



NAIARA CRISTINA MOTTA

**OSMOLALIDADE DAS SOLUÇÕES ATIVADORAS COM OU
SEM ÍONS NA ATIVAÇÃO DA MOTILIDADE DO SÊMEN
CRIOPRESERVADO DE PIABANHA *Brycon insignis*
(CHARACIFORMES)**

**LAVRAS - MG
2017**

NAIARA CRISTINA MOTTA

**OSMOLALIDADE DAS SOLUÇÕES ATIVADORAS COM OU SEM ÍONS NA
ATIVACÃO DA MOTILIDADE DO SÊMEN CRIOPRESERVADO DE PIABANHA**

***Brycon insignis* (CHARACIFORMES)**

Dissertação apresentada a Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição de Não-Ruminantes para a obtenção do título de mestre.

Orientadora
Profa. Dra. Ana Tereza de Mendonça Viveiros

**LAVRAS – MG
2017**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Motta, Naiara Cristina.

Osmolalidade das soluções ativadoras com ou sem íons na
ativação da motilidade do sêmen criopreservado de piabanha
Brycon insignis (characiformes) / Naiara Cristina Motta. - 2017.
46 p. : il.

Orientador(a): Ana Tereza de Mendonça Viveiros.

.
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Sêmen. 2. Criopreservação. 3. Peixe. I. Viveiros, Ana Tereza
de Mendonça. . II. Título.

NAIARA CRISTINA MOTTA

**OSMOLALIDADE DAS SOLUÇÕES ATIVADORAS COM OU SEM ÍONS NA
ATIVÇÃO DA MOTILIDADE DO SÊMEN CRIOPRESERVADO DE PIABANHA
Brycon insignis (CHARACIFORMES)**

**OSMOLALITY OF ACTIVATING SOLUTIONS WITH OR WITHOUT IONS ON
THE ACTIVATION OF THE CRIOPRESERVED SPERM IN PIABANHA *Brycon
insignis* (CHARACIFORMES)**

Dissertação apresentada a Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição de Não-Ruminantes, para a obtenção do título de mestre.

APROVADA em 31 de março de 2017.

Dra. Ana Tereza de Mendonça Viveiros	UFLA
Dra. Cristina Delarete Drummond	UFLA
Dr. Alexmiliano Vogel de Oliveira	EPAMIG

Profa. Dra. Ana Tereza de Mendonça Viveiros
Orientadora

**LAVRAS – MG
2017**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por toda luz e sabedoria para concluir mais essa etapa.

Aos meus pais, Sebastião e Elizabete, por sempre me apoiarem.

À Professora Ana Tereza de Mendonça Viveiros pela oportunidade, confiança e apoio para a realização desse trabalho. Seus ensinamentos serão levados por toda vida

Aos membros da banca Dra. Cristina Delarete Drummond e Alexmiliano Vogel de Oliveira pela disposição para contribuir com esse trabalho.

Aos pesquisadores da EPAMIG Alexmiliano Vogel de Oliveira e Rafael Alves Vianna, mesmo a distância seus conselhos e apoio foram imprescindíveis.

Ao Meu Amor Anderson, por todo cuidado, paciência e carinho.

Ao meu irmão Luiz Eduardo, por todo o apoio, paciência, cuidado e conselhos. A família que formamos em Lavras é meu alicerce em todos os momentos.

Aos meus queridos amigos Felipe, Jéssica, Brisa, Marli, Gustavo, Márcio e Dani, obrigada por entenderem minha ausência.

Aos amigos do Laboratório de Tecnologia de sêmen: Marcelo C. Leal, Ziara A. Isaú, Natália M. N. Mourad, Isabela M. Di Chiacchio, Pollyana H. Siqueira, Isabelle M. Mattioli, Izabella Luiza G. Almeida, Thales S. Franca, muito obrigada por toda ajuda e amizade.

Ao Departamento de Zootecnia e ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, pela oportunidade de aprendizado.

A Universidade Federal de Lavras, pelo seu ensino de excelência.

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.

“A natureza reservou para si tanta liberdade que não a podemos nunca penetrar completamente com o nosso saber e a nossa ciência.”

(Johann Wolfgang von Goethe)

RESUMO

O objetivo deste estudo foi determinar o efeito de soluções ativadoras com diferentes osmolalidades, com ou sem íons, na qualidade espermática do sêmen criopreservado de *Brycon insignis*. O sêmen de 8 machos foi coletado após tratamento hormonal com extrato de hipófise de carpa. Após a coleta, o sêmen foi criopreservado utilizando metilglicol como crioprotetor e uma solução de BTS[®] como diluidor. O sêmen diluído foi envasado em palhetas de 0,5 mL, que foram congeladas em botijão de vapor de nitrogênio (*dry shipper*) e armazenadas em botijão de nitrogênio líquido. Após cinco anos, as palhetas foram descongeladas em banho-maria a 60°C por 8 segundos. No experimento 1, 11 soluções foram preparadas utilizando água osmose reversa (~ 0 mOsm/Kg) e glicose ou NaCl ajustadas as seguintes osmolalidades: 50, 100, 150, 200 e 250 mOsm/Kg. No experimento 2, 6 soluções foram preparadas utilizando água osmose reversa e NaHCO₃, citrato de sódio (Na₃C₆H₅O₇), NaCl, KCl, CaCl₂ ou glicose (controle não iônico), ajustadas a ~ 98 mOsm/Kg. Os parâmetros de taxa de motilidade, velocidade curvilínea (VCL), velocidade retilínea (VSL), velocidade média de percurso (VAP) e frequência de batimento flagelar cruzado (BCF) do sêmen após o descongelamento foram determinados utilizando o sistema computadorizado de análise de sêmen (CASA). Maiores taxas de motilidade e velocidades foram observadas em amostras ativadas nas soluções de NaCl e glicose em osmolalidades de 0 a 200 mOsm/Kg, se comparadas com as amostras ativadas nas soluções de 250 mOsm/Kg e não foram observadas diferenças estatísticas entre as soluções de NaCl e glicose dentro da mesma osmolalidade. As amostras ativadas em NaHCO₃, citrato de sódio, NaCl, KCl e glicose apresentaram as maiores taxas de motilidade, se comparada às amostras ativadas em CaCl₂. Maiores velocidades curvilineares foram observadas em amostras ativadas em NaHCO₃, citrato de sódio, KCl e glicose, quando comparadas às amostras ativadas em CaCl₂. As amostras ativadas em NaCl apresentaram valores intermediários para VCL. O sêmen criopreservado de *B. insignis* pode ser ativado em soluções iônicas ou não iônicas com osmolalidades de 0 a 200 mOsm/Kg, entretanto a solução de CaCl₂ deve ser evitada.

Palavras-chave: Criopreservação. Espermatozoides. CASA. Peixe. Piabanha.

ABSTRACT

The objective of this study was to determine the effect of activating solutions with different osmolalities, with or without ions, on the sperm quality of the cryopreserved sperm of *Brycon insignis*. The semen of 8 males was collected after hormonal treatment with carp pituitary extract. After collection, the semen was cryopreserved using methyl glycol as a cryoprotectant and a BTS™ solution was used as extender. The diluted sperm loaded into 0.5 mL straws, which were frozen in a nitrogen vapor vessel (dry shipper) and stored in a liquid nitrogen vessel. After five years the straws were thawed in a water bath at 60 °C for 8 seconds. In experiment 1, 11 solutions were prepared with reverse osmosis water (~0 mOsm kg⁻¹) and glucose or NaCl adjusted to an osmolality of 50, 100, 150, 200 and 250 mOsm kg⁻¹. In experiment 2, 6 solutions were prepared with reverse osmosis water e NaHCO₃, sodium citrate ((Na₃C₆H₅O₇), NaCl, KCl, CaCl₂ or glucose (as an ion-free control), adjusted to ~98 mOsm Kg⁻¹. The parameters of motility rate, curvilinear velocity (VCL), straight line (VSL), average path (VAP) and beat-cross frequency (BCF) of the post-thaw were determined using a Computer-Assisted Sperm Analyzer (CASA). Higher motility rates and velocities were observed in activated samples in NaCl and glucose solutions at osmolalities of 0 to 200 mOsm Kg⁻¹, when compared to the activated samples in the solutions of 250 mOsm Kg⁻¹ and was no statistical difference on motility rate and velocities between samples activated in NaCl or in glucose solutions within the same osmolality. The samples activated in NaHCO₃, sodium citrate, NaCl, KCl or glucose presented the higher rates of motility, when compared to samples activated in CaCl₂. Higher curvilinear velocities were observed in samples activated in NaHCO₃, sodium citrate, KCl and glucose, when compared to samples activated in CaCl₂. Samples activated in NaCl presented intermediate VCL values. The post-thaw sperm in *B. insignis* can be activated in ionic or non-ionic solutions with osmolalities of 0 to 200 mOsm/kg, however the CaCl₂ solution should be avoided.

Keywords: Cryopreservation. Spermatozoon. CASA. Fish. Tiete Tetra.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

PRIMEIRA PARTE

Figura 1 – Bacia do rio Paraíba do Sul	12
Figura 2 – Exemplar de piabanha <i>Brycon insignis</i>	13
Figura 3 – Mecanismo de ativação espermática em carpa.....	15

SEGUNDA PARTE

Figure 1 – Post-thaw motility rate (A) and curvilinear velocity (VCL; B) of <i>Brycon insignis</i> activated in glucose (closed square) or NaCl solution (opened triangle) at different osmolalities and evaluated at 10 s post-activation. *At the same composition of the activating solution, means followed by this symbol are lower than the others (P<0.05, Student-Newman-Keuls). There was no difference on motility or VCL between samples activated in NaCl and glucose solutions at the same osmolality (P> 0.05; ANOVA).	40
Figure 2 - Quadratic regression graph for post-thaw motility rate and curvilinear velocity (VCL) of <i>Brycon insignis</i> activated in glucose or NaCl solution at different osmolalities and evaluated at 10 s post-activation. The continuous line represents the trend line for motility rate and VCL for the glucose solution. The dotted line represents the trend line for motility rate and VCL for the NaCl solution.	41
Figure 3 – Post-thaw motility rate (A) and curvilinear velocity (VCL; B) of <i>Brycon insignis</i> sperm after activation in five ionic solutions plus a glucose solution (ion-free control). ^{a,b} Means followed by different superscript differ (P< 0.05 Student-Newman-Keuls).	42

LISTA DE TABELAS

PRIMEIRA PARTE

Tabela 1 – Osmolalidade e composição química de soluções ativadoras para espermatozoides de peixes.....19

SEGUNDA PARTE

Table 1 – Concentration of ions Na⁺, K⁺ and Ca²⁺ (mmol L⁻¹), measured using a flame photometer, in each activating solution tested in experiment 2. All solutions were prepared at 98 ± 2 mOsm Kg⁻¹39

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	11
1 INTRODUÇÃO	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1 Caracterização da espécie	12
2.2 Biologia e fisiologia da ativação espermática	13
2.3 Efeito da osmolalidade na motilidade espermática	15
2.4 Efeito dos íons na motilidade espermática	17
3 CONSIDERAÇÕES GERAIS	20
REFERÊNCIAS	21
SEGUNDA PARTE – ARTIGO	25
ARTIGO 1 Ions and osmolality on post-thaw sperm motility activation of the endangered <i>Brycon insignis</i> (Characiformes)	25

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta uma grande diversidade de espécies nativas de peixes de água doce, com aproximadamente 2.500 espécies formalmente descritas (BUCKUP; MENEZES; GHAZZI, 2007). O grande potencial brasileiro para aquicultura é devido ao clima tropical e a presença de grandes rios e reservatórios, sendo que, no ano de 2015 foram produzidas aproximadamente 483 mil toneladas de peixes e 955 milhões de alevinos, considerando espécies nativas e exóticas (IBGE, 2016). No Brasil, a tilápia (*Oreochromis niloticus*) e o tambaqui (*Colossoma macropomum*), com produção de 219 e 135 mil toneladas respectivamente em 2015, são as espécies mais produzidas. Entretanto, aproximadamente 40 espécies de peixes nativas e 4 híbridos são oferecidas no mercado brasileiro (GODINHO, 2007; IBGE, 2016).

A piabanha (*Brycon insignis*), espécie endêmica da bacia do Rio Paraíba do Sul, é um peixe de grande porte, apresenta hábito alimentar onívoro e reprodução concentrada nos meses de dezembro a fevereiro (MAGALHÃES, 1931; MACHADO; ABREU, 1952). Devido à poluição, desmatamento e pesca predatória, a população de piabanha reduziu drasticamente e atualmente é considerada uma espécie ameaçada de extinção (ROSA; LIMA, 2008). Estudos sobre a biologia e fisiologia reprodutiva, principalmente com o sêmen, auxiliam na recuperação de estoques silvestres de espécies de peixes ameaçadas de extinção (VIVEIROS; ORFÃO; LEAL, 2014).

Os espermatozoides de peixes são imóveis no testículo e no plasma seminal, mas em contato com o ambiente externo adquirem motilidade. Fatores ambientais como presença de íons (K^+ , Na^+ , Ca^{2+}), osmolalidade, pH e temperatura influenciam na ativação espermática do sêmen de peixes (COSSON, 2004; ALAVI; COSSON, 2005).

A determinação da osmolalidade e composição iônica de agentes ativadores são de extrema importância para a reprodução artificial, devido aos efeitos sobre a ativação da motilidade espermática, principalmente quando se trata de sêmen criopreservado. O processo de criopreservação torna o sêmen mais sensível ao ambiente externo devido às crioinjúrias. Portanto, o desenvolvimento de novos protocolos que possam auxiliar na otimização dos parâmetros de motilidade e velocidade dos espermatozoides criopreservados poderão permitir uma maior taxa de fertilização e o sucesso da reprodução. Dessa forma, objetivou-se avaliar o efeito da osmolalidade das soluções ativadoras com ou sem íons, sob a motilidade espermática do sêmen criopreservado de *Brycon insignis* (Characiformes).

REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Caracterização da espécie

Reino: Animalia;

Filo: Chordata;

Classe: Actinopterygii;

Ordem: Characiformes;

Família: Characidae;

Gênero: *Brycon*;

Espécie: *Brycon insignis*, Steindachner, 1877.

A espécie *Brycon insignis*, conhecida como piabanha, encontra-se distribuída na Bacia do Rio Paraíba do Sul (FIGURA 1), que compreende parte dos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo. Por apresentar uma restrita distribuição geográfica, fatores como poluição, desmatamento e pesca predatória, ocasionaram o declínio da espécie em seu ambiente natural, sendo atualmente considerada uma espécie ameaçada de extinção (ROSA; LIMA, 2008).

Figura 1 – Bacia do rio Paraíba do Sul.



Fonte: Agência Nacional de Águas (2016).

A piabanha é considerada uma espécie de grande porte, podendo atingir 60 cm de comprimento e pesar de 8 a 10 kg no ambiente natural (MAGALHÃES, 1931). Possui o abdômen róseo e o dorso prateado. A mandíbula é projetada para frente e a cabeça é achatada, duas características gerais de peixes predadores (FIGURA 2). Apresenta hábito alimentar ictiófago e insetívoro na fase juvenil, e herbívora e frugívora na fase adulta, podendo verificar canibalismo na fase larval da espécie (GIRARDI; FARIA; SANTOS, 1993).

Figura 2 – Exemplar de piabanha *Brycon insignis*.



Fonte: Projeto Piabanha (2013).

Seu período reprodutivo estende-se entre os meses de dezembro a fevereiro, quando o aumento do fotoperíodo, temperatura e fluxo de água, atuam como gatilho para migração e desova para as espécies de piracema (SALGADO et al., 1997; RIZZO; BAZZOLI, 2014). As fêmeas e os machos encontram-se aptos à reprodução a partir do terceiro e segundo ano respectivamente, e quando mantida em cativeiro, não são capazes de reproduzirem naturalmente, sendo necessária uma indução hormonal (SALGADO et al., 1997). Para os machos a indução hormonal é utilizada para aumentar o volume espermático.

Na década de 50, a *B. insignis* era a segunda maior espécie em volume de captura na pesca comercial no trecho paulista da bacia do Rio Paraíba do Sul (MACHADO; ABREU, 1952). Atualmente, é apreciada para pesca esportiva devido à resistência a captura com anzol e sua criação é realizada apenas por estações de piscicultura para fins conservacionistas.

A fácil adaptação ao cativeiro, fácil aceitação de alimento, rápido crescimento para alcançar o tamanho comercial, fácil aceitação e comercialização por pesque-pague e carne muito saborosa, tornam a piabanha e outras espécies do gênero *Brycon* grandes potenciais econômicos e zootécnicos para a piscicultura nacional (ZANIBONI-FILHO; REYNALTE-TATAJE; WEINGARTNER, 2006).

2.2 Biologia e fisiologia da ativação espermática

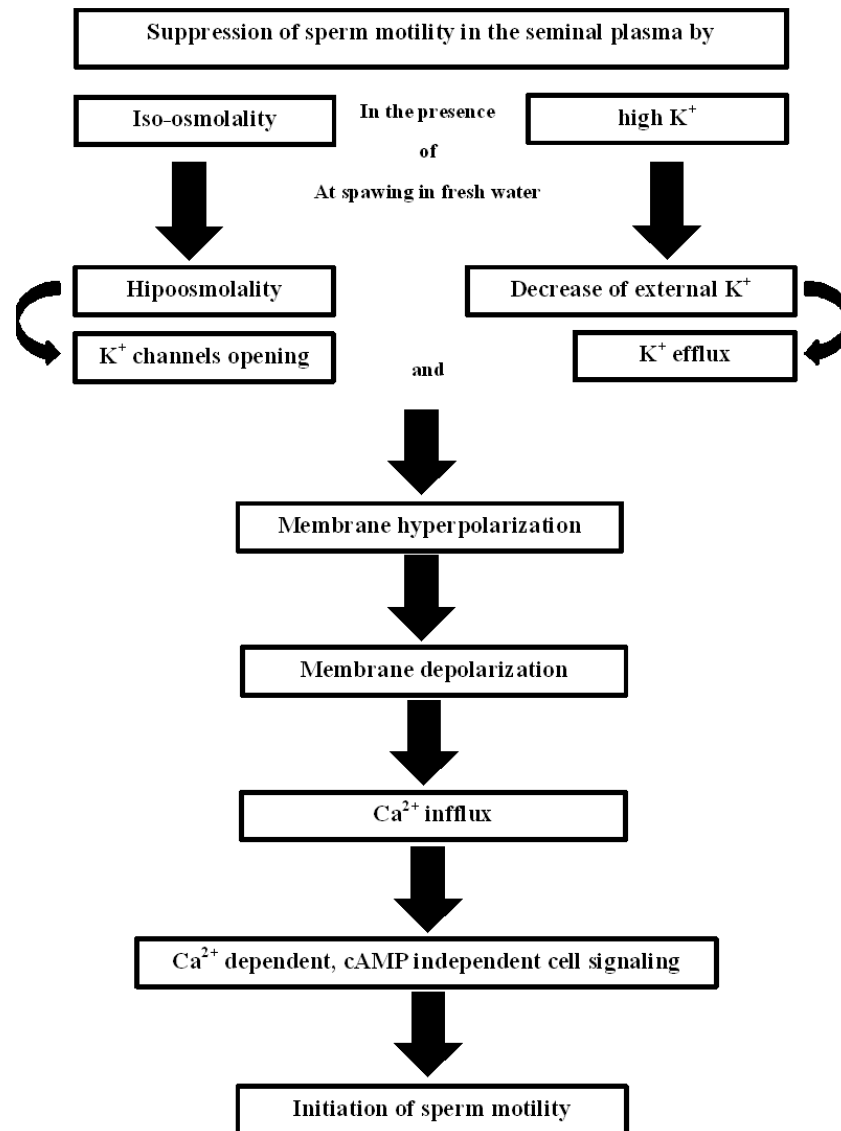
Os espermatozoides de peixes são imóveis no testículo e no plasma seminal e quando liberados em meio aquoso, são ativados adquirindo motilidade (MORISAWA; SUZUKI, 1980). O conhecimento dos mecanismos fisiológicos que regulam a motilidade espermática em peixes permite o aprimoramento de tecnologias reprodutivas.

O espermatozoide é formado por cabeça, peça intermediária e flagelo. Diferentemente dos outros vertebrados, os espermatozoides de peixes são desprovidos de acrossoma. Entretanto, existe uma estrutura no ovócito chamada micrópila, que facilita a entrada do espermatozoide permitindo a fertilização. A peça intermediária apresenta mitocôndrias, ligadas

à produção de ATP para o movimento flagelar. O flagelo é constituído por dois microtúbulos centrais e nove pares periféricos, formando o axonema (VIVEIROS; ORFÃO; LEAL, 2014). A membrana plasmática do espermatozoide apresenta fundamental importância, pois possui canais iônicos, aquaporinas e receptores que regulam as atividades celulares e rotas de sinalização que estão ligadas à ativação espermática (TABARES; TARAZONA; ÁNGEL, 2005; DZYUBA; COSSON, 2014).

A ativação espermática em peixe pode ser representada na Figura 3 conforme descrito por Krasznai et al., 2000. Em carpa comum, os espermatozoides ao serem liberados em meio aquoso, sofrem um choque hiposmótico e/ou ocorre uma diminuição da concentração extracelular do íon K^+ , esses eventos iniciais levam ao estiramento da membrana plasmática e diluição dos íons extracelulares. Após a abertura dos canais iônicos, a diferença de potencial da membrana permite o efluxo de K^+ causando a hiperpolarização da membrana. Dessa forma, os canais de Ca^{2+} são ativados, ocorrendo um influxo de íons Ca^{2+} para dentro do espermatozoide e aumento do pH intracelular. Ocorre em seguida a sinalização de Ca^{2+} dependente e AMPc independente iniciando a atividade flagelar e conseqüentemente a motilidade espermática (TABARES; TARAZONA; ÁNGEL, 2005).

Figura 3 – Mecanismo de ativação espermática em carpa.



Fonte: (Krasznai et al., 2000).

2.3 Efeito da osmolalidade na motilidade espermática

A osmolalidade é definida como a concentração total de solutos em solução, com a propriedade de exercer pressão no interior da referida solução. Esta propriedade dos solutos está estritamente relacionada com o que é chamado de pressão osmótica, a qual está envolvida na regulação do fluxo de água através de uma membrana (MARTÍNEZ; ATENCIO; PARDO, 2011).

O plasma seminal de peixes apresenta uma osmolalidade de 230 a 346 mOsm/Kg para espécies de água doce e 249 a 400 mOsm/Kg para espécies marinhas (DZYUBA; COSSON, 2014). Dessa forma, os espermatozoides de peixes são ativados em soluções hiposmóticas para

as espécies de água doce e em soluções hiperosmóticas para as espécies marinhas (COSSON, 2004).

A diluição em soluções hiposmóticas gera um gradiente osmótico entre o meio intracelular e extracelular do espermatozoide, e para equilibrar a osmolalidade em ambos os lados da membrana plasmática, ocorre um influxo de água e aumento das atividades dos canais iônicos (ALAVI et al., 2007). Em células quiescentes, o potencial de membrana dos espermatozoides de carpa comum (*Cyprinus carpio*) apresenta um estado despolarizado no plasma seminal ($\Psi = -2,6 \pm 3$ mV) e imediatamente após a ativação espermática em solução hiposmótica ocorre a hiperpolarização da membrana ($\Psi = -29 \pm 4$ mV), em um minuto do início da motilidade espermática o potencial de membrana diminuiu e após cinco minutos de ativação o potencial de membrana apresenta um valor próximo das células quiescentes (KRASZNAI et al., 2003).

Para algumas espécies de Characiformes, pesquisadores tem determinado melhores osmolalidades para a solução ativadora para o sêmen fresco. Para o tambaqui *C. macropomum*, soluções de osmolalidade entre 0-270 mOsm/Kg ativam aproximadamente 80% dos espermatozoides (CARNEIRO et al., 2012). Em curimba, *Prochilodus lineatus*, soluções entre 0-250 mOsm/kg ativam 90% dos espermatozoides (VIVEIROS et al., 2016a). Maiores taxas de motilidade podem ser observadas em solução de 100 mOsm/Kg para pacu (*Piaractus mesopotamicus*), piau (*Leporinus elongatus*), piau três pintas (*Leporinus friderici*) e curimatã-pacu (*Prochilodus argenteus*) (MARQUES; GODINHO, 2004). Para matrinxã, *Brycon orthotaenia*, solução entre 49 a 147 mOsm/Kg permitem uma maior taxa de motilidade e duração da motilidade (MELO; GODINHO, 2006). Para a piracanjuba, *Brycon orbignyanus*, as soluções com osmolalidades entre 45 a 180 mOsm/Kg promovem taxas de motilidade espermática superiores a 70% (GONÇALVES et al., 2013). Para a *B. insignis*, soluções entre 0 a 274 mOsm/Kg ativam 90% dos espermatozoides (SHIMODA et al., 2007).

Poucos estudos foram reportados para o sêmen criopreservado de Characiformes. Os espermatozoides de *P. lineatus* apresentam motilidades acima de 70 % e velocidade curvilínea acima de 150 $\mu\text{m/s}$ quando ativados em soluções entre 0-150 mOsm/Kg (VIVEIROS et al., 2016a). Soluções a 184 mOsm/Kg permitem uma maior duração de motilidade para o sêmen criopreservado de *B. insignis* se comparada à solução de 92 mOsm/Kg (VIVEIROS et al., 2011).

A água destilada, que apresenta aproximadamente 0 mOsm/Kg é considerada uma solução ativadora para as espécies de peixes de água doce, mas os autores reportam que apesar da alta taxa de motilidade, a duração da motilidade é menor, devido a um maior choque

hiposmótico que gera danos no flagelo do espermatozoide e gasto imediato de energia, diminuindo as concentrações de ATP e conseqüentemente cessando a motilidade em menor período de tempo (COSSON, 2004; ALAVI et al., 2009a; GONÇALVES et al., 2013). Em *Barbus barbuis*, foi observado movimento de natação circular após ativação espermática com água destilada ou com soluções abaixo de 230 mOsm/Kg, se comparada as soluções de maiores osmolalidades e as menores osmolalidades proporcionou maiores danos no flagelo (formação de laço na ponta do flagelo) (ALAVI et al., 2009a). Em *Perca fluviatilis*, maiores velocidades espermáticas foram observadas em soluções a 100 mOsm/Kg em relação a água destilada (ALAVI et al., 2007).

A solução ativadora para espécies de peixes de água doce deve ser hiposmótica em relação ao plasma seminal. Entretanto, é necessário determinar a melhor faixa de osmolalidade que permite maiores taxas de motilidade e velocidades, e conseqüentemente maiores taxas de fertilização, principalmente para as espécies nativas brasileiras que possuem um curto período reprodutivo.

2.4 Efeito dos íons na motilidade espermática

A composição iônica do plasma seminal é bastante variável inter e intra-espécie, sendo que os principais íons presentes no plasma seminal são o Na^+ , K^+ e Cl^- e os íons que estão relacionados com a ativação espermática em sêmen de peixes são o K^+ , Na^+ e Ca^{2+} , e apresentam também grande variabilidade quanto aos seus efeitos em cada espécie (ALAVI; COSSON, 2006; COSSON, 2010).

Para os salmonídeos, o íon K^+ é o fator principal de inibição da motilidade espermática e ambientes que possuem baixas concentrações de K^+ induzem o efluxo de K^+ para o meio extracelular, dessa forma, ocorre a hiperpolarização da membrana e o início a motilidade espermática (COSSON, 2004; ALAVI; COSSON, 2006). Diferentemente do poder inibitório do íon K^+ para os salmonídeos, em ciprinídeos a diferença de pressão osmótica em um ambiente é o fator principal para desencadear a motilidade (ALAVI; COSSON, 2006). Em estudos com ciprinídeos, soluções ativadoras de KCl ativaram os espermatozoides de *B. barbuis* (ALAVI et al., 2009a), *Vimba vimba* (ALAVI et al., 2010), *Clinostomus elongatus* (BUTTS et al., 2013) e *C. carpio* (KHARA et al., 2014).

Em salmonídeos o íon Na^+ é capaz de eliminar o efeito inibitório do íon K^+ na motilidade espermática (MORISAWA; SUZUKI, 1980). Para os ciprinídeos a ativação espermática é seguida pela alcalinização do meio intracelular através de um canal de Na^+/H^+ (MÁRIÁN et al., 1997). As soluções de NaCl e NaHCO_3 são amplamente utilizadas como agentes ativadores

para os Characiformes, tais como *P. lineatus* (MURGAS et al., 2007; VIVEIROS et al., 2010; GONÇALVES et al., 2013; VIVEIROS et al., 2016b), a piapara, *Leporinus obtusidens*, (TAITSON; CHAMI; GODINHO, 2008), o dourado, *Salminus brasiliensis* (VIVEIROS et al., 2009), a pirapitinga, *Piaractus brachypomus* (NASCIMENTO et al., 2010) e *C. macropomum* (CARNEIRO et al., 2012), além das espécies do gênero *Brycon*, *B. orthotaenia* (MELO; GODINHO et al., 2006), *B. nattereri* (OLIVEIRA et al., 2007), *B. opalinus* (ORFÃO et al., 2011), *B. orbignyanus* (GONÇALVES et al., 2013) e *B. insignis* (SHIMODA et al., 2007; VIVEIROS et al., 2011).

O íon Ca^{2+} atua como um sinalizador para o movimento flagelar, iniciando a motilidade espermática, dessa forma, o íon Ca^{2+} durante o processo de ativação do espermatozoide é tratado como um segundo mensageiro (COSSON, 2010; DZYUBA; COSSON, 2014). A adição de íons Ca^{2+} externo com concentração de 0 a 5 mM não afeta a taxa de motilidade dos espermatozoides de *C. elongatus*, no entanto, maior velocidade curvilínea ocorre em soluções de 1 e 5 mM de Ca^{2+} (BUTTS et al., 2013). Para *P. fluviatilis* a adição de 2,5 mM de Ca^{2+} aumenta a velocidade espermática, mas não afeta as taxas de motilidade (ALAVI et al., 2007). Entretanto, a taxa de motilidade dos espermatozoides de *C. carpio* diminui quando soluções de CaCl_2 a 1,75, 2,5 e 3,25 mM são utilizadas como solução ativadora (KHARA et al., 2014). Em *Puntius javanicus* a adição de 5 mM de Ca^{2+} na solução ativadora induz um movimento de natação circular dos espermatozoides, essa assimetria no batimento flagelar, possivelmente estaria associada a menor duração e taxa de motilidade (MORITA et al., 2006).

Soluções ativadoras sem a presença de íons, como glicose, sacarose e manitol são capazes de ativar os espermatozoides de *C. elongatus* (BUTTS et al., 2013), *B. barbuis* (ALAVI et al., 2009a), *V. vimba* (ALAVI et al., 2010), *Esox lucius* (ALAVI et al., 2009b), *P. fluviatilis* (ALAVI et al., 2007), *P. lineatus* (GONÇALVES et al., 2013; VIVEIROS et al., 2016a), *Prochilodus magdalenae* (MARTÍNEZ; ATENCIO; PARDO, 2011), *B. opalinus* (ORFÃO et al., 2011) e *B. orbignyanus* (GONÇALVES et al., 2013). Esses resultados confirmam que a osmolalidade da solução ativadora é o principal fator que afeta a motilidade espermática (COSSON, 2004).

A presença dos íons e açúcares em soluções ativadoras para espermatozoides de peixes, atuam na osmolalidade final da solução (TABELA 1). Entretanto, esses compostos podem estimular ou inibir a ativação espermática, dessa forma, a sensibilidade biológica dos espermatozoides à concentração de íons e açúcares devem ser consideradas durante a determinação da composição do agente ativador (KHARA et al., 2014).

Tabela 1 – Osmolalidade e composição química de soluções ativadoras para espermatozoides de peixes.

Ordem	Espécie	Plasma Seminal (mOsm/Kg)	Composição	Osmolalidade (mOsm/Kg)	Referências
Characiformes	<i>Brycon insignis</i>	250 ± 13	NaHCO ₃	184	VIVEIROS et al., 2011
		-	NaCl	0-274	SHIMODA et al., 2007
	<i>Brycon orbignyanus</i>	301 ± 11	NaCl	45-180	GONÇALVES et al., 2013
			Glicose	45-180	GONÇALVES et al., 2013
	<i>Brycon orthotaenia</i>	-	NaCl	49-147	MELO; GODINHO, 2006
	<i>Colossoma macropomum</i>	-	NaHCO ₃	0-270	CARNEIRO et al., 2012
	<i>Prochilodus lineatus</i>	286 ± 8	NaCl	45-270	GONÇALVES et al., 2013
			Glicose	45-270	GONÇALVES et al., 2013
		291 ± 8	NaCl	0-150	VIVEIROS et al., 2016a
			Glicose	0-150	VIVEIROS et al., 2016a
<i>Prochilodus magdalenae</i>	278 ± 21	Glicose	0-250	MARTÍNEZ; ATENCIO; PARDO, 2011	
Cypriniformes	<i>Barbus barbuis</i>	273 ± 2	NaCl	3-230	ALAVI et al., 2009a
			KCl	3-215	ALAVI et al., 2009a
			Sacarose	4-210	ALAVI et al., 2009a
	<i>Vimba vimba</i>	273 ± 18	NaCl	30-240	ALAVI et al., 2010
			KCl	30-240	ALAVI et al., 2010
			Sacarose	30-200	ALAVI et al., 2010
	<i>Clinostomus elongatus</i>	280	NaCl	51-255,5	BUTTS et al., 2013
			KCl	45-244,5	BUTTS et al., 2013
			Sacarose	49-243,5	BUTTS et al., 2013
Esociformes	<i>Esox lucius</i>	283 ± 33	NaCl	0-200	ALAVI et al., 2009b
			Sacarose	125-235	ALAVI et al., 2009b
			Manitol	0-235	ALAVI et al., 2009b
Perciformes	<i>Perca fluviatilis</i>	298 ± 5	Sacarose	0-100	ALAVI et al., 2007

As soluções foram classificadas como soluções ativadoras quando a motilidade foi desencadeada em pelo menos 60% dos espermatozoides. Fonte: Do autor (2017).

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os fatores do ambiente, incluindo a osmolalidade e os íons, influenciam na ativação espermática do sêmen de peixes, refletindo nos parâmetros de motilidade e velocidade do espermatozoide, que por sua vez, é capaz de influenciar na fertilização dos ovócitos. Os estudos sobre os efeitos da osmolalidade e composição iônica de soluções ativadoras juntamente com o aprimoramento de técnicas para a ativação dos espermatozoides, permitirão o aperfeiçoamento dos protocolos reprodutivos e o aumento da eficiência da fertilização artificial para espécies nativas de potencial zootécnico, mas que ainda são pouco exploradas no mercado nacional da piscicultura.

REFERÊNCIAS

- ALAVI, S. M. H.; COSSON, J. Sperm motility in fishes. (I) Effects of temperature and pH: a review. **Cell biology international**, London, v. 29, n. 2, p. 101-110, Feb. 2005.
- ALAVI, S. M. H.; COSSON, J. Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: a review. **Cell biology international**, London, v. 30, n. 1, p. 1-14, Jan. 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, July 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, June 2009a.
- ALAVI, S. M. H. et al. Effects of osmolality on sperm morphology, motility and flagellar wave parameters in Northern pike (*Esox lucius* L.). **Theriogenology**, Los Angeles, v. 72, n. 1, p. 32-43, July 2009b.
- ALAVI, S. M. H. et al. Relationships between reproductive characteristics in male *Vimba vimba* L. and the effects of osmolality on sperm motility. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 74, n. 2, p. 317-325, July 2010.
- AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS. **Estudos Auxiliares para a Gestão do Risco de Inundações Bacia do Rio Paraíba do Sul**. Disponível em: <<http://gripbsul.ana.gov.br/ABacia.html>> Acesso em: 06 fev. 2017
- BUCKUP, P. A.; MENEZES, N. A.; GHAZZI, M. S. **Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil**. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2007. p. 195.
- BUTTS, I. A. et al. Physiological functions of osmolality and calcium ions on the initiation of sperm motility and swimming performance in redbottom dace, *Clinostomus elongatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, Oxford, v. 166, n. 1, p. 147-157, Sep. 2013.
- 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, Sept./Oct. 2012.
- COSSON, J. The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa. **Aquaculture International**, Cork, v. 12, n. 1, p. 69-85, Jan. 2004.
- COSSON, J. Frenetic activation of fish spermatozoa flagella entails short-term motility, portending their precocious decadence. **Journal of Fish Biology**, London, v. 76, n. 1, p. 240-279, Jan. 2010.
- DZYUBA, V.; COSSON, J. Motility of fish spermatozoa: from external signaling to flagella response. **Reproductive biology**, Olsztyn, v. 14, n. 3, p. 165-175, Sept. 2014.

GIRARDI, L.; FARIA, C. A.; SANTOS, P. P. Reprodução induzida, larvicultura e alevinagem de piabanha (*Brycon insignis*) na Estação de Aquicultura de Paraibuna CESP/SP. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE ICTIOLOGIA, 10., 1993, São Paulo. **Anais...** São Paulo: [s. n.], 1993. p. 92.

GODINHO, H. P. Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 31, n. 3, p. 351-360, Set. 2007.

GONÇALVES, A. C. S., et al. Initiation and suppression of sperm motility is osmolality-dependent in two South American fish species: streaked prochilod *Prochilodus lineatus* and piracanjuba *Brycon orbignyanus*. **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 10, n. 1, p. 62-70, Jan./Mar. 2013.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa Pecuária Municipal**, 2016. [online] Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/Tabela/3940#notas-tabela>>. Acesso em: 10 fev. 2016.

KHARA, H. et al. Effect of different activation solutions on motility and fertilizing ability of spermatozoa in common carp *Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758. **Indian Journal of Fisheries**, Kerala, v. 61, n. 3, p. 63-68, Oct. 2014.

KRASZNAI, Z. et al. Membrane hyperpolarization removes inactivation of Ca²⁺ channels, leading to Ca²⁺ influx and subsequent initiation of sperm motility in the common carp. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 97, n. 5, p. 2052-2057, Feb. 2000.

KRASZNAI, Z. et al. Role of ion channels and membrane potential in the initiation of carp sperm motility. **Aquatic Living Resources**, London, v. 16, n. 05, p. 445-449, Oct. 2003.

MACHADO, C. E.; ABREU, H. C. F. Notas preliminares sobre a caça e a pesca no Estado de São Paulo-I. A Pesca no Vale do Paraíba. **Boletim de Indústria Animal**, Nova Odessa, v. 13, p. 145-160, 1952.

MAGALHÃES, A. C. de. **Monographia brasileira de peixes fluviaes**. São Paulo: Ed. Graphicars, 1931.

MÁRIÁN, T. et al. Role of extracellular and intracellular pH in carp sperm motility and modifications by hyperosmosis of regulation of the Na⁺/H⁺ exchanger. **Cytometry**, Hoboken, v. 27, n. 4, p. 374-382, Apr. 1997.

MARQUES, S.; GODINHO, H. P. Short-term cold storage of sperm from six neotropical characiformes fishes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 47, n. 5, p. 799-804, Sept. 2004.

MARTÍNEZ, G.; ATENCIO, V.; PARDO, S. Effect of glucose concentration on sperm motility activation in bocachico *Prochilodus magdalena* (Pisces, Characiformes). **Revista MVZ Córdoba**, Córdoba, v. 16, n. 2, p. 2554-2563, may./aug. 2011.

MELO, F. C. S. A.; GODINHO, H. P. A protocol for cryopreservation of spermatozoa of the fish *Brycon orthotaenia*. **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 3, n. 3, p. 380-385, July/Sept. 2006.

MORISAWA, M.; SUZUKI, K. Osmolality and potassium ion: their roles in initiation of sperm motility in teleosts. **Science**, Washington, v. 210, n. 4474, p. 1145-1147, Dec. 1980.

MORITA, M. et al. Changes in sperm motility in response to osmolality/Ca²⁺ in three Indonesian fresh water teleosts: Goby (*Oxyeleotris marmorata*), Java carp (*Puntius javanicus*), and catfish (*Clarias batrachus*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, Oxford, v. 143, n. 3, p. 361-367, Mar. 2006.

MURGAS, L. D. S. et al. Criopreservação do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) mediante adição de diferentes diluidores, ativadores e crioprotetores. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 36, n. 3, p. 526-531, May/June 2007.

NASCIMENTO, A. et al. Out-of-season sperm cryopreserved in different media of the Amazonian freshwater fish pirapitinga (*Piaractus brachypomus*). **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 118, n. 2, p. 324-329, Apr. 2010.

OLIVEIRA, A. V. et al. Sucesso do resfriamento e congelamento de sêmen de pirapitinga *Brycon nattereri*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 59, n. 6, p. 1509-1515, dez. 2007.

ORFÃO, L. H. et al. Extender composition, osmolality and cryoprotectant effects on the motility of sperm in the Brazilian endangered species *Brycon opalinus* (Characiformes). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 311, n. 1, p. 241-247, Feb. 2011.

PROJETO PIABANHA. Use 10 minutos do seu dia e entenda como empregamos a técnica de repovoamento com peixes ameaçados de extinção. Disponível em: <<http://projetopiabanha.blogspot.com.br/2013/04/use-10-minutos-do-seu-dia-e-entenda.html>> Acesso em: 06 feb. 2017

RIZZO, E.; BAZZOLI, N. Reprodução e Embriogênese. In: Baldisserotto, B; Cyrino, JEP; Urbinati, EC. (Org.). **Biologia e fisiologia de peixes neotropicais de água doce**. 1ed. Jaboticabal: FUNEP Campus de Jaboticabal, 2014, p. 265-284.

ROSA, R. S.; LIMA, F. T. Os peixes ameaçados de extinção. In: MACHADO, A. B. M.; DRUMMOND, G. M.; PAGLIA, A. P. (Ed.). **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente/Fundação Biodiversitas, 2008. p. 9-285.

SALGADO, A. F. G. et al. **A conservação da piabanha (*Brycon insignis*) na Bacia Hidrográfica do Rio Paraíba do Sul**. São Paulo: CESP, 1997. 28 p. (Relatório Técnico).

SHIMODA, E. et al. Efeitos da osmolaridade sobre a motilidade espermática na Piabanha *Brycon insignis*. **Ceres**, Viçosa, v. 54, n. 315, p. 430-433, Set./Out. 2007.

TABARES, C. J.; TARAZONA, A. M.; ÁNGEL, M. O. Fisiología de la activación del espermatozoide en peces de agua dulce. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, Medellín, v. 18, n. 2, p. 149-161, jul./sept. 2005.

TAITSON, P. F.; CHAMI, E.; GODINHO, H. P. Gene banking of the neotropical fish *Leporinus obtusidens* (Valenciennes, 1836): a protocol to freeze its sperm in the field. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 105, n. 3, p. 283-291, May 2008.

- VIVEIROS, A. T. M. et al. Sensibilidade dos espermatozoides de dourado (*Salminus brasiliensis*) a diferentes soluções crioprotetoras. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, n. 4, p. 883-889, Ago. 2009.
- VIVEIROS, A. T. M. et al. Motility and fertility of the subtropical freshwater fish streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) sperm cryopreserved in powdered coconut water. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 74, n. 4, p. 551-556, Sept. 2010.
- VIVEIROS, A. T. M. et al. Sperm cryopreservation of tiete tetra *Brycon insignis* (Characiformes): effects of cryoprotectants, extenders, thawing temperatures and activating agents on motility features. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 42, n. 6, p. 858-865, May 2011.
- VIVEIROS, A. T. M.; ORFÃO, L. H.; LEAL, M. C. Biologia e conservação dos espermatozoides. In: BALDISSEROTTO, B.; CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C. (Org.). **Biologia e fisiologia de peixes neotropicais de água doce**. 1ed. Jaboticabal: FUNEP Campus de Jaboticabal, 2014, p. 307-327.
- VIVEIROS, A. T. M. et al. Osmolality and composition of the activating solution affects motility of fresh and frozen *Prochilodus lineatus* sperm differently. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 173, p. 73-79, Oct. 2016a.
- VIVEIROS, A. T. M. et al. Storage and transportation of *Prochilodus lineatus* (Characiformes) sperm prior to cryopreservation. **General and Comparative Endocrinology**, 2016b.
- ZANIBONI-FILHO, E.; REYNALTE-TATAJE, D.; WEINGARTNER, M. Potencialidad del género *Brycon* en la piscicultura brasileña. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, Medellín, v. 19, n. 2, p. 233-240, abr./jun. 2006

SEGUNDA PARTE – ARTIGO

ARTIGO 1

Ions and osmolality on post-thaw sperm motility activation of the endangered *Brycon insignis* (characiformes)

Ana TM Viveiros*, Naiara C Motta, Ziara A Isaú, Izabella LG Almeida, Marcelo C Leal

Dept. Animal Science, Federal University of Lavras, UFLA, P.O. Box 3037, Lavras, Minas Gerais, 37200-000, Brazil.

*Corresponding author: Phone/fax: +55(35)38291231; anatmviveiros@outlook.com

Artigo formatado de acordo com as normas do periódico *Aquaculture*

Abstract

The aim of this study was evaluate the effects of osmolality and the presence of ions on the activation of post-thaw sperm motility of *Brycon insignis*. Sperm was frozen under a standardized methodology for this species. In experiment 1, 11 solutions were prepared with reverse osmosis (RO) water (~ 0 mOsm kg^{-1}) and glucose or NaCl adjusted to an osmolality of 50, 100, 150, 200 and 250 mOsm kg^{-1} . In experiment 2, six solutions were prepared with RO and adjusted to ~ 98 mOsm Kg^{-1} with one of the following chemicals: NaHCO_3 , sodium citrate ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$), NaCl, KCl, CaCl_2 or glucose (as an ion-free control). Post-thaw sperm of both experiments was evaluated for motility rate, velocities (curvilinear = VCL, among others) and beat-cross frequency (BCF). In experiment 1, sperm motility and velocities were higher ($P < 0.05$) when triggered in solutions at osmolalities from 0 to 200 mOsm kg^{-1} (62-80% motility; 139-167 $\mu\text{m s}^{-1}$ VCL) than that at 250 mOsm kg^{-1} (36-44% motility; 94-99 $\mu\text{m s}^{-1}$ VCL). BCF was not affected by osmolality and varied from 19 to 24 Hz in all samples. In experiment 2, samples activated in NaHCO_3 , citrate, NaCl and KCl solutions yielded higher motility rates (76-85%) and BCF (24-25 Hz) compared to those activated in CaCl_2 (50%; 14 Hz). Samples activated in ion-free glucose solution yielded higher motility rate (87%) than those activated in NaHCO_3 and in CaCl_2 . Curvilinear velocity was higher in samples activated in glucose, NaHCO_3 , citrate and KCl solutions (144-160 $\mu\text{m s}^{-1}$) than in those activated in CaCl_2 (104 $\mu\text{m s}^{-1}$); samples activated in NaCl yielded intermediate VCL values (127 $\mu\text{m s}^{-1}$). *B. insignis* sperm achieves maximum motility rate and velocities when activated in ion-free glucose solution, in sodium citrate, NaCl or KCl solutions at osmolalities ranging from 0 to 200 mOsm kg^{-1} . The presence of calcium should be avoided in the activating solution.

Keywords: CASA; Semen; Cryopreservation; Frozen; Neotropical fish

Introduction

Brycon insignis (Steindachner, 1877), known as tiete tetra in English and piabanha in Portuguese, is a Brazilian freshwater fish, member of the order Characiformes and native to Paraíba do Sul River, which includes the states of Minas Gerais, Rio de Janeiro and São Paulo (Buckup et al., 2007). The *B. insignis* is a migratory species, which spawns between December and February, with a single spawning per season (Salgado et al., 1997). Due to a restricted geographic distribution, factors such as the construction of hydroelectric dams, pollution, deforestation and overfishing have caused the decline of this species in the environment, and thus it is currently classified as an endangered species (Rosa and Lima, 2008)

Sperm of most fish species is immotile in the testis and seminal plasma and motility is induced when in contact with the aquatic environment during natural reproduction or with activating agent during artificial reproduction. External factors such as the presence of ions (K^+ , Na^+ , Ca^{2+}), osmolality, pH and temperature influence the activation of sperm motility (Alavi and Cosson, 2006; Alavi and Cosson, 2005). In freshwater species, the main external factor that activates sperm motility is the reduced osmolality of the extracellular media, as previously described in cyprinids (Cosson, 2004). In salmonids, however, the decrease of extracellular K^+ concentration is the triggering factor for sperm motility activation (Alavi and Cosson, 2006; Morisawa, 2008). The mechanisms behind sperm motility activation are well described in salmonids, sturgeons and cyprinids, but in characiforms the number of studies is reduced while the number of species is high. In general, these studies show that motility of characiforms fresh sperm is triggered in solutions composed of NaCl, glucose or $NaHCO_3$ and set at osmolalities between 0 up to 270 mOsm kg^{-1} (Melo and Godinho, 2006; Shimoda et al., 2007; Gonçalves et al., 2013).

The cryopreservation of fish sperm provides a great tool by which a number of steps during artificial reproduction is optimized (Kopeika and Kopeika, 2008). However, the freezing and thawing processes decrease post-thaw motility and velocities, and increases membrane and organelles damages, as previously described (Cabrita et al., 1998; Jun et al., 2006). These damages may alter the permeability of sperm membrane in such a way that the osmolality range at which post-thaw sperm motility is triggered may be different from that described for fresh sperm. Recently, a study comparing the motility activation of fresh and frozen sperm of the same males has been published (Viveiros et al., 2016). It was shown in *Prochilodus lineatus* that motility above 70% were observed after activation in solutions from 0 to 250 mOsm kg⁻¹ in fresh samples and from 0 to 150 mOsm kg⁻¹ in frozen samples. The authors suggested that the dehydration and rehydration, among other events that occurred during the cooling/freezing and rewarming of frozen samples, changed the ion channel functions and/or membrane permeability so that frozen cells were more sensitive to osmotic stress caused by solutions at higher osmolalities.

In *Brycon insignis*, fresh sperm motility can be successfully triggered in NaCl solution up to 270 mOsm Kg⁻¹ (Shimoda et al., 2007) but in frozen samples this range of osmolality and the composition of the activating solution may be different. Thus, the aim of this study was to evaluate the effects of osmolality and the presence of ions on the initiation of post-thaw sperm motility of *Brycon insignis*.

Materials and Methods

Fish handling and sperm collection

This study was approved by the Ethical Committee of Animal Use at Federal University of Lavras - UFLA (CEUA Protocol N° 061/14), in the city of Lavras, Minas Gerais State, Brazil.

Brycon insignis males (n = 8) were selected from earthen ponds at the Hydrobiology and Aquaculture Station of the Hydroelectric Company of São Paulo (CESP) in the city of Paraibuna (23°23'10"S; 45°39'44"W), São Paulo state, Brazil, during the spawning season (January and February). Males (245-335 g of body weight) with detectable running sperm under soft abdominal pressure received a single intramuscular dose of carp pituitary extract (Argent Chemical Laboratory, Redmond, WA, USA) at 3 mg kg⁻¹. After 8 h at ~ 25 °C, the urogenital papilla was carefully dried and sperm was hand-stripped directly into test tubes. Sperm collection was carried out at room temperature (~ 25°C), and soon after collection, the tubes containing sperm were maintained in a polystyrene box containing crushed ice (5 ± 2 °C). Contamination of sperm with water, urine or feces was carefully avoided.

Immediately after collection, each sperm sample was subjectively evaluated for motility rate after activation in 1% NaHCO₃ (~184 mOsm Kg⁻¹), using a light microscope (Model L1000; Bioval, Jiangbei, China) at 400x magnification. All samples achieved at least 90% motile sperm and thus were used in the subsequent analyses. Approximately 2 mL of each sperm sample was centrifuged at 4500 x g for 30 min at room temperature and osmolality of the seminal plasma was measured cryoscopically (Semi-Micro Osmometer K-7400, Knauer, Berlin, Germany).

Sperm cryopreservation

Sperm was cryopreserved within 60 min from collection, following the methodology previously described for *B. insignis* (Viveiros et al., 2011). Briefly, the freezing medium was composed of 5% BTSTM (Beltsville Thawing SolutionTM, Minitüb, Tiefenbach/Landshut, Germany; 79.9% glucose, 12.7% sodium citrate, 2.7% EDTA, 2.7% NaHCO₃, 1.6% KCl, and 0.4% gentamycin sulfate; 318 mOsm kg⁻¹) as extender and methyl glycol [CH₃O(CH₂)₂OH] (Vetec Química Fina Ltda, Duque de Caxias, RJ, Brazil) as cryoprotectant agent. All samples

were individually diluted in the freezing medium at a ratio of 1:8:1 (100 μ L sperm + 800 μ L BTS + 100 μ L methyl glycol). Diluted sperm was then drawn into eight replicate unsealed 0.5-mL straws (total of 64 straws) and frozen in nitrogen vapor (dry vapor vessel YDH-8, Chengdu Golden Phoenix Liquid Nitrogen Container, Chengdu, Sichuan, China) at approximately -170°C. Final dilution, loading and freezing (equilibration time) took ~20 min. Within 24 h, all straws were transferred to a cryogenic tank (YDS-20; Chengdu Golden Phoenix Liquid Nitrogen Container, Chengdu, Sichuan, China) for storage. After a few months, the straws were transferred to a dry vapor vessel, transported by car from CESP to Laboratory of Semen Technology at Federal University of Lavras (UFLA) for ~6 hours and then transferred back to a cryogenic tank (MVE XC 34/18, New Prague, Minnesota, USA) for storage.

Evaluation of post-thaw sperm motility rate and velocities

Sperm was evaluated approximately five years after freezing, when straws were individually thawed in a 60°C water bath (Water-bath MA 127, Marconi, Piracicaba, São Paulo, Brazil) for 8 s. Sperm motility rate and velocities were estimated using the CASA system (Computer-Assisted Sperm Analyzer), following the methodology described in Viveiros et al. (2012). Briefly, sperm motility was triggered in each activating solution (see below) directly in a Makler™ counting chamber (Sefi-Medical Instruments ltd, Haifa, Israel) placed under a phase contrast microscope (Nikon™ Eclipse E200, Tokyo, Japan) at 100x magnification, green filter and phase 1 position. The microscope was connected to a video camera (Basler Vision Technologies™ A602FC, Ahrensburg, Germany) generating 100 images s⁻¹; video recording started approximately 10 s post-activation. Each image was analyzed using the standard settings for fish by Sperm Class Analyzer™ software (SCA™ 2010, Microptics, S.L. Version 5.1, Barcelona, Spain). Motility rate, curvilinear velocity (VCL), average path velocity (VAP), straight line velocity (VSL) and beat-cross frequency (BCF) were considered for analysis. To

determine these parameters, each individual sperm ($n = 732 \pm 360$) was followed throughout the recorded video images from which sperm trajectories were evaluated.

Experiment 1. Osmolality of the activating solution

The activating solutions were prepared using the same methodology described in Viveiros et al (2016). The solutions were prepared with reverse osmosis (RO) water and glucose or NaCl and adjusted to five osmolalities: 50, 100, 150, 200 and 250 mOsm kg⁻¹. The RO water (~0 mOsm Kg⁻¹) was also tested as activating agent. To achieve each osmolality from 50 to 250 mOsm kg⁻¹, approximately 0.9, 1.8, 2.7, 3.6, 4.4 g of glucose in 100 mL RO and approximately 0.152, 0.305, 0.457, 0.610, 0.763 g of NaCl in 100 mL RO were used, respectively. The 11 activating agents were referred to as: 0-RO, 50-glu, 100-glu, 150-glu, 200-glu, 250-glu, 50-NaCl, 100-NaCl, 150-NaCl, 200-NaCl and 250-NaCl. All chemicals were purchased from Vetec Quimica Fina LTDA (Duque de Caxias, RJ, Brazil). Each solution was kept in 100-mL amber glass bottles, stored in a refrigerator at 6–8°C and used within 7 days.

Two straws of each male were evaluated for motility using batch #1 containing six activating solutions (0-RO, 100-glu, 200-glu, 250-glu, 100-NaCl and 200-NaCl), and other two straws using batch #2 also containing six solutions (0-RO, 50-glu, 150-glu, 50-NaCl, 150-NaCl and 250-NaCl). The analysis of each straw was carried out in duplicate ($n = 12$ analyses; 6 activating solutions x 2 analyses) and lasted 40-50 min. To control post-thaw sperm ability of being activated during this 40-50 min period, the first and the last motility analysis was always carried out using 0-RO as activating solution and then evaluated for any decrease of sperm quality. During this period of time, post-thaw sperm was kept at room temperature.

Experiment 2. Ions of the activating solution

The activating solutions were prepared with RO water and one of the following chemicals (g/100 mL): NaHCO₃ (sodium bicarbonate; 0.424 g), Na₃C₆H₅O₇ (sodium citrate; 0.952 g), NaCl (sodium chloride; 0.305 g), KCl (potassium chloride; 0.398), CaCl₂ (calcium chloride; 0.646 g) or glucose (1.8 g; as an ion-free control). The osmolality of each solution was set at 98 ± 2 mOsm Kg⁻¹ to eliminate the effects of osmolality. All chemicals were purchased from Vetec Quimica Fina LTDA (Duque de Caxias, RJ, Brazil). Each solution was kept in 100-mL amber glass bottles, stored in a refrigerator at 6–8°C and used within 7 days. In order to determine the actual ion concentration present in each activating solution, the concentration of Na⁺, K⁺ and Ca²⁺ were measured using a flame photometer (Digimed DM – 62, Campo Grande, SP, Brazil), in duplicate analysis.

Four straws of each male were evaluated for motility after activation in each of the six solutions. The analysis of each straw was carried out in duplicate (n = 12 analyses; 6 activating solutions x 2 analyses) and lasted 40-50 min. During this period, post-thaw sperm was kept at room temperature, as described in experiment 1.

Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm standard deviation (SD). Statistical analyses were conducted with the software R, version 3.1.3 (R Development Core Team 2015). Data were tested for normal distribution using test Shapiro-Wilk and for significant differences using ANOVA, followed by Student–Newman–Keuls test when applicable. The level of significance for all statistical tests was set to 5% (P<0.05). The motility rate and VCL curves in relation to the level of osmolality were obtained by quadratic regression. The point of maximal motility rate and VCL was determined from the first derivative of the regression curve equation.

Results

The osmolality of the seminal plasma of the males used in this study was 340 ± 20 mOsm Kg⁻¹.

The analysis of each straw was performed in duplicate and took 40-50 min. The first analysis of each straw yielded higher ($P < 0.05$) motility and velocities values compared to those observed after the second analysis, regardless of the activating solution osmolality or ion composition. This demonstrated that the sperm capacity of being activated decreased as a function of time after thawing, and thus, only the first analysis was considered for statistical analysis.

Experiment 1-Osmolality of the activating solution

The osmolality of the activating solution affected both post-thaw sperm motility rate (Figure 1A) and velocities. As the results were similar among velocities, only VCL data is displayed in Figure 1B. Significantly higher motility and velocities were observed when samples were activated in 0-RO (77% motility, $147 \mu\text{m s}^{-1}$ of VCL, $116 \mu\text{m s}^{-1}$ of VAP and $83 \mu\text{m s}^{-1}$ of VSL), in 50- to 200-glu (69-80% motility, $139-167 \mu\text{m s}^{-1}$ of VCL, $90-134 \mu\text{m s}^{-1}$ of VAP and $81-104 \mu\text{m s}^{-1}$ of VSL) and in 50- to 200-NaCl (62-75% motility, $143-154 \mu\text{m s}^{-1}$ of VCL, $108-114 \mu\text{m s}^{-1}$ of VAP and $81-87 \mu\text{m s}^{-1}$ of VSL), compared to those activated at higher osmolalities as 250-glu (44% motility, $99 \mu\text{m s}^{-1}$ of VCL, $69 \mu\text{m s}^{-1}$ of VAP and $50 \mu\text{m s}^{-1}$ of VSL) and 250-NaCl (36% motility, $94 \mu\text{m s}^{-1}$ of VCL, $63 \mu\text{m s}^{-1}$ of VAP and $46 \mu\text{m s}^{-1}$ of VSL). Beat cross frequency was not affected ($P > 0.05$) by the osmolality of the activating agent and varied from 19 to 24 Hz. There was no difference on motility rate, velocities or BCF between samples activated in NaCl or in glucose solutions within the same osmolality.

The quadratic regression equation was the one that best explained the biological behavior of the samples. The equations identified the points of maximum motility rate and VCL

(Figure 2) obtained for the samples activated in the osmolalities of 0 to 250 mOsm Kg⁻¹ of NaCl or glucose. For the NaCl samples activated, the maximum motility point was estimated at 73.2 mOsm kg⁻¹ with a motility rate of 77.3%, and the VCL was estimated at 88.2 mOsm kg⁻¹ with a VCL of 154.9 $\mu\text{m s}^{-1}$. In the case of the samples activated glucose, we observed that the point of maximum motility was estimated at 81.5 mOsm Kg⁻¹ with a motility rate of 79.9%, and the VCL was estimated at 104.7 mOsm kg⁻¹ with a VCL of 166.6 $\mu\text{m s}^{-1}$.

Experiment 2. Ions of the activating solution

The actual ion concentration present in each activating solution is displayed on Table 1. The Na⁺ concentration was higher in citrate (137.7 mmol L⁻¹) than in NaHCO₃ (71.1 mmol L⁻¹), and in NaCl (60.2 mmol L⁻¹) solutions; in sodium-free solutions only traces of sodium were detected (0.0-0.4 mmol L⁻¹). The K⁺ concentration was 26.0 mmol L⁻¹ in KCl solution and 0.2-0.8-mmol L⁻¹ in potassium-free solutions. The Ca²⁺ concentration was 4.1 mmol L⁻¹ in CaCl₂ solution and 0.6-1.7 mmol L⁻¹ in calcium-free solutions.

The presence of ions on the activating solution affected (P<0.05) all parameters evaluated. Samples activated in NaHCO₃, citrate, NaCl and KCl solutions yielded higher motility rates (76-85%; Fig 3A), VAP (92-122 $\mu\text{m s}^{-1}$), VSL (69-90 $\mu\text{m s}^{-1}$) and BCF (24-25 Hz) compared to those activated in CaCl₂ (50% motility; 63 $\mu\text{m s}^{-1}$ of VAP; 39 $\mu\text{m s}^{-1}$ of VSL; 14 Hz of BCF). Curvilinear velocity (Figure 3B) was higher in samples activated in NaHCO₃, citrate and KCl solutions (144-160 $\mu\text{m s}^{-1}$) than in those activated in CaCl₂ (104 $\mu\text{m s}^{-1}$); samples activated in NaCl yielded intermediate VCL values (127 $\mu\text{m s}^{-1}$).

Samples activated in solution containing only traces of ions, the glucose solution, yielded higher motility (87%) when compared to those activated in NaHCO₃ and in CaCl₂, and higher VCL (159 $\mu\text{m s}^{-1}$), VAP (122 $\mu\text{m s}^{-1}$), VSL (91 $\mu\text{m s}^{-1}$), and BCF (23 Hz) when compared to those activated in CaCl₂.

Discussion

Fish sperm are immotile in the testes due to osmolality and ion concentration of the seminal plasma. Sperm motility is usually triggered in decreasing osmolality of the extracellular medium, except for sturgeons and salmonids where the concentration of specific ions is crucial (Cosson 2010). In Characiformes, the process involving the activation of sperm motility has received less attention, but it seems that osmolality is the key factor. In the present study, we described the effects of osmolality and the presence of ions on the initiation of post-thaw sperm motility of *B. insignis*.

In this study, maximal post-thaw motility and velocities were observed in *B. insignis* sperm activated in solutions from 0 to 200 mOsm Kg⁻¹. Similarly, no difference on post-thaw sperm motility of the same fish species was observed after activation in solutions at 92 or 184 mOsm Kg⁻¹ (Viveiros et al 2011). As reported for *P. lineatus*, the osmolality interval to initiate sperm motility in fresh samples may be larger and include higher values compared to post-thaw samples. It has been suggested that post-thaw sperm may be more sensitive to osmotic stress caused by solutions at higher osmolalities than fresh sperm does. Dehydration and rehydration that occurs during the cooling/freezing and rewarming of samples may change the ion channels functions and/or membrane permeability (Viveiros et al., 2016). Thus, it is possible that the osmolality interval to induce full motility in fresh *B. insignis* sperm may include values above 200 mOsm Kg⁻¹, as observed in *P. lineatus* where this interval increased from 0-150 mOsm Kg⁻¹ in post-thaw sperm to 0-250 mOsm Kg⁻¹ in fresh sperm (Viveiros et al., 2016).

In a species-specific basis, fish sperm motility is influenced by the presence of Na⁺, K⁺ and Ca²⁺ ions (Alavi et al., 2007). In the present study, we observed high sperm motility and velocities after activation in solutions containing significant amount of Na⁺ and K⁺, such as NaCl, NaHCO₃, citrate and KCl. The NaCl and NaHCO₃ solutions have been used to successfully trigger post-thaw motility of *B. insignis* sperm (Viveiros et al., 2011), as well as

of other characiforms, such as *B. orthotaenia* (Melo and Godinho 2006), *Leporinus obtusidens* (Taitson et al., 2008) and *P. lineatus* (Viveiros et al., 2009), among others. The use of KCl as activating solution has been reported in cypriniforms *Barbus barbuis* (Alavi et al., 2009a), *Clinostomus elongatus* (Butts et al., 2013) and *Cyprinus carpio* (Khara et al., 2014), in perciforms *Perca fluviatilis* (Alavi et al., 2007) but not in characiforms. In *P. fluviatilis*, highest motility rate was observed when K⁺ concentration was above 20 mM and highest velocity at 50 mM (Alavi et al., 2007). In the present study, K⁺ concentration in the KCl solution was 26.0 mmol L⁻¹ and in the other activating solutions tested its concentration varied from 0.2 to 0.8 mmol L⁻¹. When used to trigger sperm motility, KCl-activated samples yielded motility and velocities similar to those activated in solutions containing Na⁺ or ion-free solution. Therefore we can conclude that sperm motility activation of *B. insignis* sperm was not dependent on the presence of Na⁺ or K⁺ ions. Differently, K⁺ is a key ion which, by its concentration and its combination with osmolality, controls sperm motility in salmonids and acipenserids (Cosson 2010). In these species, the first trigger for initiating sperm motility occurs when K⁺ ion exits the cell in a diluted extracellular medium or is removed from seminal plasma by dialysis (Alavi and Cosson, 2006).

In the present study, post-thaw *B. insignis* sperm activated in CaCl₂ solution (containing 4.1 mmol L⁻¹ Ca²⁺), yielded significantly lower values for motility rate, velocities and BCF when compared to sperm activated in solutions containing lower concentration of Ca²⁺. Similarly, a reduction on sperm motility after activation in 3.5 mM Ca²⁺ solution compared to solutions at a lower Ca²⁺ concentration was reported in *C. carpio* (Khara et al., 2014). Furthermore, in all CaCl₂-activated samples, sperm agglutination was observed, which possibly contributed to reduce sperm motility in these samples. A circular swimming pattern after sperm activation in 5 mM Ca²⁺ has been reported in *Puntius javanicus* and the authors concluded that

this asymmetrical beating of flagellum decreased duration and motility rate (Morita et al., 2006).

The glucose solution tested in the present study contained only traces of Na⁺, K⁺ and Ca²⁺ ions and was regarded as an ion-free solution. Despite the absence of considered amount of ions, glucose solution fully activated sperm motility of *B. insignis* with results similar to those obtained after activation in NaCl, sodium citrate and KCl solutions. The use of glucose and other sugar solutions, such as sucrose and mannitol, as activation media have been reported in *P. lineatus* and *B. orbignyana* (Gonçalves et al., 2013), as well as in *Vimba vimba* (Alavi et al., 2010), *E. lucius* (Alavi et al., 2009b) and *C. elongatus* (Butts et al., 2013). These results suggest that the osmolality of the solution rather than the presence of ions is the key factor for the initiation of sperm motility of *B. insignis* and possibly of other characiforms, as previously suggested by Viveiros et al. (2016).

The use of post-thaw sperm, either for motility analysis or fertilization of oocytes, should closely follow thawing because sperm is damaged in more or less intensity during the freezing and thawing processes and thus the capacity of being activated decreases fast after returning to liquid stage (Viveiros et al, 2016). In the present study, we observed a significant decrease on *B. insignis* sperm capacity of being activated 20-25 min after thawing when kept at room temperature, as the second motility analysis always reached lower values than the first one. In *B. orbignyana* and *Salminus brasiliensis* an even stronger decreased capacity of being activated after only a few seconds of thawing has been observed in our lab over the last decade (personal observation). On the other hand, post-thaw *P. lineatus* sperm is very resistant and motility can be triggered for as long as 40-50 min after thawing without losing the capacity of being activated (Viveiros et al., 2016).

Conclusion

Brycon insignis sperm presents similar behavior to other species of Characiformes and cyprinids where osmolality is the main factor of sperm activation and the presence of K^+ ion does not inhibit motility. To trigger motility in a high percentage of spermatozoa with fast velocities, the activating solution should be prepared with an organic or ionic compound between 0 and 200 mOsm kg^{-1} , but at 100 mOsm kg^{-1} these values will be maximum. The Ca^{2+} ion in the activating agent should be avoided.

Conflicts of interest

We declare no actual or potential conflict of interest regarding the submitting manuscript.

Acknowledgments

This study received funding from the Brazilian fostering agencies CNPq (grant PQ 302434/2011-9 to A.T.M.V.; project 471393/2011-8; project 474001/2013-0; grant IC 101051/2014-0 to I.L.G.A; grant IC 115496/2015-7 to I.M.M). The authors thank the undergraduate students P.H. Siqueira and I.M. Mattioli (UFLA) for assistance during the experiments.

Table 1. Concentration of Na⁺, K⁺ and Ca²⁺ ions (mmol L⁻¹) present in each activating solution tested in experiment 2. All solutions were prepared at 98 ± 2 mOsm Kg⁻¹.

Activating solution	[Na ⁺]	[K ⁺]	[Ca ²⁺]
NaHCO ₃ (sodium bicarbonate)	71.1	0.8	0.6
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ (sodium citrate)	137.7	0.6	1.1
NaCl (sodium chloride)	60.2	0.4	0.9
KCl (potassium chloride)	0.0	26.0	1.7
CaCl ₂ (calcium chloride)	0.4	0.2	4.1
C ₆ H ₁₂ O ₆ (glucose)	0.4	0.4	0.9

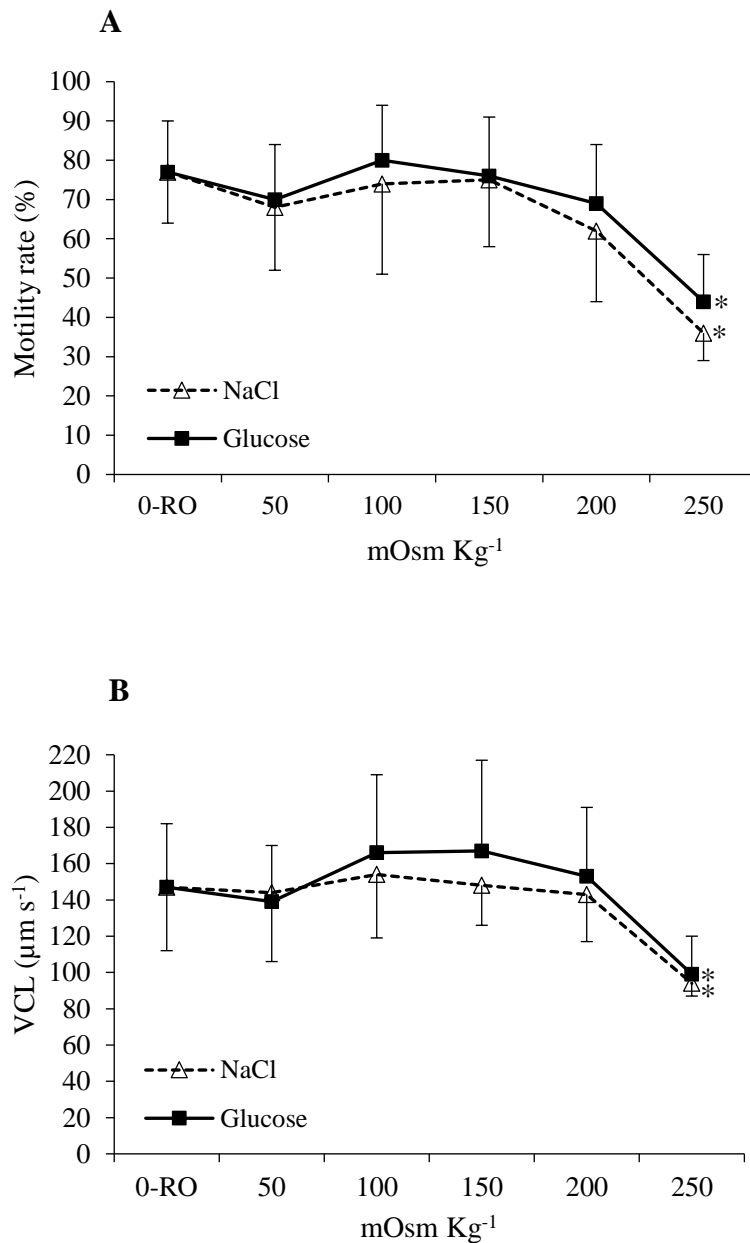


Figure 1. Post-thaw motility rate (A) and curvilinear velocity (VCL; B) of *Brycon insignis* activated in glucose (closed square) or NaCl solution (opened triangle) at different osmolalities and evaluated at 10 s post-activation. *Within the same composition of the activating solution, means followed by this symbol are lower than the others ($P < 0.05$, Student-Newman-Keuls). There was no difference on motility or VCL between samples activated in NaCl and glucose solutions within the same osmolality ($P > 0.05$; ANOVA).

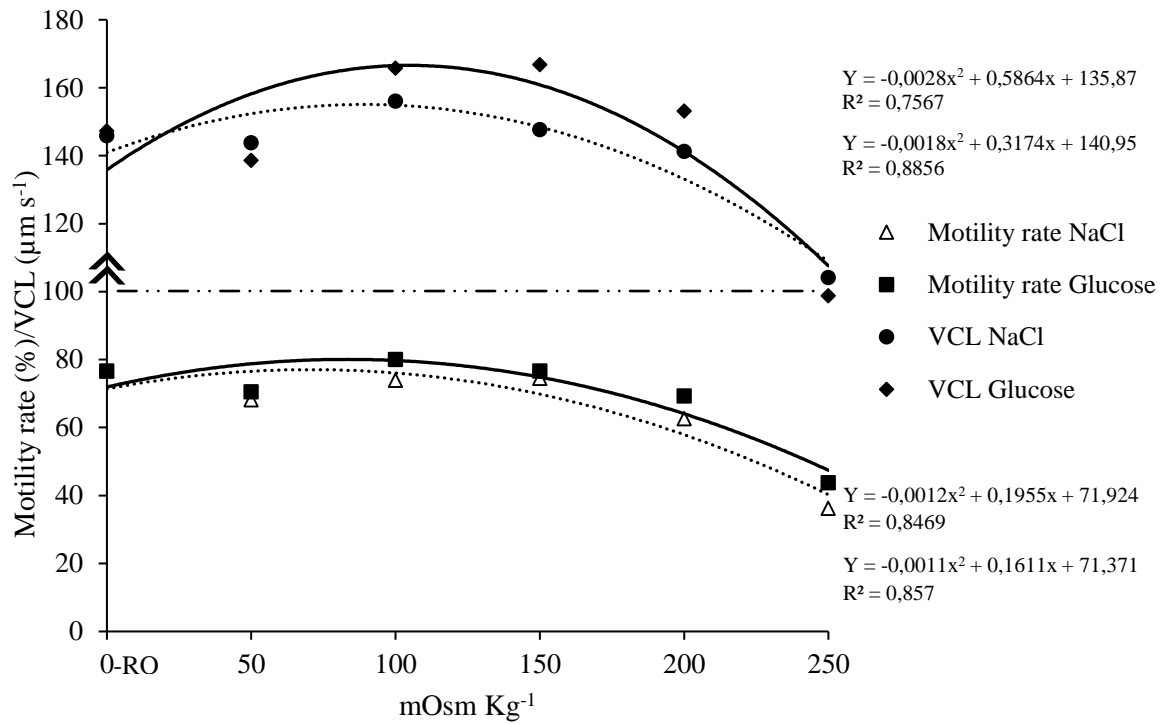


Figure 2. Quadratic regression graph for post-thaw motility rate and curvilinear velocity (VCL) of *Brycon insignis* activated in glucose or NaCl solution at different osmolalities and evaluated at 10 s post-activation. The continuous line represents the trend line for motility rate and VCL for the glucose solution. The dotted line represents the trend line for motility rate and VCL for the NaCl solution.

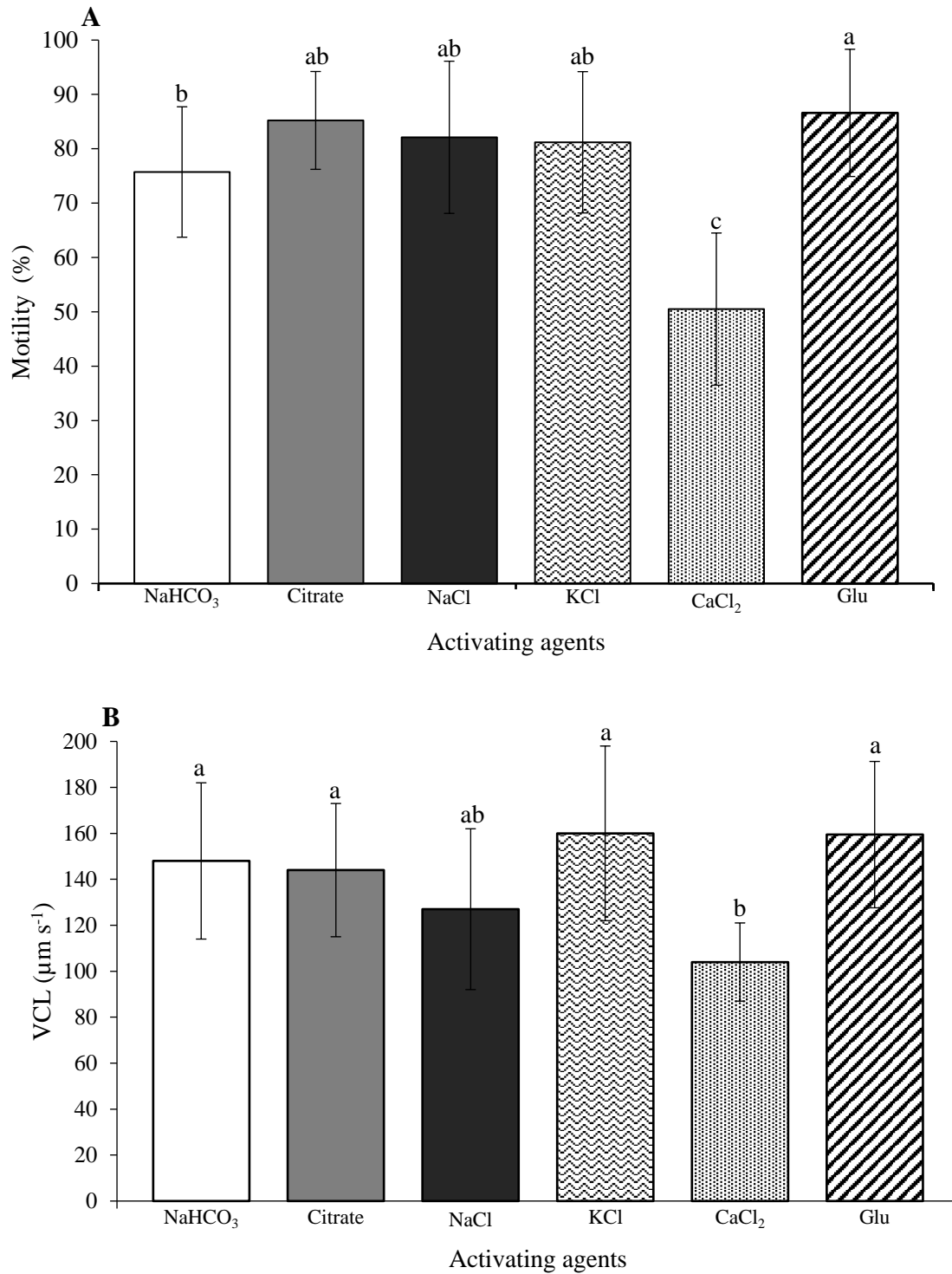


Figure 3. Post-thaw motility rate (A) and curvilinear velocity (VCL; B) of *Brycon insignis* sperm after activation in five ionic solutions plus a glucose solution (ion-free control). ^{a,b} Means followed by different superscript differ ($P < 0.05$ Student-Newman-Keuls).

References

- Alavi, S.M.H., Cosson, J., 2005. Sperm motility in fishes. (I) Effects of temperature and pH: a review. *Cell Biol Int.* 29, 101-110. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellbi.2004.11.021>
- Alavi, S.M.H., Cosson, J., 2006. Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: a review. *Cell Biol. Int.* 30, 1-14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellbi.2005.06.004>
- Alavi, S.M.H., Rodina, M., Policar, T., Kozak, P., Psenicka, M., Linhart, O., 2007. Semen of *Perca fluviatilis* L.: sperm volume and density, seminal plasma indices and effects of dilution ratio, ions and osmolality on sperm motility. *Theriogenology* 68, 276-283. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.05.045>
- Alavi, S.M.H., Rodina, M., Policar, T., Linhart, O., 2009a. Relationship between semen characteristics and body size in *Barbus barbus* L. (Teleostei: Cyprinidae) and effects of ions and osmolality on sperm motility. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol Integr Physiol.* 153, 430-437. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.04.001>
- Alavi, S.M.H., Rodina, M., Viveiros, A.T.M., Cosson, J., Gela, D., Boryshpolets, S., Linhart, O., 2009b. Effects of osmolality on sperm morphology, motility and flagellar wave parameters in Northern pike (*Esox lucius* L.). *Theriogenology* 72, 32-43. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.01.015>
- Alavi, S.M.H., Kozak, P., Hatef, A., Hamackova, J., Linhart, O., 2010. Relationships between reproductive characteristics in male *Vimba vimba* L. and the effects of osmolality on sperm motility. *Theriogenology*, 74, 317-325. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.02.017>
- Buckup, P.A., Menezes, N.A., Ghazzi, M.S., 2007. Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil. Rio de Janeiro: Museu Nacional.
- Butts, I.A., Alavi, S.M.H., Mokdad, A., Pitcher, T.E., 2013. Physiological functions of osmolality and calcium ions on the initiation of sperm motility and swimming performance in redbreast dace, *Clinostomus elngoatus*. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol Integr. Physiol.*, 166, 147-157. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.05.011>

Cabrita, E., Alvarez, R., Anel, L., Rana, K. J., Herraiez, M. P., 1998. Sublethal damage during cryopreservation of rainbow trout sperm. *Cryobiology* 37, 245-253. <http://dx.doi.org/10.1006/cryo.1998.2121>

Cosson, J., 2004. The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa. *Aquac. Int.* 12, 69-85. <http://dx.doi.org/10.1023/B:AQUI.0000017189.44263.bc>

Cosson, J., 2010. Frenetic activation of fish spermatozoa flagella entails short-term motility, portending their precocious decadence. *J. Fish Biol.* 76, 240-279. <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1095-8649.2009.02504.x>

Khara, H., Noveiri, S.B., Hadiseh, D., Rahbar, M., Ahmadnejad, M., Khodadoost, A., 2014. Effect of different activation solutions on motility and fertilizing ability of spermatozoa in common carp *Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758. *Indian J Fish.* 61, 63-68.

Kopeika, E., Kopeika, J., 2008. Variability of sperm quality after cryopreservation in fish. In: Alavi, S.M.H., Cosson, J.J., Coward, K., Rafie., Gh. (eds) *Fish spermatology*. Alpha Science Ltd, Oxford, 347-396.

Gonçalves, A.C.S., Nascimento, A.F., Costa, A.C., Leal, M.C., Viveiros, A.T.M., 2013. Initiation and suppression of sperm motility is osmolality-dependent in two South American fish species: streaked prochilod *Prochilodus lineatus* and piracanjuba *Brycon orbignyanus*. *Anim Reprod.* 10, 62-70.

Jun, L., Qinghua, L., Shicui, Z., 2006. Evaluation of the damage in fish spermatozoa cryopreservation. *Chin J Oceanol Limnol.* 24, 370-377. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02842852>

Melo, F.C.S.A., Godinho, H.P., 2006. A protocol for cryopreservation of spermatozoa of the fish *Brycon orthotaenia*. *Anim Reprod.* 3, 380-385.

Morisawa, M., 2008. Adaptation and strategy for fertilization in the sperm of teleost fish. *J Appl Ichthyol.* 24, 362–370. <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1439-0426.2008.01126.x>

Morita, M., Okuno, M., Susilo, E. S., Setyo, B. P., Martarini, D., Harnadi, L., Takemura, A., 2006. Changes in sperm motility in response to osmolality/ Ca^{2+} in three Indonesian fresh water teleosts: Goby (*Oxyeleotris marmorata*), Java carp (*Puntius javanicus*), and catfish (*Clarias batrachus*). *Comp. Biochem. Physiol. A Mol Integr. Physiol.*, 143, 361-367. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2005.12.020>

R Core Team, 2015. R: A language and environment for statistical computing. Version 3.1.3. R Foundation for Statistical Computing.

Rosa, R.S., Lima, F.T., 2008. Os peixes ameaçados de extinção, in: Machado, A.B.M, Drummond, G.M., Paglia, A.P. (Ed.), Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente/Fundação Biodiversitas, pp. 9-285.

Salgado, F.G.A., Chain, M.G., Girardi, L., Faria, C.A., 1997. O salvamento de uma espécie em extinção: A conservação da Piabanha (*Brycon insignis*) na Bacia do Rio Paraíba do Sul. Technical Report of CESP - Companhia Energética de São Paulo.

Shimoda, E., De Andrade, D.R., Júnior, M.V.V., Yasui, G.S., Silva, J.F.S., Godinho, H.P., Souza, G., 2007. Efeitos da osmolaridade sobre a motilidade espermática na Piabanha *Brycon insignis*. *Ceres* 54, 430-433.

Taitson P.F., Chami E., Godinho H.P., 2008. Gene banking of the neotropical fish *Leporinus obtusidens* (Valenciennes, 1836): A protocol to freeze its sperm in the field. *Anim Reprod Sci.* 105, 283-291. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.03.009>

Viveiros, A.T.M., Orfão, L.H., Maria, A.N., Allaman, I.B., 2009. A simple, inexpensive and successful freezing method for curimba *Prochilodus lineatus* (Characiformes) semen. *Anim Reprod Sci.* 112, 293–300. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.04.025>

Viveiros, A.T.M., Amaral, T.B., Orfão, L.H., Isaú, Z.A., Caneppele, D., Leal, M.C., 2011. Sperm cryopreservation of tiete tetra *Brycon insignis* (Characiformes): effects of cryoprotectants, extenders, thawing temperatures and activating agents on motility features. *Aquac Res.* 42, 858-865. <http://doi.wiley.com/10.1111/j.13652109.2010.02761.x>

Viveiros, A.T.M., Isaú, Z.A., Caneppele, D., Leal, M.C., 2012. Sperm cryopreservation affects postthaw motility, but not embryogenesis or larval growth in the Brazilian fish *Brycon insignis* (Characiformes). *Theriogenology* 78, 803–810.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.03.028>

Viveiros, A.T.M., Leal, M.C., França, T.S., Almeida, I.L.G., Isaú, Z.A., 2016. Osmolality and composition of the activating solution affects motility of fresh and frozen *Prochilodus lineatus* sperm differently. *Anim Reprod Sci.* 173, 73-79.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.08.014>