



THALES DE SOUZA FRANÇA

**SOLUÇÕES ATIVADORAS MAIS INDICADAS PARA A
REPRODUÇÃO DE PIRACANJUBA *Brycon orbignyanus* e
GRUMATÃ *Prochilodus vimboides*, UTILIZANDO SÊMEN
FRESCO OU CRIOPRESERVADO**

**LAVRAS - MG
2018**

THALES DE SOUZA FRANÇA

**SOLUÇÕES ATIVADORAS MAIS INDICADAS PARA A REPRODUÇÃO DE
PIRACANJUBA *Brycon orbignyanus* E GRUMATÃ *Prochilodus vimboides*,
UTILIZANDO SÊMEN FRESCO OU CRIOPRESERVADO**

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.

Prof. Dr. Luis David Solis Murgas
Orientador

Dra. Gilmara Junqueira Machado
Coorientadora

**LAVRAS – MG
2018**

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

França, Thales de Souza.

Soluções ativadoras mais indicadas para a reprodução de
piracanjuba *Brycon orbignyanus* e grumatã *Prochilodus*
vimboides utilizando sêmen fresco ou criopreservado / Thales de
Souza França. - 2018.

62 p. : il.

Orientador(a): Luis David Solis Murgas.

Coorientador(a): Gilmara Junqueira Machado.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Peixes. 2. Reprodução. 3. Ativador. I. Murgas, Luis David
Solis. II. Machado, Gilmara Junqueira. III. Título.

THALES DE SOUZA FRANÇA

**SOLUÇÕES ATIVADORAS MAIS INDICADAS PARA A REPRODUÇÃO DE
PIRACANJUBA *Brycon orbignyanus* E GRUMATÃ *Prochilodus vimboides*,
UTILIZANDO SÊMEN FRESCO OU CRIOPRESERVADO
MORE INDICATED ACTIVATING SOLUTIONS FOR PIRACANJUBA *Brycon
orbignyanus* AND GRUMATÃ *Prochilodus vimboides* REPRODUCTION, USING
FRESH OR CRIOPRESERVED SPERM**

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 11 de setembro de 2018.

Dr. Luis David Solis Murgas	UFLA
Dra. Cristina Delarete Drummond	UFLA
Dr. Alexmiliano Vogel de Oliveira	EPAMIG

Prof. Dr. Luis David Solis Murgas
Orientador

Gilmara Junqueira Machado
Coorientadora

**LAVRAS – MG
2018**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro a Deus, por me iluminar e proteger nesta árdua caminhada.

À toda minha família, principalmente meus pais, Jorge e Maria Alice pelo apoio incondicional e ao meu irmão Thácio pelo companheirismo.

Ao amor da minha vida, Beatriz, pelo amor e incentivo em todos os momentos.

À Naiara Motta que foi minha mentora e esteve presente em todas as etapas do trabalho.

À Renata Egger pela ajuda do início ao fim, sem medir esforços.

Ao Professor Luis David Solis Murgas pela confiança e apoio para a realização desse trabalho.

Aos membros da banca examinadora Alexmiliano Vogel e Cristina Delarete.

Ao pessoal da Fazenda Experimental da EPAMIG em Leopoldina-MG, Jardel, Zé do Carmo, Zé Lopes, Geraldo e Renata.

Ao pessoal da Piscicultura da CEMIG em Itutinga-MG, Jaílson e Ivo.

À toda equipe do NEPAD, Gilmar Souza, Gilmara Junqueira, Priscila Palhares, Willian Franco, Naiara Melo, Laís Libeck, Isadora Assis, Isabela Di Chiacchio, Bárbara Rodrigues, Victor Mansur, Isadora Marques, Felipe Cunha, Aline Vilela, Julia Alvarenga, Tássia Flávia, Aline Ferreira e Mariana Torquete, agradeço pela amizade e pelo apoio.

Aos técnicos do Biotério Central da UFLA, Fidelis Jr. e Érica pelo apoio.

À Professora Ana Viveiros e o pesquisador Marcelo Leal, por terem me iniciado na ciência e pelos ensinamentos que irei sempre levar comigo.

À saudosa República Baviera que sempre me deu irmãos e nessa fase não foi diferente.

Às republicas amigas, Coice de Mula, Paioca, Terra Roxa, Pé-de-Cana, Mula Manca e todas as outras que participaram dos momentos de descontração.

Aos meus amigos de Itaúna, BDS e Perdisgoto, que entenderam a distância e sempre torceram por mim.

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.

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

*“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa,
nunca tem medo e nunca se arrepende.”*

(Albert Schweitzer)

RESUMO

As condições do meio externo, como a concentração iônica, o pH, a osmolalidade e temperatura, afetam a ativação e a qualidade espermática de peixes. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes soluções ativadoras, na qualidade espermática e taxa de fertilização do sêmen fresco e criopreservado de piracanjuba *Brycon orbignyanus* (n=10) e grumetã *Prochilodus vimboides* (n=8). Foram utilizadas 3 soluções ativadoras contendo íons, NaCl, KCl, CaCl₂ (150 mOsm kg⁻¹) e 3 soluções não-iônicas, glicose (150 mOsm kg⁻¹), água osmose reversa (OR) (~ 0 mOsm kg⁻¹) e água do tanque (AT) (*B. orbignyanus* 139 mOsm kg⁻¹ e *P. vimboides* 114 mOsm kg⁻¹). Após tratamento hormonal com extrato bruto de hipófise de carpa o sêmen dos machos e os ovócitos das fêmeas foram coletados. No experimento 1 se avaliou o sêmen fresco ativado pelas diferentes soluções de forma subjetiva, sendo que os parâmetros avaliados foram: porcentagem de espermatozoides móveis (%), vigor (1-5) e a duração da motilidade (segundos). Outra alíquota do sêmen de cada macho foi utilizada para fertilizar ovócitos de uma fêmea, os gametas foram ativados pelas soluções, e se avaliou a taxa de fertilização e a taxa de eclosão. No experimento 2 o sêmen foi criopreservado utilizando metilglicol como crioprotetor e os diluidores BTS[®] 5% - 325 mOsm kg⁻¹ (*B. orbignyanus*) e glicose 5% - 325 mOsm kg⁻¹ (*P. vimboides*). O sêmen diluído foi envasado em palhetas de 0,5 mL que foram congeladas em vapor de nitrogênio e após mantidas em botijão de nitrogênio. As palhetas (3 macho⁻¹) foram descongeladas em banho-maria a 60°C por 8 segundos, e através do sistema computadorizado de análise de sêmen (CASA) a taxa de espermatozoides móveis e as velocidades curvelinear (VCL), linear (VSL) e média de percurso (VAP) foram determinadas utilizando as diferentes soluções ativadoras. Os resultados foram submetidos a ANOVA one-way, depois teste de médias SNK ao nível de 5%. No experimento 1, observou-se as maiores médias dos parâmetros subjetivos do sêmen fresco de *B. orbignyanus* nas amostras ativadas com solução a base de KCl. A solução a base de cálcio apresentou os menores valores. A maior taxa de fertilização se deu quando os gametas foram ativados com água do tanque e a menor quando ativados com solução de CaCl₂. Não houve diferença entre os tratamentos na taxa de eclosão. No sêmen fresco de *P. vimboides* a solução glicose obteve os maiores valores e a solução a base de CaCl₂ os menores. As maiores taxas de fertilização e eclosão foram glicose ou água OR; as menores foram KCl ou CaCl₂. No experimento 2, o sêmen descongelado de *B. orbignyanus* ativados com AT ou OR apresentaram os maiores valores de espermatozoides móveis, os maiores valores de VCL, VSL e VAP foram observado utilizando glicose em relação ao CaCl₂. As maiores taxas de fertilização e eclosão foram observadas nos gametas ativados utilizando soluções não-iônicas. O sêmen descongelado de *P. vimboides* e ativado por solução à base de glicose apresentou os maiores valores dos parâmetros motilidade e as velocidades espermáticas VCL e VSL comparados aos do sêmen ativado com KCl ou CaCl₂. A maior taxa de fertilização foi observada quando os gametas foram ativados com glicose ou água OR comparados aos ativadores iônicos. O maior valor de taxa de eclosão foi observado nos gametas ativados com água OR e o menor quando ativados com NaCl. Para a ativação do sêmen fresco e criopreservado de *B. orbignyanus* deve-se utilizar os ativadores não-iônicos para obter a melhor qualidade seminal e melhores taxa de fertilização e eclosão. A solução glicose (150 mOsm kg⁻¹) e a água OR são os ativadores mais indicados para o sêmen fresco e criopreservado visando obter a melhor qualidade seminal, taxa de fertilização e eclosão de *P. vimboides*.

Palavras-chave: Ativador. Fertilização. Characiformes. CASA. Peixe.

ABSTRACT

The conditions of extracellular environment, ionic concentration, pH, osmolality and temperature, makes effect on sperm activation and sperm quality. The objective of this study was to determine the effect of different activating solutions on the sperm quality and fertilization rate of the fresh sperm and cryopreserved sperm of piracanjuba *Brycon orbignyianus* (n=10) and grumatã *Prochilodus vimboides* (n=8). Was used 3 activation solutions with ions NaCl, KCl, CaCl₂ (150 mOsm kg⁻¹) and 3 solutions without ions glucose (150 mOsm kg⁻¹), water reverse osmosis (RO) (~ 0 mOsm kg⁻¹) and tank water (TW) (*B.orbignyianus* 139 mOsm kg⁻¹ and *P.vimboides* 114 mOsm kg⁻¹). After hormonal treatment with carp pituitary extract was collected the semen of males and the oocytes of females. In the experiment 1 the parameters of motility rate (%), motility quality score (1-5) and motility duration (seconds) of the fresh sperm were determined using a subjective form. Other aliquot of the semen from each male was used to fertilize oocytes from a one female, the gametes were activated with solutions and evaluated the fertilization rate and hatching rate. In experiment 2, the semen was cryopreserved using methyl glycol as a cryoprotectant and as extenders BTS[®] 5% - 325 mOsm kg⁻¹ (*B.orbignyianus*) and glucose 5% - 325 mOsm kg⁻¹ (*P.vimboides*). The diluted sperm loaded into 0.5 mL straws which were frozen in a nitrogen vapor vessel and stored in a liquid nitrogen vessel. The straws (3 male⁻¹) were thawed in a water bath at 60°C for 8 seconds and activated with different solutions, the parameters of motility rate and as curvilinear velocity (VCL), straight line (VSL) and average path (VAP) of the post-thaw were determined using a Computer-Assisted Sperm Analyzer (CASA). The data were tested for significant differences using ANOVA one-way and after SNK 5% test. In experiment 1 a higher average of the subjective parameters in fresh semen of *B. orbignyianus* was observed when the samples activated by the solution based on KCl, a solution based on calcium showed the lowest values. A higher value fertilization rate was observed when a gametes activated with TW and the lowest activated with CaCl₂, was no statistical difference between the solution on hatching rate. In fresh sperm of *P. vimboides* the highest values were observed using glucose solution and the lowest when used CaCl₂. The higher values of fertilization rate e hatching rate were observed in glucose or RO, the lowest were KCl or CaCl₂. In the experiment 2 the samples post-thaw of *B.orbignyianus* activated with TW or RO showed the highest values for motility, the highest values of VCL, VSL and VAP were observed when activated with glucose compared to the samples activated with CaCl₂. The highest values for fertilization rate and hatching rate were observed when used non-ionic solutions. The post-thaw of *P. vimboides* when activated with glucose solution presented the highest values of motility and velocities VCL and VSL compared when used KCl and CaCl₂ with agent activator. The highest values of fertilization rate were observed using glucose or RO compared an ionic solution. The higher hatching rate value was observed on gametes activated with RO and the lower activated with NaCl. For the activation of fresh and cryopreserved semen of *B.orbignyianus*, the non-ionic activators must be used to obtain the best seminal quality and better rate of fertilization and hatching. The glucose solution (150 mOsm kg⁻¹) and RO are the most suitable activators for fresh and cryopreserved semen in order to obtain the best seminal quality, fertilization rate and hatching of *P.vimboides*.

Keywords: Activator. Fertilization. Characiformes. CASA. Fish

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

PRIMEIRA PARTE

Figura 2.1 - Exemplar de piracanjuba *Brycon orbignyanus* cultivada em cativeiro.....14

Figura 2.2 – Exemplar de grumetã *Prochilodus vimboides*, contendo de 34 a 39 escamas ao longo da linha lateral.....16

Figura 2.3 – Esquema da ativação da motilidade espermática ativada por sinais externos que passam através da membrana e transitam até o anexoma, estrutura onde se localiza as mitocôndrias que produzem energia para a movimentação do flagelo e conseqüentemente do gameta. Abreviações: sAC: adenil ciclase solúvel; tmAC: adenil ciclase transmembrana; cAMP: adenosina monofosfatase cíclica; cAGMP: guanosina monofosfatase cíclica; NO: Óxido nítrico; FCr/Cr: fosfocreatina/creatina; EOR; espécies de oxigênio reativo.....17

Figura 2.4 – Mecanismo de sinalização celular da iniciação espermática em Carpa comum *C. carpio*. Imóvel nos testículos pelo contato com o plasma seminal o sêmen quando liberado ao meio aquoso hipotônico, ocorrem várias sinalizações celulares que culminam na motilidade dos espermatozoides.....18

Figura 2.5 - Fertilização artificial, coleta da desova da fêmea utilizando becker de plástico seco e estéril.....20

SEGUNDA PARTE

Figura 1- a, b, c. Avaliações (média \pm EP) subjetivas da motilidade(a), duração da motilidade (b) e vigor espermático (c) do sêmen fresco de machos de *Brycon orbignyanus* ativados em diferentes soluções.....50

Figura 2 – Avaliação (média ± EP) da taxa de fertilização (a) e eclosão (b) de ovócitos de <i>Brycon orbignyianus</i> fertilizados em diferentes soluções espermáticas ativadoras.....	50
Figura 3 – Avaliações (média ± EP) subjetivas dos parâmetros espermatozoides móveis (a), duração da motilidade (b) e vigor espermático (c) do sêmen fresco de machos de <i>Prochilodus vimboides</i> ativados em diferentes soluções.....	51
Figura 4 – Avaliação (média ± EP) da taxa de fertilização (a) e eclosão (b) de ovócitos de <i>Prochilodus vimboides</i> fertilizados em diferentes soluções ativadoras espermáticas.....	51
Figura 5 – Taxa de motilidade (média ± EP) de <i>Brycon orbignyianus</i> ativados com diferentes soluções após o descongelamento.....	52
Figura 6 – Velocidades espermáticas (média ± EP) de <i>Brycon orbignyianus</i> ativadas em diferentes soluções após o descongelamento.....	52
Figura 7 –a, b. Avaliação da taxa de fertilização (a) e eclosão (b) dos ovócitos (média ± EP) fertilizados pelo sêmen de <i>Brycon orbignyianus</i> após o descongelamento e ativação do sêmen com diferentes soluções.....	53
Figura 8 – Taxa de motilidade (média ± EP) <i>Prochilodus vimboides</i> ativados com diferentes soluções após o descongelamento.....	55
Figura 9 – Velocidades espermáticas (média ± EP) de <i>Prochilodus vimboides</i> ativadas em diferentes soluções após o descongelamento.....	55
Figura 10 –a, b, c. Taxa de fertilização (a) e eclosão (b) dos ovócitos (média ± EP) de <i>Prochilodus vimboides</i> após o descongelamento e ativação com diferentes soluções.....	56

LISTA DE TABELAS

PRIMEIRA PARTE

Tabela 2.1 – Osmolalidade do plasma seminal de espécies da ordem Characiformes. Composição e osmolalidade das soluções ativadoras da motilidade espermática já avaliadas com êxito em Characiformes.....22

SEGUNDA PARTE

Tabela 1 – Concentração iônica das soluções ativadoras utilizadas para ativar o sêmen durante as análises da qualidade seminal, e na ativação dos gametas frescos e descongelados para fertilização. Concentração iônica média do plasma seminal dos machos (n=10) de piracanjuba.....50

Tabela 2 - Concentração iônica das soluções ativadoras utilizadas para ativar o sêmen durante as análises da qualidade seminal, e na ativação dos gametas frescos e descongelados para fertilização. Concentração iônica média do plasma seminal dos machos (n=10) de grumatã.....50

Tabela 3 – Volume de sêmen utilizados por macho, para garantir a relação ideal entre espermatozoides:ovócitos.....54

Tabela 4 – Volume de sêmen descongelado utilizado para garantir a proporção ideal entre os gametas *Prochilodus vimboides*.....56

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	12
1	INTRODUÇÃO	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1	Piracanjuba Brycon orbignyanus	13
2.2	Grumatã Prochilodus vimboides	15
2.3	Morfologia do espermatozoide e fisiologia da ativação espermática	16
2.3	Fertilização Artificial	19
2.4	Efeito dos íons na ativação espermática	20
3	CONSIDERAÇÕES GERAIS	23
	REFERÊNCIAS	24
	SEGUNDA PARTE – ARTIGO	29
	ARTIGO 1	29

PRIMEIRA PARTE

1. INTRODUÇÃO

A demanda por peixes está em constante crescimento ao redor do mundo, o que estimula pesquisas em toda a cadeia produtiva, com o objetivo de produzir em maior quantidade, com maior qualidade e sustentabilidade. Em 2014 o consumo mundial *per capita* de peixes bateu seu novo recorde, 20kg (FAO, 2016). Isso só se deu pelo grande crescimento da aquicultura, atividade essa que passou a pesca extrativista em toneladas produzidas, mostrando que a aquicultura conduzida de forma sustentável, além de promover um salto na produção, preserva os estoques naturais das espécies.

As ações promovidas pelo homem no meio ambiente e o aumento das pisciculturas comerciais estão despertando o interesse dos pesquisadores em desenvolver novas técnicas para reprodução e conservação de peixes nativos. Técnicas utilizadas para o aperfeiçoamento da reprodução artificial em cativeiro são estudadas com o intuito de preservar espécies ameaçadas na natureza e fornecer animais para a produção comercial (GODINHO, 2000).

A produção da maioria das espécies nativas em pisciculturas é totalmente dependente das técnicas de reprodução artificial. Como os animais não estão em seu *habitat* natural, não sofrem os estímulos naturais que desencadeiam reações hormonais que proporcionam a reprodução. Assim sendo, é imprescindível o uso de técnicas para o sucesso da reprodução (MURGAS et al., 2003).

A piracanjuba *Brycon orbignyanus* é uma espécie nativa brasileira, reofílica, onívora e oriunda da Bacia dos Uruguai e Paraná. Por todas as ações antropogênicas como, construções de hidroelétricas, poluição e sobre pesca, a população natural da espécie diminuiu (ASHIKAGA et al., 2015) e em alguns locais sua sobrevivência é crítica (LIMA, 2017). A piracanjuba apresenta um bom desenvolvimento zootécnico, é apreciada para o consumo e pela esportividade quando fisgada no anzol.

A grumatã *Prochilodus vimboides*, é uma espécie nativa brasileira, reofílica, iliófaga e oriunda das Bacias dos rios Paraíba do Sul, Jequitinhonha, Jucuruçu, Mucuri e Doce, que se situam nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo e Bahia (CASTRO; VARI, 2004). A espécie foi considerada ameaçada de extinção no estado de São Paulo, conforme o artigo 3º do Decreto nº 60.133, de 7 de fevereiro de 2014. Relatos de

pescadores indicam que a população de *Prochilodus vimboides* está em risco nos estados do Rio de Janeiro, Minas Gerais e Espírito Santo (SANTOS, 2014). A falta de informações sobre a espécie evidencia o risco de desaparecimento da *P. vimboides* dos rios brasileiros.

Na maioria dos peixes de água doce, os espermatozoides permanecem imóveis dentro das gônadas e em contato com o plasma seminal. Dessa forma a motilidade é ativada somente quando o sêmen entra em contato com uma solução aquosa e hipotônica em relação ao plasma seminal. Fatores da solução como a presença de íons (Ca^{2+} , K^+ , Na^+), temperatura, osmolalidade e pH, influenciam no processo de ativação espermática do sêmen de peixes (ALAVI; COSSON, 2006).

As composições iônicas das soluções ativadoras são de suma importância para que se obtenha sucesso na reprodução artificial, uma vez que a concentração iônica provoca diferentes efeitos na ativação da motilidade espermática. Assim para se obter uma maior motilidade, velocidade e conseqüentemente uma maior taxa de fertilização, novos protocolos devem ser desenvolvidos. Portanto, o objetivo do trabalho foi avaliar os parâmetros cinéticos espermáticos e as taxas de fertilização e eclosão do grumatã *Prochilodus vimboides* e da piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Characiformes) utilizando diferentes soluções ativadoras de sêmen com ou sem íons, em uma mesma osmolalidade.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Piracanjuba *Brycon orbignyanus*

Reino: Animalia;

Filo: Chordata;

Classe: Actinopterygii;

Ordem: Characiformes;

Família: Characidae;

Gênero: *Brycon*;

Espécie: *Brycon orbignyanus*, Valenciennes, 1849.

Os peixes do gênero *Brycon* são oriundos da América do Sul (MOREIRA et al., 2001), a espécie em estudo *Brycon orbignyanus*, está distribuída nas bacias do Paraná, Paraguai e Uruguai. Os principais rios que esta espécie habita são Rio Grande e Paraná, assim presente nos estados de Goiás, Mato Grosso do Sul, São Paulo, Paraná e Minas Gerais. (VAZ; TORQUATO; BARBOZA, 2000).

O *Brycon orbignyanus* assume muitos nomes populares no Brasil, dentre eles: Piracanjuba, piracanjuva, pirapitonga, piraputanga, bracanjuba, bracanjuva e salmão-criolo. Em outros países como na Argentina e no Uruguai são conhecidas como: pirá-pitá, pirapitanga, salmón, salmón-del-Paraná, salmón-del-rio, salmonete e piraputá.

A piracanjuba é um peixe de hábito alimentar onívoro, se alimenta de frutas, sementes e outros peixes menores que se encontram no estado inicial de vida. Habita preferencialmente ambientes com água corrente e clara, tem preferência por locais onde há vegetação frutífera na zona ripária (alimento). É um peixe que pode chegar à 80 centímetros de comprimento e pesar mais de 10 kg, por isso é considerada um peixe de grande porte (VAZ; TORQUATO; BARBOZA, 2000).

Essa espécie realiza migração reprodutiva durante o período que geralmente se estende do mês de outubro a fevereiro, portanto é considerada reofílica. As fêmeas entram em maturidade sexual a partir do terceiro ano de vida, com cerca de 25 centímetros de comprimento. Os machos estão aptos à reprodução a partir do segundo ano de vida, medindo cerca de 20 centímetros (VAZ; TORQUATO; BARBOZA, 2000). A piracanjuba (FIGURA 2.1) apresenta rápido crescimento em cativeiro e excelente qualidade de carne, assim considerada uma espécie com potencial produtivo em escala comercial. A carne tem coloração avermelhada pela presença de carotenoides adquiridos através da alimentação natural, agregando valor e aumentando a aceitação no mercado (SANTAMARIA; ANTUNES, 1999). Outro atrativo comercial da piracanjuba é a sua capacidade de resistir quando fígada no anzol, sendo bastante atrativa para pescadores onde se pratica a pesca esportiva.

Figura 2.1 - Exemplar de piracanjuba *Brycon orbignyanus* cultivada em cativeiro.



Fonte: Acervo do autor (2018)

As ações antrópicas realizadas nos *habitats* naturais dessa espécie como: poluição, pesca extrativista, desmatamento e principalmente as construções de barragens, provocou uma queda

no número de indivíduos em ambiente natural. De acordo com o IBAMA (in MMA 05/04 2008) a piracanjuba está na lista de animais ameaçados de extinção.

2.2 Grumatã *Prochilodus vimboides*

Reino: Animalia;

Filo: Chordata;

Classe: Actinopterygii;

Ordem: Characiformes;

Família: Prochilodontidae;

Gênero: *Prochilodus*;

Espécie: *Prochilodus vimboides*, Kner, 1859.

A presente espécie é conhecida pelos nomes populares: Curimba, curimbatá, curimatã, curimbatá-de-lagoa, papa-terra e grumatã, sendo o último o especificadamente utilizado para se referir à *Prochilodus vimboides* (FIGURA 2.2). Em demais países da América do Sul onde o gênero está presente o nome popular é sábalo. Existem treze espécies do gênero *Prochilodus* que habitam as bacias sul-americanas (SANTOS, 2014), dentre elas a *Prochilodus vimboides*, que se difere das demais espécies do gênero pelo número de escamas ao longo da linha lateral (34 a 39 escamas contra 40 a 64 das demais espécies) (CASTRO; VARI, 2004). Os peixes do gênero *Prochilodus* possuem características anatômicas semelhantes, dentre as principais, a boca terminal posicionada na região anterior da cabeça em forma de ventosa, com lábios grossos e dentes pequenos e numerosos dispostos em fileiras. Contém trato digestivo longo e aproveitam com eficiência os alimentos ingeridos (BERNADES; PÚBLIO, 2012). Se alimentam de detritos orgânicos encontrados na água e de organismos bentônicos, como: crustáceos, larvas e ovos de moluscos, larvas de insetos, entre outros organismos que se encontram no fundo ou leitos dos rios (CASTAGNOLLI, 1992; PROENÇA; BITTENCOURT, 1994).

A reprodução natural da espécie está ligada com as alterações dos fatores ambientais, como o aumento da pluviosidade e da temperatura, desencadeando uma série de alterações hormonais sinalizando aos exemplares adultos o período reprodutivo. Desta forma eles iniciam a migração para os locais de desova, fenômeno esse conhecido como Piracema. Quando mantidos em cativeiro, esta espécie não percebe todas os estímulos ambientais necessários para a sua reprodução natural, necessitando de técnicas artificiais para sua reprodução (MURGAS et al., 2003). Com isso pesquisadores buscam desenvolver biotecnologias que aumentam a

utilização dos gametas, dentre elas o resfriamento e congelamento de sêmen, protocolo já estabelecido por Oliveira (2015).

Figura 2.2 – Exemplar de grumatã *Prochilodus vimboides*, contendo de 34 a 39 escamas ao longo da linha lateral.



Fonte: Guilherme Souza – Projeto Piabanha

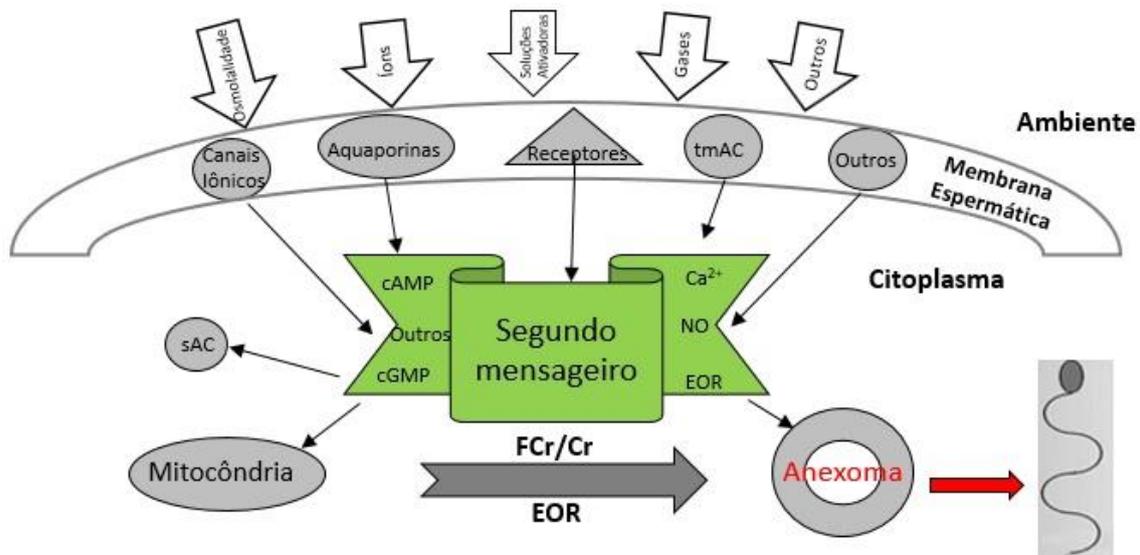
2.3 Morfologia do espermatozoide e fisiologia da ativação espermática

Os espermatozoides da maioria dos peixes de água doce permanecem imóveis dentro dos testículos e em contato com o plasma seminal, só adquirindo motilidade quando liberados em meio hipotônico em relação ao plasma seminal (MORISAWA; SUZUKI, 1980).

Assim como os espermatozoides dos vertebrados, os gametas dos peixes teleósteos são compostos por cabeça, peça intermediária e flagelo. Mas se diferem em várias características, como o tamanho e a ausência do acrossoma na maioria das espécies. Esse fato pode ser explicado pela presença de uma abertura no córion dos ovócitos expelidos pela fêmea. Essa estrutura é chamada de micrópila e seu principal objetivo é facilitar a entrada do espermatozoide permitindo a fecundação. A função básica da cabeça do espermatozoide é transportar o material genético localizado no núcleo para o ovócito. O tamanho e a forma da cabeça do espermatozoide são importantes característica no momento de penetrar da micrópila. Várias formas de cabeça já foram observadas em peixes teleósteos que realizam fecundação externa, mas as mais comuns são as formas esférica e ovoide. A peça intermediária é ligada à cabeça. Nela estão localizadas as mitocôndrias responsáveis pela produção de energia na forma de ATP, necessária para realizar o batimento flagelar que proporciona o movimento dos gametas. O flagelo do espermatozoide pode ser dividido em três partes: proximal, central e distal. Ele é

composto por dois microtúbulos centrais e nove periféricos, formando o complexo 9 + 2, chamado de anexoma, essa composição pode ser observada na maioria das espécies nativas brasileiras (VIVEIROS; ORFÃO; LEAL, 2014). A membrana plasmática do espermatozoide (FIGURA 2.3) é de extrema importância, uma vez que possui aquaporinas, canais iônicos e receptores que regulam a atividade celular interna e media as sinalizações externas para a ativação espermática (BOBE; LABBÉ, 2010; DZYUBA; COSSON, 2014).

Figura 2.3 – Esquema da ativação da motilidade espermática ativada por sinais externos que passam através da membrana e transitam até o anexoma, estrutura onde se localiza as mitocôndrias que produzem energia para a movimentação do flagelo e consequentemente do gameta. Abreviações: sAC: adenil ciclase solúvel; tmAC: adenil ciclase transmembrana; cAMP: adenosina monofosfatase cíclica; cGMP: guanosina monofosfatase cíclica; NO: Óxido nítrico; FCr/Cr: fosfocreatina/creatina; EOR; espécies de oxigênio reativo.

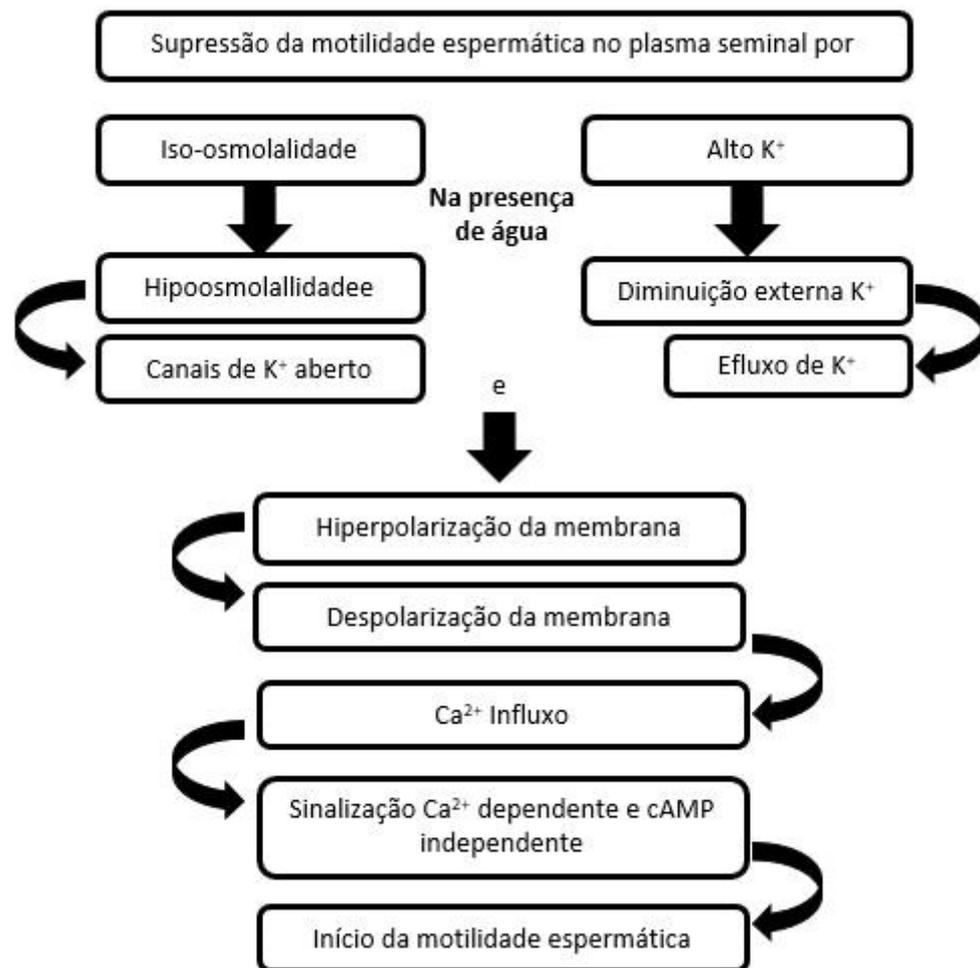


Fonte: Adaptado de Dzyuba & Cosson 2014

A motilidade do espermatozoide dentro do trato reprodutivo não pode ser ativada. O potencial de ativação da célula é adquirida durante a migração para parte baixa dos ductos seminíferos (MORISAWA et al., 1993; KOLDRAS et al., 1996). Essa maturação observada é causada pelo aumento do pH (MORISAWA; MORISAWA, 1988), levando ao aumento intracelular de AMPc (MIURA et al., 1992; MORISAWA et al., 1993). Quando o espermatozoide maduro é liberado no meio externo acontecem trocas iônicas extracelulares induzindo a motilidade. Na maioria das espécies, a diferença de osmolalidade entre o plasma seminal e o ambiente externo é o principal ativador da motilidade, uma vez que causa abertura dos canais e outros comunicantes com o meio externo. Esse processo pode ser observado em

carpa comum *Cyprinus carpio* conforme na FIGURA 2.4. Os gametas masculinos quando liberados em meio aquoso, hipotônico em relação ao plasma seminal, sofrem um choque hipósmotico que causa uma queda na concentração extracelular do íon K^+ , esses eventos causam um estiramento da membrana plasmática e a diluição dos íons extracelulares. Depois da abertura dos canais iônicos, o efluxo de K^+ acontece pela diferença de potencial da membrana, causando a hiperpolarização da mesma. Assim, os canais de Ca^{2+} são ativados, ocorrendo o influxo de íons Ca^{2+} para dentro do espermatozoide e aumentando o pH intracelular. Em seguida ocorre a sinalização de Ca^{2+} dependente e AMPc independente ativando a movimentação flagelar e em seguida a motilidade espermática (TABARES; TARAZONA; ÁNGEL, 2005).

Figura 2.4 – Mecanismo de sinalização celular da iniciação espermática em Carpa comum *C. carpio*. Imóvel nos testículos pelo contato com o plasma seminal o sêmen quando liberado ao meio aquoso hipotônico, ocorrem várias sinalizações celulares que culminam na motilidade dos espermatozoides.



Fonte: Adaptado (Krasznai et al., 2000).

2.3 Fertilização Artificial

O uso da fertilização artificial ou reprodução induzida é tratada como uma das principais metodologias para o avanço sustentável do cultivo de peixes (ROMAGOSA, 2006). A reprodução em cativeiro também contribui para a preservação das espécies em meio natural, já que aumentando a oferta do pescado, diminui-se a pressão sobre os estoques naturais (ZAMBONI; NUÑER, 2008).

Durante os anos, vários pesquisadores com linhas de pesquisas voltadas para a fisiologia reprodutiva e biologia de peixes conseguiram enriquecer o conhecimento sobre a reprodução dos peixes nativos em cativeiro. Através dos conhecimentos adquiridos, conseguiu-se desenvolver uma metodologia que possibilita a maturação das gônadas em cativeiro e o desenvolvimento final dos gametas realizando indução hormonal (ZANIBONI FILHO; WEINGARTNER, 2007). Com o domínio do protocolo de indução, a fertilização artificial de peixes nativos tornou-se possível.

Peixes de várias espécies nativas depois de serem submetidos à indução hormonal, são colocados em um tanque, onde, a fêmea libera os ovócitos e o macho o sêmen. A reprodução acontece ali sem a intervenção do produtor. A nomenclatura para essa prática é “reprodução induzida com desova natural”. Mas algumas espécies mantidas em cativeiro não liberam os gametas espontaneamente, sendo necessária a retirada desses por extrusão (WOYNAROVICH; HORVÁTH, 1983). A técnica de coleta por extrusão é a mais utilizada no Brasil, apresenta vantagens perante à reprodução induzida com desova natural, como: facilitar o manejo dos ovos fertilizados, permitir o manejo dos gametas para fins de melhoramento genético, dispensa o uso de tanques para a desova e permite o cruzamento entre espécies (HARVEY; CAROLSFELD, 1993).

A metodologia de desova por extrusão consiste em retirar os ovócitos imediatamente após a ovulação, momento em que os ovócitos estão soltos na luz do ovário, através da massagem abdominal no sentido craniocaudal, induzindo a saída dos gametas pela papila urogenital. É necessário observar o momento exato da ovulação para se obter ovócitos de boa qualidade (BROMAGE et al., 1994). A coleta do sêmen é dada pela mesma massagem abdominal, sendo coletado no mesmo recipiente dos ovócitos.

A motilidade dos espermatozoides é uma característica espécie-específica, mas geralmente dura menos de um minuto (HARVEY; CAROLSFELD, 1993). Da mesma maneira, os ovócitos se tornam aptos a serem fecundados quando entram em contato com um ambiente aquoso, devendo serem fertilizados imediatamente. A fertilização a seco é o melhor método a ser utilizado considerando as características fisiológicas dos gametas. Os ovócitos (FIGURA

2.5) e o sêmen são retirados dos peixes, sem terem contato com a água, homogeneizados e depois adiciona-se água para ativar a células (ZANIBONI FILHO; WEINGARTNER, 2007).

Figura 2.5 - Fertilização artificial, coleta da desova da fêmea utilizando becker de plástico seco e estéril.



Fonte: Acervo do autor (2018)

A técnica de fertilização a seco proporciona um maior tempo para manejar os gametas, o que permite a quantificação da desova nas porções a serem estocadas em diferentes incubadoras. A quantidade de água a ser utilizada para a ativação das células, deve ser bem dimensionada. A adição de muita água causa diluição do sêmen, o que diminui a possibilidade de os espermatozoides encontrarem a micrópila para a fertilização, sendo que se adicionada pouca quantidade de água há chances de a micrópila ser obstruída pelo muco ovariano (WAYNAROVICH; HOVÁTH, 1983).

2.4 Efeito dos íons na ativação espermática

Os principais íons presentes no plasma seminal dos peixes são Na^+ , Cl^- e K^+ . Essa composição varia entre as espécies e entre os indivíduos da mesma espécie (BILLARD et al., 1995). De acordo com Alavi e Cosson (2006) os íons que estão diretamente ligados a ativação da motilidade espermática são Ca^{2+} , K^+ , Na^+ , e de acordo com o mecanismo de ativação espermática da espécie seus efeitos podem ser diferentes.

As primeiras observações sobre imobilidade espermática do sêmen de truta em meio a altas concentrações de potássio foram realizadas no primeiro quarto do século XX por Scheuring (1925). Com o conhecimento da composição do plasma seminal e o avanço das

análises ficou definido que o íon K^+ é o principal fator da motilidade em salmonídeos. A diminuição desse íon no ambiente, causa um efluxo de K^+ pelos canais específicos da membrana celular, levando a uma hiperpolarização da membrana e iniciando a motilidade espermática em salmonídeos (BILLARD et al., 1987; KHO et al., 2001). Em cyprinídeos o íon K^+ não promove a inibição da motilidade dos espermatozoides como em salmonídeos. A ativação da motilidade nessa ordem de peixes é realizada principalmente pela diferença da pressão osmótica do ambiente (COSSON, 2004; ALAVI & COSSON 2006).

Em salmonídeos a inibição da motilidade dos espermatozoides pela concentração de íon K^+ pode ser superada pelo aumento da concentração externa de Ca^{2+} . Estudos mostram que a concentração intracelular de Ca^{2+} aumenta quando a motilidade é iniciada (BILLARD et al., 1989; COSSON et al., 1989). De acordo com os autores Dzyuba & Cosson (2014) o íon Ca^{2+} age como um sinalizador para o movimento flagelar e conseqüentemente a motilidade espermática, assim o íon Ca^{2+} é considerado um segundo mensageiro. A adição do íon Ca^{2+} nas concentrações de 0 a 5 mM não afeta motilidade espermática em *C. elongatus*, mas maior velocidade curvilínear foi observada em soluções de 1 a 5 mM de Ca^{2+} (BUTTS et al., 2013). Na *P. fluviatilis* a adição de 2,5 mM de Ca^{2+} não aumentou a motilidade, porém as velocidades dos espermatozoides aumentaram (ALAVI et al., 2007). Não se observou o mesmo em *C. carpio*, a porcentagem de espermatozoides móveis diminui quando soluções de $CaCl_2$ nas concentrações 1,75; 2,5; 3,25; mM são utilizadas como ativador (KHARA et al., 2014).

O íon Na^+ é capaz de eliminar o efeito inibitório do K^+ na motilidade dos espermatozoides em salmonídeos. Nos ciprinídeos a ativação espermática é seguida pela alcalinização intracelular média. A rápida alcalinização é provavelmente a principal causa da ativação pela permuta de Na^+/H^+ (ALAVI & COSSON, 2006). O uso de soluções ativadoras a base de sódio, principalmente $NaCl$ e $NaHCO_3$, são vastamente utilizadas para os Characiformes, como nas espécies, a piabanha, *B. insignis* (SHIMODA et al., 2007; VIVEIROS et al., 2011), a piracanjuba, *B. orbignyanus* (GONÇALVES et al., 2013), a piracanjuba, *B. nattereri* (OLIVEIRA et al., 2007), a matrinxã, *B. orthotaenia* (MELO; GODINHO et al., 2006), o tambaqui, *C. macropomum* (CARNEIRO et al., 2012), a pirapitinga, *Piaractus brachypomus* (NASCIMENTO et al., 2010), o dourado, *Salminus brasiliensis* (VIVEIROS et al., 2009), a piapara, *Leporinus obtusidens*, (TAITSON; CHAMI; GODINHO, 2008), e a curimba *P. lineatus* (MURGAS et al., 2007; VIVEIROS et al., 2010; GONÇALVES et al., 2013; VIVEIROS et al., 2016b).

Soluções ativadoras à base de açúcares e sem a presença de íons, como manitol, sacarose e glicose são capazes de ativar a motilidade espermática das espécies *B. orbignyanus*

(GONÇALVES et al., 2013), *B. opalinus* (ORFÃO et al., 2011), *Prochilodus magdalenae* (MARTÍNEZ; ATENCIO; PARDO, 2011), *P. lineatus* (GONÇALVES et al., 2013; VIVEIROS et al., 2016a), *P. fluviatilis* (ALAVI et al., 2007), *Esox lucius* (ALAVI et al., 2009b), *V. vimba* (ALAVI et al., 2010), *B. barbuis* (ALAVI et al., 2009a), *C. elongatus* (BUTTS et al., 2013) e *Megaleporinus obtusidens* (BERNARDES JÚNIOR et al., 2018). Assim confirmando que a osmolalidade da solução ativadora é o principal fator na ativação da motilidade dos espermatozoides (COSSON, 2004)

A composição da solução ativadora para espermatozoides de peixe, seja ela por íons e/ou açúcares, influenciam na osmolalidade final do ativador. Segundo Khrara et al. (2014) esses compostos podem estimular ou inibir a ativação espermática, assim a sensibilidade dos espermatozoides à essas substâncias e suas concentrações devem ser conhecidas para a determinação de uma solução ativadora ideal.

Tabela 2.1 – Osmolalidade do plasma seminal de espécies da ordem Characiformes. Composição e osmolalidade das soluções ativadoras da motilidade espermática já avaliadas com êxito em Characiformes.

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 orbignyianus</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
			Glicose	25 - 265	BERNARDES JÚNIOR et al., 2018
NaCl			25 - 265	BERNARDES JÚNIOR et al., 2018	
<i>Megaleporinus obtusidens</i>	293,2 ± 11,5	NaCl	25 - 265	BERNARDES JÚNIOR et al., 2018	
		KCl	25 - 205	BERNARDES JÚNIOR et al., 2018	

Fonte: Do autor (2018)

3. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A ativação da motilidade espermática do sêmen de peixes é controlada por fatores exógenos. Dentre eles a concentração iônica e/ou a osmolaridade presente no meio, refletem nos parâmetros de qualidade seminal e influenciam na fertilização dos gametas. Portanto, o uso de soluções ativadoras do sêmen somado as biotecnologias de reprodução artificial, podem melhorar a eficiência reprodutivas das espécies nativas ameaçadas de extinção e de potencial zootécnico, proporcionando um ganho ambiental e produtivo ao aquicultor.

REFERÊNCIAS

- 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.; RODINA, M.; POLICAR, T.; KOZAK, P.; PSENICKA, LINHART, O. 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.; RODINA, M.; VIVEIROS, A. T. M.; COSSON, J.; GELA, D.; BORYSHPOLETS, S.; LINHART, O. 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; KOZAK, P.; HATEF, A.; HAMACKOVA, J. LINHART, O. 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.
- ASHIKAGA, F. Y.; ORSI, M. L.; OLIVEIRA C.; SENHORINI, J.A.; FORESTI, F. 2015. The endangered species *Brycon orbignyanus*: genetic analysis and definition of priority areas for conservation. **Environ Biol Fishes**. v.98, p.1845–1855 2015
- BERNARDES, C. L.; PÚBLIO, J. Y. **Proteína bruta no desenvolvimento de curimbas (*Prochilodus scrofa*)**. Semina: ciência agrárias, Londrina, v. 33, n. 1, p. 381-390, jan./mar. 2012.
- BERNARDES JÚNIOR, J. J.; JIMENEZ, E. J.; BOMBARDELLI, R. A.; NUÑER, A. P. O. Changes in external osmolality and ionic composition affect *Megaloporus obtusidens* sperm motility. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 190, p. 63-74, January 2018.
- BILLARD, R; COSSON, M. P.; CHRISTEN, R. Some recent data on the biology on trout spermatozoa. **Proceedings of the third international symposium on reproductive physiology of fish, St John's, Newfoundland**. v. 90 p. 187. 1987.
- BILLARD, R.; BIENIARZ, K.; POPEK, W.; EPLER, P.; SAAD, A. Observation on a possible pheromonal stimulation of milt production in carp, *Cyprinus carpio*. **Aquaculture** v. 77, p. 87-92. 1989.
- BILLARD, R.; COSSON, J.; PERCHEC, G.; LINHART, O. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. **Aquaculture** v.124, p. 95-112 1995.
- BOBE, J.; LABBÉ, C. Review – Egg and sperm quality in fish. **General and Comparative Endocrinology**. v. 165, p. 535-548. 2010
- BROMAGE, N; BRUCE, M.; BASAVARAJA, N.; RANA, K. Egg quality determinants in finfish: the role of over ripening with special reference to the timing of stripping in the Atlantic Halibut *Hippoglossus hippoglossus*. **Journal of the World Aquaculture Society**. Baton Rouge, v. 25, n. 1, p. 13-21, Mar. 1994.

BUTTS, I. A. et al. Physiological functions of osmolality and calcium ions on the initiation of sperm motility and swimming performance in redbreast 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.; AZEVEDO, H. C.; SANTOS, J. P.; MARIA, A. N. 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.

CASTAGNOLLI, N. **Criação de peixes de água doce**. Jaboticabal: FUNEP, 1992.

COSSON, M. P.; BILLARD, R.; LETELLIER, L. Rise of internal Ca²⁺ accompanies the initiation of trout sperm motility. **Cell Motil Cytoskeleton** v. 14, p. 24-34. 1989.

COSSON, J. The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa. **Aquaculture International**, Cork, v. 12, n. 1, p. 69-85, Jan. 2004.

CASTRO, R. M. C.; VARI, R. **Detritivores of the South american fish family prochilodontidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes): a phylogenetic and revisionary study (Smithsonian contributions to zoology)**. New York: Smithsonian Books, 2004.

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.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture**. p. 4. Roma, Jul. 2016

GODINHO, H. P. **Criopreservação de sêmen de peixes. Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 21, n. 203, p. 16-20, Mar/Abr. 2000.

GONÇALVES, A. C. S., NASCIMENTO, A. F.; COSTA, A. C.; LEAL, M. C.; VIVEIROS, A. T. M. 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.

HARVEY, B.; CAROLSFELD, J. Induced breeding in tropical fish culture. **Ottawa: IDRC**, p. 144. 1993.

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.

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** v. 18, p. 19-28. 2001

KOLDRAS, M.; LOIR, M.; MAISSE, G.; LE GAC, F. Study of the composition of seminal fluid and of sperm motility along the genital tract, during a spawning season, in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquat. Living Resource**. v. 9, p. 337–345. 1996

KRASZNAI, Z.; MÁRIÁN, T.; IZUMI, H.; DAMJANOVICH, S.; BALKAY, L. TRÓN, L.; MORISAWA, M. 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.

LIMA, F.C. A revision of the cis-andean species of the genus *Brycon* Muller & Troschel (characiformes: characidae). **Zootaxa**. v. 4222, p. 1–189. 2017

MARIA, A. N.; VIVEIROS, A. T. M; FREITAS, R. T. F; OLIVEIRA, A. V. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 260, n. 1/4, p. 298-306, Sept. 2006

MARTÍNEZ, G.; ATENCIO, V.; PARDO, S. Effect of glucose concentration on sperm motility activation in bocachico *Prochilodus magdalenae* (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.

MOREIRA, A. B.; VISENTAINER, J. V.; SOUZA, N. E.; MATSUSHITA, M. Fatty Acids Profile and Cholesterol Contents of Three Brazilian *Brycon* Freshwater Fishes. **J. Food Composition and Analysis**. San Diego, v. 14, n. 6, p. 565-574, 2001.

MIURA, T.; YAMAUCHI, K.; TAKAHASHI, H.; NAGAHAMA, Y. The role of hormones in the acquisition of sperm motility in salmonid fish. **J. Exp. Zool**. v. 261, p. 359–363. 1992.

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.

MORISAWA, S.; MORISAWA, M. Induction of potential for sperm motility by bicarbonate and pH in rainbow trout and chum salmon. **J. Exp. Biol**. v. 136, p. 13–22. 1988

MORISAWA, S.; ISHIDA, K.; OKUNO, M.; MORISAWA, M. Roles of pH and cyclicadenosine monophosphate in the acquisition of potential for sperm motility during migration from the sea to the river in chum salmon. **Molecular. Reproduction**. v.34, p. 420–426 1993.

MURGAS, L.D.S.; FRANCISCATTO, R. T.; SANTOS, A. G. O. Avaliação espermática pós-descongelamento em piracanjuba (*Brycon orbignyanus*, Valenciennes, 1849). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 32, n. 62, p.1810-1814, dez. 2003.

MURGAS, L. D. S.; MILIORINI, A. B.; FREITAS, R. T. F.; PEREIRA, G. J. M. 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.; MARIA, A. N.; PESSOA, N. O.; CARVALHO, M. A. M.; VIVEIROS, A. T. M. 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.

OLIVEIRA, A. V. Avaliação de técnicas de conservação de sêmen de *Prochilodus vimboides* e *Prochilodus lineatus*. **Tese de doutorado**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2015.

ORFÃO, L. H.; NASCIMENTO, A. F.; CORRÊA, F. M.; COSSON, J.; VIVEIROS, A. T. M. 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.

PROENÇA, C. E. M.; BITTENCOURT, P. R. L. **Manual de piscicultura tropical**. Brasília: IBAMA, 1994.

ROMAGOSA, E. Biologia reprodutiva e fisiologia de peixes em confinamento: o cachara *Pseudoplatystoma fasciatum* como modelo. In: CYRINO, J. E. P.; URBINATI E. C. (Ed) Tópicos Especiais em Biologia Aquática e Aqüicultura. **Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática**, Jaboticabal, SP, p. 108-116, 2006

SANTAMARIA, F. M.; ANTUNES, S. A. Coloração e rendimento do filé de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*, valenciennes, 1849), (pisces, characidae) silvestre e criada em cativeiro. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 25, p. 27-30, 1999.

SANTOS, L. C. Crescimento de juvenis de curimba (*Prochilodus vimboides*, Kner, 1859) no inverno, em diferentes densidades de estocagem. 2014. 40 p. **Dissertação** (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SCHEURING, L. Biologische und physiologische untersuchungen am Forellensperma. **Arch Hydrobiol** v.4.1925

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 água 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.

VAZ, M. M.; TORQUATO, V. C.; BARBOSA, N. D. C. **Guia ilustrado de peixes da bacia do rio Grande**. Belo Horizonte, CEMIG/CETEC. p.144. 2000

VIVEIROS, A. T. M.; OLIVEIRA, A. V.; MARIA, A. N.; ORFÃO, L. H.; SOUZA, J. C. 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.; NASCIMENTO, A. F.; ORFÃO, L. H.; ISAÚ, Z. A. 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.; NASCIMENTO, A. F.; ORFÃO, L. H.; ISAÚ, Z. A. 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 neotrópicos de água doce**. 1ed. Jaboticabal: FUNEP Campus de Jaboticabal, p. 307-327. 2014

VIVEIROS, A. T. M.; LEAL, M. C.; FRANÇA, T. S.; ALMEIDA, I. L. G.; ISAÚ, Z. A. 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.; CHIACCHIO, I. M.; ALMEIDA, I. L. G.; TAFFAREL, T. R.; LEAL, M. C. Storage and transportation of *Prochilodus lineatus* (Characiformes) sperm prior to cryopreservation. **General and Comparative Endocrinology**, 2016b.

ZANIBONI, E. F.; WEINGARTNER, M.; Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. **Rev. Bras. Reprod. Animal**. Belo Horizonte, v.31, n.3, p. 367-373, Jul/Set. 2007.

ZANIBONI-FILHO, E.; NUÑER, A.P.O. Reservatório de Itá: Estudos Ambientais, Desenvolvimento de Tecnologia de Cultivo e Conservação da Ictiofauna. **Editores UFSC**, Florianópolis, SC, 2008.

WAYNAROVICH, E.; HORVÁTH, L. A propagação artificial de peixes de águas tropicais: **manual de extensão**. Brasília: FAO/CODEVASF/CNPq, p. 225, 1983.

SEGUNDA PARTE – ARTIGO**ARTIGO 1****Diferentes soluções na ativação e fertilização do sêmen fresco e criopreservado de piracanjuba *Brycon orbignyanus* e grumatã *Prochilodus vimboides* (characiformes)**

Thales S França, Naiara C Motta, Alexmiliano V Oliveira, Renata E Catão, Luis DS Murgas*

Dept. of Veterinary Medicine, Federal University of Lavras, UFLA, Lavras, Minas Gerais, 37200-000, Brazil.

*Corresponding author: Phone/fax: +55(35)997411182; lsmurgas@prp.ufla.br

Artigo formatado segundo as normas do periódico *Aquaculture*

Abstract

The conditions of extracellular environment, ionic concentration, pH, osmolality and temperature, makes effect on sperm activation and sperm quality. The objective of this study was to determine the effect of different activating solutions on the sperm quality and fertilization rate of the fresh and cryopreserved sperm of piracanjuba *Brycon orbignyanus* (n=10) and grumetã *Prochilodus vimboides* (n=8). Was used 3 activation solutions with ions NaCl, KCl, CaCl₂ (150 mOsm kg⁻¹) and 3 solutions without ions glucose (150 mOsm kg⁻¹), water reverse osmosis (RO) (~ 0 mOsm kg⁻¹) and tank water (TW) (*B.orbignyanus* 139 mOsm kg⁻¹ and *P.vimboides* 114 mOsm kg⁻¹). After hormonal treatment with carp pituitary extract was collected the semen of males and the oocytes of females. In the experiment 1 the parameters of motility rate (%), motility quality score (1-5) and motility duration (seconds) of the fresh sperm were determined using a subjective form. Other aliquot of the semen from each male was used to fertilize oocytes from a one female, the gamets were activated with solutions and evaluated the fertilization rate and hatching rate. In experiment 2, the semen was cryopreserved using methyl glycol as cryoprotectant and as extenders BTS[®] 5% - 325 mOsm kg⁻¹ (*B.orbignyanus*) or glucose 5% - 325 mOsm kg⁻¹ (*P. vimboides*). The diluted sperm loaded into 0.5 mL straws which were frozen in a nitrogen vapor vassel and stored in a liquid nitrogen vassel. The straws (3 male⁻¹) were thawed in a water bath at 60°C for 8 seconds and activated with different solutions, the parameters of motility rate and as curvilinear velocity (VCL), straight line (VSL) and average path (VAP) of the post-thaw were determined using a Computer-Assisted Sperm Analyzer (CASA). The data were tested for significant differences using ANOVA one-way and after SNK 5% test. In experiment 1 a higher average of the subjective parameters in fresh semen of *B. orbignyanus* was observed when the samples activated by the solution based on KCl, a solution based on calcium showed the lowest values. A higher value fertilization rate was observed when a gamets activated with TW and the lowest activated with CaCl₂. There was no statistical difference in relation to the hatch rate of *B. orbignyanus* for the different activating solutions. In fresh sperm of *P. vimboides* the highest values were observed using glucose solution and the lowest when used CaCl₂. The higher values of fertilization rate e hatching rate were observed in glucose or RO, the lowest were KCl or CaCl₂. In the experiment 2 the samples post-thaw of *B.orbignyanus* activated with TW or RO showed the highest values for motility, the highest values of VCL, VSL and VAP were observed when activated with glucose compared to the samples activated with CaCl₂. The highest values for fertilization rate and hatching rate were observed when used non-ionic solutions. The thawed semen of *P. vimboides* and activated with glucose presented the highest spermatic motile, VCL and VSL in relation to

the activated samples with KCl and CaCl₂. The highest values of fertilization rate were observed using glucose or RO compared an ionic solution. The higher hatching rate value was observed on gametes activated with RO and the lower activated with NaCl. For the activation of fresh and cryopreserved semen of *B.orbignyanus*, the non-ionic activators must be used to obtain the best seminal quality and better rate of fertilization and hatching. The glucose solution and RO are the most suitable activators for fresh and cryopreserved semen in order to obtain the best seminal quality, fertilization rate and hatching of *P.vimboides*.

Keywords: Activator. Fertilization. Characiformes. CASA. Fish

Introdução

Segundo dados da FAO (2018) o consumo mundial de peixes já supera os 20 kg/per capita/ ano e a produção aquícola ultrapassou a produção pesqueira. Isso só foi possível graças a evolução tecnológica da aquicultura em todo o mundo. Por outro lado, no Brasil, espécies nativas estão quase entrando em extinção por consequências das ações antrópicas. Mais uma vez, biotecnologias como, reprodução artificial e criopreservação de sêmen (Murgas et al., 2003), estão sendo cada vez mais utilizadas com o intuito de conservação e produção das espécies nativas em cativeiro.

Muitas vezes, para a reprodução artificial ou para a utilização de sêmen criopreservados, soluções ativadoras do sêmen são necessárias. As soluções ativadoras são soluções compostas desde água (destilada, deionizada e osmose reversa) com osmolalidade próxima a zero, ou soluções contendo apenas um sal (NaCl, KCl, NaHCO₃, CaCl₂), ou combinações de sais (MgSO₄, Na₂HPO₄, KH₂PO₄) ou até soluções de açúcares (glicose, sacarose, manitol). O objetivo de utilizar soluções ativadoras é melhorar a capacidade de fertilização dos espermatozoides, principalmente daqueles espermatozoides advindos do processo de criopreservação. O processo de criopreservação causa injúrias as células espermáticas, alterando suas propriedades de permeabilidade de membrana, tornando-as mais sensíveis (Viveiros, et al., 2016a).

A maioria dos peixes realizam fecundação externa. Como forma ou mecanismo de preservar a viabilidade de seus espermatozoides, nos peixes, os espermatozoides são imóveis dentro dos testículos e no plasma seminal (Morisawa; Suzuki, 1980). A motilidade espermática só é ativada quando os gametas são liberados no meio aquoso externo. Na reprodução artificial de peixes de água doce, a motilidade é ativada quando o espermatozoide entra em contato com uma solução hipotônica em relação ao plasma seminal. As diferenças nas características físico-químicas do meio de ativação e do plasma seminal regulam a ativação dos espermatozoides (Morisawa, 2008). Alguns fatores como a presença de íons (Na⁺, K⁺ e Ca²⁺), pH, osmolalidade e temperatura influenciam a motilidade espermática (Alavi e Cosson, 2005; Alavi e Cosson 2006) agindo através da transmissão de sinais da membrana plasmática até o aparelho flagelar (Dzyuba e Cosson, 2014). Vários estudos demonstraram o efeito dos íons em soluções ativadoras na motilidade espermática em ciprinídeos (Krasznai et al., 2000, 2003; Linhart et al., 2003a; Alavi et al., 2009a, 2010), Salmonídeos (Alavi e Cosson, 2006; Durmoné et al., 2017), Acipenserídeos (Prokopchuk et al., 2016) e Characiformes (Bernardes Júnior et al., 2018). Entretanto, para as espécies nativas de Piracanjuba *Brycon orbignianus* e Grumatã *Prochilodus vimboides*, da ordem Characiformes, soluções ativadoras do sêmen ainda não foram

completamente definidas.

A piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1850) é um peixe neotropical reofílico, distribuído ao longo da bacia do Paraná e Paraguai (Antunes et al., 2010). Essa espécie apresenta um excelente potencial zootécnico, é considerada espécie esportiva por pescadores, sua carne tem um alto valor de mercado e é adequada para a reprodução em cativeiro (Borba et al., 2006). Entretanto, ações antrópicas como as construções de hidroelétricas, poluição e pesca extrativista causaram uma queda na população natural da espécie (Ashikaga et al., 2015), sendo considerada em extinção em alguns locais (Lima, 2017).

A Grumatã *Prochilodus vimboides* (Characiformes) (Kner, 1859) é uma das 13 espécies descritas do gênero *Prochilodus* (Reis et al., 2003) e também é um peixe reofílico de fecundação externa (Lowel-McConnell, 1999). Ela está presente nas bacias dos rios Paraíba do Sul, Jequitinhonha, Jucuruçu, Mucuri e Doce, que se espalham pelos Estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo e Bahia (Castro e Vari, 2004). O estado de conservação da *P. vimboides* é considerada vulnerável (Souza, 2015).

Assim o objetivo desse trabalho é testar e definir diferentes soluções ativadoras.

para a fertilização do sêmen fresco e criopreservado de piracanjuba *Brycon orbignyanus* e grumatã *Prochilodus vimboides*.

Material e Métodos

Locais experimentais e origem dos animais

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética de Uso Animal da Universidade Federal de Lavras – UFLA (CEUA protocolo N° 069/2017), Lavras-MG, Brasil.

Os procedimentos de coleta, fertilização dos gametas e a criopreservação do sêmen de Piracanjuba *Brycon orbignyanus* foram realizados na Piscicultura da Companhia Energética do Estado de Minas Gerais (CEMIG) na cidade de Itutinga - MG (23°23'10" S; 45°39'44" W), Brasil, durante o período reprodutivo no mês de janeiro de 2018. Os mesmos procedimentos foram realizados com os gametas de Grumatã *Prochilodus vimboides* na Piscicultura do Campo Experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), localizada em Leopoldina – MG (21°28'34" S 42°43'07" W), Brasil, durante o mês de dezembro de 2017.

As análises após o descongelamento das amostras das duas espécies foram realizadas no Setor de Fisiologia e Farmacologia do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras, em Lavras – MG, durante os meses de dezembro de 2017 e janeiro de 2018.

As piracanjubas foram mantidas durante o ano em tanques escavados e alimentadas duas vezes ao dia com ração comercial extrusada (32% PB) (Pirá 32[®], Guabi, Brasil). As grumatãs também foram mantidas em tanques escavados e alimentadas duas vezes ao dia com ração comercial extrusada (32% PB) (Aquos Tropical TR 32[®], Total, Brasil).

Seleção e acondicionamento dos reprodutores

Foram selecionados reprodutores machos (n=10) e fêmeas (n=2) de piracanjuba e machos (n=8) e fêmeas (n=2) de grumatã. A captura foi realizada através de rede de arrasto e a seleção foi realizada de acordo com as características morfológicas. Os machos aptos à reprodução, liberaram sêmen sob uma leve pressão abdominal no sentido craniocaudal. As fêmeas aptas selecionadas apresentaram um evidente abaulamento na cavidade celomática e a papila urogenital avermelhada.

Os reprodutores foram selecionados, separados machos e fêmeas, identificados e pesados. Foram transferidos dos tanques escavados para os aquários de alvenaria (1000 L), com temperatura (~ 27°C) e oxigênio dissolvido (5mg L⁻¹) (YSI 550 A, Yellow Springs, OH 45387, USA). Os machos piracanjubas tinham em média 1,0kg e as fêmeas 2,0kg, os machos de

grumatãs tinham em média 0,224 kg e as fêmeas 0,210 kg.

Os reprodutores receberam o extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC) (Argent Chemical Laboratory, Redmond, WA, USA), via injeção intraperitoneal. Nas piracanjubas fêmeas foram administradas três doses do hormônio: uma dose prévia, 48 horas antes da coleta dos gametas na dosagem de $0,25 \text{ mg kg}^{-1}$. A primeira dose ($0,1 \text{ mg kg}^{-1}$) 18 horas antes da coleta e a segunda dose (1 mg kg^{-1}) 6 horas antes da extrusão. Os machos receberam uma única dose na concentração de 1 mg kg^{-1} , seis horas antes da coleta, conforme o protocolo de rotina na piscicultura da CEMIG. Aproximadamente 6h após a última indução hormonal (160 horas-graus, 27°C) iniciou-se a coleta dos gametas.

As grumatãs fêmeas receberam duas doses de EBHC, a primeira dose $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$ e a segunda 5 mg kg^{-1} , aplicada 12 horas depois da primeira e sete horas antes da coleta. Os machos receberam dose única de 4 mg kg^{-1} no mesmo horário em que as fêmeas receberam a segunda dose. O início da coleta se deu a aproximadamente 7 h após a última indução hormonal (180 horas -graus, 27°C).

Previamente à coleta, a papila urogenital e proximidades foram limpas e secas com papel descartável para evitar qualquer tipo de contaminação por água, fezes, urina e sangue. A coleta do sêmen e ovócitos foram por meio de massagem abdominal na cavidade celomática, no sentido craniocaudal. O sêmen foi coletado em tubos de ensaio graduados. Registrou-se o volume e depois a amostra foi acondicionado em um cooler contendo gelo químico ($\sim 6-9^\circ\text{C}$) por cerca de 30 minutos. A desova de uma fêmea foi coletada em recipiente de plástico seco e pesados. Um grama da desova foi pesado em balança de precisão (AY220 Shimadzu Corporation[®], Kyoto, Japan) para a quantificação estimada total de ovócitos.

Avaliação subjetiva do sêmen fresco utilizando soluções ativadoras iônicas e não-iônicas (Experimento 1)

O delineamento experimental foi DBC, onde o sêmen de cada macho foi considerado um bloco, ou seja, o sêmen de cada macho recebeu todos os tratamentos.

Imediatamente após a coleta, amostras do sêmen de cada macho foi ativado com soluções ativadoras iônicas de NaCl, CaCl_2 ou KCl (150 mOsm kg^{-1}) e não-iônicas de Glicose (150 mOsm kg^{-1}), Água Osmose Reversa (OR) (0 mOsm kg^{-1}) ou Água do tanque (AT; piracanjuba 139 mOsm kg^{-1} e grumatã 114 mOsm kg^{-1}) (Gonçalves et al., 2013). Uma alíquota de $2 \mu\text{L}$ do sêmen de cada macho e $10 \mu\text{L}$ dos ativadores foram utilizados para a avaliar de

forma subjetiva a motilidade (%), a duração da motilidade (s) e o vigor espermático (1-5) do sêmen sob microscópio de luz 200x (Olympus® CX22LED, Tokyo, Japan). Para análise do pH (DM22 Digimed, São Paulo, Brasil), osmolalidade (Wescor Vapro 5520, Logan, Estados Unidos da América) e concentração iônica do plasma seminal, 2 mL do sêmen de cada reprodutor foi coletado em eppendorf e centrifugado a 4500 x g por 30 minutos.

Avaliação das características do sêmen fresco

Uma alíquota de 10 µL foi coletada e diluída (1:1000; sêmen:volume total) em formol citrato (2,9 g de citrato de sódio, 4 mL de solução comercial de formaldeído 35% e água destilada q.s.p. 100 mL). Uma alíquota de sêmen diluído foi utilizada para determinar a concentração espermática individual através de contagem utilizando uma câmara de Neubauer (CBRA, 1998).

A integridade de membrana dos espermatozoides foi avaliada através do método eosina-nigrosina (Blom, 1950), utilizando 1 µL de sêmen, 3 µL de eosina (3%) e 3 µL de nigrosina (5%). As lâminas foram analisadas sob microscópio de luz (400x), onde foram contadas 200 células por lâmina, sendo que as células coradas foram consideradas não integras e as incolores viáveis (Kavamoto e Fogli da Silveira, 1986).

Fertilização do sêmen fresco (Experimento 1)

Para a fertilização da piracanjuba foram pesadas 60 amostras (6 ativadores x 10 machos) contendo 0,1 g de ovócitos em copos descartáveis de 50 mL, pipetou-se 5 µL do sêmen de cada macho, chegando à uma relação ideal espermatozoide:ovócito de 22 a 37 x 10⁵. Os gametas foram ativados utilizando 5mL dos ativadores (Felizardo et al., 2010). Para a fertilização da grumatã pesou-se 54 amostras (6 ativadores x 8 machos) contendo 0,1 g de ovócitos em copos descartáveis de 50 mL, uma alíquota de 5 µL do sêmen de cada macho, chegando à uma relação espermatozoide:ovócito média de 56,95 x 10⁵, considerada ideal para *Prochilodus lineatus* (Souza, 2007). A ativação foi promovida pelas soluções testadas em um mesmo volume 5 mL. Após a adição dos ativadores foram realizados movimentos circulares por 90 segundos e os ovos foram transferidos para incubadoras experimentais (2 L) de forma aleatória. As incubadoras estavam dispostas dentro de aquários com oxigenação e movimentação dos ovos constante. O delineamento experimental foi DBC, onde os machos foram considerados os blocos e cada incubadora foi considerada como unidade experimental.

Taxa de fertilização e eclosão

A taxa de fertilização foi realizada 8h após a fertilização sendo essa fase o intervalo de tempo mais utilizado para se avaliar os ovócitos fecundados. As taxas de fertilização foram obtidas através da análise de todos os ovos da unidade experimental, esses foram visualizados com o auxílio de um microscópio estereoscópico binocular (10x), e o resultado dado pela fórmula: $TF = [E/(E+I)] \times 100$ onde, TF: taxa de Fertilização; E: número de ovos viáveis e I: número de ovos inviáveis.

A taxa de eclosão foi estimada 24 horas após a fertilização, e foi dada pela seguinte fórmula: $TE = (L/TF) \times 100$ onde, TE: Taxa de eclosão; L: número de larvas; TF: taxa de fertilização (Felizardo et al., 2010).

Criopreservação do sêmen (Experimento 2)

O sêmen de piracanjuba foi criopreservado 30 minutos após a coleta seguindo a metodologia de Maria (2006). A solução crioprotetora utilizada foi composta pelo diluidor BTS[®] 5% (Beltsville Thawing Solution[™], Minitüb, Tiefenbach/Landshut, Alemanha; 79,9% glicose, 12,7% citrato de sódio, 2,7% EDTA, 2,7% NaHCO₃, 1,6% KCl, e 0,4% gentamicina; 325 mOsm kg⁻¹); pH 7,6 e o crioprotetor Metilglicol [CH₃O(CH₂)₂OH] (Vetec Química Fina Ltda, Duque de Caxias, RJ, Brasil). Todas as amostras foram diluídas em Eppendorf (2 mL) na proporção (100 µL sêmen + 800 µL BTS + 100 µL metilglicol).

O sêmen de grumetã foi criopreservado 30 minutos após a coleta utilizando o protocolo de criopreservação desenvolvido por Oliveira (2015). O diluidor utilizado foi a glicose 5% (325 mOsm/kg; Vetec Química Fina Ltda, Duque de Caxias, RJ, Brasil); pH 7,6 e o crioprotetor foi o Metilglicol [CH₃O(CH₂)₂OH] (Vetec Química Fina Ltda, Duque de Caxias, RJ, Brasil). Todas as amostras foram diluídas em Eppendorf (2 mL) na proporção (100 µL sêmen + 800 µL glicose + 100 µL metilglicol).

Após o envase, as palhetas foram congeladas em botijão de vapor de nitrogênio líquido (Dry Vapor Vessel YDH-8, Chengdu Golden Phoenix Liquid Nitrogen Container, Chengdu, Sichuan, China) à aproximadamente -170°C por 24h, e depois as amostras foram transferidas para botijão de nitrogênio líquido (MVE XC 34/18, New Prague, Minnesota, USA) à -196°C.

Composição iônica do plasma seminal e das soluções ativadoras

Para a quantificação da concentração iônica do plasma seminal, o mesmo foi diluído em

água ultrapura a uma diluição de 1:100 (4950 μL água: 50 μL de plasma). A concentração iônica dos ativadores foi determinada sem diluição previa. Os íons Ca^{2+} , K^+ , Na^+ e Mg^{2+} dos ativadores e do plasma seminal foram quantificados por meio de espectrômetro de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (Spectro Blue ICP-OES, Kleve, Alemanha).

Avaliação objetiva da motilidade e velocidades espermática do sêmen descongelado (Experimento 2)

O delineamento experimental foi DBC, conforme o experimento 1. Imediatamente após o descongelamento, amostras do sêmen de cada macho foram ativadas com as mesmas soluções utilizadas no experimento 1.

O sêmen de piracanjuba e grumatã foram avaliados 2 semanas depois de criopreservados. As palhetas (3 palhetas/macho) foram individualmente descongeladas em banho-maria (Water-bath MA 127, Marconi, Piracicaba, São Paulo, Brazil) à 60°C por 8 s (Viveiros et al., 2008). A motilidade espermática média e as velocidades foram analisadas de forma objetiva utilizando o sistema CASA (Computer-Assisted Sperm Analyzer), seguindo a metodologia descrita por Viveiros et al. (2012). A motilidade foi ativada utilizando as soluções ativadoras iônicas e não iônicas diretamente na câmara de contagem Makler[®] (Sefi-Medical Instruments Ltd, Haifa, Israel) colocada em um microscópio de contraste (Nikon[®] Eclipse E200, Tokyo, Japão) à um aumento de 100x. O microscópio foi conectado à uma câmera de vídeo (Basler Vision Technologies[™] A780-54FC, Ahrensburg, Alemanha) gerando 50 images s^{-1} ; a gravação do vídeo se iniciou 10 s após ativação dos espermatozoides. Os vídeos foram analisados pelo software Sperm Class Analyzer[®] (SCA[®] 2010, Microoptics, S.L. Version 5.4 Barcelona, Espanha), foram utilizadas as configurações padrões para peixes. Os parâmetros analisados foram: Motilidade média (%), Velocidade curvilínea (VCL), Velocidade média da trajetória (VAP), Velocidade linear progressiva (VSL). Para a determinação desses parâmetros, em média 642 ± 330 espermatozoides de piracanjuba e 1222 ± 368 de grumatã por amostra foram analisados. As palhetas de piracanjuba foram analisadas nessa ordem de soluções ativadoras: Palheta 1 – AT, Glicose, NaCl, OR, CaCl_2 , KCl. Palheta 2 – KCl, CaCl_2 , OR, NaCl, Glicose, AT e Palheta 3 – CaCl_2 , AT, Glicose, KCl, NaCl, OR. Às de grumatã foram: Palheta 1 – NaCl, Glicose, KCl, CaCl_2 , OR, AT; Palheta 2 – AT, OR, CaCl_2 , KCl, Glicose, NaCl; Palheta 3 – CaCl_2 , Glicose, AT, OR, NaCl, KCl. Os ativadores durante as análises foram mantidos à 25°C e a diluição utilizada no momento da ativação foi 1sêmen:10ativador.

Fertilização com uso de sêmen criopreservado

O sêmen de piracanjuba e grumatã permaneceram criopreservados em nitrogênio líquido (-196 °C) por 15 e 30 dias, respectivamente. Posteriormente, foram descongelados segundo metodologia de Viveiros et al. (2008) e sua concentração espermática estimada. De acordo com a concentração espermática do sêmen, uma alíquota de sêmen foi utilizada para manter uma proporção ideal entre os gametas. O desing experimental da fertilização do sêmen criopresevado de piracanjuba e de grumatã foi o mesmo utilizado no experimento 1.

Análises Estatísticas

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade (Shapiro-Wilk) em seguida foram submetidos à análise de variância ANOVA (one-way) e comparados pelo teste de SNK (Student-Newman-Keuls) com um nível de significância de 5 %, utilizando o software R® versão 3.3.2.

Resultados

Características do sêmen fresco de piracanjuba, composições do plasma seminal e ativadores

A osmolalidade média do plasma seminal de piracanjuba utilizados foi de 381 ± 8 mOsm kg^{-1} . O pH médio do plasma foi de $8,03 \pm 0,08$. O volume médio de sêmen foi de $7,9 \pm 3,2$ mL e com uma concentração espermática média de $5,68 \pm 0,93 \times 10^9$ mL^{-1} . O número médio de espermatozoides com a membrana íntegra foi de 83 ± 15 %. A composição iônica média do plasma seminal e dos ativadores utilizados estão apresentados na Tabela 1.

A desova total da fêmea utilizada para fertilização foi de 243 g de ovócitos homogêneos e sem grumos e foram constatados em média 1005 ovócitos por grama de desova.

Características do sêmen fresco de grumatã, composições do plasma seminal e ativadores

A osmolalidade do plasma seminal de grumatã utilizados foi de 345 ± 16 mOsm kg^{-1} . O pH do plasma seminal foi de $8,75 \pm 0,22$. O volume coletado foi $1 \pm 0,4$ mL com uma concentração espermática de $34,39 \pm 20 \times 10^9$ mL^{-1} . O número médio de espermatozoides com a membrana íntegra foi de 97 ± 3 %. A composição iônica média do plasma seminal e dos ativadores utilizados estão na tabela 2.

A desova da fêmea utilizada foi de 40 g de ovócitos homogêneos e sem formação de grumos. Cada grama da desova havia em média 850 ovócitos.

Análise subjetiva do sêmen fresco de piracanjuba ativado com soluções iônicas e não-iônicas. (Experimento 1)

Os ativadores KCl (94%), água OR (90%), água AT (90%), glicose (84%) e NaCl (84%) proporcionaram motilidade superior ao ativador CaCl_2 (64%) (Figura 1 – a).

No parâmetro duração da motilidade foi observado que os espermatozoides ativados em soluções à base de NaCl (120,7 s), glicose (117,3 s) e KCl (97,5 s) obtiveram a maior durabilidade ($p < 0,05$) em relação à água do tanque (30,2 s), água OR (32,6 s) e CaCl_2 (40,1 s) (Figura 1 – b).

Para o parâmetro vigor, os ativadores KCl (5), água OR (4,9), água AT (4,6), glicose (4,5) e NaCl (4,4) proporcionaram vigor superior aos ativadores a base de cálcio (3,6) (Figura 1 – c).

Taxas de fertilização e eclosão com o uso de sêmen fresco de piracanjuba

A maior taxa de fertilização foi observada para o tratamento água do tanque (3,23%) e a menor CaCl_2 (0,5%) ($p < 0,05$) (Figura 2 – a). Entretanto para a taxa de eclosão não houve diferença significativa entre os tratamentos ($p > 0,05$) (Figura 2 – b).

Análise subjetiva do sêmen fresco de grumatã ativado com soluções iônicas e não-iônicas. (Experimento 1)

Os ativadores glicose (91%), NaCl (90%), água AT (89%), água OR (87,5%) e KCl (84%) proporcionaram motilidade superior ao ativador CaCl_2 (38%) (Figura 3 – a).

No parâmetro duração da motilidade foi observado que os espermatozoides ativados em soluções à base de glicose (356,3 s) obtiveram a maior durabilidade ($p < 0,05$) em relação às demais soluções. NaCl (241,5 s) e KCl (209 s) foram superiores a água AT (30,5 s), água OR (25,8 s) e CaCl_2 (34,1 s) (Figura 3 – b).

Para o parâmetro vigor, os ativadores glicose (4,8), NaCl (4,8), água OR (4,8), água AT (4,3) e KCl (4,3) proporcionaram vigor superior as amostras ativadas com o ativador a base de cálcio (2,3) (Figura 3 – c).

Taxas de fertilização e eclosão com o uso de sêmen fresco de grumatã

As amostras ativadas com glicose (15 %) ou água OR (14%) proporcionaram uma taxa de fertilização superior as amostras ativadas com NaCl (1%), KCl (0,5%) ou CaCl_2 (0 %) (Figura 4-a). As amostras ativadas com água AT (8%) proporcionou taxa de fertilização superiores a essas três últimas e semelhante àquela com glicose e água OR.

Somente as amostras ativadas com água OR (22%), água AT (29%) ou glicose (26%) apresentaram taxa de eclosão e não se diferiram ($p > 0,05$) (Figura 4-b).

Análise objetiva (CASA) do sêmen criopreservado de piracanjuba e ativado com as soluções iônicas e não-iônicas. (Experimento 2)

Características do sêmen criopreservado de piracanjuba

O número médio de espermatozoides com a membrana íntegra foi de 59 ± 17 . O número médio de espermatozoides avaliados foram 510 ± 50 . A concentração espermática média do sêmen descongelado foi de $9 \pm 4,93 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$.

Motilidade e velocidades espermáticas das amostras descongeladas e ativadas com diferentes soluções

A motilidade espermática das amostras ativadas com água AT (45%) foram significativamente superiores as amostras ativadas com KCl (33%), NaCl (33%), CaCl₂ ou glicose (32%) (Figura 5). A motilidade das amostras ativadas com água OR (39%) foram superiores somente as amostras ativadas com CaCl₂. E as motilidades das amostras ativadas com KCl, NaCl ou Glicose foram inferiores as amostras ativadas com AT, porém superiores as amostras ativadas com CaCl₂ ($p < 0,05$).

Em relação a velocidade espermática, as amostras de sêmen ativadas com glicose ($69,4 \mu\text{m s}^{-1}$), KCl ($68,3 \mu\text{m s}^{-1}$) ou NaCl ($67 \mu\text{m s}^{-1}$) proporcionaram ($p < 0,05$) os maiores valores de VCL (Figura 6). As amostras ativadas por água AT ($54,3 \mu\text{m s}^{-1}$) ou água OR ($54,2 \mu\text{m s}^{-1}$) apresentaram VCL inferiores aos acima citados e superior ao CaCl₂ ($37,6 \mu\text{m s}^{-1}$).

Para VAP o comportamento dos dados foram semelhante ao VCL. Os maiores valores de VAP foram observados nas amostras ativadas com glicose ($59,8 \mu\text{m s}^{-1}$), KCl ($58 \mu\text{m s}^{-1}$) ou NaCl ($57,7 \mu\text{m s}^{-1}$). As amostras ativadas por água AT ($44,1 \mu\text{m s}^{-1}$) ou água OR ($45,3 \mu\text{m s}^{-1}$) apresentaram VAP inferior aos acima citados e superior ao CaCl₂ ($30,8 \mu\text{m s}^{-1}$) (Figura 6).

E para VSL, igualmente, os maiores valores de VSL foram observados nas amostras ativadas com glicose ($49,5 \mu\text{m s}^{-1}$), KCl ($48,7 \mu\text{m s}^{-1}$) ou NaCl ($49,1 \mu\text{m s}^{-1}$). A diferença ocorreu em que, os valores de VSL observados nas amostras ativadas por água AT ($33,4 \mu\text{m s}^{-1}$), água OR ($34,4 \mu\text{m s}^{-1}$) ou CaCl₂ ($25 \mu\text{m s}^{-1}$) foram semelhantes entre si, mantendo a inferioridade aos demais (Figura 6).

Taxa de fertilização e eclosão utilizando o sêmen descongelado de piracanjuba

A fêmea liberou uma desova total pesando 154g, contendo 998 ovócitos g^{-1} , e com coloração desejável, sem presença de grumos ou contaminação. Uma alíquota de sêmen descongelado de cada macho foi utilizada para garantir a proporção ideal entre os gametas de piracanjuba (TABELA 3).

As amostras ativadas com glicose (3,64%) ou água OR (3,58%) proporcionaram taxas de fertilização ($p < 0,05$) superiores as amostras ativadas NaCl, KCl ou CaCl₂. As amostras ativadas com água AT (2,57%) proporcionaram taxa de fertilização intermediária, sem diferirem da taxa de fertilização proporcionada por qualquer uma das soluções ativadoras testadas ($p > 0,05$) (Figura 7 – a).

Já em relação a eclosão dos ovócitos fertilizados, as amostras ativadas com água AT (64,7%), glicose (55,5%) ou água OR (42,7%) proporcionaram taxas de eclosão superiores as demais soluções testadas ($p < 0,05$) (Figura 7 – b).

Análise objetiva (CASA) do sêmen criopreservado de grumatã e ativado com as soluções iônicas e não-iônicas. (Experimento 2)

Características do sêmen criopreservado de grumatã

O número de espermatozoides com a membrana íntegra foi de 40 ± 9 %. Foram avaliados em média 1236 ± 374 espermatozoides em cada análise do Software CASA. A concentração espermática do sêmen descongelado foi de $34 \pm 10 \times 10^8$ mL⁻¹.

Motilidade e velocidades espermáticas das amostras descongeladas e ativadas com diferentes soluções

A motilidade espermática das amostras ativadas com glicose (40%) foram significativamente superiores ($p < 0,05$) aos demais tratamentos. (Figura 8). A motilidade das amostras ativadas com água OR foram superiores as amostras ativadas com água AT, KCl ou CaCl₂. A motilidade das amostras ativadas com NaCl foram semelhantes àquelas ativadas com água OR ou AT e superiores àquelas ativas com KCl ou CaCl₂. A motilidade das amostras ativadas com água AT foram superiores somente àquelas ativadas com KCl ou CaCl₂. E a motilidade destes dois últimos foram as menores e não diferiram entre si.

Em relação velocidade espermática, as amostras de sêmen ativadas com glicose ($43,6 \mu\text{m s}^{-1}$) apresentaram valores de VCL semelhantes as amostras ativadas com NaCl ($38,8 \mu\text{m s}^{-1}$), porém valores de VCL superiores aos demais ativadores testados (Figura 9). As amostras ativadas com NaCl, apresentaram valores de VCL semelhantes as amostras ativadas com glicose, água OR ($37 \mu\text{m s}^{-1}$) ou água AT ($33 \mu\text{m s}^{-1}$), porém superiores as amostras ativadas com KCl ($30 \mu\text{m s}^{-1}$) ou CaCl₂ ($29 \mu\text{m s}^{-1}$). As amostras ativadas com água OR apresentaram valores de VCL inferiores àquelas ativadas com glicose, superiores as amostras ativadas com KCl ou CaCl₂ e semelhante as amostras ativadas com NaCl ou água AT. E as amostras ativas com KCl ou CaCl₂ apresentaram valores de VCL semelhantes entre si e semelhante a amostra ativadas com água AT, entretanto, seus valores foram os mais baixos observados.

Para VAP, somente as amostras de sêmen ativada com água AT ($34,6 \mu\text{m s}^{-1}$) apresentaram valores de VAP superiores as amostras ativas com CaCl₂ ($17,8 \mu\text{m s}^{-1}$). As

velocidades promovidas pelos demais ativadores não se diferiram ($p>0,05$) dos ativadores acima citados (Figura 9).

Para VSL, as amostras ativadas com glicose ($24,7 \mu\text{m s}^{-1}$), NaCl ($22,3 \mu\text{m s}^{-1}$), água OR ($20,9 \mu\text{m s}^{-1}$) ou água AT ($19,8 \mu\text{m s}^{-1}$) apresentaram valores superiores as amostras ativadas com KCl ($14,9 \mu\text{m s}^{-1}$) ou CaCl_2 ($12,2 \mu\text{m s}^{-1}$) e não diferiram entre si (Figura 9).

Taxa de fertilização e eclosão utilizando o sêmen descongelado de grumatã

A fêmea liberou uma desova total pesando 26g, contendo 998 ovócitos g^{-1} e com coloração desejável, sem presença de grumos ou contaminação. Uma alíquota de sêmen descongelado de cada macho foi utilizada para garantir a proporção ideal entre os gametas de grumatã (Tabela 4).

A solução ativadora de glicose (18,19%) proporcionou a maior taxa de fertilização ($p<0,05$), com sêmen congelado, em relação as demais soluções ativadoras. A solução ativadora água OR (8,94%) não se diferiu estatisticamente da solução de glicose e nem das demais soluções que proporcionaram taxas de fertilização baixas (Figura 10 – a).

O ativador água OR (69,15%) proporcionou taxa superior ($p<0,05$) ao NaCl (10,71%), as demais soluções não se diferiram estatisticamente dos dois ativadores ($p>0,05$) (Figura 10 – b).

Discussão

No presente estudo, às características seminais como volume, osmolaridade, motilidade e concentração espermática são condizentes aos valores observados para as duas espécies estudadas. O gênero *Brycon* é conhecida por apresentar relativamente altos volumes seminais e baixas concentrações espermáticas, enquanto o gênero *Prochilodus*, é conhecido por apresentar baixo volume seminal e altas concentrações espermáticas.

O volume médio de sêmen coletado nos *B. orbignyanus* foram condizentes ao volume médio coletado em *B. orbignyanus*, por Maria et al. (2006), em torno de 10 mL. O mesmo foi observado para *P. vimboides*, ou seja, o volume médio coletado nos reprodutores foram semelhante ao observado por Oliveira (2015) em seus estudos com *P. vimboides* ($1,4 \pm 0,7$ mL).

A concentração espermática observada para *B. orbignyanus* foi próxima aquela observada por Di Chiacchio et al. (2017), para a mesma espécie ($5,7 \pm 3,4 \times 10^9$ espermatozoides mL⁻¹), porém pouco inferior a encontrada por Felizardo et al. (2010) ($10,4 \times 10^9$ espermatozoides mL⁻¹). Para a *P. vimboides*, a concentração espermática foi semelhante àquela observada por Oliveira (2015) ($27,1 \pm 15,1 \times 10^9$ espermatozoides mL⁻¹) trabalhando com a mesma espécie.

A concentração osmolar do plasma seminal das espécies em estudo estão dentro dos valores médios encontrados para peixes de água doce (230 – 400 mOsm kg⁻¹) (Viveiros, et al., 2011; Martínez; Atencio; Pardo, 2011; Bernardes Júnior et al., 2018; Rashid, et al., 2018). Em *B. orbignyanus* osmolaridade observada foi de 380 ± 7 mOsm kg⁻¹, média superior a observada, para a mesma espécie, por Gonçalves et al. (2013) (301 ± 11 mOsm kg⁻¹). Para *P. vimboides*, a osmolalidade média do plasma seminal foi de 344 ± 16 mOsm kg⁻¹, sendo semelhante as médias observadas no plasma seminal de *P. lineatus* por Gonçalves et al. (2013) (337 ± 8 mOsm kg⁻¹) e superior àquela observada por Viveiros et al., (2016a) (291 ± 8 mOsm kg⁻¹) também em *P. lineatus*.

O número médio de ovócitos g⁻¹ da desova das fêmeas de *B. orbignyanus* foi de 1005 ovócitos, valor semelhante ao encontrado por Felizado et al. (2010) que foi de 1000 ovócitos. O número médio de ovócitos g⁻¹ da desova encontrado em *P. vimboides*, 850 ovócitos, foi inferior ao número médio de ovócitos g⁻¹ da desova encontrado por Viveiros et al. (2008) em *P. lineatus* que foi de 1166 ovócitos.

As variações entre as características dos gametas podem acontecer entre e dentro de uma mesma espécie (Alavi e Cosson, 2005; Alavi e Cosson, 2006; Alavi et al., 2007).

Em peixes, os espermatozoides permanecem imóveis em contato com o plasma seminal dentro dos testículos (Morisawa; Suzuki, 1980), sendo que a constituição do plasma exerce

importantes funções fisiológicas, dentre elas a sobrevivência e a ativação espermática (Alavi e Cosson, 2006). A concentração de íons Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} e Cl^- controlam o balanço osmótico interno mantendo a imobilidade dos espermatozoides (Ciereszko, et al., 2011). Na maioria das espécies, exceto os salmonídeos e esturjões, a motilidade é ativada pela queda da osmolalidade extracelular (Cosson, 2010). A bioquímica da ativação espermática de espécies neotropicais importantes comercialmente é pouco conhecida. Neste estudo foi constatado que os íons Na^+ e K^+ são os mais abundantes no plasma seminal de *B. orbignyanus* e *P. vimbooides* assim como em outras espécies de teleósteos (Morisawa, et al., 1983; Hatef, et al., 2007; Zucarelli, et al., 2007; Rashid, et al., 2018). A concentração do íon Ca^{2+} no plasma seminal de *B. orbignyanus* e *P. vimbooides* (22,92 mM; 7,04 mM) foram maiores que as observadas para salmonídeos (0,3 – 2,6 mM L⁻¹; Billard, et al., 1995a,b) e menores que as encontradas em ciprinídeos (43,5 mM L⁻¹; Krasznai, et al., 2003b). Uma justificativa para esse comportamento é que a concentração iônica do plasma seminal é espécie e intra-específica (Alavi, et al., 2007).

Todas as soluções ativadoras, com ou sem a presença de íons, ativaram a motilidade do sêmen fresco e criopreservado das duas espécies, como foi observado em *Brycon. orbignyanus* e *Prochilodus. lineatus* (Gonçalves, et al., 2013; Viveiros et al., 2016a). Isso mostra que ambas as espécies têm seus espermatozoides ativados pelo choque hiposmótico, quando entram em contato com o meio aquoso hipotônico em relação ao plasma seminal (Alavi e Cosson, 2006). Alguns trabalhos mostram que não há diferença na qualidade seminal utilizando os ativadores com ou sem íons em uma mesma osmolalidade (Orfão, et al., 2011; Gonçalves, et al., 2013; Viveiros, et al., 2016). Porém o resultado do presente estudo evidencia que a composição do ativador pode alterar os parâmetros da qualidade seminal (motilidade, duração e velocidades) das duas espécies no sêmen fresco, descongelado e conseqüentemente na taxa de fertilização. Essa diferença pode ser explicada pelas diferentes composições do plasma seminal, principalmente a concentração de K^+ , Na^+ e Ca^{2+} (Dumorné, et al., 2017).

Nas duas espécies, as amostras de sêmen descongeladas obtiveram qualidade inferior às amostras frescas, e observou-se que os mesmos ativadores tiveram comportamentos diferentes na ativação do sêmen fresco e criopreservado. Isso pode ser explicado pelo processo de congelamento e descongelamento dos espermatozoides que causam danos às células espermáticas, possivelmente alterando as funções dos canais iônicos e/ou a permeabilidade da membrana (Viveiros, et al., 2016). Assim o uso de ativadores que promovem a melhoria da qualidade espermática na fertilização artificial é de suma importância.

Para *B. orbignyanus* as soluções ativadoras KCl (K^+), NaCl (Na^+) promoveram bons resultados sobre a qualidade espermática. O mesmo foi observado no sêmen criopreservado de

Brycon insignis ativado pelas soluções NaCl e NaHCO₃ (Viveiros, et al., 2011), em *B. orthotaenia* (Melo e Godinho 2006), *Leporinus obtusidens* (Taitson et al., 2008) e outras espécies. O uso da solução ativadora KCl, para ordem characiformes, somente foi reportada em sêmen congelado de *B. insignis* (Motta, 2016). Entretanto, já foi reportado em outras ordens como nos cypriniformes *Barbus barbus* (Alavi et al., 2009a), *Cyprinus carpio* (Khara et al., 2014) e nos perciformes *Perca fluviatilis* (Alavi et al., 2007). O sêmen de *B. orbignyanus* quando ativado por KCl obteve motilidade e velocidades similares quando ativado por NaCl ou pelos ativadores sem íons. Possivelmente, os espermatozoides dessa espécie não dependem da presença de Na⁺ ou K⁺ para ativação de sua motilidade, diferentemente dos salmonídeos e acipensiformes os quais o íon K⁺ é a chave para a ativação da motilidade dos espermatozoides (Alavi e Cosson, 2006). Para *P. vimboides* os resultados utilizando KCl foram inferiores aos utilizando NaCl como solução ativadora. Isso sugere que a composição da solução ativadora influencia na bomba sódio e potássio (Alavi e Cosson, 2006), mas como o sêmen foi ativado por todas as demais soluções, assim como na *B. orbignyanus*, os íons não são a chave para a ativação espermática em *P. vimboides*.

No presente estudo as amostras de sêmen ativadas pelas soluções de CaCl₂ (*B. orbignyanus* – 22,21 mM; *P. vimboides* – 13,14 mM) apresentaram as mais baixas taxas motilidade, duração da motilidade, velocidades e taxa de fertilização para ambas as espécies quando comparadas às outras soluções ativadoras. Resultado semelhante foi observado em estudo com *C. carpio*, onde a menor percentagem média de espermatozoides móveis ocorreu quando o sêmen foi ativado com solução a base de Ca²⁺, na concentração de 3,5 mM Ca²⁺. (Khara et al., 2014). Em outro estudo com *C. elongatus*, as soluções ativadoras contendo de 0 a 5 mM Ca²⁺ não afetaram a percentagem de espermatozoides móveis, porém quando utilizaram soluções contendo de 1 a 5 mM Ca²⁺ observaram as mais altas velocidades espermáticas (Butts, et al., 2013). Possivelmente os resultados observados com o ativador CaCl₂ pode ser explicado pela formação de aglutinações, comportamento esse recorrente após o uso dessa solução ativadora, que tem como consequência a queda acentuada da motilidade e das velocidades espermáticas. Essa formação de aglutinações pode ter sido causada pela alta concentração de Ca²⁺ presente na solução, assim como foi observado para *P. javanicus* (Morita et al., 2006). As amostras de sêmen ativadas por CaCl₂ (150 mOsm kg⁻¹) também obtiveram as piores taxas de fertilização, possivelmente pela baixa qualidade espermática provocada pelos íons Ca²⁺ e possivelmente por causar aglutinações nos espermatozoides.

A solução a base de glicose utilizada nesse estudo apresentou baixas concentrações de Na⁺, K⁺, Ca²⁺ e Mg²⁺, o mesmo aconteceu para as águas OR e do tanque, assim foram

consideradas soluções não-iônicas. As soluções não-iônicas ativaram todas as amostras de sêmen em ambas as espécies e proporcionaram melhores resultados que as soluções ativadoras iônicas em relação as taxas de fertilização e eclosão das amostras de sêmen criopreservado de *B. orbignyana*, e para o sêmen fresco e criopreservado de *P. vimboides*. Tal comportamento sugere uma interação entre a concentração iônica e a fisiologia dos ovócitos. A utilização de ativadores à base de açúcares como glicose, sacarose e manitol já foram reportadas em *B. orbignyana* e *P. lineatus* (Gonçalves et al., 2013), *E. lucius* (Alavi et al., 2009b) e *C. elongatus* (Butts et al., 2013). A motilidade espermática quando ativada em baixas osmolalidades, como em água OR e água do tanque, tende a ter altas percentagens de motilidade por pouco tempo, como observado para as duas espécies em estudo. A exposição dos espermatozoides a meios com osmolalidade baixas pode danificar o flagelo, reduzindo o tempo de motilidade (Alavi et al., 2009b; 2010).

Outros autores conseguiram taxas de fertilização maiores que as encontradas no presente estudo. Em *B. orbignyana*, Felizardo et al. (2010) utilizando sêmen fresco conseguiu uma taxa de fertilização média de 57,76%. Em outro estudo utilizando sêmen criopreservado Maria et al. (2006) obteve uma taxa de fertilização média de 40%. No gênero *Prochilodus*, Viveiros et al. (2010) utilizando o sêmen fresco de *P. lineatus* observou uma taxa de fertilização de 62%, Miliorini (2006) obteve 40% de taxa de fertilização utilizando sêmen criopreservado de *P. lineatus*. No presente estudo para anular a influência da fêmea e evidenciar os resultados obtidos pelos ativadores, utilizou-se a desova de uma única reprodutora. Porém, os ovócitos dessa reprodutora disponível não apresentaram boa qualidade, assim resultando em baixos valores de taxas de fertilização e eclosão.

Conclusão

Para o sêmen fresco de *B.orbignyana*, somente a solução ativadora a base de cloreto de cálcio (150 mOsm kg⁻¹) não proporcionou boas taxas de qualidade espermática após ativação. Já para o sêmen criopreservado, as soluções ativadoras não-iônicas: glicose (150 mOsm kg⁻¹), água OR e água AT são as mais indicadas para se obter uma boa qualidade de ativação espermática e desejável taxa de fertilização e eclosão.

Em *P. vimboides*, a solução glicose (150 mOsm kg⁻¹) e a água OR são os ativadores mais indicados para o sêmen fresco e criopreservado visando obter a melhor qualidade seminal, melhor taxa de fertilização e eclosão de *P.vimboides*.

Conflito de interesses

Nós declaramos o atual e potencial não conflito de interesse a respeito da submissão do manuscrito.

Agradecimentos

A Capes, pela bolsa de estudos. Ao CNPq pelo apoio financeiro. A CEMIG e EPAMIG pelos animais e instalações.

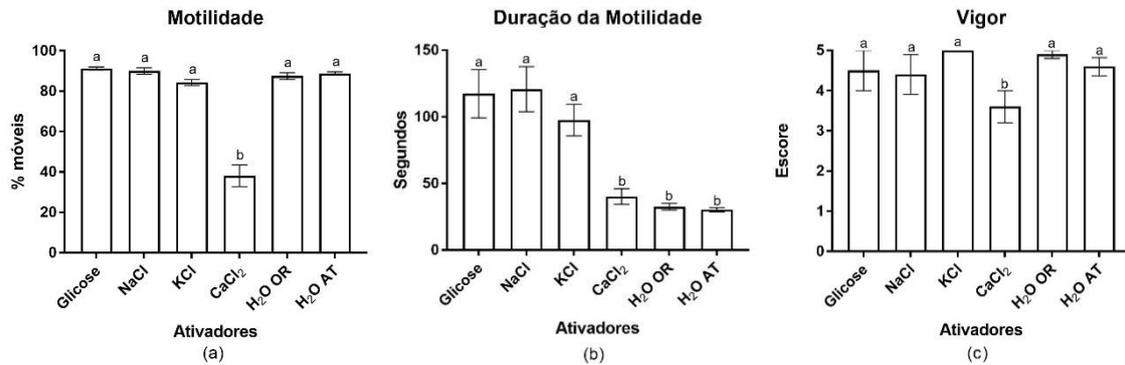
Tabela 1 – Concentração iônica (média \pm DP) das soluções ativadoras utilizadas para ativar o sêmen durante as análises da qualidade seminal, e na ativação dos gametas frescos e descongelados para fertilização. Concentração iônica média do plasma seminal dos machos (n=10) de piracanjuba.

Ativadores	Na⁺ mmol⁻¹	K⁺ mmol⁻¹	Ca²⁺ mmol⁻¹	Mg²⁺ mmol⁻¹
Água OR	4,70	8,58	0,37	0,744
Água Tanque	3,05	6,98	0,19	0,608
NaCl	46,41	7,00	0,23	0,742
CaCl ₂	5,19	6,99	22,21	0,750
KCl	2,93	80,71	0,17	0,724
Glicose	2,88	10,75	0,18	0,691
Média plasma seminal	38,01 \pm 3,58	33,43 \pm 2,38	22,92 \pm 2,73	0,77 \pm 0,05

Tabela 2 - Concentração iônica (média \pm DP) das soluções ativadoras utilizadas para ativar o sêmen durante as análises da qualidade seminal, e na ativação dos gametas frescos e descongelados para fertilização. Concentração iônica média do plasma seminal dos machos (n=10) de grumatã.

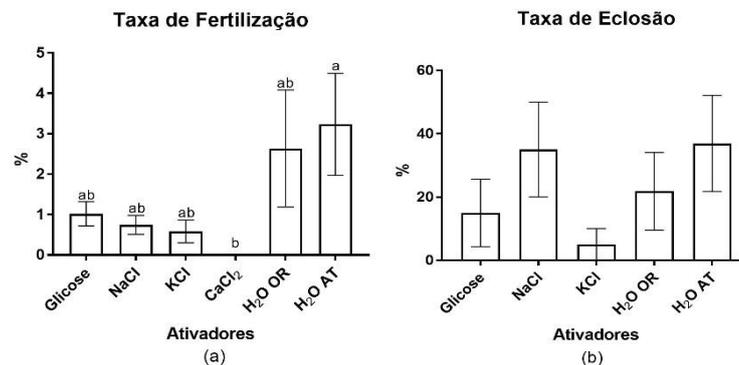
Ativadores	Na⁺ mmol⁻¹	K⁺ mmol⁻¹	Ca²⁺ mmol⁻¹	Mg²⁺ mmol⁻¹
Água OR	5,19	8,47	0,37	84,25
Água Tanque	5,65	7,03	0,15	61,14
NaCl	46,27	12,14	0,31	86,71
CaCl ₂	3,07	6,98	13,14	72,44
KCl	3,17	84,09	0,30	82,72
Glicose	3,23	7,31	0,54	80,28
Média plasma seminal	66,43 \pm 12,41	26,66 \pm 9,78	7,04 \pm 2,87	1,66 \pm 0,46

Figura 1- a, b, c. Avaliações (média \pm EP) subjetivas da motilidade (a), duração da motilidade (b) e vigor espermático (c) do sêmen fresco de *Brycon orbignyanus* ativado em diferentes soluções.



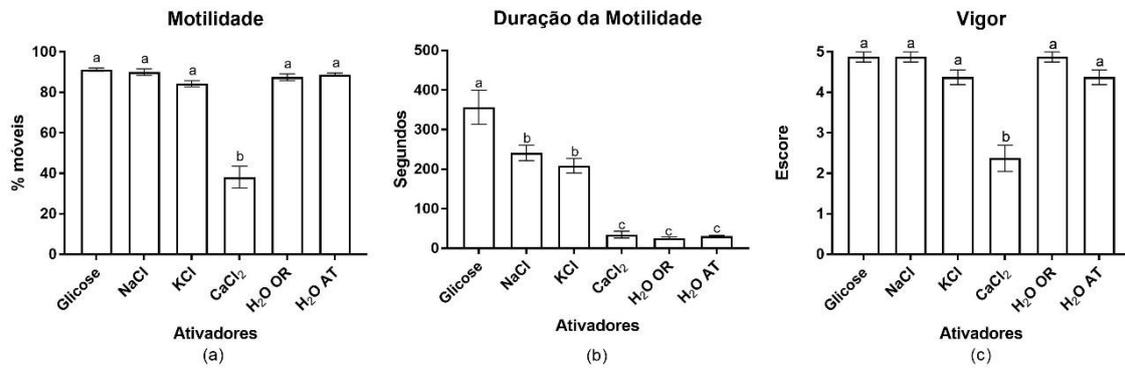
a,b,c As letras indicam as diferenças significativas obtidas através do teste de SNK ao nível de significância de 5%. O escore para o vigor foi de 1 a 5.

Figura 2 – Avaliação (média \pm EP) da taxa de fertilização (a) e eclosão (b) de ovócitos de *Brycon orbignyanus* fertilizados com sêmen fresco e ativado com diferentes soluções.



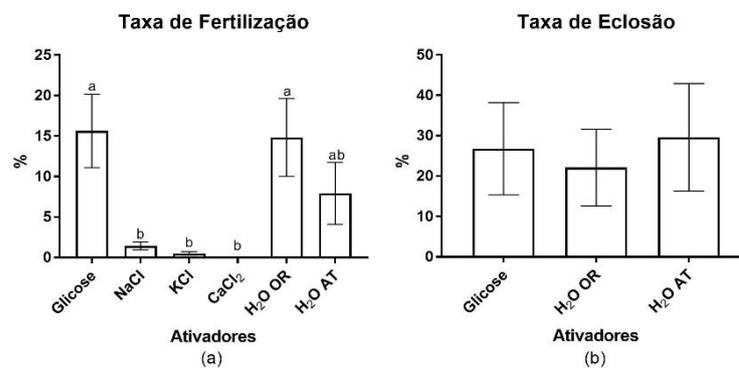
a,b As letras indicam as diferenças significativas obtidas através do teste de SNK ao nível de significância de 5%. A taxa de eclosão é sobre a porcentagem da taxa de fertilização.

Figura 3 – a, b, c. Avaliações (média \pm EP) subjetivas da motilidade (a), duração da motilidade (b) e vigor espermático (c) do sêmen fresco de *Prochilodus vimboides* ativados em diferentes soluções.



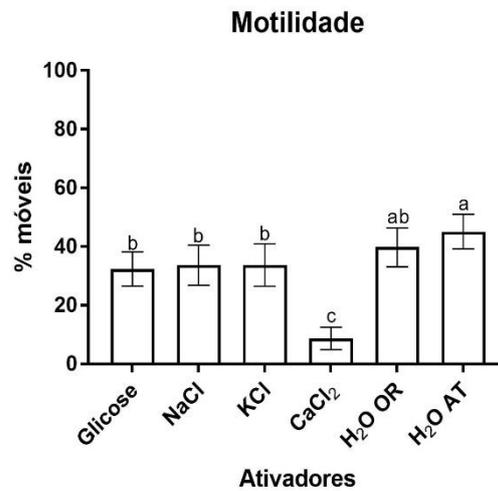
a,b,c: * indicam as diferenças significativas obtidas através do teste de SNK ao nível de significância de 5%. O escore para o vigor foi de 1 a 5.

Figura 4 – Avaliação (média \pm EP) da taxa de fertilização (a) e eclosão (b) de ovócitos de *Prochilodus vimboides* fertilizados com sêmen fresco e ativados com diferentes soluções.



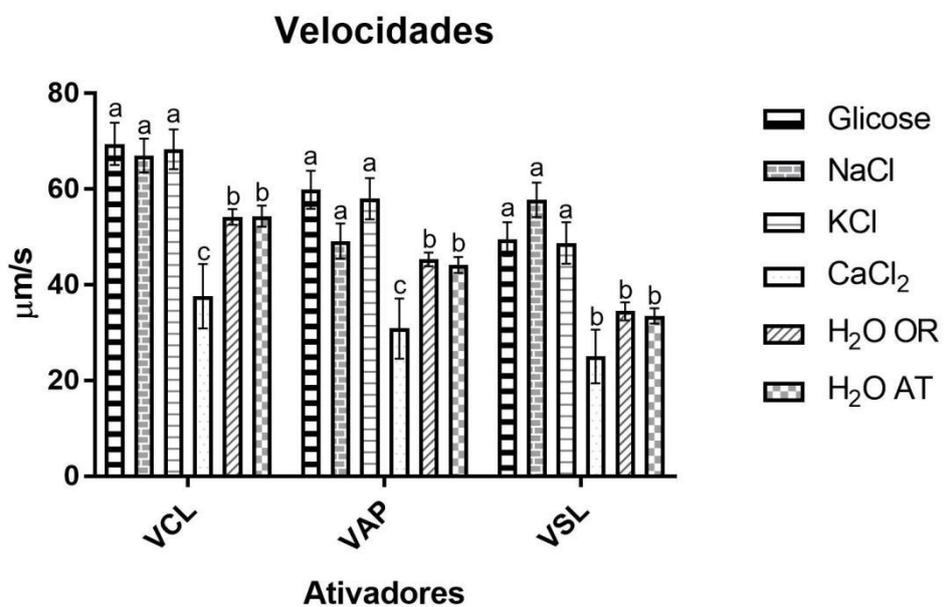
a,b,c As letras indicam as diferenças significativas obtidas através do teste de SNK ao nível de significância de 5%. A taxa de eclosão é sobre a porcentagem da taxa de fertilização.

Figura 5 – Motilidade espermática (média \pm EP) de *Brycon orbignyana*, descongeladas e ativadas com diferentes soluções.



* indica a diferença significativa obtida através do teste de SNK ao nível de significância de 5%.

Figura 6 – Velocidades espermáticas (média \pm EP) de *Brycon orbignyana*, amostras descongeladas e ativadas com diferentes soluções.

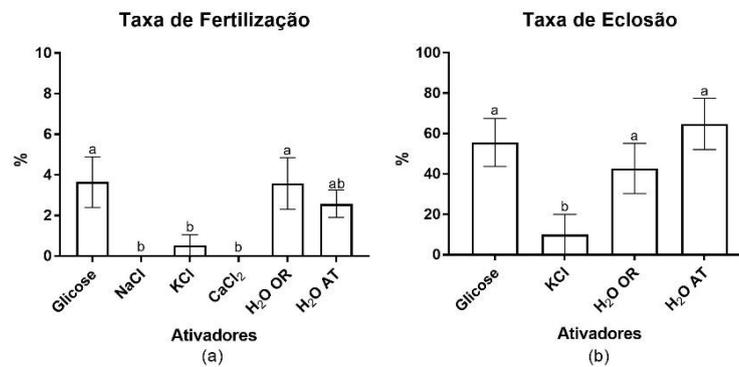


^{a,b,c} indicam as diferenças significativas obtidas através do teste de SNK ao nível de significância de 5%.

Tabela 3 – Volume de sêmen utilizados por macho, para garantir a relação ideal entre espermatozoides:ovócitos.

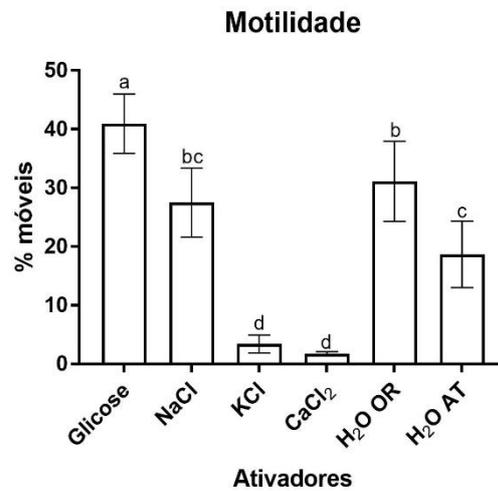
Machos	Volume de sêmen (mL)
1	1
2	1,5
3	1
4	2
5	1
6	0,5
7	1,5
8	0,5
9	1
10	1

Figura 7 –a, b. Taxa de fertilização (a) e eclosão (b) dos ovócitos (média \pm EP) de *Brycon orbignyanus* após o descongelamento e ativação do sêmen com diferentes soluções.



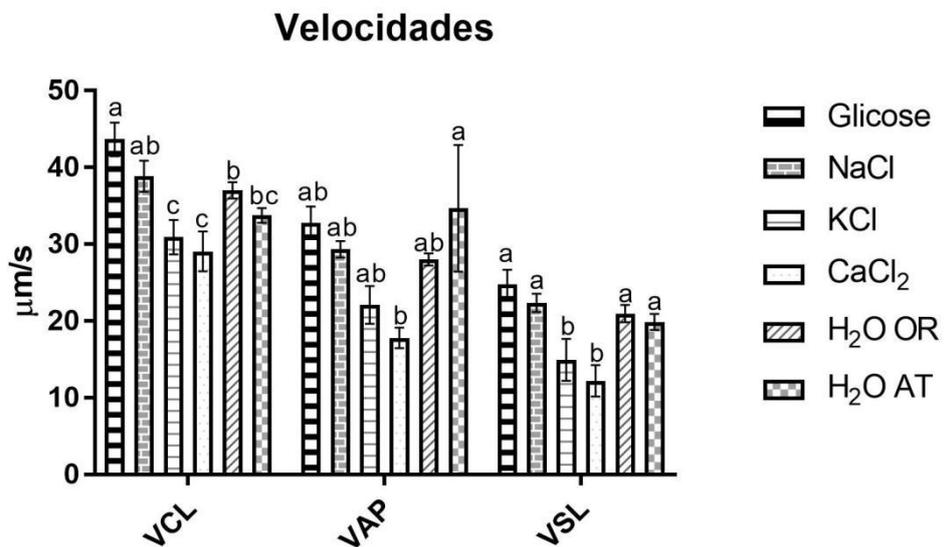
a,b e * indicam a diferença significativa obtida através do teste de SNK ao nível de significância de 5%.

Figura 8 – Taxa de motilidade (média \pm EP) *Prochilodus vimbooides* ativados com diferentes soluções após o descongelamento.



^{a,b,c} indicam a diferença significativa obtida através do teste de SNK ao nível de significância de 5%.

Figura 9 – Velocidades espermáticas (média \pm EP) de *Prochilodus vimbooides* ativadas em diferentes soluções após o descongelamento.

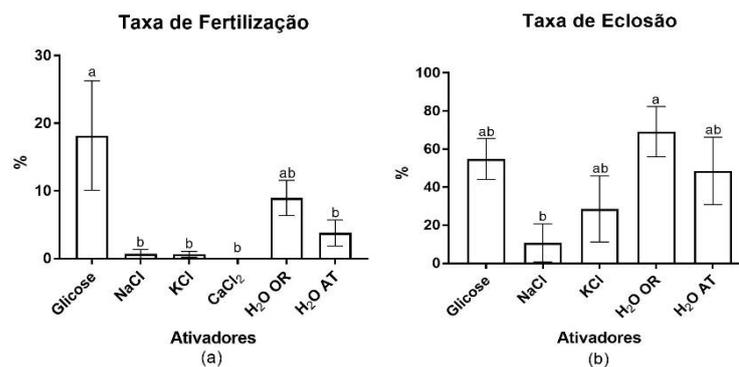


^{a,b,c,d} indicam a diferença significativa obtida através do teste de SNK ao nível de significância de 5%.

Tabela 4 – Volume de sêmen descongelado utilizado para garantir a proporção ideal entre os gametas *Prochilodus vimboides*.

Machos	Volume de sêmen (μL)
1	46,5
2	34,8
3	37,4
4	22,4
5	27,4
6	19
7	30,4
8	34

Figura 10 –a, b, c. Taxa de fertilização (a) e eclosão (b) dos ovócitos (média \pm EP) de *Prochilodus vimboides* após o descongelamento e ativação do sêmen com diferentes soluções.



a,b,c indicam a diferença significativa obtida através do teste de SNK ao nível de significância de 5%.

Referências

- Alavi, S. M. H., Cosson, J., 2005. Sperm motility in fishes. (I) Effects of temperature and pH: a review. *Cell biology internat.* 29, 101-110 doi: 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 biology internat.* 30, 1-14. doi: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, 2, 276–283. doi: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. doi: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. doi: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, 2, 317-325. doi:10.1016/j.theriogenology.2010.02.017.
- Antunes, R. S. P., Gomes, V. N., Prioli S. M. A. P., Prioli, R. A., Julio, H. F., Prioli, L. M., Agostinho, C.S., Prioli, A. J., 2010. Molecular characterization and phylogenetic relationships among species of the genus *Brycon* (characiformes: characidae) from four hydrographic basins in Brazil. *Genet Mol Res.* 9:674-684.
- Ashikaga, F.Y., Orsi, M. L., Oliveira, C., Senhorini, J. A., Foresti, F. 2015. The endangered species *Brycon orbignyanus*: genetic analysis and definition of priority areas for conservation. *Environ Biol Fishes.* 98:1845-1855
- Bernardes Júnior, J. J., Jimenez, E. J., Bombardelli, R. A., Nuñez, A. P. O., 2018. Changes in external osmolality and ionic composition affect *Megaloporus obtusidens* sperm motility. *Animal Reproduction Science*, 190, 63-74. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.01.008>
- Billard, R, Cosson, J, Crim LW, Suquet M., 1995a. Sperm physiology and quality. In: Bromage NR, Roberts RJ, editors. Brood stock management and egg and larval quality. Blackwell Science, 22-52
- Billard R, Cosson J, Perchec G, Linhart O., 1995b. Biology of sperm and artificial reproduction

in carp. *Aquaculture*;124, 95-112.

BLOM, E. A., 1950. One-minute live-dead sperm stain by means of Eosin-Nigrosin. *Fertility and Sterility*, 1: 176-177.

Borba, M. R., Fracalossi, D. M., Pezzato, L. E. 2006. Dietary energy requirement of piracanjuba fingerlings, *Brycon orbignyanus*, and relative utilization of dietary carbohydrate and lipid. *Aquac Nutr.* 12:183-191

BUTTS, I. A. E., 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 elongatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 166, 1, 147-157.

Castro, R. M. C., Vari, R., 2004 *Detritivores of the South American fish family Prochilodontidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes): a phylogenetic and revisionary study (Smithsonian Contributions to Zoology)*. New York: Smithsonian Books.

CBRA, 1998. *Manual Para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal*. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, Belo Horizonte.

Ciereszko, A., Glogowski, J., Dabrowski, K., 2011. Biochemical characteristics of seminal plasma and spermatozoa of freshwater fishes. In: Tiersch, T.R., Green, C.C (Eds.), *Cryopreservation in Aquatic Species*. World Aquaculture Society, 46-79.

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

Dumorné, K., Figueroa, E., Cosson, J., Lee-Estevez, M., Ulloa-Rodríguez, P., Valdebenito, I., Farías, J.G., 2017. Protein phosphorylation and ion effects on salmonid sperm motility activation. *Rev. Aquacult.* <http://dx.doi.org/10.1111/raq.12198>. (in press).

Dzyuba, V., Cosson, J., 2014. Motility of fish spermatozoa: from external signaling to flagella response. *Reproductive Biology*, 14, 3, 165-175. <http://dx.doi.org/10.1016/j.repbio.2013.12.005>

FAO.2018 *The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the Sustainable Development Goals*. Rome.

Felizardo, V. O., Murgas, L. D. S., Drumond, M. M., Silva, J. A., 2010. Dose inseminante utilizada na fertilização artificial de ovócito de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). *Revista Ceres*, 57, 648-652.

- Gomes, R. Z., Sato, Y., Rizzo, E., Bazolli, N., 2011. Early development of *Brycon orthotaenia* (Pisces: Characidae). *Zygote*, 21, 11-20. doi:10.1017/S0967199411000311
- 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*. *Animal Reproduction*, 10, 1, 62-70.
- Hatef, A., Niksirat, H., Amiri, B. M., Alavi, S. M. H.; Karam, M., 2007. Sperm density, seminal plasma composition and their physiological relationship in the endangered Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*). *Aquacult Res*, 38, 1175–1181. doi:10.1111/j.1365-2109.2007.01784.x.
- Kavamoto, E., Fogli da Silveira, W., 1986. Características físicas, químicas e microscópicas do sêmen do bagre, *Rhamdia hilarii*. *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 13, p. 95-100.
- 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. *Kerala*, 61, 3, 63-68.
- Krasznai, Z., Márián, T., Izumi, H., Damjanovich, S., Balkay, L., Trón, L., Morisawa, M. 2000. 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*. 97, 5, 2052-2057. www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.040558097.
- Krasznai, Z., Morisawa, M., Morisawa, S., Krasznai, Z., Trón, L., Gáspár, R., Márián, T., 2003. Role of ion channels and membrane potential in the initiation of carp sperm motility. *Aquatic Living Resources*, 16, 5, 445-449. doi:10.1016/S0990-7440(03)00054-8.
- Lima, F.C. 2017. A revision of the cis-andean species of thegenus *Brycon* Muller & Troschel (characiformes: characidae). *Zootaxa*. 4222:1–189
- Linhart, O., Cosson, J., Mims, S.D., Rodina, M., Gela, D., Shelton, W. L. 2003. Effects of ions on the motility of fresh and demembrated spermatozoa of common carp (*Cyprinus carpio*) and paddlefish (*Polyodon spathula*). *Fish Physiology and Biochemistry*. 28, 203-205.
- Lowe-McConnell, R. H., 1999. *Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Tropicais [Ecological Studies on Tropical Fish Communities]*. São Paulo: EDUSP
- Maria, A. N., Viveiros, A. T. M., Freitas, R. T. F., Oliveira, A. V., 2006. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. *Aquaculture*, 260, 1/4, 298-306. doi:10.1016/j.aquaculture.2006.06.011.

- Martínez, G., Atencio, V., Pardo, S. 2011. Effect of glucose concentration on sperm motility activation in bocachico *Prochilodus magdalenae* (Pisces, Characiformes). *Revista MVZ Córdoba*, 16, 2, 2554-2563.
- Melo, F. C. S. A., Godinho, H. P. 2006. A protocol for cryopreservation of spermatozoa of the fish *Brycon orthotaenia*. *Animal Reproduction*, 3, 3, 380-385.
- Miliorini, A. B. 2006. Ativadores e concentrações de metanol e dimetilsofóxido na qualidade do semen criopreservado de curimba (*Prochilodus lineatus*). Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Lavras
- Morisawa, M.; Suzuki, K., 1980. Osmolality and potassium ion: their roles in initiation of sperm motility in teleosts. *Science*, Washington, 210, 4474, 1145-1147.
- Morisawa, M., Suzuki, K., Shimizu, H., Morisawa, S., Yasuda, K., 1983. Effects of osmolality and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes. *Journal Biology*, 107, p. 95-103.
- Morisawa, M., 2008. Adaptation and strategy for fertilization in the sperm of teleost fish. *J. Appl. Ichthyol.* 24, 362–370.
- 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/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*, 143, 361-367. doi:10.1016/j.cbpa.2005.12.020.
- Motta, N. C., 2016. Osmolalidades das soluções ativadoras com ou sem íons na ativação da motilidade do semen criopreservado de piabanha *Brycon insignis* (Characiformes). Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Lavras.
- Murgas, L.D.S.; Franciscatto, R. T.; Santos, A. G. O., 2003. Avaliação espermática pós-descongelamento em piracanjuba (*Brycon orbignyanus*, Valenciennes, 1849). *Revista Brasileira de Zootecnia* 32, 62, 1810-1814.
- R Core Team, 2015. R: A language and environment for statistical computing. Version 3.3.2. R Foundation for Statistical Computing.
- Rashid, I., Hossain, S. M., Salam, M. A., Rafiquzzaman, S. M., 2018 Evaluation of seminal plasma composition and spermatozoa quality parameters of silver barb, *Barbonymus gonionotus* Bleeker, 1850. *Fish Physiology and Biochemistry*. 1-10. <https://doi.org/10.1007/s10695-018-0539-4>
- Reis, R. E., Kullander, S. O., Ferraris, C.J., 2003. Checklist of the freshwater fishes of South and Central America. PortoAlegre: Edipucrs.
- Oliveira, A. V., 2015. Avaliação de técnicas de conservação de sêmen de *Prochilodus vimboides* e *Prochilodus lineatus*. Tese de doutorado. Universidade Federal de Viçosa.

- Orfão, L.H., Nascimento, A.F., Corrêa, F.M., Cosson, J., Viveiros, A.T.M., 2011. Extender composition, osmolality and cryoprotectant effects on the motility of sperm in the Brazilian endangered species *Brycon opalinus* (Characiformes). *Aquaculture* 311, 241–247. doi:10.1016/j.aquaculture.2010.11.041
- Prokopchuk, G., Dzyuba, B., Rodina, M., Cosson, J., 2016. Control of sturgeon sperm motility: antagonism between K⁺ ions concentration and osmolality. *Anim. Reprod. Sci.* 164, 82–89. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.11.015>
- Shimoda, E., Andrade, D. R., Vidal Júnior, M. 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, 315, 430-433.
- Souza, B. E., Sanches, E. A., Baggio, D. M., Romagosa, E. A.; Piana, P. A., Vidal, E., 2007. Interação entre a relação de espermatozoide.ovócito⁻¹ e o volume de água empregados na fertilização artificial de ovócitos de curimbatá (*Prochilodus lineatus*) In: 1º Congresso Brasileiro de Produção de Peixes Nativos de Água Doce e 1º Encontro de Piscicultores de Mato Grosso do Sul, 2007, Dourados-MS. Anais do 1º Congresso Brasileiro de Produção de Peixes Nativos de Água Doce e 1º Encontro de Piscicultores de Mato Grosso do Sul
- Souza, G., Melo, E. J. T., Caramashi, E. P., Andrade, D. R., Monteiro, L. R., 2015. Early development and allometric growth patterns of the grumetã (*Prochilodus vimboides* Kner, 1859). *Zygote*. 24, 428-441. doi:10.1017/S0967199415000350
- 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. *Animal Reproduction Science*, 105, 3, 283-291. doi:10.1016/j.anireprosci.2007.03.009
- Viveiros, A. T. M., Orfão, L. H., Maria, A. N., Allaman, I. B., 2008. A simple, inexpensive and successful freezing method for curimba *Prochilodus lineatus* (Characiformes) semen. *Animal Reprod. Science*, 112, 293-300. doi:10.1016/j.anireprosci.2008.04.025.
- Viveiros, A. T. M., Nascimento, A. F., Orfão, L. H., Isaú, Z. A., 2010. Motility and fertility of the subtropical freshwater fish streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) sperm cryopreserved in powdered coconut water. *Theriogenology*. 74, 551-556. doi:10.1016/j.theriogenology.2010.03.018
- 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. *Aquaculture Research*, 42, 6, 858-865. doi:10.1111/j.1365-2109.2010.02761.x

Viveiros, A. T. M., Isaú, Z. A., Canappele, 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, 4, 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. 2016a Osmolality and composition of the activating solution affects motility of fresh and frozen *Prochilodus lineatus* sperm differently. *Animal Reproduction Science*, 173, 73-79. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.08.014>.

Zuccarelli, M. D. Jensen, N., Ingermann, R. L., 2007. Inhibitory effect of osmotic concentration, potassium and pH on motility of the sperm of the North American burbot *Lota lota maculosa*. *Journal Fish Biology*, 70, 178–189. doi:10.1111/j.1095-8649.2006.01293.x.