



ISABELA MARTINS DI CHIACCHIO

**QUALIDADE DO SÊMEN E SUA
CONGELABILIDADE AO LONGO DA
ESTAÇÃO REPRODUTIVA EM *Prochilodus
lineatus* E *Brycon orbignyanus***

LAVRAS - MG

2016

ISABELA MARTINS DI CHIACCHIO

**QUALIDADE DO SÊMEN E SUA CONGELABILIDADE AO LONGO
DA ESTAÇÃO REPRODUTIVA EM *Prochilodus lineatus* E *Brycon
orbignyanus***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Dra. Priscila Vieira e Rosa

Coorientadora

Dra. Ana Tereza de Mendonça Viveiros

LAVRAS - MG

2016

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

Di Chiacchio, Isabela Martins.

Qualidade do sêmen e sua congelabilidade ao longo da estação reprodutiva em *Prochilodus lineatus* e *Brycon orbignyanus* / Isabela Martins Di Chiacchio. – Lavras: UFLA, 2016.

58 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico) – Universidade Federal de Lavras, 2016.

Orientadora: Priscila Vieira e Rosa.

Bibliografia.

1. CASA. 2. Criopreservação. 3. Espermatozoide. 4. Peixe neotropical. 5. Reprodução. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

ISABELA MARTINS DI CHIACCHIO

**QUALIDADE DO SÊMEN E SUA CONGELABILIDADE AO LONGO
DA ESTAÇÃO REPRODUTIVA EM *Prochilodus lineatus* E *Brycon
orbignyanus***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 17 de agosto de 2016.

Dra. Ana Tereza de Mendonça Viveiros UFLA

Dr. João Bosco Barreto Filho UFLA

Dr. Marcelo de Castro Leal Universidade Nilton Lins

Dra. Priscila Vieira e Rosa

Orientadora

LAVRAS - MG

2016

*Aos meus amados pais Jorge e Suleide,
Às queridas irmãs Camila e Caroline,
Ao meu amor Ricardo,*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre ilumina o meu caminho.

Aos meus pais, Jorge e Suleide, por todo carinho, orações, torcida e por sempre acreditarem em mim.

Às minhas irmãs, Caroline e Camila, que sempre estiveram e estarão ao meu lado em todos os momentos.

Ao meu maior companheiro, Ricardo, por todo amor, carinho e compreensão.

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade de realização do Mestrado em Zootecnia.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia pelo aprendizado. Em especial agradeço a minha professora e orientadora Ana Tereza de Mendonça Viveiros, pela dedicação, paciência, conselhos, disposição e atenção durante a orientação deste trabalho.

À professora Priscila Vieira Rosa por me acolher, aconselhar e ajudar sempre que possível.

Aos membros da banca examinadora, Prof. João Bosco Barreto Filho e Dr. Marcelo de Castro Leal, pela disponibilidade e contribuições.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro com a bolsa de estudos.

À CEMIG cujo apoio foi essencial para que esse trabalho se concretizasse.

A todos os meus amigos, em especial aos amigos do Laboratório de Tecnologia de Sêmen: Pollyana, Isabelle Matioli, Nayara, Thales, e com agradecimento especial para Izabella Luiza, que teve participação ativa e imprescindível para realização desse trabalho.

Aos animais, pela compreensão e doação.

MUITO OBRIGADA

RESUMO

Este estudo foi realizado com o objetivo de determinar a qualidade do sêmen fresco e congelado avaliado ao longo de duas piracemas (2013-2014; 2014-2015) em *Prochilodus lineatus* e *Brycon orbignyanus*. Cada uma das piracemas foi dividida em dois períodos: de novembro até dezembro e de janeiro até fevereiro. O sêmen dos machos foi coletado após tratamento com extrato de hipófise de carpa. A taxa de motilidade, velocidades (curvilínea = VCL; linear progressiva = VSL; média = VAP) e frequência do batimento flagelar (BCF) do sêmen fresco foram determinadas utilizando o sistema computadorizado de análise de sêmen (CASA). O sêmen de cada espécie foi congelado utilizando metilglicol como crioprotetor e uma solução de glicose para *P. lineatus*, e uma solução de NaCl para *B. orbignyanus* como diluidores. O sêmen diluído foi envasado em palhetas de 0,25 mL, congelado em botijão de vapor de nitrogênio (dry shipper) e armazenado em botijão de nitrogênio líquido. Após seis meses, as palhetas foram descongeladas em banho-maria a 60°C por 3 segundos e a qualidade espermática foi determinada como descrito para o sêmen fresco. Não foram observadas diferenças significativas em todos os parâmetros do sêmen fresco e congelado entre as duas piracemas e ao longo de cada piracema em *P. lineatus* e em *B. orbignyanus*. A taxa de motilidade e velocidades, mas não o BCF, foram sempre maiores no sêmen fresco quando comparado ao congelado. Comparando as duas espécies, uma maior motilidade no sêmen congelado e uma maior VCL e VAP no sêmen fresco e congelado foram observadas em *P. lineatus*, enquanto uma maior VSL no sêmen fresco e um maior BCF no sêmen fresco e congelado foram observados em *B. orbignyanus*. A qualidade espermática e a congelabilidade do sêmen em ambas as espécies foram sustentadas ao longo dos períodos reprodutivos e, dessa forma, produtores de peixes podem reproduzir essas espécies e congelar o sêmen em qualquer momento ao longo do período reprodutivo. O sêmen de *P. lineatus* é mais resistente ao processo de criopreservação que o de *B. orbignyanus*.

Palavras-chave: CASA. Criopreservação. Espermatozoide. Peixe neotropical. Reprodução.

ABSTRACT

The aim of this study was to determine fresh and frozen sperm quality over two spawning seasons (2013-2014; 2014-2015) in *Prochilodus lineatus* and *Brycon orbignyanus*. The spawning seasons were divided into two periods: November to December and January to February. Males were hand-stripped after carp pituitary treatment. Fresh sperm motility rate, velocities (curvilinear = VCL; straight-line = VSL; average path = VAP), and beat cross frequency (BCF) were determined using a Computer-Assisted Sperm Analyzer (CASA). Sperm of each species was frozen using methyl glycol as cryoprotectant and a glucose solution for *P. lineatus* and a NaCl solution for *B. orbignyanus* were used as extenders. Diluted sperm was loaded into 0.25 mL straws, then frozen in a nitrogen vapor vessel (dry shipper) and stored in a liquid nitrogen vessel. Six months later, straws were thawed in a water bath at 60°C for 3 s and sperm quality was determined, as described for fresh sperm. No significant difference was observed for any of the fresh and frozen sperm features between or over the two spawning seasons for *P. lineatus* and *B. orbignyanus*. Motility rate and velocities, but not BCF, were always higher in fresh sperm when compared with frozen sperm. Comparing both species, higher motility in frozen sperm and higher VCL and VAP in both fresh and frozen sperm were observed in *P. lineatus*, while higher VSL in fresh sperm and higher BCF in fresh and frozen sperm were observed in *B. orbignyanus*. Sperm quality and its freezing ability remained over the spawning season for both species and thus fish farmers can reproduce these species and freeze their sperm at any time throughout the spawning season. *P. lineatus* sperm is more resistant to the cryopreservation process than *B. orbignyanus*.

Keywords: CASA. Cryopreservation. Neotropical fish. Reproduction. Spermatozoon.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

- Figura 1 - Exemplar de curimba *Prochilodus lineatus*..... 16
- Figura 2 - Exemplar de piracanjuba *Brycon orbignyanus*..... 18
- Figura 3 - Produção de gametas regulada pela produção hormonal através de estímulos ambientais.....21
- Figura 4 - Sistema Computadorizado de Análise do Sêmen (CASA).....26
- Figura 5 - Representação esquemática das velocidades espermáticas curvilínea (VCL), linear progressiva (VSL) e média (VAP), mensuradas pelo CASA.....27

SEGUNDA PARTE

- Figure 1 - Number of sperm donors of *Prochilodus lineatus* (top) and *Brycon orbignyanus* (bottom) and date of sperm collection carried out on spawning seasons 2013-2014 (black columns) and 2014-2015 (white columns). The spawning seasons were divided into first (November and December) and second period (January and February).42
- Figure 2 - Motility rate of fresh and frozen sperm evaluated during the spawning season of *Prochilodus lineatus* and *Brycon orbignyanus*. The spawning season was divided into first (November and December) and second period (January and February). Each column (black for fresh and white for frozen samples) and error bar represents mean \pm SD. ^{a,b}Means within the same period followed by different superscript differ (ANOVA; $P < 0.05$). Motility rate within the same type of sperm (fresh or frozen) was not affected by spawning period ($P > 0.05$).....46
- Figure 3 - Curvilinear velocity (a) and straight-line velocity (b) of fresh and frozen sperm evaluated during the spawning season of *Prochilodus lineatus* and *Brycon orbignyanus*. The spawning season was divided into first (November and December) and second period (January and February). Each column (black for fresh and white for frozen samples) and error bar represents mean \pm SD. ^{a,b}Means within the same period followed by different superscript differ ($P < 0.05$; Tukey). VCL and VSL within the same type of sperm (fresh or frozen) were not affected by spawning period ($P > 0.05$)47
- Figure 4 - Sperm motility (top), sperm curvilinear velocity (VCL) and straight-line velocity (VSL) (bottom) of fresh and frozen sperm of *P. lineatus* (black columns) compared to *B. orbignyanus* (white

columns). Each column and error bar represents mean \pm SD.
^{a,b}Means within fresh and frozen columns followed by different
superscript differ (P<0.05).....49

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	11
1	INTRODUÇÃO	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1	Aquicultura mundial e no Brasil	13
2.2	Caracterização das espécies	14
2.2.1	Curimba <i>Prochilodus lineatus</i>	15
2.2.2	Piracanjuba <i>Brycon orbignyanus</i>	17
2.3	Reprodução dos peixes e o ciclo reprodutivo	19
2.4	Variações na qualidade dos gametas	22
2.5	Sistema Computadorizado de Análise de Sêmen (CASA)	24
2.6	Conservação de sêmen de peixes	28
2.7	Criopreservação de sêmen de peixes	29
	REFERÊNCIAS	31
	SEGUNDA PARTE – ARTIGO	37
	ARTIGO 1 Sperm quality and its freezing ability throughout the spawning season in <i>Prochilodus lineatus</i> and <i>Brycon orbignyanus</i> ..	37

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui enorme potencial para a aquicultura, além de uma grande diversidade de espécies de peixes. Embora muitos peixes sejam potencialmente promissores para a piscicultura, o entendimento sobre a biologia das espécies ainda é escasso. Este conhecimento, principalmente no que se refere aos aspectos reprodutivos, é fundamental quando se deseja realizar a criação em cativeiro.

A atividade reprodutiva em peixes é controlada tanto por fatores endógenos (hormonais), quanto por fatores exógenos (ambientais). Em populações naturais, os fatores ambientais desencadeiam alterações hormonais que levam à migração dos animais adultos para os locais de desova, garantindo o sucesso reprodutivo dessas espécies. Este fenômeno é conhecido no Brasil como piracema (palavra de origem tupi que significa "saída de peixe") e ocorre quando os peixes sobem até as cabeceiras dos rios, nadando contra a correnteza, gerando estímulos que influenciam na reprodução do animal.

A curimba *Prochilodus lineatus* e a piracanjuba *Brycon orbignyanus* são espécies de peixes nativas que possuem potencial para a aquicultura e têm sido utilizadas em programas de repovoamento através da reprodução artificial. Essas espécies apresentam comportamento migratório durante os meses chuvosos, quando certas características ambientais delimitam o período e o sucesso reprodutivo das mesmas.

Atualmente, alterações ambientais estão cada vez mais evidentes, devido, principalmente, a ações antrópicas. Isto pode resultar em alterações na maturação gonadal dos peixes e, por consequência, variações na qualidade dos gametas em diferentes períodos da reprodução, assim como alterações na congelabilidade do sêmen.

A biologia reprodutiva das espécies de peixes neotropicais é pouco conhecida e, muitas vezes, priorizam-se pesquisas em assuntos de ponta, quando informações básicas ainda não foram totalmente elucidadas. Assim, a presente proposta foi elaborada para estudar melhor as características do sêmen de curimba e piracanjuba ao longo de duas piracemas, analisando as possíveis alterações durante os anos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aquicultura mundial e no Brasil

A aquicultura é praticada pelo ser humano há milhares de anos e nos tempos atuais ela é utilizada principalmente com objetivos comerciais para o consumo humano, atividades de lazer e para conservação e reposição dos estoques naturais de espécies em extinção (VAZ; TORQUATO; BARBOSA, 2000). Nas últimas décadas, esta atividade vem se desenvolvendo de forma significativa devido, principalmente, ao crescimento da população mundial e demanda por alimentos saudáveis e de origem animal indicados para a saúde humana. Segundo a Food and Agricultural Organization of the United Nations - FAO (2016), a produção global de peixes deve crescer até alcançar 195,9 milhões de toneladas em 2025. O mundo produzirá 29 milhões de toneladas a mais de peixe que em 2013-15 e quase todo esse aumento vai acontecer nos países em desenvolvimento, por meio da aquicultura.

O Estado Mundial da Pesca e Aquicultura 2016 (SOFIA) estima que o Brasil deva registrar um crescimento de 104% na produção da pesca e aquicultura de 2013-15 até 2025, aumentando de 560 mil toneladas para 1,145 milhão de toneladas. Além disso, o consumo *per capita* no Brasil também deve aumentar, passando de 9,6 kg para 12,7 kg em 2025, totalizando um aumento de 32,3% (FAO, 2016). Portanto, o pescado se inclui de forma importante no país, sendo o Brasil considerado um dos países de maior potencial para a aquicultura. O crescimento da produção aquícola é possível principalmente em função de um forte mercado doméstico, produção recorde de grãos, indústria de rações estabelecida, clima favorável, características continentais como uma grande faixa costeira, muita disponibilidade hídrica, amplo território com áreas favoráveis para a construção de tanques e açudes e uma enorme diversidade de espécies de peixes.

O aperfeiçoamento da produção aquícola é possível aprofundando conhecimentos sobre essa atividade, superando obstáculos, investindo em melhores tecnologias e crescendo em produção. Com relação à produção brasileira de peixes nativos cultivados, embora ela venha progredindo, o ritmo de crescimento é menor do que o indicado pelo seu potencial. Atualmente, a tilápia lidera a produção aquícola (260 mil toneladas em 2014), enquanto a produção de espécies nativas conhecidas como peixes redondos (tambaqui, pacu, pirapitinga e híbridos entre essas espécies) ficou em torno de 186 mil toneladas em 2014, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (KUBITZA, 2015). Para melhorar a eficiência e competitividade do cultivo destas e muitas outras espécies, a produção deve se consolidar através do domínio do conhecimento das particularidades e potenciais de criação de cada uma delas (GODINHO, 2007).

Um dos principais aspectos para a intensificação da produção piscícola, acompanhada da sustentabilidade tanto econômica quanto ambiental, é a utilização de técnicas de propagação artificial (ANDRADE; YASUI, 2003). Dentro da cadeia produtiva aquícola, a reprodução se destaca como um fator chave para o desenvolvimento da atividade, uma vez que o número de alevinos está diretamente relacionado ao sucesso da mesma. Fatores como a eficiência dos reprodutores e o desenvolvimento de técnicas de reprodução artificial, de coleta e preservação de sêmen são fundamentais (CARNEIRO, 2007). Além disso, o desenvolvimento da piscicultura com espécies nativas é de grande interesse para a conservação da biodiversidade e se constitui como prioridade do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA (CONTE; BOZANO; FERRAZ DE LIMA, 1995).

2.2 Caracterização das espécies

2.2.1 Curimba *Prochilodus lineatus*

Reino: Animalia;

Filo: Chordata;

Classe: Actinopterygii;

Ordem: Characiformes;

Família: Prochilodontidae;

Subfamília: Prochilodontinae;

Gênero: *Prochilodus*;

Espécie: *Prochilodus lineatus* (VALENCIENNES, 1836).

Nomes populares: curimba, curimbatá, curimatã, corimba, corimbatá, papa-terra e grumatã (Brasil) e sábalo (Argentina, Bolívia, Paraguai e Uruguai).

Os membros da família Prochilodontidae apresentam larga distribuição geográfica em toda a América do Sul e as principais áreas de distribuição de *Prochilodus lineatus* são os rios Paraná, Uruguai e Paraguai, os quais formam a Bacia hidrográfica do Prata, que é a segunda maior da América do Sul, depois da Amazônica (SVERLIJ; ROS; ORTI, 1993). No Brasil, a espécie possui grande importância na Bacia do Rio Grande, mas sua carne é bastante apreciada principalmente nas regiões norte e nordeste do Brasil (REIS; KULLANDER; FERRARIS, 2003).

A curimba (FIGURA 1) é um peixe de grande porte, atingindo até 70 cm de comprimento (SVERLIJ; ROS; ORTI, 1993) e 6 kg de peso corporal (CRUZ, 2001). Possui corpo alto, alongado, comprimido e cabeça larga. Sua cor é cinza-esverdeada, com o corpo escuro no dorso e mais claro no ventre, onde é prateado. Machos e fêmeas são idênticos externamente, porém, o macho se reproduz aos dois anos de idade, com aproximadamente 24 cm, e a fêmea, aos três anos, com

aproximadamente 31 cm de comprimento (VAZ; TORQUATO; BARBOSA, 2000).

Figura 1 - Exemplar de curimba *Prochilodus lineatus*.



Fonte: (PELLIZZER ISABEL, 2007).

Considerada um peixe iliófago ou detritívoro, tanto nas fases jovens como na fase adulta, a curimba alimenta-se de detritos orgânicos, organismos bentônicos e microrganismos de decomposição (CASTAGNOLLI, 1992; LOGATO, 2000). Devido a essa característica, ela tem importante função no fluxo de energia e na cadeia alimentar do ambiente aquático, uma vez que promove a limpeza do fundo dos rios (FLECKER, 1996). Além disto, é uma espécie de fácil adaptação à alimentação fornecida em sistemas de criação. Ela prefere e encontra-se, geralmente, em ambientes com águas mais lentas (VAZ; TORQUATO; BARBOSA, 2000).

Na aquicultura de água doce do Brasil, as larvas dessa espécie são utilizadas como alimento vivo para outros peixes carnívoros de interesse comercial (MURGAS et al., 2003), como, por exemplo, o dourado *Salminus brasiliensis* (VAZ; TORQUATO; BARBOSA, 2000) ou espécies passíveis de extinção, como a Piracanjuba *Brycon orbignyanus* e o jaú *Zungaro jahu*. Os

peixes adultos são destinados ao consumo humano, principalmente através da pesca artesanal de subsistência na região nordeste do país (FREITAS et al., 2002).

A curimba é uma espécie que possui alta prolificidade e grande facilidade de manejo, e graças a essas características, atualmente sua metodologia de reprodução artificial já está bem estabelecida. Dessa forma, ela tem sido muito utilizada por usinas hidrelétricas em programas de repovoamento de reservatórios e, também se tornou uma espécie considerada modelo para estudos sobre nutrição, saúde, diversidade genética e reprodução (ORFÃO et al., 2010a).

2.2.2 Piracanjuba *Brycon orbignyanus*

Reino: Animalia;

Filo: Chordata;

Classe: Actinopterygii;

Ordem: Characiformes;

Família: Characidae;

Gênero: *Brycon*;

Espécie: *Brycon orbignyanus* (VALENCIENNES, 1849).

Nomes populares: Piracanjuba, piracanjuva, bracanjuba e bracanjuva, Matrinchã, pirapitonga, piraputanga e salmão-crioulo (Brasil), pirá-pitá, pirapitanga, salmón, salmón-del-Paraná, salmón-del-rio e salmonete (Argentina) e piraputá (Uruguai).

Os membros do gênero *Brycon* encontram-se na América do Sul (MOREIRA et al., 2001) e a espécie *Brycon orbignyanus* está distribuída nas bacias do Paraná, Paraguai e Uruguai. Ela está presente principalmente nos Rios Grande e Paraná, sendo que, no Brasil, está presente nos estados do Mato Grosso

do Sul, São Paulo, Minas Gerais, Paraná e Goiás (VAZ; TORQUATO; BARBOSA, 2000).

A piracanjuba (FIGURA 2) é um peixe onívoro que se alimenta de outros peixes (em estágios iniciais), frutas e sementes. Habita preferencialmente ambientes lóticos de águas claras, em locais em que as árvores se deitam sobre o rio, pois é onde obtém os frutos que lhe servem como alimento. Ela é considerada um peixe de grande porte, podendo atingir 80 centímetros de comprimento e pesar até 10 kg de peso vivo (VAZ; TORQUATO; BARBOSA, 2000).

Figura 2 - Exemplar de piracanjuba *Brycon orbignyanus*.



Fonte: (DOURADO PISCICULTURA, 2016).

O macho dessa espécie se reproduz a partir de dois anos de idade, com um comprimento médio de 20 cm e apresenta como característica sexual secundária: a aspereza na nadadeira anal. A fêmea se reproduz a partir do terceiro ano de idade, com 25 cm de comprimento. Seu corpo é alongado, possui um tom acinzentado com as nadadeiras de cor laranja e brilhantes. Seu pedúnculo caudal é preto e suas brânquias são pequenas (VAZ; TORQUATO; BARBOSA, 2000).

Constantes alterações ambientais causadas por ações antrópicas, incluindo a sobrepesca, a destruição da mata ciliar, a urbanização, a poluição, a introdução de espécies exóticas e a construção de barragens de usinas hidrelétricas

levaram a um declínio nas populações naturais de piracanjuba, a qual atualmente é classificada como uma espécie em risco de extinção (ROSA; LIMA, 2008).

Ela exibe crescimento rápido em cativeiro e tem uma excelente qualidade da carne, o que indica que pode ser produzida em escala comercial, impedindo assim a sua extinção (MARIA et al., 2006b). A coloração da carne da piracanjuba é laranja-avermelhada devido à deposição de pigmentos carotenóides provenientes de alimento natural, dando assim um agradável aspecto e, provavelmente, um melhor valor de mercado (SANTAMARIA; ANTUNES, 1999). Além disso, é uma espécie arisca, muito apreciada na pesca esportiva, motivo pelo qual tem sido muito procurada para o povoamento de tanques em pesque-pagues.

2.3 Reprodução dos peixes e o ciclo reprodutivo

Peixes realizam deslocamentos no meio aquático durante as diferentes fases de sua vida e com objetivos variados. Os peixes de piracema, como são conhecidos no Brasil, os que realizam migrações reprodutivas, apresentam padrões de deslocamentos de alta complexidade (GODINHO; POMPEU, 2003). Em razão disso, o estudo de padrões migratórios de peixes brasileiros ainda é incompleto e muitas questões relativas ao tema não estão respondidas.

O padrão mais simples de migração reprodutiva consiste no deslocamento do sítio de alimentação para o de desova. Nesse modelo, classicamente conhecido em alguns peixes fluviais brasileiros, o deslocamento é feito no sentido de jusante para montante, isto é, em direção às cabeceiras da bacia hidrográfica (GODINHO; POMPEU, 2003). É lá que os peixes encontram um local mais apropriado para a sobrevivência dos ovos e larvas.

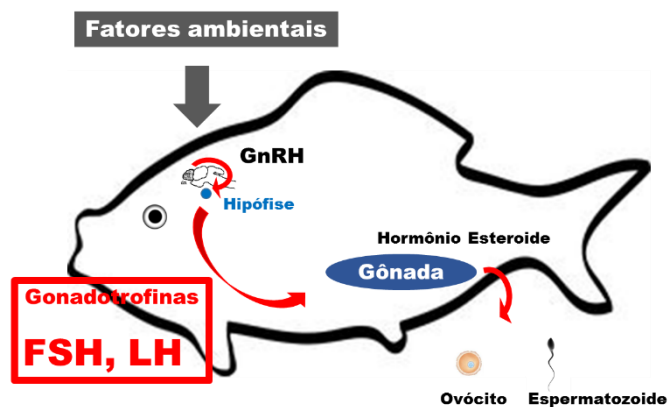
A curimba e a piracanjuba são espécies de peixes que possuem comportamento migratório durante o período reprodutivo. Este fenômeno ocorre

quando o ambiente é adequado para preparar o animal para a reprodução (GODINHO; GODINHO, 1994). A migração é o estímulo necessário para que ocorra a maturação das gônadas e, conseqüentemente, a liberação de sêmen e desova (WEINGARTNER; ZANIBONI FILHO, 2005).

O movimento de migração ocorre, portanto, de forma sazonal através da percepção, pelo sistema nervoso, dos estímulos ambientais, como a duração do dia (fotoperíodo), a temperatura da água e a chegada das chuvas. Essas informações, que passam através de receptores sensoriais e chegam até o cérebro, geram estímulos nervosos que desencadeiam reações no sistema endócrino (BAZZOLI, 2003).

Durante o período reprodutivo, os estímulos do meio ambiente chegam ao hipotálamo estimulando a produção e liberação do hormônio estimulador da hipófise, o GnRH (hormônio liberador de gonadotrofinas). Este hormônio segue para a glândula hipófise, via sanguínea, estimulando-a a produzir e secretar hormônios hipofisários, os quais possuem tropismo pelas gônadas e, por isso, são chamados de gonadotrofinas. As gonadotrofinas, hormônio folículo-estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH), estimulam as gônadas a secretarem hormônios sexuais, os estrógenos e andrógenos, e gametas, ovócitos e espermatozoides (FIGURA 3) (VIVEIROS; LEAL; SALLUM, 2011).

Figura 3 - Produção de gametas regulada pela produção hormonal através de estímulos ambientais.



Fonte: Adaptado de Tokyo University of Marine Science and Technology (2016).

A liberação dos hormônios ligados à reprodução altera-se durante o ano, estando relacionada com o ciclo reprodutivo natural do peixe. Seus níveis sanguíneos são máximos no período de pré-desova e mínimos durante ou logo após esta fase (VIVEIROS; LEAL; SALLUM, 2011). Assim, a reprodução da maioria das espécies de peixe no Brasil e no mundo, obedece a um comportamento cíclico anual e, é possível afirmar que certas mudanças ambientais delimitam o período e o sucesso reprodutivo destas espécies (VAZZOLER, 1996).

A reprodução dos peixes, portanto, corresponde a um período de repouso intercalado por períodos de atividade sexual, os quais finalizam com o surgimento da nova prole (GODINHO, 2007). No período de repouso, as gônadas estão com tamanho reduzido, contendo apenas células gametogênicas em fases iniciais de desenvolvimento. Com a progressão do ciclo, elas acumulam gametas até alcançar o pico no momento da reprodução (BAZZOLI, 2003).

Em razão do acúmulo dessas células, as gônadas sofrem mudanças radicais em sua constituição, alterando sua aparência e peso. Com base nas alterações morfo-funcionais das gônadas, o ciclo reprodutivo dos peixes pode ser

dividido nas fases: regredido, maturação inicial, maturação intermediária, maturação avançada e regressão (URIBE; GRIER; MEJÍA-ROA, 2015).

Por meio de várias pesquisas realizadas ao longo dos anos, o conhecimento da fisiologia da reprodução associado aos estudos da biologia de peixes, permitiu a determinação de procedimentos de manejo que possibilitam a maturação gonadal dos peixes em cativeiro, bem como a indução dos processos de maturação final dos gametas através de indução hormonal e a subsequente fertilização (ZANIBONI FILHO; WEINGARTNER, 2007).

O que acontece, sobretudo com as fêmeas mantidas em cativeiro, é que após os ovócitos entrarem na fase de dormência, há falha na liberação das gonadotrofinas hipofisárias FSH e LH e, assim, os ovócitos são reabsorvidos. Os machos, por outro lado, produzem espermatozoides viáveis relativamente de boa qualidade, sem a necessidade de aplicação de hormônios, embora seja comum aplicá-los para aumentar o volume do sêmen coletado (VIVEIROS; LEAL; SALLUM, 2011). Portanto, a influência do meio ambiente é de extrema importância, mesmo para animais mantidos em cativeiro.

A reprodução artificial é uma ferramenta que aumenta a produção de alevinos e auxilia o produtor a ter controle do processo reprodutivo dos animais, através de um programa de acompanhamento do desenvolvimento dos gametas, e da qualidade dos reprodutores. O conhecimento da qualidade do sêmen é necessário para o sucesso da reprodução em pisciculturas comerciais, bem como para o avanço de experimentos na área (ORFÃO et al., 2011; VIVEIROS; GODINHO, 2009).

2.4 Variações na qualidade dos gametas

Os ambientes aquáticos no Brasil vêm sofrendo, nas últimas décadas, transformações drásticas como o barramento dos rios, a drenagem de lagoas marginais e várzeas usadas pelos peixes como berçários (criadouros naturais de alevinos), a descarga de dejetos domésticos e industriais, o abuso na utilização de agrotóxicos, a má utilização do solo (erosão) e a pesca predatória. A interferência antrópica provoca modificações ambientais tanto à montante como à jusante. Os prejuízos ecológicos são muitos, como: inundações de áreas florestais ou agrícolas que podem causar alterações físicas e químicas no meio aquático e o desaparecimento de recursos naturais como florestas, rios, lagoas, cavernas e quedas d'água (VIVEIROS; LEAL; SALLUM, 2011).

Alterações climatológicas também estão cada vez mais evidentes e as estações do ano estão perdendo suas características marcantes, devido à intensificação do efeito estufa, o desmatamento e a destruição da camada de ozônio (WALTHER et al., 2002). Todos esses fatores podem resultar em alterações nas condições de reprodução de espécies aquáticas e, nesse contexto, uma maior atenção por parte dos pesquisadores é necessária às espécies de peixes de piracema. Além destas serem susceptíveis à extinção, em consequência das alterações ambientais que vêm ocorrendo ao longo dos anos, também existe uma forte pressão pela demanda comercial, principalmente sobre as espécies consideradas nobres.

Possíveis interferências do meio podem causar, por exemplo, o adiantamento ou retardamento da maturação gonadal e variações na qualidade dos gametas em diferentes períodos da reprodução. Em adição, é possível que variações na congelabilidade do sêmen possam ocorrer ao longo da piracema sem que sejam notadas através de parâmetros avaliados no sêmen fresco, comprometendo, assim, a qualidade do material quando criopreservado. O conhecimento da interação de aspectos comportamentais influenciados pelo ambiente, que resulta em respostas fisiológicas, é uma ferramenta útil para o

aperfeiçoamento de técnicas usadas ou para a elaboração de outras mais eficientes e econômicas para as pisciculturas.

Do ponto de vista prático, é de grande relevância para os produtores, saber se as variações na qualidade dos gametas existem, já que podem comprometer a produção. O conhecimento de tal informação também permite mudanças no manejo das pisciculturas, como espalhar as coletas de sêmen ao longo de todo período reprodutivo ou concentrá-las em um curto espaço de tempo, dependendo da variação dos parâmetros seminais. Além disto, permite que técnicas como a criopreservação do sêmen, sejam feitas no melhor momento possível, adquirindo um material de ótima qualidade ou até mesmo diminuindo o número de reprodutores necessários no plantel. Dessa forma, pode-se aperfeiçoar tempo e custos de produção e tornar a piscicultura cada vez mais eficiente.

Alterações na qualidade do sêmen ao longo do período reprodutivo já foram relatadas em algumas espécies de peixes, como por exemplo, na truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss*, pertencente à ordem Salmoniformes, família Salmonidae (MUNKITTRICK; MOCCIA 1987), na carpa comum *Cyprinus carpio*, pertencente à ordem Cypriniformes, família Cyprinidae (CHRIST et al., 1996), no arinca *Melanogrammus aeglefinus*, pertencente à ordem Gadiformes, família Gadidae (RIDEOUT; TRIPPEL; LITVAK, 2004) e no robalo *Dicentrarchus labrax*, família Moronidae (DREANNO et al., 1999). Alterações sazonais na qualidade do sêmen podem ocorrer em diferentes momentos do período de reprodução (começo, meio ou final) variando de acordo com a espécie em estudo ou até mesmo dentro da mesma espécie.

O conhecimento sobre o desempenho reprodutivo em *Prochilodus lineatus* e *Brycon orbignyanus* ao longo da piracema é escasso, comprovando a necessidade de reflexão sobre a obtenção de tal informação.

2.5 Sistema Computadorizado de Análise de Sêmen (CASA)

Tradicionalmente, as análises seminais em muitas espécies de animais eram baseadas em avaliações subjetivas de parâmetros espermáticos. Contudo, estudos relatam uma variação de 30 a 60% na estimativa desses parâmetros. Esse método pode apresentar resultados conflitantes devido à limitação do ser humano em analisar diferentes amostras espermáticas (VERSTEGEN; IGUER-OUADA; ONCLIN, 2002). Dessa forma, no intuito de reduzir a subjetividade, padronizar e fornecer dados acurados dessas avaliações, tanto para fins clínicos quanto de pesquisa, sistemas automáticos para análise computadorizada de sêmen (CASA) vêm sendo utilizados.

O sistema CASA tem demonstrado altos níveis de precisão e confiança, usando metodologias de classificação que fornecem uma grande melhoria no conhecimento e na habilidade de analisar espermatozoides (VERSTEGEN; IGUER-OUADA; ONCLIN, 2002). Originalmente, este sistema foi criado para análise de espermatozoides de humanos, sendo atualmente uma ferramenta útil e essencial no monitoramento da qualidade espermática em pesquisas de diversas espécies de mamíferos e peixes.

O CASA é formado por um microscópio óptico binocular com contraste de fase acoplado a uma câmera de vídeo, conectado a um computador que utiliza o *software* SCA (FIGURA 4).

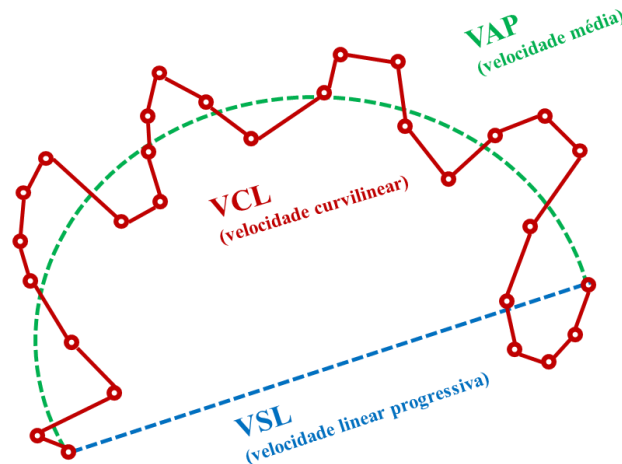
Figura 4 - Sistema Computadorizado de Análise do Sêmen (CASA).



Fonte: Arquivo pessoal.

O CASA realiza uma avaliação quantitativa complexa, simples de manusear, rápida e prática, a qual possibilita prever a qualidade dos espermatozoides de peixes e estimar a sua capacidade para fertilizar ovos. Quanto à qualidade espermática, pode auxiliar na seleção de reprodutores, melhorar a eficiência da criopreservação e armazenamento e otimizar as condições de fertilização (KIME et al., 2001). Além disso, é uma técnica acurada, que se baseia na avaliação individual do espermatozoide, calculando de forma rápida diferentes parâmetros como, por exemplo, a motilidade total, motilidade progressiva, linearidade, frequência de batimento flagelar e diferentes velocidades (IGUER-OUADA; VERSTEGEN, 2001; RIJSSELAERE et al., 2003). De acordo com a descrição de Versteegen, Iguer-Ouada e Onclin (2002), alguns parâmetros estão descritos a seguir e representados na FIGURA 5.

Figura 5 - Representação esquemática das velocidades espermáticas curvilínea (VCL), linear progressiva (VSL) e média (VAP), mensuradas pelo CASA.



Fonte: Adaptado de Verstegen, Iguer-Ouada e Onclin (2002).

- Velocidade curvilínea (VCL): É a velocidade da trajetória real do espermatozoide. É sempre a maior das três velocidades e serve como elemento de cálculo para a linearidade.

- Velocidade linear progressiva (VSL): É a velocidade média em função da linha reta estabelecida entre o primeiro e o último ponto da trajetória do espermatozoide. É sempre a mais baixa das três velocidades.

- Velocidade média da trajetória (VAP): é a velocidade da trajetória média do espermatozoide. Em casos onde a trajetória da cabeça espermática é muito regular e linear com pouco movimento lateral da cabeça, a VAP é quase a mesma que a VSL, porém com trajetórias irregulares, não lineares ou onde existe um alto grau de movimento lateral, a VAP será maior que a VSL.

- Frequência de batimento flagelar cruzado (BCF): É o número de vezes que a cabeça do espermatozoide cruza a direção do movimento. Se existem mais batimentos/segundos que imagens/segundos, então, a BCF será subestimada.

A avaliação objetiva da motilidade espermática pelo CASA, tem sido relatada para os espermatozoides de peixes neotropicais, tais como *P. brachypomus* (NASCIMENTO et al., 2010), *P. lineatus* (VIVEIROS et al., 2010), *B. insignis* (VIVEIROS et al., 2012a), e *B. orbignyanus* (LOPEZ GALVIS; LEAL; VIVEIROS, 2015), recentemente.

2.6 Conservação de sêmen de peixes

Técnicas que buscam a conservação espermática em peixes vêm se tornando cada vez mais usuais no processo de reprodução artificial, assumindo um papel importante na aquicultura. Atualmente, existe uma busca constante pela otimização de processos técnicos de preservação de espermatozoides e, a importância do uso dessas técnicas, é justificada por razões tanto ambientais quanto econômicas (CARNEIRO, 2007). Assim, busca-se melhorar os procedimentos que permitem prolongar a vida útil dos gametas em peixes.

A agressão sofrida pelo meio ambiente nos últimos anos, em especial os ambientes aquáticos, vem afetando diretamente as populações de espécies nativas de peixes. As estratégias de recuperação da ictiofauna podem ser grandemente auxiliadas por sêmen coletado num período anterior e armazenado sob baixas temperaturas (RANA, 1995). Avanços nessa área, permitem a criação de importantes bancos de sêmen de peixes nativos. Além disso, o armazenamento de sêmen de peixe possui também grande importância como ferramenta para programas de melhoramento genético de espécies de interesse econômico (CARNEIRO, 2007).

Informações sobre as particularidades do sêmen das diversas espécies de peixes, permitem a padronização de técnicas de conservação, definindo, com isso, os procedimentos adequados. Quando resfriados, os espermatozoides de peixes podem ser armazenados por algumas horas ou dias, dependendo da espécie, e

quando mantidos criopreservados podem ser estocados por muitos anos (BILLARD; COSSON; NOVEIRI, 2004). Adicionalmente, trata-se de uma técnica simples que pode ser implementada facilmente nas pisciculturas voltadas à produção de alevinos (CARNEIRO, 2007).

2.7 Criopreservação de sêmen de peixes

A criopreservação é uma técnica estudada para a conservação do sêmen de diferentes espécies de peixes nativas do Brasil (FELIZARDO et al., 2010). A técnica baseia-se no armazenamento de espermatozoides em nitrogênio líquido (-196°C), mantendo a sua viabilidade por tempo indefinido (BILLARD; COSSON; NOVEIRI, 2004). No entanto, o procedimento para a criopreservação de sêmen deve ser padronizado previamente para cada espécie de peixe buscando a definição de protocolos mais adequados (CARNEIRO, 2007).

Os bancos de sêmen em programas de conservação de recursos genéticos em piscicultura, possuem aplicações como a redução do número de reprodutores (machos), com conseqüente redução de custos e a eliminação do problema da assincronia na maturidade gonadal entre reprodutores. Principalmente em espécies migratórias, os machos e fêmeas muitas vezes não estão preparados simultaneamente para a reprodução. Além disso, a facilidade de transporte, difusão e troca de material genético entre organizações atuantes na área é também uma grande vantagem (GODINHO, 2000).

A criopreservação é um método seguro a ser utilizado para a preservação dos recursos genéticos, uma vez que, após o processo de congelamento e descongelamento, a capacidade de fertilização dos espermatozoides é recuperada. No entanto, para a manutenção do espermatozoide em baixa temperatura é necessária a utilização de um protocolo de criopreservação adequado que depende da quantidade e qualidade do meio diluidor, tipo e concentração dos

crioprotetores, o volume da amostra e características dos espermatozoides (KOPEIKA; KOPEIKA, 2008).

No Brasil, o uso de sêmen criopreservado em pisciculturas é bastante limitado. Apesar disto, existem alguns protocolos de congelamento de sêmen de peixes neotropicais já testados e publicados como em curimba *Prochilodus lineatus* (FELIZARDO et al., 2010; VIVEIROS et al., 2009b, 2010, 2015), em piracanjuba *Brycon orbignyanus* (LOPEZ GALVIS; LEAL; VIVEIROS, 2015; MARIA et al., 2006a, 2006b; VIVEIROS et al., 2015), em dourado *Salminus brasiliensis* (CAROLSFELD et al., 2003; VIVEIROS et al., 2009a), em pirapitinga *Brycon nattereri* (VIVEIROS et al., 2012c), em pirapitinga-do-sul *Brycon opalinus* (VIVEIROS et al., 2012a), em piabanha *Brycon insignis* (VIVEIROS et al., 2011, 2012b), e em pacu *Piaractus mesopotamicus* (ORFÃO et al., 2010b).

REFERÊNCIAS

ANDRADE, D. R.; YASUI, G. S. O manejo da reprodução natural e artificial e sua importância na produção de peixes no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 27, n. 2, p. 166-172, abr./jun. 2003.

BAZZOLI, N. Parâmetros reprodutivos de peixes de interesse comercial na região de Pirapora. In: GODINHO, H. P.; GODINHO, A. L. (Org.). **Águas, peixes e pescadores do São Francisco da Minas Gerais**. Belo Horizonte: PUC Minas, 2003. p. 291-306.

BILLARD, R. J.; COSSON, S. B.; NOVEIRI, M. Cryopreservation and short-term storage of sturgeon sperm, a review. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 236, p. 1-9, June 2004.

CARNEIRO, P. C. F. Tecnologias de produção e armazenamento de sêmen de peixes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 31, n. 3, p. 361-366, Sept. 2007.

CAROLSFELD, J. et al. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. **Journal of Fish Biology**, London, v. 63, p. 472-489, Aug. 2003.

CASTAGNOLLI, N. **Piscicultura de água doce**. Jaboticabal: FUNEP. 1992. 189 p.

CHRIST, S. A. et al. Monthly variation in sperm motility in common carp assessed using computer-assisted sperm analysis (CASA). **Journal of Fish Biology**, London, v. 48, p. 1210-1222, June 1996.

CONTE, L.; BOZANO, G. L. N.; FERRAZ DE LIMA, J. A. Influência do sistema de alimentação no crescimento da piracanjuba *Brycon orbignyanus*, em gaiolas. **Boletim Técnico do CEPTA**, Pirassununga, v. 8, p. 49-59, 1995.

CRUZ, V. L. B. **Criopreservação de sêmen de curimatá (*Prochilodus lineatus* = *scrofa*) (Characiformes, Prochilodontidae)**. 2001. 59 p. Dissertação (Mestrado em Zoologia) - Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.

DOURADO PISCICULTURA. **Nossas espécies: piracanjuba**. Disponível em: <<http://piscicultura.dourado.com.br/index.php?pagina=Detalhe-Especie&id=192>>. Acesso em: 22 jun. 2016.

DREANNO, C. et al. Effect of aging process on the quality of seabass (*Dicentrarchus labrax*) semen. **Journal of Applied Ichthyology**, Berlin, v. 15, p. 176–180, Nov. 1999.

FELIZARDO, V. O. et al. Effect of cryopreservant combinations on the motility and morphology of curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 122, n. 3, p. 259-263, Dec. 2010.

FLECKER, A. S. Ecosystem engineering by a dominant detritivore in a diverse tropical stream. **Ecology**, London, v. 77, n. 6, p. 1845-1854, Sept. 1996.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The state of world fisheries and aquaculture**, Rome, 2016. Disponível em: < <http://www.fao.org/3/a-i5555e.pdf>>. Acesso em: 13 set. 2016.

FREITAS, R. T. F. et al. **Reprodução/Espécies para piscicultura**: cursos de qualificação profissional a distancia. Lavras: UFLA/FAEPE, 2002. p. 17-28.

GODINHO, A. L.; GODINHO, H. P. Ecology and conservation of fish in Southeastern Brazilian river basins submitted to hydroelectric impoundments. **Acta Limnologica Brasiliensia**, Rio Claro, v. 5, p. 187–197, Jan. 1994.

GODINHO, A. L.; POMPEU, P. S. A importância dos ribeirões para os peixes de piracema. In: GODINHO, H. P.; GODINHO, A. L. (Org.). **Águas, peixes e pescadores do São Francisco da Minas Gerais**. Belo Horizonte: PUC Minas, 2003. p. 361-372.

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

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

IGUER-OUADA, M.; VERSTEGEN, J. P. Evaluation of the “Hamilton Thorn computer- based automated system” for dog semen analysis. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 55, n. 3, p. 733-749, Feb. 2001.

KIME, D. E. et al. Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 130, n. 4, p. 425-433, Aug. 2001.

KOPEIKA, E.; KOPEIKA, J. Variability of sperm quality after cryopreservation in fish. In: ALAVI, S. N. H. et al. (Ed.). **Fish spermatology**. Oxford: Alpha Science International, 2008. p. 241-267.

KUBITZA, F. Aquicultura no Brasil: Principais espécies, áreas de cultivo, rações, fatores limitantes e desafios. **Panorama da Aquicultura**, Laranjeiras, v. 25, p. 10-23, ago. 2015.

LOGATO, P. V. R. **Nutrição e alimentação de peixes de água doce**. Viçosa, MG: Aprenda Fácil, 2000. 128 p.

LOPEZ GALVIS, D. I.; LEAL, M. C.; VIVEIROS, A. T. M. Extender composition and osmolality affects post thaw motility and velocities of piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1850) (Characiformes) sperm. **Journal of Applied Ichthyology**, Berlin, v. 31, p. 114–18, May 2015.

MARIA, A. N. et al. Effects of cooling and freezing on sperm motility of the endangered fish piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Characiformes, Characidae). **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 3, n. 1, p. 55-60, Jan./Mar. 2006a

MARIA, A. N. et al. 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. 2006b.

MOREIRA, H. L. M. et al. **Fundamentos da moderna aquicultura**. Canoas: Ulbra, 2001. 200 p.

MUNKITTRICK, K. R.; MOCCIA, R. D. Seasonal changes in the quality of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) semen: effect of a delay in stripping on spermatocrit, motility, volume and seminal plasma constitutions. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 64, p.147-56, July 1987.

MURGAS, L. D. S. et al. **Reprodução/espécies próprias para a piscicultura**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2003. 28 p. (Curso Qualificação Profissional à distância).

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

ORFÃO, L. H. et al. Criopreservação do sêmen de pacu *Piaractus mesopotamicus*: efeito de diluidores, crioprotetores e ativadores. In: CYRINO, J. E. P., et al. (Ed.). **Tópicos especiais em biologia aquática e aqüicultura III**. Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Aqüicultura e Biologia Aquática, 2010b. p. 161-167.

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

ORFÃO, L. H. et al. Sperm fertility of the subtropical freshwater streaked prochilod *Prochilodus lineatus* (Characiformes) improved after dilution and cold storage. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 41, p. 679-687, July 2010a.

PELLIZZER, ISABEL. **Familia Prochilodontidae**. Disponível em: <<http://isabelpellizzer.com.br/familia-prochilodontidae/>>. Acesso em: 10 ago. 2016.

RANA, K. Preservation of gametes. In: BROMAGE, N. R.; ROBERTS, R. J. (Ed.). **Broodstock management and egg and larval quality**. Cambridge: Cambridge University, 1995. p. 88-94.

REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS J. C. J. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. 742 p.

RIDEOUT, R. M.; TRIPPEL, E. A.; LITVAK, M. K. Relationship between sperm density, spermatocrit, sperm motility and spawning date in wild and cultured haddock. **Journal of Fish Biology**, London, v. 65, p. 319-332, July 2004.

RIJSSELAERE, T. et al. Effect of technical settings on canine semen motility parameters measured by the Hamilton-Thorne analyzer. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 60, n. 8, p. 1553-1568, Nov. 2003.

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

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.

SVERLIJ, S.; ROS, A.; ORTI, G. Sinopsis de los datos biológicos y pesqueros del Sabalo *Prochilodus lineatus*. **FAO Sinopsis sobre la pesca**, Rome, v. 154, p. 1-64, 1993.

TOKYO UNIVERSITY OF MARINE SCIENCE AND TECHNOLOGY.
Disponível em: <<http://www.s.kaiyodai.ac.jp>>. Acesso em: 22 jun. 2016.

URIBE, M. C.; GRIER, H. J.; MEJÍA-ROA, V. Comparative testicular structure and spermatogenesis in bony fishes. **Spermatogenesis**, Oxford, v. 4, n. 3, Feb, 2015.

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

VAZZOLER, A. E. A. M. **Biologia da reprodução de peixes Teleósteos: teoria e prática**. Maringá: EDUEM/SBI, 1996. 169 p.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 57, p. 149-179, Jan. 2002.

VIVEIROS, A. T. M. et al. A simple, inexpensive and successful freezing method for curimba *Prochilodus lineatus* (Characiformes) semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 112, p. 293–300, June 2009b.

VIVEIROS, A. T. M. et al. Effects of extenders, cryoprotectants and freezing methods on sperm quality of the threatened Brazilian freshwater fish pirapitingado-sul *Brycon opalinus* (Characiformes). **Theriogenology**, Los Angeles, v. 78, n. 2, p. 361-368, July 2012c.

VIVEIROS, A. T. M. et al. Methyl glycol, methanol and DMSO effects on post-thaw motility, velocities, membrane integrity and mitochondrial function of *Brycon orbignyanus* and *Prochilodus lineatus* (Characiformes) sperm. **Fish Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 41, p. 193–201, Nov. 2015.

VIVEIROS, A. T. M. et al. Motility and fertility of the subtropical freshwater fish streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) sperm cryopreserved in powdered coconut water. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 74, p. 551-556, Sept. 2010.

VIVEIROS, A. T. M. et al. Sensibilidade dos espermatozoides de dourado (*Salminus brasiliensis*) a diferentes meios de congelamento. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, n. 4, p. 883-889, ago. 2009a.

VIVEIROS, A. T. M. et al. Spermatozoon ultrastructure and sperm cryopreservation of the Brazilian dry season spawner fish pirapitinga, *Brycon nattereri*. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 43, n. 4, p. 546-555, Mar. 2012b.

VIVEIROS, A. T. M. et al. Sperm cryopreservation affects post-thaw motility, but not embryogenesis or larval growth in the Brazilian fish *Brycon insignis* (Characiformes). **Theriogenology**, Los Angeles, v. 78, p. 803-810, Sept. 2012a.

VIVEIROS, A. T. M. et al. Sperm cryopreservation of tiete tetra *Brycon insignis* (Characiformes): effects of cryoprotectants, extenders, thawing temperatures and activating agents on motility features. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 42, n. 6, p. 858-865, May 2011.

VIVEIROS, A. T. M.; GODINHO, H. P. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. **Fish Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 35, p. 137-50, Mar. 2009.

VIVEIROS, A. T. M.; LEAL, M. C.; SALLUM, W. B. **Reprodução das principais espécies de peixes nativos**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2011. 94 p.

WALTHER, G. et al. Ecological responses to recent climate change. **Nature**, London, v. 416, n. 6879, p. 389-395, Mar. 2002.

WEINGARTNER, M.; ZANIBONI FILHO, E. Dourado. In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: UFSM, 2005. p. 257-286.

ZANIBONI FILHO, E.; WEINGARTNER, M. Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 31, p. 367-373, jun. 2007.

SEGUNDA PARTE – ARTIGO

ARTIGO 1

**Sperm quality and its freezing ability throughout the spawning season in
Prochilodus lineatus and *Brycon orbignyanus***

Isabela Martins Di Chiacchio¹

Artigo formatado segundo as normas do periódico *Theriogenology*

Isabela M. Di Chiacchio, Izabella L. G. Almeida, Marcelo C. Leal,
Ana T. M. Viveiros

¹ Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Lavras, Campus Universitário, Lavras-MG, 37.200-000. E-mail: isa.chiacchio@gmail.com.

Abstract

The aim of this study was to determine fresh and frozen sperm quality evaluated over two spawning seasons (2013-2014; 2014-2015) in *Prochilodus lineatus* and *Brycon orbignyanus*. The spawning seasons were divided into two periods: November to December and January to February. Males were hand-stripped after carp pituitary treatment. Fresh sperm motility rate, velocities (curvilinear = VCL; straight-line = VSL; average path = VAP), and the beat cross frequency (BCF) were determined using a Computer-Assisted Sperm Analyzer (CASA). Sperm of each species was frozen using methyl glycol as cryoprotectant and a glucose solution for *P. lineatus* or a NaCl solution for *B. orbignyanus* as extender. Diluted sperm was loaded into 0.25 mL straws, frozen in a nitrogen vapor vessel (dry shipper) and stored in a liquid nitrogen vessel. Six months later, straws were thawed in a water bath at 60°C for 3 s and sperm quality was determined, as described for fresh sperm. No significant difference was observed for any of the fresh and frozen sperm features between the two spawning seasons or over the spawning seasons in *P. lineatus* and in *B. orbignyanus*. Motility rate and velocities, but not BCF, was always higher in fresh sperm when compared with frozen sperm. Comparing both species, higher motility in frozen sperm and higher VCL and VAP in both fresh and frozen sperm were observed in *P. lineatus*, while higher fresh VSL and fresh and frozen BCF were observed in *B. orbignyanus*. Sperm quality and its freezing ability of both species were sustained over the spawning season and thus fish farmers can reproduce these species and freeze their sperm in any time throughout the spawning season. *P. lineatus* sperm is more resistant to the cryopreservation process than *B. orbignyanus*.

Keywords: CASA; cryopreservation; Neotropical fish; reproduction; spermatozoa.

1 Introduction

The streaked prochilod *Prochilodus lineatus* (VALENCIENNES, 1836) and the piracanjuba *Brycon orbignyanus* (VALENCIENNES, 1849) are fish species from the order Characiformes and are native from South America. These species have a great potential for Brazilian freshwater aquaculture and have been used in restocking programs through artificial propagation for conservation and management [1]. During the rainy season, these species migrate to find clean water and spawn. This migratory behavior is known as *piracema* and occurs when the environment is appropriate to stimulate fish reproduction [2]. Most Brazilian rheophilic fish exhibit annually migration and spawn during the rainy months, in flooding areas and high temperatures [3].

Spermatogenesis in fish is regulated by the reproductive endocrine system (endogenous factors) and environmental (exogenous factors such as thermoperiod or photoperiod) stimulus [4]. The physiological changes that occur regulates gonadal development and spermiation [5]. Thus, it is clear that certain environmental changes define the period and the reproductive success in these species. These changes may result in different fish sperm maturation. In addition, there are also factors such as the aging of mature sperm inside the testis and early spermiation in the tank prior to manual collection in captivity that may decrease sperm quality and even change their freezing ability. Changes on sperm qualitative and/or quantitative characteristics throughout the spawning season in species with annual spawning cycles have been reported in haddock *Melanogrammus aeglefinus* [6], Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* L. [7], common barbel *Barbus barbus* [8], Atlantic cod *Gadus morhua* L. [9] and Caspian roach *Rutilus rutilus caspicus* [5].

Knowledge on the reproductive performance in *Prochilodus lineatus* and *Brycon orbignyanus* over the spawning season is scarce and fish farmers often use

excess of sperm collected randomly over the spawning season. For the rational use of males broodfish, it is imperative to know the sperm production capacity during the spawning season [10]. So that fish farmers can use sperm collected when the quality is maximum. The aim of this study was to compare motility rate, velocities, beat cross frequency and freezing ability of *P. lineatus* and *B. orbignyana* sperm collected throughout two spawning seasons.

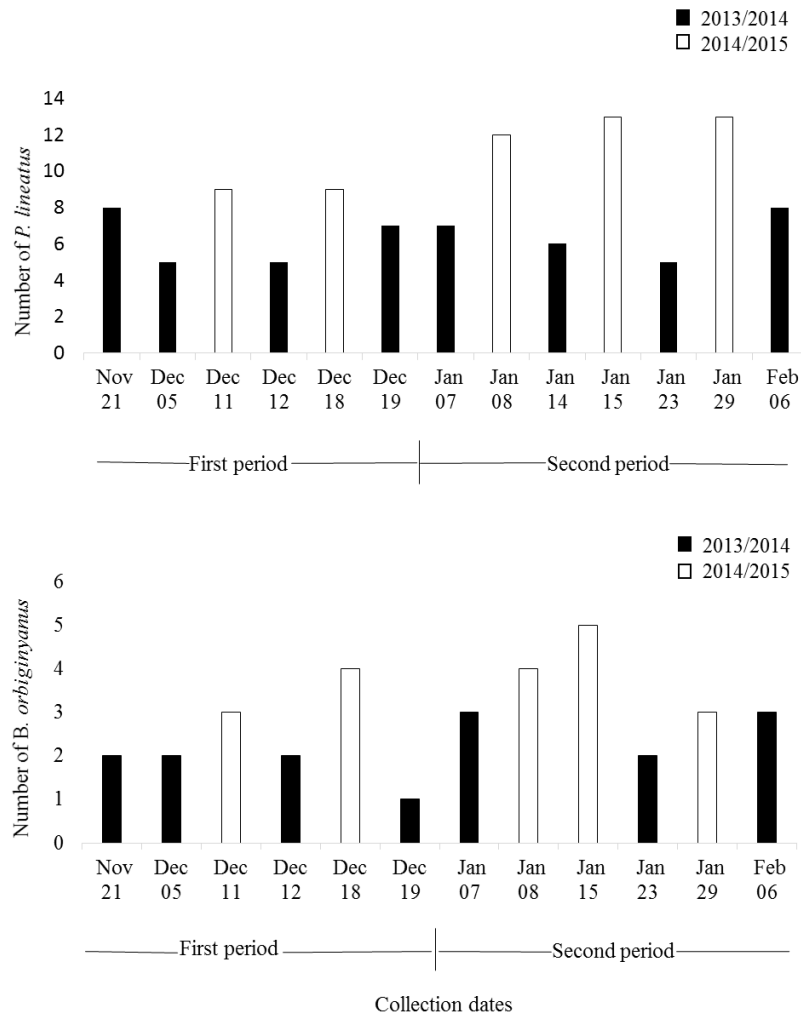
2 Materials and methods

All fish were handled following the guidelines for animal experimentation described by Van Zutphen et al. [11].

2.1 Fish handling and sperm collection

Prochilodus lineatus and *Brycon orbignyanus* males were selected during spawning season 2013-2014 and 2014-2015 at the Fish Culture Station of the Minas Gerais Power Company (CEMIG) in the city of Itutinga (21°17'36"S, 44°37'02"W), Minas Gerais State, Brazil. The spawning season was divided in two periods: the first period, November and December, with 43 *P. lineatus* and 14 *B. orbignyanus*, and the second period, January and February, with 64 *P. lineatus* and 20 *B. orbignyanus* males (Fig. 1; collection dates were set by the Fish Culture Station). Males with detectable traces of sperm released under soft abdominal pressure received intramuscular doses of carp pituitary extract (cPE; Argent Chemical Laboratories, Redmond, Washington, USA). *P. lineatus* males received two doses at 0.4 and 4 mg/kg BW in a 12 h interval and *B. orbignyanus* males received a single dose at 1 mg/kg BW, which is the routine method currently used to induce spermiation in the Fish Culture Station. The urogenital papilla was dried and 2 mL of *P. lineatus* sperm and 10 mL of *B. orbignyanus* sperm were gently hand-stripped directly into test tubes. Sperm collection was carried out at room temperature (25 to 27°C). Contamination of sperm with water, urine or feces was carefully avoided.

Figure 1 - Number of sperm donors of *Prochilodus lineatus* (top) and *Brycon orbignyanus* (bottom) and date of sperm collection carried out on spawning seasons 2013-2014 (black columns) and 2014-2015 (white columns). The spawning seasons were divided into first (November and December) and second period (January and February).



Immediately after collection, each sperm sample was subjectively evaluated for motility rate after activation in 100 mOsm/kg NaCl, using a light microscope (Eclipse E200, Nikon, Tokyo, Japan) at magnification: X 200. All

samples possessed motility above 90%. Tubes containing sperm were placed in a cooler (9-11°C) containing dry ice foam (Polar Technics CRI Ltd, São Paulo, Brazil) and transported by car in the cooler from CEMIG to the Laboratory of Semen Technology at Federal University of Lavras, in the city of Lavras (~60 km), where sperm analysis took place (see below).

2.2 Fresh sperm analysis

After ~3 h from collection, sperm features were estimated using the Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA) system according to the methodology used in our laboratory [12]. Briefly, motility was triggered in a 100 mOsm/kg NaCl solution at approximately 27°C directly in a Makler™ counting chamber (Sefi-Medical Instruments Ltd, Haifa, Israel) placed under a phase contrast microscope (Eclipse E200, Nikon, Tokyo, Japan), objective magnification: X 10, ocular magnification: X 10, with a green filter and phase one position. The microscope was connected to a video camera (Basler Vision Technologies™ A602FC, Ahrensburg, Germany) generating 100 images/s; video recording started 10 s post-activation. Each image was analyzed using the standard settings for fish by Sperm Class Analyzer™ software (SCA™ 2010, Microptics, S.L. Version 5.1, Barcelona, Spain). Motility rate, curvilinear velocity (VCL), straight-line velocity (VSL), average path velocity (VAP), and the beat cross frequency (BCF) were considered for analysis. For determination of these parameters, an average of 506 *P. lineatus* sperm tracks and 533 *B. orbignyana* sperm tracks for each straw was followed throughout the recorded video images from which sperm trajectories were evaluated. Sperm was evaluated at a final dilution ratio of 1 sperm: 100 activating agent.

2.3 Sperm cryopreservation and post-thaw sperm analysis

Sperm of each species was frozen according to the standard method previously developed in our laboratory over the last years. *P. lineatus* sperm was frozen in the laboratory ~3 h after collection and transportation according to our previous results [13]. The freezing medium was composed of methyl glycol [CH₃O (CH₂)₂OH] as cryoprotectant and 325 mOsm/kg glucose solution [14-16]. *B. orbignyanus* sperm, on the other hand, was frozen soon after collection, in the fish farm. The freezing medium was composed of methyl glycol [CH₃O (CH₂)₂OH] as cryoprotectant and 325 mOsm/kg NaCl solution [17]. Both glucose and NaCl solution were adjusted to pH of 7.6. All chemicals were purchased from Vetec Química Fina Ltda (Duque de Caxias, RJ, Brazil). Sperm sample of each male was diluted in the freezing medium to a ratio of 1 sperm: 8 extender: 1 methyl glycol [18]. Sperm was then drawn into unsealed 0.25 mL straws, in duplicate and frozen in nitrogen vapor (dry vapor shipper, Cryoport Systems, Brea, CA, USA) at approximately -170°C. Final dilution, loading and freezing (equilibration time) took exactly 15 min for *P. lineatus* and 10 min for *B. orbignyanus*. Within 24 h, all straws were transferred to a liquid nitrogen vessel (MVE XC 34/18, New Prague, MN, USA) for storage.

Cryopreserved sperm was first diluted 1:10 in the freezing medium, frozen, thawed and then further diluted 1:100 with the activating agents. Approximately six months later, straws were thawed in a 60°C water bath (Waterbath MA 127, Marconi, Piracicaba, Brazil) for 3 s and post-thaw sperm motility, velocities and BCF were estimated, as described for fresh sperm. An average of 616 *P. lineatus* sperm tracks and 417 *B. orbignyanus* sperm tracks for each straw was evaluated.

2.4 Statistical analysis

Data were expressed as average \pm standard deviation (SD). The statistical analysis were conducted using the R Development Core Team program version 2.11.0 (R Development Core Team, 2014). Data were tested for normal distribution using test Shapiro Wilk and for significant differences using analysis of multiple variance (MR-MANOVA), ANOVA. The level of significance for all statistical tests was set to 5% ($P < 0.05$).

3 Results

Quality and freezing ability of *P. lineatus* and *B. orbignyanus* sperm were not affected ($P>0.05$) by the two spawning seasons (data were pooled) nor throughout the spawning season. Fresh sperm always yielded higher ($P<0.05$) motility rate (Fig. 2), and all velocities (Fig. 3) but not BCF when compared with frozen sperm. Only VCL and VSL were graphically illustrated as VAP values followed the same pattern.

Figure 2 - Motility rate of fresh and frozen sperm evaluated during the spawning season of *Prochilodus lineatus* and *Brycon orbignyanus*. The spawning season was divided into first (November and December) and second period (January and February). Each column (black for fresh and white for frozen samples) and error bar represents mean \pm SD. ^{a,b}Means within the same period followed by different superscript differ (ANOVA; $P<0.05$). Motility rate within the same type of sperm (fresh or frozen) was not affected by spawning period ($P>0.05$).

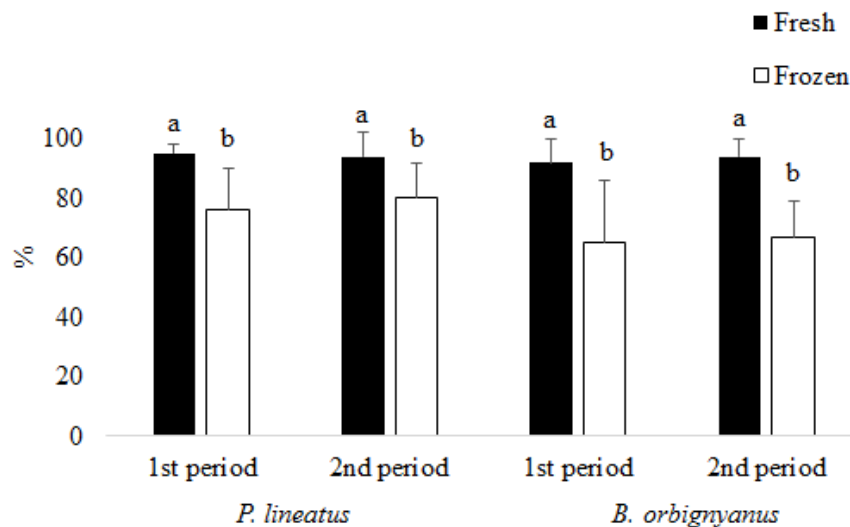
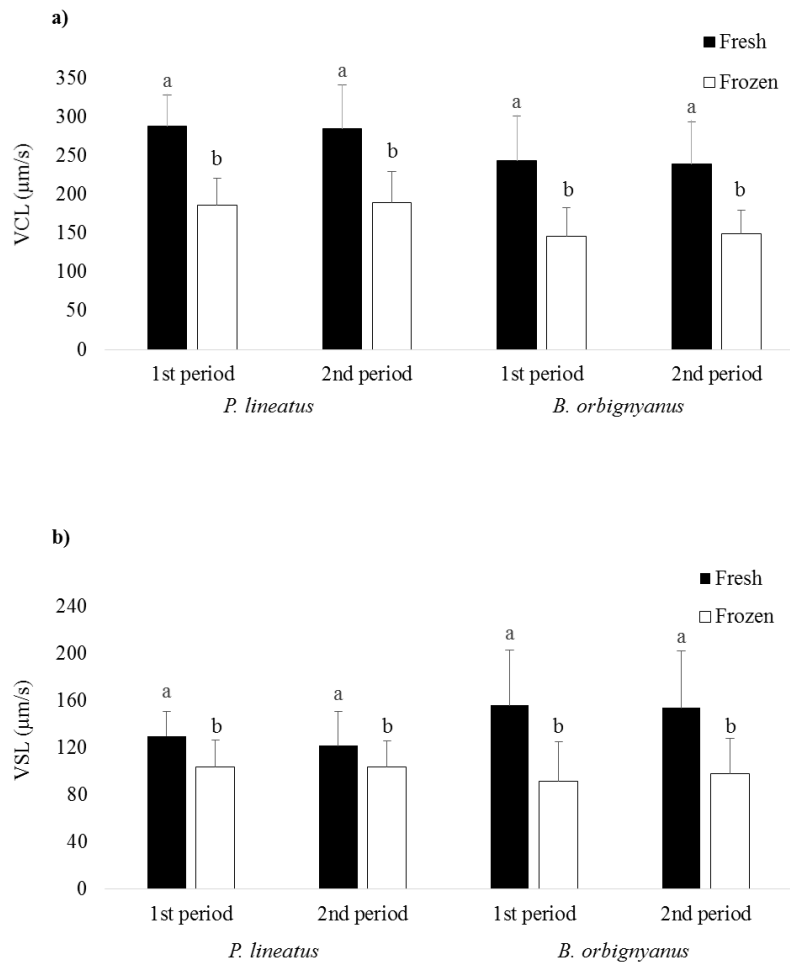


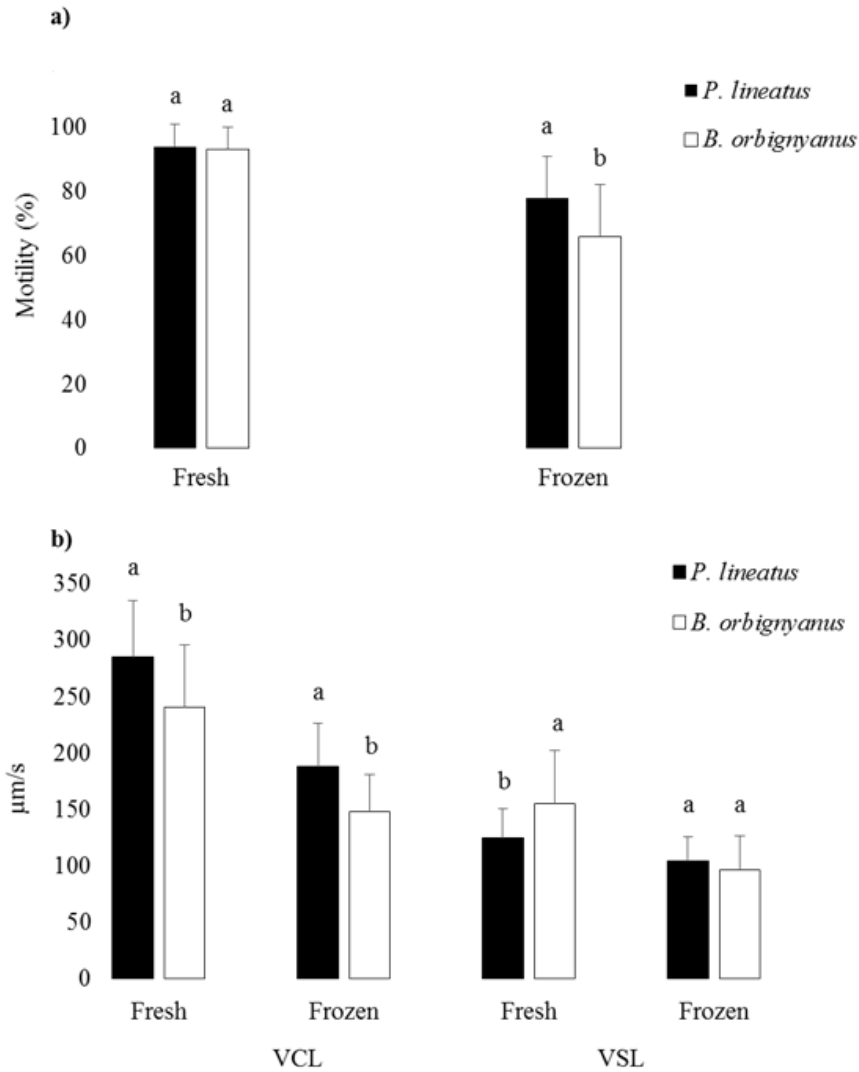
Figure 3 - Curvilinear velocity (a) and straight-line velocity (b) of fresh and frozen sperm evaluated during the spawning season of *Prochilodus lineatus* and *Brycon orbignyanus*. The spawning season was divided into first (November and December) and second period (January and February). Each column (black for fresh and white for frozen samples) and error bar represents mean \pm SD. ^{a,b}Means within the same period followed by different superscript differ ($P < 0.05$; Tukey). VCL and VSL within the same type of sperm (fresh or frozen) were not affected by spawning period ($P > 0.05$).



Taken the two periods of collection together, *P. lineatus* sperm features yielded motility of 94 to 95%, VCL of 285 to 288 $\mu\text{m/s}$, VSL of 122 to 130 $\mu\text{m/s}$, VAP of 236 to 239 $\mu\text{m/s}$, and BCF of 24 Hz/s in fresh samples, and motility of 76 to 80%, VCL of 186 to 189 $\mu\text{m/s}$, VSL of 104 $\mu\text{m/s}$, VAP of 156 $\mu\text{m/s}$ and BCF of 23 to 24 Hz/s in frozen samples. *B. orbignyana* sperm features yielded motility of 92 to 94%, VCL of 239 to 243 $\mu\text{m/s}$, VSL of 154 to 156 $\mu\text{m/s}$, VAP of 207 to 213 $\mu\text{m/s}$ and BCF of 27 Hz/s in fresh samples, and motility of 65 to 67%, VCL of 146 to 149 $\mu\text{m/s}$, VSL of 92 to 98 $\mu\text{m/s}$, VAP of 119 to 124 $\mu\text{m/s}$ and BCF of 24 to 25 Hz/s in frozen samples, regardless of the period of spawning season.

Comparing both species, higher ($P < 0.05$) motility in frozen sperm and higher ($P < 0.05$) VCL and VAP in both fresh and frozen sperm were observed in *P. lineatus*, while higher ($P < 0.05$) fresh VSL and fresh and frozen BCF were observed in *B. orbignyana* (Fig 4).

Figure 4 - Sperm motility (top), sperm curvilinear velocity (VCL) and straight-line velocity (VSL) (bottom) of fresh and frozen sperm of *P. lineatus* (black columns) compared to *B. orbignyana* (white columns). Each column and error bar represents mean \pm SD. ^{a,b}Means within fresh and frozen columns followed by different superscript differ ($P < 0.05$).



4 Discussion

Fish sperm quality differs among species [5], among individuals of the same species, the resting period, the spawning induction method and during the spawning season [19-21]. These differences may be related to environmental conditions as temperature and photoperiod, sperm contamination, stress, hormonal regulation of spermiation, secretory activity of the sperm duct, stage of maturation, enzymatic activity, sperm morphology, ATP content, or a combination of these factors [22]. The evaluation of sperm quality throughout the spawning season has been used to assess the impacts of sperm aging on viability and reproductive success of fish populations. In the present study, sperm quality and its freezing ability were evaluated during two spawning seasons in *P. lineatus* and *B. orbignyanus*. The difference of sperm quality between the two seasons and over each season is discussed.

In the present study, no significant change was observed on sperm motility, velocities and BCF or its freezing ability between the two spawning seasons or over the spawning season in both *P. lineatus* and *B. orbignyanus*. However, changes on sperm quality over the spawning season have been reported in teleost species. In rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, sperm motility decreased from the beginning to the end of the spawning season [23] while in common carp *Cyprinus carpio*, sperm motility was significantly greater in the last three months (May, June, July) when compared to the first sampling month (March) [24]. In Caspian roach *Rutilus rutilus caspicus*, sperm motility increased from the beginning to the middle of the spawning period and then decreased towards the end of the season [5]. Furthermore, in Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*, sperm velocities decreased from the beginning to the end of the spawning season [7] while in common barbel *Barbus barbus*, sperm velocities increased from the beginning to the middle of the spawning season and declined

thereafter [8]. Contrasting results were reported for Atlantic cod *Gadus morhua*; in one study sperm velocities increased significantly during the middle of the spawning season compared with the beginning and the end [25] while in another, velocities increased throughout the entire spawning season [9].

In this study, sperm collection took place from late November to early February, when temperature is high and water level rises in the rivers as these months coincide with the rainy season. According to the literature, *P. lineatus* spawning season lasts from October to March [26, 27, 28, 29] while in *B. orbignyanus*, it lasts from November to February [30, 31]. The beginning and the end of the spawning season also depend on the year of collection, as the variation of rainfall over the years and in each region is variable [32], advancing or extending this period. With this in mind, it is possible that we may have missed the very beginning and the very end of the season, mainly in *P. lineatus*, when sperm might have showed lower quality compared with that collected during the middle of the season.

When sperm was submitted to the freezing and thawing processes, motility rate decreased when compared with fresh sperm, of both species. The cryopreservation of fish sperm optimizes the artificial fertilization processes [33] in one hand, but leads to a great cellular stress and imposes sperm extremely unfavorable conditions for maintaining its viability, on the other [34]. In the present study, the sensitivity of sperm to these negative effects was different between the two species. *P. lineatus* sperm motility decreased from 94 to 78%, while in *B. orbignyanus*, this difference was more intense from 93 to 66%. Similarly in another study, *P. lineatus* sperm yielded a higher post-thaw motility (overall = 56%) compared with *B. orbignyanus* sperm (overall = 30%) [16]. These results suggest that *P. lineatus* sperm is more resistant to dehydration and rehydration events than *B. orbignyanus* sperm. A decrease on post-thaw sperm motility compared to fresh sperm has also been demonstrated in Cypriniformes

such as barbel *Barbus barbus* (from 82% in fresh to 51% in frozen) [35], chub *Leuciscus cephalus* (from 82% in fresh to 60% in frozen) [35] and common carp *Cyprinus carpio L.* (from 62% in fresh to 25% in frozen) [36], in Siluriformes as African catfish *Clarias gariepinus* (from 99% in fresh to 71% in frozen) [37], among others.

With the advance of the evaluation methods for sperm quality, such as the CASA system, sperm velocities have been correlated to the reproductive success in fishes [15,37,38]. In *P. lineatus*, it has been reported a high correlation between VCL and fertilization success [15]. In the present study, VCL of fresh sperm was higher in *P. lineatus*, which implies a faster real sperm trajectory compared to *B. orbignyanus* sperm. On the other hand, VSL of fresh sperm was higher in *B. orbignyanus*, which implies a more regular and linear trajectory with little lateral movement compared to *P. lineatus* sperm. Going through the data over the last five spawning seasons of the same fish farm where sperm was collected (unpublished data), we observed a better average fertilization rate for *P. lineatus* (55%) than for *B. orbignyanus* (40%). Surely, fertilization rates depend mainly on the quality of oocytes, but the importance of males in this process is also notable. Besides, the genus *Brycon* is highly affected by environmental changes, and many species are in the red list of Brazilian threatened fauna [39], which confirms a greater difficulty of this species in the success of reproduction. *P. lineatus*, on the other hand, is better adapted to captivity and has also artificial fertilization methods well established.

5 Conclusions

No changes on sperm motility, velocities, BCF and the freezing capacity over the spawning season in *P. lineatus* and *B. orbignyanus* were observed in this study. It suggests that sperm of both species, and possibly of other Neotropical species as well, are relatively resistant to environmental changes. Although difference on male gamete quality was not observed, we recommend evaluating the female's reproductive parameters, as oocyte quality (mainly yolk quality) is more vulnerable and sensitive, and strongly depends on the female nutrition, which in turn depends on the environment. *B. orbignyanus* sperm is more sensitive to the cryopreservation process than *P. lineatus* sperm.

Declaration of interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

Acknowledgements

This study received funding from the Brazilian fostering agencies CNPq (PQ 302434/2011-9). This research is part of I. M. Di Chiacchio's MSc project (161754/2014-7). The authors thank Flavio H. Siqueira and Manoel V. Oliveira (CEMIG) for providing the broodfish, and Gilson A. Azarias and Jailson M. Silva (CEMIG, Itutinga) for assistance during fish injection and sperm collection, and P. H. Siqueira and Z. A. Isaú (DZO, UFLA) for assistance on sperm analysis.

References

- [1] Maria AN, Viveiros ATM, Freitas RTF, Oliveira AV. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. *Aquaculture* 2006;260:298–306.
- [2] Godinho AL, Godinho HP. Ecology and conservation of fish in Southeastern Brazilian river basins submitted to hydroelectric impoundments. *Acta Limnol. Bras* 1994;5:187-97.
- [3] Godinho HP. Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aqüicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. *Rev Bras Reprod Anim* 2007;31:351-60.
- [4] Crim LW. Environmental modulation of annual and daily rhythm associated with reproduction in teleost fishes. *Can J Fish Aquat Sci* 1982;39:17–21.
- [5] Golpour A, Akhoundian M, Khara H, Rahbar M, Dadras H. Changes of sperm quality parameters in Caspian roach (*Rutilus rutilus caspicus*) during spawning migration. *Czech J Anim Sci* 2013;58:117–24.
- [6] Rideout RM, Trippel EA, Litvak MK. Relationship between sperm density, spermatocrit, sperm motility and spawning date in wild and cultured haddock. *J Fish Biol* 2004;65:319–32.
- [7] Babiak I, Ottesen O, Rudolfson G, Johnsen S. Quantitative characteristics of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L., semen throughout the reproductive season. *Theriogenology* 2006;65:1587–604.
- [8] Alavi SMH, Psenicka M, Rodina M, Policar T and Linhart O. Changes of sperm morphology, volume, density and motility and seminal plasma composition in *Barbus barbus* (Teleostei: Cyprinidae) during the reproductive season. *Aquat Living Resour* 2008;21:75–80.
- [9] Butts IAE, Litvak MK, Trippel EA. Seasonal variations in seminal plasma and sperm characteristics of wild-caught and cultivated Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Theriogenology* 2010;73:873–85.

- [10] Kavamoto ET, Mainardes-Pinto CSR, Andrade-Talmelli EF, Campos BES. Produção espermática do curimatá *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881. Bol Inst Pesca 1997;24:73-8.
- [11] Van Zutphen LF, Baumans V, Beynen AC. Principles of laboratory animal science, Revised edition. Amsterdam: Elsevier, 2001; p. 1–428.
- [12] Viveiros ATM, Gonçalves ACS, Di Chiacchio IM, Nascimento AF, Romagosa E, Leal MC. Gamete quality of streaked prochilod *Prochilodus lineatus* (Characiformes) after GnRH α and dopamine antagonist treatment. Zygote 2015a; 23:212-21.
- [13] Viveiros ATM, Di Chiacchio IM, Almeida ILG, Taffarel TF, Leal MC. Storage and transportation of *Prochilodus lineatus* (Characiformes) sperm prior to cryopreservation. Gen. Comp. Endocrin. In press.
- [14] Viveiros ATM, Orfão LH, Maria AN, Allaman IB. A simple, inexpensive and successful freezing method for curimba *Prochilodus lineatus* (Characiformes) semen. Anim. Reprod. Sci. 2009;112:293-300.
- [15] Viveiros ATM, Nascimento AF, Orfão LH, Isaú ZA. Motility and fertility of the subtropical freshwater fish streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) sperm cryopreserved in powdered coconut water. Theriogenology 2010;74:551-56.
- [16] Viveiros ATM, Nascimento AF, Leal MC, Gonçalves ACS, Orfão LH, Cosson J. Methyl glycol, methanol and DMSO effects on post-thaw motility, velocities, membrane integrity and mitochondrial function of *Brycon orbignyanus* and *Prochilodus lineatus* (Characiformes) sperm. Fish Physiol. Biochem. 2015c; 41:193-201.
- [17] Lopez Galvis DI, Leal MC, Viveiros ATM. Extender composition and osmolality affects post thaw motility and velocities of piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1850) (Characiformes) sperm. J. Appl. Ichthyol 2015;31:114–18.

- [18] Viveiros ATM, Leal MC. Sperm dilution ratio affects post-thaw motility rate and velocity of *Prochilodus lineatus* (Characiformes) sperm. Zygote. In press.
- [19] Piironen J. Variation in the properties of milt from the Finnish landlocked salmon (*Salmo salar* m. sebago Girard) during a spawning season. Aquaculture 1985;48:337–50.
- [20] Koldras M, Loir M, Maise G, Le Gac F. Study of the composition of seminal fluid and sperm motility along the genital tract, during a spawning season in the rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). Aquat Living Resour 1996;9:337–45.
- [21] Ramirez-Merlano J. Variación estacional de las características seminales del bagre rayado *Pseudoplatystoma metaense* (Telostei, pimelodidae). Rev MVZ Córdoba 2011;16:2336-48.
- [22] Alavi SMH, Cosson JJ, Coward K, Rafiee G, editors. Fish Spermatology. Alpha Science International Ltd; 2008
- [23] Munkittrick KR, Moccia RD. Seasonal changes in the quality of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) semen: effect of a delay in stripping on spermatocrit, motility, volume and seminal plasma constitutions. Aquaculture 1987;64:147-56.
- [24] Christ SA, Toth GP, Mccarthy HW, Torsella JA, Smith MK. Monthly variation in sperm motility in common carp assessed using computer-assisted sperm analysis (CASA). J Fish Biol 1996;48:1210-22.
- [25] Rouxel C, Suquet M, Cosson J, Severe A, Quemener L, Fauvel C. Changes in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) sperm quality during the spawning season. Aquacult Res 2008;39:434–40.
- [26] Barbieri G, Salles FA, Cestarolli MA. Análise populacional do curimatá *Prochilodus lineatus*, do rio Mogi-Guaçu, Pirassununga/SP (Characiformes, Prochilodontidae). Bol. Inst. Pesca 2000;26:137-45.
- [27] Ramos RO, Peret AC, Ramos SM, Melo JSC. Parâmetros reprodutivos do curimatá no rio Mogi-Guaçu. Rev Ceres 2010;57:520-25.

- [28] Godoy MP. Dez anos de observações sobre periodicidade migratória de peixes do rio Mogi Guassu. *Rev Bras Biol* 1967; 27:1-12.
- [29] Hardt E, Peret AC, Pereira-Silva EFL. Dinâmica reprodutiva e atividade alimentar do curimatá (*Prochilodus lineatus* Steindachner, 1881) em dois ambientes aquáticos da Estação Ecológica de Jataí. In: Santos JE, Pires JSR, Moschini LE, editors. *Estudos integrados em ecossistemas: Estação Ecológica de Jataí*, São Carlos: Rima Editora; 2006, p. 325-37.
- [30] Mata RA, Leme dos Santos HS. Alterações morfométricas nas células gonadotróficas da piracanjuba, *Brycon orbignyanus*, durante o ciclo reprodutivo. *Ars Vet* 2003;19:1-7.
- [31] Reynalte-Tataje D, Zaniboni-Filho E, Esquivel JR. Embryonic and larvae development of piracanjuba, *Brycon orbignyanus* Valenciennes, 1849 (Pisces, Characidae). *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, Maringá 2004;26:67-71.
- [32] Walther G, Post E, Convey P, Menzel A, Parmesan C, Beebee TJC, et al. Ecological responses to recent climate change. *Nature*, 2002; 416:389-95.
- [33] Kopeika E, Kopeika J. Variability of sperm quality after cryopreservation in fish. In: Alavi SMH, Cosson JJ, Coward K, Rafiee G, editors. *Fish spermatology*, Alpha Science Inc: Oxford; 2008, p. 347–96.
- [34] Purdy PH. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Rumin Res* 2006;63:215-25.
- [35] Lahnsteiner F, Berger B, Horvath A, Urbanyi B, Weismann T. Cryopreservation of spermatozoa in cyprinid fishes. *Theriogenology* 2000;54:1477-98.
- [36] Warnecke D, Pluta HJ. Motility and fertilizing capacity of frozen/thawed common carp (*Cyprinus carpio* L.) sperm using dimethyl-acetamide as the main cryoprotectant. *Aquaculture* 2003;215:167-85.
- [37] Rurangwa E, Volckaert FA, Huyskens G, Kime DE, Ollevier F. Quality control of refrigerated and cryopreserved semen using computer-assisted sperm

analysis (CASA), viable staining and standardized fertilization in African catfish (*Clarias gariepinus*). Theriogenology 2001;5:751–69.

[38] Urbach D, Bittner D, Lenz TL, Bernet D, Wahli T, Wedekind C. Sperm velocity in an Alpine whitefish: effects of age, size, condition, fluctuating asymmetry and gonad abnormalities. J Fish Biol 2007;71:672–83.

[39] Rosa RS, Lima FCT. Os peixes ameaçados de extinção. In: Machado ABM, Drummond GM, Paglia AP (eds) Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. Ministério do Meio Ambiente/Fundação Biodiversitas, Brasília, 2008; 9–285.