

Fabiola Suellen da Silva Reis

**CONTAMINANTES BIOLÓGICOS
E A ATIVAÇÃO DO SÊMEN DO SURUVI
Steindachneridion scriptum (Miranda Ribeiro, 1918)**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de mestre em Aquicultura.

Orientador: Alex Pires de Oliveira Nuñez

Florianópolis - SC
2017

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

Reis, Fabiola Suellen da Silva

Contaminantes biológicos e a ativação do sêmen do suruvi *Steindachneridion scriptum* (Miranda Ribeiro, 1918) / Fabiola Suellen da Silva Reis ; orientador, Alex Pires de Oliveira Nuñez, 2017. 60 p.

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

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. ativação espermática. 3. espermatozoides. 4. reprodução de peixes. I. Nuñez, Alex Pires de Oliveira . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. III. Título.

**Contaminantes biológicos e a ativação do sêmen de suruvi
(*Steindachneridion scriptum*, Miranda Ribeiro, 1918).**

Por

FABIOLA SUELLEN DA SILVA REIS

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE 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. Alex Pires de Oliveira Nuñez – *Orientador*

Dr. Evoy Zaniboni Filho - UFSC

Dr. José Luiz Pedreira Mourão - UFSC

Dr. Raphael de Leão Serafini - EPAGRI

Este trabalho é dedicado a minha família.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e provisão diante dos obstáculos enfrentados, aos meus familiares, em especial Pai, Mãe e Irmão, que sempre me deram forças pra continuar.

Ao meu orientador, Dr. Alex Pires de Oliveira Nuñez, pela oportunidade, confiança, e orientação.

A Universidade Federal de Santa Catarina, pela oportunidade de estudar nesta instituição tão conceituada.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro concedido.

Ao LAPAD e ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, pela infraestrutura e apoio para a realização do projeto.

A Jhon Jimenez, Jurandir Junior, Renata e Josiane, pela ajuda.

Obrigada a todos os professores, colegas e funcionários do LAPAD pelo aprendizado: o apoio de vocês foi fundamental para a realização deste trabalho.

Posso todas as coisas em Cristo que me fortalece.
Filipenses 4:13

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência dos contaminantes urina e plasma sanguíneo sobre a ativação do sêmen de suruvi, *Steindachneridion scriptum*, uma espécie de peixe nativa das bacias do alto rio Uruguai e do rio Paraná. Para tanto dois experimentos foram realizados, sendo que em cada um foi utilizado o sêmen de oito machos, que foram induzidos com extrato pituitário de carpa. Nos dois experimentos a qualidade do sêmen foi analisada através do volume, concentração espermática, integridade da membrana celular, motilidade espermática, analisada com o auxílio do software CASA (Computer Assisted Sperm Analysis), e pela morfologia dos espermatozoides. A concentração espermática e o espermatócrito apresentaram forte relação em ambos os experimentos ($P < 0,05$), com alto coeficiente de determinação ($R^2 = 0,8058$ e $0,8562$), sendo, portanto, possível estimar a concentração espermática a partir do espermatócrito. Para a motilidade espermática os seguintes parâmetros espermáticos foram avaliados: motilidade (MOT), velocidade curvilínea (VCL), velocidade média do deslocamento (VAP), velocidade em linha reta (VSL) e linearidade (LIN). No primeiro experimento o sêmen foi ativado com água mineral, plasma sanguíneo e urina, na proporção de 1:1000 (sêmen/solução), e avaliado durante 40 s. Após a ativação foi registrada diferença na motilidade produzida pelos diferentes ativadores ($P < 0,05$), não tendo sido registrada ativação com o plasma sanguíneo. A VCL apresentou os maiores valores nos primeiros 30 s com diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os ativadores, ocorrendo uma diminuição de 136,6 a 48,0 $\mu\text{m/s}$ para a água e de 158,0 para 58,0 $\mu\text{m/s}$ para a urina. Para a VAP foram registradas tendências semelhantes às observadas para a VCL, sendo que no decorrer do tempo houve diferenças significativas nas velocidades a partir da ativação, que declinaram de 122,6 para 21,0 $\mu\text{m/s}$ e de 148,0 para 21,0 $\mu\text{m/s}$ para ativação com água e urina, respectivamente. A VSL apresentou diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os ativadores no decorrer do tempo, variando de 111,4 para 20,6 $\mu\text{m/s}$ para água, e de 133,2 para 27,2 $\mu\text{m/s}$ para a urina, respectivamente. Nos dois experimentos as amostras apresentaram altos percentuais de células viáveis, altas porcentagem de espermatozoide com morfologia normal (>88%) e baixa porcentagem com morfologia anormal (<12 %), entre as quais a mais frequente foi a anormalidade secundária sem cauda e cauda curvada. No segundo experimento foi avaliado o efeito da urina sobre a ativação do sêmen e sobre os parâmetros espermáticos o sêmen foi submetido às concentrações 10,

30, 50 e 70 %. A urina em baixa concentração (10%) não produziu ativação do sêmen, entretanto o aumento das proporções de urina produziu motilidade espermática e aumentou as velocidades analisadas. Os resultados demonstraram que a urina é um potencial ativador, recomenda-se o descarte com amostras com níveis acima de 10% de urina, para impedir a perda da qualidade do sêmen, enquanto as amostras ativadas com plasma sanguíneo não precisam ser descartadas.

Palavras-chaves: Aquicultura, ativação espermática, espermatozoides, reprodução de peixes.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the influence of urine and blood plasma contaminants on the activation of semen of suruvi, *Steindachneridion scriptum*. In order to do this, two experiments were carried out, and in each one the semen of eight males, induced with pituitary carp extract, was used. In the experiments the semen quality was analyzed through volume, sperm concentration, cell membrane integrity, sperm motility, analyzed with CASA software, and sperm morphology. The values of sperm concentration and spermatocrit in both experiments were significant ($P < 0.05$), with a high coefficient of determination ($R^2 = 0.8058$ and 0.8562), and therefore it was possible to estimate the sperm concentration from the spermatocrit. The following parameters were evaluated for the sperm motility: motility (MOT), curvilinear velocity (VCL), average path velocity (VAP), straight line velocity (VSL) and linearity (LIN). In the first experiment the semen was activated with mineral water, blood plasma and urine, in a ratio of 1: 1000 (semen/solution), and evaluated for 40 s. After activation, there was a difference in the motility produced by the activators ($P < 0.05$), and no activation was produced with blood plasma. The VCL presented the highest values in the first 30 s with significant differences ($P < 0.05$) between the activators, with a reduction of 136.6 to 48.0 $\mu\text{m/s}$ for water and 158.0 for 58.0 $\mu\text{m/s}$ for urine. For VAP, trends similar to those observed for the VCL were recorded, and in the course of time there were significant differences in velocities from activation, which declined from 122.6 to 21.0 $\mu\text{m/s}$ and from 148.0 to 21.0 $\mu\text{m/s}$ for water and urine, respectively. VSL showed significant differences ($P < 0.05$) between the activators over time, varying from 111.4 to 20.6 $\mu\text{m/s}$ for water, and from 133.2 to 27.2 $\mu\text{m/s}$ for urine, respectively. In both experiments, the samples had a good percentage of viable cells, a high percentage of spermatozoa with normal morphology ($>88\%$) and low percentage with abnormalities ($<12\%$), among which the most frequent was the secondary abnormality without tail and curved tail. In the second experiment, the effect of urine on semen activation and sperm parameters was evaluated at concentrations of 10, 30, 50 and 70 %. Urine in low concentration (10 %) did not produce semen activation; however, increased urine proportions produced sperm motility and increased the velocities analyzed. The results showed that urine is a potential activator, it is recommended to discard samples with levels above 10% urine, to prevent loss of semen quality, while blood plasma activated samples need not be discarded.

Keywords: Aquaculture, sperm activation, spermatozoa, fish reproduction.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Relação entre a concentração espermática mensurada por contagem em câmara hematimétrica de Neubauer e o espermátócrito do sêmen de *Steindachneridion scriptum*. 36
- Figura 2:** Motilidade espermática de *Steindachneridion scriptum* até 40 s após a ativação com água mineral, urina e plasma sanguíneo. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) dentro de um determinado tempo pelo teste de Tukey. 37
- Figura 3:** Velocidade curvilinear (a; VCL), velocidade média do deslocamento (b; VAP), velocidade em linha reta (c; VSL) e linearidade (d; LIN) dos espermatozoides de *Steindachneridion scriptum* até 40 s após a ativação com água mineral, urina e plasma sanguíneo. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) dentro de um determinado tempo pelo teste de Tukey 38
- Figura 4:** Anormalidades primárias e secundárias dos espermatozoides de *Steindachneridion scriptum*: Cd: cauda dobrada. Ce: cauda enrolada. Cc: cauda curvada. Cabp: cabeça pequena. Cabg: cabeça grande. Cd: cauda dupla (Cd); e as secundárias Cg: cauda gancho, Scab: sem cabeça. Sc: sem cauda (Sc)..... 39
- Figura 5:** Relação entre a concentração espermática mensurada por contagem em câmara hematimétrica de Neubauer e pelo espermátócrito do sêmen de *Steindachneridion scriptum*. 40
- Figura 6:** Motilidade espermática do sêmen de *Steindachneridion scriptum* ativado com diferentes proporções de urina. A equação representa a relação entre a motilidade e a porcentagem de contaminação com urina ($P < 0,05$). 40
- Figura 7:** Velocidade curvilinear (a; VCL), velocidade média do deslocamento (b; VAP), velocidade em linha reta (c; VSL) e linearidade (d; LIN) dos espermatozoides de *Steindachneridion scriptum* ativados com diferentes porcentagens de urina (10, 30, 50 e 70%). As equações representam variáveis com regressão linear significativa ($P < 0,05$). 41
- Figura 8:** Anormalidades primárias e secundárias dos espermatozoides de *Steindachneridion scriptum*. Primárias: Cd: cauda dobrada. Ce: cauda enrolada. Cc: cauda curvada. Cabp: cabeça pequena. Cabg: cabeça grande. Cd: cauda dupla Cd: Secundárias: Cg: cauda gancho. Scab: sem cabeça. Sc: sem cauda. 42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros espermáticos do sêmen de suruvi <i>Steindachneridion scriptum</i> (média \pm desvio padrão) durante o experimento 1.....	36
Tabela 2: Parâmetros qualitativos do sêmen de suruvi <i>Steindachneridion scriptum</i> (média \pm desvio padrão) durante o experimento 2.....	42

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	21
OBJETIVOS	25
OBJETIVO GERAL	25
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
CAPITULO I - Contaminantes biológicos e a ativação do sêmen de suruvi <i>Steindachneridion scriptum</i>	27
RESUMO	27
ABSTRACT	29
INTRODUÇÃO	30
MATERIAL E MÉTODOS	31
RESULTADOS	35
DISCUSSÃO	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL	51
APÊNDICE	57

INTRODUÇÃO GERAL

A pesca e a aquicultura são importantes fontes de alimentos, renda, nutrição e subsistência para milhões de pessoas no mundo todo. Com relação aos peixes, o abastecimento global per capita atingiu, em 2014, um novo recorde de 20 kg devido ao forte crescimento da aquicultura (FAO, 2016). O abastecimento atual fornece metade de todo o peixe para consumo humano, tendo sido identificada uma rápida melhoria da situação de certas populações de peixes, como resultado de uma melhor gestão da pesca (FAO, 2016).

No Brasil a aquicultura produziu aproximadamente 576 mil ton em 2015, e semelhante ao padrão mundial, o maior grupo cultivado foi composto pelos peixes continentais, com 483,2 mil ton (IBGE, 2016).

Os estados que mais produziram peixes foram Rondônia (84,5 mil toneladas), Paraná (69,3 mil toneladas), Mato Grosso (47,4 mil toneladas), Santa Catarina (33,7 mil toneladas) e São Paulo (31,1 mil toneladas) (IBGE, 2016).

Em Santa Catarina a piscicultura é baseada principalmente no cultivo de espécies exóticas, com destaque para as Tilápias (variedades nilótica) 71,21% Carpas (comum, prateada, cabeça-grande, capim) Jundiás (cinza e rosa) 1,74% Truta (arco-íris) 1,64% Outros (Iambari, pacu, tambaqui, traíra, cascudo e etc.) 1,45%, 22,57% Catfish, 39% (EPAGRI-CEDAP, 2015).

No entanto, há diversas vantagens no cultivo de espécies nativas em comparação às exóticas, relacionadas a sua adaptação natural ao ambiente e a boa aceitação do mercado consumidor (ZANIBONI FILHO, 2000).

Entre as espécies de peixes nativas com potencial para a piscicultura, destaca-se o suruvi *Steindachneridion scriptum* (Miranda Ribeiro, 1918), também conhecido como bocudo, que é uma espécie nativa das bacias do alto rio Uruguai e do rio Paraná (GARAVELLO, 2005), pertencente à ordem Siluriformes e a família Pimelodidae.

É uma espécie reofílica, encontrada em locais profundos que sucedem corredeiras em rios de médio e grande porte (AGOSTINHO et al., 2008), e que atualmente está listada no livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção (AGOSTINHO et al., 2008). O suruvi apresenta hábitos noturnos, dieta predominantemente piscívora, e é considerada uma espécie de grande porte (MEURER; ZANIBONI-FILHO, 2000) que pode atingir 90 cm e chegar a 7,0 kg (ZANIBONI-FILHO et al., 2004). O suruvi foi a quarta espécie mais capturada em biomassa na área de abrangência do reservatório da usina hidrelétrica de

Itá (BEUX e ZANIBONI FILHO, 2008). Outros estudos foram desenvolvidos com a espécie: Ramella et al. (2006) estudaram a variabilidade genética de quatro espécies de peixes entre elas o suruvi; Adamante et al. (2007) analisaram as fases iniciais desta espécie; Schütz et al. (2008) avaliaram a transição alimentar de larvas; Maghelly et al. (2014) avaliaram as características morfométricas e o rendimento corporal do suruvi de fêmeas e de machos de suruvi; Abreu et al. (2015) caracterizam histologicamente as fases de desenvolvimento ovocitário da espécie em condições de cativeiro e Zaniboni-Filho et al. (2015) utilizaram a bioimpedância como uma ferramenta para a análise da composição corporal do suruvi.

O suruvi destaca-se pela qualidade da sua carne, comportamento dócil no cativeiro e resistência a baixas temperaturas, características que demonstram o seu potencial para a piscicultura.

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

Como a maior parte das espécies reofílicas, essas espécies realizam curtos deslocamentos migratórios, porém não completam o ciclo de maturação gonadal quando mantidas em cativeiros, sendo necessários para isso os manejos de seleção de reprodutores e de indução hormonal (ZANIBONI-FILHO et al., 2010).

Nos estudos sobre a biologia reprodutiva de suruvi no alto rio Uruguai, considerando-se os animais capturados na pesca científica e por pescadores artesanais da região, Meurer e Zaniboni-Filho (2000) registraram um amplo período reprodutivo, embora tenham observado a presença de peixes em processo de regressão gonadal no mês de dezembro, quando mantidos em cativeiro.

Estudos recentes, desenvolvidos no Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce (LAPAD), da Universidade Federal de Santa Catarina, com intuito de aprofundar o conhecimento sobre a espécie, indicaram que a mesma apresenta um período reprodutivo restrito, que ocorre geralmente entre a segunda quinzena de setembro e a primeira quinzena de novembro, sendo bastante influenciado pela variação da temperatura da água (ZANIBONI-FILHO et al., 2010).

Técnicas de fertilização artificial de gametas de peixes representam um avanço importante em programas comerciais e de repovoamento de rios, sendo que para o sucesso da reprodução em cativeiro são necessárias informações sobre a qualidade do sêmen,

visando garantir melhor a eficiência da fertilização (BILLARD et al, 1995; RURANGWA et al., 2004). Neste sentido, a avaliação das características seminais como o volume, a taxa e a duração da motilidade espermática, a concentração e a morfologia dos espermatozoides, é quesito importante para o processo de reprodução artificial de peixes, que deve fazer parte da rotina de pisciculturas (BILLARD, 1992; SOLIS-MURGA et al., 2011).

O conhecimento do perfil espermático de uma espécie apresenta várias vantagens, entre elas o melhor aproveitamento dos gametas e a produção de um maior número de embriões viáveis. Com uma metodologia adequada e padronizada, é possível maximizar o uso do sêmen para a fertilização das fêmeas (BILLARD, 1990).

Através do estudo do sêmen é possível determinar o volume produzido por cada animal, a concentração de espermatozoides e a sua motilidade, informações que servem como base para diluição do material fecundante, o que possibilita medir a capacidade de produção do sêmen de cada reprodutor (SALISBURY e VANDERMARK, 1964).

O volume de sêmen produzido pelas diferentes espécies, ou entre animais de uma mesma espécie, é muito variável, e pode sofrer influência de vários fatores, como a estação do ano, o período reprodutivo e o clima, sendo que algumas espécies, como *Brycon orbignyanus*, podem liberar um volume relativamente grande de sêmen (>10 ml), quando comparadas a outras, como *Leporinus macrocephalus* e *Zungaro jahu*, cujo sêmen é muito difícil de ser obtido, sendo necessária a extração dos testículos dos animais para a coleta do sêmen (VIVEIROS e GODINHO, 2009).

A concentração de espermatozoides, é definida como o número de espermatozoides/ml, é altamente variável nas espécies de peixes neotropicais (VIVEIROS e GODINHO 2009), e geralmente é avaliada através da contagem de espermatozoides em câmara hematimétrica de Neubauer (STREIT JUNIOR et al., 2003; WIRTZ e STEINMANN, 2006), sendo uma importante informação para a otimização do uso do sêmen em processos de desova induzida (SHIMODA, 2007).

A análise da motilidade e morfologia espermática são apontadas por diversos autores como uma importante ferramenta na seleção de um ejaculado, consistir na determinação da porcentagem espermatozoides móveis, o teste mais utilizado para predizer a qualidade seminal (VERSTEGEN et al., 2002).

Para esta análise programas de computador, como o Computer Assisted Sperm Analysis (CASA), têm sido utilizados na determinação

dos padrões de movimentação espermática (SANCHES et al., 2010; WILSON-LEEDY e INGERMANN 2007).

O CASA também tem sido utilizado para a determinação da variabilidade espermática entre machos (LAHNSTEINER et al., 1998), na avaliação do efeito da criopreservação (RURANGWA et al., 2001) e também para avaliar os efeitos de metais pesados sobre o sêmen (KIME et al., 1996).

A motilidade espermática, que é influenciada por diversos fatores como a temperatura, o estado nutricional, o estado sanitário, as condições de análise, as soluções ativadoras empregadas e a espécie utilizada (CAROLSFELD e HARVEY, 1999; GODINHO, 2000), é um dos principais parâmetros a serem considerados na análise da qualidade do sêmen de peixes. As estimativas da taxa de motilidade são avaliadas observando-se a movimentação dos espermatozoides imediatamente após a introdução de uma solução ativadora, pois o tempo de motilidade geralmente é curto, em torno de um minuto (BILLARD e COSSON, 1992). Outros métodos alternativos de mensuração indireta servem como ferramenta para auxiliar na avaliação de sêmen, que podem ser aplicados em condições de campo, como por exemplo, o espermatócrito (KAVAMOTO et al., 1986).

Os espermatozoides dos peixes estão imóveis nos testículos e no plasma seminal de espécies de água doce (COSSON et al., 1999), e como na maioria dessas espécies a fecundação ocorre no meio externo, o sêmen é ativado ao entrar em contato com a água (BOBE e LABBÉ, 2010), uma solução hiposmótica (POUPARD et al., 1998), que apresenta características propícias para servir como ativadora, pois apresenta osmolaridade inferior a do plasma seminal que é próximo a 300 mOsm kg^{-1} (ALAVI e COSSON, 2006).

A qualidade do sêmen, principalmente quando são realizados trabalhos a campo ou em grande escala, pode sofrer graves prejuízos se ocorrer a contaminação de amostras com sangue, urina e fezes (SATTEFIELD e FLICKINGER, 1995; NYNCA et al., 2012).

A contaminação do sêmen com sangue, que pode ocorrer durante a reprodução artificial de peixes, pode causar impacto sobre a motilidade e a qualidade do sêmen, ainda que, geralmente o sangue não seja considerado um contaminante fisiologicamente importante (CIERESZKO, 2008), uma vez que a contaminação com pequenas quantidades de sangue parece não alterar significativamente a qualidade do sêmen.

O contato entre a urina e o sêmen é praticamente inevitável nas condições da colheita do sêmen por extração, devido ao fato do canal urinário e do ducto espermático se unirem ao ducto eferente com uma abertura através da papila urogenital (DREANNO, 1998).

Como a urina dos peixes teleósteos apresenta baixa osmolaridade, o seu efeito prejudicial está relacionado à indução da ativação parcial da motilidade dos espermatozoides no sêmen colhido (LINHART et al., 2003) acompanhado por uma redução de armazenamento de ATP intracelular (POUPARD et al., 1998).

Como a urina e o plasma sanguíneo podem ativar e/ou alterar a qualidade e a motilidade do sêmen de *S. scriptum* durante a reprodução induzida, o estudo do efeito desses contaminantes visa fornecer informações que permitirão aos piscicultores elaborar protocolos de manuseio ideais para o sêmen utilizado na fertilização artificial.

O Capítulo 1 desta dissertação foi redigido seguindo as normas da Revista Brasileira de Zootecnia

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

O presente estudo tem como objetivo geral avaliar a influência de contaminantes biológicos sobre a ativação do sêmen de *Steindachneridion scriptum*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a influência da urina e do plasma sanguíneo sobre os parâmetros de movimentação espermática;
- Estabelecer os índices de contaminação com urina e plasma sanguíneo que inviabilizam o uso do sêmen coletado.

Capítulo 1

**Contaminantes Biológicos e a Ativação Do Sêmen Do Suruvi,
Steindachneridion scriptum (Miranda Ribeiro, 1918)****RESUMO**

A influência da urina e do plasma sanguíneo sobre a ativação do sêmen do suruvi, *Steindachneridion scriptum*, foi avaliada utilizando o sistema computadorizado de código aberto CASA. Dois experimentos foram realizados, nos quais os animais foram induzidos com extrato pituitário de carpa. Nos experimentos a qualidade do sêmen foi analisada através do volume, concentração espermática, integridade da membrana celular, motilidade espermática, analisada com o auxílio do software CASA, e morfologia dos espermatozoides. A concentração espermática e o espermátócrito apresentaram forte relação em ambos os experimentos ($P < 0,05$), com alto coeficiente de determinação ($R^2 = 0,8058$ e $0,8562$), sendo, portanto, possível estimar a concentração espermática a partir do espermátócrito. Para a motilidade espermática os seguintes parâmetros foram avaliados: motilidade (MOT), velocidade curvilínea (VCL), velocidade média do deslocamento (VAP), velocidade em linha reta (VSL) e linearidade (LIN). No primeiro experimento o sêmen foi ativado com água mineral, plasma sanguíneo e urina, na proporção de 1:1000 (sêmen/solução), e avaliado durante 40 s. Após a ativação foi registrada diferença na motilidade produzida pelos ativadores ($P < 0,05$), não tendo sido registrada ativação com o plasma sanguíneo. A VCL apresentou os maiores valores nos primeiros 30 s com diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os ativadores, ocorrendo uma diminuição de 136,6 a 48,0 $\mu\text{m/s}$ para a água e de 158,0 para 58,0 $\mu\text{m/s}$ para a urina. Para a VAP foram registradas tendências semelhantes às observadas para a VCL, sendo que no decorrer do tempo houve diferenças significativas nas velocidades a partir da ativação, que declinaram de 122,6 para 21,0 $\mu\text{m/s}$ e de 148,0 para 21,0 $\mu\text{m/s}$ para ativação com água e urina, respectivamente. A VSL apresentou diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os ativadores no decorrer do tempo, variando de 111,4 para 20,6 $\mu\text{m/s}$ para água, e de 133,2 para 27,2 $\mu\text{m/s}$ para a urina, respectivamente. Nos dois experimentos as amostras apresentaram ótimos percentuais de células viáveis, alta porcentagem de espermatozoides com morfologia normal ($>88\%$) e baixa porcentagem com anormalidades ($<12\%$), entre as quais a mais frequente foi a anormalidade secundária sem cauda e cauda curvada. No segundo

experimento o efeito da urina sobre a ativação do sêmen e sobre os parâmetros espermáticos foi avaliado nas concentrações (10, 30, 50 e 70 %). A urina em baixa concentração (10 %) não produziu ativação do sêmen, entretanto o aumento das proporções de urina produziu motilidade espermática e aumentou as velocidades analisadas.

Os resultados demonstraram que a urina é um potencial ativador, recomenda-se o descarte com amostras com níveis acima de 10% de urina, para impedir a perda da qualidade do sêmen, enquanto as amostras ativadas com plasma sanguíneo não precisam ser descartadas.

Palavras-chaves: motilidade espermática, espermatozoide, reprodução de peixes.

ABSTRACT

The influence of urine and blood plasma on survival, *Steindachneridion scriptum*, semen activation was evaluated using the computerized open source system CASA. Two experiments were performed in which the animals were induced with carp pituitary extract. In the experiments the semen quality was analyzed through volume, sperm concentration, cell membrane integrity, sperm motility, analyzed with CASA software, and sperm morphology. The values of sperm concentration and spermatocrit in both experiments were significant ($P < 0.05$), with a high coefficient of determination ($R^2 = 0.8058$ and 0.8562), and therefore it was possible to estimate the sperm concentration from the spermatocrit. The following parameters were evaluated for the sperm motility: motility (MOT), curvilinear velocity (VCL), average path velocity (VAP), straight line velocity (VSL) and linearity (LIN). In the first experiment the semen was activated with mineral water, blood plasma and urine, in a ratio of 1:1000 (semen/solution), and evaluated for 40 s. After activation, there was a difference in the motility produced by the activators ($P < 0.05$), and no activation was produced with blood plasma. The VCL presented the highest values in the first 30 s with significant differences ($P < 0.05$) between the activators, with a reduction of 136.6 to 48.0 $\mu\text{m/s}$ for water and 158.0 for 58.0 $\mu\text{m/s}$ for urine. For VAP, trends similar to those observed for the LVC were recorded, and in the course of time there were significant differences in velocities from activation, which declined from 122.6 to 21.0 $\mu\text{m/s}$ and from 148.0 to 21.0 $\mu\text{m/s}$ for water and urine, respectively. VSL showed significant differences ($P < 0.05$) between the activators over time, varying from 111.4 to 20.6 $\mu\text{m/s}$ for water, and from 133.2 to 27.2 $\mu\text{m/s}$ for urine, respectively. In both experiments, the samples had a good percentage of viable cells, a high percentage of spermatozoa with normal morphology ($>88\%$) and low percentage with abnormalities ($<12\%$), among which the most frequent was the secondary abnormality without tail and curved tail. In the second experiment, the effect of urine on semen activation and sperm parameters was evaluated at concentrations of 10, 30, 50 and 70%. Urine in low concentration (10 %) did not produce semen activation however, increased urine proportions produced sperm motility and increased the velocities analyzed. The results showed that urine is a potential activator, it is recommended to discard samples with levels above 10 % urine, to prevent loss of semen quality, while blood plasma activated samples need not be discarded.

Keywords: sperm motility, spermatozoa, fish reproduction.

INTRODUÇÃO

O suruvi *Steindachneridion scriptum* (Miranda Ribeiro, 1918), também conhecido como bocudo, é uma espécie de bagre nativa das bacias do alto rio Uruguai e do rio Paraná (GARAVELLO, 2005), que apresenta hábitos noturnos e dieta predominantemente piscívora, sendo considerada uma espécie de grande porte (MEURER; ZANIBONI FILHO, 2000), que pode atingir 90 cm e 7,0 kg (ZANIBONI-FILHO et al., 2004). Essas características fazem com que a espécie apresente potencial para a aquicultura, embora seja pouco frequente na natureza e tenha uma biologia pouco conhecida (VIVEIROS e GODINHO, 2009).

Como esta espécie não se reproduz naturalmente em cativeiro, se faz necessário o uso da reprodução induzida, para a qual são importantes as informações sobre a qualidade do sêmen, que visam melhorar a eficiência da fertilização (BILLARD, 1992; BILLARD et al., 1995; RURANGWA et al., 2004). Essas informações incluem o perfil espermático, onde são analisadas as características físicas do sêmen (volume, taxa e duração da motilidade espermática, concentração e morfologia). A análise da motilidade e morfologia espermática são apontadas por diversos autores como uma importante ferramenta na seleção de um ejaculado, sendo a determinação da porcentagem de espermatozoides móveis, o teste mais utilizado para demonstrar a qualidade seminal (Verstegen et al., 2002).

Tem sido utilizados programas computadorizados tais como, computer assisted sperm analysis (CASA), método que consiste na determinação dos padrões de movimentação espermática (Sanches et al., 2010; Wilson-Leedy e Ingermann, 2007). Ele também tem sido utilizado, por exemplo, para a determinação da variedade espermática entre machos (LAHNSTEINER et al., 1998). Efeito criopreservador (RURANGWA et al., 2001). E também avaliando os efeitos de metais pesados (KIME et al., 1996).

A motilidade espermática é um dos principais parâmetros a serem considerados na análise da qualidade do sêmen de peixes e, para tanto, deve-se levar em conta que ela é influenciada por diversos fatores como a temperatura, o estado nutricional, o estado sanitário e a espécie estudada (CAROLSFELD e HARVEY, 1999; GODINHO, 2000).

E a preservação do sêmen, principalmente quando são realizados trabalhos a campo ou em grande escala, pode sofrer graves prejuízos se ocorrer a contaminação de amostras com sangue, urina e fezes (SATTEFIELD e FLICKINGER, 1995; NYNCA et al., 2012)

O contato entre a urina e o sêmen é praticamente inevitável nas condições da colheita do sêmen por extração, devido ao fato do canal urinário e do ducto espermático se unirem ao ducto eferente com uma abertura através da papila urogenital (DREANNO, 1998). Como a urina dos peixes teleosteos apresenta baixa osmolaridade, o seu efeito prejudicial está relacionado à indução da ativação parcial da motilidade dos espermatozoides no sêmen colhido (LINHART et al., 2003) acompanhado por uma redução de armazenamento de ATP intracelular (POUPARD et al., 1998).

Como a urina e o plasma sanguíneo podem ativar e/ou alterar a qualidade e a motilidade do sêmen de *S. scriptum* durante a reprodução induzida, o estudo do efeito desses contaminantes visa fornecer informações que permitirão aos piscicultores elaborar protocolos de manuseio ideais para o sêmen utilizado na fertilização artificial.

O presente estudo tem como objetivo avaliar a influência da urina e do plasma sanguíneo sobre a ativação do sêmen do suruvi *Steindachneridion scriptum*.

MATERIAL E MÉTODOS

Para avaliar a qualidade do sêmen de *S. scriptum* foi conduzido no mês de agosto o experimento 1 no Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce, da Universidade Federal de Santa Catarina.

Todos os procedimentos destes experimentos foram realizados atendendo as exigências do Protocolo CEUA (PP00788), aprovado pelo Comitê de Ética de Uso Animal/UFSC.

Os peixes utilizados tinham aproximadamente dois anos de idade, eram mantidos em caixas d' água de 1000 litros, com a temperatura controlada, são reprodutores F2 e descendentes de reprodutores capturado na bacia do alto rio Uruguai foram alimentados com ração comercial balanceada comercial, com valor proteico de 36 % de proteína bruta, oferecida duas vezes ao dia. Com base nos resultados obtidos foi conduzido o experimento 2 na semana seguinte, no qual foi avaliado o efeito da concentração de urina de machos desta espécie sobre a ativação do sêmen.

Experimento 1

Neste estudo a qualidade do sêmen de *S. scriptum* foi avaliada pelo volume de sêmen produzido, pela concentração espermática, pela integridade da membrana dos espermatozoides, pela motilidade

espermática, analisada com auxílio do software CASA, e morfologia dos espermatozoides.

O sêmen utilizado foi obtido de oito machos ($210,0 \pm 26,68$ g), que eram mantidos em condições de laboratório, foram submetidos a reprodução induzida com duas doses de extrato pituitário de carpa (EPC) aplicados na região dorsal, na razão de 0,5 e 5,0 mg EPC/kg, aplicadas em intervalo de 12 h.

Volume

O volume do sêmen foi mensurado utilizando-se uma seringa de plástico para insulina, de acordo com KAVAMOTO e FOGLI da SILVEIRA (1986). A seringa, sem agulha, foi colocada junto a papila urogenital dos peixes, e com uma leve pressão abdominal o sêmen liberado foi retirado pela seringa, com cuidado para evitar a contaminação e ativação com urina, muco, fezes ou água. A medida do volume foi realizada diretamente na seringa, e posteriormente as seringas com o material colhido foram armazenadas em caixa de isopor com gelo.

Concentração espermática

A avaliação da concentração espermática do sêmen foi realizada de forma individual a partir do sêmen proveniente de cada animal, utilizando-se os métodos de contagem de espermatozoides (espermatozoides/mL) em câmara hematimétrica de Neubauer (Wirtz e Steinmann, 2006), e estabelecendo a relação desta medida com o espermatócrito (RIDEOUT et al., 2004). Para a contagem de células na câmara de Neubauer foi utilizada uma amostra de 10 μ L de sêmen, previamente diluído (1:1000) em solução de formol-citrato (2,9 g de citrato de sódio, 4,0 mL de formaldeído 35% e 100 mL água destilada), e a concentração espermática foi calculada conforme CBRA (1998). A avaliação do espermatócrito foi realizada utilizando-se tubos capilares de micro-hematócrito, preenchidos com aproximadamente 70% de sêmen e vedados em uma das extremidades. Em seguida, os tubos foram submetidos a centrifugação por 15 min a 12.000 rotações por minuto em uma microcentrífuga. Após a centrifugação o percentual de massa celular presente no sêmen foi quantificado com uma régua (SANCHES et al, 2011).

Integridade da membrana celular

O percentual de espermatozoides com membrana celular íntegra foi quantificado pelo método de coloração (NASR-ESFAHANI et al., 2002). Este método, quando o sêmen é homogeneizado ao corante os espermatozoides mortos coram-se em rosa, devido à permeabilidade ao corante, enquanto que as células vivas permanecem incolores.

Uma alíquota de 10 µl de sêmen foi homogeneizada com 90 µL de soro fisiológico, corada com 40 µl de nigrosina e 20 µl de eosina, e posteriormente foi realizado um esfregaço com uma alíquota de 1,0 µl da mistura (SANCHES et al., 2011). Após este preparo os espermatozoides foram analisados em microscópio de luz (Leica DMLB, 100 X), considerando-se como não íntegros aqueles cujas células apresentaram coloração rosada, ou seja, que absorveram corantes, e como íntegros aqueles que não coraram, porque apresentavam membranas íntegras, impermeáveis aos corantes (KAVAMOTO e FOGLI da SILVEIRA, 1986).

Preparação e ativação dos espermatozoides

Para ativação do sêmen dois contaminantes biológicos foram utilizados: plasma sanguíneo e urina. Para obtenção do plasma sanguíneo, foi coletado sangue através da punção do vaso caudal com seringa descartável contendo EDTA. Os indivíduos foram anestesiados com eugenol. O plasma sanguíneo foi obtido pela centrifugação de microtubo de 2,0 mL a 1400 g durante 10 min, que foi armazenado a -4,0 °C. A urina foi obtida pela compressão abdominal de cada animal um pouco antes da liberação do sêmen, sendo coletada com uma seringa colocada junto à papila urogenital; a urina dos indivíduos foi recolhida e misturada em um único “pool” em tubos tipo Falcon de 20 mL, que foram imediatamente armazenados a -4,0 °C em um refrigerador.

A osmolaridade do plasma e da urina foram avaliadas em um osmômetro crioscópico (PLZ, modelo PLZ-1000), e o pH foi avaliado com peagômetro digital.

Motilidade espermática

A motilidade espermática foi avaliada através da análise computacional assistida (CASA), método que consiste na determinação dos padrões de movimentação espermática (Sanches et al. 2010; Wilson-Leedy e Ingermann 2007). A fim de assegurar a ativação

sincronizada de todos os espermatozoides, uma amostra de sêmen de cada animal foi ativada com três soluções ativadoras distintas: água mineral, plasma sanguíneo e urina, na proporção de 1:1000 (sêmen/solução) em temperatura ambiente (23-24 °C). Em seguida 10 µL da solução final foram colocados em câmara de Neubauer, e a motilidade espermática foi gravada em vídeos com duração de 10, 20, 30 e 40 s, utilizando-se uma câmera com objetiva de contraste de fase com ampliação de dez vezes (taxa de 100 frames/s) acoplada a um microcomputador. A gravação dos vídeos, a compilação das imagens e a análise utilizando o aplicativo CASA do software Image J seguiu o protocolo proposto por (KIME et al., 2001), previamente padronizado para *S. scriptum*.

As variáveis avaliadas no aplicativo CASA foram: a velocidade curvilínea (VCL; µm/s), que mostra o percurso real dos espermatozoides; a velocidade média do deslocamento (VAP; µm/s), que mostra o percurso irregular, e não linear; a velocidade em linha reta (VSL; µm/s), que é estabelecida entre o primeiro e o último ponto do percurso do espermatozoide, e a linearidade (LIN), que é a relação percentual entre a VSL/VAP (MORTIMER, 2000, VERSTEGEN et al., 2002).

Morfologia dos espermatozoides

Uma amostra de 10 µL do sêmen coletado foi diluída (1:1000) em solução de formol-citrato (2,9 g de citrato de sódio, 4,0 µL de formaldeído 35% e 100 mL de água destilada), e desta diluição foi retirada uma alíquota de 1,0 µL, a qual foram adicionados 40 µL de corante rosa de bengala (STREIT JR et al., 2004).

Posteriormente uma alíquota de 1,0 µL de sêmen corado, foi colocada sobre uma lâmina, sendo o líquido espalhado com a ajuda de outra lâmina. Depois de seco o esfregaço foi observado em microscópio de luz para contagem ($n=200$) e classificação dos espermatozoides em normais ou com a presença de anormalidades, conforme descrito por STREIT JR (2008). As anormalidades foram classificadas em primárias, quando os espermatozoides apresentavam cauda dobrada, cauda enrolada, cauda curvada, cabeça pequena, cabeça grande ou cauda dupla, enquanto espermatozoides com cauda tipo gancho, sem cabeça ou sem cauda foram classificados como apresentando anormalidades secundárias.

Experimento 2

Neste experimento foi utilizado o sêmen de oito machos ($260,0 \pm 70,2$ g), que foram submetidos a tratamento hormonal conforme descrito no Experimento 1.

A coleta, o armazenamento do sêmen, a quantificação da concentração de espermatozoides e da taxa de sobrevivência seguiram os procedimentos descritos no experimento 1.

Antes da ativação o sêmen foi diluído na proporção de 1:500 μL em soro fisiológico. O sêmen foi ativado utilizando diferentes porcentagens de urina equivalentes 10, 30, 50 e 70 %. A motilidade foi analisada através de análise computacional assistida (CASA), conforme realizada no experimento 1, com os vídeos avaliados aos 12 s.

Análise estatística

No experimento 1, para cada tempo analisado, foi aplicada ANOVA, seguida pelo teste de Tukey para comparação de médias, quando necessário, ao nível significância de 5,0 %. As premissas de normalidade e homogeneidade foram verificadas por meio dos testes de Levene e Shapiro-Wilk. Antes da análise, às variáveis analisadas que apresentaram dados de distribuição anormal foi aplicada a transformação angular ($\arcsen\sqrt{p}$). No experimento 2 foi aplicada a análise de regressão linear ao nível de significância de 5,0 %.

RESULTADOS

Os parâmetros do sêmen analisado estão apresentados na Tabela 1, onde se verifica que as amostras apresentaram elevados percentuais de células viáveis ($94,3 \pm 3,1\%$), valores de médio a baixo para anormalidades ($11,8 \pm 5,3$ %) e elevados para a normalidade morfológica dos espermatozoides ($88,1 \pm 5,3$ %). A osmolaridade do sêmen e do plasma sanguíneo foi muito semelhante, e treze vezes maior que a da urina.

Uma alta relação foi registrada entre a concentração espermática e o espermatócrito, representada pela equação de regressão $y = 1,0 E^{09}x - 9,0 E^{08}$ ($P < 0,05$; $R^2 = 0,8058$). É possível, portanto, estimar a concentração espermática do suruvi a partir do espermatócrito (Figura 1), sendo este um método confiável, que permite a otimização do tempo e de recursos para avaliar a concentração espermática.

Tabela 1: Parâmetros espermáticos do sêmen de suruvi *Steindachneridion scriptum* (média \pm desvio padrão) durante o experimento 1.

Parâmetros espermáticos	
Concentração (sptz/mL)	$7,72 \times 10^9 \pm 2,85 \times 10^9$
Volume total ajustado (kg/mL)	$8,14 \pm 4,67$
Espermatócrito (%)	$8,87 \pm 2,63$
Integridade de membranas (%)	$94,33 \pm 3,10$
Anormalidade morfológica (%)	$11,86 \pm 5,35$
Normalidade morfológica (%)	$88,14 \pm 5,35$
Osmolaridade do sêmen (mOsm)	$261,67 \pm 3,82$
Osmolaridade da urina (mOsm)	$20,83 \pm 1,44$
Osmolaridade do plasma sanguíneo (mOsm)	$255,83 \pm 1,44$
pH do sêmen	$7,87 \pm 0,03$
pH da urina	$7,55 \pm 0,57$
pH do plasma sanguíneo	$7,51 \pm 0,17$

Para a motilidade espermática foi registrada diferença significativa ($P < 0,05$) entre os ativadores água mineral e urina quando comparados com o plasma sanguíneo, que não ativou o sêmen.

A motilidade espermática do sêmen ativado com água e urina (Figura 2) aos 10 s foi de $80,0 \pm 10,0$ % e $70,0 \pm 16,0$ %, apresentando diminuição constante até os 40 s, quando foi inferior a 20 %. A partir dos 30 s verificou-se que a motilidade do sêmen ativado com urina foi maior ($58,0 \pm 15,0$ %) que a registrada com água ($39,0 \pm 18,0$ %).

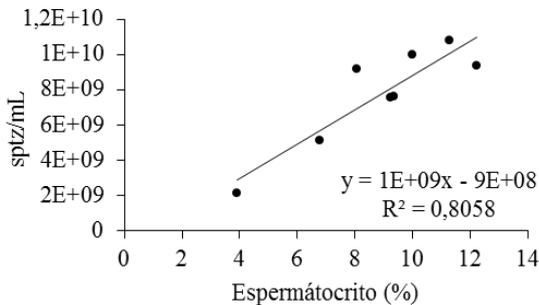


Figura 1: Relação entre a concentração espermática mensurada por contagem em câmara hematimétrica de Neubauer e o espermatócrito do sêmen de *Steindachneridion scriptum*.

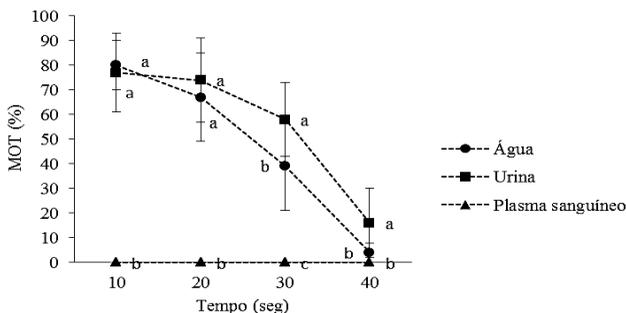


Figura 2: Motilidade espermática (%) de *Steindachneridion scriptum* até 40 s após a ativação com água mineral, urina e plasma sanguíneo. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) dentro de um determinado tempo pelo teste de Tukey.

A velocidade curvilinear apresentou os maiores valores, considerando-se as soluções utilizadas (Figura 3). Entre 10 e 30 s pode-se observar que houve diferenças significativas ($P < 0,05$) entre elas, que não foi registrada aos 40 s. Em geral a VCL diminuiu de forma constante tanto no tratamento com urina, de $158,4 \pm 13,1 \mu\text{m/s}$ para $58,0 \pm 11,5 \mu\text{m/s}$, quanto no tratamento com água de $136,6 \pm 15,7 \mu\text{m/s}$ para $48,0 \pm 20,4 \mu\text{m/s}$.

As mudanças da velocidade média do deslocamento (VAP) ao longo do tempo (Figura 3) foram quantitativamente semelhantes às tendências observadas para VCL. No decorrer do tempo houve diferenças significativas na VAP a partir da ativação, quando houve acentuado declínio, de $122,6 \pm 19,43 \mu\text{m/s}$, aos 10 s, para $21,0 \pm 8,56 \mu\text{m/s}$ aos 40 s para água, sendo que para a urina a velocidade diminuiu de $148,0 \pm 13,90 \mu\text{m/s}$ para $21,0 \pm 2,37 \mu\text{m/s}$.

A VSL apresentou diferenças significativas entre os ativadores a partir dos 10 s, com uma alta redução na velocidade quando ativado com água, com média de $111,4 \pm 20,6 \mu\text{m/s}$, enquanto aos 20s a velocidade dos espermatozoides decresceu de $55,0 \pm 9,19 \mu\text{m/s}$ para $30,6 \pm 2,58 \mu\text{m/s}$ chegando aos 40s com $20,6 \pm 8,46 \mu\text{m/s}$ (Figura 3). Quando ativados com urina declinou de $133,2 \pm 10,15 \mu\text{m/s}$, aos 20 s para $73,3 \pm 8,91 \mu\text{m/s}$, finalizando com $20,6 \pm 8,46 \mu\text{m/s}$.

A análise da linearidade (Figura 3d), mostrou que não houve diferenças significativas entre os ativadores, sendo que os espermatozoides apresentaram um movimento linear, com movimentos circulares poucos evidentes.

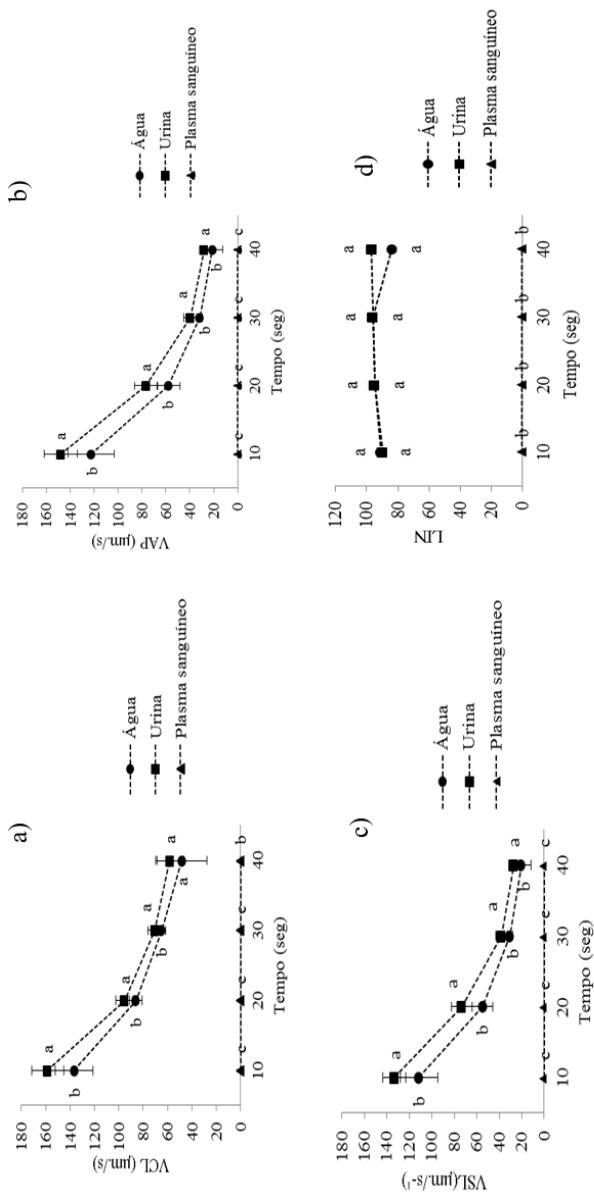


Figura 3: Velocidade curvilinear (a; VCL), velocidade média do deslocamento (b; VAP), velocidade em linha reta (c; VSL) e linearidade (d; LIN) dos espermatozoides de *Steindachmeridion scriptum* até 40 s após a ativação com água mineral, urina e plasma sanguíneo. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) dentro de um determinado tempo pelo teste de Tukey

A avaliação morfológica dos espermatozoides de *S. scriptum* (Figura 4) mostrou maior frequência da anormalidade secundária sem cauda no sêmen ($50,5 \pm 30,9$ %), seguida pela anormalidade primária cauda curvada ($36,8 \pm 29,7$ %), sem cabeça ($6,6 \pm 5,9$ %), e pelas anormalidades primárias cauda dobrada ($5,2 \pm 6,5$ %), cabeça pequena ($0,96 \pm 2,7$ %) e cauda dupla ($0,27 \pm 0,75$ %).

Experimento 2

Assim como no experimento anterior, foi registrada relação diretamente proporcional, entre a concentração espermática e o espermátócrito de *S. scriptum* (Figura 5).

Neste experimento foi observado que o aumento da concentração de urina influenciou a motilidade do sêmen (Figura 6; $P < 0,05$; $R^2 = 0,8524$). A menor concentração de urina, 10 %, não ativou o sêmen, entretanto o aumento da proporção de urina produziu motilidade espermática, condição corroborada pela velocidade curvilínea (VCL), velocidade média do deslocamento (VAP) e velocidade em linha reta (VSL), para as quais também foi registrado o mesmo padrão (Figura:7).

A linearidade mostrou que trajetória dos espermatozoides foi altamente linear para todas as concentrações de urina que ativaram o sêmen (Figura 7d).

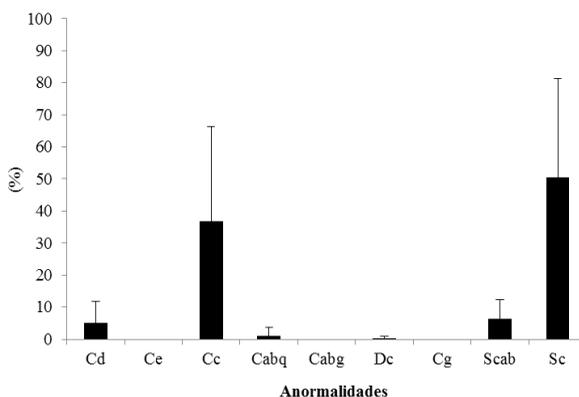


Figura 4: Anormalidades primárias e secundárias dos espermatozoides de *Steindachneridion scriptum*: Cd: cauda dobrada. Ce: cauda enrolada. Cc: cauda curvada. Cabp: cabeça pequena. Cabg: cabeça grande. Cd: cauda dupla (Cd); e as secundarias Cg: cauda gancho, Scab: sem cabeça. Sc: sem cauda (Sc).

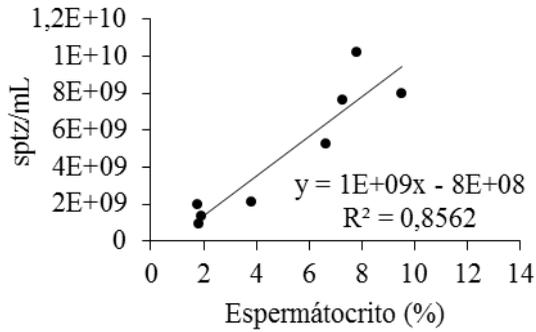


Figura 5: Relação entre a concentração espermática mensurada por contagem em câmara hematimétrica de Neubauer e pelo espermátocrito do sêmen de *Steindachneridion scriptum*.

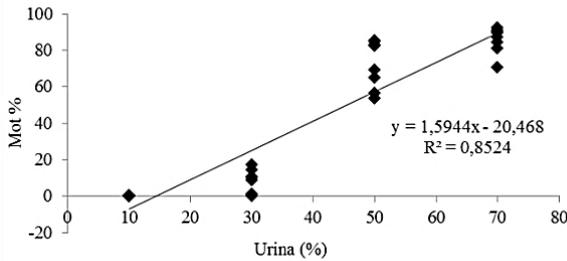


Figura 6: Motilidade espermática do sêmen de *Steindachneridion scriptum* ativado com diferentes proporções de urina. A equação representa a relação entre a motilidade e a porcentagem de contaminação com urina ($P < 0,05$).

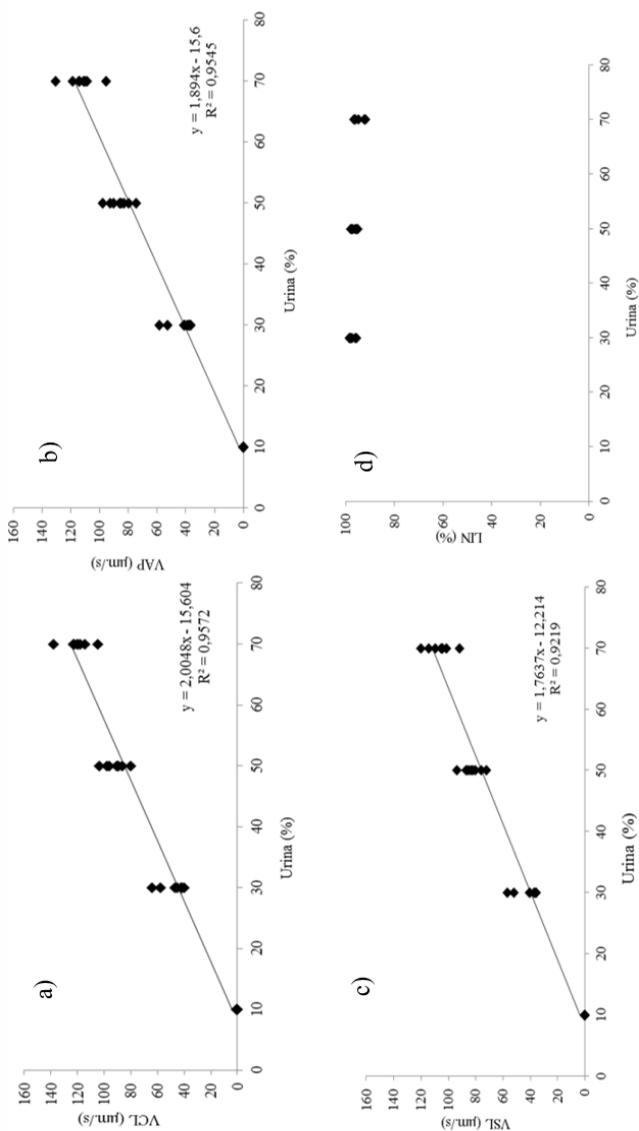


Figura 7: Velocidade curvilinear (a; VCL), velocidade média do deslocamento (b; VAP), velocidade em linha reta (c; VSL) e linearidade (d; LIN) dos espermatozoides de *Steindachmeridon scriptum* ativados com diferentes porcentagens de urina (10, 30, 50 e 70%). As equações representam variáveis com regressão linear significativa ($P < 0,05$).

O padrão de morfologia dos espermatozoides (Figura 8) foi semelhante ao encontrado no primeiro experimento, tendo sido registrada maior frequência de anormalidades secundárias, com indivíduos sem cauda ($62,05 \pm 22,70$ %), seguida pelas anormalidades primárias cauda curvada ($18,55 \pm 23,49$ %), sem cabeça ($7,23 \pm 10,63$ %), cauda dobrada ($9,11 \pm 13,80$ %) e cauda dupla ($2,72 \pm 7,69$ %).

Os parâmetros do sêmen analisado estão apresentados na Tabela 2. Considerando-se a técnica empregada, as amostras apresentaram alto percentual de células viáveis, e espermatozoides com alto índice de normalidade morfológica.

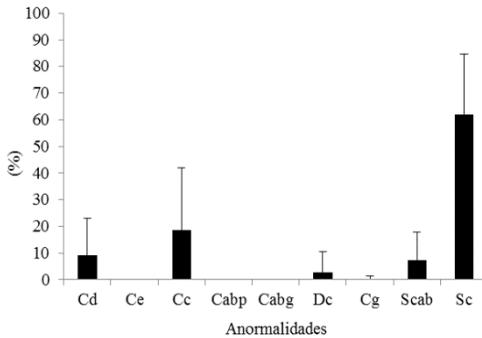


Figura 8: Anormalidades primárias e secundárias dos espermatozoides de *Steindachneridion scriptum*. Primárias: Cd: cauda dobrada. Ce: cauda enrolada. Cc: cauda curvada. Cabp: cabeça pequena. Cabg: cabeça grande. Cd: cauda dupla. Secundárias: Cg: cauda gancho. Scab: sem cabeça. Sc: sem cauda.

Tabela 2: Parâmetros qualitativos do sêmen de suruvi *Steindachneridion scriptum* (média \pm desvio padrão) durante o experimento 2.

Parâmetros espermáticos	
Concentração (sptz/mL)	$4,62 \cdot 10^9 \pm 3,58 \times 10^9$
Volume ajustado (kg/mL)	$1,48 \pm 0,91$
Espermatócrito (%)	$5,08 \pm 3,11$
Integridade de membranas (%)	$90,33 \pm 15,67$
Anormalidade morfológica (%)	$11,2 \pm 6,34$
Normalidade morfológica (%)	$88,75 \pm 6,34$

DISCUSSÃO

O volume de sêmen obtido nos experimentos foi semelhante aos obtidos por (Luz et al., 2001) para o suruvi (1,60 a 9,09 mL/kg) que utilizou o sêmen de indivíduos adultos. De acordo com Viveiros e Godinho (2009), o volume de sêmen é muito variável em peixes teleósteos. (Maria et al., 2010), em seu estudo sobre o sêmen do tambaqui *Colossoma macropomum*, encontraram valores de $10,2 \pm 5,1$ mL, enquanto (Sanches et al., 2010), em estudo com o jundiá, encontraram volumes de $4,9 \pm 1,4$ mL. Corroborando com Canappele (2011), que analisou o ciclo reprodutivo de *S. parahybae*, os volumes somados por exemplar durante o período de seis coletas estiveram entre 8,2 e 67,0 mL, sendo que para esta mesma espécie Sanches (2012) encontrou valores de $26,8 \pm 7,1$ mL.

A concentração espermática variou em ambos os experimentos apresentando valores inferiores aos encontrados por (Luz et al., 2001) ($19,50$ a $120,15 \times 10^9$ spz/mL) para a mesma espécie deste estudo, onde utilizaram-se cinco machos com peso entre 1,8 e 4,7 kg, submetidos ao tratamento de hipofiseação. Estudos com *S. parahybae* e jundiá mostraram variação de $3,50 \times 10^9$ a $11,5 \times 10^9$ e $9,24 \pm 0,88 \times 10^9$ e $8,75 \pm 0,58 \times 10^9$ spz/mL, conforme (Sanches et al., 2010) e Canappele (2011) respectivamente. Sanches (2012) encontrou valor um pouco menor para *S. parahybae* ($1,70 \times 10^{10}$), que pode estar relacionado à quantidade de indivíduos analisados, desse modo, as variações dos parâmetros espermáticos entre os indivíduos indica que a quantidade de machos deve ser considerada em trabalhos com sêmen de peixes. Esta concentração geralmente é utilizada na avaliação do sêmen de animais que possuem fecundação interna e externa, com intuito de obter um melhor aproveitamento e melhores resultados na fertilização (FOGLI Da SILVEIRA et al., 1990).

Para *S. scriptum* foi encontrada relação entre a concentração espermática e o espermatócrito (Shimoda et al., 2007) verificaram a viabilidade do espermatócrito para estimar a concentração espermática do sêmen da piabanha, *Brycon insignis*, e seus resultados foram semelhantes ao deste estudo, onde a regressão foi significativa ($P < 0,01$) mostrando alto coeficiente de determinação ($R^2 = 0,75$), portanto é possível avaliar a concentração espermática a partir da obtenção do espermatócrito (Sanches et al., 2011) identificaram esta mesma condição para curimba (*Prochilodus lineatus*), jundiá (*Rhamdia quelen*) e tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), em estudo que também envolveu as

espécies dourado (*Salminus brasiliensis*) e cascudo-preto (*Rhinelepis aspera*), para as quais esta condição não foi encontrada.

A motilidade espermática de *S. scriptum* neste estudo foi inferior a 60 % até os 40s de ativação, quando ativados com água e urina, e quando ativados com água a motilidade decresceu em 40 s. (Luz et al. 2001) observaram valores semelhantes a este, em que o tempo de motilidade do sêmen de suruvi variou de 46 a 75 s quando ativado com água do tanque, e de 37 a 56 s quando ativado com solução de bicarbonato de sódio 1,0 %.

Os espermatozoides não apresentaram movimentação quando foi quando foi utilizado plasma sanguíneo, uma vez que a osmolaridade do sêmen e do plasma sanguíneo são semelhantes, e devido a isso o plasma sanguíneo não foi capaz de ativar a motilidade espermática dos animais analisados. Como a urina do suruvi apresentou baixa osmolaridade, ela propiciou a ativação da motilidade espermática.

Ciereszko et al., (2004) relataram que 0,2 % de contaminação do sêmen com sangue não produziu efeito sobre a motilidade no sêmen de truta (*Oncorhynchus mykiss*). Porém (Ingermann et al., 2010) relataram que se a contaminação sanguínea fosse induzir motilidade prematura, mesmo localmente, tal contaminação poderia afetar negativamente a qualidade do sêmen em salmonídeos, uma vez que seus espermatozoides geralmente apresentam motilidade inferior a um minuto.

Após a ativação, foi observada uma continua redução da motilidade espermática, de acordo com a análise do software CASA, resultados semelhantes aos encontrados por (SANCHES et al., 2010) para *R. quelen*, para a qual foi registrada redução contínua da motilidade e das velocidades espermáticas VCL, VAP e VSL logo após a ativação em 15, 25 e 35 s. Essa mesma condição ocorreu para outra espécie de bagre endêmica da bacia do rio Paraíba do Sul, *Steindachneridion parahybae*, para a qual o comportamento dos espermatozoides, avaliado entre 10 e 20 s e entre 10 e 50 s após a ativação, também mostrou continua redução da qualidade espermática (SANCHES et al., 2012).

A redução da capacidade de natação dos espermatozoides deve-se à diminuição do estoque de energia, que ocorre em função da rápida resposta de ativação pelo meio circundante. As mitocôndrias são as organelas responsáveis pela liberação de energia, e elas estão diretamente ligadas aos flagelos, que por sua vez são responsáveis por dar movimento aos espermatozoides (BILLARD, 1999; COSSON, 2010). A VCL, VAP e VSL dos espermatozoides do suruvi ativados com água, decorridos 40 s, foram semelhantes às registradas para

S. parahybae por Sanches (2012). O uso de água destilada para ativação do sêmen de *S. parahybae* mostrou que as velocidades demonstraram valores semelhantes aos deste estudo com valores de VCL, VAP e VSL de $103,01 \pm 25,40 \mu\text{m/s}$, $85,76 \pm 30,60 \mu\text{m/s}$ e $81,95 \pm 29,97 \mu\text{m/s}$ respectivamente Sanches (2012).

Os espermatozoides de suruvi apresentaram predominantemente uma trajetória linear. Segundo Cosson (2010) a motilidade espermática e a linearidade são bons indicadores de qualidade e representam uma descrição extensa das características do movimento do esperma.

Sanches et al., (2015), avaliando a motilidade *S. parahybae*, encontraram correlações positivas com os parâmetros espermáticos estudados, com exceção da linearidade, para a qual obteve correlação negativa. Nesse caso, quando a motilidade é alta, mais espermatozoides com movimentos aleatórios ou circulares são observados, e quando a motilidade é baixa, predominam os espermatozoides com movimento reto. De acordo com (Sanches et al., 2010), pode-se supor que os espermatozoides exibindo movimentos retos morrem eventualmente e não participam na motilidade. Para *R. quelen*, esses autores mostraram que a motilidade espermática observada no software CASA aos 15, 25 e 35 s não apresentou linearidade.

No presente estudo espermatozoides sem cauda e com cauda curvada foram a anormalidade mais frequente (Kavamoto et al., 1999) verificaram que para curimatá (*Prochilodus scrofa*) as anormalidades morfológicas mais comuns nos espermatozoides foram a falta de cauda, a cauda dobrada ou enrolada (Maria et al., 2010) em seu estudo observaram que as anormalidades morfológicas variaram entre 9,7 e 23,4%. Frequentemente lesões nos espermatozoides podem estar relacionadas com o meio hiposmótico, no qual a osmolaridade do meio diluidor produz injúrias na cabeça e na cauda dos espermatozoides (COSSON et al., 1999). Segundo (Rurangwa et al., 2004), as alterações morfológicas da estrutura dos espermatozoides podem, de maneira direta, ter grande influência na fertilidade dos reprodutores.

Para o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998), reprodutores que apresentem sêmen com anormalidades acima de 30 % para bovinos, 40 % para equinos e 20 % para suínos, ovinos e caprinos, apresentam capacidade reduzida de fertilização e são inviáveis em programas de reprodução. Para peixes, entretanto, ainda não estão determinados os índices morfológicos que possam indicar até o que ponto os reprodutores são viáveis (SANCHES, 2009).

O sêmen ativado com até 10% de urina não apresentou motilidade, porém com o aumento das porções houve aumento

significativo ($P < 0,05$) nas velocidades analisadas pelo software CASA. (Poupard et al., 1998) constataram que após adição de 5,0 % de urina a porcentagem de espermatozoides com elevada velocidade diminuiu (de 90 ± 3 para $30 \pm 3\%$) e aqueles com baixa velocidade aumentaram (de 5 ± 2 para $65 \pm 5\%$) conforme aumento da adição de urina (Dreanno et al., 1998) determinaram que a qualidade do sêmen do *Psetta máxima* foi influenciada pela porcentagem de contaminação com proporção de urina maior que 30 % para um tempo de incubação de 15 min.

A ativação dos espermatozoides de *Tinca tinca*, no sêmen contaminado com 0,5-2,0 mL de urina continha altas concentrações de íons, como Na^+ ($30,9 \pm 8,9$ mM), K^+ ($4,3 \pm 2,9$ mM), Ca^{2+} ($0,9 \pm 0,5$ mM) e Mg^{2+} ($0,6 \pm 0,2$ mM), sendo que a ativação foi de até 100% (LINHART et., 2003). Já em trutas arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, as adições de urina ao sêmen exposto a 10, 20 e 30 % de contaminação resultaram em 44, 48 e 68 % de redução na porcentagem de espermatozoides móveis, respectivamente, levando a uma diminuição da osmolaridade do plasma seminal, de 301 para 203 mOsm/kg (NYNCA et al, 2012).

Os resultados deste estudo demonstraram que a urina é um potencial ativador espermático do sêmen do suruvi *Steindachneridion scriptum*, sendo recomendado o descarte de amostras contaminadas com mais de 10% de urina, para evitar a progressiva perda da qualidade do sêmen durante o seu armazenamento e uso posterior. No entanto o plasma sanguíneo utilizado como ativador em sêmen fresco não produziu nenhum efeito sobre a motilidade dos espermatozoides de suruvi, e deste modo às amostras contaminadas com sangue não precisam ser descartadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Billard, R., Cosson, M. P. (1992). Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology, 261(2), 122-131.

Caneppele, D. 2011. *Steindachneridion parahybae* (Steindachner, 1876) (Siluriformes: Pimelodidae): produção espermática ao longo de um ciclo reprodutivo. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura e Pesca. Instituto de Pesca, APTA-SAA, São Paulo.

Carolsfeld, J.; Harvey, B. Conservação de recurso genético de peixes: teoria e prática. World Fisheries Trust. Apostila: Curso de treinamento Brasileiro, 1999.

Ciereszko A. Chemical composition of seminal plasma and its physiological relationship with sperm motility, fertilizing capacity and cryopreservation success in fish. In: Fish Spermatology (ed. by S.M.H. Alavi, J. Cosson, K. Coward & G. Rafiee), pp. 215-240, Ch 6, Alpha Sci. Intl. Ltd, Oxford, UK. (2008).

Ciereszko, A.; Własow, T.; Dobosz, S., Goryczko, K.; Glogowski, J. (2004). Blood cells in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* milt: relation to milt collection method and sampling period. *Theriogenology*, 62(7), 1353-1364.

Colégio Brasileiro De Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal. 2 ed. Belo Horizonte, p. 49. 1998.

Cosson, J. (2010). Frenetic activation of fish spermatozoa flagella entails short-term motility, portending their precocious decadence. *Journal of Fish Biology*, 76(1), 240-279 *Journal of Fish Biology*, 76(1), 240-279.

Cosson, J.; Dreanno, C.; Billard, R.; Suquet, M.; Cibert, C. (1999). Regulation of axonemal wave parameters of fish spermatozoa by ionic factors. The male gamete: from basic knowledge to clinical applications, 161-186.

Dreanno, C.; Suquet, M.; Desbruyères, E.; Cosson, J.; Le Delliou, H.; Billard, R. (1998). Effect of urine on semen quality in turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture*, 169 (3), 247-262. *Aquaculture*, 169 (3), 247-262.

Fogli da Silveira, W.; Kavamoto, E. T.; Cestarolli, M. A.; Godinho, H. M.; Ramos, S. M.; Silveira, A. N. (1990). Avaliação espermática, preservação criogênica e fertilidade do sêmen do pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), proveniente de reprodução induzida. *B Inst Pesca*, 17, 1-13.

Garavello, J. C. (2005). Revision of genus *Steindachneridion* (Siluriformes: Pimelodidae). *Neotropical ichthyology*, 3(4), 607-623.

Godinho, H. P. (2000). Criopreservação de sêmen de peixes. *Informe agropecuário*, 21(203), 6-20.

Ingermann, R. L.; Kanuga, M. K.; Wilson-Leedy, J. G. (2010). Effect of blood plasma on motility of steelhead sperm. *Aquaculture Research*, 41(7), 1107-1112.

Kavamoto, E. T.; Fogli da Silveira, W. (1986). Características físicas, químicas e microscópicas do sêmen do bagre, *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840) em condições de campo. *Boletim do Instituto de Pesca*, 13(1), 95-100.

Kavamoto, E. T.; Silveira, W. F.; Godinho, H. M. (1986). Características seminais do curimatá, *Prochilodus scrofa*, Steindachner 1881. *Boletim do Instituto de Pesca*, 13(2), 45-50.

Kime, D. E.; Van Look, K. J. W.; McAllister, B. G.; Huyskens, G.; Rurangwa, E.; Ollevier, F. (2001). Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part: Toxicology e Pharmacology*, 130(4), 425-433.

Linhart, O.; Rodina, M.; Bastl, J.; Cosson, J. (2003). Urinary bladder, ionic composition of seminal fluid and urine with characterization of sperm motility in tench (*Tinca tinca L.*). *Journal of Applied Ichthyology*, 19(3), 177-181.

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

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.

Meurer, S.; Zaniboni Filho, E. (2000). O suruvi *Steindachneridion scripta* (Ribeiro, 1918) como espécie alternativa para a piscicultura sul brasileira. *Simpósio Brasileiro de Aquicultura*, 11.

Mortimer, S. T. (2000). CASA—practical aspects. *Journal of andrology*, 21(4), 515-524.

Nasr-Esfahani, M. H., Aboutorabi, R., Esfandiari, E., Mardani, M. (2002). Sperm MTT viability assay: a new method for evaluation of human sperm viability. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 19(10), 477-482.

Nynca, J.; Dietrich, G. J.; Kuźmiński, H.; Dobosz, S.; Ciereszko, A. (2012). Motility activation of rainbow trout spermatozoa at pH 6.5 is directly related to contamination of milt with urine. *Aquaculture*, 330, 185-188.

Poupard, G. P.; Paxion, C.; Cosson, J.; Jeulin, C., Fierville, F.; Billard, R. (1998). Initiation of carp spermatozoa motility and early ATP reduction after milt contamination by urine. *Aquaculture*, 160(3), 317-328.

Rideout, R. M.; Trippel, E. A.; Litvak, M. K. (2004). Relationship between sperm density, spermatocrit, sperm motility and spawning date in wild and cultured haddock. *Journal of Fish Biology*, 65(2), 319-332.

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), 1-28.

Sanches, E. A.; Okawara, R. Y.; Caneppele, D.; Toledo, C. P. R.; Bombardelli, R. A.; Romagosa, E. (2015). Sperm characteristics of *Steindachneridion parahybae* (Steindachner, 1877) throughout 112 h of storage at four temperatures. *Journal of Applied Ichthyology*, 31(S1), 79-88.

Sanches, E. A.; Bombardelli, R. A.; Marcos, R. M.; Neumann, G., De Toledo, C. P. R.; Romagosa, E. (2010). Sperm motility of *Rhamdia quelen* studied using computer-assisted analysis by open-source software. *Aquaculture Research*, 42(1), 153-156.

Sanches, E. A. (2009). Efeito da estocagem a curto prazo e da temperatura sobre gametas de Jundiá, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824).

Sanches, E. A.; Marcos, R. M.; Baggio, D. M.; Tessaro, L.; Balen, R. E.; e Bombardelli, R. A. (2011). Estimativa da concentração espermática do sêmen de peixe pelo método de espermátocrito. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 1163-1167.

Sanches, E. A. (2012). Metodologias de avaliação de sêmen e procedimentos de fertilização artificial de surubim-do-paraíba, *Steindachneridion parahybae*.

Shimoda, E.; de Andrade, D. R.; Junior, M. V. V.; Yasui, G. S., Godinho, H. P.; Silva, J. F. S.; Sousa, G. (2007). Utilização do espermátocrito para estimar a concentração espermática no sêmen da piabanha (*Brycon insignis*). *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 44 (supl.), 19-24.

Streit-Junior, D. P.; Moraes, G. V.; Ribeiro, R. P.; Povh, J. A.; Souza, E. D.; Oliveira, C. A. (2004). Avaliação de diferentes técnicas para coloração de sêmen de peixes. *Arq. ciênc. vet. zool. UNIPAR*, 7(2), 157-162.

Verstegen, J.; Iguer-Ouada, M.; Onclin, K. (2002). Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, 57(1), 149-179.

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

Wirtz, S.; Steinmann, P. (2006). Sperm characteristics in perch *Perca fluviatilis* L. *Journal of fish biology*, 68(6), 1896-1902.

Zaniboni-filho, E.; Barbosa, N. D. C. 1996. Priming hormone administration to induce spawning of some Brazilian migratory fish. *Revista Brasileira de Biologia*, v. 56, n. 4, p. 655-659.

Zaniboni Filho, E. (2004). *Catálogo ilustrado de peixes do alto rio Uruguai*. Editora da UFSC.

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

- Abreu, M. R. D.; Garcia, P.; Zaniboni-Filho, E. (2015). Histological characterization of oocyte developmental stages of suruvi *Steindachneridion scriptum* kept in captivity. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 37(4), 351-356.
- Adamante, W. B.; Weingartner, M.; Nuñez, A. P. O. (2007). Feed transition in larval rearing of bocudo, *Steindachneridion scripta* (Pisces, Pimelodidae), using *Artemia* spp. nauplii and artificial diet. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 59 (5), 1294-1300.
- Agostinho, A. A.; Zaniboni-FILHO, E; Shibatta, O; Garavello, J. *Steindachneridion scripta*. In: MACHADO, A. B. M.; DRUMMOND, G. M.; PAGLIA, A. P. (Eds). Livro Vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. V. II. Brasília: MMA, Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, p.239-249, 2008.
- Alavi, S. M. H., Cosson, J. (2006). Sperm motility in fishes.(II) Effects of ions and osmolality: a review. *Cell biology international*, 30(1), 1-14.
- Billard, R.; Cosson, M. P. (1992). Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 261(2), 122-131.
- Billard, R. Artificial insemination in fish. In: LAMMING, G. E. (Org.). *Marshall's physiology of reproduction*. 4.th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, Chap. 9, p. 870-887. 1990.
- Bobe, J., Labbé, C. (2010). Egg and sperm quality in fish. *General and comparative endocrinology*, 165(3), 535-548.
- Ciereszko A. Chemical composition of seminal plasma and its physiological relationship with sperm motility, fertilizing capacity and cryopreservation success in fish. In: *Fish Spermatology* (2008). (ed. by S.M.H. Alavi, J. Cosson, K. Coward & G. Rafiee), pp. 215 240, Ch 6, Alpha Sci. Intl. Ltd, Oxford, UK.
- Ciereszko, A.; Własow, T.; Dobosz, S.; Goryczko, K.; Glogowski, J. (2004). Blood cells in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* milt: relation

to milt collection method and sampling period. *Theriogenology*, 62(7), 1353-1364.

Cosson, J.; Billard, R.; Cibert, C.; Dreanno, C.; Suquet, M. (1999). Ionic factors regulating the motility of fish sperm. The male gamete: from basic to clinical applications, 161-186.

Dreanno, C.; Suquet, M.; Desbruyères, E.; Cosson, J.; Le Delliou, H.; e Billard, R. (1998). Effect of urine on semen quality in turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture*, 169(3), 247-262.

Epagri-Cedap. Desempenho Catarinense na Piscicultura de Água Doce. Florianópolis: Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural Santa Catarina - EPAGRI, Centro de Desenvolvimento em Aquicultura e Pesca - CEDAP, 2015. 11 p.

Fao. EL estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. Roma. 224 pp. 2016.

Garavello, J. C. (2005). Revision of genus *Steindachneridion* (Siluriformes: Pimelodidae). *Neotropical ichthyology*, 3(4), 607-623.

Ibge (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas). Produção da pecuária municipal. Rio de Janeiro, 2016. v. 43, p.149.

Kavamoto, E. T., Fogli da Silveira, W. (1986). Características físicas, químicas e microscópicas do sêmen do bagre, *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840) em condições de campo. *Boletim do Instituto de Pesca*, 13(1), 95-100.

Kime, D. E.; Van Look, K. J. W.; McAllister, B. G.; Huyskens, G.; Rurangwa, E.; Ollevier, F. (2001). Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part: Toxicology e Pharmacology*, 130(4), 425-433.

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(1), 163-181.

Linhart, O.; Rodina, M.; Bastl, J.; Cosson, J. (2003). Urinary bladder, ionic composition of seminal fluid and urine with characterization of sperm motility in tench (*Tinca tinca* L.). *Journal of Applied Ichthyology*, 19(3), 177-181.

Luz, R. K.; Ferreira, A. A.; Nuñez, A. D. O. 2001. Avaliação qualitativa e quantitativa do sêmen de suruvi, *Steindachneridion scripta* (Pimelodidae). *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 39-42.

Maghelly, O. R.; Huergo, G. M.; Zaniboni Filho, E.; Enke, D. B. S. (2014). Características morfométricas e rendimento corporal do suruvi *Steindachneridion scriptum* agrupados por sexo. *Boletim Do Instituto De Pesca*, 419-430.

Meurer, S.; Zaniboni Filho, E. (2000). O suruvi *Steindachneridion scripta* Ribeiro, 1918, como espécie alternativa para a piscicultura sul brasileira. *Simpósio Brasileiro de Aqüicultura*, 11.

Nynca, J.; Dietrich, G. J.; Kuźmiński, H., Dobosz, S.; Ciereszko, A. (2012). Motility activation of rainbow trout spermatozoa at pH 6.5 is directly related to contamination of milt with urine. *Aquaculture*, 330, 185-188.

Poupard, G. P.; Paxion, C.; Cosson, J.; Jeulin, C.; Fierville, F.; Billard, R. (1998). Initiation of carp spermatozoa motility and early ATP reduction after milt contamination by urine. *Aquaculture*, 160(3), 317-328.

Ramella, M. S.; Kroth, M. A., Meurer, S.; Nuñez, A. P. D. O.; Zaniboni Filho, E.; Arisi, A. C. M. (2006). Genetic variability in four fish species (*Pimelodus maculatus*, *Prochilodus lineatus*, *Salminus brasiliensis* and *Steindachneridion scripta*) from Uruguay River Basin. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49(4), 589-598.

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), 1-28.

Salisbury, G. W.; Vandemark, J. R.; Salisbury, N. L. G. W.; VanDemark, N. L., Lodge, J. R. (1978). Fisiología de la reproducción e inseminación artificial de los bóvidos. *Acribia*.

Sanches, E. A.; Marcos, R. M.; Baggio, D. M.; Tessaro, L.; Balen, R. E.; Bombardelli, R. A. (2011). Estimativa da concentração espermática do sêmen de peixe pelo método de espermátocrito. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 1163-1167.

Schütz, J. H.; Weingartner, M.; Zaniboni-Filho, E.; Nuñez, A. P. O. (2008). Crescimento e sobrevivência de larvas de suruvi *Steindachneridion scriptum* nos primeiros dias de vida: influência de diferentes alimentos e fotoperíodos. *Boletim do Instituto de Pesca*, 34(3), 443-451.

Shimoda, E.; de Andrade, D. R.; Junior, M. V. V.; Yasui, G. S., Godinho, H. P.; Silva, J. F. S.; Sousa, G. (2007). Utilização do espermátocrito para estimar a concentração espermática no sêmen da piabanha (*Brycon insignis*). *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 44(supl.), 19-24.

Solis-Murgas, L. D.; Felizardo, V. O.; Ferreira, M. R.; Andrade, E. S.; Veras, G. C. (2011). Importância da avaliação dos parâmetros reprodutivos em peixes nativos. *Rev Bras Reprod Anim*, 35(2), 186-191.

Streit Jr, D. P.; Moraes, G. V.; RIBEIRO, R. (2003). Estudo comparativo da indução hormonal da espermição em piavuçu (*Leporinus macrocephalus*) com extrato de hipófise de frango, coelho e carpa. *Acta Scientiarum, Animal Sciences*, 25(2), 261-266.

Verstegen, J.; Iguer-Ouada, M.; Onclin, K. (2002). Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, 57(1), 149-179.

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

Wilson-Leedy, J. G.; Ingermann, R. L. (2007). Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. *Theriogenology*, 67(3), 661-672.

Wirtz, S.; Steinmann, P. (2006). Sperm characteristics in perch *Perca fluviatilis* L. *Journal of fish biology*, 68(6), 1896-1902.

Zaniboni-Filho, E.; Hermes-Silva, S.; Weingartner, M.; Jimenez, J. E.; Borba, M. R.; Fracalossi, D. M. (2015). Bioimpedance as a tool for evaluating the body composition of suruvi (*Steindachneridion scriptum*). *Brazilian Journal of Biology*, 75(4), 239-244.

Zaniboni-Filho, E.; Reynalte-Tataje, D.; Hermes-Silva, S. (2010). Cultivo de bagres do gênero *Steindachneridion*. Espécies nativas para piscicultura no Brasil. Editora da UFSM, Santa Maria, 363-378.

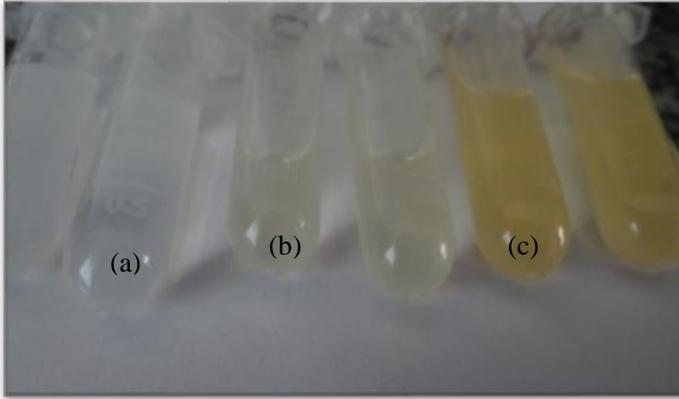
APÊNDICES



Apêndice 1: Coleta de sêmen de suruvi *Steindachneridion scriptum*. Acervo pessoal.



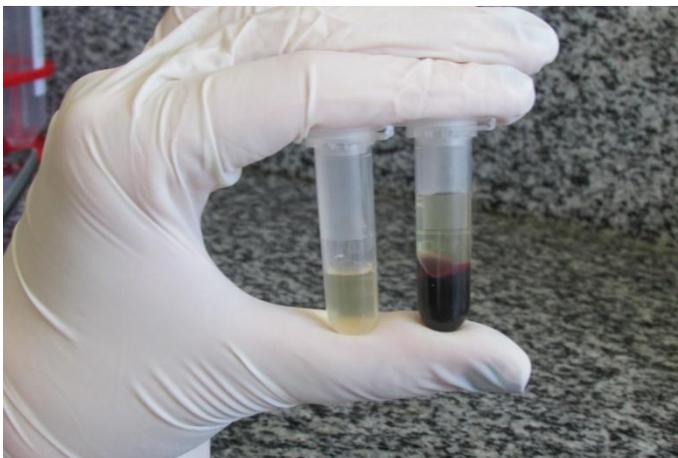
Apêndice 2: Sêmen de suruvi *Steindachneridion scriptum* após a coleta. Acervo pessoal.



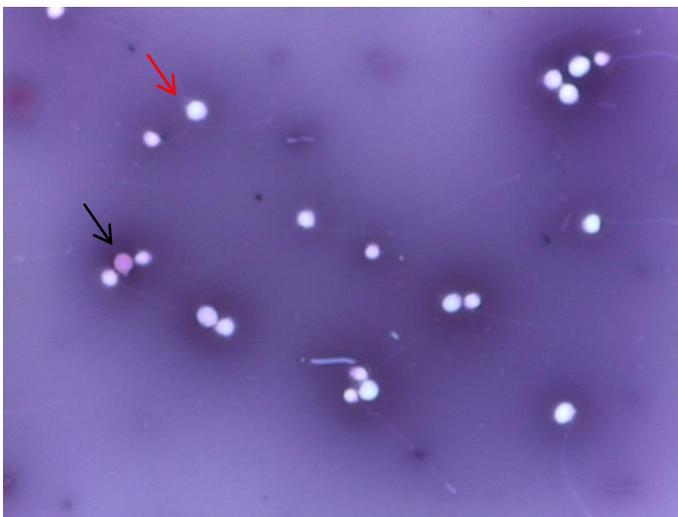
Apêndice 3: Água mineral (a), Urina (b) e Plasma Sanguíneo (c) utilizados como ativadores do sêmen de suruvi *Steindachneridion scriptum*. Acervo pessoal.



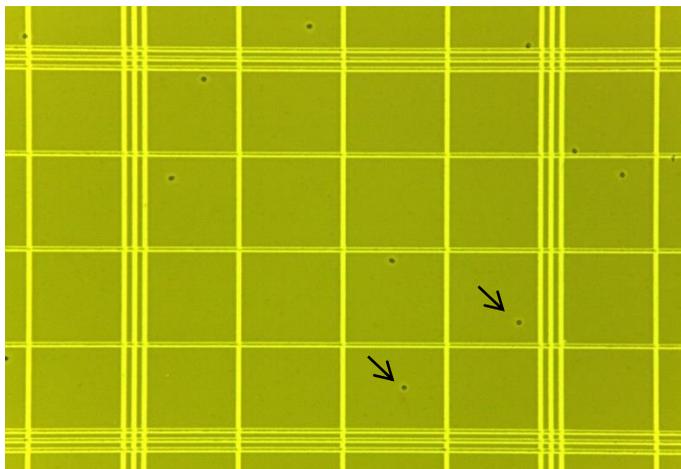
Apêndice 4: Coleta de sangue de suruvi *Steindachneridion scriptum*. Acervo pessoal.



Apêndice 5: Obtenção de plasma sanguíneo de suruvi *Steindachneridion scriptum*, após centrifugação. Acervo pessoal.



Apêndice 6: Imagem da análise de sobrevivência dos espermatozoides de suruvi *Steindachneridion scriptum*. Seta: espermatozóides com membrana rompida. Seta vermelha: espermatozoides com membrana íntegra. Acervo pessoal.



Apêndice 7: Imagem da análise da concentração espermática. Câmara hematóimétrica de Neubauer. Acervo pessoal.