



DOMINGA ISABEL LÓPEZ GALVIS

**EFEITO DA COMPOSIÇÃO E OSMOLALIDADE
DO DILUIDOR NA QUALIDADE DO SÊMEN
CRIOPRESERVADO DE PIRACANJUBA *Brycon*
orbignyianus (CHARACIFORMES)**

LAVRAS - MG

2014

DOMINGA ISABEL LÓPEZ GALVIS

**EFEITO DA COMPOSIÇÃO E OSMOLALIDADE DO DILUIDOR NA
QUALIDADE DO SÊMEN CRIOPRESERVADO DE PIRACANJUBA**

Brycon orbignyanus (CHARACIFORMES)

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. Ana Tereza de Mendonça Viveiros

Coorientador

Dr. Marcelo de Castro Leal

LAVRAS - MG

2014

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Galvis, Dominga Isabel López.

Efeito da composição e osmolalidade do diluidor do sêmen
criopreservado de piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Characiformes)
/ Dominga Isabel López Galvis. – Lavras : UFLA, 2014.
62 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.
Orientador: Ana Tereza de Mendonça Viveiros.
Bibliografia.

1. Computer Assisted Sperm Analysis - CASA. 2. Meio
imobilizador. 3. NaCl. 4. Glicose. I. Universidade Federal de
Lavras. II. Título.

CDD – 639.3752

DOMINGA ISABEL LÓPEZ GALVIS

**EFEITO DA COMPOSIÇÃO E OSMOLALIDADE DO DILUIDOR NA
QUALIDADE DO SÊMEN CRIOPRESERVADO DE PIRACANJUBA**

Brycon orbignyanus (CHARACIFORMES)

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 27 de fevereiro de 2014.

Dr. Rilke Tadeu Fonseca de Freitas UFLA

Dr. Juliano Vogas Peixoto UFLA

Dra. Ziara Aparecida Isaú IFSULDEMINAS/Inconfidentes

Dra. Ana Tereza de Mendonça Viveiros
Orientadora

LAVRAS - MG

2014

A Deus, pela vida e por todas as bênçãos recebidas;

Aos meus pais Julio Carlos e Alicia, pelo apoio, orações e amor incondicional;

Aos meus irmãos Marisol, Julio Carlos e José Hilário, pelo carinho e incentivo;

A minha tia Rosmary, pela confiança, apoio e carinho, saiba que considero você como uma mãe!;

Aos meus tios Juan e Martha por terem estendido o seu braço quando mais precisei;

As minhas primas Ana Mary, Ana Cecília e Maria Raquel, pelo carinho, amizade e contínua comunicação! Considero vocês minhas irmãs;

Aos demais familiares pelo apoio, motivação e confiança.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as bênçãos recebidas ao longo desse tempo, por me guiar e por me dar forças nos momentos de angústia. Esta etapa foi vencida devido a sua presença em minha vida!;

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Zootecnia, pela oportunidade oferecida de realização do mestrado;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela concessão da bolsa de estudos via programa estudante, convênio de Pós-graduação - PEC-PG;

À Fundação para o Futuro da Colômbia – COLFUTURO, pelo apoio financeiro para realizar os meus estudos fora da Colômbia;

À minha orientadora Prof^a Ana Viveiros, pela oportunidade, orientação, incansável dedicação, ensinamentos e exemplo profissional;

Ao meu coorientador Dr. Marcelo Leal, pelos auxílios prestados ao longo da realização do trabalho, principalmente nas análises do CASA;

À toda equipe do Laboratório de Tecnologia de Sêmen: Tais Taffarel, Antônio Gonçalves, Daniele Rosseto, Thales França, Marina Lemes, Lays Pereira, Marina Curi, Lidiane Lemes e Camilla Silveira, pelo acolhimento, amizade, companheirismo e auxílio prestado em campo e no laboratório;

À minha querida família em Lavras: Martha Prieto Guevara, Yamid Hernández Julio, Jorge Enrique Romero e minha irmãzinha Gabi, pela grande acolhida, apoio, amizade e carinho ainda desde a Colômbia e ao longo desses dois anos, a minha profunda gratidão;

Às minhas amigas-irmãs e colegas de casa Verónica Bonilla, Elidiane da Silva e Maíra Toma, obrigada pela amizade, carinho, ensinamentos, conselhos, paciência e solidariedade. Obrigada, por terem aberto as portas da nossa casa para que eu fosse parte desse nosso lar;

Aos meus caros amigos Neira Perez, Diana Domingu, Chary Rojas, Manuel Bobadilla, Liliana Estupiñan, Fábio Gomes, Janaina Mauri, Wesley Fernandes Braga, Jordano Salamanca, Sly Wongchuig e Maria Eugênia, obrigada pelo carinho, amizade, conselhos, paciência e por fazer os meus dias menos difíceis longe de casa. Sentirei muito a falta de todos;

Ao secretário da Pós-Graduação em Zootecnia, Carlos H. de Souza, pela atenta disposição e prontidão nos momentos que precisei;

À estação de piscicultura da Companhia Energética de Minas Gerais (CEMIG), unidade de Itutinga e aos técnicos Gilson A. Azarias e Jaílson M. Silva, pela prontidão e auxílio na realização dos experimentos;

A todos os que participaram desta longa jornada, que estenderam a sua e me brindaram com sua solidariedade mão, nestes dois anos longe da minha casa.

Muito obrigada!!

RESUMO

A piracanjuba *Brycon orbignyanus* é um peixe da ordem Characiformes, nativo da América do Sul. As mudanças no curso do rio, urbanização, poluição e construção de hidrelétricas são algumas das razões pelas quais o *B. orbignyanus* está atualmente classificado como uma espécie ameaçada de extinção. A criopreservação de sêmen de peixes fornece uma ferramenta pela qual a reprodução é otimizada, melhorando os programas de conservação e melhoramento genético das espécies. Um meio de congelamento ideal deve evitar o início da motilidade espermática, durante o armazenamento. Objetivou-se, neste trabalho, avaliar o efeito da composição e da osmolalidade do diluidor, na qualidade do sêmen criopreservado de *B. orbignyanus*. Os machos de *B. orbignyanus* foram selecionados em tanques de terra na Estação de Piscicultura da CEMIG, em Itutinga, durante o período reprodutivo (Dezembro a Fevereiro). Os machos receberam dose única de extrato pituitário de carpa e o sêmen foi coletado 8-10 horas depois. A osmolalidade do plasma seminal foi mensurada (249 mOsm kg^{-1}). Oito diluidores compreendendo a combinação de duas composições (NaCl e Glicose) e quatro osmolalidades (285, 325, 365 e 405 mOsm kg^{-1}) foram testados. O metilglicol foi usado como agente crioprotetor. O sêmen diluído foi envasado em palhetas de 0,25mL, congelado em botijão de vapor de nitrogênio (*dry shipper*) e armazenado em botijão de nitrogênio líquido. As palhetas foram descongeladas em banho- maria a 60°C por três segundos e o sêmen foi imediatamente avaliado quanto à taxa de motilidade e velocidades (curvilínea = VCL; linear = VSL e média de percurso = VAP), utilizando-se o sistema CASA. A composição e osmolalidade do diluidor afetaram a qualidade espermática pós-descongelamento. Em geral, o sêmen criopreservado em NaCl foi de melhor qualidade do que o sêmen criopreservado em glicose, e a 285 e 325 mOsm kg^{-1} melhor do que a 365 e 405 mOsm kg^{-1} . A maior qualidade pós-descongelamento foi observada apenas nas amostras congeladas em NaCl a 285 mOsm kg^{-1} , com motilidade acima de 60% e VCL acima de $140 \mu\text{m s}^{-1}$. O sêmen de *B. orbignyanus* deve ser criopreservado em solução de NaCl preparada em uma osmolalidade superior a do plasma seminal e usado, tanto para fins de aquicultura, quanto para programas de conservação, uma vez que *B. orbignyanus* é uma espécie ameaçada.

Palavras-chave: CASA. Meio imobilizador. NaCl. Glucose.

ABSTRACT

The piracanjuba *Brycon orbignyanus* is a Characiformes order fish, native to South America. Changes in the river stream, urbanization, pollution and hydroelectric dams are some of the reasons why the *B. orbignyanus* is currently classified as an endangered species. The cryopreservation of fish sperm provides a tool by which reproduction is optimized, improving breeding and fish conservation programs. An optimum freezing medium should prevent the initiation of sperm motility during storage. The aim of this study was to evaluate the effects of extender composition and osmolality on post-thaw quality of *B. orbignyanus* sperm. *B. orbignyanus* males were selected from earthen ponds at the Fish Culture Station of the Minas Gerais Power Company (CEMIG) in the city of Itutinga, MG, Brazil, during the spawning season (December to February). Males received a single intramuscular dose of carp pituitary extract and sperm were hand-stripped 8-10 h later. Seminal plasma osmolality was measured (249 mOsm kg⁻¹). Eight extenders comprising combinations of two compositions (NaCl and glucose) and four osmolalities (285, 325, 365 and 405 mOsm kg⁻¹) were tested. Methyl glycol was used as cryoprotectant. Diluted sperm was loaded into 0.25 mL straws, frozen in a nitrogen vapor vessel (*dry shipper*) and stored in a liquid nitrogen vessel. Straws were thawed in a water bath at 60°C for 3 s and sperm was immediately evaluated for motility rate and velocities (curvilinear = VCL; straight line = VSL; average path = VAP), using CASA system. Both extender composition and osmolality affected post-thaw sperm quality. In general, sperm cryopreserved in NaCl was of better quality than that sperm cryopreserved in glucose and at 285 and 325 mOsm kg⁻¹ better than that at 365 and 405 mOsm kg⁻¹. High post-thaw quality, was observed only in samples frozen in NaCl at 285 mOsm kg⁻¹, with motility above 60% and VCL above 140 $\mu\text{m s}^{-1}$. Sperm should be cryopreserved in NaCl solution prepared at an osmolality just above seminal plasma osmolality, and used for both aquaculture purposes and for conservational programs, since *B. orbignyanus* is a threatened species.

Keywords: CASA. Immobilizing médium. NaCl. Glucose.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

Figura 1	Exemplar de <i>Brycon orbignyana</i>	14
Figura 2	Cascata dos eventos desencadeadores da motilidade espermática..	20
Figura 3	Sistema Computadorizado de Análise do Sêmen (CASA).....	23
Figura 4	Esquema das velocidades espermáticas (VCL, VSL e VAP).....	24

SEGUNDA PARTE

ARTIGO 1

Fig 1. Motility rate (A), curvilinear (VCL; B), straight-line (VSL; C) and average path (VAP; D) velocities of <i>Brycon orbignyana</i> sperm cryopreserved in eight extenders composed of 2 compositions (NaCl=closed circles; glucose=open circles) x 4 osmolalities. Each dot and error bar represents mean $\pm$ SD (n=3 replicate straws x 10 males).....	47
--	----

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

- Table 1. Body weight and some fresh sperm features of *Brycon orbignyanus* (n=10 males; mean $\pm$ SD; minimum-maximum values) after carp pituitary treatment.....46
- Table 2. Composition and osmolality of some extenders tested during the cryopreservation of fish sperm of the genus *Brycon*.....49

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	
1	INTRODUÇÃO 12
2	REFERENCIAL TEÓRICO 14
2.1	<i>Brycon orbignyanus</i>..... 14
2.2	Criopreservação de sêmen de peixes 15
2.3	Diluidores e osmolalidade..... 17
2.4	Sistema Computadorizado de Análise de Sêmen (CASA) 22
	REFERÊNCIAS 25
	SEGUNDA PARTE – ARTIGO 33
	ARTIGO 1 Extender composition and osmolality affects
	post-thaw sperm motility and velocities of Piracanjuba <i>Brycon</i>
	<i>orbignyanus</i> (Characiformes) sperm 33

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

As populações de peixes que realizam migrações reprodutivas têm diminuído bastante nos últimos anos devido à construção de barragens hidrelétricas que constituem uma barreira intransponível na rota migratória desses peixes, prejudicando, e muitas vezes, impedindo a sua reprodução. Dessa forma, esses habitats não podem mais cumprir seu papel de maternidade e berçário para esses peixes também conhecidos como peixes de piracema, diminuindo sensivelmente a população piscícola e colocando várias dessas espécies em perigo de extinção.

O gênero *Brycon*, família Characidae, é altamente afetado por essas mudanças e muitas espécies estão na lista vermelha da fauna brasileira ameaçadas de extinção, tais como piracanjuba (*Brycon orbignyanus*), pirapitinga-do-sul (*Brycon opalinus*), piabanha (*Brycon insignis*) e pirapitinga (*Brycon nattereri*) (ROSA; LIMA, 2008). Assim, torna-se imperiosa e urgente a adoção de práticas de conservação genética para essas espécies, por meio da criopreservação.

A criopreservação de sêmen, utilizando diluidores alternativos a um baixo custo, pode contribuir para a recuperação desses estoques. O uso de diluidores na criopreservação é uma etapa fundamental para a conservação das células em baixas temperaturas. Um bom diluidor deve apresentar características físico-químicas semelhantes a do plasma seminal da espécie, tal como osmolalidade, pH, carboidratos (como fonte de energia), íons para auxiliar na regulação da osmolalidade e controle da motilidade, e demais substâncias como proteínas e fatores de crescimento. Além de apresentar baixa toxicidade quando

misturado com o crioprotetor, para manutenção da integridade celular, durante e após o descongelamento.

Diante destas circunstâncias estudos sobre os efeitos da composição e osmolalidade do diluidor sobre a indução e supressão da motilidade espermática ainda são necessários para melhorar, tanto as técnicas de fertilização artificial, quanto as técnicas de preservação. Objetivou-se, no presente trabalho, avaliar o efeito da composição e osmolalidade do diluidor na qualidade do sêmen criopreservado de piracanjuba *Brycon orbignyanus*, utilizando-se o Sistema Computarizado de Análise de Sêmen (CASA).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Brycon orbignyanus*

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Clase: Actinopterygii

Ordem: Characiformes

Família: Characidae

Subfamília: Bryconinae

Gênero: Brycon

Espécie: *Brycon orbignyanus*, VALENCIENES 1849



Figura 1 Exemplar de *Brycon orbignyanus*

Fonte: Fishbase (2013)

O *Brycon orbignyanus* (Figura 1), popularmente conhecido como piracanjuba, é um peixe migratório que se encontra distribuído na bacia Paraná-Uruguai, principalmente nos rios Grande e Paraná (CASTAGNOLLI, 1992). A piracanjuba é uma espécie de porte médio a grande, atingindo os 80 cm e pesando até 8,2 Kg. O corpo é alongado e lateralmente comprimido. Apresenta boca terminal, com dentes cônicos dispostos em três séries no pré-maxilar e duas no dentário. A coloração do dorso é castanho escuro, clareando no sentido do

ventre. A cauda apresenta uma mancha negra que se estende do pedúnculo caudal até os raios medianos da nadadeira caudal. As nadadeiras caudal, anal e ventrais são avermelhadas (COMPANHIA ENERGÉTICA DE MINAS GERAIS - CEMIG; FUNDAÇÃO CENTRO TECNOLÓGICO DE MINAS GERAIS - CETEC, 2000). A piracanjuba prefere os ambientes lóticos de águas claras, sendo encontrada nos locais em que as árvores se deitam sobre o rio. É onívora, podendo se alimentar de plantas, frutos, pequenos peixes e insetos. Essa espécie é reofílica, assim como todas da subfamília Bryconinae, e realiza migração reprodutiva entre setembro e outubro, para desovar entre novembro e janeiro. A piracanjuba tem despertado grande interesse, não só por sua carne de excelente qualidade, mas também por ser muito apreciada em pescas esportivas, devido ao seu comportamento agressivo quando fisgado, além de apresentar rápido crescimento e facilidade de criação (VAZ; TORQUATO; BARBOSA, 2000).

As populações de piracanjuba eram especialmente abundantes na bacia do alto no Paraná, na calha e em seus principais tributários, como o Rio Grande, Tiete e Paranapanema (MACHADO, 2005). No entanto, recentemente foi classificada como uma das espécies da fauna brasileira em perigo de extinção (ROSA; LIMA, 2008), não sendo mais encontrada em vários trechos do rio Grande por não conseguir realizar migração reprodutiva, devido ao grande número de barragens hidrelétricas encontradas nos rios, à degradação ambiental e à pesca predatória.

2.2 Criopreservação de sêmen de peixes

A criopreservação é uma técnica bastante empregada para a conservação do sêmen de diferentes espécies de peixes, incluindo as espécies 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 et al., 2004). Segundo Godinho (2000) as aplicações de bancos de sêmen em programas de conservação de recursos genéticos em piscicultura incluem:

- a) a recuperação de estoques silvestres ameaçados de extinção;
- b) a redução do número de reprodutores (machos), utilizados em programas de propagação artificial, com consequente redução de custos;
- c) a eliminação do problema da assincronia na maturidade gonadal entre reprodutores, principalmente das espécies migratórias (ou de piracema), quando machos e fêmeas não estão preparados simultaneamente para a reprodução. Através da preservação do sêmen, os gametas masculinos são armazenados por um determinado tempo até que os gametas femininos estejam disponíveis;
- d) o estabelecimento de programas de melhoramento genético com a utilização de machos selecionados ou manipulados geneticamente (triplóides transgênicos);
- e) a facilidade de transporte, difusão e troca de material genético entre organizações atuantes na área, com risco reduzido de transmissão de patógenos;
- f) o fornecimento de materiais genéticos para a identificação de populações ou estoques, através de técnicas de biologia molecular;
- g) o estabelecimento de programa de hibridização, utilizando espécies com períodos reprodutivos diferentes.

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, à 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 da célula espermática (KOPEIKA; KOPEIKA, 2008).

No Brasil, o uso de sêmen criopreservado em pisciculturas é bastante limitado. Embora, existam muitos protocolos de congelamento de sêmen de peixes neotropicais já testados e publicados em piracanjuba *B. orbignyanus* (CAROLSFELD et al., 2003; MARIA et al., 2006a, 2006b; VIVEIROS; GONÇALVES; LEAL, 2014), em dourado *Salminus brasiliensis* (CAROLSFELD et al., 2003; CÓSER; GODINHO; RIBERIO, 1984; VIVEIROS et al., 2009a), em pirapitinga *B. nattereri* (VIVEIROS et al., 2012c), em pirapitinga do sul *B. opalinus* (VIVEIROS et al., 2012a), em piabanha *B. insignis* (VIVEIROS et al., 2011, 2012b), em curimba *Prochilodus lineatus* (CAROLSFELD et al., 2003; FELIZARDO et al., 2010; MURGAS et al., 2007; VIVEIROS et al., 2009b, 2010) e em pacu *Piaractus mesopotamicus* (ORFÃO et al., 2010), ainda são necessárias muitas pesquisas para aprimorar esta tecnologia.

2.3 Diluidores e osmolalidade

No processo de criopreservação, o sêmen antes de ser congelado, necessita ser diluído em meio contendo diluidor e crioprotetor. Os diluidores têm por função nutrir, proteger e conservar viáveis os espermatozoides durante a estocagem em baixas temperaturas. Para aumentar a eficiência da criopreservação e a fertilização artificial, a composição do diluidor do sêmen é

muito importante e deve ser ajustada para simular a composição do plasma seminal das espécies (ALAVI et al., 2004a, 2004b; RURANGWA et al., 2004). Além destas características, os diluidores devem estar livres de contaminantes e ser adicionados aos crioprotetores de maneira a proteger os espermatozoides, durante os processos de congelamento e descongelamento. Os crioprotetores reduzem o ponto de congelamento do meio extracelular, atenuam os efeitos deletérios dos cristais de gelo, e regulam a velocidade de desidratação das células, reduzindo os danos causados pela alta concentração de solutos durante o congelamento lento.

Soluções simples como NaCl 0,9% e glicose 5%, bem como soluções mais complexas como o BTS[®] (Beltsville Thawing Solution Minitub[®]) primeiramente desenvolvido como diluidor de sêmen de suíno e a água de coco em pó (ACP[®]) desenvolvida por pesquisadores da Universidade Estadual do Ceará (UECE), têm sido usadas com sucesso na criopreservação de sêmen de peixes neotropicais.

Recentemente, alguns trabalhos envolvendo o uso de diferentes diluidores na criopreservação do sêmen de peixes brasileiros como a curimba *P. lineatus* (MURGAS et al., 2007; VIVEIROS et al., 2009b), o dourado *S. Brasiliensis* (VIVEIROS et al., 2009a), o pacu *P. mesopotamicus* (ORFÃO et al., 2010), a piabanha *B. insignis* (VIVEIROS et al., 2011), a pirapitinga *B. naterreri* (OLIVEIRA et al., 2007; VIVEIROS et al., 2012c), a pirapitinga-do-sul *B. opalinus* (VIVEIROS et al., 2012b), e a piracanjuba *B. orbignyanus* (MARIA et al., 2006a, 2006b) têm sido descritos. Todos com resultados variáveis entre as diferentes espécies.

É importante que a motilidade dos espermatozoides não seja ativada antes do congelamento nem durante o descongelamento. Para que isso não ocorra, os diluidores devem conter sais (KCl, NaCl, NaHCO₃ dentre outros) e/ou açúcares, para manter a osmolalidade no meio diluidor em torno de 300 mOsm e

evitar a ativação da motilidade. Na maioria das espécies de peixes, os espermatozoides são imóveis nos testículos e no plasma seminal. Durante a reprodução natural, a motilidade é induzida depois da liberação dos espermatozoides (e desta forma sua dispersão/diluição) do trato genital do macho dentro do ambiente aquoso em que os espermatozoides encontram os componentes solúveis da água do meio externo, principalmente íons (COSSON, 2004). Em salmonídeos e ciprinídeos de água doce, a redução da concentração de potássio ou a osmolaridade do ambiente ao redor dos espermatozoides liberados em água doce afeta diretamente o flagelo e regula a iniciação da motilidade espermática (MORISAWA et al., 1983). O fluido seminal é rico em muitos nutrientes e íons, alguns dos quais importantes na manutenção da qualidade espermática, quando estocados no estado imóvel no trato genital. Fatores ambientais externos podem afetar a qualidade e a motilidade espermática, durante o processo de ativação. Fatores como o pH ou íons presentes podem polarizar a membrana celular e estimular a motilidade espermática dos peixes (MORISAWA et al., 1999). Em resposta ao estresse osmótico, o volume citoplasmático das células espermáticas das espécies de água doce aumenta em até três vezes, como resultado do influxo de água (PERCHEC-POUPARD et al., 1997). O oposto ocorre em espécies de água salgada. Isso, combinado com a medição do ATP, leva a um possível esquema geral (Figura 2), mostrando as mudanças nas concentrações iônicas internas ocorridas em respostas à osmolalidade externa, que podem controlar a motilidade espermática em peixes (COSSON, 2004).

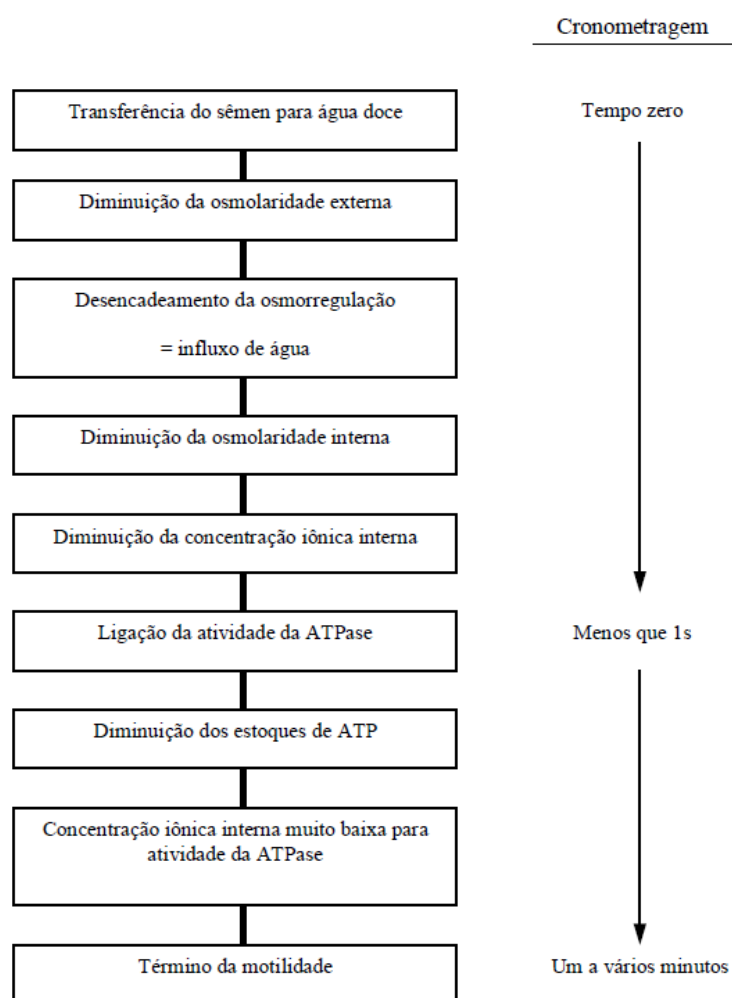


Figura 2 Cascata dos eventos desencadeadores da motilidade espermática

Fonte: Modificado de Cosson (2004)

A osmolalidade é definida como a concentração total de solutos numa solução que tem a propriedade de exercer uma pressão no interior da referida solução. Essa propriedade dos solutos está intimamente relacionada com o que se denomina pressão osmótica, a qual está envolvida na regulação do fluxo de

água através da membrana, por um fenômeno denominado osmose. Assim, quando a concentração de solutos (mOsm kg^{-1} de água) é mais baixa no meio (hiposmótico) onde se encontra imersa a célula do que no próprio citosol, essa tende a aumentar seu volume, absorvendo água do meio ambiente; mas, quando a célula está imersa em uma solução mais concentrada (hiperosmótico) sofre redução da sua membrana por desidratação (BOLSOVER et al., 2004).

A osmolalidade, ou pressão osmótica, tem influência sobre a motilidade espermática, sendo a ativação dos espermatozoides de peixes de água doce parcial ou totalmente dependente da iso ou hipotonicidade da solução diluidora, em relação ao plasma seminal (SHIMODA et al., 1999). A osmolalidade e a composição do plasma seminal geralmente evitam a motilidade dos espermatozoides nos ductos espermáticos dos peixes (BILLARD, 1986). O plasma seminal de peixes é constituído, em grande parte, por compostos minerais na forma de cloretos, proteínas, vitaminas e lipídios, sendo os principais íons presentes o Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+} . Esses íons estão envolvidos na regulação da osmolalidade (HE; KEERAN-JENKINS; WOODS, 2004). O fluido seminal não só imobiliza os espermatozoides, mas também os protege (COSSON et al., 1997).

A osmolalidade do sêmen já foi estudada em ciprinídeos (ALAVI et al., 2009, 2010; BILLARD; COSSON, 1992; HU et al., 2009; IAN et al., 2013; LAHNSTEINER et al., 1996; LINHART et al., 2003a, 2003b, 2003c), salmonídeos (BAYNES; SCOTT; DAWSON, 1981; BILLARD et al., 1995; LINHART; SLECHTA; SLAVIK, 1991; MORISAWA; HIRANO; SUZUKI, 1979; SCOTT; BAYNES, 1980) e esturjões (ALAVI; COSSON, 2005a, 2005b; ALAVI et al., 2004b, 2011; LINHART et al., 2003a, 2003b, 2003c). No entanto, em Characiformes, existem poucos estudos que descrevem os efeitos da osmolalidade sobre a motilidade espermática do sêmen fresco e criopreservado (CARNEIRO et al., 2012; GONÇALVES et al., 2013; MARTINEZ; ATENCIO;

CARRASCO, 2011; MELO; GODINHO, 2006; NASCIMENTO et al., 2012; ORFÃO et al., 2011; SHIMODA et al., 2007).

2.4 Sistema Computadorizado de Análise de Sêmen (CASA)

Até há alguns anos, as análises seminais em muitas espécies de mamíferos eram baseadas em uma avaliação subjetiva de parâmetros como motilidade, vigor e concentração espermática. Porém, esse método pode apresentar resultados errados e conflitantes, pois pode ser influenciado pela temperatura do ambiente e pela habilidade do avaliador. Dessa forma, no intuito de se padronizar e objetivar essas avaliações, tanto para fins clínicos quanto de pesquisa, foram criados aparelhos de mensuração computadorizada.

O Sistema Computadorizado de Análise de Sêmen (CASA) foi inicialmente proposto por Dott e Foster (1979), sendo sua primeira utilização em análise seminal de cães (GÜNZEL-APEL et al., 1993); há algum tempo é utilizada por diversos pesquisadores (RIJSSELAERE et al., 2003; ROTA et al., 2006). O primeiro trabalho com peixes foi reportado por Cosson et al. (1985), que utilizaram iluminação estroboscópica e câmera de vídeo na análise da motilidade de espermatozoides de truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss*.

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 2).

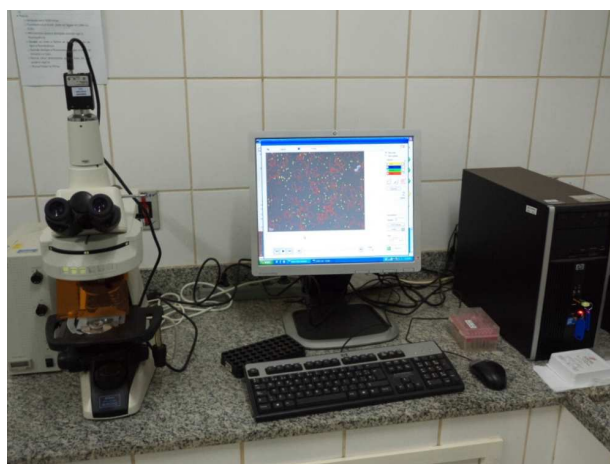


Figura 3 Sistema Computadorizado de Análise do Sêmen (CASA)

Fonte: Gonçalves et al. (2013).

O CASA, apresenta uma avaliação quantitativa simples e rápida da qualidade dos espermatozoides de peixes e pode prever a sua capacidade para fertilizar ovos. Na qualidade espermática; para selecionar 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 a motilidade total, motilidade progressiva, linearidade e vários parâmetros de velocidade como a velocidade curvilinear (VCL) que é a velocidade da trajetória real do espermatozoide, por unidade de tempo; velocidade linear (VSL) que é a velocidade média em função da linha reta estabelecida entre o primeiro e o último ponto da trajetória do espermatozoide, por unidade de tempo (VAP) é a velocidade da trajetória média do espermatozoide, por unidade de tempo (IGUER-OUADA; VERSTEGEN, 2001; RIJSSELAERE et al., 2003) (Figura 3).

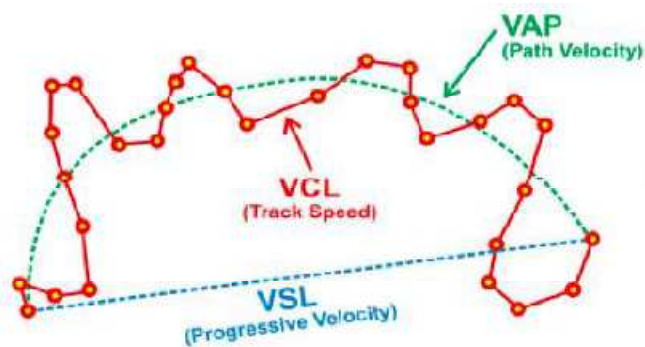


Figura 4 Esquema das velocidades espermáticas (VCL, VSL e VAP)

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., 2012b), e *B. orbignyanus* (VIVEIROS; GONÇALVES; LEAL, 2014), recentemente.

REFERÊNCIAS

ALAVI, S. M. H.; COSSON, J. Sperm motility and fertilizing ability in the Persian sturgeon *Acipenser persicus*. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 36, n. 9, p. 841-50, June 2005a.

ALAVI, S. M. H.; COSSON, J. Sperm motility in fishes: I., effects of temperature and pH: a review. **Cell Biology International**, London, v. 29, n. 2, p. 101-10, Feb. 2005b.

ALAVI, S. M. H. et al. Chemical composition and osmolality of seminal plasma of *Acipenser persicus*; their physiological relationship with sperm motility. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 35, n. 13, p. 1238-1243, Nov. 2004a.

ALAVI, S. M. H. et al. Relationships between reproductive characteristics in male *Vimba vimba* L. and the effects of osmolality on sperm motility. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 74, n. 2, p. 317-325, July 2010.

ALAVI, S. M. H. et al. Relationship between semen characteristics and body size in *Barbus* L. (Teleostei: Cyprinidae) and effects of ions and osmolality on sperm motility. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, New York, v. 153, n. 4, p. 430-437, Aug. 2009.

ALAVI, S. M. H. et al. Roles of osmolality, calcium-potassium antagonist and calcium in activation and flagellar beating pattern of sturgeon sperm. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, New York, v. 160, n. 2, p. 166-174, Oct. 2011.

ALAVI, S. M. H. et al. Spermatozoa motility in the Persian sturgeon, *Acipenser persicus*: effects of pH, dilution rate, ions and osmolality. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 128, n. 6, p. 819-828, Dec. 2004b.

BAYNES, S. M.; SCOTT, A. P.; DAWSON, A. P. Rainbow trout, *Salmo gairdneri*, spermatozoa: effects of cations and pH on motility. **Journal of Fish Biology**, London, v. 19, n. 3, p. 259-267, Sept. 1981.

BILLARD, R. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. **Reproduction and Nutritional Development**, Les Ulis, v. 2, n. 4, p. 877-920, 1986.

BILLARD, R.; COSSON, M. P. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. **Journal of Experimental Zoology**, Philadelphia, v. 261, n. 2, p. 122-131, Apr. 1992.

BILLARD, R. et al. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 124, n. 1/4, p. 195-112, Jan. 1995.

BILLARD, R. et al. Cryopreservation and short-term storage of sturgeon sperm: a review. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 236, n. 1/4, p. 1-9, June 2004.

BOLSOVER, R. S. et al. **Cell biology**. 2nd ed. New York: J. Willey, 2004. 552 p.

CARNEIRO, P. C. F. et al. Cryopreservation of tambaqui (*Colossoma macropomum*) semen: extenders, cryoprotectants, dilution ratios and freezing methods. **CryoLetters**, Lewes, v. 33, n. 5, p. 385-393, Sept. 2012.

CAROLSFELD, J. et al. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. **Journal of Fish Biology**, London, v. 63, n. 2, p. 472-489, Feb. 2003.

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

COMPANHIA ENERGÉTICA DE MINAS GERAIS; FUNDAÇÃO CENTRO TECNOLÓGICO DE MINAS GERAIS. **Guia ilustrado de peixes da bacia do Rio Grande**. Belo Horizonte, 2000. 144 p.

CÓSER, A. M.; GODINHO, H.; RIBERIO, D. M. Cryogenic preservation of spermatozoa from *Prochilodus scrofa* and *Salminus maxillosus*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 37, n. 4, p. 387-390, 1984.

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

COSSON, J. et al. Movements of fish sperm flagella studied by high speed video microscopy coupled to computer assisted image analysis. **Polish Archives of Hydrobiology**, Cincinnati, v. 44, n. 2, p. 103-113, 1997.

COSSON, M. P. et al. Rapid and quantitative assessment of trout spermatozoa motility using stroboscopy. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 46, p. 71-75, 1985.

DOTT, H. M.; FOSTER, G. C. The estimation of sperm motility in semen, on a membrane slide, by measuring the area change frequency with an image analyzing computer. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 55, n. 1, p. 161-166, Jan. 1979.

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.

FISHBASE. *Brycon orbignyanus*. Disponível em: <<http://www.fishbase.org>>. Acesso em: 10 dez. 2013.

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

GÜNZEL-APEL, A. R. et al. Computer-assisted analysis of motility, velocity and linearity of dog spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, Cambridge, v. 47, p. 271-278, 1993.

HE, S.; KEERAN-JENKINS, K.; WOODS, C. Activation of sperm motility in striped bass via a cAMP-independent pathway. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 61, n. 7, p. 1487-1498, May 2004.

HU, J. et al. Changes in extracellular osmolality initiate sperm motility in freshwater teleost rosy barb *Puntius conchonus*. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 72, n. 5, p. 704-710, Sept. 2009.

IAN, A. E. B. 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**, New York, v. 166, n. 1, p. 147-157, Sept. 2013.

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.

LAHNSTEINER, F. et al. Motility of spermatozoa of *Alburnus alburnus* (Cyprinidae) and its relationship to seminal plasma composition and sperm metabolism. **Fish Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 15, n. 2, p. 167-179, Apr. 1996.

LINHART, O. et al. Effects of ions on the motility of fresh and demembrated sperm of common carp (*Cyprinus carpio*) and paddlefish (*Polyodon spathula*). **Fish Physiology and Biochemistry**, Wageningen, v. 28, n. 1/4, p. 203-205, 2003a.

LINHART, O. et al. Ionic composition and osmolality of paddlefish (*Polyodon spathula*, Acipenseriformes) seminal fluid. **Aquaculture International**, Wageningen, v. 11, n. 4, p. 357-368, 2003b.

LINHART, O. Urinary bladder, ionic composition of seminal fluid and urine with characterization of sperm motility in tench (*Tinca tinca* L.). **Journal of Applied Ichthyology**, Berlin, v. 19, n. 3, p. 177-181, June 2003c.

LINHART, O.; SLECHTA, V.; SLAVIK, T. Fish sperm composition and biochemistry. **Bulletin of the Institute of Zoology Academia Sinica**, Taipei, v. 16, p. 285-311, 1991.

MACHADO, A. B. M. **Lista da fauna brasileira ameaçada de extinção**: incluindo as espécies quase ameaçadas e deficientes em dados. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 2005. 160 p.

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 on 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.

MARTÍNEZ, J. G.; ATENCIO, V. J.; CARRASCO, S. C. Effect of glucose concentration on sperm motility activation in bocachico *Prochilodus magdalenae* (Pisces, Characiformes). **Revista MVZ Cordoba**, Monteria, v. 16, n. 2, p. 2554-2563, Jan. 2011.

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

MORISAWA, M. et al. Initiation of sperm motility in teleosts. **Journal Submicroscope Cytology**, Tokyo, v. 15, n. 1, p. 61-65, Jan. 1983.

MORISAWA, M. et al. Transmembrane signal transduction for the regulation of sperm motility in fishes and ascidians. In: GAGNON, C. (Ed.). **The malegamete: from basic knowledge to clinical applications**. Vienna: CacheRiver, 1999. p. 149-160.

MORISAWA, M.; HIRANO, T.; SUZUKI, K. Changes in blood and seminal plasma composition of the mature salmon, *O. keta*, during adaptation. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, New York, v. 64, n. 3, p. 325-329, 1979.

MURGAS, L. D. S. et al. Cryopreservation of curimba (*Prochilodus lineatus*) semen after addition of different diluters, activators and cryoprotectants. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 36, n. 3, p. 526-531, maio/jun. 2007.

NASCIMENTO, A. F. et al. Extender composition, osmolality, cryoprotectant and equilibration time effects on fresh sperm motility of two Characiformes fish: piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) and streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*). **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 9, n. 2, p. 103-110, Apr./June 2012.

NASCIMENTO, A. F. et al. Out-of-season sperm cryopreserved in different freezing media of the Amazonian freshwater fish pirapitinga (*Piaractus brachypomus*). **Animal Reproduction Science**, Belo Horizonte, v. 118, n. 2/4, p. 324-329, Apr. 2010.

OLIVEIRA, J. F. et al. Sucesso do resfriamento e congelamento de sêmen de pirapitinga *Brycon nattereri*. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 59, n. 6, p. 1509-1515, 2007.

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 aquicultura III**. Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, 2010. 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, n. 1/4, p. 241-247, Feb. 2011.

PERCHEC-POUPARD, G. et al. Effects of extracellular environment on the osmotic signal transduction involved in activation of motility of carp spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 110, n. 2, p. 315-327, July 1997.

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.

ROTA, A. et al. Comparison between glycerol and ethylene glycol for dog sêmen cryopreservation. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 65, n. 9, p. 1848-1858, June 2006.

RURANGWA, E. et al. Measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 234, n. 1/4, p. 1-28, May 2004.

SCOTT, A. P.; BAYNES, S. M. A review of the biology, handling and storage of Salmonid spermatozoa. **Journal of Fish Biology**, London, v. 17, n. 6, p. 707-739, Dec. 1980.

SHIMODA, E. et al. Caracterização química do plasma seminal do pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) hipofisado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 23, n. 3, p. 248-250, 1999.

SHIMODA, E. et al. Efeito da osmolaridade sobre a motilidade espermática na piabanha *Brycon insignis*. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 54, n. 315, p. 430-433, set./out. 2007.

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.

VIVEIROS, A. T. M. et al. Motility and fertility of the subtropical freshwater fish streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) sperm cryopreserved in powdered coconut water. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 74, n. 4, p. 551-556, Sept. 2010.

VIVEIROS, A. T. M. et al. Sensibilidade dos espermatozóides 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. A simple, inexpensive and successful freezing method for curimba *Prochilodus lineatus* (Characiformes) semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 112, n. 3/4, 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 pirapitinga-do-sul *Brycon opalinus* (Characiformes). **Theriogenology**, Los Angeles, v. 78, n. 2, p. 361-368, July 2012c.

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, n. 4, 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. 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.; GONÇALVES, A. C. S.; LEAL, M. C. Fresh, diluted and post-thaw sperm quality of *Brycon orbignyanus* and *Prochilodus lineatus* males treated with either salmon GnRHa and domperidone or pituitary extract. **Journal of Applied Ichthyology**, Berlin, 2014. In press.

SEGUNDA PARTE – ARTIGO

ARTIGO 1 Extender composition and osmolality affects post-thaw sperm motility and velocities of *Piracanjuba Brycon orbignyanus* (Characiformes) sperm

Preparado de acordo com as normas e submetido na revista Journal of Applied Ichthyology

Summary

D. Isabel López, Marcelo C. Leal, Ana. T. M. Viveiros. Extender composition and osmolality affects post-thaw motility and velocities of piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Characiformes) sperm

The aim of this study was to evaluate the effects of extender composition and osmolality on post-thaw quality of *Brycon orbignyanus* sperm. Eight extenders comprising combinations of two compositions (NaCl and glucose) and four osmolalities (285, 325, 365 and 405 mOsm kg⁻¹) were tested. Methyl glycol was used as cryoprotectant. Diluted sperm was loaded into 0.25 mL straws, frozen in a nitrogen vapor vessel (*dry shipper*) and stored in a liquid nitrogen vessel. Straws were thawed in a water bath at 60°C for 3s and sperm was immediately evaluated for motility rate and velocities (curvilinear = VCL; straight line = VSL; average path = VAP). Seminal plasma osmolality was also determined (249 mOsm kg⁻¹). Both extender composition and osmolality affected post-thaw sperm quality. In general, sperm cryopreserved in NaCl showed better quality than that in glucose, and at lower osmolalities better than that at higher ones. High post-thaw quality, with motility above 60% and VCL above 140 $\mu\text{m s}^{-1}$, was observed only in samples frozen in NaCl

at 285 mOsm kg⁻¹. Different from most of the sperm from freshwater species which needs a cell membrane protector (such as sugars), *B. orbignyanus* sperm should be frozen in as ionic solution for the better protection during the freezing and thawing processes. Furthermore, this solution should be prepared at an osmolality just above seminal plasma osmolality. Cryopreserved sperm can be used for both aquaculture purposes and for conservational programs, since *B. orbignyanus* is a threatened species.

Keywords: CASA, immobilizing medium, NaCl, glucose

Resumo

D. Isabel López, M. C. Leal, A. T. M. Viveiros. A composição e osmolalidade do diluidor afetam a taxa de motilidade e velocidades do sêmen criopreservado de piracanjuba *Brycon orbignyana* (Characiformes)

Objetivou-se, neste estudo, avaliar o efeito da composição e osmolalidade do diluidor sobre a qualidade do sêmen criopreservado de *Brycon orbignyana*. Oito diluidores, compreendendo a combinação de duas composições (NaCl e glicose) e quatro osmolalidades (285, 325, 365 and 405 mOsm kg⁻¹), foram testados. O metilglicol foi usado como agente crioprotetor. O sêmen diluído foi envasado em palhetas de 0,25 mL, congelado em vapor de nitrogênio líquido (*dry shipper*) e armazenados em botijão de nitrogênio líquido. As palhetas foram descongeladas em banho-maria a 60°C por 3 segundos e o sêmen foi imediatamente avaliado quanto à taxa de motilidade e velocidades (curvilínea = VCL; linear = VSL e média de percurso = VAP). A osmolalidade do plasma seminal também foi determinada (249 mOsm kg⁻¹). A composição e osmolalidade do diluidor afetaram a qualidade espermática pós-descongelamento. Em geral, o sêmen criopreservado em NaCl apresentou melhor qualidade do que em glicose, e as baixas osmolalidades foram

melhores do que as altas. A maior qualidade pós-descongelamento, com motilidade acima de 60% e VCL acima de $140 \mu\text{m s}^{-1}$, foi observada apenas nas amostras congeladas em NaCl a 285 mOsm kg^{-1} . Diferente da maioria do sêmen de espécies de água doce, que necessitam de um protetor de membrana celular (tais como açúcares), o sêmen de *B. orbignyana* deve ser congelado em solução iônica para uma melhor proteção, durante os processos de congelamento e descongelamento. Além disso, essa solução deve ser preparada em uma osmolalidade um pouco acima do que a do plasma seminal. O sêmen criopreservado pode ser utilizado, tanto para fins de aquicultura quanto para programas de conservação, uma vez que o *B. orbignyana* é uma espécie ameaçada de extinção.

Introduction

The piracanjuba *Brycon orbignyanus* is a native fish species from South America and belongs to the order Characiformes, family Characidae and subfamily Bryconinae. During the spawning season (November to February), the *B. orbignyanus* migrates to spawning sites. This migratory behavior is known as *piracema* and occurs when the environment is appropriate to stimulate fish reproduction (Godinho and Godinho, 1994). Changes in the river stream, overfishing, urbanization, pollution and hydroelectric dams are some of the reasons why the status of *B. orbignyanus* is currently set as endangered. The genus *Brycon* is highly affected by these environmental changes, and many species are in the red list of Brazilian threatened fauna, such as *B. opalinus*, *B. insignis* and *B. nattereri* (Rosa and Lima, 2008). The *B. orbignyanus* exhibits fast growth in captivity and has an excellent meat quality, indicating that this species can be produced on a commercial scale and thus preventing it from extinction (Maria et al., 2006).

Most fish spermatozoa are immotile in the seminal tract (Morisawa and Suzuki, 1980), and hyposmotic media or water initiate sperm motility in freshwater fish (Alavi and Cosson, 2006). Osmolality,

pH, temperature, and ion concentration affect sperm motility (Morisawa and Suzuki, 1980; Alavi and Cosson, 2006). Studies regarding the effects of these factors on the induction and suppression of sperm motility are necessary to establish standard activating agents (media that trigger motility) and extender (also called immobilizing media; media that suppress the initiation of sperm motility), for improving both artificial fertilization and preservation techniques (Alavi et al., 2009). Osmolality, but not the presence of ions, seems to be the key factor for the induction or suppression of fresh sperm motility in Characiformes fish species. Motility was completely suppressed when sperm was diluted in a solution at 270 mOsm kg⁻¹ or higher in *B. orbignyanus*, or at 360 mOsm kg⁻¹ or higher in *Prochilodus lineatus*, regardless of extender composition (NaCl, glucose or BTSTM; Gonçalves et al., 2013). In frozen sperm, however, detailed information on the effects of extender osmolality on post-thaw sperm quality in Characiformes species is not yet available, but the presence of ions affects post-thaw quality, and this occurs differently among fish species. Sperm of *B. nattereri* (Oliveira et al., 2007) can be successfully frozen in ionic solution, while sperm of *B. opalinus* (Viveiros et al., 2012), of *Salminus brasiliensis* (Viveiros et al., 2009a)

and of *P. lineatus* (Viveiros et al., 2009b) are better frozen in sugar solutions. Yet, sperm of *Piaractus mesopotamicus* (Orfão et al., 2010) needs a combination of both ions and sugar (BTS™) for the better protection during the freezing and thawing processes.

The aim of this study was to evaluate the effects of extender composition (ionic and sugar extenders) and osmolality on post-thaw motility and velocities of piracanjuba *Brycon orbignyanus* sperm, using a Computer-Assisted Sperm Analyzer (CASA).

Materials and Methods

Fish handling and sperm collection

All fish were handled in compliance with the guidelines for animal experimentation described by Van Zutphen et al. (2001). The *B. orbignyanus* males were selected from earthen ponds 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), State of Minas Gerais, Brazil, during the spawning season (December to February). Males (n=10, 2.1 kg⁻¹ BW) with detectable running sperm under soft abdominal pressure received a single intramuscular dose of carp pituitary extract (cPE; Argent

Chemical Laboratories, Redmond, WA, USA; 1 mg kg⁻¹ BW). After 8-10 h at ~28°C, the urogenital papilla was carefully dried, and approximately 10 mL of sperm were hand stripped directly into glass tubes. Sperm collection was carried out at room temperature (~25°C). Immediately after collection, the tubes containing sperm were maintained in a cooler (9-11°C), containing dry ice foam (Polar Technics CRI Ltd, São Paulo, Brazil). Contamination of sperm with water, blood, feces or urine was carefully avoided.

Determination of fresh sperm features

Immediately after collection, 5 µL of each sample were placed on a glass slide and observed using a light microscope (Eclipse E200; Nikon, Tokyo, Japan) at 400 X magnification. Motility rate (expressed as % of motile sperm) was subjectively estimated following the addition of 50 µL of water. Approximately 2 mL of sperm were transported to the Laboratory of Semen Technology at the Federal University of Lavras (UFLA), State of Minas Gerais, Brazil, for further analyses. Sperm concentration was determined using a hemacytometer Neubauer chamber (Boeco, Hamburg, Germany). Osmolality (Semi-Micro Osmometer K-

7400, Knauer, Berlin, Germany) and pH (Digimed DM- 22-V1.0, São Paulo, Brazil) of the seminal plasma were measured after semen centrifugation at 2000 x g for 10 min (MiniStar, Shanghai, China).

Extender composition and osmolality

Eight extenders comprising combinations of an ionic (NaCl; Vetec Quimica Fina LTDA, Rio de Janeiro, Brazil) or sugar (glucose; Vetec Quimica Fina LTDA, Rio de Janeiro, Brazil) solution, adjusted to four osmolalities (285, 325, 365 and 405 mOsm kg⁻¹) were prepared in 100-mL amber glass bottles, stored in a refrigerator at 6-8°C and used within 48 h. Methylglycol (CH₃O (CH₂)₂ OH; Vetec Química Fina LTDA, Rio de Janeiro, Brazil), was used as cryoprotectant agent, according to our previous results (Maria et al., 2006). Within ~10 min after collection, sperm was diluted in each freezing media to a ratio of 10% sperm, 10% methyl glycol and 80% extender. Diluted sperm was loaded into 0.25 mL straws (n=3 replicate straws x 8 extenders x 10 males) and frozen in a nitrogen vapor vessel (*dry vapor shipper*, Cryoport Systems, Brea, CA, USA) at approximately -170°C after an equilibration period of 15 min. The straws were then transported 50 km from CEMIG to the Laboratory of Semen Technology at UFPA and stored in a liquid nitrogen vessel (MVE XC 34/18, New Prague, MN 56071, USA) within 24 h.

Post-thaw sperm evaluation

After a few weeks, straws were thawed in a water bath (Waterbath MA 127, Marconi, Brazil) at 60°C for 3 s, and post-thaw sperm quality was immediately estimated using the CASA system, following the methodology described in Viveiros et al. (2014). Briefly, post-thaw sperm was activated in a Makler™ counting chamber (Sefi-Medical Instruments ltd, Haifa, Israel) placed under a phase contrast microscope (Nikon™ ECLIPSE E200, Tokyo, Japan) at 100 X magnification with a green filter and pH 1 position. The activating agent used was NaCl at 98 mOsm kg⁻¹ (~50 mM) at 26-29°C to a final dilution ratio of 1:50. The microscope was connected to a video camera (Basler Vision Technologies™ A602FC, Ahrensburg, Germany) generating 100 images s⁻¹; video recording started approximately 10 s post-activation. Each image was analyzed using the standard settings for fish by Sperm Class Analyzer™ software (SCA™ 2010, Microptics, S.L. Version 5.1, Barcelona, Spain). Although the SCA™ simultaneously assesses more than 15 sperm motility endpoints, for brevity, only motility rate, curvilinear velocity (VCL), straight line velocity (VSL) and average path velocity (VAP), were considered for analysis. To determine these parameters, each

individual sperm (a mean of 501 spermatozoa per straw) was followed throughout the images and sperm trajectory was calculated. We considered high post-thaw sperm quality when motility rate was above 60% and VCL was above $140 \mu\text{m s}^{-1}$.

Statistical analyses

Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD). Statistical analyses were conducted with the SISVAR software program (Ferreira, 1999). Data were tested for normal distribution using test Shapiro Wilk and for significant differences using ANOVA, followed by the Scott-Knott test, when applicable. The level of significance for all statistical tests was set to 5% ($P < 0.05$).

Results

Fresh sperm features

Fresh sperm of the 10 males used in this study possessed a mean of 91% motility and 2.7×10^9 spermatozoa mL^{-1} . Seminal plasma exhibited osmolality of 249 mOsm kg^{-1} and a pH of 8.06 (Table 1).

Table 1. Body weight and some fresh sperm features of *Brycon orbignyanus* (n=10 males; mean $\pm$ SD; minimum-maximum values) after carp pituitary treatment.

Feature	Mean $\pm$ SD	Min - max
Body weight (Kg)	2.1 ± 0.4	1.5 - 2.9
Subjective motility rate (%)	91 ± 3	86 - 95
Concentration (spermatozoa $\times 10^9 \text{ mL}^{-1}$)	2.7 ± 1.3	1.1 - 5.3
Seminal plasma osmolality (mOsm kg^{-1})	249 ± 17	216 - 275
Seminal plasma pH	8.06 ± 0.11	7.88 - 8.21

Extender composition and osmolality

Both extender osmolality and composition affected ($P < 0.05$) post-thaw sperm quality. In general, samples frozen in NaCl yielded higher

quality than that in glucose, and at 285 and 325 mOsm kg⁻¹ higher than that at 365 and 405 mOsm kg⁻¹. The only exception was VCL that was not affected ($P>0.05$) by the osmolality of glucose solution (Figure 1).

High post-thaw quality, with motility above 60% and VCL above 140 $\mu\text{m s}^{-1}$, was observed only in samples frozen in NaCl at 285 mOsm kg⁻¹ (Table 2).

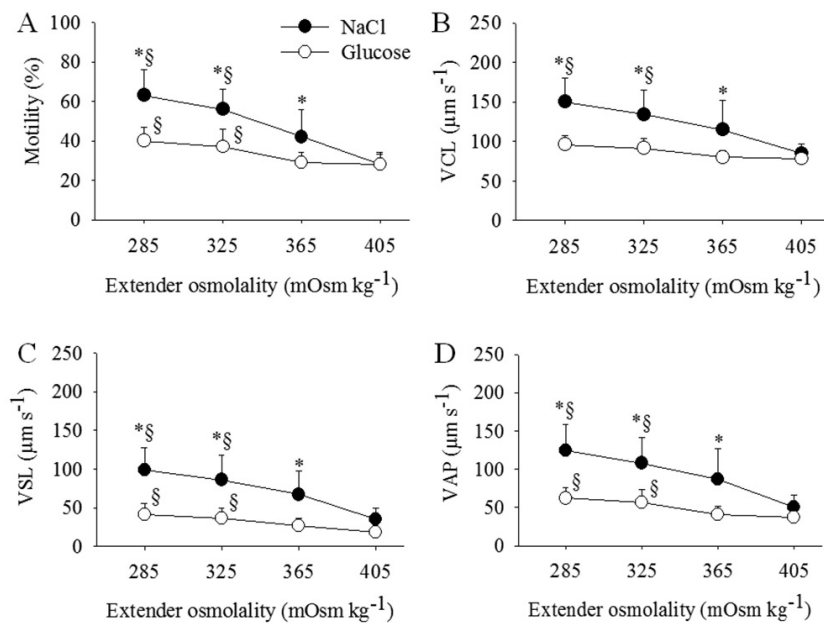


Fig 1. Motility rate (A), curvilinear (VCL; B), straight-line (VSL; C) and average path (VAP; D) velocities of *Brycon orbignyanus* sperm cryopreserved in eight extenders composed of 2 compositions

(NaCl=closed circles; glucose=open circles) x 4 osmolalities. Each dot and error bar represents mean $\pm$ SD (n=3 replicate straws x 10 males).

*Differences between extender compositions ($P < 0.05$; ANOVA); § Differences among extender osmolalities ($P < 0.05$; Scott-Knott test); values followed by a symbol are significantly higher.

Table 2. Composition and osmolality of some extenders tested during the cryopreservation of fish sperm of the genus *Brycon*.

Species	Extender (mOsm kg ⁻¹)	Post-thaw sperm quality	Reference
<i>B. orbignyanus</i>	285 NaCl	63% motility ^C ; VCL of 150 $\mu\text{m s}^{-1}$; VSL of 99 $\mu\text{m s}^{-1}$; VAP of 124 $\mu\text{m s}^{-1}$	Present study
	325 NaCl	56% motility ^C ; VCL of 134 $\mu\text{m s}^{-1}$; VSL of 86 $\mu\text{m s}^{-1}$; VAP of 108 $\mu\text{m s}^{-1}$	
	365 NaCl	42% motility ^C ; VCL of 115 $\mu\text{m s}^{-1}$; VSL of 67 $\mu\text{m s}^{-1}$; VAP of 87 $\mu\text{m s}^{-1}$	
	405 NaCl	28% motility ^C ; VCL of 85 $\mu\text{m s}^{-1}$; VSL of 35 $\mu\text{m s}^{-1}$; VAP of 50 $\mu\text{m s}^{-1}$	
	285 Glucose	40% motility ^C ; VCL of 96 $\mu\text{m s}^{-1}$; VSL of 41 $\mu\text{m s}^{-1}$; VAP of 61 $\mu\text{m s}^{-1}$	
	325 Glucose	37% motility ^C ; VCL of 91 $\mu\text{m s}^{-1}$; VSL of 35 $\mu\text{m s}^{-1}$; VAP of 56 $\mu\text{m s}^{-1}$	
	365 Glucose	29% motility ^C ; VCL of 80 $\mu\text{m s}^{-1}$; VSL of 23 $\mu\text{m s}^{-1}$; VAP of 42 $\mu\text{m s}^{-1}$	
	405 Glucose	28% motility ^C ; VCL of 78 $\mu\text{m s}^{-1}$; VSL of 18 $\mu\text{m s}^{-1}$; VAP of 37 $\mu\text{m s}^{-1}$	

	285 NaCl + yolk	66% motility ^S	Maria et al., 2006
	404 NaCl + yolk	44% motility ^S	
	429 NaCl + yolk	26% motility ^S	
<i>B. insignis</i>	285 NaCl	70% motility ^S ; duration of motility 86 s; 64% intact sperm ^{EN}	Viveiros et al., 2011
	308 Glucose	68% motility ^S ; duration of motility 107 s; 51% intact sperm ^{EN}	
	356 BTS	62% motility ^S ; duration of motility 85 s; 62% intact sperm ^{EN}	
<i>B. nattereri</i>	~285 NaCl	68% motility ^S	Oliveira et al., 2007
	~405 NaCl	57% motility ^S	
	~429 NaCl	45% motility ^S	
	~318 BTS	72% motility ^S	
	~277 Glucose	49% motility ^S	
<i>B. opalinus</i>	325 NaCl	25% motility ^S ; duration of motility 30 s; 28% intact sperm ^{EN}	Viveiros et al., 2012
	365 NaCl	70% motility ^S ; duration of motility 49 s; 68% intact sperm ^{EN}	

325 Glucose	42% motility ^S ; duration of motility 28 s; 47% intact sperm ^{EN}
365 Glucose	88% motility ^S ; duration of motility 52 s; 84% intact sperm ^{EN}

^{S,C} Motility rate evaluated subjectively under a light microscope (^S) or under a Computer-Assisted Sperm

Analyzer (^C)

^{EN} Percentage of intact sperm after eosin–nigrosin staining

BTSTM (Beltsville Thawing Solution, Minitub): glucose, sodium citrate, EDTA, NaHCO₃, KCl and gentamycin sulfate.

Discussion

In the present study, eight extenders comprising the combination of two compositions and four osmolalities were tested. Post-thaw sperm quality was evaluated in terms of sperm motility and velocities using the CASA system. This is the first detailed report on the evaluation of extender osmolality on post-thaw sperm quality of a Characiformes fish species.

Fresh sperm quality of *B. orbignyanus* was assessed after hormonal treatment with carp pituitary extract. The values observed for sperm quality were all within the range observed for fresh sperm of this species (Nascimento et al., 2012; Gonçalves et al., 2013; Viveiros et al., 2014). It is interesting to observe that sperm of this species is characterized by a large volume, frequently above 10 mL, and a low concentration, mostly below 10×10^9 sperm mL⁻¹ (Viveiros and Godinho, 2009). A better understanding of the characteristics of fresh sperm before manipulation is necessary to evaluate sperm quality in commercial hatcheries before artificial reproduction and in laboratories before experiments (Orfão et al., 2011).

The extenders herein tested were simple solutions, either ionic (NaCl) or non-ionic (glucose). The presence of ions in the extender composition was benefic during the freezing and thawing of *B. orbignyianus* sperm, as NaCl-frozen sperm yielded higher motility and velocities compared to glucose-frozen sperm. Similarly, post-thaw motility of *B. nattereri* sperm was higher in NaCl- than in glucose-frozen samples (Oliveira et al., 2007). Contrarily, in other Characiformes, sperm of *B. opalinus* (Viveiros et al., 2012), *P. lineatus* (Viveiros et al., 2009b) and *S. brasiliensis* (Viveiros et al., 2009a) frozen in glucose yielded higher motility than that in NaCl, and sperm of *B. insignis* (Viveiros et al., 2011) frozen in ionic or sugar solution yielded similar motility (Table 2). The addition of ions in a freezing medium aims the control of osmotic pressure during cell dehydration, while sugars are cell membrane protectors (Kopeika and Kopeika, 2008) and are present in most of the extenders for fish sperm (Viveiros and Godinho, 2009).

Extender osmolality also affected post-thaw sperm quality of *B. orbignyianus*. Highest motility and velocities were observed when sperm was frozen in extenders at 285 and 325 mOsm kg⁻¹, compared to that at 365 and 405 mOsm kg⁻¹ (Fig 1). It is important to note that all

osmolalities tested here were higher than that of seminal plasma (216-275 mOsm kg⁻¹). In other studies using species of the genus *Brycon*, sperm frozen in extender at ~285 mOsm kg⁻¹ yielded higher post-thaw motility when compared to that at ~404 and at ~429 mOsm kg⁻¹, in both *B. orbignyanus* (Maria et al., 2006) and in *B. nattereri* (Oliveira et al., 2007). It has been stated that, since sperm of freshwater fish are very sensitive to osmotic changes, the extender (before the addition of a cryoprotectant) should be iso-osmotic or slightly hypertonic compared to seminal plasma, as the osmotic pressure of the freezing medium is substantially increased by the addition of a cryoprotectant agent (Kopeika and Kopeika, 2008).

The use of a CASA system has been developed to reduce the amount of time spent in sperm observation and the intra-observer differences, and to improve the accuracy of final results (Rurangwa et al., 2001). This method is objective, accurate, and enables quantification of physical components of sperm movement (Liu et al., 2007). Furthermore, the use of CASA for the evaluation of sperm motility is important because motility rate and VCL have been associated with the reproductive success in fishes (Rurangwa et al., 2001; Viveiros et al., 2010). But, even when analyzing sperm using an objective method, differences among

studies are frequent. *B. orbignyana* sperm frozen in NaCl and methyl glycol yielded motility of 63% and VCL of $150 \mu\text{m s}^{-1}$ (present study), while sperm frozen in BTS™ and methyl glycol yielded lower motility (42%) and similar VCL ($160 \mu\text{m s}^{-1}$; Viveiros et al., 2014). *P. lineatus* sperm frozen in glucose and methyl glycol yielded motility of 75% and VCL of only $49 \mu\text{m s}^{-1}$ in Viveiros et al. (2010) and motility of 73% and VCL as high as $277 \mu\text{m s}^{-1}$ in Viveiros et al. (2014). These differences are mostly related to rearing conditions in each fish farm, spermiation inducer methodology, freezing medium, activating agent and differences among individuals. Sperm velocity also depends on several other parameters such as head dimension (diameter of head), beat frequency, length of flagellum, and physical parameters of wave propagation (Alavi et al., 2009) as well as the activating agent (osmolality, composition and viscosity).

Thus, different from most of the sperm from freshwater species which needs a cell membrane protector (such as sugars), *B. orbignyana* sperm should be frozen in as ionic solution for the better protection during the freezing and thawing processes. Furthermore, this solution should be prepared at an osmolality just above seminal plasma

osmolality. Sperm cryopreserved in this medium should yield high post-thaw quality with motility above 60% and VCL above $140 \mu\text{m s}^{-1}$ and can be used for both aquaculture purposes and for conservational programs, since *B. orbignyanus* is a threatened species.

Acknowledgements

This study received funding from the Brazilian fostering agencies CNPq (PQ 302434/2011-9; 471393/2011-8; grant PEC-PG 190276/2012-6 to D.I. López) and FAPEMIG (00167-12; 00129-11). This research is part of D.I. Lopez's MSc project. The authors thank Flávio H. Siqueira and Manoel V. Oliveira from CEMIG for providing the broodfish, and Gilson A. Azarias and Jailson M. Silva (CEMIG, Itutinga), D. Rosseto (UNIOESTE) and T. S. França (UFLA) for assistance during the experiments.

References

- Alavi, S. M. H.; Cosson, J., 2006: Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: a review. *Cell Biol.Int.* 30, 1-14.
- Alavi, S. M. H.; Rodina, M.; Viveiros, A. T. M.; Cosson, J.; Gela, D.; Boryshpolets, S.; Linhart, O., 2009: Effects of osmolality on sperm morphology, motility and flagellar wave parameters in Northern pike (*Esox lucius* L). *Theriogenology* 72, 32-43.
- Ferreira, D. F., 1999: Analysis of Variance System (SISVAR). Version 4.3 (Build 43). Lavras, MG: Department of Statistics/UFLA, Brazil.
- Godinho, H. P.; Godinho, A. L., 1994: Ecology and conservation of fish in southeastern Brazilian river basins submitted to hydroelectric impoundments. *Acta Limnol. Bras.* 5, 187-197.
- Gonçalves, A. C. S.; Nascimento, A. F.; Costa, A. C.; Leal, M. C.; Viveiros, A. T. M., 2013: Initiation and suppression of sperm motility is osmolality-dependent in two South American fish species: streaked prochilod *Prochilodus lineatus* and piracanjuba *Brycon orbignyanus*. *Anim. Reprod.* 10, 62-70.

Kopeika, E.; Kopeika, J., 2008: Variability of sperm quality after cryopreservation in fish. In: Fish spermatology. Eds: S. M. H. Alavi; J. J. Cosson; K. Coward; G. Rafiee Oxford, UK. pp. 347-396.

Liu, Q. H.; Li, J.; Xiao, Z. Z.; Ding, F. H.; Yu, D. D.; Xu, X. Z., 2007: Use of computer-assisted sperm analysis (CASA) to evaluate the quality of cryopreserved sperm in red seabream (*Pagrus major*). Aquaculture 263, 20-25.

Maria, A. N.; Viveiros, A. T. M.; Orfão, L. H., Oliveira, A. V.; Moraes, G. F., 2006: Effects of cooling and freezing on sperm motility of the endangered fish piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Characiformes, Characidae). Anim. Reprod. 3, 55-60.

Morisawa, M.; Suzuki, K., 1980: Osmolality and potassium ions: their roles in initiation of sperm motility in teleosts. Science 210, 114-115.

Nascimento, A. F.; Gonçalves, A. C. S.; Reis Neto, R. V.; Leal, M. C.; Viveiros, A. T. M., 2012: Extender composition, osmolality, cryoprotectant and equilibration time effects on fresh sperm motility of two Characiformes fish: piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) and streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*). Anim. Reprod. 9, 103-110.

Oliveira, A. V.; Viveiros, A. T. M.; Maria, A. N.; Freitas, R. T. F.; Izaú, A. Z., 2007: Sucesso do resfriamento e congelamento de sêmen de pirapitinga *Brycon nattereri*. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 59, 1509-1515.

Orfão, L. H.; Viveiros, A. T. M.; Maria, A. N.; Silva, F. P. C., 2010: Criopreservação do sêmen de pacu *Piaractus mesopotamicus*: efeito de diluidores, crioprotetores e ativadores. In: Tópicos especiais em Biologia Aquática e Aqüicultura III. Sociedade Brasileira de Aqüicultura e Biologia Aquática. Eds: J. E. P. Ciryño; W. M. Furuya; R. P. Ribeiro; J. D. S. Filho. Jaboticabal, SP, Brazil. pp. 161-167.

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.

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

Rurangwa, E.; Volckaert, F. A.; Huyskens, G.; Kime, D. E.; Ollevier, F., 2001: Quality control of refrigerated and cryopreserved semen using computer-assisted sperm analysis (CASA), viable staining and standardized fertilization in African catfish (*Clarias gariepinus*). Theriogenology 55, 751-769.

Van Zutphen, L. F.; Baumans, V.; Beynen, A. C., 2001: Principles of Laboratory Animal Science. Revised edition. Elsevier, Amsterdam, the Netherlands, p 428.

Viveiros, A. T. M.; Godinho, H. P., 2009: Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. Fish Physiol. Biochem. 35, 137-150.

Viveiros, A. T. M.; Oliveira, A. V.; Maria, A. N.; Orfão, L. H.; Souza, J. C., 2009a: Sensibilidade dos espermatozoides de dourado (*Salminus brasiliensis*) a diferentes meios de congelamento. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 61, 883-889. Viveiros, A. T. M.; Orfão, L. H.; Maria, A. N.; Allaman, I. B., 2009b. A simple, inexpensive and successful freezing method for curimba *Prochilodus lineatus* (Characiformes) semen. Anim. Reprod. Science. 112, 293-300.

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

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. Aquacult. Res.42, 858-865.

Viveiros, A. T. M.; Orfão, L. H.; Nascimento, A. F.; Corrêa, F. M.; Caneppele, D., 2012: Effects of extenders, cryoprotectants and freezing methods on sperm quality of the threatened Brazilian freshwater fish pirapitinga-do-sul *Brycon opalinus* (Characiformes). Theriogenology78, 361-368.

Viveiros, A. T. M.; Gonçalves, A. C. S.; Leal, M. C., 2014. Fresh, diluted and post-thaw sperm quality of *Brycon orbignyanus* and *Prochilodus lineatus* males treated with either salmon GnRHa and domperidone or pituitary extract. J. Appl. Ichthyol submitted JAI-13-Gametes-022

Versão preliminar sujeito às alterações pelo conselho editorial da revista