiente térmico com gelo (sem contato direto entre o gelo e o recipiente com o ativador espermático) para manutenção da temperatura durante o período de análises. Imediatamente após a ativação, um único avaliador procedeu a

análise em microscópio óptico (Leica LCC50HD) (200x) em um campo de visão escolhido aleatoriamente e intensidade de luz inalterada. O teste foi realizado em quadruplicata. O período de motilidade foi medido com cronômetro desde o momento de ativação até a parada total de todos os espermatozoides. Para determinar a porcentagem de células móveis utilizou-se escala graduada de 0 a 5, conforme sugerido por FAUVEL *et al.* (1999), na qual: 0 = espermatozoides imóveis; 1 = 0–20%; 2 = 20–40%; 3 = 40–60%; 4 = 60–80%; 5 = 80–100% de espermatozoides móveis.

### Concentração espermática

A concentração espermática foi avaliada por meio da contagem em microscópio óptico (Leica LCC50HD)(400x) das células espermáticas presentes nas amostras de sêmen, previamente diluído (1:1000) em solução tamponada de formol citrato a 4%, em câmara hematimétrica de Neubauer (1 mm<sup>3</sup>). Foram realizadas quatro contagens para cada pool de sêmen. Para determinação e comparação da concentração espermática, foi empregada a técnica de espermátocrito. O sêmen foi colocado em capilares de hematócrito, com uma das extremidades selada com plastilina, e submetido à centrifugação 18.000 g por 25 min, em uma centrífuga para capilares. A rotação e o tempo adequado de centrifugação foram determinados em testes prévios. A leitura da massa celular das amostras centrifugadas e do volume de plasma seminal foi realizada com régua graduada, sendo os valores obtidos expressos em porcentagem.

### Integridade da membrana plasmática

Amostras de sêmen foram avaliadas quanto à integridade da membrana plasmática do espermatozoide pelo método da eosina-nigrosina, realizada de acordo com MARIA *et al.* (2010). Para isso, o sêmen proveniente de cada repetição foi depositado na proporção 1:3 (sêmen:corante) em uma lâmina e realizou-se o esfregaço. Com tempo inferior a 60 s, foram fotografados 3 campos aleatórios de cada lâmina com câmera digital acoplada ao microscópio Leica LCC50HD (400x). As imagens obtidas foram analisadas com software Leica Application Suite LAS EZ, por meio da contagem de 500 células por lâmina, diferenciando-se pigmentadas e não pigmentadas. Os valores foram demonstrados em porcentagem de células vivas (não pigmentadas).

### Análise estatística

O teste Levene foi utilizado para verificar a homocedasticidade e o teste Shapiro Wilk para verificar a normalidade dos dados obtidos. Os valores em porcentagem foram transformados para arco-seno ( $y^{0,5}$ ) antes da análise estatística. Foi calculada correlação entre os resultados de integridade da membrana plasmática e porcentagem de motilidade espermática por análise de regressão linear ( $y=a+bx$ ). Todos os resultados foram submetidos a ANOVA simples ( $p<0,05$ ) com auxílio do software Statistica 7.0.

## RESULTADOS

Os oito machos selvagens de tainha (*M. liza*) apresentaram comprimento total de  $48,75\pm 2,05$  cm e peso de  $1250\pm 163$  g. Das amostras de sêmen coletadas, somente três apresentaram volume (400, 1500 e 500  $\mu\text{L}$ ) e qualidade de sêmen (porcentagem de células móveis  $>80\%$ ) adequados para a refrigeração. O *pool* avaliado *in natura* apresentou  $93\pm 12\%$  de porcentagem de células móveis,  $343\pm 6$  s de tempo de motilidade,  $76\pm 2\%$  de integridade da membrana plasmática,  $98\pm 1\%$  de espermátócrito e  $2,5\pm 1,5 \times 10^{10}$  cel.  $\text{mL}^{-1}$  de concentração espermática. Estes parâmetros foram considerados o tempo zero do experimento de refrigeração.

Durante o período de 96h os espermatozoides dos dois tratamentos apresentaram redução no tempo e porcentagem de motilidade e integridade da membrana plasmática. Nos tempos 6, 12 e 18h de refrigeração foi encontrada diferença significativa ( $p<0,05$ ) entre o tempo médio de motilidade dos espermatozoides submetidos aos tratamentos. Neste período foi verificado o aumento no tempo de motilidade dos espermatozoides diluídos com CF-HBSS, de  $343\pm 6$  s para  $415\pm 5$  s (cerca de 20% maior) após 18h (Figura 1A).

Foi encontrada diferença significativa ( $p<0,05$ ) na porcentagem de motilidade dos espermatozoides diluídos com CF-HBSS, a qual foi mais elevada que a do sêmen sem diluidor durante as 96h de refrigeração (aproximadamente 30% superior nos tempos 12, 18 e 24h) (Figura 1B). O tratamento com sêmen diluído também apresentou taxa superior (15-20%) de integridade da membrana plasmática durante os tempos de 6 a 48h ( $p<0,05$ ), igualando-se ao tratamento sem diluição após tal período (Figura 1C).

Os resultados de integridade da membrana plasmática espermática e porcentagem de células móveis avaliados durante as 96h apresentaram correlação positiva em ambos tratamentos, sendo  $R^2 =$

0,98 para sêmen diluído em CF-HBSS 1:3 e  $R^2 = 0,96$  para sêmen *in natura* (Figura 2).

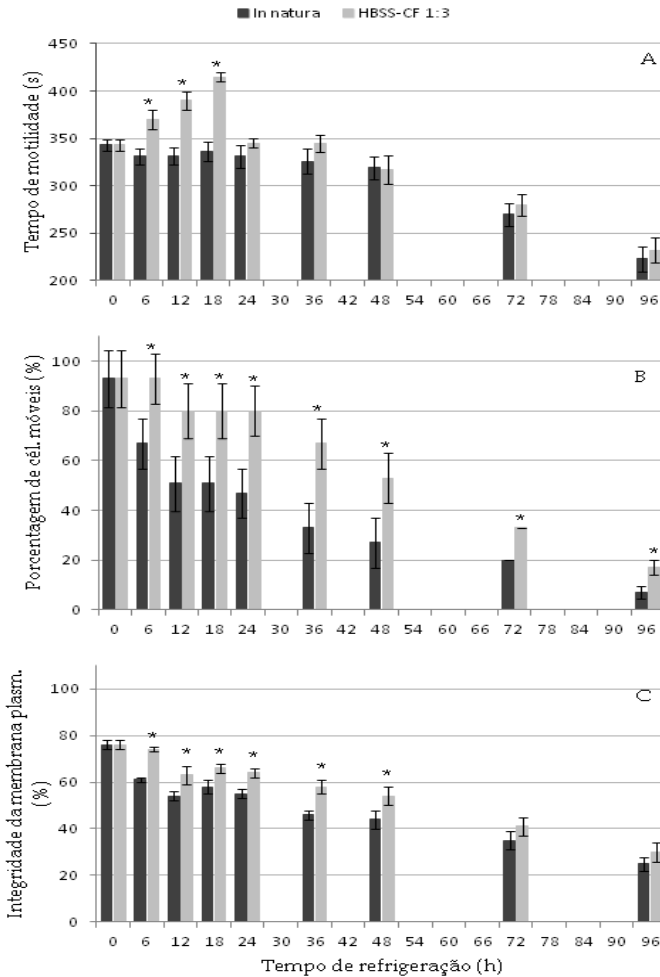


Figura 1. Tempo de motilidade (A), porcentagem de motilidade (B) e integridade da membrana plasmática (C) dos espermatozoides de tainha (*Mugil liza*) estocados durante 96h a  $4 \pm 2$  °C *in natura* e diluído 1:3 (v:v) com CF-HBSS. \* indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) verificado com ANOVA uma via.

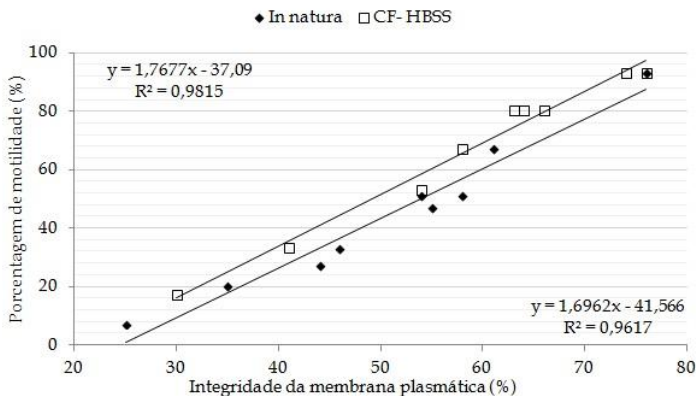


Figura 2. Correlação entre porcentagem de células móveis (%) e integridade da membrana plasmática (%) durante o período de 96h de refrigeração do sêmen da tainha *M. liza* *in natura* (◆) e diluído 1:3 com CF-HBSS (□).

## DISCUSSÃO

O pool de sêmen *in natura* apresentou  $93 \pm 12\%$  de motilidade e  $343 \pm 6$  s de tempo de motilidade espermática. Os valores foram próximos aos encontrados por OTSUBO (2010), que obteve  $99 \pm 2,1\%$  de ativação e  $458 \pm 12$  s de tempo de motilidade no sêmen *in natura* de *M. liza*. Qualidade e quantidade do sêmen obtido no experimento não foram influenciadas pelo método de coleta empregado.

A técnica de pressão abdominal e coleta por seringas empregada é de fácil execução e permite observar e descartar as amostras contaminadas com muco, fezes ou urina. O descarte é importante, uma vez que a contaminação das células espermáticas interfere negativamente nas características essenciais para o sucesso da fertilização natural ou induzida, na porcentagem e velocidade de espermatozoides móveis, e por consequência, no processo de armazenamento por resfriamento ou congelamento (SUQUET *et al.*, 2000).

As variações de qualidade no sêmen entre indivíduos de mesma espécie que influenciam taxas de motilidade espermática e fertilização já foram atribuídas a diferença de idade, fase do ciclo reprodutivo, fatores nutricionais e genéticos, entre outros (RANA, 1995; DREANNO *et al.*, 1999; SUQUET *et al.*, 2000; CABRITA *et al.*, 2014; VALDEBENITO *et al.*, 2015). No presente estudo, o sêmen foi proveniente de peixes selvagens durante o período de migração reprodutiva. Ao encontro das diferenças observadas pelos autores supracitados, a possibilidade de os

animais coletados estarem em fases distintas de maturação gonadal justificaria a alta ativação espermática (>80%) observada em apenas três machos.

O sêmen da tainha tem como característica a elevada viscosidade, com porção reduzida de plasma, conforme observado na elevada taxa de espermatócrito apresentada pelo pool de sêmen utilizado ( $98\pm 1\%$ ). A elevada viscosidade do sêmen e reduzida parcela de plasma seminal (15-25%) também foi observada em outras espécies de peixes marinhos, como: *Mugil cephalus* (CHAO *et al.*, 1975); *Pleuronectes americanus* (HARMIN *et al.*, 1995); *Hippoglossus hippoglossus* (TVEDT *et al.*, 2001); *Lutjanus synagris* (SANCHES e CERQUEIRA, 2010; SANCHES *et al.*, 2015); *Lutjanus analis* (SANCHES e CERQUEIRA, 2011; SANCHES *et al.*, 2013). Porém a taxa de somente 2% de plasma seminal, além da captura de machos com reduzida espermiacão após massagem abdominal, podem indicar que os peixes ainda não estavam com as gônadas maduras, necessitando de tempo ou distância maior de migração para a aptidão à desova. O local de captura, Florianópolis – Santa Catarina (27°S), situa-se no meio do trajeto migratório das tainhas, a pelo menos 350 km ao sul das áreas de pico de desova, identificadas em regiões oceânicas no nordeste de Santa Catarina, e do Paraná (26° S) (LEMOS *et al.*, 2014) até São Paulo (24° S) (VIEIRA, 1991).

Ademais, o aumento do volume do plasma seminal durante o período reprodutivo já foi verificado no linguado, *Paralichthys orbignyanus* (LANES *et al.*, 2010). Mudanças em outros parâmetros de qualidade de sêmen durante o período reprodutivo também foram observados em *Psetta maxima* (SUQUET *et al.*, 1998); *Dicentrarchus labrax* (DREANNO *et al.*, 1999; FAUVEL *et al.*, 1999); *Pagrus pagrus* (MYLONAS *et al.*, 2003) e *Solea senegalensis* (CABRITA *et al.*, 2006). Porém não é possível identificar um padrão definido nestas variações dos parâmetros seminais, demonstrando que está característica é espécie-específica (LANES *et al.*, 2010).

O plasma seminal apresenta uma composição bioquímica única que propicia a normalidade das funções dos espermatozoides (CIERESZKO, 2008). Alguns componentes orgânicos (mono e polissacarídeos, proteínas, triglicerídeos, fosfolípidios) e inorgânicos ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{+2}$ ,  $Cl^-$ ,  $Mg^{+2}$ ) do plasma seminal afetam a motilidade dos espermatozoides antes de serem liberados ao meio ambiente (LAHNSTEINER *et al.*, 1993; LAHNSTEINER *et al.*, 2004; ALAVI e COSSON, 2006; HAJIREZAEI *et al.*, 2010). Estes componentes são essenciais pois podem afetar a maturação final dos gametas

(LAHNSTEINER *et al.*, 1998), e portanto devem ser considerados na elaboração de meios de diluição e de ativação espermiática (VALDEBENITO *et al.*, 2009; FIGUEROA *et al.*, 2016). Neste sentido, a medição dos componentes orgânicos e inorgânicos no plasma seminal de peixes selvagens e a determinação das relações fisiológicas com a motilidade dos espermatozoides podem ser utilizadas como biomarcadores de qualidade. Tais estudos incrementam o desenvolvimento de técnicas de fecundação artificial de peixes, formulação de diluentes para criopreservação e armazenamento a curto prazo dos espermatozoides (VALDEBENITO *et al.*, 2009).

Mesmo sem a adição de um diluidor espermiático, os espermatozoides da tainha apresentaram motilidade e integridade da membrana plasmática durante as 96h testadas, apresentando perdas mínimas de desempenho no período de 24h (Figura 1). Este é um resultado incomum no processo de refrigeração *in natura*, que apresenta em geral pouco sucesso e perda da qualidade seminal em poucas horas (SANCHES e CERQUEIRA, 2010). A rápida perda de qualidade seminal foi verificada na refrigeração de: robalo-flecha, *Centropomus undecimalis* (TIERSCH *et al.*, 2004); *Lutjanus synagris* (SANCHES e CERQUEIRA, 2010) e *Lutjanus analis* (SANCHES e CERQUEIRA, 2011) que apresentam total imobilidade dos espermatozoides em apenas 24h de refrigeração; *Latris lineata* (RITAR e CAMPET, 2000) e para *Anguilla anguilla* (PEÑARANDA *et al.*, 2010) com perda da total da motilidade após 48h de refrigeração.

Para o sêmen diluído foi verificado: aumento no tempo de motilidade nas primeiras 18h; melhor integridade da membrana plasmática durante as primeiras 48h de refrigeração; e melhor taxa de ativação durante as 96h. Este tratamento apresentou perdas mínimas de qualidade de sêmen durante 48h de refrigeração. A ampliação do tempo de motilidade durante a refrigeração do sêmen também foi verificada para *Scophthalmus maximus* (CHEREGUINI *et al.*, 1997), *L. synagris* (SANCHES e CERQUEIRA, 2010) e *L. analis* (SANCHES e CERQUEIRA, 2011). Os diluentes apresentam como principal função manter a imobilidade espermiática, sendo desenvolvidos para que, durante os procedimentos de refrigeração as trocas osmóticas das células possam ser continuamente restabelecidas, corrigindo os sucessivos desequilíbrios nas concentrações iônicas dos solutos, que acompanham as mudanças de temperaturas (GWO, 2011). Segundo BEZERRA (2010), um bom diluente se caracteriza pela osmolalidade adequada à espécie, valor de pH e poder tampão eficazes, além de uma composição iônica que favoreça a sobrevivência espermiática. Estudos recentes

(WILSON-LEEDY *et al.*, 2009; ALAVI *et al.*, 2010) mostraram a importância da osmolalidade e da composição iônica do diluente na preservação da qualidade espermática.

A pequena quantidade de plasma seminal encontrada no sêmen dos machos utilizados neste experimento pode ter potencializado os benefícios do diluidor espermático, o qual pode ter contribuído significativamente para o equilíbrio iônico da solução e para suprir a necessidade de nutrientes dos espermatozoides. Entretanto, para definir com precisão qual o tempo máximo de estocagem do sêmen sob refrigeração, são necessários estudos que avaliem a capacidade de fertilização dos ovócitos, atividade fim deste procedimento.

A proporção de sêmen:diluente normalmente testada para a refrigeração e a crioconservação de sêmen varia entre 1:1 a 1:20, com resultados positivos para proporções próximas a 1:3 (MCANDREW *et al.*, 1993; SUQUET *et al.*, 2000; MAGNOTTI *et al.*, 2016), sendo assim adotada para o tratamento com diluidor. A utilização do HBSS formulado com osmolalidade entre 200 e 300 mOsMol kg<sup>-1</sup> tem obtido sucesso para a refrigeração e crioconservação de muitas espécies marinhas (WAYMAN e TIERSCH, 2000). O seu uso também gerou bons resultados na refrigeração do sêmen de *C. undecimalis* (TIERSCH *et al.*, 2004), *Lutjanus campechanus* e *Lutjanus griseus* (RILEY *et al.*, 2008), na crioconservação do sêmen de *Lutjanus campechanus* (RILEY *et al.*, 2004), *Hippoglossus hippoglossus* (DING *et al.*, 2011), e mais recentemente para vitrificação do sêmen de *Cynoscion nebulosus*, e *Sciaenops ocellatus* (CUEVAS-URIBE *et al.*, 2015).

Apesar dos resultados positivos com o uso do CF-HBSS e da proporção de 1:3 (v:v), é recomendado executar testes com outras formulações de diluidores e outras proporções sêmen:diluidor. PEÑARANDA *et al.* (2010) obtiveram resultados positivos com diluições de 1:50 e 1:100 (sêmen: diluidor), durante a refrigeração do sêmen de *Anguilla anguilla*. O mesmo foi verificado para outras espécies (OHTA e IZAWA, 1996; TAN-FERMIN *et al.*, 1999; OHTA *et al.*, 2001) e deve ser considerado para estudos futuros. Peixes marinhos apresentam como característica a liberação de pouco volume de sêmen, com elevada concentração espermática e viscosidade. Por isso, seu armazenamento utilizando-se diluições maiores favorece o planejamento da fertilização e otimização do material biológico. Também deve ser testada a adição de outras substâncias ao diluidor, como: antioxidantes, aminoácidos, ácidos orgânicos, crioprotetores e outros, que podem melhorar o tempo de estocagem e o desempenho dos espermatozoides, conforme descrito por MAGNOTTI *et al.* (2016).



## CONCLUSÃO

O procedimento de refrigeração do sêmen *in natura* da tainha *M. liza* a 4°C apresentou motilidade durante 96h, com pouca redução na qualidade de sêmen até 24h. A utilização do CF-HBSS na proporção de 1:3 de sêmen:diluidor proporcionou melhor desempenho dos espermatozoides por 96h, com elevação de até 20% no tempo de motilidade após 18h e manutenção de suas características de qualidade por 48h.

## AGRADECIMENTOS

À toda equipe do LAPMAR – UFSC, à comunidade de pescadores artesanais de Florianópolis pelo suporte à realização do trabalho e à CAPES projeto n° 23038.004323/2014-54 pelo apoio financeiro nos itens de custeio.

## REFERÊNCIAS

- ALAVI, S.M.H. COSSON, J. (2006) Sperm motility in fishes II. Effects of ions and osmolality: a review. *Cell Biology International*, 30: 1-14.
- ALAVI, S.M.H.; JORFI, E.; HATEF, A. MORTEZAVI, S.A.S. (2010) Sperm motility and seminal plasma characteristics in *Barbus sharpeyi* (Günther, 1874). *Aquaculture Research*, 112: 1-7.
- BEZERRA, F.J.B. (2010) Conservação do sêmen caprino sob refrigeração ou congelação. *Acta Veterinária Brasileira*, 4: 20-25.
- CABRITA, E.; SOARES, F. DINIS, M.T. (2006) Characterization of Senegalese sole, *Solea senegalensis*, male broodstock in terms of sperm production and quality. *Aquaculture*, 261: 967-975.
- CABRITA, E.; MARTINEZ-PARAMO, S.; GAVAIÁ, P.J.; RIESCO, M.F.; VALCARCE, D.G.; SARASQUETE, C.; HERRAEZ, M.P. ROBLES, V. (2014) Factors enhancing fish sperm quality and emerging tools for sperm analysis. *Aquaculture*, 432: 389-401.
- CERQUEIRA, V.R. (2004) Cultivo de peixes marinhos. In: (ed. by POLI, C.R.; POLI, A.T.; ANDREATA, E.R. BELTRAME, E.) *Aquicultura experiências brasileiras*. UFSC, Florianópolis.
- CHAO, N.H.; CHEN, H.P. LIAO, I.C. (1975) Study on Cryogenic Preservation of Grey Mullet Sperm. *Aquaculture*, 5(4): 389-406.
- CHEREGUINI, O.; CAL, R.; DREANNO, C.; BAULNY, B.; SUQUET, M. MAISSE, G. (1997) Short-term storage and

cryopreservation of turbot (*Scophthalmus maximus*) sperm. *Aquatic Living Resources*, 10: 251-255.

CIERESZKO, A. (2008) Chemical composition of seminal plasma and its physiological relationship with sperm motility, fertilizing and cryopreservation success in fish. In: (ed. by ALAVI, S.M.H.; COSSON, J.; COWARD, K. RAFIEE, R.) Fish spermatology. Alpha Science, Oxford, pp. 215-240.

CUEVAS-URIBE, R.; CHESNEY, E.J.; DALY, J. TIERSCH, T.R. (2015) Vitrification of sperm from marine fish: effect on motility and membrane integrity. *Aquaculture Research*, 46(7): 1770-1784.

DING, F.; LALL, S.P.; LI, J.; LEI, J.; ROMMENS, M. MILLEY, J.E. (2011) Cryopreservation of sperm from Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*, L.) for commercial application. *Cryobiology*, 63(1): 56-60.

DREANNO, C.; SUQUET, M.; FAUVEL, C.; LE COZ, J.R.; DORANGE, G.; QUEMENER, L. BILLARD, R. (1999) Effect of the aging process on the quality of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) semen. *Journal of Applied Ichthyology-Zeitschrift Fur Angewandte Ichthyologie*, 15(6): 176-180.

EIRAS-STOFELLA, D.R. GREMSKI, W. (1991) Ultrastructural analysis of the mullet *Mugil liza* and *Mugil platanus* (Teleostei, Mugilidae) spermatozoa. *Microscopia Electronica y Biologia Celular*, 15(2): 173-178.

FAUVEL, C.; SAVOYE, O.; DREANNO, C.; COSSON, J. SUQUET, M. (1999) Characteristics of sperm of captive seabass in relation to its fertilization potential. *Journal of Fish Biology*, 54(2): 356-369.

FIGUEROA, E.; VALDEBENITO, I. FARIAS, J. (2016) Technologies used in the study of sperm function in cryopreserved fish spermatozoa. *Aquaculture Research*, 47: 1691-1705.

GWO, J. (2011) Cryopreservation of sperm of some marine fishes. In: (ed. by TIERSCH, T.R. GREEN, C.) Cryopreservation in Aquatic Species, 2nd Edition. World Aquaculture Society, Louisiana, pp. 459-481.

HAJIREZAEI, S.; MOJAZI, B. MIRVAGHEFI, A.R. (2010) Relationships between the chemical properties of seminal fluid and the sperm motility characteristics of Caspian brown trout, *Salmo trutta*

caspius (a critically endangered salmonid fish). *Research Journal of Fisheries and Hydrobiology*, 5: 27-31.

HARMIN, S.A.; CRIM, L. WIEGAND, M. (1995) Plasma sex steroid profiles and the seasonal reproductive cycle in male and female winter flounder, *Pleuronectes americanus*. *Marine Biology*, 121: 601-610.

IBAMA (2007) Relatório de reunião Técnica para ordenamento da pesca da tainha (*Mugil platanus*, *M. liza*) na região Sudeste/Sul do Brasil. (ed IBAMA). Instituto brasileiro do meio ambiente e dos recursos naturais renováveis, Itajaí pp. 85.

LAHNSTEINER, F.; PATZNER, R. A. WEISMANN, T. (1993) Energy resources of spermatozoa of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Pisces, Teleostei). *Reproduction Nutrition Development*, 33(4): 349-360.

LAHNSTEINER, F.; BERGER, B.; WEISMANN, T. PATZNER, R.A. (1998) Determination os semen quality of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by sperm motility, seminal plasma parameters, and spermatozoal metabolism. *Aquaculture*, 163(1-2): 163-181.

LAHNSTEINER, F.; MANSOUR, N. BERGER, B. (2004) Seminal plasma proteins prolong the viability of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Theriogenology*, 62(5): 801-808.

LANES, C.F.C.; OKAMOTO, M.H.; BIANCHINI, A.; MARINS, L.F. SAMPAIO, L.A. (2010) Sperm quality of Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* throughout the reproductive season. *Aquaculture Research*, 41(9): e199-e207.

LEMOS, V.M.; VARELA, A.S.; SCHWINGEL, P.R.; MUELBERT, J.H. VIEIRA, J.P. (2014) Migration and reproductive biology of *Mugil liza* (Teleostei: Mugilidae) in south Brazil. *Journal of Fish Biology*, 85(3): 671-687.

MAGNOTTI, C.; CERQUEIRA, V.R.; LEE-ESTEVEZ, M.; FARIAS, J.; VALDEBENITO, I. FIGUEROA, E. (2016) Cryopreservation and vitrification of fish semen: a review with special emphasis on marine species. *Reviews in Aquaculture*:

MARIA, A.N.; AZEVEDO, H.C.; SANTOS, J.P.; SILVA, C.A. CARNEIRO, P.C.F. (2010) Semen characterization and sperm structure of the Amazon tambaqui *Colossoma macropomum*. *Journal of Applied Ichthyology*, 26(5): 779-783.

MCANDREW, B.J.; RANA, K. PENMAN, D.J. (1993) Conservation and preservation of genetic variation in aquatic organism. In: (ed. by MUIR, J.F. ROBERTS, R.J.) Recent advances in aquaculture. Blackwell, Oxford, pp. 295-336.

MIRANDA-FILHO, K.C.; TESSER, M.B.; SAMPAIO, L.A. GODINHO, H.M. (2010) Tainha. In: (ed. by BALDISSEROTTO, B. GOMES, L.C.) Espécies nativas para a piscicultura no Brasil. UFSM, Santa Maria, pp. 541-552.

MORISAWA, M. SUZUKI, K. (1980) Osmolality and potassium ion: their roles in initiation of sperm motility in teleost. *Science*, 210: 1145-1147.

MPA (2011) Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura. (ed MPA). Ministério da pesca e aquicultura, Brasília pp. 60.

MPA; MMA (2015) Plano de gestão para o uso sustentável da tainha, *Mugil liza* Valenciennes, 1836, no sudeste e sul do Brasil. (eds MPA MMA), Brasília pp. 238.

MYLONAS, C.C.; PAPADAKI, M. DIVANACH, P. (2003) Seasonal changes in sperm production and quality in the red porgy *Pagrus pagrus* (L.). *Aquaculture Research*, 34: 1161-1170.

NETO, J.C.F. SPACH, H.L. (1998) Sobrevivência de juvenis de *Mugil platanus* Günther, 1880 (Pisces, Mugilidae) em diferentes salinidades. *Boletim Do Instituto De Pesca*, 26: 13-17.

OHTA, H. IZAWA, T. (1996) Diluent for cool storage of the Japanese eel (*Anguilla japonica*) spermatozoa. *Aquaculture*, 142: 107-118.

OHTA, H.; UNUMA, T.; TSUJI, M.; YOSHIOKA, M. KASHIWAGI, M. (2001) Control by the environmental concentration of ions of the potential for motility in Japanese eel spermatozoa. *Aquaculture*, 198: 339-351.

OTSUBO, R.I. 2010. Inseminação artificial da tainha *Mugil Liza* com a utilização de sêmen fresco e criopreservado. 68 (Mestrado). Programa de Pós graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca, Instituto de Pesca, São Paulo. Disponível em: < ftp.sp.gov.br/ftppesca/DissertaRicardoIgiOtsubo.pdf >.

PEÑARANDA, D.S.; PEREZ, L.; GALLEGOS, V.; BARRERA, R.; JOVER, M. ASTURIANO, J.F. (2010) European eel sperm diluent for short-term storage. *Reproduction in Domestic Animals*, 45: 407-415.

- RANA, K. (1995) Preservation of gametes. In: (ed. by BROMAGE, N.R. ROBERTS, R.J.) Broodstock management and egg and larval quality. Cambridge University, Cambridge.
- RILEY, K.L.; HOLLADAY, C.G.; CHESNEY, E.J. TIERSCH, T.R. (2004) Cryopreservation of sperm of red snapper (*Lutjanus campechanus*). *Aquaculture*, 238(1-4): 183-194.
- RILEY, K.L.; CHESNEY, E.J. TIERSCH, T.R. (2008) Field collection, handling, and refrigerated storage of sperm of red snapper and gray snapper. *North American Journal of Aquaculture*, 70(3): 356-364.
- RITAR, A.J.; CAMPET, M. (2000) Sperm survival during short-term storage and after cryopreservation of semen from striped trupeter (*Latris lineata*). *Theriogenology*, 54(1): 467-480.
- RURANGWA, E.; KIME, D.E.; OLLEVIER, F. NASH, J.P. (2004) The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture*, 234(1-4): 1-28.
- SANCHES, E.G. CERQUEIRA, V.R. (2010) Refrigerated Storage of Lane Snapper *Lutjanus Synagris* Sperm. *Boletim Do Instituto De Pesca*, 36(4): 293-305.
- SANCHES, E.G. CERQUEIRA, V.R. (2011) Preservation of refrigerated sperm of the mutton snapper with diluents and modified atmosphere. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 46(12): 1673-1680.
- SANCHES, E.G.; OLIVEIRA, I.R.; SERRALHEIRO, P.C.S. CERQUEIRA, V.R. (2013) Cryopreservation of mutton snapper (*Lutjanus analis*) sperm. *Anais Da Academia Brasileira De Ciencias*, 85(3): 1083-1091.
- SANCHES, E.G.; OLIVEIRA, I.R.; SERRALHEIRO, P.C.D.S. CERQUEIRA, V.R. (2015) Sperm cryopreservation of lane snapper *Lutjanus synagris* (Linnaeus, 1758). *Brazilian Journal of Biology*, 75(3): 662-669.
- SERRALHEIRO, P.C.S.; FOGLI DA SILVEIRA, W.; KAVAMOTO, E.T.; GODINHO, H.M. FERRAZ, E. (1992) Criopreservação do sêmen da tainha *Mugil platanus* em “macro-paillets”. In: Reunião anual do Instituto de Pesca, São Paulo pp. 59.
- SERRALHEIRO, P.C.S.; FOGLI DA SILVEIRA, W.; GODINHO, H.M. OLIVEIRA, I.R. (1999) O uso de três soluções diluidoras em sêmen de tainha – *Mugil platanus*, Gunther, 1880, resfriado em

container de vapor de nitrogênio líquido. In: Encontro Brasileiro de Ictiologia, Sao Carlos pp. 508.

STOSS, J. (1983) Fish gamete preservation and spermatozoan physiology. In: (ed. by HOAR, W.S.; RANDALL, D.J. DONALDSON, E.M.) Fish physiology. Academic Press, New York, pp. 305-350.

SUQUET, M.; DREANNO, C.; DORANGE, G.; NORMANT, Y.; QUEMENER, L.; GAIGNON, J.L. BILLARD, R. (1998) The ageing phenomenon of turbot spermatozoa: effects on morphology, motility and concentration, intracellular ATP content, fertilization, and storage capacities. *Journal of Fish Biology*, 52(1): 31-41.

SUQUET, M.; DREANNO, C.; FAUVEL, C.; COSSON, J. BILLARD, R. (2000) Cryopreservation of sperm in marine fish. *Aquaculture Research*, 31(3): 231-243.

TAN-FERMIN, J.D.; MIURA, T.; ADACHI, S. YAMAUCHI, K. (1999) Seminal plasma composition, sperm motility, and milt dilution in the Asian catfish *Clarias macrocephalus* (Gunther). *Aquaculture*, 171: 323-338.

TIERSCH, T.R.; WAYMAN, W.R.; SKAPURA, D.P. NEIDIG, C.L. (2004) Transport and cryopreservation of sperm of the common snook, *Centropomus undecimalis* (Bloch). *Aquaculture Research*, 35: 278-288.

TVEDT, H.; BENFEY, T.; MARTIN-ROBICHAUD, D. POWER, J. (2001) The relationship between sperm density, spermatocrit, sperm motility and fertilization success in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*. *Aquaculture*, 194: 191-200.

UBILLA, A. VALDEBENITO, I. (2011) Use of antioxidants in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) sperm diluents: effects on motility and fertilizing capability. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 39: 236-249.

UBILLA, A.; FORNARI, D.; FIGUEROA, E.; EFFER, B. VALDEBENITO, I. (2015) Short-term cold storage of the semen of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) incorporating DMSO in the sperm diluent. Effects on motility and fertilizing capacity. *Aquaculture Research*, 46(S1): 37-44.

VALDEBENITO, I.; FLETCHER, C.; VERA, V. FERNANDEZ, J. (2009) Factores fisicoquímicos que regulan la motilidad espermática en

peces: aspectos básicos y aplicados. Una revisión. *Archivos De Medicina Veterinaria*, 47: 97-106.

VALDEBENITO, I.; GALLEGOS, P.C. EFFER, B.R. (2015) Gamete quality in fish: evaluation parameters and determining factors. *Zygote*, 23(2): 177-197.

VIEIRA, J.P. (1991) Juvenile mullets (Pisces: Mugilidae) in the estuary of Lagoa dos Patos, RS Brazil. *Copeia*, 2: 409-418.

VIVEIROS, A.T.M.; ORFÃO, L.H.; NASCIMENTO, A.F.; CORREA, F.M. CANEPPELE, D. (2012) Effects of extenders, cryoprotectants and freezing methods on sperm quality of the threatened Brazilian freshwater fish pirapitinga-do-sul *Brycon opalinus* (Characiformes). *Theriogenology*, 78: 361-368.

WAYMAN, W.R. TIERSCH, T.R. (2000) Research methods for cryopreservation of sperm. In: (ed. by TIERSCH, T.R. MAZIK, P.M.) *Cryopreservation in Aquatic Species*. World Aquaculture Society, Louisiana, pp. 264-275.

WILSON-LEEDY, J.G.; KANUNGA, M.K. INGERMANN, R.L. (2009) Influence of osmolality and ions on the activation and characteristics of zebrafish sperm motility. *Theriogenology*, 71(7): 1054-1062.

## 10. CONCLUSÃO GERAL

- a) Os componentes ambientais que podem modular a motilidade dos espermatozoides de tainha incluem salinidade e pH.
- b) O intervalo entre 34,6 a 34,8 de salinidade e pH 8.5 a 8.7 são ideais para a ativação dos espermatozoides de *Mugil liza*.
- c) A idade dos peixes e as características individuais podem gerar diferenças na morfometria e na ativação dos espermatozoides.
- d) O sêmen de tainha mantém a motilidade e a integridade da membrana plasmática sob refrigeração a 4°C durante 96 h, com pouca perda de qualidade de sêmen até 24h.
- d) A utilização do HBSS-CF na proporção de 1:3 de sêmen:diluidor melhorou o desempenho dos espermatozoides em todos os parâmetros analisados durante a refrigeração a  $4 \pm 2$  °C, demonstrando ser uma boa alternativa para a conservação do sêmen de *M. liza*.



## 11. REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO

ALBIERI, R.J.;ARAÚJO, F.G. Reproductive biology of the mullet *Mugil Liza* (Teleostei:Mugilidae) in a tropical Brazilian bay, *Zoologia* 27(3): 331-340, 2010.

Alvarez B *et al.* (2008) Use of post-thaw silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) spermatozoa to increase hatchery productions. In: Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species. Biology Series. E. Cabrita *et al.*(Eds), CRCPress (Taylor and Francis group), pp. 345–350.

ALVAREZLAJONCHERE L. *et al.*. Positive Results of Induced Spawning and Larval Rearing Experiments with *Mugil Liza* Val, a Grey Mullet from Cuban Waters. *Aquaculture* 73, 349-355, 1988.

ANDRADE-TALMELLI, E.F *et al.*. Característica reprodutivas de tainha *Mugil platanus* (Teleostei, Perciformes, Mugilidae), da região estuarino lagunar de Cananéia, São Paulo, *Revista Ceres*, 43(246): 165-185, 1996.

ANDREATT A E.R.; ROCHA, I.P.; RODRIGUES, J.B. Ensaio sobre desova induzida de tainha, *Mugil brasiliensis* Spix et Agassiz (1931). In: *Congresso Brasileiro de Engenharia de Pesca*, 2, Recife pp. 463-468, 1981.

ANDREATT A, E.R.; SILVA, I.D.; BELTRAME, E. Consideração sobre a incubação de ovos e o cultivo de larvas de tainha, *Mugil liza*, em laboratório. In: *Congresso Brasileiro de Engenharia de Pesca*, 3, 1983, Manaus: AEP-AM, p. 163-174, 1983.

ANGHEL, A. *et al.* The effects of antioxidants on the cytological parameters of cryopreserved buck semen. *Romanian Biotechnological Letters* 15 (3); 26-32, 2010.

BAKHACH, J. The cryopreservation of composite tissues: principles and recent advancement on cryopreservation of different type of tissues. *Organogenesis* 5 (3): 119-126, 2009.

BENETTI D.D.; FAGUNDES NETTO, E.B. Considerações sobre desova e alevinagem da tainha (*Mugil liza* Valenciennes, 1836). *Instituto de Pesquisas da Marinha* 135, 26, 1980.

BENETTI D.D.; FAGUNDES NETTO, E.B. Desova, larvicultura e criação de tainhas. In: *Manual de Maricultura*. Ministério da Marinha - Instituto de Pesquisas da Marinha, Rio de Janeiro, pp. 57, 1983.

BILLARD R; ZHANG T. Technique of genetic resources banking fish. In: Watson PF, Holt WV (eds.) *Cryobanking the Genetic resource: Wildlife Conservation for the Future*, pp. 143-170. Taylor & Francis, London. 2001.

BORGES, A. *et al.*. Biochemical composition of seminal plasma and annual variations in semen characteristics of jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, Pimelodidae). *Fish Physiology and Biochemistry*, 31: 45-53, 2005.

BOZKURT Y, *et al.* Effects of seminal plasma composition on sperm motility in mirror carp (*Cyprinus carpio*). *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh* 61: 307–314, 2009.

CABRITA, E. *et al.* Sublethal damage during cryopreservation of rainbow trout sperm. *Cryobiology* 37, 245–253, 1998.

CABRITA, E. *et al.* Evaluation of gilthead sea bream, *Sparus aurata*, sperm quality after cryopreservation in 5 mL macrotubes. *Cryobiology* 50 (3): 273-284, 2005.

CABRITA, E. *et al.* Successful cryopreservation of sperm from sex-reversed dusky grouper, *Epinephelus marginatus*. *Aquaculture*, 287: 152-157. 2009.

CABRITA, E. *et al.* Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. *Journal of Applied Ichthyology* 26: 623-635, 2010.

CABRITA, E. *et al.* Factors enhancing fish sperm quality and emerging tools for sperm analysis. *Aquaculture*, 432: 389-401. 2014.

CAROLSFELD, J. *et al.* Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. *Journal of Fish Biology*, 63: 472-481, 2003.

CASTRO, J.J.P. *et al.* Refrigeração do sêmen de pescada amarela, *Cynoscion acoupa*. In: XIX Congresso Brasileiro de Engenharia de Pesca, 2014, São Luis. Trabalhos Científicos, 2014a. P. 603-607.

CASTRO, J.J.; TEIXEIRA, E.G. Resfriamento do sêmen de pescada amarela (*Cynoscion acoupa*). In: *XXVI Seminário de iniciação científica, pesquisa e inovação integradas ao conhecimento acadêmico*, 2014, São Luis. Livros de Resumos. São Luis: UEMA, 2014b. p. 728-730.

CAVALLI, R.O.; HAMILTON, S. Piscicultura marinha no Brasil com ênfase na produção do beijupirá. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.6, p.64-69, 2009.

CAVALLI, R.; DOMINGUES, E.; HAMILTON, S. Development of open ocean marine fish farming in Brazil: possibilities and constraints. *R. Bras. Zootec*, 40: 155-164, 2011.

CERQUEIRA V.R. Cultivo de peixes marinhos. In: *Aquicultura experiências brasileiras* (ed. by Poli, C.R., Poli, A.T., Andreatta, E.R., Beltrame, E.). Editora UFSC, Florianópolis/SC p.369-406, 2004.

CIERESZKO A; DABROWSKI K. Sperm quality and ascorbic acid concentration in rainbow trout semen are affected by dietary vitamin C: an across-season study. *Biology of Reproduction* 52: 982-988, 1995.

COSSON, J. 2004. The Ionic and Osmotic Factors Controlling Motility of Fish Spermatozoa. *Aquaculture International*, 12 (1), 69-85.

COSSON, J. *et al.* Marine fish spermatozoa: racing ephemeral swimmers. *Reproduction*, 136(3): 277-294, 2008.

COSSON, J. Frenetic activation of fish spermatozoa flagella entails short term motility, portending their precocious decadence. *Journal of Fish Biology* 76, 240– 279, 2010.

COSTA FILHO, J.; FABREGAT, T.; ROSA, C. A review of major aspects of snook breeding. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, 12 (3): 317-325, 2013.

CAYLOR, R.E.; BIESIOT, P.M.; FRANKS; J.S. Culture of cobia (*Rachycentron canadum*): cryopreservation of sperm and induced spawning. *Aquaculture*, Amsterdam, 125(1-2): 81-92, 1994.

CUEVAS-URIBE, R; TIERSCH, T.R. Non-Equilibrium vitrification: an introduction and review of studies done in fish. In: TIERSCH TR; GREEN CC (eds.) *Cryopreservation in Aquatic Species*, 2nd Edition.

pp. 309-324. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, 2011.

CUEVAS-URIBE, R. *et al.* Vitrification of sperm from marine fish: effect on motility and membrane integrity. *Aquaculture Research*. doi: 10.1111/are.12337, 2013.

CHAO, N.H. *et al.* Experiment on cryogenic preservation of grey mullet sperm – I. Study on the biological characteristics and effect of protectants. *Taiwan. J. Fish. Soc.* 2(1): 31-41, 1973.

CHAO, N.H. *et al.* Experiment on cryogenic preservation of grey mullet sperm – II Effect of dilution and cryoprotective agents on prefreeze motility and fertility of mullet spermatozoa. *Taiwan. J. Fish. Soc.* 3(1):1-9, 1974.

CHAO, N.H.; CHEN, H.P.; LIAO, I.C. Study on cryogenic preservation of grey mullet sperm. *Amsterdam. Aquaculture*, 5: 389-406, 1975.

DE CARVALHO, C. *et al.* Produção de juvenis de tainha *Mugil liza* no Estado de Santa Catarina. In: Simpósio Internacional de Carcinicultura, Simpósio Internacional de Aquicultura. Natal, RN: Associação Brasileira de Criadores de camarões, p. 14. 2014.

DREANNO, C. *et al.* Effect of the aging process on the quality of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) semen. *Journal of Applied Ichthyology-Zeitschrift Fur Angewandte Ichthyologie* 15, 176-180, 1999.

DURAND, J.D. *et al.* Systematic of the grey mullets (Teleostei: Mugiliformes: Mugilidae): molecular phylogenetic evidence challenges two centuries of morphology-based taxonomy. *Mol. Phylogenet. Evol.* 64(1): 79-92, 2012.

DZIEWULSKA, K.; RZEMIENIECKI, A.; DOMAGAŁA, J. Motility and energetic status of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) sperm after refrigerated storage. *Journal of Applied Ichthyology* 26: 668–673, 2010.

EIRAS-STOFELLA, D. R.; GREMSKI, W. Ultrastructural analysis of the mullet *Mugil liza* and *Mugil platanus* (Teleostei, Mugilidae) spermatozoa. *Microsc. Electron. Biol. Celular* 15, 173–178, 1991.

- EIRAS-STOFELLA, D. R.; GREMSKI, W.; KULIGOWSKI, S. M. The ultrastructure of the mullet *Mugil curema* Valenciennes (Teleostei, Mugilidae) spermatozoa. *Rev. Brasil. Zool.* 10, 618–619, 1993.
- FAO. *The state of world fisheries and aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all.* Rome. 200pp. 2016.
- FAUVEL, C.; SUQUET, M.; COSSON, J. Evaluation of fish quality. *Journal of Applied Ichthyology*, 26(5): 636-643, 2010.
- FIGUEROA E, *et al.* Spermatozoa vitrification of sex-reversed rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*): Effect of seminal plasma on physiological parameters. *Aquaculture* 372 (5): 119-126, 2013.
- FIGUEROA E; VALDEBENITO I; FARIAS J. Technologies used in the study of sperm function in cryopreserved fish spermatozoa. *Aquaculture Research*. 2014. doi:10.1111/are.12630
- FIGUEROA. E. *et al.* Effect of seminal plasma on Atlantic salmon (*Salmo salar*) sperm vitrification. *Theriogenology* 83: 238-245, 2015.
- FIGUEROA, E.; VALDEBENITO, I.; FARIAS, J. Technologies used in the study of sperm function in cryopreserved fish spermatozoa. *Aquaculture Research* 47(6), 1697-1705, 2016.
- FRAGA, E. *et al.* Molecular phylogenetic analyses of mullets (Mugilidae, Mugiliformes) based on two mitochondrial genes. *J. Appl. Ichthyol.* 23, 598-604, 2007.
- FROESE, R.; D. PAULY. FishBase. 2008. Disponível online em: <http://www.fishbase.org>. [Accessed: 01/IX/2008]
- GAITÁN-ESPITIA, JD. *et al.* Cryogenic preservation of sperm from lane snapper (*Lutjanus synagris*): Testing the effects of extenders and freezing rates on sperm quality. *Aquaculture* 394-397: 6-12, 2013.
- GODINHO, H.M. *et al.* Induced spawning of the mullet *Mugil platanus* Gunther, 1980, in Cananéia, São Paulo, Brazil. *Boletim do Instituto de Pesca*, 20: 59-66, 1993.
- GLOGOWSKI, J. *et al.* Fertilization rate of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri* Brandt) milt cryopreserved with methanol. *Aquaculture* 211, 367–373, 2002.

- GREGORY, R.W. Occurrence of fructose in trout seminal plasma. *Transactions of the American Fisheries Society* **97**(2): 203-204, 1968.
- GWO J-C. Cryopreservation of sperm of some marine fishes. In: Tiersch TR, Green CC (eds.) *Cryopreservation in Aquatic Species*, 2nd Edition. pp 459-481. World Aquaculture Society. Baton Rouge. Louisiana. 2011.
- HINES, R.; YASHOUV, A. Some environmental factors influencing the activity of spermatozoa of *Mugil capito* Cuvier, a grey mullet. *Journal of Fish Biology* **3**: 123-127, 1971.
- HORVÁTH, A; URBANYI, B. The effect of cryoprotectants on the motility and fertilizing capacity of cryopreserved African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell 1822) sperm. *Aquaculture Research* **31**, 317–324, 2000.
- HORVÁTH, A. *et al.* The relationship of cryoprotectants methanol and dimethyl sulfoxide and hyperosmotic extenders on sperm cryopreservation of two North-American sturgeon species. *Aquaculture* **247**, 243–251, 2005.
- HORVÁTH, A, *et al.* Improved cryopreservation of sperm of paddlefish (*Polyodon spathula*). *J. World Aquac. Soc.* **37**, 356–362, 2006.
- HORVÁTH A, *et al.* Viability and fertilizing capacity of cryopreserved sperm from three North American Acipenseriform species: a retrospective study. *Journal of Applied Ichthyology* **24**, 443–449, 2008.
- HWANG, S.W. *et al.* Preliminary results in the cryogenic reservation of grey mullet (*Mugil cephalus*) sperm. *J. Fish. Soc.* **1**(2): 1-7, 1972.
- IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. *Relatório de reunião Técnica para ordenamento da pesca da tainha (Mugil platanus, M. liza) na região Sudeste/Sul do Brasil*. Itajaí, SC, 85p, 2000.
- ISACHENKO E, *et al.* Acrosomal status and mitochondrial activity of human spermatozoa vitrified with sucrose. *Reproduction* **136**:167–173, 2008.
- KUMAR, P. *et al.* Ultrastructure of grey mullet (*Mugil cephalus*, Linnaeus, 1758) spermatozoa as revealed from light, scanning and

transmission electron microscopy. *Journal of applied Ichthyology* 31(6), 1113-1119, 2015.

LAHNSTEINER F, *et al.* The influence of various cryoprotectants on semen quality of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) before and after cryopreservation. *Journal of Applied Ichthyology* 12, 99–106, 1996.

LAHNSTEINER F. Characterization of seminal plasma proteins stabilizing the sperm viability in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Animal Reproduction Science* 97: 151-164, 2007.

LAHNSTEINER F The role of free amino acids in semen of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and carp *Cyprinus carpio*. *Journal of Fish Biology* 75: 816-833, 2009.

LAHNSTEINER, F; MANSOUR, N. A comparative study on antioxidant systems in semen of species of the percidae, salmonidae, cyprinidae, and lotidae for improving semen storage techniques. *Animal Reproduction Science* 307: 130-140, 2010.

LAHNSTEINER, F.; MANSOUR, N.; PLAETZER, K. Antioxidant systems of brown trout (*Salmo trutta* f. fario) semen. *Animal Reproduction Science* 119: 314-321, 2010.

LINHART, O. *et al.* Cryopreservation of European catfish *Silurus glanis* sperm: sperm motility, viability, and hatching success of embryos. *Cryobiology* 51: 250-261, 2005.

LANES, C.F.C. *et al.* Cryopreservation of Brazilian flounder (*Paralichthys orbignyanus*) sperm. *Aquaculture*, 275: 361-365, 2008.

LEMOS, V. M. *et al.* Migration and reproductive biology of *Mugil liza* (Teleostei: Mugilidae) in south Brazil. *Journal of Fish Biology* 85(3): 671-687. 2014.

LEWIS, S.E *et al.* Comparison of individual antioxidants and total antioxidant capacity of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. *Fertility and Sterility* 67:142-147, 1997.

LIU X, *et al.* Cloning and expression of Stat5 and an additional homologue (Stab5b) involved in prolactin signal transduction in mouse

mammary tissue. *Proceedings of National Academy of Science* **92**: 8831-8835, 1995.

LIU Q, *et al.* An efficient methodology for cryopreservation of spermatozoa of red sea bream, *Pagrus major*, with 2-mL cryovials. *Journal of the World Aquaculture Society* 37 (3): 289- 297, 2006.

MAISSE, G; OGIER DE BALNY, B; LABBÉ, C. Cryopreservation of testicular sperm from European catfish (*Silurus glanis*). In: *Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species Biology SERIES*. E. *et al.* (Eds), CRCPress (Taylor and Francis group), pp. 397–401, 2008.

MAGNOTTI, C. *et al.* Cryopreservation and vitrification of fish semen: a review with special emphasis on marine species. *Reviews in Aquaculture*, in press. Doi: 10.1111/raq.12145. 2016

MARIA, A. N.; AZEVEDO, H. C.; CARNEIRO, P. C. F. Crioconservação de sêmen de peixes no contexto do agronegócio da piscicultura. In: TAVARES-DIAS, M. (Org.). *Manejo e sanidade de peixes em cultivo*. Amapá: Embrapa Amapá, 2009. v. 1, p. 47- 63.

MARIA, A. N.; AZEVEDO, H. C.; CARNEIRO, P. C. F.. *Protocolo para Crioconservação do Sêmen de Tambaqui (Colossoma macropomum)*. 112. ISSN 1678-1937. Julho, 2011. Aracaju, SE. Comunicado. Técnico.

MARIA, A.; CARNEIRO, P. Fish semen cryopreservation in Brazil: state of the art and future perspectives. *Ciencia Animal*, 22(1): 124-131, 2012.

MARTÍNEZ-PÁRAMO S, *et al.* Cryobanking as tool for conservation of biodiversity: effect of brown trout sperm cryopreservation on the male genetic potential. *Theriogenology* 71, 594–604, 2009.

MARTÍNEZ-PÁRAMO S, *et al.* Effect of two sulfur-containing amino acids, taurine and hypotaurine in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) sperm cryopreservation. *Cryobiology* 66 (3): 333-338, 2013.

MENEZES, N.A.; OLIVEIRA, C.; NIRCHIO, M. An old taxonomic dilemma: the identity of the western South Atlantic lebranche mullet (Teleostei: Perciformes: Mugilidae). *Zootaxa* 2519, 59-68, 2010.



MERINO O, *et al.* Fish (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa cryoprotectant-free vitrification: Stability of mitochondrion as criterion of effectiveness. *Animal Reproduction Science* 124: 125-131, 2011.

MERINO, O. *et al.* Cryoprotectant-free vitrification of fish (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa: first report. *Andrologia* 44: 390-395, 2012.

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA (MPA). *Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura*. Brasília. pp. 129, 2010.

MPA; MMA. *Plano de gestão para o uso sustentável da tainha, Mugil liza Valenciennes, 1836, no sudeste e sul do Brasil*. (eds MPA; MMA), Brasília pp. 238. 2015.

MIRANDA-FILHO, K. C.; *et al.* *Espécies nativas para a piscicultura no Brasil*. UFSM, Santa Maria, 2010. p. 541-552.

MONTEIRO-RIBAS W.M.; BONECKER, A.C.T. Artificial fertilization and development in laboratory of *Mugil liza* (Valenciennes, 1836) (Osteichthyes, Mugilidae). *Bulletin of Marine Science* 68, 427-433, 2001.

MORAES, C.N. *et al.* Etylene glycol for freezing ram semen in pellets. *Ciência Rural* 28(2): 287-292, 1998.

MURGAS, L.D.S. *et al.* Crioconservação do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) mediante adição de diferentes diluidores, ativadores e crioprotetores. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 36 (3): 526-531, 2007.

NETO, J.C.F.; SPACH, H.L. Sobrevivência de juvenis de *Mugil platanus* Günther, 1880 (Pisces, Mugilidae) em diferentes salinidades. *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo 25, 13-17, 1998.

OLIVEIRA, A. V. *et al.* Sucesso do resfriamento e congelamento de sêmen de pirapitinga *Brycon nattereri*. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 59, n. 6, p. 1509-1515, 2007.

OTSUBO, R.I. *Inseminação artificial da tainha Mugil Liza com a utilização de sêmen fresco e crioconservado*. Dissertação de mestrado - Programa de Pós graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca. São Paulo, 2010

PASSINI G., *et al.* Reprodução e larvicultura da tainha (*Mugil liza*) no Estado de Santa Catarina. In: *FENACAM & LACQUA/SARA (WAS)*, Brasil. 2015.

PEGG, D. E. Principles of Cryopreservation. In: DAY, J. G.; STACEY, G. N. (Ed.). *Methods in molecular biology: cryopreservation and freeze-drying protocols*. 2. ed. Totowa: Humana Press Inc. 2007.

PEÑARANDA, D.S. *et al.* Evaluation of different diluents for short-term storage of European eel sperm under air-limited conditions. *Journal of Applied Ichthyology*, v. 26, p. 659-664, 2010.

RABIN Y.; STEIF P. Solid mechanics aspects of cryobiology. In: BAUST JG, BAUST JM (eds.) *Advances in Biopreservation*. pp. 353-375. CRC Press, Boca Raton, Florida, 2009.

RANA, K. Preservation of gametes, in: Bromage, N.R., Roberts, R.J. (Eds.), *Broodstock management and egg and larval quality*. Cambridge University, Cambridge. 1995.

REIS, E.G; D'INCAO, F. The present status of artisanal fisheries of extreme Southern Brazil: an effort towards community-based management. *Ocean & Coastal Management*, 43: 585-595, 2000.

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

SALGUEIRO, C.C.M.; NUNES, J.F. Estudo de características testiculares e espermáticas de caprinos e ovinos. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 23: 231-232, 1999.

SAMPAIO, L.A.; FERREIRA, A.H.; TESSER, M.B. Effect of stocking density on laboratory rearing of mullet fingerlings, *Mugil platanus* (Günther, 1880). *Acta Scientiarum*, 23, 471-475, 2001.

SAMPAIO, L.A.; WASIELESKY, W.; MIRANDA-FILHO, K.C. Effect of salinity on acute toxicity of ammonia and nitrite to juvenile *Mugil platanus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 68, 668-674, 2002.

SANCHES; E.G.; OLIVEIRA, I.R.; SERRALHEIRO, P.C.S. Crioconservação do sêmen da garoupa-verdadeira *Epinephelus*

*marginatus* (Lowe, 1834) (teleostei, serranidae). *B. Inst. Pesca*, v. 35, n. 3, p.389 - 399, 2009.

SANCHES, E.; CERQUEIRA, V. Refrigerated Storage of Lane Snapper *Lutjanus synagris* Sperm. *Boletim do Instituto de Pesca* **35**(4): 293-305. 2010.

SANCHES, E.; CERQUEIRA, V. Preservation of refrigerated sperm of the mutton snapper with diluents and modified atmosphere. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 46 (12): 1673-1680, 2011.

SANCHES, E. G. *et al.* Cryopreservation of mutton snapper (*Lutjanus analis*) sperm. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 85 (3): 1083-1091, 2013.

SANCHES, E. *et al.* Sperm cryopreservation of Lane snapper *Lutjanus synagris* (Linnaeus, 1758). *Brazilian Journal of Biology* 75 (3): 662-669, 2015.

SARAGUSTY, J; ARAV, A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction* 141: 1-19, 2010.

SASAKI T, *et al.* Expression of fibulin-2 by fibroblasts and deposition with fibronectin into a fibrillar matrix. *Journal of Cell Science* 190: 2895-2904, 1996.

SERRALHEIRO, P.C.S. *et al.* Criopreservação do sêmen da tainha *Mugil platanus* em “macro-paillets”. In: *REUNIAO ANUAL DO INSTITUTO DE PESCA (1 a RAIP)*, 1992, São Paulo. p.59.

SERRALHEIRO, P.C.S. *et al.* O uso de três soluções diluidoras em sêmen de tainha – *Mugil platanus*, Gunther, 1880, resfriado em container de vapor de nitrogênio líquido. In: *ENCONTRO BRASILEIRO DE ICTIOLOGIA*, 1999, São Carlos. Anais... p.508.

SERRALHEIRO, P.C. S. *et al.* Sperm cryopreservation of the fat snook *Centropomus parallelus* Poey, 1860. In: *WORLD AQUACULTURE*, 2003., Salvador., p.716.

SERRALHEIRO, P.C. S. *et al.* Criopreservação de sêmen de robalo-peva *Centropomus parallelus* Poey, 1860: pH de meios crioprotetores, concentrações de crio-aditivo e de diluente, velocidades de

congelamento e taxa de fertilização. In: *CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE AQUICULTURA E BIOLOGIA AQUÁTICA*, 2004. Vitória. Anais... p.205.

SUQUET, M. *et al.* Cryopreservation of sperm in marine fish. *Aquaculture Research* 31 (3): 231-243, 2000.

SCOTT, A.P.; BAYNES, S.M. A review of the biology, handling and storage of salmonid spermatozoa. *Journal of Fish Biology* 17, 707-739, 1980.

TIBA, R.M. *et al.* Diluentes e proporções sêmen:diluyente na crioconservação do sêmen de robalo-peva *Centropomus parallelus*. *Boletim do Instituto de Pesca*, 35(1): 99-110, 2009.

TIERSCH, T.R. *et al.* Transport and cryopreservation of sperm of the common snook, *Centropomus undecimalis* (Bloch). *Aquaculture Research* 35: 278–288, 2004

TIERSCH, T.R. *et al.* Sperm cryopreservation in fish and shellfish. In: Roldan E, Gomendio M (eds.) *Spermatology*. pp. 493-508. Nottingham University Press, Nottingham, UK. 2007.

TIERSCH, T.R. Introduction to the Second Edition. In: TIERSCH TR, GREEN CC (eds.) *Cryopreservation in Aquatic Species*, 2nd Edition. pp.1-17. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, 2011.

THIRUMALA, S. *et al.* Freezing response and optimal cooling rates for cryopreserving sperm cells of striped bass, *Morone saxatilis*. *Theriogenology*, 66: 964-973, 2000.

UBILLA, A; VALDEBENITO, I. Use of antioxidants on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) sperm diluent: effect on motility and fertilizing capability. *Latin American Journal of Aquatic Research* 39 (2): 338-343, 2011.

VALDEBENITO, I.I.; GALLEGOS, P.C.; EFFER, B.R. Gamete quality in fish: evaluation parameters and determining factors. *Zygote* 23, 177-197, 2015.

VIEIRA, J.P. (1991). Juvenile mullets (Pisces: Mugilidae) in the estuary of Lagoa dos Patos, RS Brazil. *Copeia* 1991, 409–418.

VIEIRA, J.P.; SCALABRIN, C. (1991). Migração reprodutiva da Tainha (*Mugil platanus*, Günther, 1880) no sul do Brasil. *Atlantica* 13, 131–141.

VIVEIROS, A.T.M; KOMEN, J. Semen cryopreservation of the African catfish, *Clarias gariepinus*. In: *Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species. Biology. Series. E.* CABRITA, V. ROBLES, M. P. HERRÁEZ (Eds), CRCPress (Taylor and Francis group), pp. 403–407, 2008.

VIVEIROS, A.T.; GODINHO, H.P. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. *Fish Physiology Biochemistry* 35(1):137-150. 2009

VIVEIROS ATM, *et al.* Effects of extenders, cryoprotectants and freezing methods on sperm quality of the threatened Brazilian freshwater fish pirapitinga-do-sul *Brycon opalinus* (Characiformes). *Theriogenology* 78: 361-368, 2012.

YAMANAKA, N. *et al.* Larvicultura e observações sobre o crescimento da tainha *Mugil* sp. em cativeiro (Cananéia, SP). In: *Simpósio Brasileiro de Aquicultura*, 7, Peruíbe, SP. São Paulo: ACIESP, 1992. p.124. 1992.

YAVIN, S.; ARAV, A. Measurement of essential physical properties of vitrification solutions. *Theriogenology* 67:81-89, 2007.

YEGANEH, B.; MOJAZI AMIRI, B.; ALAVI, S. Motility of *Mugil cephalus* L. spermatozoa in coelomic fluid, seminal fluid and saline media. *Journal of applied Ichthyology*, 24 (4), 517-518, 2008.

ZANIBONI FILHO, E.; BALDISSEROTTO, B. Congelação de sêmen e tecidos de peixes brasileiros. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 39(1): 189-194. 2015

ZAKI, M. I.; GARABAVI, M. M. E.; ASSEM, S.S. Characteristics of spermatogenesis and the production of sperm in the gray mullet, *Liza ramada*. *J. Ichthyol.* 33,152–158, 1993.

Zhang YZ, *et al.* Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) sperm with a practical methodology, 2003.