



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

Samira Freitas Costa

Efeito da solução ativadora sobre a motilidade do sêmen crioconservado de *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824)

Florianópolis

2020

Samira Freitas Costa

Efeito da solução ativadora sobre a motilidade do sêmen crioconservado de *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824)

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Aquicultura

Orientador: Prof. Alex Pires de Oliveira Nuñez, Dr.

Florianópolis

2020

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

Costa, Samira Freitas

Efeito da solução ativadora sobre a motilidade do sêmen
crioconservado de *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) /
Samira Freitas Costa ; orientador, Alex Pires de Oliveira
Nuñez, 2020.

41 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós
Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. Crioconservação. 3. Jundiá. 4.
Osmolaridade. 5. Reprodução. I. Nuñez, Alex Pires de
Oliveira . II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. III. Título.

Samira Freitas Costa

Efeito da solução ativadora sobre a motilidade do sêmen crioconservado de *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824)

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Alex Pires de Oliveira Nuñez, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Evoy Zaniboni Filho, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Raphael de Leão Serafini Dr.
Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Aquicultura.

Profª. Leila Hayashi, Dra
Coordenadora do Programa

Prof. Alex Pires de Oliveira Nuñez, Dr.
Orientador

Florianópolis, 2020.

Este trabalho é dedicado à minha mãe
Valesca, e ao meu filho, Alvim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Federal de Santa Catarina, pelo ensino de excelência oferecido. E ao Departamento de Pós-Graduação em Aquicultura pelo suporte ao longo do projeto, pelo ensino de qualidade, e por todos conhecimentos e oportunidades compartilhados.

À toda equipe do LAPAD, que ofereceu todo suporte necessário para realização do projeto. Agradeço em especial aos doutores Luciano Weiss, Jurandir Bernardes, Josiane Ribolli e Renata Maria Guerreschi.

Ao professor Alex Nuñez pela confiança, pela oportunidade e assistência durante a realização do projeto.

Aos colegas de laboratório que se tornaram grandes amigos ao longo da caminhada.

Ao membro da banca, Dr. Raphael Serafini, pela pronta resposta ao aceitar o convite para contribuir com meu trabalho e pela compreensão nas etapas finais.

Ao professor Evoy Zaniboni Filho, por estar participando de mais um importante fechamento de ciclo em meus estudos, por sua gentileza e cordialidade de sempre.

Agradeço a minha mãe, que foi uma grande parceira durante todas as etapas, especialmente quando a maternidade chegou. A minha família por estar ao meu lado em todos os momentos, dando todo suporte necessário.

Aos amigos de longa data, que se fizeram presentes e apoiando sempre que possível e entenderam meu afastamento.

À Deus por todas as etapas vencidas com sabedoria e serenidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro que possibilitou a realização do projeto e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Agradeço a todos que ajudaram de alguma forma a realizar este projeto.

RESUMO

Alguns fatores ambientais, como as concentrações de íons e a pressão osmótica podem afetar a ativação dos espermatozoides dos peixes, a duração da sua motilidade e as velocidades do seu deslocamento. O presente estudo teve por objetivo avaliar o efeito de soluções ativadoras com diferentes osmolaridades sobre o sêmen crioconservado do jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824). Para tanto, amostras de sêmen foram congeladas com solução crioprotetora (100ml/l metanol, 50g/l frutose, 50g/l leite em pó), e após descongelamento o efeito de duas soluções ativadoras foi avaliado. As soluções ativadoras utilizadas foram bicarbonato de sódio (NaHCO_3) e cloreto de potássio (KCl), nas osmolaridades 120, 200, 300 e 400 mOsm l^{-1} . A ativação com água deionizada foi utilizada como tratamento controle. O sêmen de reprodutores foi coletado em campo, sem o uso de indução hormonal, no mês de junho/2019. Foram utilizados machos adultos selvagens ($n=4$) em idade reprodutiva, de um plantel de reprodutores provenientes de captura do Rio Uruguai. As amostras de sêmen fresco foram caracterizadas individualmente e posteriormente foi preparado um pool, que foi diluído na proporção 1:4 (sêmen: solução crioprotetora), envasado em pallets de 0,25 ml, resfriado e congelado em vapor de nitrogênio, e posteriormente foi armazenado em botijão de nitrogênio líquido. Para a descongelação os pallets foram imersos em água a 24 °C por 10 s. A análise da motilidade foi realizada com o software computacional de análise espermática (CASA). O tratamento utilizando KCl produziu as maiores taxas de motilidade e velocidade curvilínea, enquanto a velocidade em linha reta apresentou maiores valores para os tratamentos utilizando NaHCO_3 . As soluções ativadoras contendo K^+ e Na^+ em concentrações a partir de 300 mOsm l^{-1} afetaram negativamente a motilidade de sêmen crioconservado de *R. quelen* reduzindo de forma severa a motilidade dos espermatozoides.

Palavras-chave: Aquicultura. Crioconservação. Jundiá. Osmolaridade. Reprodução.

ABSTRACT

Some environmental factors, such as ion concentrations and osmotic pressure, can affect the activation of fish sperm, the duration of their motility and the speed of their displacement. The present study aimed to evaluate the effect of activating solutions with different osmolarities on the cryopreserved semen of the jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824). For that, semen samples were frozen with cryoprotectant solution (100ml / l methanol, 50g / l fructose, 50g / l milk powder), and after thawing the effect of two activating solutions was evaluated. The activating solutions used were sodium bicarbonate (NaHCO_3) and potassium chloride (KCl), in osmolarities 120, 200, 300 and 400 mOsm l⁻¹. Activation with deionized water was used as a control treatment. The semen from breeders was collected in the field, without the use of hormonal induction, in June / 2019. Wild adult males (n = 4) of reproductive age were used, from a breeding stock from the Uruguay River. The fresh semen samples were individually characterized and then a pool was prepared, which was diluted in a 1: 4 ratio (semen: cryoprotectant solution), filled in 0.25 ml pallets, cooled and frozen in nitrogen vapor, and was subsequently stored in liquid nitrogen canister. For defrosting, the pallets were immersed in water at 24 ° C for 10 s. The analysis of motility was performed with the computational sperm analysis software (CASA). The treatment using KCl produced the highest motility rates and curvilinear speed, while the straight line speed presented the highest values for the treatments using NaHCO_3 . Activator solutions containing K^+ and Na^+ in concentrations from 300 mOsm l⁻¹ negatively affected the motility of *R. quelen* cryopreserved semen, severely reducing sperm motility.

Keywords: Aquaculture. Cryopreservation. Jundiá. Osmolarity. Reproduction.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Reprodutor de *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) do plantel de reprodutores do LAPAD, capturado na região do alto Rio Uruguai..... 13
- Figura 2 - (A) Taxas de motilidade (MOT%), (B) Velocidade curvilínea (VCL $\mu\text{m s}^{-1}$), (C) Velocidade média do trajeto (VAP $\mu\text{m s}^{-1}$), (D) Velocidade em linha reta (VSL $\mu\text{m s}^{-1}$) obtidas após descongelamento do sêmen crioconservado de *Rhamdia quelen*, utilizando soluções ativadoras de NaHCO_3 (BS) ou KCl^+ (CP) em diferentes osmolaridades. CC = motilidade produzida no tratamento controle (água deionizada 24 °C).....25
- Figura 3 - (A) Linearidade (LIN%) (B) Retilinearidade (STR%) obtidas após descongelamento do sêmen crioconservado de *Rhamdia quelen*, utilizando soluções ativadoras de NaHCO_3 (BS) ou KCl^+ (CP) em diferentes osmolaridades. CC = motilidade produzida no tratamento controle (água deionizada 24 °C).....27
- Figura 4 - Trajetórias de deslocamento dos espermatozoides obtidas após descongelamento do sêmen crioconservado de *Rhamdia quelen*, utilizando soluções ativadoras de NaHCO_3 (BS) ou KCl^+ (CP) em cada osmolaridades testada. (A) 120 mOsm l-1, (B) 200 mOsm l-1, (C) 300 mOsm l-1, (D) 400 mOsm l-1. CC = motilidade produzida no tratamento controle (água deionizada 24 °C).....28
- Figura 5 - Taxas de motilidade (MOT%) obtidas após descongelamento do sêmen crioconservado de *Rhamdia quelen*, utilizando soluções ativadoras de NaHCO_3 (BS) ou KCl^+ (CP) em cada osmolaridades testada. (A) 120 mOsm l⁻¹, (B) 200 mOsm l⁻¹, (C) 300 mOsm l⁻¹, (D) 400 mOsm l⁻¹. CC = motilidade produzida no tratamento controle (água deionizada 24 °C).....40
- Figura 6 - Velocidade curvilínea (VCL $\mu\text{m s}^{-1}$) obtidas após descongelamento do sêmen crioconservado de *Rhamdia quelen*, utilizando soluções ativadoras de NaHCO_3 (BS) ou KCl^+ (CP) em cada osmolaridades testada. (A) 120 mOsm l⁻¹, (B) 200 mOsm l⁻¹, (C) 300 mOsm l⁻¹, (D) 400 mOsm l⁻¹. CC = motilidade produzida no tratamento controle (água deionizada 24 °C).....40
- Figura 7 – Velocidade média do trajeto (VAP $\mu\text{m s}^{-1}$) obtidas após descongelamento do sêmen crioconservado de *Rhamdia quelen*, utilizando soluções ativadoras de NaHCO_3 (BS) ou KCl^+ (CP) em cada osmolaridades testada. (A) 120 mOsm l⁻¹, (B) 200 mOsm l⁻¹, (C) 300 mOsm l⁻¹, (D) 400 mOsm l⁻¹. CC = motilidade produzida no tratamento controle (água deionizada 24 °C).....41
- Figura 8 – Velocidade em linha reta (VSL $\mu\text{m s}^{-1}$) obtidas após descongelamento do sêmen crioconservado de *Rhamdia quelen*, utilizando soluções ativadoras de NaHCO_3 (BS) ou KCl^+ (CP) em cada osmolaridades testada. (A) 120 mOsm l⁻¹, (B) 200 mOsm l⁻¹, (C) 300 mOsm l⁻¹, (D) 400 mOsm l⁻¹. CC = motilidade produzida no tratamento controle (água deionizada 24 °C).....41

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1- Tratamentos e osmolaridades das soluções ativadoras utilizadas em sêmen crioconservado de *Rhamdia quelen*. CC = tratamento controle (água deionizada a 24 °C). BS = bicarbonato de sódio. CP = cloreto de potássio.....22
- Tabela 2 - Caracterização individual e pool do sêmen fresco de *Rhamdia quelen*. Solução ativadora: água deionizada a 24 °C.23
- Tabela 3 - Cálculo dos valores utilizados, de cada soluto no preparo das soluções ativadora para sêmen crioconservado de *Rhamdia quelen*.24
- Tabela 4 - Motilidade e velocidades de deslocamento (média desvio-padrão) obtidas por análise computadorizada (CASA) na descongelação de sêmen crioconservado de *Rhamdia quelen* para os tratamentos água deionizada (CC, controle: água deionizada a 24 °C). bicarbonato de sódio (BS) e cloreto de potássio (CP) em diferentes osmolaridades. MOT = motilidade. VCL = velocidade curvilínea. VAP = velocidade média de deslocamento. VSL = velocidade retilínea.25
- Tabela 5 - Linearidade (LIN %) e Retilinearidade (STR %) (média desvio-padrão) obtidas por análise computadorizada (CASA) na descongelação de sêmen crioconservado de *Rhamdia quelen* para os tratamentos água deionizada (CC, controle: água deionizada a 24 °C). bicarbonato de sódio (BS) e cloreto de potássio (CP) em diferentes osmolaridades.26
- Tabela 6 - Tempo de duração (segundos) da motilidade espermática, do sêmen fresco e do sêmen crioconservado de *Rhamdia quelen*, após descongelação, para os tratamentos água deionizada (C fresco e Controle congelado: água deionizada a 24 °C). bicarbonato de sódio (BS) e cloreto de potássio (CP) em diferentes osmolaridades.27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LAPAD - Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce

MOT - Motilidade espermática (%)

VSL - Velocidade m Linha Reta

VCL- Velocidade Curvilínea

VAP - Velocidade Média do Trajeto

DMSO - Dimetilssulfóxido

NaHCO₃ - Bicarbonato de Sódio

KCl⁺ - Cloreto de Potássio

Ca⁺ - Cálcio

K⁺ - Potássio

Na⁺ - Sódio

µm - Micrometros

s - Segundos

l - Litros

kg - Quilograma

pH - Potencial Hidrogeniônico

mM - Milimolar

mOsm - Miliosmol

qps - quadros por segundo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	12
1.1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
1.1.1	Espécie	13
1.1.2	Crioconservação.....	14
1.1.3	Crioprotetores	15
1.1.4	Resfriamento, congelação e descongelação.....	16
1.1.5	Osmolaridade das soluções ativadoras	17
1.2	OBJETIVOS	18
1.2.1	Objetivo geral.....	18
1.2.2	Objetivos específicos.....	18
2	CAPÍTULO 1: EFEITO DA SOLUÇÃO ATIVADORA SOBRE A MOTILIDADE DO SÊMEN CRIOCONSERVADO DE <i>RHAMDIA</i> <i>QUELEN</i> (QUOY & GAIMARD, 1824).....	19
2.1	INTRODUÇÃO	19
2.2	MATERIAL E MÉTODOS	21
2.2.1	Coleta do sêmen	21
2.2.2	Delineamento experimental	21
2.2.3	Análise inicial das amostras	22
2.2.4	Preparo das amostras e congelação	23
2.2.5	Descongelação	23
2.2.6	Preparo das soluções ativadoras	24
2.3	RESULTADOS	24
2.4	DISCUSSÃO	29
2.5	CONCLUSÕES	32
2.6	AGRADECIMENTOS	33
2.7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
	REFERÊNCIAS BIBLOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL	37
	APÊNDICE A – GRÁFICOS	40

1 INTRODUÇÃO GERAL

A capacidade técnica para crioconservação de gametas e embriões de peixes e de invertebrados aquáticos tem se expandido rapidamente, impulsionada principalmente pela indústria aquícola (CAROLSFELD et al., 2003). Neste setor, as técnicas de crioconservação apresentam relevância para a piscicultura e podem ser utilizadas nos laboratórios de reprodução (CARNEIRO, 2009), pois muitas espécies de peixes apresentam alto interesse comercial para aquicultura, sendo que a utilização de sêmen crioconservado pode servir como uma ferramenta para facilitar a produção (CAROLSFELD et al., 2003).

Entretanto, para se obter sucesso com o uso desta técnica é necessário o domínio de seus procedimentos, de modo a otimizar a eficiência de cada etapa, desde a incorporação da solução crioprotetora até o correto resfriamento, congelamento e descongelamento (PAULINO, 2009). Características como a motilidade e a capacidade de fertilização dos espermatozoides, pós-descongelamento, são consideradas critérios de qualidade que permitem medir o sucesso ou a falha do processo. Elas são consideradas indicadores que não dependem de um único fator, mas sim da estabilidade e do bem-estar do conjunto de estruturas, enzimas e compostos funcionais celulares que dão origem a essas características espermáticas (MARTINEZ et al., 2010).

As características químicas do meio determinam a duração do movimento dos espermatozoides, e em combinação com outros fatores desempenham papel essencial na indução da motilidade (COSSON, 2004). Fatores como a pressão osmótica, o pH e a concentração iônica (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) do meio de ativação podem influenciar a motilidade dos espermatozoides em espécies de água doce (BILLARD et al. 1992; CIERESZKO et al., 2002).

Esse conjunto de fatores atua no sentido de despolarizar a membrana celular, afetando a capacidade de motilidade flagelar dos espermatozoides e estimulando ou inibindo a motilidade (MORISAWA et al., 1980; MORISAWA et al., 1983). Meios hiper e hiposmótico, em relação ao plasma seminal, desencadeiam a motilidade do sêmen em peixes marinhos e de água doce, uma vez que a motilidade do sêmen em peixes é controlada pela sensibilidade que as células espermáticas apresentam à osmolaridade e às concentrações de íons, em função da atividade dos canais iônicos presentes na membrana, que ativam os mecanismos de motilidade dos axonemas (ALAVI & COSSON, 2006).

As taxas de fertilização e de sobrevivência dos espermatozoides crioconservados geralmente são inferiores às do sêmen fresco, sendo influenciadas por fatores como a concentração e a composição das soluções crioprotetoras e ativadoras, o pH, a osmolaridade e

pela relação temperatura/tempo de congelação, e pela taxa de descongelação. A investigação desses fatores em relação aos espermatozoides de peixes pode ajudar a melhorar protocolos, e fornecer informações que propiciem meios para aumentar a produção artificial, a fertilização e a conservação de gametas (OGRETMEN et al., 2014).

Na literatura é possível encontrar diversos estudos que abordam o resfriamento e a congelação de sêmen de peixes, mas relativamente poucos estudos são específicos para *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824), de modo que este estudo visa contribuir para o desenvolvimento de protocolos cada vez mais eficazes para a aplicação da técnica de crioconservação nesta espécie.

1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1.1 Espécie

O jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824), é uma espécie pertencente à ordem dos Siluriformes, família Heptapteridae, que ocorre nas Américas Central e do Sul (PERDICES et al., 2002). Ela pode atingir 50 cm de comprimento e 3,0 kg de peso, apresenta hábito noturno e habita locais calmos e profundos dos rios (BALDISSEROTTO, 2004).

O período reprodutivo do jundiá se estende de agosto a março. É uma espécie ovulípara, com desova múltipla e, na natureza, os cardumes desovam em locais com água limpa, calma e de fundo pedregoso, não apresentando cuidado parental (BALDISSEROTTO, 2004). O período reprodutivo e os picos de desenvolvimento gonadal de *R. quelen* podem variar a cada ano e de um lugar para outro.

Figura 1- Reprodutor de *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) do plantel de reprodutores do LAPAD, capturado na região do alto Rio Uruguai.



Segundo FERREIRA et al. (2001), estes animais podem iniciar a maturação gonadal em temperaturas a partir de 17 °C, e as desovas apresentam dois picos ao longo do ano, na primavera e no verão. Animais da região de Santa Maria (RS), apresentaram período reprodutivo entre agosto e fevereiro, com picos de desenvolvimento gonadal entre os meses de agosto-setembro e janeiro-fevereiro (BOSSEMEYER, 1976). Contudo, MARDINI *et al.* (1981) encontraram reprodutores em adiantado estágio gonadal entre setembro e maio na Lagoa dos Quadros (RS); PAULA-SOUZA (1978) detectou maiores índices gonadossomáticos entre setembro e março em animais do estado do Paraná.

1.1.2 Crioconservação

O congelamento de sêmen produz efeitos que reduzem a qualidade dos espermatozoides e comprometem diretamente a capacidade de fertilização e o desenvolvimento embrionário. Diversos autores sugerem que o percentual de células móveis, ou motilidade e o vigor ou velocidade espermática influenciam a determinação da aptidão reprodutiva e da fertilidade dos gametas masculinos (CIERESZKO et al., 2002; URBANYI et al., 1999).

A avaliação da qualidade do sêmen submetido a diferentes técnicas de crioconservação é muito importante para a comparação dos efeitos durante sua ativação, pois fornece índices para a determinação e otimização da capacidade reprodutiva das espécies (CAROLSFELD et al., 2003; ALAVI et al., 2006).

A utilização de bancos genéticos apresenta vantagens em diversos aspectos, conforme JAMIESON & LEUNG (1991) resumiram: redução nos custos de manutenção de estoques, disponibilidade de gametas e facilidade em transportar estoques de gametas, maior eficiência para selecionar características genéticas, além de ser uma importante ferramenta para programas de melhoramento genético e preservação de espécies nativas (HARVEY et al., 1998).

Uma forma de auxiliar o compartilhamento de conhecimento é dar ênfase a padronização de cada etapa dos procedimentos: coleta de sêmen, taxas de diluição, diluidores, crioprotetores, tempo de equilíbrio, taxas de resfriamento e congelamento, descongelamento e proporção espermatozoide: ovócito em testes de fertilização (MONGKOPUNYA et al., 2000)

1.1.3 Crioprotetores

O congelamento do sêmen puro inviabiliza sua atividade após o descongelamento, e para evitar que isso ocorra são adicionados crioprotetores externos e internos, bem como meios diluentes. Desse modo, a crioconservação de sêmen exige o uso de solução crioprotetora adequada, utilizada com o intuito de produzir taxas de congelamento e descongelamento consideradas ótimas (VIVEIROS, 2007). Grandes esforços têm sido realizados para desenvolver diluentes complexos, que sejam o mais semelhantes à composição do plasma seminal.

Os crioprotetores intracelulares são substâncias permeáveis de baixo peso molecular que atuam no citoplasma e nas organelas, auxiliando a desidratação das células e reduzindo a temperatura de congelação do seu interior. Desde que o glicerol foi descoberto como crioprotetor (POLGE et al., 1949), muitos outros compostos foram utilizados para proteger células vivas dos danos causados pelo processo de congelação.

Em espécies de peixes brasileiros alguns crioprotetores já foram testados e, na maioria dos estudos destacam-se o dimetilsulfóxido (DMSO) e o metanol, em concentrações que variam de 5% a 15% (VIVEIROS & GODINHO, 2009). Alguns estudos demonstram o uso do metilglicol com bom desempenho para a taxa de motilidade, quando comparado ao DMSO, para algumas espécies nativas, como *Brycon nattereri*, *Brycon orbignyianus*, *Leporinus obtusidens* e *Prochilodus lineatus* (VIVEIROS et al., 2008).

Os crioprotetores extracelulares são açúcares ou polímeros de alto peso molecular, não permeáveis e hidrofílicos, que recobrem a superfície celular para estabilizar a membrana, para evitar os danos causados pela congelação, e diminuir a formação de cristais de gelo. Neste grupo comumente são utilizadas a gema de ovo fresco, o leite em pó, a frutose e a glicose (CAROLSFELD et al., 2003).

Já a solução diluidora é composta de sais ou carboidratos acrescentados ao sêmen, que têm como função manter a estrutura das células espermáticas durante a etapa de resfriamento das amostras (LEGENDRE & BILLARD, 1980). A composição dos diluentes é outro fator importante para aumentar a eficiência da fertilização artificial e, deve ser ajustada a partir da composição do plasma seminal da espécie (ALAVI et al., 2004; RURANGWA et al., 2004).

Duas condições são exigidas para um bom diluente: ele deve ser carreador de crioprotetores e não deve ativar a motilidade espermática (HARVEY & CAROLSFELD, 1993). A solução diluidora deve ser utilizada no processo de resfriamento porque a diluição diminui a

competição dos espermatozoides por oxigênio e espaço (LEGENDRE & BILLARD, 1980; CAROLSFELD & HARVEY, 1999).

Para bagres sul-americanos, como o surubim e o pintado (*Pseudoplatystoma* spp.), o diluente mais recomendado na literatura consiste na mistura de metanol, glicose e leite em pó. Todas essas soluções devem ser misturadas numa proporção de 3 a 4 partes para uma de sêmen (CAROLSFELD et al., 2003).

1.1.4 Resfriamento, congelação e descongelação

A preservação do sêmen sob refrigeração é uma técnica simples, que se encaixa como possível alternativa para a utilização racional do sêmen de peixes e que apresenta potencial para a aquicultura comercial ou para programas de repovoamento (CARNEIRO et al., 2006)

Carneiro et al. (2007) avaliaram o sêmen armazenado sob refrigeração a 5,7 °C por 12 dias. Durante o período foi possível observar uma significativa redução na taxa de motilidade e redução gradativa na sobrevivência do sêmen refrigerado. Já as taxas de fertilização mantiveram-se viáveis (acima de 50%) após os 12 dias de refrigeração.

Sanches et al. (2013) avaliaram os parâmetros seminiais de *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) para intervalos de tempo mais curtos (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24, 32, 40 e 48 horas após a coleta do sêmen) em diferentes temperaturas (15, 25 e 35 °C). As velocidades médias de deslocamento dos espermatozoides, a frequência de batimento e as taxas de motilidade apresentaram interação entre o tempo e a temperatura de resfriamento, e entre o tempo de resfriamento e temperatura da água. A exposição e a ativação espermática a 15 °C apresentaram resultados significativamente melhores ($P < 0,05$) 48 h após a coleta em relação às temperaturas de 25 e 35 °C.

A congelação de sêmen consiste em conservar os espermatozoides em temperaturas abaixo do ponto de fusão da água, porém o processo deve ser feito de forma a minimizar os efeitos da técnica. A congelação não deve ser muito lenta, a fim de evitar a formação de gelo fora da célula e, conseqüentemente o aumento da concentração osmótica no meio extracelular, promovendo a perda de água do interior das células e acarretando danos fatais.

A velocidade de congelação é um fator determinante para o sucesso da técnica (ZANIBONI FILHO & BALDISSEROTTO, 2015). Carolsfeld et al. (2003) registraram bons resultados obtidos com o resfriamento prévio do esperma até a temperatura de -8 °C (60 s) e mantendo neste platô até a congelação em -150 °C (taxa de congelação de -45 °C/min) até uma

estabilização da temperatura em $-190\text{ }^{\circ}\text{C}$, totalizando aproximadamente 7 min para realizar todo processo.

Assim como para a congelação, os cuidados para a descongelação também são fundamentais para que o máximo de células viáveis seja mantido, uma vez que podem ocorrer mortes celulares e crioinjúrias se as amostras forem descongeladas muito rápida ou muito lentamente, pois as células precisam de um tempo específico para se reidratar (CAROLSFELD; HARVEY, 1999).

1.1.5 Osmolaridade das soluções ativadoras

A osmolaridade refere-se ao número de partículas osmoticamente ativas de soluto contidas em um litro de uma solução (MOTTA, 2009), sendo que existem relações claras entre a composição do plasma seminal, a osmolaridade da solução ativadora e a duração da motilidade dos espermatozoides (ALAVI et al., 2006).

A duração da motilidade pode variar sazonalmente, e a pressão osmótica, o pH e íons presentes no meio ativador influenciam a motilidade em espermatozoides de peixes de água doce e marinhos, e em particular a concentração de íons (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) e o equilíbrio osmótico afetam sua duração (BILLARD & COSSON, 1992).

Os espermatozoides de peixes são ativados em soluções hiposmóticas, em espécies de água doce e em soluções hiperosmóticas para espécies marinhas (COSSON, 2004). Entre as soluções ativadoras de motilidade espermática, merecem destaque a água deionizada e as soluções salinas de NaHCO_3 , NaCl e KCl em concentrações que variam em função da espécie (CHEREGUINI et al., 1999).

LAHNSTEINER et al. (1996) identificaram a correlação entre a motilidade dos espermatozoides e a composição do fluido seminal em *Alburnus alburnus*, um ciprinídeo, e sugeriram que esta correlação poderia indicar que os componentes do plasma seminal influenciariam a motilidade. Estes autores concluíram que os níveis Na^+ e K^+ têm relações positivas e negativas, estatisticamente significativas sobre as porcentagens de espermatozoides móveis.

Em salmonídeos, a presença do íon K^+ em soluções ativadoras é um dos principais inibidores de motilidade espermática, quando comparados a ambientes que possuem baixa concentração de K^+ . O inverso ocorre em ciprinídeos, para os quais a diferença de pressão osmótica no ambiente é o principal fator para desencadear a motilidade (COSSON, 2004; ALAVI & COSSON, 2006).

A sensibilidade das células espermáticas à concentração de íons e açúcares deve ser levada em consideração durante a escolha da solução ativadora, à medida que estas variáveis são alteradas, despolarizam a membrana celular, podendo afetar a capacidade de motilidade dos espermatozoides e alterar o movimento flagelar da cauda estimulando ou inibindo a motilidade (MORISAWA et al., 1983).

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de soluções ativadoras e da osmolaridade sobre a motilidade do sêmen crioconservado do jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824).

1.2.2 Objetivos específicos

Avaliar os efeitos de diferentes osmolaridades da solução de bicarbonato de sódio (120, 200, 300 e 400 mOsm l⁻¹) sobre a motilidade do sêmen crioconservado.

Avaliar os efeitos de diferentes osmolaridades da solução de cloreto de potássio (120, 200, 300 e 400 mOsm l⁻¹) sobre a motilidade do sêmen crioconservado.

2 CAPÍTULO 1

EFEITO DA SOLUÇÃO ATIVADORA SOBRE A MOTILIDADE DO SÊMEN CRIOCONSERVADO DE *RHAMDIA QUELEN* (QUOY & GAIMARD, 1824).

Este artigo será submetido a Revista Brasileira de Zootecnia, Qualis B1, Percentil 49%

RESUMO

O presente estudo avaliou a influência de soluções ativadoras compostas por K^+ e Na^+ , sobre a ativação de sêmen crioconservado do jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824). Investigar a relação de fatores ambientais como concentração de íons e pressão osmótica sobre os parâmetros espermáticos dos peixes pode definir os procedimentos mais adequados para a ativação ou imobilização dos espermatozoides. As amostras de sêmen foram congeladas com solução crioprotetora (100ml/l metanol, 50g/l frutose, 50g/l leite em pó) e após descongelação o efeito de duas soluções foi avaliado. As soluções ativadoras foram formadas com $NaHCO_3$ ou KCl , nas osmolaridades 120, 200, 300 e 400 $mOsm.l^{-1}$, para o tratamento controle utilizou-se água deionizada. O sêmen foi coletado em campo sem o uso de indução hormonal, de reprodutores estocados no Campo Experimental de Piscicultura de Camboriú-SC (CEPC Epagri) no mês de junho/2019. Foram utilizados machos adultos selvagens ($n = 4$) em idade reprodutiva. Após caracterização individual do sêmen fresco, foi preparado um pool, e diluído na proporção 1:4 (sêmen: solução crioprotetora), as amostras envasadas em pallets de 0,25ml, resfriadas e congeladas em vapor de nitrogênio, e armazenadas em botijão de nitrogênio líquido. Para a descongelação os pallets foram imersos em água a 24°C por 10s, a análise da motilidade foi realizada com o software computacional de análise espermática (CASA). O tratamento utilizando KCl produziu maiores taxas de motilidade e velocidade curvilínea, a velocidade em linha reta apresentou diferenças para o tratamento utilizando $NaHCO_3$. As soluções ativadoras com concentrações superiores 300 $mOsm.l^{-1}$ afetaram significativamente ($P < 0,05$) a motilidade de sêmen crioconservado de *R. quelen* reduzindo de forma severa a motilidade dos espermatozoides.

2.1 INTRODUÇÃO

A utilização de sêmen crioconservado pode servir como ferramenta para facilitar a produção de muitas espécies de peixes de interesse comercial para aquicultura (CAROLSFELD et al., 2003). No entanto, a utilização de bancos genéticos crioconservados como rotina em estações de pisciculturas é pouco difundida no Brasil, ainda que se trate de uma técnica valiosa para preservar material genético por períodos indeterminados (CARNEIRO, 2009).

Essa técnica tem sido aplicada para espécies de algumas famílias de peixes, como Salmonidae (SCOTT & BAYNES, 1980), Cyprinidae (BILLARD et al., 1995), Siluridae

(LEGENDRE et al., 1996), Characidae, Prochilodontidae e Anastomidae (VIVEIROS & GODINHO, 2009).

O congelamento de sêmen produz efeitos que reduzem a qualidade dos espermatozoides e comprometem diretamente a capacidade de fertilização e o desenvolvimento embrionário. Diversos autores sugerem que o percentual de células móveis, denominado de motilidade, e o vigor, ou velocidade espermática, influenciam a determinação da aptidão reprodutiva e da fertilidade dos gametas masculinos (CIERESZKO et al., 2002; URBANYI et al., 1999).

A indução da motilidade está relacionada a condições ambientais específicas durante a desova (MORISAWA & SUZUKI 1980). As características químicas do meio determinam a duração do movimento dos espermatozoides, que em combinação com outros fatores desempenham papel essencial na indução da motilidade (COSSON, 2004). Fatores como a pressão osmótica, o pH e a concentração iônica (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) do meio de ativação podem influenciar a motilidade dos espermatozoides em espécies de peixes de água doce e marinha (BILLARD & COSSON, 1992; CIERESZKO et al., 2002).

A motilidade de sêmen em peixes é controlada pela sensibilidade que as células espermáticas apresentam à osmolaridade e às concentrações de íons, em função da atividade dos canais iônicos presentes na membrana, que ativam os mecanismos de motilidade dos axonemas (ALAVI & COSSON, 2006). Um meio hiposmótico em relação ao plasma seminal desencadeia a motilidade dos espermatozoides de peixes de água doce. A ativação do sêmen em soluções hiposmóticas produz um gradiente osmótico entre os meios intracelular e extracelular, e para que o equilíbrio osmótico em ambos os lados da membrana seja mantido, ocorre influxo de água para a célula, o que aumenta a atividade dos canais iônicos (ALAVI et al., 2007).

O jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824), Siluriformes da família Heptapteridae que ocorre nas Américas Central e do Sul (PERDICES et al., 2002), apresenta importância para a piscicultura da região sul americana, devido a sua rusticidade e fácil adaptação ao manejo, além de boa aceitação do mercado consumidor. A espécie apresenta bom crescimento mesmo durante o inverno e bom desempenho reprodutivo (MARCHIORO & BALDISSEROTTO, 1999). Contudo, estudos ligados a rotinas de conservação dos seus gametas ainda são necessários, com vistas à otimização do seu uso em rotinas de reprodução em pisciculturas (BOMBARDELLI et al., 2006).

Na literatura é possível encontrar diversos estudos relacionados ao resfriamento e ao congelamento de sêmen de peixes, porém poucos têm foco em *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824). Neste sentido o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de soluções ativadoras

a base de potássio (K^+) e de sódio (Na^+) em diferentes osmolaridades sobre a motilidade do sêmen crioconservado do jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824).

A investigação desses fatores poderá contribuir para o desenvolvimento de protocolos mais eficientes, através da produção de informações que possam melhorar a fertilização, a produção artificial e a conservação de gametas (OGRETMEN, GOLBASI et al., 2014).

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em duas etapas: (1) coleta do sêmen realizada em campo e (2) preparo, congelação e análise das amostras, que foram realizados no Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce (LAPAD/UFSC), entre os meses de maio e julho/2019.

2.2.1 Coleta do sêmen

A coleta do sêmen foi realizada em campo, no CEPC/Epagri/Camboriú, onde os animais estavam estocados em viveiros escavados. Os animais foram selecionados considerando os aspectos reprodutivos da espécie e as características qualitativas e quantitativas do sêmen fresco de cada animal.

A análise espermática do sêmen fresco foi realizada no LAPAD/UFSC, com o software de análise espermática CASA. O sêmen de machos selvagens ($n=4$) de um plantel de reprodutores, com peso médio de $1,128 \pm 0,502$ kg, foi individualmente coletado em tubos Falcon (15 ml), que foram imediatamente resfriados em caixa de isopor contendo placas de gelo e numa temperatura média de $11,9 \pm 1,16$ °C, que foi monitorada constantemente com um termômetro de mercúrio.

Uma alíquota do sêmen de cada macho foi retirada para caracterização individual, e posteriormente foi constituído um pool, utilizando o mesmo volume de sêmen de cada peixe, para a preparação e o congelamento das amostras. A primeira gota de sêmen liberada foi descartada para evitar possíveis contaminações com urina, muco ou fezes.

2.2.2 Delineamento experimental

Os tratamentos (Tabela 1) seguiram modelo fatorial em delineamento inteiramente ao acaso, considerando-se como fatores as soluções ativadoras, $NaHCO_3$ ou KCl , e as osmolaridades (120, 200, 300 e 400 mOsm l^{-1}). Para determinar as osmolaridades testadas

foram escolhidos valores inferiores, próximos e superiores a osmolaridade do plasma seminal descrita para a espécie. Além disso foram considerados os resultados obtidos em outros estudos, nos quais são sugeridas faixas de osmolaridade em que há ativação e inibição da motilidade espermática de peixes.

A ativação com água deionizada (0 mOsm l^{-1}) a $24 \text{ }^{\circ}\text{C}$ foi utilizada como tratamento controle. Para análise estatística dos dados foi utilizado o software Graphpad Prism 6.07, sendo utilizada a regressão linear para a análise dos tratamentos e ANOVA ou o teste de Mann-Whitney para análise dos resultados em blocos.

Tabela 1- Tratamentos e osmolaridades das soluções ativadoras utilizadas em sêmen criopreservado de *Rhamdia quelen*.
CC = tratamento controle (água deionizada a $24 \text{ }^{\circ}\text{C}$. BS = bicarbonato de sódio. CP = cloreto de potássio.

Solução	mOsm l^{-1}	Tratamento
H ₂ O	0	CC
NaHCO ₃	120	BS 120
	200	BS 200
	300	BS 300
	400	BS 400
KCl	120	CP 120
	200	CP 200
	300	CP 300
	400	CP 400

2.2.3 Análise inicial das amostras

Para análise inicial da motilidade, uma alíquota de $2,0 \text{ } \mu\text{L}$ de cada amostra foi diluída em $998 \text{ } \mu\text{L}$ de água deionizada a $24 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (diluição de 1: 1000; espermatozoides: água deionizada; v/v). Imediatamente após essa diluição, $10 \text{ } \mu\text{L}$ foram transferidos para uma câmara de Neubauer, que foi sobreposta por uma lamínula, para avaliação do movimento espermático, realizada em microscópio óptico (Leica DM 300 LED) com uma objetiva de $10 \times$, conectado a um câmara de vídeo digital (Basler, aCA 1300, $200 \mu\text{m}$, FireWire, 720×512 pixels, 100 qps). As avaliações da motilidade espermática foram realizadas 15 s após a ativação dos espermatozoides. Os valores obtidos pela caracterização individual do sêmen estão descritos na tabela 2.

A análise prévia da motilidade do sêmen foi realizada com o auxílio de Software gratuito do plugin do Computer Assistant Sperm Analyzer (CASA). O software AMCap foi utilizado

para gravar os vídeos de movimento dos espermatozoides, a uma taxa de captura de 100 qps e a análise foi realizada no software ImageJ 1.48 (WILSON-LEEDY & INGERMANN, 2007), adaptado às espécies (ADAMES et al., 2015). Foram analisadas a taxa de motilidade dos espermatozoides (MOT), a velocidade curvilínea (VCL), a velocidade média do trajeto (VAP), a velocidade em linha reta (VSL), a linearidade (LIN) e a retilinearidade (STR).

Tabela 2 - Caracterização individual e pool do sêmen fresco de *Rhamdia quelen*.
Solução ativadora: água deionizada a 24 °C.

Peixe	mOsm l ⁻¹	MOT (%)	VCL (μm s ⁻¹)	VAP (μm s ⁻¹)	VSL (μm s ⁻¹)
1	0,00	86,94 ± 2,74	87,22 ± 3,69	71,90 ± 3,11	69,86 ± 2,69
2	0,00	87,38 ± 1,02	84,84 ± 5,94	40,43 ± 15,69	34,35 ± 19,57
3	0,00	85,15 ± 5,01	111,13 ± 19,67	67,81 ± 9,23	52,07 ± 16,42
4	0,00	81,22 ± 5,81	82,06 ± 22,51	45,80 ± 22,74	41,76 ± 24,24
Pool	0,00	88,10 ± 5,93	100,95 ± 10,81	90,33 ± 67,28	34,93 ± 23,40

2.2.4 Preparo das amostras e congelamento

Para a congelamento um pool do sêmen dos machos amostrados foi formado, e este foi crioconservado diluído na proporção de 1:4 (sêmen: solução) em solução crioprotetora composta por metanol (100 ml/l), leite em pó desnatado (50 g/l) e frutose (50 g/l), diluídos em água deionizada. Após a diluição as amostras foram envasadas em pallets de 0,25 ml, e resfriadas gradualmente em vapor de nitrogênio líquido em um *dry shipper*, a uma taxa de -45 °C/min até a estabilização da temperatura (aproximadamente 7 min).

Posteriormente as amostras foram transferidas para um botijão de nitrogênio líquido e armazenadas por 15 dias até o início do processo de descongelamento.

2.2.5 Descongelamento

A descongelamento foi realizada por imersão parcial dos pallets em água a 24 °C por 10 s, evitando-se o contato da extremidade aberta com a água para que não houvesse ativação prévia dos espermatozoides. Foram descongelados cinco pallets para cada tratamento, cada pallet descongelado gerou um vídeo, de aproximadamente 60 s, ou quando todos os

espermatozoides estavam imóveis. Após a descongelação individual, a amostra contida em cada pallet foi transferida para um tubo Eppendorf de 1,5 ml, do qual foi retirada uma alíquota de 2,0 μL para um novo tubo e adicionados 998 μL da solução ativadora a ser testada. Desta diluição foram transferidos 10 μL para câmara de Neubauer para gravação de vídeos de 60 s para cada amostra.

Para cada tratamento, cinco vídeos foram analisados no software ImageJ 1.48, utilizando-se os mesmos parâmetros avaliados para o sêmen fresco. A gravação dos vídeos teve início 15 s após a ativação do sêmen, tempo inicial que foi padronizado para permitir a ativação das amostras e a disposição da alíquota para análise na câmara de Neubauer.

2.2.6 Preparo das soluções ativadoras

Para o preparo das soluções ativadoras foi considerada a massa molar e a quantidade de íons que compõe a solução. Os valores, em gramas de cada soluto, estão descritos na tabela 3, considerando volume final de 100ml para cada solução.

Tabela 3 - Cálculo dos valores utilizados, de cada soluto no preparo das soluções ativadora para sêmen crioconservado de *Rhamdia quelen*.

Massa Molar	Número de íons	Osmolaridade (mOsm l ⁻¹)	KCl (g)	NaHCO ₃ (g)
KCl	2	120	0,37275	0,42005
74,55		200	0,67095	0,75609
NaHCO ₃	2	300	1,0437	1,17614
84,01		400	1,41645	1,59619

2.3 RESULTADOS

A caracterização do sêmen fresco de *R. quelen* está apresentada na Tabela 2. Com relação ao sêmen congelado, foram observadas diferenças significativas ($P < 0,05$) nas taxas de motilidade e nas velocidades entre as soluções ativadoras.

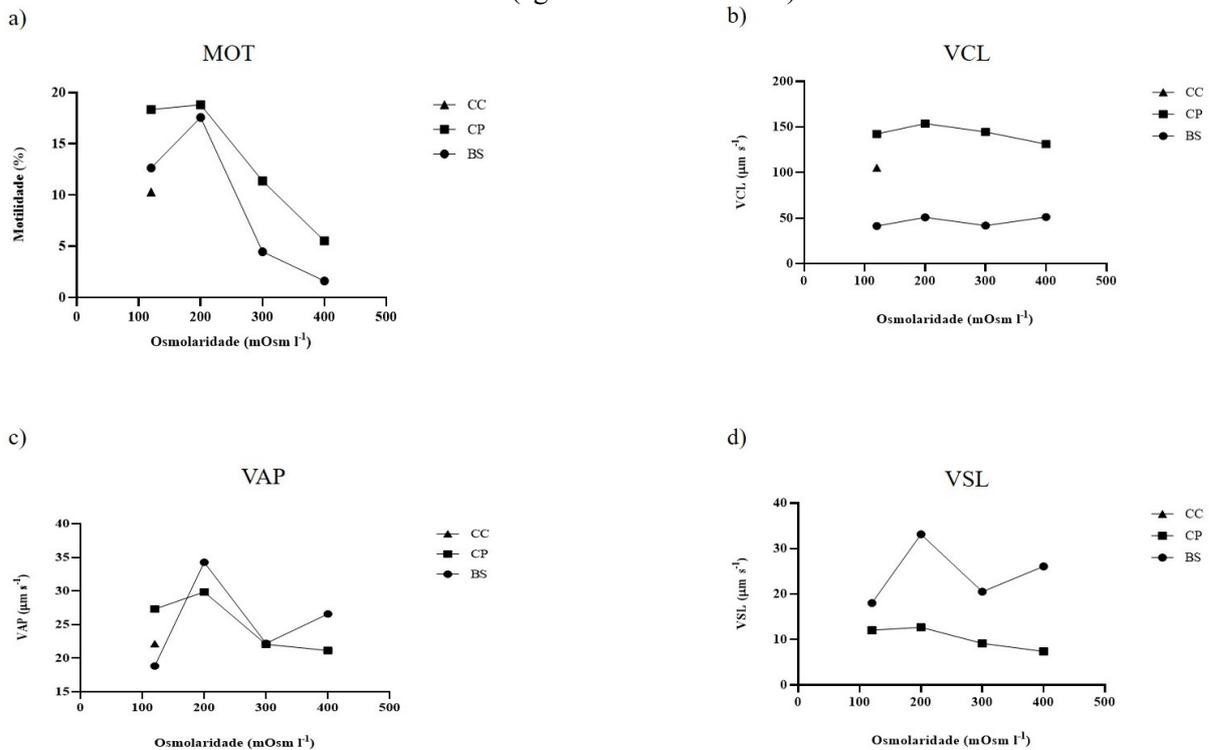
As taxas de motilidade e as velocidades de deslocamento do sêmen crioconservado foram influenciadas pelas osmolaridades das soluções ativadoras (Figura 1).

As soluções de NaHCO₃ com menores osmolaridades (120 e 200 mOsm l⁻¹) produziram taxas de motilidade superiores ($12,64 \pm 15,40\%$ e $17,57 \pm 2,10\%$) em relação as osmolaridades mais altas, 300 e 400 mOsm l⁻¹ ($4,46 \pm 2,76\%$ e $1,60 \pm 0,45\%$).

Tabela 4 - Motilidade e velocidades de deslocamento (média desvio-padrão) obtidas por análise computadorizada (CASA) na descongelação de sêmen crioconservado de *Rhamdia quelen* para os tratamentos água deionizada (CC, controle: água deionizada a 24 °C), bicarbonato de sódio (BS) e cloreto de potássio (CP) em diferentes osmolaridades. MOT = motilidade. VCL = velocidade curvilínea. VAP = velocidade média de deslocamento. VSL = velocidade retilínea.

Solução	mOsm l ⁻¹	MOT (%)	VCL (μm s ⁻¹)	VAP (μm s ⁻¹)	VSL (μm s ⁻¹)
H ₂ O (Sêmen fresco)	0,00	88,10 ± 5,93	100,95 ± 10,81	90,33 ± 67,28	34,93 ± 23,40
H ₂ O (CC)	0,00	11,43 ± 3,35	105,26 ± 33,75	22,15 ± 5,34	12,07 ± 9,90
NaHCO ₃ (BS)	120	12,64 ± 15,40	41,36 ± 13,02	18,84 ± 2,20	18,00 ± 1,98
	200	17,57 ± 2,10	50,99 ± 5,57	34,28 ± 9,07	33,16 ± 9,13
	300	4,46 ± 2,76	41,89 ± 15,96	22,22 ± 5,86	20,53 ± 5,94
KCl (CP)	400	1,60 ± 0,45	51,25 ± 14,28	26,59 ± 9,76	26,09 ± 9,89
	120	18,34 ± 8,20	142,34 ± 39,71	27,33 ± 6,71	12,04 ± 11,46
	200	18,81 ± 5,26	153,72 ± 25,58	29,85 ± 9,81	12,68 ± 10,16
KCl (CP)	300	11,37 ± 4,27	144,53 ± 9,41	22,07 ± 2,89	9,17 ± 1,74
	400	5,53 ± 3,48	131,25 ± 46,72	21,16 ± 3,35	7,37 ± 4,22

Figura 2 - (A) Taxas de motilidade (MOT%), (B) Velocidade curvilínea (VCL μm s⁻¹), (C) Velocidade média do trajeto (VAP μm s⁻¹), (D) Velocidade em linha reta (VSL μm s⁻¹) obtidas após descongelação do sêmen crioconservado de *Rhamdia quelen*, utilizando soluções ativadoras de NaHCO₃ (BS) ou KCl⁺ (CP) em diferentes osmolaridades. CC = motilidade produzida no tratamento controle (água deionizada 24 °C)



Nas amostras ativadas com soluções de KCl os valores obtidos para motilidade foram superiores aos obtidos utilizando NaHCO₃ e água deionizada (controle) nos tratamentos CP120,

CP200 e CP300 (120, 200 e 300 mOsm l⁻¹) $18,34 \pm 8,20\%$, $18,81 \pm 5,26\%$ e $11,37 \pm 4,27\%$ respectivamente.

Algumas velocidades de deslocamento sofreram influência das osmolaridades das soluções ativadoras (Tabela 2), pois foi possível observar picos de velocidades na concentração de 200 mOsm l⁻¹ para ambos os ativadores (Figura 1).

A VCL apresentou valores superiores para amostras ativadas com soluções de KCl em relação as amostras ativadas com água deionizada e NaHCO₃, destacando-se a maior velocidade registrada no tratamento CP200 ($153,72 \pm 25,58 \mu\text{m s}^{-1}$) e a menor velocidade no tratamento BS 120 ($41,36 \pm 13,02 \mu\text{m s}^{-1}$).

As VAP apresentaram as maiores taxas no tratamento BS200 ($34,28 \pm 9,07 \mu\text{m s}^{-1}$), seguido por CP200 e CP120 ($27,33 \pm 6,71 \mu\text{m s}^{-1}$ e $29,85 \pm 9,81 \mu\text{m s}^{-1}$), respectivamente.

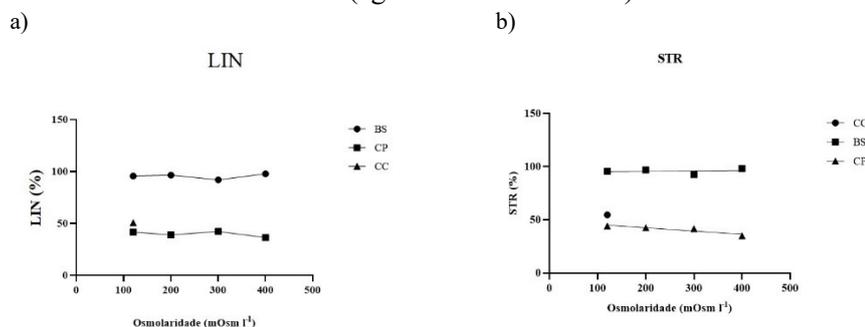
Para a VSL foram registradas diferenças significativas entre os tratamentos BS e CP nas osmolaridades 120 e 300 mOsm l⁻¹, sendo que os valores mais altos foram produzidos pela solução BS200 ($33,16 \pm 9,13 \mu\text{m s}^{-1}$).

Os parâmetros linearidade e retilinearidade foram comparados entre si, apresentando valores superiores ao dobro em todos os tratamentos do NaHCO₃.

Tabela 5 - Linearidade (LIN %) e Retilinearidade (STR %) (média desvio-padrão) obtidas por análise computadorizada (CASA) na descongelação de sêmen crioconservado de *Rhamdia quelen* para os tratamentos água deionizada (CC, controle: água deionizada a 24 °C). bicarbonato de sódio (BS) e cloreto de potássio (CP) em diferentes osmolaridades.

Solução	mOsm l ⁻¹	LIN (%)	STR (%)
H ₂ O (CC)	0,00	$50,67 \pm 27,07$	$25,05 \pm 17,98$
	120	$95,56 \pm 2,61$	$48,26 \pm 11,16$
NaHCO ₃ (BS)	200	$96,75 \pm 1,23$	$66,35 \pm 11,43$
	300	$92,38 \pm 8,01$	$55,78 \pm 13,21$
	400	$98,13 \pm 1,39$	$53,14 \pm 14,93$
	120	$41,74 \pm 26,93$	$21,48 \pm 12,22$
KCl (CP)	200	$39,08 \pm 20,86$	$20,00 \pm 8,51$
	300	$42,30 \pm 10,44$	$15,22 \pm 1,08$
	400	$36,48 \pm 23,37$	$18,46 \pm 9,02$

Figura 3 - (A) Linearidade (LIN%) (B) Retilinearidade (STR%) obtidas após descongelação do sêmen crioconservado de *Rhamdia quelen*, utilizando soluções ativadoras de NaHCO_3 (BS) ou KCl^+ (CP) em diferentes osmolaridades. CC = motilidade produzida no tratamento controle (água deionizada 24 °C).



Na tabela 6 estão descritos os tempos de duração da motilidade espermática em cada tratamento. Para ambos ativadores, as concentrações a partir de 300 mOsm l⁻¹ apresentaram uma redução no tempo de duração da motilidade. O sêmen fresco apresentou maiores tempos de duração em relação ao tratamento controle, evidenciando os efeitos da crioconservação sobre os espermatozoides.

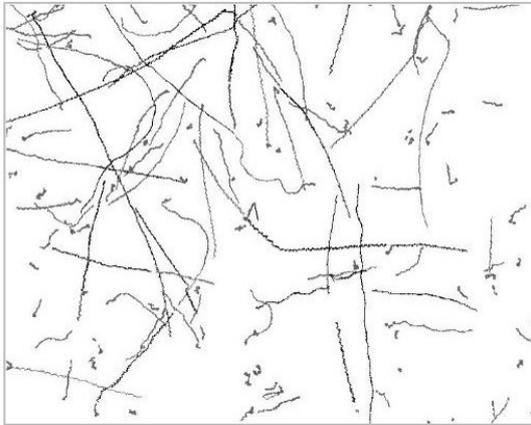
Tabela 6 - Tempo de duração (segundos) da motilidade espermática, do sêmen fresco e do sêmen crioconservado de *Rhamdia quelen*, após descongelação, para os tratamentos água deionizada (C fresco e Controle congelado: água deionizada a 24 °C), bicarbonato de sódio (BS) e cloreto de potássio (CP) em diferentes osmolaridades.
Duração das Motilidades (minutos)

	Controle fresco	Controle congelado	BS				CP			
			120	200	300	400	120	200	300	400
Px 1	01:06	00:58	00:56	00:57	00:49	00:38	00:54	01:03	00:51	00:48
Px 2	01:12	00:48	00:52	01:04	00:52	00:43	01:02	00:58	00:56	00:46
Px 3	01:04	01:04	00:50	00:54	00:43	00:42	01:07	01:12	00:54	00:50
Px 4	01:09	00:53	01:01	01:02	00:41	00:47	00:56	01:00	00:48	00:53
Pool	00:56	01:02	00:57	00:59	00:45	00:36	00:53	00:59	01:00	00:51
Média	01:05	00:57	00:55	00:59	00:46	00:41	00:58	01:02	00:53	00:49

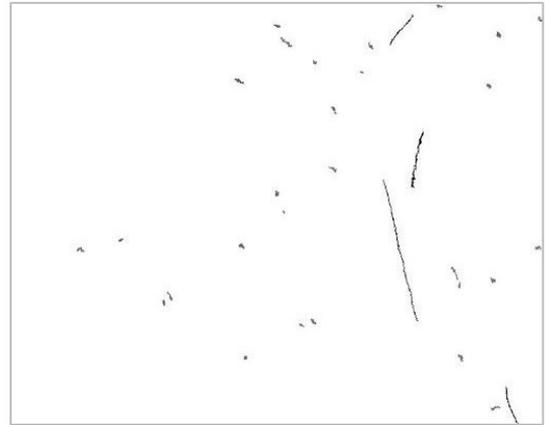
Na figura 7 é possível observar as trajetórias de deslocamento dos espermatozoides, em cada tratamento utilizado, e para o sêmen fresco. O padrão do movimento sofreu influência das soluções e das osmolaridades.

Figura 4 – Trajetórias de deslocamento dos espermatozoides obtidas após descongelação do sêmen crioconservado de *Rhamdia quelen*, utilizando soluções ativadoras de NaHCO_3 (BS) ou KCl^+ (CP) em cada osmolaridades testada. (A) 120 mOsm l^{-1} , (B) 200 mOsm l^{-1} , (C) 300 mOsm l^{-1} , (D) 400 mOsm l^{-1} . CC = motilidade produzida no tratamento controle (água deionizada 24 °C).

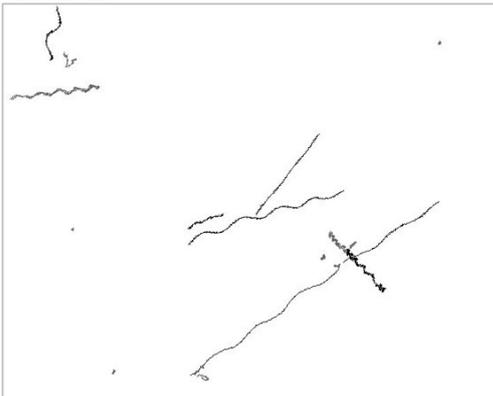
Sêmen fresco



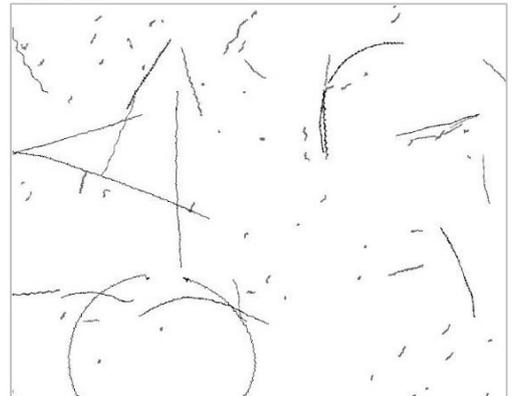
Sêmen crioconservado



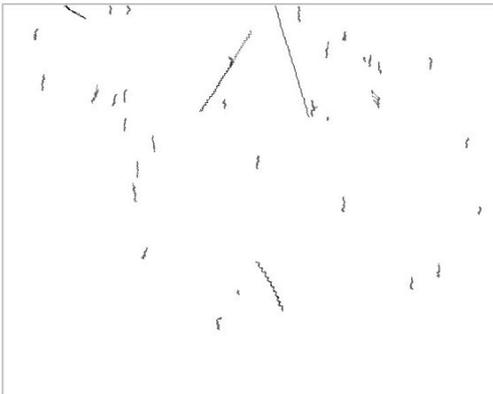
BS120



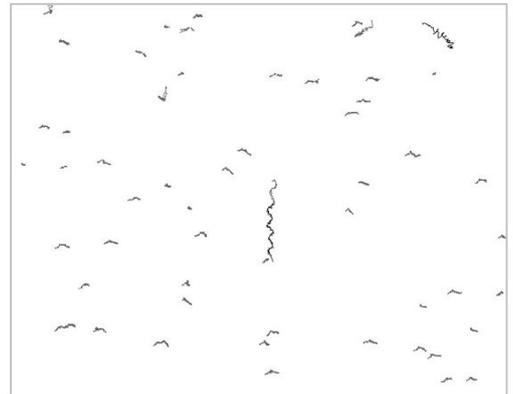
BS200



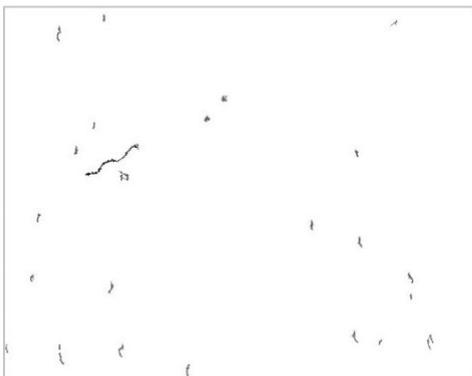
BS300



BS400



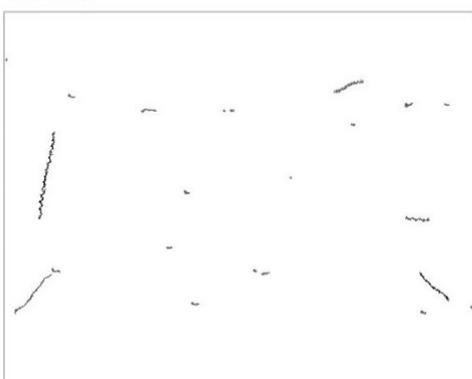
CP120



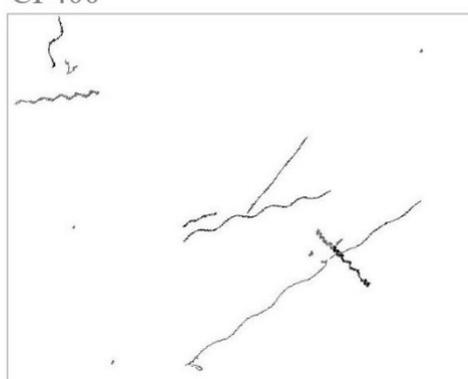
CP200



CP300



CP400



2.4 DISCUSSÃO

A variabilidade da composição iônica do plasma seminal e das células espermáticas apontada na literatura, mostra que existem importantes diferenças intra e interespecíficas em peixes (BILLARD et al., 1995) e, conseqüentemente nos mecanismos de iniciação da motilidade espermática.

Estudos demonstram que há uma correlação entre a motilidade espermática e a composição do fluido seminal em *Alburnus alburnus*, um ciprinídeo, e sugeriram que esta correlação poderia indicar os componentes do plasma seminal que influenciariam a ativação da motilidade. Concluindo também que os níveis Na^+ e K^+ apresentam relações positivas e negativas sobre as taxas de motilidade dos espermatozoides (LAHNSTEINER et al. 1996).

Os resultados deste estudo demonstram uma heterogeneidade nos padrões de resposta de cada parâmetro espermático avaliado, sugerindo que há influência tanto das osmolaridades quanto da composição das soluções.

Para muitas espécies um desequilíbrio das concentrações de Ca^+ , K^+ e Na^+ altera o potencial de membrana das células espermáticas por meio dos canais iônicos, o que leva a um

aumento da concentração de monofosfato cíclico de adenosina nas células, que para os salmonídeos é o sinal de iniciação para a motilidade espermática (ALAVI et al., 2006). Dependendo das concentrações, a maioria desses íons são responsáveis pela regulação da motilidade espermática, contribuindo para a composição iônica intracelular ou para a sua osmolaridade (BILLARD & COSSON, 1992; SCOTT & BAYNES, 1980).

A redução da osmolaridade externa leva imediatamente ao reajustamento da concentração iônica interna dos espermatozoides, através do processo de osmorregulação da membrana. A diminuição da concentração iônica atinge valores em que a ATPase é ótima e, conseqüentemente há ativação da motilidade (COSSON, 2004).

No presente estudo, foi observado que as osmolaridades produziram efeitos sobre as taxas de motilidade do sêmen crioconservado, observando-se valores superiores para ativadores com concentrações de íons K^+ e Na^+ inferiores ou próximas à encontrada no plasma seminal, considerada de 274,8 mOsm kg^{-1} , segundo Borges et al. (2005).

Ao utilizar soluções ativadoras com osmolaridades acima de 200 mOsm l^{-1} , apenas parte dos espermatozoides foram ativados, cessando a motilidade em um curto espaço de tempo. Observou-se uma diminuição do tempo em função do aumento das osmolaridades. Para ambas as soluções, as osmolaridades mais altas (300 e 400 mOsm l^{-1}) a motilidade dos espermatozoides foi influenciada em relação aos controles fresco e congelado e, a osmolaridades inferiores a 300 mOsm l^{-1} .

Em concentrações superiores a 200 mOsm l^{-1} , a solução ativadora de Na^+ produziu taxas de motilidade inferiores a 5%, demonstrando uma menor eficiência das soluções com osmolaridades mais altas em relação ao plasma seminal para sêmen crioconservado.

Para Morisawa & Suzuki (1980), o meio hipotônico desencadeia o início da motilidade espermática em peixes de água doce como a carpa-comum e o peixe-dourado, *Carassius auratus*. Na maioria dos peixes de água doce, o sinal hiposmótico induz as atividades dos canais de K^+ e Ca^{2+} , e ativa os espermatozoides em função das concentrações intracelulares de Ca^{2+} (KRASZNAI et al., 2000). No entanto, existem exemplos em que a motilidade espermática é ativada em meio isotônico para peixes de água doce.

Cussac & Magesse (1988) não relataram efeito dos níveis de potássio sobre a motilidade espermática do sêmen fresco de *Rhamdia sapo*, considerando inclusive, as concentrações consideradas inibitórias para o sêmen de salmonídeos.

Contudo, os resultados deste estudo demonstraram que há uma melhor eficiência nas taxas de motilidade utilizando soluções de KCl^+ com osmolaridades até 200 mOsm l^{-1} se comparada aos demais tratamentos.

Estudos mostram os efeitos do K^+ sobre os espermatozoides de carpa-comum, para os quais o choque hiposmótico induzido afetou a motilidade e a velocidade espermática através da regulação dos canais de K^+ (KRASZNAI et al. 1995, MORISAWA et al., 1983; BILLARD & COSSON, 1992).

A duração da motilidade é afetada pelo choque hiposmótico, que, ao causar danos ao flagelo dos espermatozoides devido ao elevado consumo imediato de ATP reduz rapidamente suas concentrações e, conseqüentemente, a motilidade cessa em menor período de tempo (COSSON, 2004; ALAVI et al., 2009).

Shimoda et al. (2007) testaram os efeitos da osmolaridade em sêmen de piabanha (*Brycon insignis*) e verificaram que osmolaridades até 270 mOsm ativaram todos os espermatozoides, e que em valores acima de 342 mOsm somente parte dos espermatozoides foi ativada. Quando concentrações iguais ou maiores de 410 mOsm foram utilizadas não ocorreu ativação espermática.

O mesmo padrão foi observado para o sêmen crioconservado de *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824), para o qual concentrações superiores à do plasma seminal influenciaram negativamente as taxas de ativação, o tempo de duração da motilidade, e as velocidades de deslocamento.

O tratamento controle (água deionizada) produziu taxas de motilidade com valores e duração inferiores aos ativadores em suas concentrações mais baixas (120 e 200 mOsm l^{-1}). Resultados semelhantes foram observados em sêmen crioconservado de curimba (*Prochilodus lineatus*), para o qual as taxas de motilidade entre 0 e 5% (CAROLSFELD et al., 2003). A exposição do sêmen a condições osmóticas extremas pode acarretar alterações na morfologia e na motilidade, como é o caso da água deionizada (PERCHEC et al., 1996) ou urina (PERCHEC et al., 1995; PERCHEC-POUPARD et al., 1997).

As velocidades de deslocamento do sêmen crioconservado foram influenciadas de formas distintas por cada um dos ativadores. VCL, VAP e VSL apresentaram maiores valores utilizando soluções com osmolaridades até 200 mOsm l^{-1} , porém apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos.

A VCL, que apresenta relação com a capacidade de fecundação, foi superior à do tratamento controle para todas as osmolaridades de cloreto de potássio, e inferior para o bicarbonato de sódio.

Já a VSL apresentou padrão inverso, com velocidades mais elevadas registradas para os tratamentos utilizando $NaHCO_3$. Estes resultados demonstraram que a composição e a

concentração iônica da solução ativadora influenciam o movimento dos espermatozoides, e consequentemente acarretam alterações em sua trajetória.

Resultados como estes foram observados em ciprinídeos, grupo em que a mudança da osmolaridade externa é o primeiro fator desencadeador, que precede o efluxo de K^+ no início da motilidade; a ativação espermática é seguida pela alcalinização do meio intracelular através de um canal de Na^+/H^+ (COSSON & GAGNON, 1988; MÁRIÁN et al., 1997).

Desse modo, meios de diluição contendo altas concentrações de K^+ em relação à composição iônica e à pressão osmótica do plasma seminal inibem o início da motilidade espermática em salmónídeos (BILLARD et al., 1995; KHO et al, 2001).

Hwang & Idler (1969) mostraram a correlação entre o plasma seminal, a relação Na^+/K^+ e a fertilidade dos espermatozoides no salmão-do-Atlântico, *Salmo Salar*, espécie para a qual o íon Na^+ é capaz de eliminar o efeito inibitório do íon K^+ na motilidade espermática (MORISAWA & SUZUKI, 1980).

Ao serem analisadas, neste estudo a linearidade (LIN) e a retilinearidade (STR) apresentaram diferenças significativas entre as soluções. Os tratamentos utilizando bicarbonato de sódio apresentaram resultados superiores para ambos os parâmetros, demonstrando que a trajetória percorrida pelos espermatozoides foi afetada pela composição da solução e não pelas osmolaridades. A curvatura do caminho que o espermatozoide percorre aproximou-se mais de uma trajetória em linha reta para todas as osmolaridades do tratamento BS.

Portanto o presente estudo mostrou o efeito das soluções ativadoras sobre as taxas de motilidade e sobre as velocidades de deslocamento do sêmen crioconservado de *R. quelen*.

2.5 CONCLUSÕES

Para ativação do sêmen crioconservado de *R. quelen* a solução ativadora deve ser hiposmótica em relação ao plasma seminal.

Soluções de $NaHCO_3$ com concentrações acima de 300 mOsm l^{-1} levaram praticamente à inibição da motilidade espermática, enquanto soluções de KCl, com osmolaridade mais baixa que o plasma seminal produziram as melhores taxas de motilidade para sêmen crioconservado de *R. quelen*. O padrão de movimento espermático foi alterado pela solução ativadora e pela osmolaridade, em relação ao sêmen fresco.

2.6 AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

2.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMES, M.S., TOLEDO, C.P.R., NEUMANN, G., BUZZI, A.H., BURATTO, C.N., PIANA, P.A., BOMBARDELLI, R.A.. Optimization of the sperm:ooocyte ratio and Sperm economy in the artificial reproduction of *Rhamdia quelen* using fructose as a sperm motility modulator. **Anim. Reprod. Sci.** 161, p. 119–128, 2015.

ALAVI, S. M. H.; COSSON, J. Sperm motility in fishes: (II) effects of ions and osmotic pressure. **Cell Biology International**, Londres, v. 30, p. 1-14, 2006.

ALAVI, S. M. H. et al. Semen of *Perca fluviatilis* L.: Sperm volume and density, seminal plasma indices and effects of dilution ratio, ions and osmolality on sperm motility. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 68, n. 2, p. 276–283, 2007.

ALAVI, S. M. H. et al. O. Relationship between semen characteristics and body size in *Barbus barbus* L. (Teleostei: Cyprinidae) and effects of ions and osmolality on sperm motility. **Comparative biochemistry and physiology - Part A, Molecular & integrative physiology**, Oxford, v. 153, n. 4, p. 430-437, 2009.

BILLARD, R. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. **Reprod Nutr Develop.**, v. 28, p.877-920, 1986.

BILLARD, R.; COSSON, M.R. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. **Journal Experimental Zoology**, v. 261, p. 122– 13, 1992.

BILLARD, R.; COSSON, J.; CRIM, L.W.; SUQUET, M. Sperm physiology and quality. In: BROMAGE, N. R.; ROBERTS, R. J. (Ed.). **Broodstock management and egg and larval quality**. Cambridge: Cambridge University Press, Cambridge, p. 53-76, 1995.

BILLARD, R.; COSSON, J.; CRIM, L.W.; SUQUET, M. Sperm physiology and quality. In: BROMAGE, N. R.; ROBERTS, R. J. (Ed.). **Broodstock management and egg and larval quality**. Cambridge: Cambridge University Press, Cambridge, p. 53-76, 1995.

BOMBARDELLI, R.; MÖRSCHBÄCHER, E.; CAMPAGNOLO, R.; SANCHES, E.; SYPERRECK, M. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá cinza, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 4, p. 1251-1257, 2006.

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

- CARNEIRO, P. C. et al. Cryopreservation of tambaqui (*Colossoma macropomum*) semen: extenders, cryoprotectants, dilution ratios and freezing methods. **Cryoletters**, Lewes, v. 33, n. 5, p. 385-393, 2012.
- CAROLSFELD, J., GODINHO, H.P., ZANIBONI FILHO, E., HARVEY, B.J. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. **Journal of Fish Biology**, v. 63, p. 472-489, 2003.
- CIERESZKO A, DABROWSKI K, TOTH GP, CHRIST SA, GLOGOWSKI J. Factors affecting motility characteristics and fertilizing ability of sea Lamprey spermatozoa. **Trans Am Fish Soc** ;131;193-202, 2002.
- COSSON MP, GAGNON C. Protease inhibitor and substrates block motility and microtubule sliding of sea urchin and carp spermatozoa. **Cell Motility and Cytoskel.** 5, p. 18-527, 1988.
- COSSON, J. The ionic and osmotic: factors controlling motility of fish spermatozoa. **Aquaculture International**, v. 12, p. 69-85, 2004.
- CUSSAC, V.E.; MAGGESE, M.C. Effects of salt solutions on the fertilizing ability and activation of gametes in the catfish, *Rhumdia sapo* (Pisces, Pimelodidae). **Rev. Bras. Biol.**, 48(2), p. 203-211, 1988.
- HWANG, P. C.; IDLER, D. R. A study of major cations, osmotic pressure, and pH in seminal components of Atlantic salmon. **J Fish Res Board Can** ;26, p. 413-419, 1969.
- KRASZNAI, Z., MARIAN, T., BALKAY, L., GASPARI, R.; TRON, L. Potassium channels regulate hypo-osmotic shock-induced motility of common carp (*Cyprinus carpio*) sperm. **Aquaculture** 129, p. 123–128, 1995.
- KRASZNAI, Z.; MARIAN, T.; IZUMI, H.; DAMJANOVICH, S.; BALKAY, L.; TRON, L.; MORISAWA, M. Membrane hyper polarization removes inactivation of Ca²⁺ channels leading to Ca²⁺ influx and initiation of sperm motility in the common carp. **Biophysics**, v. 97, p. 2052–2067, 2000.
- KHO, K.H.; TANIMOTO, S.; INABA, K.; OKA, Y.; MORISAWA, M. Transmembrane cell signalling for the initiation of trout sperm motility: roles of ion channels and membrane hyperpolarization for cyclic AMP synthesis. **Zool Sci**; 18, p. 919-28, 2001.
- INGERMANN, R.; HOLCOMB, M.; ROBINSON, M. L.; CLOUD, J. G.; Carbon dioxide and pH affect sperm motility of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). **J Exp Biol**;205, p. 2885-2890, 2002.
- ITOH, A.; INABA, K.; OHTAKE, H.; FUJINOKI, M.; MORISAWA, M. Characterization of a cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit from rainbow trout spermatozoa. **Biochem Biophys Res Commun**;305, p. 855-861, 2003.
- LAHNSTEINER, F.; BERGER, B.; WEISSMAN, T.; PATZNER, R.A. Motility of spermatozoa of *Alburnus* (Cyprinidae) and its relationship to seminal plasma composition and sperm metabolism. **J Fish Physiologi Biochem**, v.15, p. 167-179, 1996.

- LEGENDRE, M.; LINHART, O.; BILLARD, R. Spawning and management of gametes, fertilized eggs and embryos in Siluroidei. **Aquatic Liv. Res.**, 9, p. 59-80, 1996.
- LINHART, O.; SLECHTA, V.; SLAVIK, T. Fish sperm composition and biochemistry. **Bull Inst Zool Acad Sin Monogr**;16, p. 285-311, 1991.
- MARCHIORO, M. I.; BALDISSEROTTO, B. Survival of fingerlings of the Jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard, 1824) to changes on water salinity. **Ciênc Rural** 29, p. 315-318, 1999.
- MARIAN T, KRASZNAI Z, BALKAY L, EMRI M, TRON L. Role of extracellular and intracellular pH in carp sperm motility and modifications by hyperosmosis of regulation of the Na^+ / H^+ exchanger. **Cytometry**, v. 27, p. 374–382, 1997.
- MORISAWA, M., AND K. SUZUKI. Osmolarity and potassium ion: their roles in initiation of sperm motility in teleosts. **Science** 210, p. 1145–1147, 1980.
- MORISAWA, M., SUZUKI, K., MORISAWA, S. Effects of potassium and osmolality on spermatozoan motility of salmonid fishes. **J. Exp. Biol.** 107, p. 105–113, 1983.
- OGRETMEN, F.; GOLBASI, S.; İNANAN, B.E. Inhibitory effect of K^+ and Ca_2^+ concentrations, pH, and osmolality of activation solution on motility of shabut (*Barbus grypus* Heckel 1843) spermatozoa. **Turkish Journal of Veterinary Animal Science**, v. 38, p. 245-252, 2014.
- PERCHEC G, COSSON M.P., COSSON J, JEULIN C, BILLARD R. Morphological and kinetic changes of carp (*Cyprinus carpio*) spermatozoa after initiation of motility in distilled water. **Cell Motil Cytoskeleton**. 35, p. 113-20, 1996.
- PERCHEC-POUPARD, G., GATTI, J.-L., COSSON, J., JEULIN, C., FIERVILLE, F.; BILLARD, R. Effects of extracellular environment on the osmotic signal transduction involved in activation of motility of carp spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility** 110, p. 315–327, 1997.
- PERDICES, A.; BERMINGHAM, E; MONTILLA, A.; DOADRIO, I. Evolutionary history of the genus *Rhamdia* (Teleostei: Pimelodidae) in Central America. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 25, p. 172–189, 2002.
- RURANGWA, E.; KIME, D.E.; OLLEVIER, F.; NASH, J.P. Measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. **Aquaculture**, v. 234, p.1-28, 2004.
- SCOTT, A. P.; BAYNES, S. M. A review of the Biology, handing and storade of salmonid spermatozoa. **J. Fish Biology**, 17, p. 707-739, 1980.
- SHIMODA, E.; ANDRADE, D. R.; VAZQUEZ, V. J. M.; YASUI, S. G.; SILVA, J. F. S.; GODINHO, H. P.; SOUZA, G. Efeitos da osmolaridade sobre a motilidade espermática na Piabanha *Brycon insignis*. **Revista Ceres**, v. 54, n. 315, p.430-433, 2007.

- URBÁNYI, B., HORVÁTH, Á., VARGA, Z., HORVÁTH, L., MAGYARY, I., RADICS, F. Effect of extenders on sperm cryopreservation of African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). **Aquac. Res.** 30, p. 145–151, 1999.
- VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v.57, p.149-179, 2002.
- VIVEIROS, A. T. M.; GODINHO, H. P. Sperm quality and Cryopreservation os Brazilian freshwater fish espécies a review. **Fish Physiol. Biochem.**, 35, p. 137-150, 2009.
- WILSON-LEEDY, J. G.; INGERMANN, R. L. Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. **Theriogenology** 67, p. 661– 672, 2007.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL

- ALAVI, S. M. H.; MOJAZI, B. A.; COSSON, J.; KARAMI, M.; POURKAZEMI, M. Seminal plasma composition in *Acipenser persicus*: effect of stripping frequency in ionic content and osmolality. **Research Reproduction**, Irã, v. 128, p.819-828, 2004.
- ALAVI, S. M. H.; COSSON, J. Sperm motility in fishes: (II) effects of ions and osmotic pressure. **Cell Biology International**, Londres, v. 30, p. 1-14, 2006.
- BALDISSEROTTO, B. Biologia do jundiá. In: BALDISSEROTTO, B.; NETO, J. R. **Criação de jundiá**. Santa Maria: Editora UFSM, p. 67-72, 2004.
- BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L.C. (Orgs), **Espécies Nativas para Piscicultura no Brasil**, 2ª edição, Editora UFSM, Santa Maria, 2010.
- BILLARD, R.; COSSON, M.R. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. **Journal Experimental Zoology**, v. 261, p. 122– 13, 1992.
- BORGES, A.; SIQUEIRA, D.; JURINITZ, D. et al. Biochemical composition of seminal plasma and annual variations in semen characteristics of jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, Pimelodidae). **Fish Physiology and Biochemistry**, v.31, p.45-53, 2005.
- BOSSEMEYER, I. M. K. **Mudanças morfológicas no ovário de *Rhamdia Sapo* (Pimelodidae) relacionadas com o ciclo reprodutivo [peixe de água doce, Rio Grande do Sul, Brasil]**. 1976. 48 p. Tese. Santa Maria, RS. 1976.
- CARNEIRO, P. C. F. et al. Viabilidade do sêmen do jundiá, *Rhamdia quelen*, armazenado sob refrigeração. **Revista Acadêmica: Ciência Animal**, Curitiba, v. 4, n. 3, p. 11-16, 2006.
- CARNEIRO, P. C. F. Tecnologias de produção e armazenamento de sêmen de peixes. **Rev. Brasileira de Reprodução Animal**. 31, 361–366, 2007.
- CAROLSFELD, J.; HARVEY, B. Conservação de recursos genéticos de peixes: teoria e prática. Curso de Treinamento Brasileiro. Victoria: **World Fisheries Trust**, 41 p. 1999.
- CAROLSFELD, J., GODINHO, H.P., ZANIBONI FILHO, E., HARVEY, B.J. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. **Journal of Fish Biology**, v. 63, p. 472-489, 2003
- CHEREGUINI, O., DE LA BANDA, I., RASINES, I., FERNADEZ, A. Artificial fertilization in turbot, *Scophthalmus maximus*, L.: different methods and determination of the optimal sperm egg ratio. **Aquaculture Research**, v.30, p. 319-324, 1999.
- COSSON, J. The ionic and osmotic: factors controlling motility of fish spermatozoa. **Aquaculture International**, v. 12, p. 69-85, 2004.
- CIERESZKO A, DABROWSKI K, TOTH GP, CHRIST SA, GLOGOWSKI J. Factors affecting motility characteristics and fertilizing ability of sea Lamprey spermatozoa. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 131, p. 193-202, 2002.

FERREIRA, A. A.; NUÑER, A. P. O.; LUZ, R. K. Avaliação qualitativa e quantitativa do sêmen de jundiá, *Rhamdia quelen*. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 27, n. 1, p. 57-60, 2001.

HARVEY, B.; CAROLSFELD, J. **Induced Breeding in Tropical Fish Culture**, Ottawa: International Development Research Centre, 1993.

HARVEY, B. 1998. **An overview of action before extinction**. In: Harvey B, Ross C, Greer D, Carolsfeld J (eds) Action before extinction: an international conference on conservation of fish genetic diversity. World Fisheries Trust, Victoria, 2004.

JAMIESON, B.G. M.; LEUNG, L. K. P. **Introduction to fish spermatozoa and the micropyle**. In: Jamieson, B. G. M. Fish Evolution and Systematics: Evidence from Spermatozoa. Cambridge: Cambridge University Press, 1991.

LEGENDRE, M.; BILLARD, R. Cryopreservation of rainbow trout sperm by deep freezing. **Reproduction. Nutrition at Developpement**. v.20, p.1859-1868, 1980.

LEGENDRE, M.; LINHART, O.; BILLARD, R. Spawing and management of gametes, fertilized eggs and embryos in Siluroidei. **Aquatic Liv. Res.**, 9, p. 59-80, 1996.

MARDINI, C.V., SILVEIRA, M.A., BARENHO D.H.L. **Técnica de indução da desova em jundiá (*Rhamdia quelen*) empregada na estação experimental de piscicultura da Lagoa dos Quadros**. Porto Alegre: Secretaria da Agricultura, 1981. 14 p. Documento ocasional n.4, 1981.

MARTÍNEZ, J.; CARRASCO, S. Semen Cryopreservation in Fish: Effects on Sperm Motility and Fertility. **Acta Biology Colombia**, v. 15, n. 2, p. 3-24, 2010.

MONGKONPUNYA K, PUPIPAT T, TIERSCH TR **Cryopreservation of sperm of Asian catfishes, including the endangered Mekong giant catfish**. In: Tiersch TR, Mazik PM (eds) Cryopreservation in aquatic species. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, p. 108–116, 2000.

MORISAWA, M., AND K. SUZUKI. Osmolarity and potassium ion: their roles in initiation of sperm motility in teleosts. **Science** 210, p. 1145–1147, 1980.

MORISAWA, M., SUZUKI, K., MORISAWA, S. Effects of potassium and osmolality on spermatozoan motility of salmonid fishes. **J. Exp. Biol.** 107, p. 105–113, 1983.

MOTTA, V. T. **Bioquímica clínica para o laboratório – princípios e interpretações**. Rio de Janeiro: MedBook, UFSC, 120p, 2009.

OGRETMEN, F.; GOLBASI, S.; İNANAN, B.E. Inhibitory effect of K⁺ and Ca₂₊⁺ concentrations, pH, and osmolality of activation solution on motility of shabut (*Barbus grypus* Heckel 1843) spermatozoa. **Turkish Journal of Veterinary Animal Science**, v. 38, p. 245-252, 2014.

PAULA-SOUZA, G. **Reprodução de *Rhamdia branneri*, 1911 (Pisces, Siluriformes) e suas relações com fatores abióticos**. Curitiba – PR, 1978. 66 p. Dissertação (Mestrado em Zoologia) - Curso de Pós-graduação em Zoologia, Universidade Federal do Paraná, 1978.

- PAULINO, M. S. **Criopreservação do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*): técnicas para o descongelamento**. 2009. 94 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Lavras. Lavras, UFLA, 2009.
- POLGE, C., SMITH, A. U., PARKES, A. S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, n.164, p.626-627, 1949.
- RURANGWA, E.; KIME, D.E.; OLLEVIER, F.; NASH, J.P. Measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. **Aquaculture**, v.234, p. 1-28, 2004.
- URBÁNYI, B., HORVÁTH, Á., VARGA, Z., HORVÁTH, L., MAGYARY, I., RADICS, F. Effect of extenders on sperm cryopreservation of African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). **Aquaculture Research**, v. 30, p. 145–151, 1999.
- SANCHES, E. A.; NEUMANN, G.; TOLEDO, C. P. R.; BOMBARDELLI, R. A.; PIANA, P. A.; ROMAGOSA, E. Temperature and storage period over spermatid parameters of jundia, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824). **Aquaculture Research**, v. 44, p.534–541, 2013.
- VIVEIROS, A. T. M.; MARIA, A. N.; ORFÃO, L. H.; CARVALHO, M. A.; NUNES J. F. **Powder coconut water (ACP-104) as extender for semen cryopreservation of Brazilian migratory fish species**. In: Roudaut G, Labbe´ C, Bobe J (eds) Proceedings of the 8th international symposium on reproductive physiology of fish, Saint Malo, France, 3–8. Junho, 2007.
- VIVEIROS, A. T. M.; GODINHO, H. P. Sperm quality and Cryopreservation os Brazilian freshwater fish espécies a review. **Fish Physiol. Biochem.**, 35: 137-150. 2009.
- ZANIBONI-FILHO, E.; BALDISSROTO, B. Congelação de sêmen e tecidos de peixes brasileiros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 39, p.189-194, 2015.

APÊNDICE A – GRÁFICOS

Figura 5 - Taxas de motilidade (MOT%) obtidas após descongelação do sêmen crioconservado de *Rhamdia quelen*, utilizando soluções ativadoras de NaHCO_3 (BS) ou KCl^+ (CP) em cada osmolaridades testada. (A) 120 mOsm l^{-1} , (B) 200 mOsm l^{-1} , (C) 300 mOsm l^{-1} , (D) 400 mOsm l^{-1} .

CC = motilidade produzida no tratamento controle (água deionizada 24 °C).

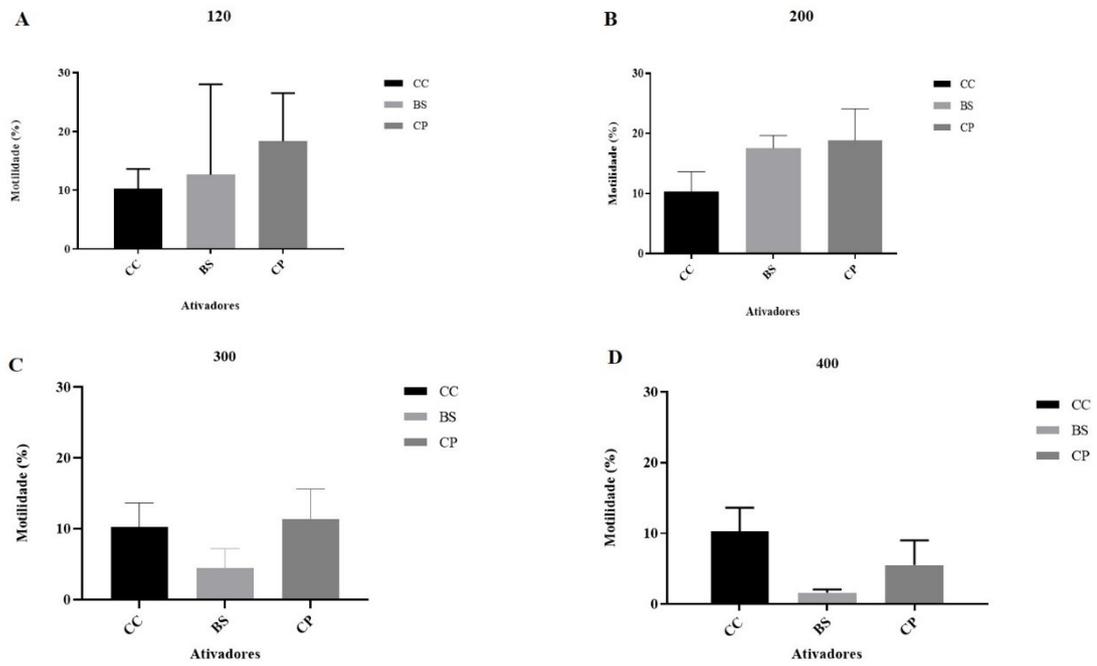


Figura 6 - Velocidade curvilínea (VCL $\mu\text{m s}^{-1}$) obtidas após descongelação do sêmen crioconservado de *Rhamdia quelen*, utilizando soluções ativadoras de NaHCO_3 (BS) ou KCl^+ (CP) em cada osmolaridades testada. (A) 120 mOsm l^{-1} , (B) 200 mOsm l^{-1} , (C) 300 mOsm l^{-1} , (D) 400 mOsm l^{-1} . CC = motilidade produzida no tratamento controle (água deionizada 24 °C).

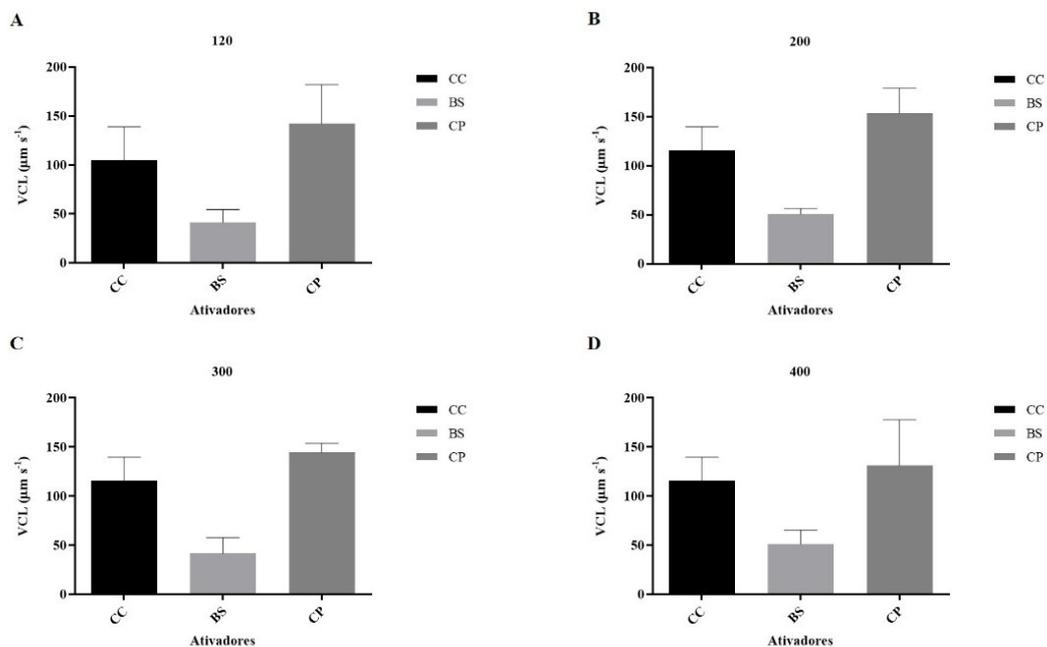


Figura 7 – Velocidade média do trajeto (VAP $\mu\text{m s}^{-1}$) obtidas após descongelação do sêmen crioconservado de *Rhamdia quelen*, utilizando soluções ativadoras de NaHCO_3 (BS) ou KCl^+ (CP) em cada osmolaridades testada. (A) 120 mOsm l^{-1} , (B) 200 mOsm l^{-1} , (C) 300 mOsm l^{-1} , (D) 400 mOsm l^{-1} . CC = motilidade produzida no tratamento controle (água deionizada 24 °C).

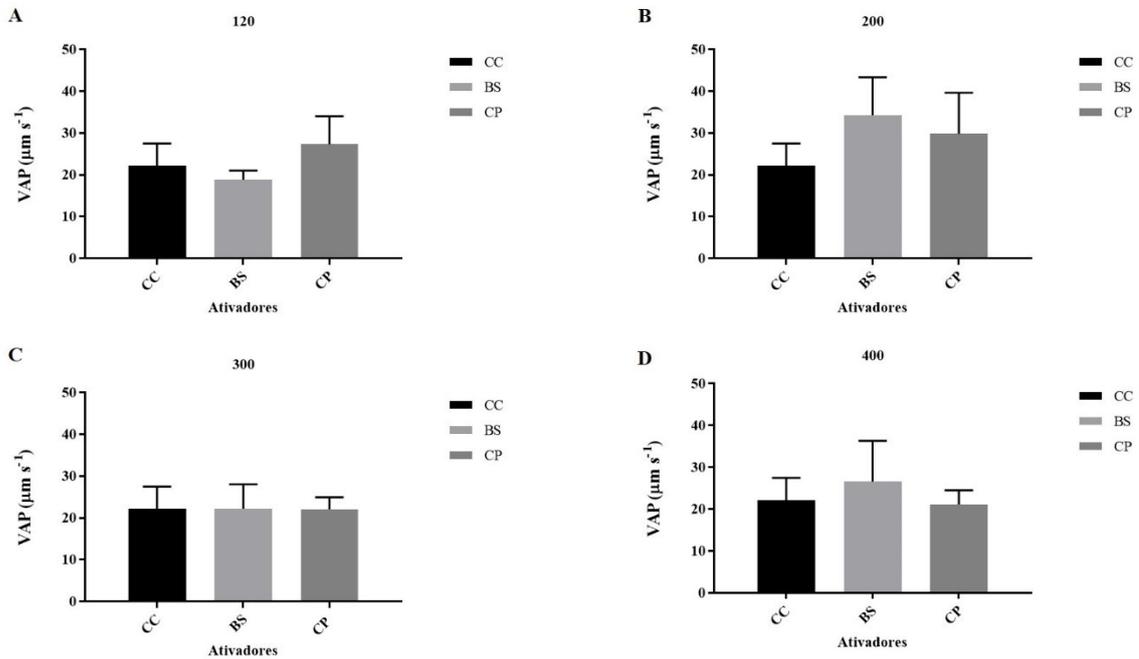


Figura 8 – Velocidade em linha reta (VSL $\mu\text{m s}^{-1}$) obtidas após descongelação do sêmen crioconservado de *Rhamdia quelen*, utilizando soluções ativadoras de NaHCO_3 (BS) ou KCl^+ (CP) em cada osmolaridades testada. (A) 120 mOsm l^{-1} , (B) 200 mOsm l^{-1} , (C) 300 mOsm l^{-1} , (D) 400 mOsm l^{-1} . CC = motilidade produzida no tratamento controle (água deionizada 24 °C).

