



MICHELLE SAMPAIO PAULINO

**CONGELAMENTO DE SÊMEN E
ULTRAESTRUTURA DOS GAMETAS DE
PEIXES NATIVOS**

LAVRAS - MG

2012

MICHELLE SAMPAIO PAULINO

**CONGELAMENTO DE SÊMEN E ULTRAESTRUTURA DOS
GAMETAS DE PEIXES NATIVOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Doutora.

Orientador

Dr. Luis David Solis Murgas

LAVRAS - MG

2012

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Paulino, Michelle Sampaio.

Congelamento de sêmen e ultraestrutura dos gametas de peixes
nativos / Michelle Sampaio Paulino. – Lavras : UFLA, 2012.

114 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Luis David Solis Murgas.

Bibliografia.

1. Peixes nativos. 2. Eclosão de larvas. 3. Congelamento de
sêmen. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 639.375

MICHELLE SAMPAIO PAULINO

**CONGELAMENTO DE SÊMEN E ULTRAESTRUTURA DOS
GAMETAS DE PEIXES NATIVOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Doutora.

APROVADA em _____ de _____ de 2012.

Dra Sheila Cristina da Silva Victorio

Dra. Elizabeth Romagosa

Dra. Cristina Delarete Drummond

Dra. Gláucia Frasnelli Mian

Dr. Luis David Solis Murgas
Orientador

LAVRAS - MG

2012

*Aos meus filhos, Izabela e Luiz Eduardo, que fazem a minha vida mais feliz,
simplesmente por estarem ao meu lado.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade de concluir o curso de doutorado

Ao Departamento de Pós Graduação em Ciências Veterinárias , ao coordenador do curso de Pós-Graduação Márcio Gilberto Zangerônimo, ao secretário do curso de Pós graduação José Reinaldo Berin e ao orientador Professor Luis Murgas.

Aos funcionários do laboratório de Fisiologia e Farmacologia da Veterinária: Wilian, Seu Marcos e Marquinhos, pelo auxílio em campo (nas pescarias).

Aos colegas de laboratório: Gilmara,Rafael, Galileu, Viviane, Fernando e Alésio.

Aos integrantes do Laboratório de Microscopia e Análise Ultraestrutural da UFLA, em especial ao Professor Eduardo Alves, Heloisa, Claudinha e Douglas, por me auxiliarem no manuseio das amostras.

Ao pessoal da Piscicultura da CEMIG de Itutinga, em especial ao Oscar, Darlig, Jailson e Gilson, por estarem sempre dispostos a ajudar nos experimentos disponibilizando os reprodutores da estação.

Muito obrigada!

RESUMO GERAL

O Brasil destaca-se, por possuir a maior rede hidrográfica do mundo, sendo o país com maior diversidade de peixes teleósteos de água doce. Entre esses, destacam-se os de piracema, que reproduzem uma vez ao ano ao serem impulsionados por estímulos ambientais para o desenvolvimento gonadal. Com intuito de auxiliar no manejo reprodutivo, suprir a demanda comercial e a recuperar espécies em ambiente natural, diversas alternativas vem sendo propostas. Entre essas, o congelamento de sêmen que além de otimizar assincronia entre os reprodutores, preserva o material genético. Assim, neste trabalho procuramos avaliar espécies com potencial para a aquicultura. O *Prochilodus lineatus*, curimba, é uma espécie muito produzida em estações de piscicultura devida o seu fácil manuseio e suas larvas servirem de alimento para espécies de peixes carnívoros. O *Piaractus mesopotamicus*, pacu é muito apreciado no sudeste do país, sendo também uma das mais estudadas e o *Brycon orbignyanus*, piracanjuba e *Salminus brasiliensis*, dourado são espécies que além de apresentam carne saborosa, estão sendo ameaçadas de extinção. O objetivo da tese foi reunir informações a respeito da reprodução dessas espécies, utilizando biotecnologias aplicadas a preservação de sêmen e análise ultraestrutural dos gametas. No artigo 1 foi avaliado a eclosão de larvas de *Prochilodus lineatus* gerados a partir do sêmen criopreservado em diferentes soluções crioprotetora (metilenoglicol ou metanol ou propilenoglicol ou dimetilsulfóxido em concentrações de 7,89%). Os maiores valores das taxas de eclosão ocorreram quando se utilizou o sêmen criopreservado com metilglicol. No artigo 2, foi avaliada a influência dos crioprotetores, temperatura e tempo de descongelamento sobre as anormalidades espermáticas de *Piaractus mesopotamicus*, uma vez que em trabalhos anteriores foi utilizado a espécie *Prochilodus lineatus*. As amostras de sêmen foram diluídas em soluções de 10% de dimetilsulfóxido ou metanol, congeladas e descongeladas em temperaturas de 40 ou 60 graus em tempos de 8 ou 12 segundos. As menores porcentagens de anormalidades primárias foram verificadas quando se descongelou o sêmen em 60 °C por 8 segundos ou 40 °C por 12 segundos. No artigo 3 foram feitos estudos para observação e medição das estruturas dos gametas de *Prochilodus lineatus*, *Piaractus mesopotamicus*, *Salminus brasiliensis* e *Brycon orbignyanus*. Os resultados mostraram muitas semelhanças entre os gametas das espécies estudadas. Esse estudo pode auxiliar para uma melhor compreensão da biologia reprodutiva dos peixes, manejo reprodutivo e na conservação dessas espécies.

Palavras-chave: Congelamento de sêmen, Eclosão de larvas, Gametas, Peixes nativos.

ABSTRACT

Brazil is highlighted for possessing the world's largest river system, being the country with the largest diversity of fish species. Among these species, piracema fish stand out, reproducing once a year, driven by environmental stimulation, which result in the end of their gonadal development. However, this process is often interrupted by various factors, such as the construction on dams, overfishing and pollution. In this context, various alternatives have been proposed with the intention of assisting in management, in meeting commercial demand and recovering these species in a natural environment. In article 1, the hatching of *Prochilodus lineatus* larvae, generated from semen cryopreserved in different cryoprotectant solutions (methylen glycol or methanol or propylene glycol or dimethylsulfoxide in concentration of 7.89%) was evaluated. The highest motility and hatching rates derived from the semen cryopreserved with methyl glycol. In article 2, the influence of the cryoprotectants, temperature and thawing time on *Piaractus mesopotamicus* spermatic abnormalities was evaluated. The semen samples were diluted in 10% dimethylsulfoxide solution or methanol, frozen and thawed in temperatures of 40 or 60 degrees at 8 or 12 seconds. The smallest percentages of abnormalities were verified when the semen was thawed at 60°C for 8 seconds or 40°C for 12 seconds. In article 3, studies were performed for the observation and measurements of *Prochilodus lineatus*, *piaractus mesopotamicus*, *Salminus brasiliensis* and *Brycon orbignyanus* gamete structures. The results showed several similarities between the gametes of the studied species. The oocytes presented a funnel shaped micropyle with pleats and folds in the micropylar region, with the exception of *Prochilodus lineatus*. A variation occurred in the larger and smaller ostium of the micropyle. This may possibly be related to different reproductive strategies. The spermatozoa presented simple structures with an ovoid head, a cylindrical intermediate piece with a single flagellum and no acrosome. This study may assist in a better comprehension of the reproductive biology of these fishes, reproductive management and in the conservation of these species.

Key-words: Semen cryopreservation. Native species. Larvae hatching. Gametes, Natives Fishes.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

- Figura 1 Ovócito de *Prochilodus lineatus* fecundado - fase de fechamento do blastóporo 40

ARTIGO 1

- FIGURA 1. Taxa(%) e duração (s) médias da motilidade espermática do sêmen fresco (controle) e diluído com metanol, metilenoglicol, dimetilsulfóxido e propilenoglicol em concentrações de 7,89% (teste de toxicidade).. 64
- FIGURA 2. Taxa(%) e duração (s) médias da motilidade espermática do sêmen fresco (controle) e criopreservado com metanol, metilenoglicol, dimetilsulfóxido e propilenoglicol em concentrações de 7,89%). 65
- FIGURA 3. Taxas(%) médias de anormalidades morfológicas do sêmen fresco (controle) e do sêmen criopreservado com metilenoglicol, dimetilsulfóxido, propilenoglicol e metanol em concentrações de 7,89%..... 71
- FIGURA 4. Taxas (%) médias de embriões viáveis, em diferentes fases do desenvolvimento, provenientes do sêmen criopreservado com metilenoglicol, dimetilsulfóxido, propilenoglicol e metanol e ativado com bicarbonato de sódio 90 mM. 72

ARTIGO 3

- Figure 1. A- Diameters of the micropyle B-.Diameters of the oocyte 112

Figure 2.	A- Micropyle of the <i>Prochilodus lineatus</i> , B-arrow indicates pores, C micropyle of the <i>Salminus brasiliensis</i> , D- arrow indicates pores, E- micropyle of the <i>Piaractus mesopotamicus</i> , F- arrow indicates ridges and folds, G- micropyle of the <i>Brycon orbignyanus</i> ,H- arrow indicates pores.	113
Figure 3.	Sperm cells: A <i>Prochilodus lineatus</i> , B- <i>Salminus brasiliensis</i> , C- <i>Piaractus mesopotamicus</i> , D- <i>Brycon orbignyanus</i>	114

LISTA DE TABELAS

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1

- Tabela 1. Tratamento do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) congelado com os diferentes crioprotetores e ativados em solução 90 mM de bicarbonato de sódio..... 61

ARTIGO 2

- Tabela 1. Descrição dos tratamentos empregados para avaliação morfológica do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*)..... 82
- Tabela 2. Porcentagem de anormalidades primárias e secundárias verificadas em espermatozoides de pacu (*Piaractus mesopotamicus*)..... 83
- Tabela 3. Porcentagem de anormalidades do flagelo, cabeça e peça intermediária dentro das anormalidades primárias. pacu (*Piaractus mesopotamicus*)..... 84
- Tabela 4. Porcentagem de anormalidades do flagelo, cabeça e gota dentro das anormalidades secundárias pacu (*Piaractus mesopotamicus*)..... 85

ARTIGO 3

- Table 1. Morphometry of the oocytes of *Brycon orbignyanus*, *Piaractus mesopotamicus*, *Prochilodus lineatus* and *Salminus brasiliensis* and sperm head width ratio and the major diameter of major micropyle ostium (MSH/MO). Data are presented as mean \pm standard deviation. 100

Table 2.	Morphometry of the various portions of the sperm of <i>Brycon orbignyanus</i> , <i>Piaractus mesopotamicus</i> , <i>Prochilodus lineatus</i> and <i>Salminus brasiliensis</i> . Data are presented as mean \pm standard deviation.	101
----------	---	-----

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	
1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	Classificação dos peixes teleósteos	15
2.2	Espécies em estudo	16
2.2.1	<i>Prochilodus lineatus</i> , curimba	16
2.2.2	<i>Salminus brasiliensis</i> , dourado	17
2.2.3	<i>Piaractus mesopotamicus</i> , pacu	18
2.2.4	<i>Brycon orbignyanus</i> , piracanjuba	19
2.3	Fisiologia reprodutiva de peixes	19
2.4	Morfologia dos ovócitos de peixes	22
2.5	Morfologia dos espermatozoides de peixes	24
2.5.1	Morfologia da cabeça	24
2.5.2	Morfologia da peça intermediária	25
2.5.3	Morfologia do flagelo	26
2.6	Qualidade espermática	27
2.6.1	Motilidade espermática	27
2.6.2	Anormalidades espermática	28
2.7	Biotecnologias aplicadas a reprodução de peixes	29
2.7.1	Criopreservação de sêmen de peixes	29
2.7.2	Substâncias químicas utilizadas como crioprotetoras	31
2.7.3	Soluções diluidoras	35
2.8	Fertilização em peixes	36
2.8	Desenvolvimento embrionário em peixes	37
	REFERÊNCIAS	42
	SEGUNDA PARTE-ARTIGOS	55
	ARTIGO 1 Efeito do sêmen congelado na produção de larvas de curimba, (<i>Prochilodus lineatus</i>)	55
	ARTIGO 2 Anormalidades espermáticas de <i>Piaractus mesopotamicus</i> após descongelamento utilizando diferentes metodologias	77
	ARTIGO 3 Morphometric study by means of ultrastructural analysis of gametes of the neotropical teleost fish <i>Piaractus mesopotamicus</i>, <i>Brycon orbignyanus</i>, <i>Salminus brasiliensis</i> and <i>Prochilodus lineatus</i>	93

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

Existem mais de 23.400 espécies de peixes teleósteos descritos no mundo, sendo que mais de 3000 espécies são de água doce que habitam águas continentais da América do sul (NAKATANI et al., 2001). Essa grande variedade de espécies os torna, no meio aquático, formas de vida dominante, por apresentarem diversas formas, tamanhos e padrões do ciclo de vida, além disso, essas inúmeras adaptações favorecem quase todos os tipos de estratégias de alimentação e reprodução.

Por outro lado, a interferência humana no ambiente natural provoca declínio do ambiente aquático, a exemplo disso podemos citar a construção de barragens, que apesar de apresentar benefícios sócios econômico ao país, impede a rota migratória dos peixes (CAROLSFELD et al., 2003). Nesse contexto, pesquisas vêm sendo realizadas com intuito de minimizar estes impactos ambientais, entre essas, as técnicas que aperfeiçoam a reprodução artificial como o estudo e preservação de gametas que preservam sêmen de espécies de peixes.

A criopreservação de gametas, é uma técnica que consiste em submeter as células espermáticas em períodos longos de manutenção em nitrogênio líquido, permitindo a conservação do material genético e consequentemente proporcionando a produção de alevinos de espécies de peixes migradoras ao longo de todo o ano, o que, representaria uma economia de escala para os piscicultores comerciais. Além disso, dispensa

a presença dos reprodutores no plantel, reduzindo os custos com aplicação de hormônios gonadotrópicos.

Mediante isso, o desenvolvimento de técnicas aliados ao melhor conhecimento reprodutivo das espécies migradoras são necessárias para compreender e auxiliar no manejo da piscicultura, suprimindo desta forma a demanda comercial, além de contribuir para redução do declínio das espécies em ambiente natural.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Os peixes são um dos grupos com maior número de espécies, apresentando morfologia e cores variadas, com inúmeras adaptações que favorecem quase todos os tipos e estratégias de alimentação e reprodução (RIBEIRO; PAVANELLI, 2001).

2.1 Classificação dos peixes teleósteos

Segundo NAKATANI et al. (2001), os peixes representam 50% dos vertebrados, englobando cerca de 24.000 espécies. Entre essas, 96% são teleósteos e 41% são encontrados em ambientes de água doce. A maior diversidade de espécies fazem parte dos Characiformes que compreendem geralmente espécies de peixes nativos, seguidos pela ordem dos Siluriformes que incluem os bagres, cascudo e jaú e pela ordem dos Perciformes que incluem as tilápias e tucunarés (RIBEIRO; PAVANELLI, 2001).

Diante dessa ampla variedade de espécies, os peixes desenvolveram diferentes estratégias, ligada a diferentes funções vitais, as quais o habilitam a se manterem presentes nos distintos habitats. Todavia, essas estratégias estão associadas às várias condições favoráveis como desenvolvimento inicial de ovos e larvas, migração, cuidado com a prole, tipo de desova, número e tipos de ovos, tempo de incubação e desenvolvimento embrionário, (NAKATANI et al., 2001).

Na época de reprodução, as fêmeas podem liberar seus ovos de uma única vez (peixes de desova total) ou em várias parcelas (desova

parcelada) ao longo de um período reprodutivo (VAZZOLER, 1996). Os peixes de desova total são de grande porte, migradores e desovam no leito dos rios, já os peixes de desova parcelada, desovam em águas mais calmas e estáveis (NAKATANI et al., 2001). Eles também podem apresentar cuidados com a prole, neste caso, podem ser não guardadoras, guardadora e carregadoras. As não guardadoras incluem espécies que não protegem seus ovos e jovens, as guardadoras, incluem aquelas que cuidam dos ovos e embriões até a eclosão e as carregadoras, incluem aquelas que carregam ovos ou embriões externa ou internamente, (NAKATANI et al., 2001).

2.2 Espécies em estudo

A fauna brasileira é representada por um grande número de espécies de peixes. Entre essas, podemos destacar *Prochilodus lineatus*, *Salminus brasiliensis*, *Piaractus mesopotamicus* e *Brycon orbignyanus*.

2.2.1 *Prochilodus lineatus*, curimba

Prochilodus lineatus, (VALENCIENNES,1836) conhecido vulgarmente por curimba, curimbatá ou papa-terra, é um peixe detritívoro em todas as fases de vida, atinge até 70 cm de comprimento e possui coloração cinza esverdeado com o dorso escuro e o ventre claro. Prefere ambientes lóticos, em locais de águas lentas, pois realizam migração em massa, rio acima, na época de reprodução (novembro a janeiro) podendo migrar várias centenas de quilômetros, até as áreas de

desova. O macho inicia sua reprodução mais cedo, aos dois anos de idade, com 24 cm em relação às fêmeas que iniciam aos três anos (COMPANHIA ENERGETICA DE MINAS GERAIS, CEMIG, 2000).

A curimba é considerada um dos peixes de maior importância econômica na pesca interior e em programas de repovoamento de rios, devido o fato de seus ovos, larvas e alevinos servirem de alimentos a muitas espécies de peixes predadores, assim como também servirem de alimento para várias aves aquáticas (CEMIG, 2000).

É uma espécie reofílica, que em cativeiro pressupõe a reprodução induzida para a produção de larvas, sendo conhecido pela sua elevada prolificidade (FURUYA, 2001).

2.2.2 *Salminus brasiliensis*, dourado

O *Salminus brasiliensis*, (VALENCIENNES,1849) conhecido vulgarmente como dourado, é o maior peixe de escamas da bacia do rio Paraná, podendo atingir mais de um metro de comprimento. O dorso é castanho escuro e na região central, as escamas dorsais apresentam uma mancha, formando em conjunto estrias longitudinais. O abdome e a região inferior do corpo são amarelo-vivos, com uma listra negra sobre os sobre os raios caudais medianos (CEMIG, 2000).

É um predador compulsivo, valente e saltador conhecido como “o rei dos rios”, podendo alcançar 25 Kg de peso e pouco mais de 1 metro de comprimento, além disso, é muito apreciado pelos pescadores, pela excelência de sua carne e pela sua agressividade o que tornadifícil sua captura por meio de anzol e vara (CEMIG, 2000).

O dourado é um peixe de piracema, que se reproduz de novembro a janeiro. O macho atinge a maturidade gonadal com dois anos de idade, enquanto que a fêmea a alcança aos três anos de idade (CEMIG, 2000). No entanto, apesar do grande valor comercial, a elevada taxa de canibalismo que ocorre após eclosão e os custos com a alimentação dessa espécie, têm dificultado a viabilização econômica do seu cultivo (FURUYA, 2001).

2.2.3 *Piaractus mesopotamicus*, pacu

O *Piaractus mesopotamicus*, (HOLMBERG,1887), pacu é uma espécie largamente distribuída nos rios da Bacia do Prata, é cultivada principalmente no sudeste do país, onde apresenta grande importância na pesca comercial (FURUYA, 2001). Apresenta o corpo robusto e arredondado com o dorso cinza escuro e o ventre amarelo-dourado e a cabeça pequena. É considerado um peixe de grande porte, podendo atingir 1m de comprimento e até 20 kg de peso (CEMIG, 2000).

Alimenta-se de frutos, pedaços de vegetais e crustáceos e dependendo da época do ano e da qualidade da água, seu hábito alimentar pode variar entre o canibalismo e o consumo de frutas (CEMIG, 2000).

É um peixe migrador e por esse motivo não reproduz em ambiente lênticos, somente se forem hipofizados. A incubação dos ovos é realizada em temperatura entre 25° e 27 °C e a eclosão das larvas ocorre entre 20 a 25 horas após a fertilização (FURUYA, 2001).

2.2.4. *Brycon orbignyanus*, piracanjuba

O gênero *Brycon*, é representado por cerca de 40 espécies, sendo que, a espécie mais utilizada para o cultivo é a piracanjuba, *Brycon orbignyanus* (VALENCIENNES, 1849), originária da bacia do Paraná-Uruguai (FURUYA, 2001). A fêmea atinge o comprimento de 80 cm e 8 Kg de peso, enquanto o macho atinge 68 cm e 3,6 Kg. Seu corpo é fusiforme e comprido e a boca ampla e terminal, com três séries de dentes multicuspidados no pré-maxilar e duas no dentário. A nadadeira caudal tem coloração vermelha com uma faixa mediana bem escura (CEMIG, 2000).

Tem hábito alimentar onívoro, se alimentando de peixes, plantas e insetos. É uma espécie de piracema e realiza migração reprodutiva subindo o rio entre setembro e outubro, culminando com a desova entre novembro e janeiro. O macho reproduz a partir de dois anos de idade, com 20 cm, e a fêmea, a partir do terceiro ano com 25 cm de comprimento (CEMIG, 2000). Por se muito sensível à degradação ambiental, os estoques naturais desta espécie encontram-se reduzidos (CEMIG, 2000).

2.3 Fisiologia reprodutiva de peixes

A reprodução de peixes é um fenômeno sazonal ou cíclico. Em peixes suas atividades fisiológicas são controladas por dois sistemas: O nervoso que controla atividades rápidas e de curta duração e o endócrino que geralmente controla atividades lentas e prolongadas

(BALDISSEROTO, 2009) e está diretamente relacionado com fatores ambientais e com a atividade dos órgãos da reprodução (CREPALDI et al., 2006).

O ciclo reprodutivo em peixes é coordenado por complexos mecanismos de regulação endócrina, sendo mediados por vários mensageiros endógenos (gonadotropinas, estrógenos, andrógenos, entre outros). Alterações de fatores ambientais, tais como fotoperíodo e temperatura, são detectadas por receptores específicos, localizados nos olhos, pineal, narinas e receptores cutâneos que os convertem em sinais eletroquímicos no qual são propagados via neurônio sensoriais até o hipotálamo (ISEKI; NEGRÃO, 2003). Esse integra e responde aos estímulos externos e internos produzindo o fator liberador de gonadotropinas (GnRH), que estimula as células gonadotrópicas da hipófise a secretarem gonadotropinas (GTH) ou inibidores como a dopamina (DA) que antagonizam o efeito do GnRH inibindo a secreção de gonadotropinas (GTH) pela hipófise (ISEKI; NEGRÃO, 2003).

Alterações nas condições ambientais podem atuar por meio do sistema sensorial e dos centros específicos do cérebro, desencadeando neurosecreções as quais regulam as atividades da hipófise (CREPALDI et al., 2006), conseqüentemente as células endócrinas liberam neurohormônio no sangue ou no espaço intersticial até as células alvos aumentarem os níveis de gonadotropina na hipófise e no plasma, isso ocorre possivelmente para iniciar a vitelogênese no período reprodutivo corrente (ZOHAR, 1989) e estimular a concentração de testosterona e estrógeno (CAROLSFELD, 1989).

Em peixes existem duas gonadodrofina, o folículo estimulante, FSH e o hormônio luteizante, LH. O FSH estimula a liberação de estradiol pelo ovário, o crescimento gonadal, a gametogênese e a entrada de vitelogenina no ovócito. Já o LH é importante para a manutenção final dos gametas e sua liberação (BALDISEROTO, 2009).

Entretanto, existem outros hormônios relacionados com a reprodução, tais como: os tireoidianos, que estimulam a vitelogênese e o desenvolvimento embrionário, o cortisol que aumenta a produção de gonodotrofinas, o hormônio do crescimento, GH e somatolactina que estimula a liberação de esteróides nos testículos e ovários e a arginina e vasotocina, que estimulam a liberação de testosterona (BALDISEROTTO, 2009).

Algumas espécies de peixes nativos, como traíras (*Hoplias malabaricus e Hoplis lacerdae*), tucunaré (*Cichla ocellaris*), lambari (*Astyanax spp*), entre outros, reproduzem naturalmente em águas lânticas (lagoas ou represas). Já as espécies reofílicas, só conseguem se reproduzir em águas lólicas, ou seja, recebem estímulos da correnteza do rio para desencadear seu processo reprodutivo (CAROLSFED et al., 2003)

A reprodução induzida é uma técnica que induz a maturação final, liberação dos ovócitos e o aumento do volume seminal. Essa técnica está baseada na liberação de gonadotropinas para regular a fase final do processo de maturação gonadal e liberação dos gametas (CREPALDI et al., 2006). Esse processo baseia-se na concentração máxima de gonadotropina na hipófise que ocorre durante a fase final da vitelogênese e se estende por todo o período de dormência. Desta forma o processo atua como um complemento da quantidade de gonadotropina produzida

pelo organismo receptor, substituindo a quantidade que deixou de ser processada pela ausência das condições ambientais favoráveis (ZOHAR; MYLONAS, 2001).

2.4 Morfologia dos ovócitos de peixes

As características morfológicas dos ovócitos são importantes para compreender a dinâmica da ovogênese, incluindo maturação e ovulação (TYLER; SUMPTER, 1996, citados por GARCIA, 2001).

Segundo Romagosa e Narahara (2002) durante o desenvolvimento dos ovócitos de *Piaractus mesopotamicus*, as camadas foliculares sofrem modificações e estão organizadas em um envoltório ou envelope folicular constituído de quatro camadas distintas: a teca, membrana basal, epitélio folicular e zona radiata. As células foliculares originam-se no epitélio germinativo e tem função de proteção do ovo contra lesões mecânicas e ação de microorganismos (YAZAWA, 1997). As células foliculares são altas com superfície apical irregular (CRUZ LANDIM; CRUZ HOFLING, 1989) e são constituídas por células da granulosa e da teca. A função dessas células está relacionada com a produção de estrogênio estimulando a produção de vitelogenina pelo fígado (GURAYA, 1983; YAZAWA, 1997).

Os ovócitos apresentam uma camada acelular, que se encontra na superfície da camada de células da granulosa, a zona radiata (ARUKE; GOKSOYR, 2003). Essa camada apresenta inúmeros poros ou canais dispostos radialmente na superfície do ovo (ROMAGOSA; NARAHARA, 2002; RIZZO; GODINHO; SATO, 2003). A disposição

dos poros ou canais são características de espécie-específica (RIEHL, 1993) e pode ter formato hexagonal ou serem distribuídos irregularmente (RIZZO et al., 2002). Em vários Characiformes, os poros podem apresentar maior diâmetro em relação a outras ordens de peixes, proporcionando melhor aeração ao embrião (RIZZO et al., 2002).

A zona radiata apresenta duas camadas, sendo uma interna mais espessa que protege o embrião contra danos mecânicos e a externa mais fina, que protege o ovo contra a ação de microorganismos. Dependendo da espécie, a camada externa pode ou não apresentar polissacarídeos ácidos que são responsáveis pela adesividade do ovo, quando eles entram em contato com a água (GURAYA, 1996). Em algumas espécies como *Prochilodus margavi*, a zona radiata pode apresentar ainda estrias transversais e grânulos finos que se acumulam na região micropilar (RIZZO; GODINHO; SATO, 2003).

Durante o crescimento dos folículos ovarianos, os ovócitos são rodeados por uma matriz extracelular, o córion, que apresenta proteínas com função relacionada a fertilização e a prevenção a polispermia (WASSARMAN, 2008). Essas proteínas são sintetizadas no fígado e codificadas geralmente por sete genes, dependendo da espécie (KANAMORI et al., 2003).

No momento da liberação dos ovócitos a camada de células foliculares se rompe e os ovócitos são expelidos para a cavidade ovariana, permitindo a visualização da micrópila (GURAYA, 1996), uma abertura localizada no polo animal (TWAMATSU, 1993), que apresenta forma de funil na maioria dos teleósteos. O vestíbulo micropilar pode apresentar diferenças morfológicas, dependendo da espécie, exibindo superfície lisa

como em *Prochilodus margavi*, (RIZZO; GODINHO; SATO, 2003) ou vários sulcos e pregas com disposição retilíneas como em *Brycon orbignyanus*, (GANECO; NAKAGHI, 2003).

2.5 Morfologia dos espermatozoides de peixes

Os espermatozoides de peixes são compostos por cabeça, peça intermediária e flagelo.

2.5.1 Morfologia da cabeça

A cabeça dos espermatozoides de peixes pode apresentar diversas formas, tais como: ligeiramente alongada, achatada ou ovoide (MATOS; AZEVEDO, 1989). Algumas espécies marinhas podem apresentam acrossoma e sua função parece ser essencial no processo de fertilização, porém, ainda não está clara (PSENICKA et al., 2011). Em espécies nativas brasileiras, a cabeça do espermatozoide pode apresentar morfologia similar (VERÍSSIMO SILVEIRA et al., 2006).

Em *Brycon microlepis* e *Brycon orbignayanus*, os espermatozoides possuem na cabeça um núcleo esférico em torno de 1,5 µm de diâmetro, cercados por uma estreita faixa de mitocôndrias com organelas e em *Salminus brasiliensis* a cabeça possui um núcleo arredondado com cromatina condensada rodeados de citoplasma e um sistema de endomembrana pouco desenvolvida (VERÍSSIMO SILVEIRA et al., 2006). Em *B. nattererie* a cabeça do espermatozoide apresenta formato ovoide com uma estreita faixa citoplasmática sem organelas. O

núcleo tem formato de U e no seu interior a cromatina é condensada em filamentos que se arranjam na forma de grupos justapostos entremeados por poucas áreas elétricas-lúcidas. A fossa nuclear é profunda, alojando o complexo centriolar e o segmento inicial do flagelo (MARIA, 2008).

2.5.2 Morfologia da peça intermediária

Na maioria dos teleósteos, os espermatozoides apresentam peça intermediária pequena com canais citoplasmáticos ou peça intermediária longa e um canal citoplasmático externo (JAMIESON et al., 1991). As mitocôndrias apresentam-se com formato esférico ou ovoide, LANHNSTEINER et al. (1997) e sua quantidade pode estar relacionada com a diferença de motilidade que ocorrem entre as espécies (ALAVI; COSSON, 2006).

Em espécies nativas brasileiras, como *Salminus brasiliensis*, *Brycon microlepis* e *Brycon orbignyanus*, a peça intermediária apresenta-se delgada assimétrica e longa, medindo, desde a base do núcleo até o fim da bainha do citoplasma, 2,3 µm, 2,4 µm e 2,6 µm respectivamente. Sua parte anterior é um pouco larga e longa com presença de mitocôndrias ramificadas e a posterior é caracterizada pela ausência de mitocôndrias e presença de revestimento citoplasmático (VERÍSSIMO SILVEIRA et al., 2006). Já em *Brycon Nattereri* a peça intermediária é curta com presença de mitocôndrias e ao seu final apresenta um prolongamento da membrana citoplasmática que forma uma bainha composta por três anéis membranosos concêntricos, (MARIA, 2008).

2.5.3 Morfologia do Flagelo

Em espermatozoides de peixes, o flagelo pode ser paralelo ou perpendicular ao núcleo, dependendo da rotação que ocorre durante a espermatogênese, MATTEI (1991), podendo ser ainda monoflagelar ou biflagelar (FISHELSON; DELAREA; GON, 2006). Os espermatozoides monoflagelar tem um corpo basal que se conecta ao centríolo distal e apresenta um colar curto contendo de 8 a 12 mitocôndrias na base. Já os biflagelados estão ligados uns aos outros e rodeados por uma bainha citoplasmática comum e a base é cercada por mitocôndrias de tamanho maior (FISHELSON; DELAREA; GON, 2006).

Em algumas espécies como *Esox lucius*, o final do flagelo pode apresentar uma estrutura de quilha (ALAVI et al., 2009).

Em espécies nativas, como *Salminus brasiliensis*, *Brycon microlepis* e *Brycon orbignyanus* o flagelo é único e está rodeado por uma membrana flagelar no qual se observa um eixo perpendicular e medial na base do núcleo exibindo classes de axonemas (nove microtúbulos periféricos e um par central). Um complexo de centríolos migra em posição paralela na base do núcleo e são conduzidos ao longo da membrana plasmática iniciando parte do flagelo. O núcleo é profundo com uma capa de material homogêneo e material eletro denso que conecta os centríolos (VERISSIMO SILVEIRA et al., 2006).

EM *Bryconamericus stramineus* o flagelo apresenta rotação nuclear incompleta e uma definida posição lateral em relação à base do núcleo. (GUSMÃO; FORESTI; QUAGIO-GRASSIOTTO, 1999).

2.6 Qualidade espermática

O conhecimento das características seminais é fundamental na rotina de reprodução artificial, pois permite a utilização do uso racional de gametas (BOMBARDELLI; SYPERRECK; SANCHES, 2006), bem como do número de reprodutores (FOGLI DA SILVEIRA et al., 1985). STREIT et al., (2008), sugerem que os espermatozoides devem ser eficientes na fertilização de ovócito. Porém, a qualidade espermática pode ser influenciada por fatores tais como: tamanho do indivíduo (LUZ et al., 2001), a idade dos reprodutores (BASTARDO; GUEDEZ.; LEÓN, 2004), a realização de sucessivas coletas seminais (KAVAMOTO et al., 1997), a época do ano (BORGES et al., 2005), a indução hormonal (KAVAMOTO; FOGLI DA SILVEIRA, 1986; STREIT JUNIOR et al., 2003; ZANIBONI FILHO; WEINGARTNER, 2007) e variabilidade na composição iônica do plasma seminal (ALAVI et al., 2009). Devido a isso, estudos sobre as características do sêmen são necessárias para compreender a base dos processos bioquímicos que ocorrem na motilidade espermática e durante a fertilização (LINHART et al., 1999).

2.6.1 Motilidade espermática

Os espermatozoides de peixes são imóveis nos testículos e em muitas espécies no plasma seminal devido à osmolaridade e a composição

do plasma (BILLARD et al., 1986). Durante a reprodução natural a motilidade é induzida depois da liberação dos espermatozoides no ambiente aquoso, em que os espermatozoides encontram os componentes solúveis do meio externo, principalmente íons (COSSON, 2004; ALAVI et al., 2009).

A osmolaridade isotônica do plasma seminal supre a motilidade espermática em teleósteos marinhos e de água doce e a iniciação da motilidade é induzida quando o sêmen é exposto à hipertonicidade da água salgada ou hipotonicidade da água doce (TAKAI; MORISAWA, 1995; ALAVI; COSSON, 2006). Além disso, a diminuição da capacidade de natação dos espermatozoides é originada em parte pela diminuição do estoque de energia que ocorre durante o período de motilidade (COSSON, 2004). Nesse período, a fosforilação oxidativa mitocondrial é altamente requerida para produzir energia durante a locomoção e é insuficiente para sustentar o armazenamento de ATP endógeno (COSSON et al., 1999).

O comprimento do flagelo e o número de mitocôndrias também podem intervir na motilidade espermática (LANHNSTEINER et al., 2008), pois as mitocôndrias são responsáveis por fornecer ATP durante a motilidade espermática (PSENICK et al., 2007). Em trabalhos com *Siberian sturgeon*, o ATP afeta a motilidade espermática do sêmen fresco e congelado (BILLARD; COSSON; LINHART, 2000) e em *Acipenser baerii* a motilidade é afetada pela diminuição dos níveis de ATP que ocorrem devido às mudanças nos componentes mitocondrial (PSENICK et al., 2007).

2.6.2 Anormalidades espermática

Segundo RURANGWA et al. (1998) e COSSON et al. (1999), as deformações estruturais dos espermatozoides (anormalidades morfológicas) podem causar sensível redução na motilidade dos espermatozoides e, por consequência, perda da capacidade de fertilização.

Segundo Herman, Mitchell e Doak (1994) a origem das patologias primárias das células espermáticas podem estar relacionadas com a deficiência nutricional, idade dos machos, consanguinidade e doenças que acometem os reprodutores. Já as patologias secundárias têm influência na temperatura ambiente, alimentação, problemas no ducto espermático, extrusão do sêmen e manejo (confecção das lâminas).

Outro fator que se deve levar em consideração, é a alteração da morfologia espermática após o uso de biotecnologias, pois, estudos evidenciam o aumento de espermatozoides anormais, após serem criopreservados (BILLARD; COSSON; LINHART, 2000).

2.7 Biotecnologias aplicadas a reprodução de peixes

Os gametas masculinos de peixes produzidos pela técnica de hipofização são rapidamente utilizados, pois tem sua viabilidade reduzida. Assim, são utilizados procedimentos que permitam sua eficácia. A criopreservação de sêmen é uma técnica bastante eficaz e que consiste em congelar o sêmen utilizando diluídores e crioprotetores com o objetivo de proteger as células espermáticas contra a redução brusca de temperatura e conservar o material genético (CAROLSFELD et al., 2003).

2.7.1 Criopreservação de sêmen de peixes

O primeiro trabalho sobre congelamento de sêmen de peixe foi realizado há mais de 50 anos por BLAXTER em 1953, para viabilizar o cruzamento de dois “tipos de arenque” que desovaram em épocas diferentes do ano. A partir daí, novas técnicas vêm sendo desenvolvidas na criopreservação de gametas (CARNEIRO, 2007).

O congelamento de sêmen tem por finalidade promover o fornecimento de material genético para aumentar a variabilidade de uma determinada população (FAUVEL et al., 1999). Nesse processo o sêmen é envasado em palhetas geralmente de 0,5 mL, que são acondicionadas em raques e colocadas em vapor de nitrogênio líquido por um tempo de 24 horas, e posteriormente acondicionadas em botijões contendo nitrogênio líquido em temperatura de $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (CAROLSFELD; HARVEY, 1999).

Segundo COSSON et al. (1999) para se processar o congelamento de sêmen de peixes, os espermatozoides devem apresentar uma taxa de motilidade espermática mínima de 90%, além disso, o sêmen não deve ser colocado diretamente no nitrogênio líquido, pois a membrana plasmática e a peça intermediária podem desintegrar-se (BILLARD, 1983). Neste caso, pode ocorrer a formação de microcristais de gelo, que é deletéria aos espermatozoides por duas razões principais: a redução brusca da temperatura dentro e fora da célula e a osmoconcentração extracelular, que ocasiona efluxo de água e intensificação da concentração osmótica interna, resultando no colapso da membrana celular (MEDEIROS et al., 2002).

Segundo Leung e Jamieson (1991), os maiores prejuízos conhecidos na estrutura dos espermatozoides ocorrem no intervalo crítico entre $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Quando o sêmen é colocado primeiro em vapor de

nitrogênio, os espermatozoides sofrem congelamento gradual e as estruturas membranosas não são muito alteradas, apesar de o aspecto da cromatina ser consideravelmente modificado (BILLARD, 1983). Em temperaturas em torno de 5 °C, a água intra e extracelular permanece resfriada e não cristaliza; porém entre temperaturas de -5 °C e -10 °C, microcristais de gelo começam a se formar no meio extracelular e o processo de desidratação se inicia (MEDEIROS et al., 2002).

2.7.2 Substâncias químicas utilizadas como crioprotetoras

Os espermatozoides, quando submetidos ao congelamento, estão sujeitos ao estresse resultante da interação água e solução, responsável pela formação de cristais de gelo, causando dano estrutural ou até mesmo a morte das células espermáticas (HOLT, 2000). Esses danos que o sêmen criopreservado pode sofrer são reduzidos ou evitados através da utilização de crioprotetores, que permitem o congelamento do sêmen em vapor de nitrogênio a uma temperatura de -79 °C, ou em nitrogênio líquido a -196 °C (CAROLSFELD et al., 2003).

A criopreservação de células espermáticas teve seu avanço nas pesquisas quando descobriram que o glicerol possui capacidade de protegê-las contra efeitos deletérios do congelamento (HOLT, 2000). Desde então, várias substâncias, como metanol, metiglicol, DMSO, propanodiol e gema de ovo, entre outras, vêm sendo testadas com a finalidade de proteger células espermáticas quando expostas ao congelamento (ALDERSON, 1984; GODINHO, 2000). Essas substâncias protegem as células espermáticas durante o processo de congelamento,

porém a eficácia de cada produto químico varia nas diferentes espécies de peixes (YAO, 2000).

O processo de criopreservação inclui soluções crioprotetoras adequadas que penetram e desidratam as células, minimizando alterações celulares e danos na membrana celular ocasionados pela formação de cristais de gelo. No entanto, a baixa toxicidade e a alta solubilidade na água são requisitos essenciais para um agente químico ser considerado crioprotetor (CHAO, 2001).

Essas substâncias que exercem funções crioprotetoras são divididas em crioprotetores intra e extracelulares. O crioprotetor intracelular é uma substância química não tóxica capaz de retirar a água da célula e diminuir a temperatura de congelamento no seu interior, impedindo a formação de cristais de gelo internamente (CAROLSFELD et al., 2003).

Entre os crioprotetores intracelulares podem-se destacar o dimetilsulfóxido (DMSO), o metanol, a dimetilacetamida (DMA), o glicerol, o metilglicol, o propanodiol e o etilenoglicol. O DMSO é um líquido orgânico, incolor, oleoso e sem odor, cuja fórmula é C_6H_6SO (ROSENBAEM; HERSCHILER; JACOB, 1965). É um composto derivado da lignina, substância responsável pela rigidez das células vegetais, e teve sua primeira utilização na preservação de órgãos (JACOB; HERSCHLER, 1983). Esse crioprotetor é um dos mais utilizados para preservar células espermáticas de peixe de água doce (LEUNG; JAMIESON, 1991). Em algumas espécies de peixes, essa toxicidade do DMSO pode ser suprimida pela adição de carboidratos (LEUNG; JAMIESON, 1991). Já o metanol é a substância que mais

facilmente atravessa a membrana celular, sendo, entretanto, considerada a mais tóxica, exceto para tilápias (*Oreochromus niloticus*) (HARVEY, 1993). O DMA tem sido utilizado com sucesso em bagre africano, porém sua toxicidade foi alta em tilápia-nilótica (AMORIM, 2002). O metilglicol é um éter monometílico de etilenoglicol, é proveniente do metanol (CH_3OH) e do óxido de eteno (CH_2OCH_2), utilizado como crioprotector na preservação de embriões bovinos (TAKAGI et al., 1993) e tem sido usado na criopreservação de algumas espécies de peixes (VIVEIROS et al., 2009). O glicerol é um líquido oleoso, incolor, viscoso e de sabor doce, solúvel em água e álcool. Esse crioprotetor induz a mudanças nos eventos citoplasmáticos por aumentar a viscosidade ao penetrar a célula espermática, causando alterações na polimerização da tubulina, na associação de microtúbulos no balanço bioenergético (HAMMERSTED; GRAHAM, 1992).

Os crioprotetores extracelulares, ao contrário dos intracelulares, revestem a célula externamente, estabilizando a membrana e diminuindo os danos provocados pelo congelamento (CAROLSFELD et al., 2003). Entre os crioprotetores extracelulares podem ser citados os açúcares (glicose, sacarose), proteínas (derivadas da gema de ovo, do leite desnatado, do soro e água de coco) e polímeros (dextram e PVP). Os açúcares atuam na desidratação da célula, reduzindo as injúrias causadas pela cristalização de gelo (YILDIZ et al., 2000). Eles conferem proteção à membrana plasmática durante o congelamento por meio das interações diretas com a membrana, as quais envolvem ligações de hidrogênio dos grupos hidroxil dos açúcares com os grupos fosfatos localizados na cabeça dos fosfolipídeos. Por restaurarem o percentual de água ao redor

dos grupos das cabeças dos fosfolipídios, os açúcares podem prevenir os danos causados pela desidratação extrema. Geralmente os dissacarídeos como a sacarose e a trealose têm melhor efeito na estabilização da bicamada da membrana do que os monossacarídeos, pois mantêm melhor a capacidade de transporte de cálcio e inibem a fusão das membranas (CROWE et al., 1987).

A gema de ovo é adicionada antes do uso da solução e funciona como fonte de nutrientes, além de ter ação crioprotetora por conter ácidos graxos e antioxidantes que auxiliam na proteção e conservação do espermatozoide (CAROLSFELD et al., 1999). Sua ação crioprotetora se dá devido à presença de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), as quais aderem à membrana celular durante o processo de criopreservação (MOUSSA et al., 2002).

Segundo MARIA (2005), a proteção proporcionada pelos crioprotetores internos se dá sobre as enzimas lábeis (ex-catalase) e sobre a estabilidade das proteínas em soluções aquosas não congeladas. Alternativamente, pode também induzir a desnaturação e causar toxicidade nos sistemas celulares. Foi verificado que determinadas substâncias agem melhor em algumas espécies do que em outras (GODINHO, 2000). Além disso, a eficiência crioprotetora pode aumentar quando dois crioprotetores (intracelular e extracelular) são combinados (HARVEY, 1993).

MILLIORINI (2006), utilizando, no congelamento do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) o crioprotetor DMSO em concentração de 10% e BTS em 5%, obteve maiores durações de motilidade espermática comparadas com metanol e BTS nas mesmas concentrações. Já, MARIA et al. (2006) obtiveram média da taxa de motilidade de 70% utilizando o

crioprotetor metilglicol em concentração de 10% e BTS em concentrações de 5% no congelamento de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). Entretanto, HOLT (2000) não observou alterações na motilidade espermática quando utilizou DMSO no congelamento dos espermatozoides de *Macrozoarces americanos* descongelados a 30 °C e 18 °C e YAO (2000) relata que o DMSO pode interagir com elementos não identificados no plasma seminal.

2.7.3 Soluções diluidoras

Os diluidores são soluções de sais ou de carboidratos adicionadas ao sêmen, cuja função é manter a estrutura das células espermáticas durante a redução da temperatura (LEGENDRE; BILLARD, 1980). Componentes constituintes de um meio diluidor são importantes para assegurar o pH, a força iônica, os tipos de íon e a pressão osmótica do sêmen de cada espécie animal (CHAO, 1991). As condições exigidas para um diluidor são isotonicidade, ou seja, que não ative a motilidade espermática; estável durante o armazenamento, pois suas características físico-químicas não devem ser alteradas durante o contato com o sêmen; e estéril, pois não pode veicular microrganismos potencialmente nocivos às células espermáticas (LEGENDRE; BILLARD, 1980).

A incorporação das soluções diluidoras é importante para proporcionar um meio osmótico e nutricional ideal aos espermatozoides durante a aplicação da biotecnologia (MURGAS et al., 2007). Além de diminuir a competição dos espermatozoides por oxigênio e espaço (CAROLFELD; HARVEY, 1999).

A glicose é um diluidor de fácil acesso e, em combinação com o DMSO e a gema de ovo, ou com metilglicol, tem sido a mais utilizada em espécies de peixes de ordem characiformes no Brasil (VIVEIROS; GODINHO, 2009). O BTS *Beltisville thawing solution* (BTS, Minitub) é um diluidor desenvolvido e utilizado para conservação do sêmen suíno, possuindo, em suas fórmulas, componentes que, além de nutrir células espermáticas e proporcionar um microambiente osmoticamente favorável, protegem a face intracelular da membrana citoplasmática durante o congelamento (MURGAS et al., 2007). Logo, têm sido utilizado por autores em pesquisas com peixes de piracema (FRANCISCATTO et al., 2002; MILIORINI, 2006).

Contudo, o diluidor pode ser utilizado desde que sejam adicionados solutos adequados em quantidades apropriadas para gerar um meio osmoticamente favorável à inativação da motilidade dos espermatozoides (MURGAS et al., 2004).

2.8 Fertilização em peixes

O processo de fertilização em peixes inicia-se quando o espermatozoide entra em contato com o exterior do ovócito e termina com a fusão dos dois pro-núcleos haplóides no citoplasma do ovócito (MENGERINK; VACQUIER, 2001; HARI, 1990).

Na natureza a fêmea de peixes de piracema é acompanhada por vários machos durante o processo de fertilização, o que assegura a variabilidade genética da prole (GODINHO et al., 1997). Em cativeiro, a fertilização de peixes é iniciada após a homogenização dos ovócitos com os espermatozoides e ativados com água ou outro ativador (solução salina). Os ovócitos fertilizados são aclimados á temperatura da água da incubadora geralmente do tipo funil, onde são distribuídos na proporção de 1 grama de ovos/ por litro de água (GODINHO, 2007).

Todavia, para que ocorra sucesso na fertilização, as fêmeas precisam estar com um bom condicionamento físico, aliados à ótimas condições ambientais. Essa ação conjunta reduz a incidência da atresia (reabsorção dos ovócitos não viabilizados para a fertilização) (NAKATANI et al., 2001).

2.9 Desenvolvimento embrionário em peixes

A embriogênese em peixes é o período compreendido entre a fertilização e o momento da eclosão do ovo (SATO et al., 2000; PRIVITERRA, 2001). Seu conhecimento é de grande importância, pois auxilia na localização de áreas de desova e no estudo da identificação e crescimento da espécie em ambiente natural. Além disso, contribui para o conhecimento biológico das espécies que poderão ser útil na aquicultura (PINTO; CASTAGNOLLI, 1984), na avaliação da qualidade do ambiente aquático (REYNALTE-TATAJE; ZAMBONI-FILHO; MUELBERT, 2001) e na compreensão fisiológica do sistema reprodutivo das espécies de peixes (HOAR, 1969).

Segundo Woynarovich; Horváth (1983) o momento da fertilização até os estágios larvais, pode ser considerado da seguinte forma:

- a) “ovo”, período decorrente entre o momento da fertilização até a eclosão;
- b) “larva”, período seguinte á eclosão até o início da alimentação exógena;
- c) “pós-larva”, período em que se inicia alimentação exógena até cerca de dez dias após o início da alimentação;
- d) “juvenil”, período em que o individuo se assemelha ao adulto e que se estende até o início do processo de maturação sexual.

Na maioria dos peixes teleósteos o desenvolvimento embrionário é caracterizado pelas fases de segmentação, formação da blástula, gástrula, organogênese, liberação da cauda e eclosão (KIMMEL; BALLARD; KIMMEL, 1995; LOPES; SENHORINI; SOARES, 1995; NAKATANI et al., 2001; LUZ et al., 2001; LANDINES et al., 2003; GANECO, 2003; BORÇATO; BAZZOLI; SATO, 2004; SAMPAIO, 2006; VALENTIM, 2007; FAUSTINO et al., 2007; FAUSTINO; NAKAGHI; NEUMANN, 2011).

O desenvolvimento embrionário em peixes inicia-se após a fertilização do ovo, seguidos pela segregação do pólo animal e vegetativo e clivagem do blastodisco e termina com a eclosão da larva, após o amolecimento do córion por meio da ação de enzimas (NAKATANI et al., 2001). A clivagem ocorre no polo animal ou blastodisco e divide-se em dois blastômeros, a segunda clivagem formam 4, 8, 16, 32 e 64 a 128

blastômeros, dando origem a mórula. Nessa fase os blastômeros aumentam e diminuem o tamanho e ocorre o início do movimento de epibolia (GANECO, 2003; SAMPAIO, 2006; VALETIM, 2007).

A fase da gástrula é caracterizada pelo espaçamento do blastoderme dando origem ao anel embrionário, que por meio de movimentos de epibolia, motivam as células da blastoderme a moverem-se sobre a superfície do vitelo em direção ao polo vegetativo e retornam ao polo animal, originando os folhetos germinativos, epiblasto e hipoblasto. Neste período a margem do blastoderme avança ao longo do limite do vitelo para recobri-lo completamente, formando o saco vitelínico e o eixo embrionário (diferenciação do epiblasto em ectoderma e do hipoblasto em mesoderma e endoderma), (GANECO, 2003; SAMPAIO, 2006; VALENTIM, 2007).

Os primeiros movimentos é chamado de epibolia em que as células da blastoderme englobam o ovo, o segundo movimento é chamado de involução ou germe de anel (espessura as margens do ovo) e ocorre após os primeiros movimentos terem englobado quase metade do ovo. O movimento de involução prossegui para o polo animal, ao contrário do movimento de epibolia que vai para polo vegetativo, formando duas camadas externa e interna denominada hipoblasto. (FAUSTINO; NAKAGHI; NEUMANN, 2011). No final da gastrulação, quando a epipolia está próxima de seu término, ocorre o acúmulo de células que darão origem a notocorda. Essa fase é caracterizada pelo fechamento do blastóporo, figura 1 e pela abertura do intestino primitivo (GANECO, 2003; SAMPAIO, 2006; VALENTIM, 2007).

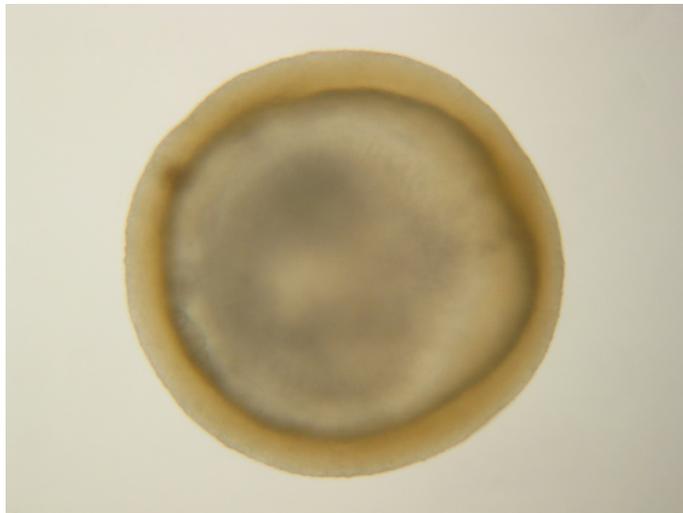


Figura1 Ovócito de *Prochilodus lineatus* fecundado - fase de fechamento do blastóporo

A fase de organogênese em teleósteos é evidenciada pelos primeiros somitos e o surgimento do saco vitelínico. O embrião continua desenvolvendo-se e nesta fase são visíveis a cauda livre, aumento da região da cabeça, vesícula ótica, tubo neural na região cefálica, notocorda, deslocamento da cauda, alongamento do embrião a partir do eixo cefálico caudal e o sistema nervoso constituído por cérebro anterior, prosencéfalo, cérebro médio, mesencéfalo e cérebro posterior (rombencéfalo) (LANDINES et al., 2003; SAMPAIO, 2006; VALETIM, 2007; FAUSTINO; NAKAGHI; NEUMANN, 2011).

A eclosão ocorre após movimentos da cauda, que resulta no rompimento do córion, (GANECO, 2003) e após a eclosão, ocorre o estágio de larva, no qual são evidenciados a pigmentação dos olhos,

abertura bucal, inflação da bexiga natatória e o início do consumo de alimentos exógenos (LOPES; SENHORINI; SOARES, 1995).

REFERÊNCIAS

- ALAVI, S. M. H.; COSSON, J. Sperm motility in fishes . (II)Effect of ions and osmolality: areview. **Cell Biology International**, London, v. 30, p. 1-14, 2006.
- ALAVI, S. M. H. et al. Effects of osmolality on sperm morphology, motility and flagellar wave parameters in Northern pike *Esox lucius* L. **Theriogenology**: an international journal of animal reproduction, Stoneham, v. 72, p. 32-43, 2009.
- ALDERSON, P.; MACNEIL, A. J. Preliminary investigations of milt of Atlantic salmon *Salmo salar*. and its application to commercial farming. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 43, p. 351–354, 1984.
- AMORIM, V. M. C. **Criopreservação de sêmen de tilápia-nilótica (*Oreochromis niloticus*), variedade chitralada**. 2002. 64 p. Dissertação (Mestrado em Zoologia)-Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.
- ARUKWE, A.; GOKSOYR, A. Eggshell and egg yolk nproteins in fish: hepatic proteins for the next generation: oogenetic,population, and evolutionary implications of endocrine disruption. **Comparative Hepatology**, London, v. 2, n. 1, p. 4, Mar. 2003.
- BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de peixes aplicada a piscicultura**. 2. ed. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2009. 352 p.
- BASTARDO, H.; GUEDEZ, C.; LEÓN, M. Características del semen de trucha arco-iris de diferentes edades, bajo condiciones de cultivo en Mérida, Venezuela. **Zootecnia Tropical**, Maracay, v. 22, n. 3, abr. p. 277-288, 2004.
- BILLARD, R.; COSSON, J.; LINHART, O. Changes in the flagellum morfology of intact and frozen/thawed Siberian sturgeon *Acipenser baeri* (Brandt) sperm during motility. **Aquaculture Reserch**, v. 31, p. 283-287, 2000.

BILLARD, R. Effects of ceolomic and seminal fluids and various saline diluents on the fertilizing ability of spermatozoa in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. **Journal Reproduction & Fertility**, Cambridge, v. 68, p. 77-84, 1983.

BILLARD, R. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. **Reproduction Nutrition Development**, v. 2, p. 877-920, 1986.

BOMBARDELLI, R. A.; SYPERRECK, M. A.; SANCHES, E. A. Hormônio liberador de gonadotrofinas em peixes: aspectos básicos e suas aplicações. **Arquivos Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, Umuarama, v. 9, n. 1, p. 59-65, jan./jun. 2006.

BORÇATO, F. L.; BAZZOLI, N.; SATO, Y. Embriogênese and larval ontogeny of the “piau gordura”, *Leporinus piau* (Fowler) (Pisces, Anostomidae) after induced spawning. **Revista Brasileira de Zoologia**, São Paulo, v. 21, n. 1, p. 117-122, mar. 2004.

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

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, jul./set. 2007.

CAROLSFELD, H. B. et al. Criopreservação do sêmen de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, (Holmberg, 1887). **Boletim Técnico do CEPTA**, Pirassununga, v. 3, p. 1-4, 1990.

CAROLSFELD J. Reproductive physiology and induced breeding of fish as related to culture of Colossomas. In: HERNANDEZ, A. **Cultivo de Colossoma**. Bogotá: Guadalupe, 1989. p. 37-73.

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

CAROLSFELD, J.; HARVEY, B. **Conservação de recursos genéticos de peixes: teoria e prática**. Canadá: Victoria, 1999. 41 p. (Curso de Treinamento Brasileiro. World Fisheries Trust).

CHAO, N. H. **Fish sperm cryopreservation in Taiwan: technology advancement and extension efforts**. Taiwan: Department of Aquaculture. Taiwan Fishery Research Institute, 1991. p. 31. (Paper on International Symposium on Reproductive Biology in Aquaculture).

COMPANHIA ENERGETICA DE MINAS GERAIS. **Guia ilustrado de peixes da Bacia do Rio Grande**. Belo Horizonte, 2000. 144 p.

COSSON, J. et al. Ionic factors regulanting the motility of fish sperm. In: GAGNON, C. (Ed.). **The male gamete: from basic science to clinical applications**. Vienna: Cachê River, 1999. Cap.16, p v. 16, 162-186.

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

CREPALDI, D. V. et al. Utilização de hormônios na reprodução induzida de surubim (*Pseudoplatystoma* spp). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 30, n. 3-4, p. 168-173, jul./dez. 2006.

CROWE, J. H. et al. Stabilization of dryphospholipid bilayers and proteins by sugars. **Biochemistry Journal**, London, v. 242, p. 1-10, 1987.

CRUZ-LANDIM, C.; CRUZ-HÖFLING, M.A. Estudo ao microscópio eletrônico da deposição do envoltório do ovócito de peixes: I *Plagiocion squamosissimum* (Teleostei-Sciaenidae). **Naturalia**, São Paulo, v. 14, p. 97-105, 1989.

FAUSTINO, F. et al. Fertilização e desenvolvimento embrionário: morfometria e análise estereomicroscópica dos ovos dos híbridos de surubins (pintado, *Pseudoplatystoma corruscans* x cachara, *Pseudoplatystoma fasciatum*). **Acta Scientiarum Biological Sciences**, Maringá, v. 29, n. 1, p. 49-55, 2007.

FAUSTINO, F.; NAKAGHI, L. S. O.; NEUMANN, E. *Brycon gouldingi* (Teleostei, characidae): aspects of the embryonic development in a new fish species with aquaculture potential. **Zygote**, v. 19, p. 351-363, Nov. 2011.

FAUVEL, C. et al. Characteristics of sperm of captive sea bass in relation to its fertilization potential. **Journal of Fish Biology**, London, v. 54, n. 2, p. 356-369, Feb. 1999.

FISHELSON, L.; DELAREA, Y.; GON, O. Testis structure spermatogenesis and sperm structure in cardinal fish (Apogonidae, Perciformes). **Anatomy and Embryology**, Berlin, v. 211, p. 31-46, 2006.

FOGLI da SILVEIRA, W. et al. Avaliação da qualidade e criopreservação em forma de pellets do sêmen do bagre, *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840). **Boletim Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 12, n. 2, p. 7-11, 1985.

FRANCISCATTO, R. T. et al. Qualidade do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) e taxa de fertilidade após o resfriamento à 4°C. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 26, n. 3, p. 213-215, jul./set. 2002.

FURUYA, W. M. Classificação sistemática de peixes. In: MOREIRA, H. L. M. et al. **Fundamentos da moderna aquicultura**. Canoas: Ulbra, 2001. p. 83-90.

GANECO, L. N. **Análise dos ovos de Piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849) durante a fertilização e o desenvolvimento embrionário, sob condições de reprodução induzida**. 2003. 78 p. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura)-Universidade Estadual Paulista-Centro de Aqüicultura, Jaboticabal, 2003.

GARCIA, J. A. D. Dynamics and cytochemistry of oogenesis in *Astyanax fasciatus* (Cuvier) (Teleostei, Characiformes, Characidae) from Rio Sapucaí, Minas Gerais State, Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, São Paulo, v. 18, n. 4, p. 1057-1064, 2001.

GANECO, L. N.; NAKAGHI, L. S. O. Morfologia da micrópila e da superfície dos ovócitos de piracanjuba, *Brycon orbignyanus* (Osteichthyes, Characidae), sobmicroscopia eletrônica de varredura. **Acta Scientiarum: biological sciences**, Maringá, v. 25, n. 1, p. 227-231, 2003.

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. et al. Pesca e biologia do surubin *Pseudoplatystoma coruscans* no Rio São Francisco. In: MIRANDA, M. O. T. (Org.). **Surubin**. Belo Horizonte: IBAMA, 1997. p. 27-42.

GURAYA, S. S. Recent advances in the functional morphology of follicular wall, egg-surface components, and micropyle in the fish ovary. In: MUNSHI, J. S. D.; DUTTA, H. M (Ed.) **Fish morphology: horizon of new research**. Rotterdam: Balkema, 1996. p. 114-144.

GURAYA, S. S. Recent advances in the functional morphology of follicular wall, egg-surface components, and micropyle in the fish ovary. In: MUNSHI, J. S. D.; DUTTA, H. M (Ed.). **Fish morphology: horizon of new research**. New York: Academic, 1996. p. 114-144.

GURAYA, S. S. **The cell and molecular biology of fish oogenesis**. New York: Karger, 1986. v. 18. (Monographs Developmental Biology, 18).

GUSMÃO, P.; FORESTI, F.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I. Ultrastructure of spermiogenesis in *Plagioscion squamosissimus* (Teleostei, Perciformes, Sciaenidae). **Tissue and Cell**, Essex, v. 31, n. 6, p. 627-633, 1999.

HAMMERSTED, R. H.; GRAHAM, J. K. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glicerol. **Cryobiology**, San Diego, v. 29, n. 1, p. 26-28, 1992.

HARI, N. H. Fertilization in teleost fish: Mechanism of sperm-egg interactions. **International Review of Cytology**, New York, v. 121, p. 1-66, 1990.

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

HERMAN, H. A.; MITCHELL, J. R.; DOAK, G. A. **The artificial insemination and embryo transfer of dairy and beef cattle**. Illinois: Interstate, 1994. 392 p.

HOLT, W. V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**: an international journal of animal reproduction, Stoneham, v. 53, p. 47-58, Jan. 2000.

ISEKI, K. K.; NEGRÃO, J. A. Controle neuroendócrino da reprodução de peixes teleósteos. **Revista de Ciências Veterinária**, v. 1, n. 1, p. 11-20, 2003.

JACOB, S. W.; HERSCHLER, R. Introductory remarks: dimethyl sulfoxide after twenty years. **Annals of Academy Science of the New York**, New York, n. 401, p. 13-17, 1983.

KANAMORI, A. et al. Genomic organization of ZP domain containing egg envelope genes in medaka (*Oryzias latipes*). **Gene**, v. 305, p. 35-45, 2003.

KAVAMOTO, E. T. et al. Produção espermática do curimatá *Prochilodus scrofa*, Steindachner, 1881. **Boletim Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 24, p. 73-78, 1997.

KAVAMOTO, E. T.; FOGLI DA SILVEIRA, W. Características físicas, químicas e microscópicas do sêmen do bagre *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840) em condições de campo. **Boletim Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 13, n. 1, p. 95-100, 1986.

KIMMEL, C. B.; BALLARD, W. W.; KIMMEL, S. R. Stages embryonic developmental of the zebrafish. **Developmental Dynamics**, New York, v. 203, n. 3, p. 253-310, July 1995.

LANHNSTEINER, F. et al. Sperm structure and motility of freshwater teleost *Cottus gobio*. **Journal Fish Biology**, v. 50, p. 564-574, 1997.

LANHNSTEINER, F. et al. Sperm morphology and ultrastructure in fish. In: COWARD, G.; RAFIE, E. (Ed.). **Fish spermatology**. Oxford: Science, 2008. p. 1-62.

LANDINES, M. A. et al. Desenvolvimento embrionário do pintado (*Pseudoplatystoma coruscans* Agassiz, 1829). **Boletim Técnico do CEPTA**, Pirassununga, v. 16, p. 1-13, 2003.

LEGENDRE, M.; BILLARD, R. Cryopreservation of rainbow trout sperm by deep-freezing. **Reproduction Nutrition Development**, Paris, v. 20, n. 6, p.1859-1868, 1980.

LEUNG, L. K. P.; JAMIESON, B. G. M. Live preservation of fish gametes. In: JAMIESON, B. G. M. (Ed.). **Fish evolution and systematics: evidence from spermatozoa**. Cambridge: Cambridge University, 1991. Cap. 20, p. 245-295.

LINHART, O. et al. Effects of osmolality and ions on the motility of stripped and testicular sperm of freshwater- and seawater-acclimated tilapia, *Oreochromis mossambicus*. **Journal of Fish Biology**, London, v. 55, p. 1344-1358, 1999.

LOPES, R. N. M.; SENHORINI, J. A.; SOARES, M. C. F. Desenvolvimento embrionário e larval do matrinxã *Brycon cephalus* Gnter, 1869, (Pisces, Characidae). **Boletim Técnico do CEPTA**, Pirassununga, v. 8. p. 25-39, 1995.

LUZ, R. K. et al. Desenvolvimento embrionário e estágios larvais do mandi-amarelo *Pimelodus maculatus*. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 27, p. 49-55, 2001.

MARIA, M. N. **Caracterização ultra-estrutural dos gametas, aspectos da fertilização e desenvolvimento inicial de pirapitinga**. 2008. 115 p. Tese (Doutorado em Zootecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

MARIA, A. N. **Diluidores e crioprotetores no resfriamento e congelamento do sêmen de Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)**. 2005. 73 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

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, p. 298–306, 2006.

MATOS, E.; AZEVEDO, C. Ultraestrutura da espermatogênese de *Lepidosiren paradoxa* (Pisces, Dipnoi) na Amazônia. **Revista Brasileira de Ciências Morfológicas**, São Paulo, v. 6, p. 67-71, 1989.

MATTEI, X. Spermatozoon ultrastructure and its systematic implications in fishes. **Canadian Journal of Zoology**, Ottawa, v. 69, p. 3038–3055, 1991.

MEDEIROS, C. M. et al. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology: an international journal of animal reproduction**, Stoneham, v. 57, n. 1, p. 327-344, Jan. 2002.

MENGERINK, K. J.; VACQUIER, V. D. Glycobiology of sperm-egg interactions in deuterostomes. **Glycobiology**, Oxford, v. 11, n. 4, p. 37-43, 2001.

MILLIORINI, A. B. **Ativadores e concentrações de metanol e dimetilsulfóxido na qualidade do sêmen criopreservado de Curimba (*Prochilodus lineatus*)**. 2006. 99 p. Dissertação (Mestrado em Veterinária)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

MOUSSA, M. et al. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by a easy method: cryoprotective effect on frozen –thawed bull semen. **Theriogenology: an international journal of animal reproduction**, Stoneham, v. 57, n. 6, p. 1695-1706, Apr. 2002.

- MURGAS, L. D. S. et al. Criopreservação de sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) mediante adição de diferentes diluidores, ativadores e crioprotetores. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 36, n. 3, p. 526-531, 2007.
- MURGAS, L. D. S. et al. Viabilidade espermática do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) resfriado a 4° C. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 33, n. 6, p. 1361-1365, 2004.
- NAKATANI, K. et al. **Ovos e larvas de peixes de água doce:** desenvolvimento e manual de identificação. Maringá: EDUEM, 2001. 378 p.
- PINTO, M. L. G.; CASTAGNOLLI, N. Desenvolvimento inicial do pacu (Berg, 1895). In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, 3., 1983, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 1984. p. 523-535.
- PRIVITTERA, L. Characteristics of eggs and larval production in captive blue spotted gobies. **Journal of Fish Biology**, London, v. 58, p. 1211-1220, 2001.
- PSENICKA, M. et al. Morphology and ultrastructure of *Siberian sturgeon* using scanning and transmission electron microscopy. **Biology of the Cell**, Paris, v. 99, n. 2, p. 103-115, 2007.
- PSENICKA, M. et al. Potential role of the acrosome of sturgeon spermatozoa in the fertilization process. **Journal of Applied Ichthyology**, Berlin, v. 27, p. 678-682, 2011.
- REYNALTE-TATAJE, D. R.; ZAMBONI-FILHO, E.; MUELBERT, B. Stages of the embryonic development of the piavuçu *Leporinus macrocephalus*. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 23, n. 4, p. 823-827, 2001.
- RIBEIRO, R. P.; PAVANELLI, C. S. Classificação sistemática de peixes. In: MOREIRA, H. L. M. et al. **Fundamentos da moderna aquicultura**. Canoas: Ulbra, 2001. p. 83-90.

RIEHL, R. Surface morphology and micropyle as a tool for identifying fish eggs by scanning electron microscopy. **Microscopy and Analysis**, Surrey, p. 29-31, May 1993.

RIZZO, E. et al. Adhesiveness and surface patterns of eggs in neotropical freshwater teleosts. **Journal of Fish Biology**, London, v. 61, p. 615-632, 2002.

RIZZO, E.; GODINHO, H. P.; SATO, Y. Short-term storage of oocytes from the neotropical teleost fish *Prochilodus marginatus*. **Theriogenology**: an international journal of animal reproduction, Stoneham, v. 60, p. 1059-1070, 2003.

ROMAGOSA, E.; NARAHARA, M. Y. Desenvolvimento e diferenciação dos ovócitos de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) (Osteichthyes, Characidae). **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 24, n. 2, p. 433-438, 2002.

ROSENBAUM, E. E.; HERSCHLER, R. J.; JACOB, S. W. Dimethyl sulfoxide in musculoskeletal disorders. **Journal American Medical Association**, Chicago, v. 192, n. 4, p. 309-313, 1965.

RURANGWA, E. et al. The minimum effective spermatozoa : egg ratio for artificial insemination and the effects of mercury on sperm motility and fertilization ability in *Clarias gariepinus*. **Journal of Fish Biology**, London, v. 53, p. 402-413, 1998.

SAMPAIO, L. K. H. **Superfície ovocitária e desenvolvimentop inicial de quatro espécies de peixes de interesse comercial da Bacia do rio São Francisco**. 2006. 53 p. Dissertação (Mestrado em Biologia celular)- Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

SATO, Y. et al. Induced reproductive responses of the neotropical anostomid fish *Leporinus elongatus* Val. under captive breeding. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 31, p. 189-193, 2000.

VERÍSSIMO SILVEIRA, R. et al. Spermiogenesis and spermatozoa ultrastructure in *Salminus* and *Brycon*, two primitive genera in

Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes). **Acta Zoologica**, Stockholm, v. 87, p. 305-313, 2006.

STERIT Jr., D.P. et al. Parâmetros qualitativos do sêmen de Dourado (*Salminus maxillosus*) em cativo. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 34, n. 3, p. 337-344, 2008

STREIT JUNIOR, D. P. et al. Estudos comparativo da indução hormonal da espermiacão em piavuçu (*Leporinus macrocephalus*) com extrato de hipófise de frango, coelho e carpa. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 25, n. 2, p. 261-266, abr./jun. 2003.

TAKAGI, M. et al. Survival rate of frozen-thawed bovine IVF embryos in relation to exposure time using various cryoprotectants. **Cryobiology**, San Diego, v. 30, n. 5, p. 306-312, Oct. 1993.

TAKAI, H.; MORISAWA, M. Change in intracellular K⁺ concentration caused by external osmolality change regulates sperm motility of marine and freshwater teleosts. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 108, n. 3, p. 1175-1181, Mar. 1995.

IWAMATSU, T.; ISHIJIMA, S.; NAKASHIMA, S. Movement of spermatozoa and changes in micropyles during fertilization in medaka eggs. **The Journal of Experimental Zoology**, New York, v. 266, p.57-64, 1993.

VALETIM, F. N. **Efeito da idade das matrizes de tilapia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) no desenvolvimento embrionário e larval**. 2007. 43 p. Dissertação (Mestrado em Aquicultura)-Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

VAZZOLLER, A. E. de M. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática**. Maringá: Universidade de Maringá, 1996. 169 p.

VERÍSSIMO SILVEIRA, R. et al. Spermiogenesis and spermatozoa ultrastructure in *Salminus* and *Brycon*, two primitive genera in Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes). **Acta Zoologica**, Stockholm, v. 87, p. 305-313, 2006.

VIVEIROS, A. T. M. et al. A simple, inexpensive and successful freezing method for curimba (*Prochilodus lineatus*) (Characiformes) sêmen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 105, n. 3-4, p. 283-291, Mar. 2009.

VIVEIROS, A. T. M.; GODINHO, H. P. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species a review. **Fish Physiology Biochemistry**, Amsterdam, v. 35, n.1, p.137-150, Mar. 2009.

YAO, Z. et al. Motility, fertility and ultrastructural changes of ocean pout *Macrozoarces americanus* L. sperm after cryopreservation. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 181, p. 361–375, 2000.

YILDIZ, C.; KAYA, A.; AKSOY, M.; TEKELI, T. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrossomal integrity of dog spermatozoa during freezing. **Theriogenology: an international journal of animal reproduction**, Stoneham, v. 54, n. 4, p. 579-585, Sept. 2000.

WASSARMAN, P. M. Zona pellucida glycoproteins. **Journal Biology Chemistry**, v. 283, n. 36, p. 24285–24289, 2008.

WOYNAROVICH, E.; HORVÁTH, L. A propagação artificial de peixes de águas tropicais. Brasília: FAO/CODEVASF/CNPq, 1983. 220 p.

ZAMBONI FILHO, E.; WEINGARTNER, M. Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 31, n. 3, p. 367-373, jul./set. 2007.

ZOHAR, Y. Endocrinology and fish farming: aspects in reproduction, growth, and smoltification. **Fish Physiology Biochemistry**, Amsterdam, v. 7, p. 395-405, 1989.

ZOHAR, Y.; MYLONAS, C. C. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish from hormones to genes. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 197, p. 99-136, 2001.

SEGUNDA PARTE-ARTIGOS

ARTIGO 1 Efeito do sêmen congelado na produção de larvas de Curimba, *Prochilodus lineatus*

Paulino, M. S; Miliorini, A.B; Murgas, L.D.S.

**Preparado de acordo com as normas da revista Ciência Animal Brasileira
(SUBMETIDO)**

RESUMO

O presente estudo objetivou avaliar a taxa de eclosão de larvas de curimba, *Prochilodus lineatus* no processo de fertilização utilizando sêmen criopreservado em diferentes soluções crioprotetoras. Após avaliação inicial, o sêmen foi acrescido em cinco tratamentos: solução de metilenoglicol, metanol, propilenoglicol ou dimetilsulfóxido (DMSO), em concentrações de 7,89%. Os sêmen foram envasados em paletas de 0,5 mL e congelados a -196°C . Sete dias depois, foi descongelado e avaliado, como no sêmen *in natura*, quanto à motilidade e morfologia. Para a fertilização, um pool de sêmen contendo 5 mL de cada tratamento foi homogenizado em 2 g de ovócitos e ativado em bicarbonato de sódio 90 mM. Foram avaliados 30 embriões nas fases de blástula, gástrula, segmentação e eclosão. Os maiores valores das taxas médias de motilidade ($p < 0,01$) foram obtidos com o tratamento metilenoglicol ($46 \pm 5\%$) e DMSO ($42 \pm 12\%$). Não houve ($p > 0,05$) diferença entre os crioprotetores quanto à taxa de anormalidades totais. Observou-se que o índice de embriões viáveis foi superior ($p < 0,01$), em quase todas as fases do desenvolvimento avaliadas, exceto para metanol. O sêmen criopreservado com metilenoglicol apresentou os maiores valores ($p < 0,01$) das taxas de eclosão ($93 \pm 4\%$). O crioprotetor utilizado na criopreservação do sêmen e o ativador da motilidade espermática interferem nas etapas do desenvolvimento dos embriões de *P. lineatus* até a eclosão da larva. Os maiores valores dos índices de motilidade e taxa de eclosão de larvas foram obtidos com o sêmen criopreservado com metilenoglicol.

Palavras-chave: criopreservação, desenvolvimento embrionário, espermatozoides, peixes.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the hatch of curimba (*Prochilodus lineatus*) from cryopreserved sperm in different cryoprotectant solutions. After the initial evaluation, semen was plus metilenoglicol, methanol, propylene glycol or dimethyl sulfoxide (DMSO) at a concentration of 7.89%, and frozen at -196°C. Seven days later, sperm was thawed and evaluated as in fresh one for motility and morphology. For the fertilization procedure, a pool of 5 mL of semen was mixed to 2g of oocytes and activated in 10 mL of sodium bicarbonate 90 mM. A total of 30 embryos were evaluated in the stages of blastula, gastrula, segmentation and hatching for each treatment. It can be observed that the highest motility rates means ($p < 0.01$) were obtained with metilenoglicol ($46 \pm 5\%$) and DMSO ($42 \pm 12\%$). There was no significant ($p > 0.05$) difference among cryoprotectants on the total abnormalities rates. It was observed that the rate of viable embryos was higher ($p < 0.01$) in almost all stages of development studied, except for methanol. The cryopreserved sperm with metilenoglicol had the highest ($p < 0.01$) hatching rates ($93 \pm 4\%$). In conclusion, cryoprotectant used in sperm freezing and activating solution interfere with embryo development of *P. lineatus*, and possibly other fish species.

Key words: freezing, spermatozoids, cryopreservation, hatching, *Prochilodus lineatus*

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui grande potencial para a aquicultura, principalmente em razão do clima tropical e da diversidade de espécies de peixes (DIEMER et al., 2012). Entre as espécies nativas, merece destaque as do gênero *Prochilodus*, que é amplamente distribuído pela América do Sul. Esse gênero alimenta-se de detritos de peixes, quando os nutrientes se tornam escassos, exercendo notável função para a biomassa (WELCOME, 1982). A curimba, *Prochilodus lineatus* é uma espécie nativa que exerce importância em estações de piscicultura, pois é utilizada como modelo experimental devido sua facilidade de manejo e por suas larvas servirem de alimento a peixes carnívoros (MURGAS et al., 2007).

Dentre as técnicas de biotecnologia reprodutiva, a criopreservação de sêmen de peixes consiste em congelar o sêmen por tempo indeterminado, preservando o material genético e otimizando problemas de assincronia entre os reprodutores. Nesse processo, a qualidade do sêmen após o congelamento e descongelamento, depende do tipo e da concentração do crioprotetor intracelular, da sua combinação com diferentes taxas de diluição (VIVEIROS e GODINHO, 2009). No entanto, o nível de proteção que o crioprotetor proporciona as células espermáticas pode ser variado, isso vai depender da concentração, do tipo de crioprotetor, além da distinta sensibilidade que as espécies de peixes podem apresentar (VIVEIROS e GODINHO, 2009). Essa proteção é avaliada mediante os resultados que são obtidos nos valores das taxas de fertilização e motilidade espermática (LINHART et al., 2000, GODINHO et al., 2003). Entre os crioprotetores, o dimetilsulfóxido (DMSO), vem

sendo o mais testado proporcionado bons resultados em espermatozoides de espécies nativas (VIVEIROS e GODINHO) assim como o metanol (MURGAS et al., 2007), no entanto, estudos revelam que o metilenoglicol tem sido o crioprotetor que melhor protege as células espermáticas de curimba após congelamento (VIVEIROS et al., 2009).

Do mesmo modo que a utilização de crioprotetores é fundamental no sucesso da criopreservação de sêmen de peixes, a incorporação de soluções diluidoras é fundamental para proporcionar meio osmótico e nutricional ideal para os espermatozoides durante a aplicação da biotecnologia. O BTS (*Beltsville Thawing Solution*) é um diluidor preconizado para conservação de sêmen suíno e tem sido utilizado com sucesso em criopreservação de sêmen de curimba (MURGAS et al., 2007; VIVEIROS et al., 2009). Os autores relatam ainda que a utilização do ativador para dar início a motilidade espermática em peixes, tem sido testadas em outras espécies, porém em *Prochilodus lineatus*, a utilização do NaHCO_3 em concentração de 90 mM e 119mM, tem proporcionado valores superiores nas taxas e duração de motilidade espermática. No entanto, a toxidez que soluções salinas exercem sobre os ovócitos no processo de fertilização devem ser investigada mediante ensaios de fertilização (MURGAS et al., 2007).

O presente trabalho objetivou avaliar qual o crioprotetor utilizado no congelamento do sêmen que proporcionaria os valores superiores das taxas de eclosão de larvas de curimba, após serem utilizados na fertilização.

2 MATERIAL E METODOS

O experimento foi realizado na Estação de Piscicultura da Cemig, em Itutinga, Minas Gerais, Brasil, entre dezembro de 2010 e janeiro de 2011. Foram selecionados seis exemplares de curimba, *Prochilodus lineatus*, com peso entre 0,8 a 1,8 Kg. Os reprodutores foram selecionados de acordo com características que liberavam sêmen sob leve pressão e fêmeas que apresentavam ventre avermelhado.

Uma alíquota de 10 μ L de sêmen fresco foi retirada para avaliar os valores das taxas e duração da motilidade espermática, mediante ativação com água destilada. O sêmen de seis reprodutores que apresentaram valores das taxas de motilidade acima de 90% foi considerado apto para o experimento. Para a avaliação das anormalidades morfológicas, uma alíquota de 10 μ L foi diluída em 990 μ l de formol citrato. Foram identificadas as anormalidades presentes nas células espermáticas, segundo critério proposto por MILIORINI et al. (2011). Foram consideradas anormalidades maiores os espermatozoides que apresentaram: presença de rupturas, enrolamentos, dobramentos e degeneração da cauda, anormalidades na peça intermediária e na cabeça (microcefalia e macrocefalia e degenerada) nessas células. Já as anormalidades menores foram atribuídas aos espermatozoides que apresentaram cauda dobrado e cabeça isolada.

Em seguida, foram avaliados a sensibilidade do sêmen em detrimento dos crioprotetores (teste de toxicidade). Para tanto alíquotas de 10 μ l de sêmen de cada animal foram diluídos em 5% de Beltsville Thawing Solution (BTSTM; MinitubTM), (glicose 3,99 g, EDTA 0,13 g,

NaHCO₃, 0,63 g, cloreto de potássio, 0,0079 g e sulfato de gentamicina 0,025 g) e posteriormente diluídas novamente em quatro soluções crioprotetoras distintas compostas por metilenoglicol ou metanol ou propilenoglicol ou DMSO, na concentração de 7,89%, (Tabela 1). Para o procedimento de congelamento do sêmen, amostras do sêmen de seis machos foram diluídas em solução diluente (5% BTS acrescidas de 7,89% de metilglicol ou metanol ou propilenoglicol ou dimetilsulfóxido) em proporção 1:4 (sêmen: solução diluente), (Tabela 1) e, posteriormente, foram envasadas em palhetas de 0,5 mL e acondicionadas em vapor de nitrogênio líquido por 15 dias. O descongelamento ocorreu por imersão das palhetas em água em banho-maria a 40°C por 8 segundos, (PAULINO et al., 2011) e o sêmen foi ativado com solução de 90 mM de NaHCO₃.

Tabela 1. Tratamentos do sêmen de curimba, *Prochilodus lineatus*, congelado com os diferentes crioprotetores e ativados em solução 90 mM de bicarbonato de sódio.

Tratamento	Crioprotetor	Ativador
1	Metilenoglicol	NaHCO ₃ ¹
2	Dimetilsulfóxido	NaHCO ₃
3	Metanol	NaHCO ₃
4	Propilenoglicol	NaHCO ₃

¹Bicarbonato de sódio 90 mM

Para análise da influência dos diferentes crioprotetores sobre a fertilização de curimba, foram utilizados para cada tratamento 2600

ovócitos de curimba homogeneizados com 0,5 mL de pool de sêmen, ativado com 10 mL de bicarbonato de sódio (NaHCO_3), segundo metodologia empregada por JI et al., (2008). Os ovócitos fertilizados foram distribuídos em 4 incubadoras experimentais de policloreto de vinila (PVC) com 700 mL de volume útil, sendo acondicionadas em caixas de água com sistema de circulação de água constante. A temperatura da água foi monitorada de hora em hora.

A partir de então, os embriões foram observados em estereomicroscópio até que atingissem os seguintes estágios de desenvolvimento: blástula (4 horas), gástrula (7 horas), segmentação (12 horas) e eclosão larval (BOTTA et al., 2010). Os estágios embrionários avaliados seguiram a metodologia proposta por LAHNSTEINER et al., (2003), que consistiu em retirar 30 embriões em cada fase, para se estimar os valores das taxas de embriões viáveis. Utilizaram-se como controle positivo ovócitos fertilizados com sêmen fresco.

Os experimentos de criopreservação e morfologia espermática foram conduzidos em delineamento em blocos casualizados, com os tratamentos dispostos em arranjo fatorial $2 \times 5 + 1$ (temperatura x crioprotetores + tratamento controle) com seis repetições (blocos), sendo cada macho uma repetição. Antes das análises, as variáveis foram investigadas quanto à homogeneidade da variância e à normalidade dos resíduos. Aquelas, cujos resíduos não apresentaram distribuição normal, foram transformadas em $\log_{10}x$ para sua normalização, sendo as médias posteriormente, convertidas em seu antilogaritmo para apresentação dos resultados. Para análise dos dados foi utilizado o programa SISVAR

versão (2007) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (nível mínimo de significância = 0,01).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teste de toxicidade (avaliação do sêmen fresco) apresentou diferenças estatísticas entre os tratamentos ($p < 0,01$). O sêmen diluído com metilenoglicol proporcionou os maiores valores das taxas de motilidade espermática ($90 \pm 4\%$) em relação aos outros tratamentos, entretanto, o sêmen diluído com DMSO mostrou os menores valores de motilidade quando comparados aos demais tratamentos. A duração da motilidade não apresentou diferenças estatísticas entre os tratamentos, exceto, para o sêmen diluído com DMSO, que também apresentou menor duração da motilidade, em relação aos outros tratamentos, (FIGURA 1).

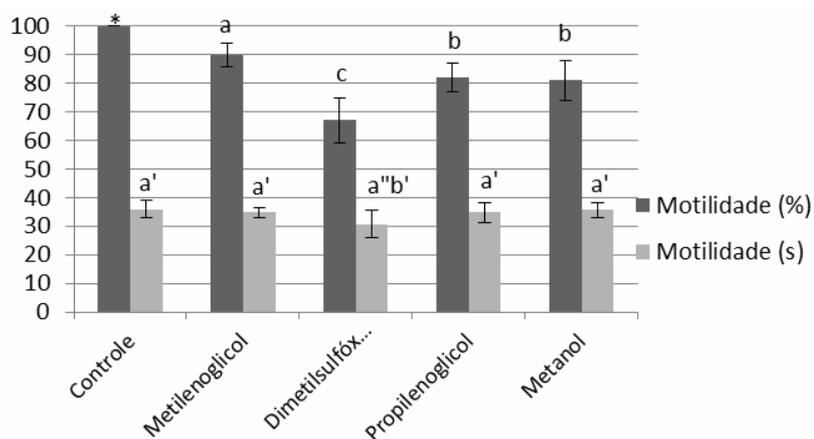


FIGURA 1. Taxa (%) e duração (s) médias da motilidade espermática do sêmen de *Prochilodus lineatus* fresco (controle) e diluído com metanol, metilenoglicol, dimetilsulfóxido e propilenoglicol em concentrações de 7,89% (teste de toxicidade). Barras sobrepostas de letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,01$).

O sêmen criopreservado apresentou diferença estatística entre os diferentes crioprotetores. O metilenoglicol e o DMSO apresentaram os maiores valores das taxas de motilidade em relação aos outros crioprotetores. Na avaliação da duração da motilidade, o sêmen criopreservado com metilenoglicol apresentou os maiores valores das durações da motilidade, contrariamente ao DMSO que apresentou as menores durações (FIGURA 2).

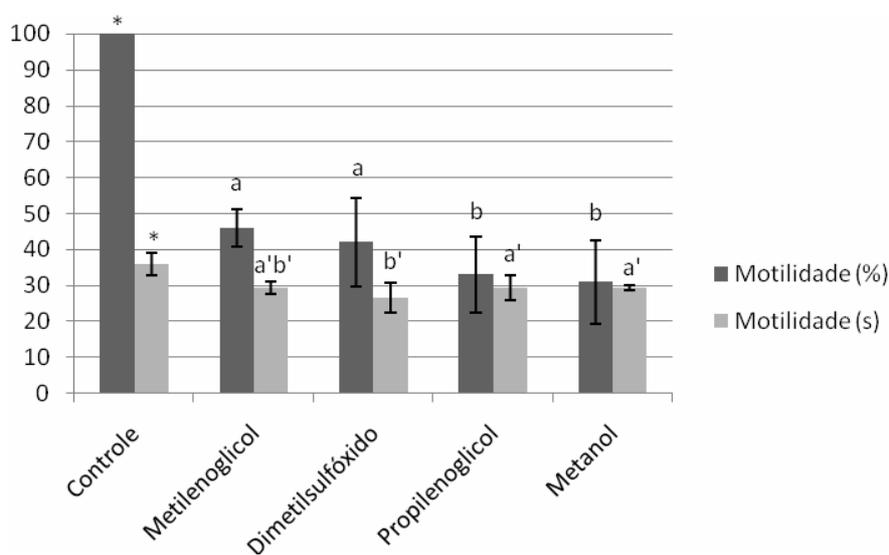
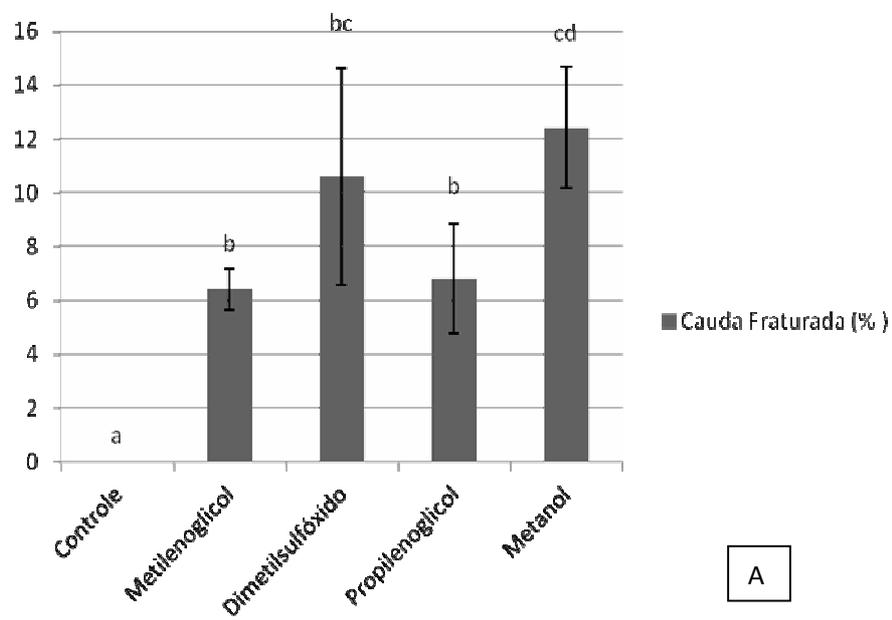


FIGURA 2. Taxa (%) e duração (s) médias da motilidade espermática do sêmen *Prochilodus lineatus* fresco (controle) e criopreservado com metanol, metilenoglicol, dimetilsulfóxido e propilenoglicol em concentrações de 7,89%. Barras sobrepostas de letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,01$).

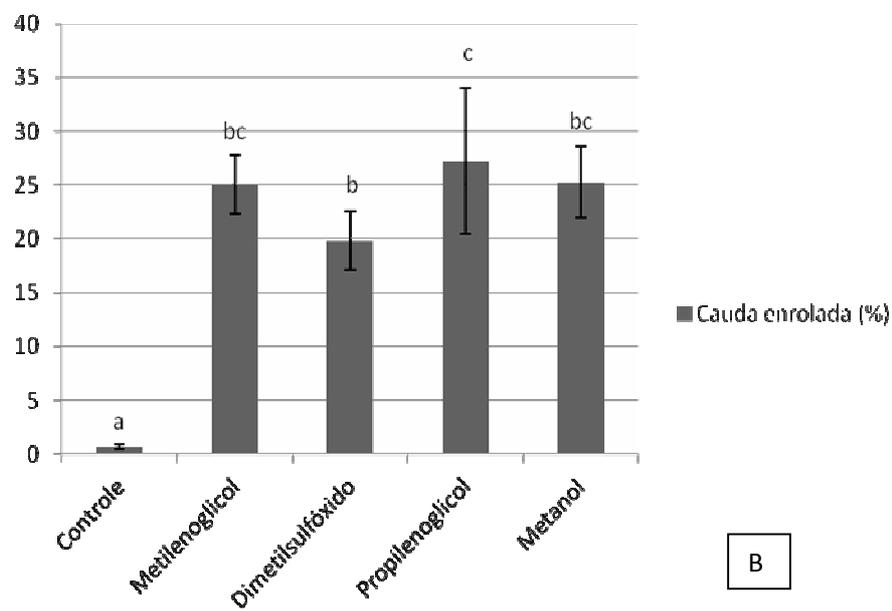
Pode-se observar que os maiores valores das taxas médias de motilidade do sêmen descongelado foram obtidas com os tratamentos utilizando metilenoglicol ($46 \pm 5\%$) e dimetilsulfóxido ($42 \pm 12\%$). Se houve independentemente do tratamento utilizado, uma perda na taxa de motilidade seminal após o congelamento, o mesmo não foi verificado para a duração média quando o sêmen foi diluído com metanol (29 ± 2 s) e propilenoglicol (12 ± 4 s). Estudos semelhantes também foram descritos por JI et al., (2008), que ao avaliarem o sêmen de *Varicorhinus macrolepis*, verificaram que os maiores valores das taxas de motilidade

foram alcançadas ao utilizarem DMSO em detrimento do uso de metanol. O metilenoglicol é um crioprotetor utilizado para criopreservar embriões de bovino, porém, tem sido utilizado com sucesso para criopreservar sêmen de peixes (VIVEIROS et al., 2009a). Essa maior proteção proporcionada por esse crioprotetor nas células espermáticas, foi relatada em estudos anteriores com curimba (VIVEIROS et al., 2009b), e *Brycon orbignyanus*, piracanjuba (MARIA et al., 2006) e *Brycon nattereri* pirapitinga (OLIVEIRA et al., 2007).

Em relação ao parâmetro anormalidade não houve ($p > 0,05$) diferença entre os crioprotetores quanto aos valores das taxas totais, porém o metanol e o propilenoglicol foram aqueles que menos proteção ofereceu aos espermatozoides, em se tratando das anormalidades de cauda fraturada ($12 \pm 2\%$) e cauda degenerada ($8,2 \pm 1,5\%$), para o primeiro, cauda enrolada ($27,2 \pm 6,8$) e peça intermediária degenerada (PID) ($17,8 \pm 2,2$), para o segundo (FIGURA 3).

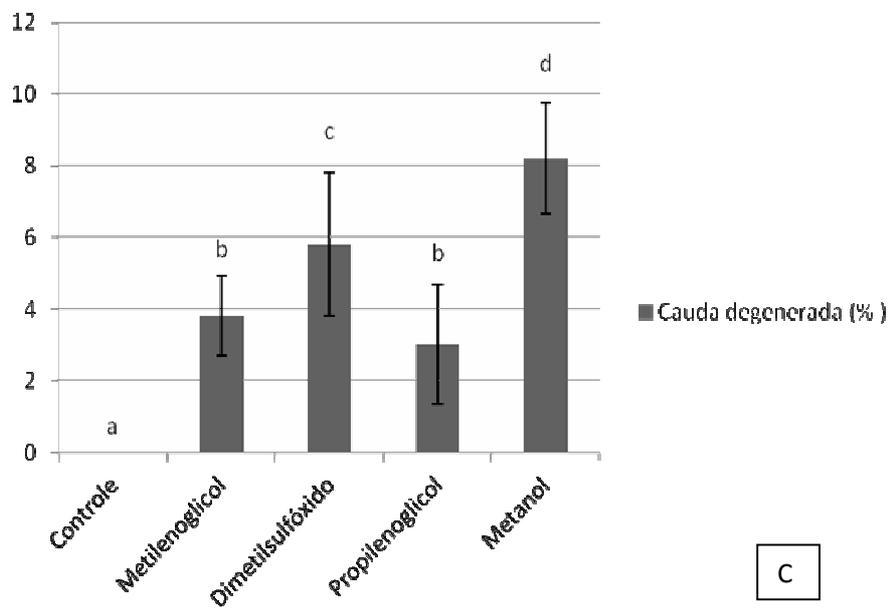


A

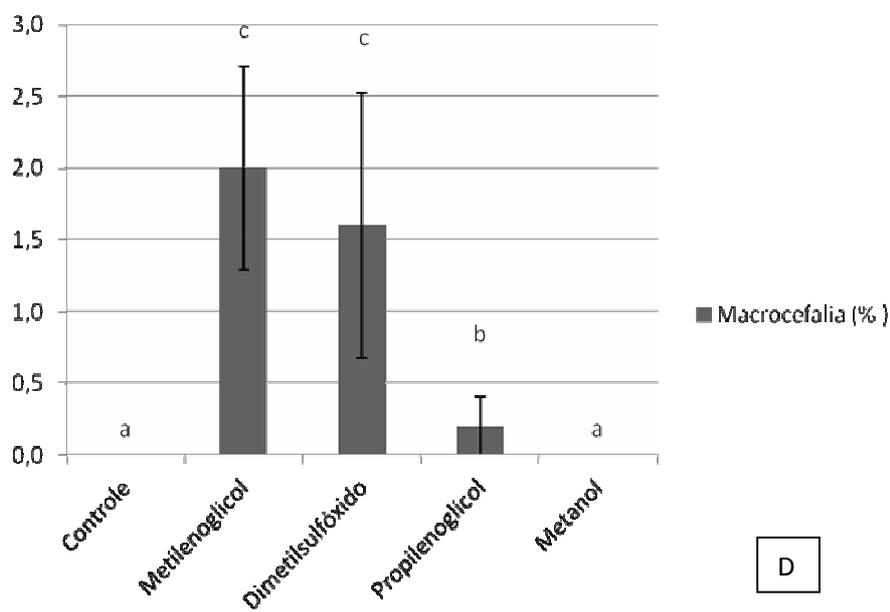


B

...continua...

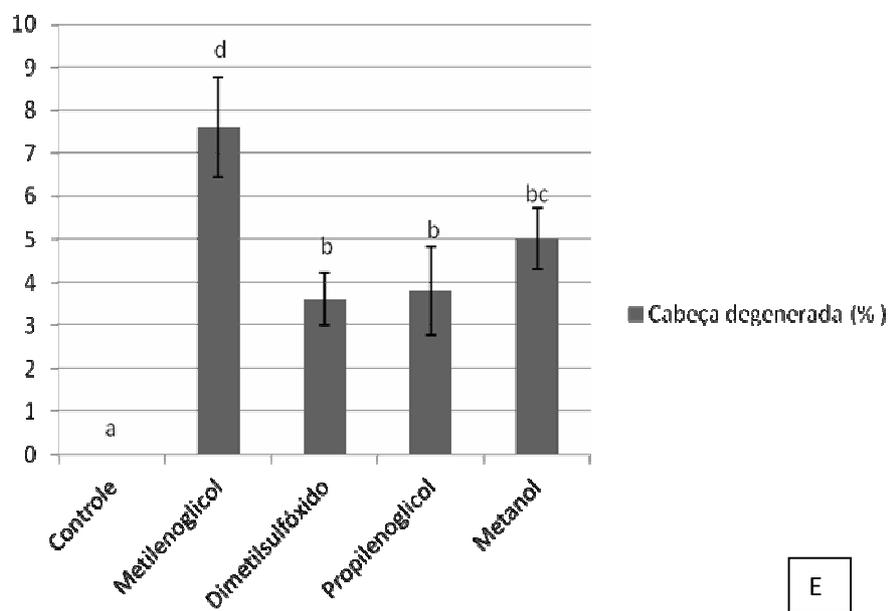


C

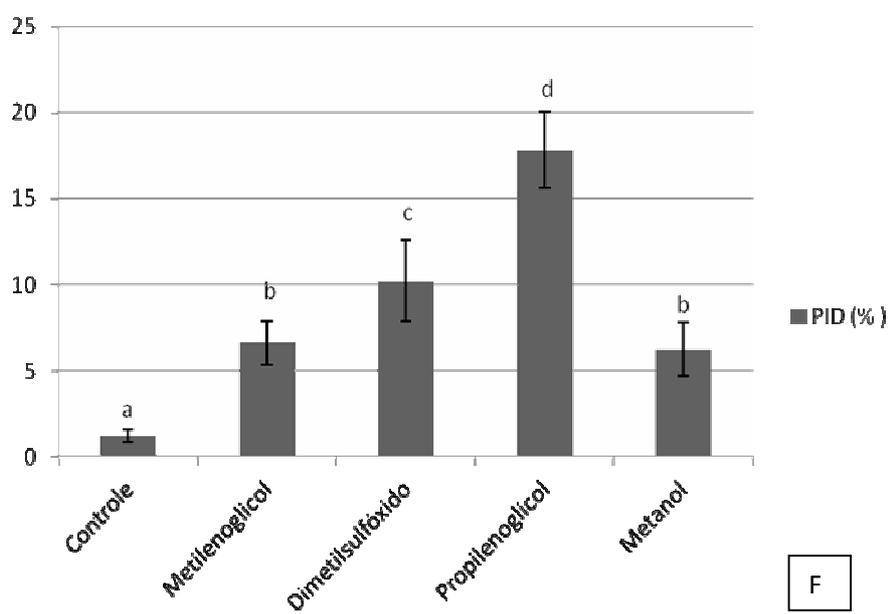


D

...continua...

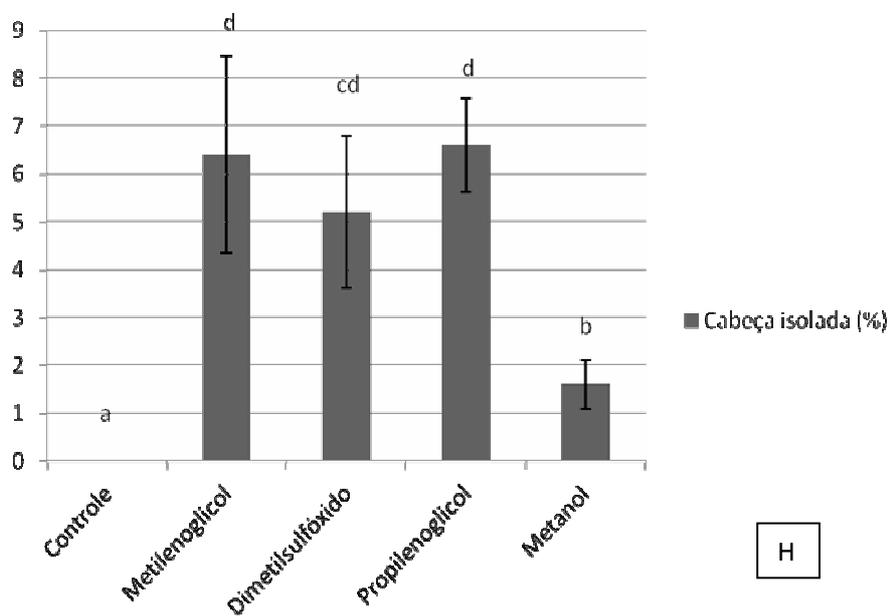
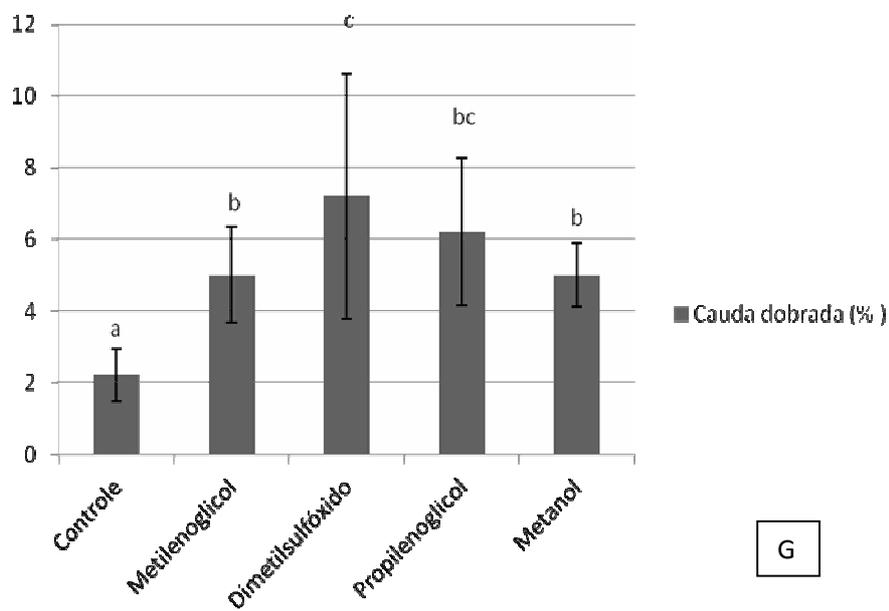


E



F

...continua...



...continua...

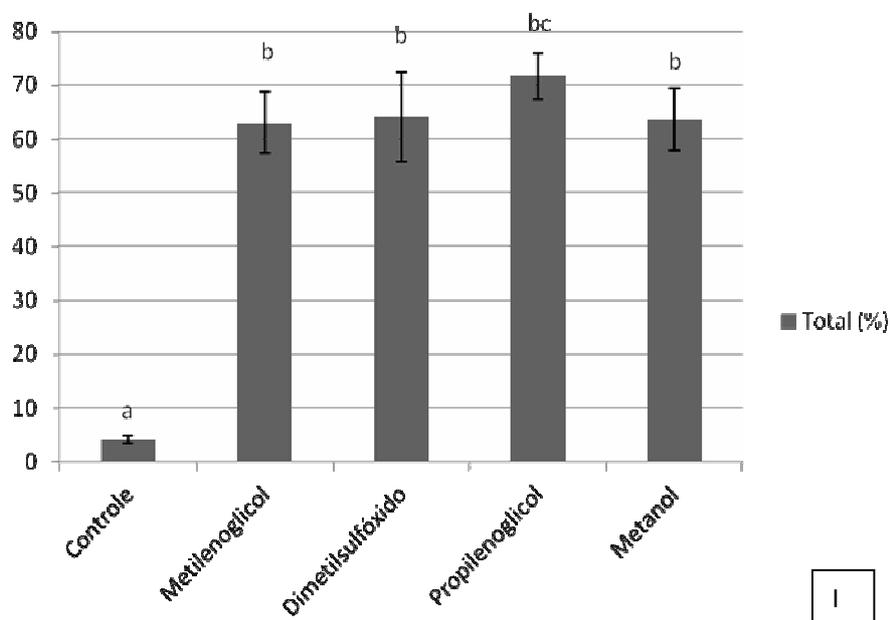


FIGURA 3. Taxas médias de anormalidades morfológicas do sêmen de *Prochilodus lineatus* fresco (controle) e do sêmen criopreservado com metilenoglicol, dimetilsulfóxido, propilenoglicol e metanol em concentrações de 7,89%. Barras sobrepostas de letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,01$) (A; B; C; D; E; F; G; H; I).

Durante o desenvolvimento embrionário de *Prochilodus lineatus* observou-se que o índice de embriões viáveis foi satisfatório ($p < 0,01$), em todas as fases avaliadas, ao utilizar a solução de bicarbonato de sódio 90 mM (FIGURA 4). Os maiores valores das taxas de eclosão das larvas foram alcançados quando se utilizou na fertilização dos ovócitos o sêmen criopreservado com metilenoglicol, entretanto, os valores da taxa de

eclosão foi nula quando foi utilizado na fertilização dos ovócitos o sêmen criopreservado com metanol, (FIGURA 4).

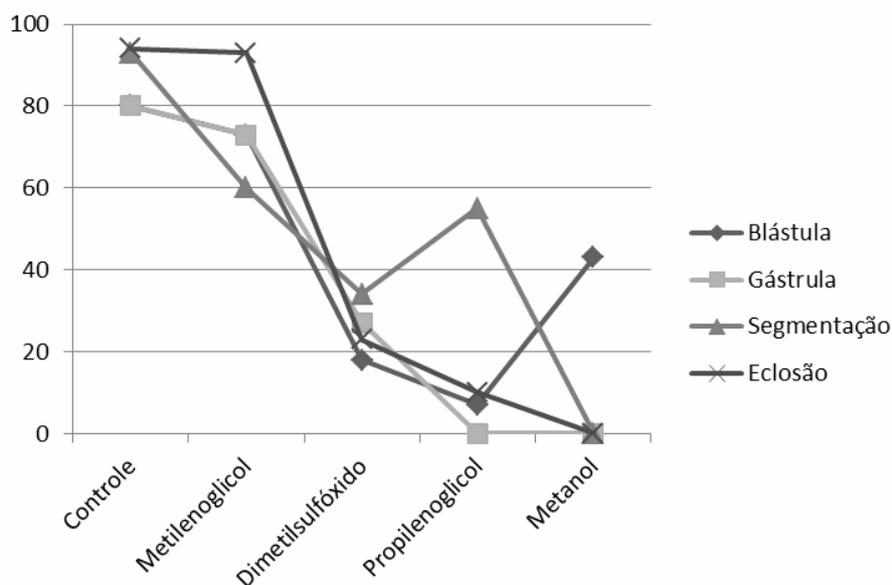


FIGURA 4. Taxas médias de embriões viáveis de *Prochilodus lineatus*, em diferentes fases do desenvolvimento, provenientes do sêmen criopreservado com metilenoglicol, dimetilsulfóxido, propilenoglicol e metanol e ativado com bicarbonato de sódio 90 mM.

O sêmen criopreservado de *Prochilodus lineatus* com metilenoglicol foi o crioprotetor que proporcionou os maiores valores das taxas de eclosão ($93 \pm 4\%$), assim como também as maiores taxas de motilidade. O mesmo, contudo, não ocorreu para as amostras de sêmen contendo metanol, que apesar de terem alcançado a fase de blástula ($43 \pm 7\%$), não foi observado desenvolvimento das células. Isso provavelmente,

ocorreu devido ao elevado percentual de espermatozoides com anormalidades da cauda (FIGURA 3), se não houvesse desenvolvimento até a fase de blástula para as amostras ativadas com bicarbonato de sódio. Considerando-se que o percentual de anormalidades totais foi semelhante ($p > 0,05$) para os tratamentos, pode-se considerar, finalmente, que o metanol provavelmente induziu ou permitiu alguma alteração no material genético suficiente para provocar a morte embrionária após a fase de blástula, pois a presença deste crioprotetor evitou o surgimento de anormalidades relacionadas à cabeça.

Apesar do DMSO ter apresentado valores das taxas de motilidade aceitáveis (40%), menos de 20% dos embriões avaliados atingiram à fase de eclosão. Esses valores da taxa de eclosão inferiores estão de acordo com HE e WOODS (2003) que relataram que apesar do DMSO apresentar baixo peso molecular e elevada permeabilidade celular, pode causar danos pela toxidez. Porém, estudo feitos por LAHNSTEINER et al. (2003) consideram que as lesões das células provenientes do congelamento e descongelamento podem ser compensadas com a ativação de soluções salinas, entretanto, em seu estudo com ciprinídeos, os maiores valores das taxas de motilidade, foram provenientes de sêmen criopreservado com DMSO, ativados com água destilada.

A metodologia empregada neste estudo ratifica que a adição dos crioprotetores utilizados para preservar o sêmen de *Prochilodus lineatus* curimba proporciona um efeito protetor sobre as características bioquímicas, refletindo nos aspectos físicos das células espermáticas após o descongelamento, a exemplo do verificado por MILIORINI et al., (2011).

Estes resultados revelaram que os embriões da espécie em estudo são sensíveis ao crioprotetor utilizado na preservação das células espermáticas, interferindo nas etapas distintas do desenvolvimento embrionário.

4 CONCLUSÃO

O crioprotetor utilizado na criopreservação do sêmen e o ativador da motilidade espermática interferem no desenvolvimento dos embriões de *Prochilodus lineatus*, curimba. Neste estudo, a combinação metilglicol como crioprotetor do sêmen de curimba, aliado ao ativador NaHCO₃ 90mM, proporcionou os maiores valores das taxas de eclosões de larvas.

5 AGRADECIMENTOS

Esse projeto foi financiado pela Capes e Fapemig e os autores agradecem a Estação de Piscicultura de Itutinga, Minas Gerais-CEMIG .

6 REFERÊNCIAS

BOTTA, P.; SCIARA, A.; ARRANZ, S.; MURGAS, L.D.S.; PEREIRA, G.J.M.; OBERLENDER, G. Estudio del desarrollo embrionario de *Prochilodus lineatus* (Valenciennes 1847). **Arch Med Vet**, v.42 n.2, p.76-81, 2010.

DIEMER, O.; NEU, H.D., SARY, C., FINKLER, J.K. BOSCOLO, W.G., FEIDEN, A. *Artemia* sp. na alimentação de larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*). **Ciência Animal Brasileira**, v.13, n.2, p.175-179, 2012.

GODINHO, H.P., AMORIM, V.M.C., PEIXOTO, M.T.D. Criopreservação do sêmen de Tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus*, var. Chitralada: Crioprotetores, soluções ativadoras e refrigerador criogênico. **Revista Brasileira Zootecnia**, Belo Horizonte, v.6, n.6, p. 1537-1543, 2003.

HE, S., WOODS, L.C. Effects of glycine and laminine on short-term storage and cryopreservation of striped bass (*Morone saxatilis*) spermatozoa. **Cryobiology**, v. 46, n.1, 17-25, 2003.

JI, X. S.; AN, ZHAO, Y.; CHEN, S. L.; B.; JIANG, Y. L.; WANG, A, H.; SONG, A, J. Y.; DING, L.; CHEN, H. J. Successful fertilization of *Varicorhinus macrolepis* eggs with sperm subjected to two freeze-thaw cycles. **Theriogenology**, p. 69, v.793-797, 2008.

LAHNSTEINER, A. F.; BERGER, B.; WEISMANN, T. Effects of media, fertilization technique, extender, straw volume, and sperm to egg ratio on hatchability of cyprinid embryos, using cryopreserved semen. **Theriogenology**, v. 60, p. 829-841, 2003.

LINHART, O., RONDINA, M., COSSON, J. Cryopreservation of sperm in common carp *Cyprinus carpio*: Sperm motility and hatching success of embryos. **Cryobiology**, v.41, p.241-250, 2000.

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

MILIORINI, A.B.; MURGAS, L.D.S.; ROSA, L.V.E.; OBERLENDER, G.; PEREIRA, G.J.N.; COSTA, D.V. A morphological classification proposal for curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm damages after cryopreservation. **Aquaculture Research**, v. 41, n.8, p.1-11, 2011.

MURGAS, L.D.S.; MILIORINI, A.B.; FREITAS, R.T.F.; PEREIRA, G.J.M. Criopreservação do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) mediante adição de diferentes diluidores, ativadores e crioprotetores. **R. Bras. Zootec**, v.36, n.3, p. 526-531, 2007.

OLIVEIRA, A.V.; VIVEIROS, A.T.M.; MARIA, A.N.; FREITAS, R.T.F.; IZAÚ, Z.A. Sucesso do resfriamento e congelamento de sêmen de pirapitinga *Brycon nattereri*. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.59, n.6, p.1509-1515, 2007.

PAULINO, M.S.; MILIORINI, A.B.; MURGAS, L.D.S.; LIMA, F.S.M.; FELIZARDO, V.O. Desempenho reprodutivo do pacu, piracanjuba e curimba induzidos com extrato de busserelina. **Bol. Inst. Pesca**, São Paulo, v.37, n.1, p.39-45, 2011.

VIVEIROS, A.T.M., OLIVEIRA, A.V., MARIA, A.N., ORFÃO, L.H. SOUZA, I.C. Sensibilidade dos espermatozoides de dourado, *Salminus brasiliensis* a diferentes soluções crioprotetoras. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.4, p.883-889, 2009a.

VIVEIROS, A. T. M.; ORFÃO, L. H.; MARIA, A. N.; ALLAMAN, I. B. A simple, inexpensive and successful freezing method for curimba *Prochilodus lineatus* (Characiformes) semen. **Animal Reproduction Science**, v.112, p. 293–300, 2009b.

WELCOME, R. L. **River fisheries**. California: FAO Fish, 1982. 330 p.

ARTIGO 2 Anormalidades espermáticas de *Piaractus mesopotamicus* após descongelamento utilizando diferentes metodologias¹

Arq. Bras. Med.Vet. e Zootec.

*[Abnormalities of sperm after thawing *Piaractus mesopotamicus* using different methodologies]*

M.S. Paulino, L.D.S. Murgas, V.O. Felizardo, R.T.F. Freitas

Universidade Federal de Lavras - UFLA - Lavras, MG

RESUMO

Avaliou-se a influência de crioprotetores, temperatura e tempo de descongelamento sobre as anormalidades espermáticas de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Amostras de sêmen de quatro pacus foram coletadas e diluídas em duas soluções crioprotetoras, dimetilsulfóxido (DMSO) 10% e Metanol 10%. Após o descongelamento, foram avaliadas anormalidades primárias e secundárias. Não foi verificada interação ($P>0,05$) nas anormalidades secundárias, anormalidades totais e nos espermatozoides normais nos diferentes tratamentos empregados. Nas anormalidades primárias verificou-se interação temperatura versus tempo de descongelamento, em que a maior temperatura associada ao menor tempo 60°C por 8 s ou a menor temperatura associada ao maior tempo de descongelamento 40° C por 12 s proporcionaram menor ($P<0,05$) porcentagem de espermatozoides com anormalidades primárias. No processo de criopreservação de sêmen de pacu utilizando os crioprotetores DMSO ou metanol, recomenda-se que o descongelamento seja realizado a 40°C por 12 segundos ou 60°C por 8 segundos.

Palavras-chave: peixes, criopreservação, DMSO, metanol, sêmen

¹ Aceito em 20 de julho de 2012
E-mail: mspmichelle@bol.com.br

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the influence of cryoprotectants, thawing times and temperatures on sperm abnormalities pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Semen samples from four pacu were collected and diluted in 2 solutions cryoprotectant dimethylsulfoxide (DMSO) 10% and methanol 10%. After thawing, semen was collected for morphological analysis, evaluating primary and secondary abnormalities. There was no interaction ($P>0.05$) secondary abnormalities, abnormalities in total and normal sperm in the different treatments. The primary abnormalities showed interaction between temperature and thawing time, where the higher temperature associated with the shortest time (60°C for 8 s) or the lowest temperature associated with longer thawing (40°C for 12 s) provided under ($P<0.05$) percentages of spermatozoa with primary abnormalities. In the process of semen cryopreservation of *P. mesopotamicus* using the cryoprotectants DMSO and methanol, is recommended that thawing is performed at 40°C for 12 seconds or 60°C for 8 seconds.

Keywords: fish, cryopreservation, DMSO, methanol, semen

1 INTRODUÇÃO

Devido à expansão da piscicultura nos últimos anos, várias técnicas têm se desenvolvido no intuito de preservar gametas (Carolsfeld et al., 2003). O processo de criopreservação de sêmen de peixes envolve várias etapas, nas quais são utilizadas soluções crioprotetoras adequadas, ativadores que possam promover e prolongar a capacidade natatória dos espermatozoides e o descongelamento (Murgas et al., 2001). No entanto ao longo do processo de criopreservação danos podem ocorrer nas células espermáticas (Medeiros et al., 2002).

Entre as características para verificar a qualidade do sêmen, a motilidade espermática é importante para a avaliação do processo de criopreservação do sêmen de peixes (Rurangawa et al., 2004; Godinho,

2007). Alguns autores sugerem que exames morfofisiológicos dos espermatozoides de peixes sejam incorporados à rotina de avaliação do sêmen, Streit Jr. et al., (2006), o que pode auxiliar na caracterização de amostras congelada, explicando insucessos na reprodução (Yao, 2000). Algumas técnicas têm sido desenvolvidas com objetivo de avaliar a morfologia espermática, entre elas, a utilização de corantes na preparação de esfregaços. Segundo Streit-Jr et al. (2004), o corante Rosa Bengala mostrou-se eficiente na preparação da coloração de esfregaços do sêmen de pacu.

O pacu (*Piaractus mesopotamicus*) é um peixe utilizado nas pisciculturas e nos repovoamento de reservatório. A criação dessa espécie tem sido incentivada em razão do seu alto valor comercial e da grande aceitação no mercado nacional (Vaz et al., 2000).

Os primeiros estudos envolvendo a criopreservação com sêmen de pacu limitaram-se a avaliar a motilidade progressiva (Carolsfeld et al., 2003) e a taxa de fertilização (Silveira et al., 1990). Posteriormente, Streit Jr. et al. (2009), Felizardo et al. (2010) e Miliorini et al. (2011) realizaram análise da morfologia espermática pós-congelamento de pacu, no caso do primeiro estudo, e de *Prochilodus lineatus*. Porém, esses autores não avaliaram a influência da temperatura e tempos de descongelamento sobre as anormalidades morfológicas. Diante disso, este trabalho teve como objetivo avaliar a influência de crioprotetores, temperatura e tempo de descongelamento sobre as anormalidades espermáticas de pacu.

2 MATERIAL E METODOS

O experimento foi realizado no período de novembro/2009 a fevereiro/2010. Foram utilizados quatro reprodutores provenientes do plantel da Estação Ambiental da Companhia Energética de Minas Gerais (CEMIG). Os animais aptos a receberem a indução hormonal foram selecionados mediante a verificação da liberação de sêmen sobre leve pressão da cavidade celomática, sendo encaminhados para aquários de 2000 L à densidade de três peixes/aquário. Os exemplares foram pesados e permaneceram em jejum por 24 horas até serem submetidos ao tratamento hormonal com 1 mg/kg de extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC).

Após oito horas da aplicação hormonal, o peixe foi capturado com um puçá e envolto em uma toalha, sendo totalmente seco para evitar a ativação do sêmen com água. A coleta do sêmen foi realizada em tubo de ensaio e encaminhado para avaliação qualitativa. Em lâmina focalizada á microscópio óptico, o sêmen foi ativado com água destilada na proporção de 1:4 sêmen:água, onde foi avaliado subjetivamente a taxa de motilidade espermática. Todas as amostras de sêmen analisadas, apresentaram taxas de motilidade espermática acima de 80%.

Para o processo de congelamento, o sêmen de cada animal foi diluído em duas diferentes soluções crioprotetoras [metanol 10% + Beltisville Thawing Solution (BTS) 5% e dimetilsulfóxido (DMSO) 10% + BTS 5%] uma proporção de 1:4 sêmen:solução crioprotetora (Miliorini et al., 2011). O sêmen diluído foi envasado em palhetas de 0,5mL e imediatamente acondicionados em raques de polietileno e colocados em botijão de vapor de nitrogênio (*Taylor-Warton*, modelo CP 300, *dry*

shipper). Após 24 horas as raques foram transferidas para um botijão contendo nitrogênio líquido (*Cryometal*, modelo DS-18) onde permaneceram por três dias. As palhetas contendo o sêmen criopreservado foram descongeladas em temperaturas de 60 °C e 40 °C por 8 e 12 segundos, originando dessa forma, oito tratamentos (Tab. 1).

Para análise das anormalidades espermáticas de cada animal, 10µL de sêmen descongelado nas diferentes temperaturas e tempos foi diluído em 990µL de solução fixadora de formol-citrato. A diluição do sêmen *in natura* foi utilizado como controle para a avaliação das anormalidades totais. Dessa diluição, uma alíquota de sêmen submetido foi depositada em lâmina histológica e corada com Rosa Bengala e levados ao microscópio óptico com objetiva de 100X onde foram avaliados 200 espermatozoides por lâmina (Streit Jr et al., 2004).

Foram verificadas anormalidades primárias: macrocefalia, microcefalia, cabeça degenerada, peça intermediária degenerada (PID), cauda fraturada, cauda fortemente enrolada e cauda degenerada; e anormalidades secundárias: cabeça isolada, cauda apresentando gota citoplasmática proximal, gota citoplasmática distal e cauda dobrada (Paulino et al., 2011, Miliorini et al., 2011).

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso em um esquema fatorial 2x2x2 (dois crioprotetores x duas temperaturas x dois tempos de descongelamento). Cada animal representou o bloco, perfazendo-se um total de quatro animais, sendo estes considerados como unidade experimental. Para análise dos dados foi utilizado o programa SAEG (2007) e as médias foram comparadas utilizando o teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

Tabela 1. Descrição dos tratamentos empregados para avaliação morfológica do sêmen de pacu

	Crioprotetor	Temperatura (°C)	Tempo de descongelamento (s)
1	DMSO	60	8
2			12
3		40	8
4			12
5	Metanol	60	8
6			12
7		40	8
8			12

3 RESULTADOS

Não foi verificada interação significativa ($P > 0,05$) nas anormalidades secundárias, anormalidades totais e entre os espermatozoides normais nos diferentes tratamentos empregados no sêmen de pacu (Tab. 2), isto é, não houve interação do crioprotetor versus temperaturas versus tempo de descongelamento, no entanto, as anormalidades primárias apresentaram interação da temperatura versus tempo de descongelamento, em que a maior temperatura associada ao menor tempo (60°C por 8 s) ou a menor temperatura associada ao maior tempo de descongelamento (40°C por 12 s) proporcionaram menores ($P < 0,05$) porcentagens de espermatozoides com anormalidades primárias (Tab. 2).

A porcentagem de anormalidades totais observadas no sêmen de pacu nos diferentes tratamentos empregados foi mais alta ($P < 0,05$) ao do sêmen *in natura* (Tab. 2).

Tabela 2. Porcentagem de anormalidades primárias e secundárias verificadas em espermatozoides de pacu

Tratamento	Anor Prim (%)*	Anor Sec (%)	Anor Total (%)**	Normal (%)
1	6,0±2,6	14,4±11,8	23,4±13,1	54,3±26,2
2	7,0±2,4	14,8±11,6	19,8±9,6	58,5±19,7
3	9,0±2,8	13,2±7,4	19,3±5,6	57,5±11,3
4	5,9±2,9	8,4±1,9	15,2±3,9	71,0±7,8
5	6,2±4,8	20,1±3,9	29,4±4,6	43,3±9,3
6	9,0±3,9	19,4±4,2	26,4±2,8	45,3±5,7
7	8,1±4,6	8,1±3,8	24,4±11,5	51,3±23,0
8	5,1±4,9	9,6±2,3	20,8±7,7	64,5±7,6
<i>In natura</i> (%)		9,2±0,9		

Anor. Anormalidades. * interação temperatura versus tempo de descongelamento. **diferença significativa em relação ao sêmen *in natura* a 5% de probabilidade pelo teste Scott Knott. 1-DMSO,60°,8s; 2-DMSO,60°,12s; 3-DMSO,40°, 8s; 4-DMSO,40°,12s; 5-metanol,60°,8s; 6-metanol,60°,12s; 7-metanol,40°,8s; 8-metanol,40°,12s.

Dentro das anormalidades primárias, a utilização do crioprotetor DMSO (tratamentos 1, 2, 3 e 4) proporcionou menor porcentagem de anormalidades da peça intermediária (Tab. 3) em relação à utilização do metanol. Porém, não foram verificadas diferenças significativas ($P>0,05$) em anormalidades de flagelo e cabeça nos diferentes tratamentos empregados.

Tabela 3. Porcentagem de anormalidades do flagelo, cabeça e peça intermediária dentro das anormalidades primárias.

Tratamento	Anormalidades primárias (%)		
	Flagelo	Cabeça	PI *
1	86,2±19,6	8,2±10,6	5,5±9,1
2	67,6±17,8	27,6±23,9	4,6±9,3
3	78,6±14,3	21,3±14,3	0,0±0,0
4	72,2±18,7	20,6±19,9	7,0±10,7
5	73,8±16,6	11,4±9,9	14,7±39,6
6	63,6±8,1	19,5±19,5	16,8±12,6
7	69,7±25,0	19,4±16,3	10,8±11,6
8	74,2±21,9	11,1±7,4	14,6±16,9

PI. peça intermediária. 1-DMSO,60°,8s; 2-DMSO,60°,12s; 3-DMSO,40°,8s; 4-DMSO, 40°,12s; 5-metanol,60°,8s; 6-metanol,60°,12s; 7-metanol,40°, 8s; 8-metanol,40°,12s.

Nas anormalidades secundárias não foram verificadas diferenças significativas entre as características avaliadas nos diferentes tratamentos empregados (Tab. 4).

Tabela 4. Porcentagem de anormalidades do flagelo, cabeça e gota dentro das anormalidades secundárias

Tratamento	Anormalidades secundárias		
	Flagelo	Cabeça	Gota
1	72,3±17,8	27,6±17,8	0,0±0,0
2	91,6±9,7	8,3±9,7	0,0±0,0
3	64,6±18,0	34,1±19,5	1,2±2,5
4	55,5±35,0	41,1±34,5	3,3±6,6
5	74,3±4,9	25,6±4,9	0,0±0,0
6	80,2±6,5	19,7±6,5	0,0±0,0
7	76,4±19,8	11,0±11,7	12,5±25,0
8	63,4±26,5	24,0±29,7	12,5±25,0

1-DMSO,60°,8s; 2-DMSO,60°,12s; 3-DMSO,40°,8s;4-DMSO,40°,12s;5-metanol,60°,8s; 6-metanol,60°,12s; 7-metanol,40°, 8s; 8-metanol,40°,12s.

4 DISCUSSÃO

A porcentagem de anormalidade total verificada no sêmen pós-congelamento variou de 15,2±3,9 a 26,4±2,8. Embora, a porcentagem máxima de anormalidades espermáticas para utilização do sêmen no processo de fertilização não é as determinada para peixes, o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal recomenda não utilizar sêmen para fertilização com índices de espermatozoides com anormalidade acima de 30% em bovinos e eqüinos, e 20% em ovinos e suínos. Pode-se sugerir, dessa forma, que os tratamentos empregados podem ser utilizados no processo de criopreservação e descongelamento do sêmen de pacu, tendo em vista os índices de anormalidades considerados para as espécies

citadas. Por outro lado, vale ressaltar que do total das anormalidades verificadas, correspondem a anormalidades secundárias que não afetam diretamente a capacidade fertilizante do espermatozoide, que segundo Herman et al. (1994) estariam relacionadas aos procedimentos de manejo durante a coleta do sêmen e à confecção das lâminas para avaliação.

A influência da interação temperatura versus tempo de descongelamento sobre as anormalidades primárias podem ser atribuída principalmente ao aquecimento final adquirido pela paleta após sua imersão na água, tendo em vista, também que em uma menor temperatura o sêmen pode demorar mais tempo para descongelar. Miranda et al. (2009) afirmaram que a temperatura exerce efeitos diretos sobre a gametogênese e sobre a liberação de gonadotropinas hipofisárias.

A porcentagem de anormalidade total verificada neste trabalho com os diferentes tratamentos empregados é mais alta que a do sêmen *in natura* ($9,2 \pm 0,9$ %), porém as anormalidades verificadas no sêmen tratado é mais baixa que a verificada por Streit Jr et al. (2006) no sêmen *in natura* da mesma espécie (41,8 %). A porcentagem de anormalidades primárias verificadas nos diferentes tratamentos teve variação de $5 \pm 2,4$ a $11,1 \pm 4,9$, menor que as anormalidades primárias verificada no sêmen *in natura* por este mesmo autor. Essa diferença dentro da mesma espécie pode estar relacionada com as condições em que os animais são mantidos, pois segundo Herman et al. (1994) as anormalidades dos espermatozoides em outros animais podem estar relacionadas com deficiência nutricional, idade dos machos, consangüinidade, além de doenças que possam acometer os reprodutores.

Porém, os danos causados aos espermatozoides pelo processo de criopreservação já é relatado em espécies reofílicas como a curimba (*P. lineatus*) (Felizardo et al., 2010) e até mesmo para o próprio pacu (Streit Jr, 2006). Segundo Baulny et al. (1997), isso ocorre em problemas de integridade e alteração no citoplasma da célula após o congelamento, podendo, dessa forma, afetar a capacidade do espermatozoide em fecundar o ovócito.

Neste trabalho não foi verificada diferença nas anormalidades espermáticas entre os diferentes crioprotetores utilizados, Felizardo et al. (2010) também não verificaram diferença nas anormalidades totais do sêmen de pacu após congelamento, utilizando-se DMSO e metanol como crioprotetores. Miliorini et al. (2011) concluíram que DMSO 7,5% e metanol 5% conferem adequada proteção ao sêmen de pacu durante o processo de criopreservação, visto que essa proteção se dá sobre as enzimas lábeis e sobre a estabilidade das proteínas em soluções aquosas.

Entre as anormalidades primárias encontradas, as de peça intermediária foram mais baixas ao utilizar DMSO como crioprotetor em relação ao uso do metanol. Este fato pode ser atribuído às características da rápida penetração intracelular que o metanol possui (Jamieson, 1991), visto que o processo de criopreservação causa desestabilização das membranas lipoprotéicas das células espermáticas, sobretudo das mitocôndrias localizadas na peça intermediária.

5 CONCLUSÕES

No processo de criopreservação de sêmen de *P. mesopotamicus* utilizando os crioprotetores DMSO ou metanol, recomenda-se que o descongelamento seja realizado a 40° por 12 segundos ou 60° por 8 segundos para que não haja alteração na porcentagem de anormalidades espermáticas, impedindo dessa forma, que esse parâmetro venha afetar a fertilização.

5 AGRADECIMENTOS

Agradecemos a CEMIG pela disponibilização do local e dos reprodutores de peixes, a FAPEMIG e CAPES pelo apoio financeiro para realização deste projeto.

6 REFERÊNCIAS

BAULNY, B.O.; LE VERN, Y.; KERBOEUF, D. et al. Flow cytometric evaluation of mitochondrial activity and membrane integrity in fresh and cryopreserved rainbow trout spermatozoa. *Cryobiology*, v.34, p.141–149, 1997.

CAROLSFELD, J.; GODINHO, H.P.; ZANIBONI FILHO, E. et al. Cryopreservation of sperm in brazilian migratory fish conservation. *J. Fish Biol.*, v.63, p.472-489, 2003.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal. Belo Horizonte, MG. 1998

FELIZARDO, V.O.; MELLO, R.A.; MURGAS, L.D.S. et al. Effect of cryopreservant combinations on the motility and morphology of curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm. *Anim. Reprod. Sci.*, v.122, p.259-263, 2010.

GODINHO, H.P. Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas á aqüicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. *Rev. Bras. Reprod. Animal*, v.31, p.351-360, 2007.

HERMAN, H.A.; MITCHELL, J.R.; DOAK, G.A. *The artificial insemination and embryo transfer of diary and beef cattle.* Illinois: Interstate Publisher, 1994. 392 p.

JAMIESON, B.G.M. Fish evolution and systematics: evidence from spermatozoa. Cambridge: Cambridge University , 1991. 139 p.

MEDEIROS, C.M.O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A.T.D. et al. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*, v.57, p.327-344, 2002.

MILIORINI, A.B.; MURGAS, L.D.S.; ROSA, P.V. et al. A morphological classification proposal for curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm damages after cryopreservation. *Aquac. Res.*, v.42, p.177-187, 2011.

MIRANDA, L.A.; STRÜSSMANN, C.A.; SOMOZA, G.M. Effects of light and temperature conditions on the expression of GnRH and GtH genes and levels of plasma steroids in *Odontesthes bonariensis* females. *Fish Physiol. Biochem.*, v.35, p.101-108, 2009.

MURGAS, L.D.S.; GUALHANONE, A.; SILVA, M.O.B. et al. Calidad seminal del pez piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) post-descongelación. *Rev. Anales Vet.*, v.17, p.3-10, 2001.

PAULINO, M.S.; MILIORINI, A.B.; MURGAS, L.D.S.; LIMA, F.S.M.; FE LIZARDO, V.O. Desempenho reprodutivo do pacu, piracanjuba e curimba induzidos com extrato de busserelina. *Bol. Inst. Pesca*, v.37, p.39-45, 2011.

RURANGWA, E.; KIME, D.E.; OLLEVIER, F. et al. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture*, v.234, p.1-28, 2004.

SAEG Sistema para Análises Estatísticas, Versão 9.1: Fundação Arthur Bernardes - UFV - Viçosa, 2007.

SILVEIRA, W.F.; KAVAMOTO, E.T.; CESTAROLLI, M.A. et al. Avaliação espermática, preservação criogênica e fertilidade do sêmen do pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), proveniente de reprodução induzida. *Bol. Inst. Pesca*, v.17, p.1-13, 1990.

STERI-JR, D.P.; MORAES, G.V.; RIBEIRO, R.P. et al. Avaliação de diferentes técnicas para coloração de sêmen de peixes. *Arq. Ciên. Vet. Zool.*, v.7, p.157-162, 2004.

STREIT-JR, D.P.; BENITES, C.; MORAES, G.V. et al. Sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) criopreservado com diluentes utilizados para sêmen de suínos. *Ciên. Anim Bras.*, v.7, p.289-297, 2006.

STREIT JR., D.P.; OLIVEIRA, A.C.; RIBEIRO, R.P. et al. Motilidade, vigor e patologias seminal in natura e pós criopreservação de *Piaractus mesopotamicus*. *Bol. Inst. Pesca*, v.35, p.159-167, 2009.

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

YAO, Z.; CRIM, L.W.; RICHARDSON, G.F. et al. Motility, fertility and ultrastructural changes of ocean pout (*Macrozoarces americanus* L.) sperm after cryopervation. *Aquaculture*, v.181, p.361-375, 2000.

ARTIGO 3 Morphometric study by means of ultrastructural analysis of gametes of the neotropical teleost fish

Paulino, M. S., Miliorini, A.B; Murgas, L.D.S; Alves, E.

**Preparado de acordo com as normas da revista *Zygote*
(SUBMETIDO)**

ABSTRACT

During the reproductive period between October and December 2009, the gametes of six breeding pairs of *Piaractus mesopotamicus*, *Brycon orbignyanus*, *Salminus brasiliensis* and *Prochilodus lineatus* were collected, fixed and subjected to electron scanning microscope for the observation and measurement of the structures. The results showed many similarities between the gametes of the studied species. An array of grooves and folds was observed in the micropyle in all species in but the *Prochilodus lineatus* oocytes, the micropyle was funnel-shaped in all species. The oocytes showed a great variation in the diameters of major and minor micropyle ostium, evidencing different reproductive strategies. The sperm cells showed simple structures with ovoide heads, a cylindrical midpiece with a single flagellum and no acrosome. This study may contribute to a better understanding of fish reproductive biology, conservation genetics and breeding studies.

Keywords: sperm cells, micropyle, oocytes, fish.

1 INTRODUCTION

Most of Brazilian native fish species need to migrate to river heads to reproduce. These species are known as reofilic fish and are represented by several species, including *Piaractus mesopotamicus*, *Brycon orbygnianus*, *Salminus brasiliensis* and *Prochilodus lineatus*. When these species are kept in lentic waters (captive), they fail to complete their reproductive cycle, making the use of hormones necessary to induce final maturation and the release of gametes (Crepaldi et al., 2006). The induction process acts in supplementing the amount of gonadotropin which is no longer produced due to the absence of favorable environmental conditions (Zohar e Mylonas, 2001).

The species above are neotropical fish found in major Brazil basins. Alteration in the habitats (hydroelectric dams, deforestation and pollution) and predatory fishery have caused reduction of the populations among the studied species, *B. orbygnianus* is the only officially endangered species (Ministry of Environment, 2007).

Most fish species present ovoid shaped eggs and a single micropyle (Ganeco et al., 2003, Faustino et al., 2011) or a single oocyte with several micropyles (Psenicka et al., 2011). The sperm cell is divided

into head, midpiece and flagellum (Nagahama, 1983) and in a few other species, such as sturgeon, present acrosome and subacrosome, Psenicka et al. (2007), Psenicka et al. (2008). Some spermatozooids can still present at the end of the flagellum a structure similar to a keel (Alavi et al., 2009). The organization structure of the sperm cell also reveals major differences according to fertilization strategy, habitat conditions or most importantly oocytes morphology.

Thus, this work aimed at studying and measuring the gamete structures of the *Prochilodus lineatus*, *Salminus brasiliensis*, *Piaractus mesopotamicus* and *Brycon orbignyana* by ultrastructural analysis

2 MATERIAL AND METHODS

Selection of the investigated specimens

This study was conducted during the breeding season between October and December 2009 at the fish culture station of Companhia Energetica de Minas Gerais, Brazil. The fishes were captured in the Rio Grande, in the Paraná basin, Itutinga, MG, Brazil, twelve months before the beginning of the experiment.

Animals were fed with a commercial diet consisting of 32% extruded crude protein (8 mm diameter pellets). The animals were

selected according to their external characteristics (bulging of coelomic wall, release of sperm by light pressure on the urogenital papilla). Six breeding pairs of the following species were used: *Piaractus mesopotamicus*, *Prochilodus lineatus*, *Brycon orbignyanus* and *Salminus brasiliensis*. The water temperature was maintained at $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Induction of the final maturation of the gonads occurred after administration of two intramuscular doses of a crude extract of carp pituitary (EBHC); the first dose was of $0.25 \text{ mL EBHC.kg}^{-1}$ of fish and the second (12 hours later) was of 0.75 mL.kg^{-1} EBHC of fish.

Eight hours after the final EBHC dose, the fish were removed from the aquarium and had their urogenital papilla cleaned and dried with a paper towel. The collection of gametes began after delicate manual massage of the coelomic wall. This procedure was performed in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation, Protocol 040/2009 of Lavras Federal University - UFLA.

Ultrastructural analysis of gametes

Post-fixation was accomplished in accordance to the methodology employed in the Laboratory of Eletronic Microscopy and Ultrastructural Analysis of Lavras Federal University. Samples containing 1mL of semen

or 30 oocytes of each species were fixed separately in microtubules containing a solution of 2.5% glutaraldehyde and 2.0% paraformaldehyde in 0.05 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2, calcium chloride 0.001 M. The samples were maintained for 24 hours at 4°C. After this, they were immersed in 1% osmium tetroxide for 4 hours at room temperature and subsequent dehydration through an ascending series of acetone (25%, 50%, 75%, 90% and 100%).

Before evaluation in the electron scanning microscope, the oocytes and spermatozoa were dehydrated with a CPD030 critical point instrument. The samples were coated with gold in a SCD 050 vacuum evaporator according to protocols designed in Ultrastructural Analysis and Electronic Microscopy Laboratory of Lavras Federal University.

Morphometric analysis of the gametes

The micropyle diameters (Figure 1) and oocytes surface, the length of the flagellum and midpiece, the length and width of the sperm head and the total length of the sperm of each species were studied. To this end, we used the SRV32 Leosoftware, Windows version.

3 RESULTS

In all species, micropyle was funnel-shaped and the micropylar region had a porous surface and open pores in the pellucide zone (Figure 2). The ultrastructural analysis also revealed the presence of several ridges and folds around micropyle of *S. brasiliensis*, *B. orbignyana* and *P. mesopotamicus* (less intense for this). In all species, the further the pores are from the micropyle surface, the closer they are to each other while *P. lineatus* oocytes have no ridges or folds (Fig. 2). It is also possible to note that *P. mesopotamicus* micropyle had the shape of a cylinder with an elliptical base, while *P. lineatus* oocytes had a more circular base. *B. orbignyana* oocytes were the highest and the *P. mesopotamicus* the lowest ones. The oocytes of the studied species had micropyle ostium diameters ranging from 18.56 ± 2.43 to 29.13 ± 2.05 μm for major ostium (MO) and from 15.79 ± 2.4 to 23.04 ± 1.06 μm for minor ostium (mO) (Table 1).

Table 1. Morphometry of the oocytes of *Brycon orbignyana*, *Piaractus mesopotamicus*, *Prochilodus lineatus* and *Salminus brasiliensis* and sperm head width ratio and the major diameter of major micropyle ostium (MSH/MO). Data are presented as mean \pm standard deviation.

Species	Major micropyle ostium (MO)			Minor micropyle ostium		
	Md* (μm)	md** (μm)	Area (μm^2)	Md (μm)	md (μm)	Area (μm^2)
<i>P. lineatus</i>	18.6 \pm 2.4	15.8 \pm 2.3	918.1 \pm 174.1	5.0 \pm 0.5	3.9 \pm 0.2	62.4 \pm 8.6
<i>B. orbignyana</i>	21.9 \pm 0.4	17.6 \pm 0.7	1216.1 \pm 70.5	3.4 \pm 0.5	2.5 \pm 0.1	27.2 \pm 4.8
<i>S. brasiliensis</i>	24.1 \pm 2.6	20.8 \pm 3.1	1530.3 \pm 290.1	7.3 \pm 0.9	4.7 \pm 0.9	108.4 \pm 31.4
<i>P. mesopotamicus</i>	29.1 \pm 2.1	23.0 \pm 1.1	12109.2 \pm 185.7	5.7 \pm 0.3	4.5 \pm 0.1	81.0 \pm 5.4

Species	Oocyte			MSH/MO (%)
	Md (μm)	md (μm)	Volume (mm^3)	
<i>P. lineatus</i>	1020.4 \pm 94.0	888.7 \pm 69.3	3.4 \pm 0.7	31.0 \pm 4.9
<i>B. orbignyana</i>	1228.2 \pm 36.0	1137.3 \pm 79.7	6.7 \pm 1.0	43.1 \pm 3.7
<i>S. brasiliensis</i>	1093.7 \pm 91.9	985.6 \pm 97.8	4.5 \pm 1.2	19.4 \pm 2.0
<i>P. mesopotamicus</i>	1014.2 \pm 85.7	866.5 \pm 70.5	3.2 \pm 0.7	23.6 \pm 1.8

*Major diameter. **Minor diameter.

In all species, the sperm morphology showed considerable similarities, consisting of an ovoid sperm head. Sperm had no acrosome, a cylindrical midpiece and a single flagellum (Figure 3). Morphometric results for sperm cells are summarized in Table 2.

Table 2. Morphometry of the various portions of the sperm of *Brycon orbignyianus*, *Piaractus mesopotamicus*, *Prochilodus lineatus* and *Salminus brasiliensis*. Data are presented as mean \pm standard deviation.

Species	Head length (μm)	Head width (μm)	Midpiece (μm)
<i>P. lineatus</i>	2.06 \pm 0.24	1.58 \pm 0.14	3.41 \pm 0.43
<i>B. orbignyianus</i>	1.82 \pm 0.21	1.50 \pm 0.21	3.07 \pm 0.49
<i>S. brasiliensis</i>	1.88 \pm 0.32	1.58 \pm 0.28	1.54 \pm 0.31
<i>P. mesopotamicus</i>	2.19 \pm 0.204	1.33 \pm 0.10	1.61 \pm 0.17

Species	Flagellum (μm)	Total length (μm)	Proportion of the flagellum (%)
<i>P. lineatus</i>	26.48 \pm 1.67	32.05 \pm 1.60	82.08 \pm 5.97
<i>B. orbignyianus</i>	27.75 \pm 1.92	32.66 \pm 1.81	84.32 \pm 5.93
<i>S. brasiliensis</i>	27.03 \pm 2.19	29.11 \pm 2.53	93.34 \pm 9.57
<i>P. mesopotamicus</i>	26.46 \pm 2.11	29.86 \pm 1.23	88.91 \pm 6.86

4 DISCUSSION

For all species, the function of the porous surface and open pores in the pellucid zone of the micropylar region is to optimize gas exchange for the development of the embryo (Rizzo et al., 2002). Ganeco & Nakaghi (2003) also observed several ridges and folds around the micropylar vestibule in *B. orbignyanus*. According to Sampaio (2006) these folds may represent a strategy to facilitate fertilization of these species. The same author observed that these folds do not occur in the micropilar zone in oocytes of *P. lineatus* and *Prochilodus argenteus*, which suggests that the absence of these folds may be a feature of the genus *Prochilodus*. In addition, the work cited above corroborate our findings regarding *P. lineatus*. According to Riehl (1993), the distance among pores of the channels radiate zone channels, pore size and micropyle morphology can be used in the identification of the species. This study show that the pores near the micropylar opening of *Prochilodus lineatus* were more distant from each other compared to the pores of *Brycon orbignyanus* and *Salminus brasiliensis* (Fig. 2). The

pores of the oocytes of these species were larger in diameter with a higher density. These data are consistent and with the observations of Ganeco & Nakaghi (2003) and Faustino et al., 2011. They found that the surface of the oocytes of *Brycon orbignyanus* and *Brycon gouldingi* displays pores which are close to each other around the micropylar opening. As mentioned earlier, *B. orbignyanus* is the only endangered species that was studied. The fact that the micropyle of *B. orbignyanus* had the smallest mO (27 μm^2) and the reason for MSH/MO (43%) reinforces the importance of artificial propagation in the preservation of the species. Comparing the diameters of oocytes, it was observed that the gametes of *B. orbignyanus* and *S. brasiliensis* were more spherical, while the *P. mesopotamicus* oocytes presented an ellipsoid shape (Fig 2). The same inference can be made for both the ostium and the micropyle.

In species whose sperm cells are devoid of an acrosome, as is the case of all the species in this study, the micropylar apparatus allows the sperm direct access to the oocyte membrane (Redding & Patino, 1993). Sperm measurements were similar to those obtained by Verissimo-Silveira et al. (2006), who analyzed the structures of the sperm of *B. orbignyanus* and *S. brasiliensis* and revealed that the midpiece is thin,

long and asymmetrical. However, the average length of the midpiece in the spermatozoa of *S. brasiliensis* measured by the same authors was larger than in the present study (1.539 ± 0.309 mm), suggesting that there are genetic differences between groups of specimens in the different basins. Since the mitochondrial content of the midpiece is proportional to its size, there could be differences in the quality of motile sperm cells between these populations. This study revealed that the head of the sperm in all investigated species had a spherical core of 1.5 μ m in diameter with no acrosome, corroborating results obtained by Veríssimo-Silveira et al. (2006). The difference in the morphology of the spermatozoa head of different species may be related to fertilization. The fact that species such as sturgeon present acrosome and subacrosome (Psenicka et al., 2008) and oocytes with many micropyles (Psenicka et al., 2011), may induce polyspermy. These structures were not observed in gametes of the studied species because the sperm has no acrosome at the simple head and only one micropyle per oocyte, since the smaller diameter of the ostium only permit the entry of a single sperm cell. In African catfish (Mansour et al., 2002), similarities were only observed in terms of head size (1.55 ± 0.10 μ m in length and 1.369 ± 0.4 μ m in width) and the flagellum (37.8 ± 1.3

μm in length), but not the size of the midpiece, showing that, despite its cylindrical shape, it was smaller in size ($0.5 \pm 0.06 \mu\text{m}$ 177 in length). Some sturgeon species may exhibit similar sized sperm, but that differ in their structure. In *Acipenser sinensis*, although measures of the head, midpiece and flagellum of spermatozoa were similar to those of the species studied here ($1.84 \pm 0.45 \mu\text{m}$ in 181 width and $3.27 \pm 0.20 \mu\text{m}$ in length vs. $2.17 \pm 0.36 \mu\text{m}$ and $33.26 \pm 2.74 \mu\text{m}$ 182 respectively), morphology differs regarding the acrosome inserted in the head and elongated in the presence of a short middle piece (Wei et al., 2007). In *Acipenser beriberi*, the structure is similar to that of the other species of the genus *Acipenser* (Psenicka et al., 2008); the midpiece is relatively smaller ($1.09 \pm 0.42 \mu\text{m}$ and the flagellum is long ($44.75 \pm 4.93 \mu\text{m}$) (Psenicka et al., 2007). Some species sturgeon may exhibit similar sized sperm, but differ in their structure. In *Acipenser sinensis*, although measures of the head, midpiece and flagellum of spermatozoa were similar to those of the species studied here ($1.84 \pm 0.45 \mu\text{m}$ in 181 width and $3.27 \pm 0.20 \mu\text{m}$ in length vs. $2.17 \pm 0.36 \mu\text{m}$ and $33.26 \pm 2.74 \mu\text{m}$ respectively), morphology differs regarding the acrosome inserted in the head and elongated in the presence of a short middle piece (Wei et al.,

2007). In another species, *Acipenser beriberi*, the structure is similar to that of other species of the genus *Acipenser* (Psenicka et al., 2008); the midpiece is relatively smaller ($1.09 \pm 0.42 \mu\text{m}$) and the flagellum is long ($44.75 \pm 4.93 \mu\text{m}$) (Psenicka et al., 2007). It was observed that the sperm cells of *P. lineatus* and *B. orbignyanus* had similar overall lengths, although the former species had a longer midpiece. Morphologically, the head of the *P. mesopotamicus* sperm were of a more cylindrical shape. The standard deviations for the lengths of the scourge were high, which indicates large differences between the cells and the sperm tails, and which cannot suggest that this variable is important from an evolutionary point of view. Taking into account that the surface morphology of the oocyte and the micropyle are criteria for identifying different species, and that the length of the flagellum can influence sperm motility, this preliminary study may contribute to phylogenetic analysis and genetic conservation through germplasm banks. Moreover, these methods constitute an important tool in the study of genetic improvement through the observation of the gametes structures. It may be noted that the midpiece of *S. brasiliensis* and *P. mesopotamicus* sperm presented was larger than of the other studied species. In contrast, *P. lineatus* and *B.*

orbignyianus sperm present lower intermediate part. The size of the midpiece may be related to the time of tail activity, because the mitochondria are concentrated in that region. Therefore it may be inferred that smaller midpieces have fewer mitochondria and this may influence the sperm motility (Baccetti et al., 1984, Ishijima et al., 1998 and Lahnsteiner & Patzner, 2008).

Alavi et al. (2006) also reports that the number of mitochondria may be a possible cause of the difference in the duration of sperm motility that occur among species. Another issue that must be taken into account is that the length of the flagellum may also affect sperm motility. However studies that relate the time of sperm motility with the length of the flagellum and the number of mitochondria present in the intermediate part are scarce.

5 CONCLUSION

The gametes of the studied species showed similarities, although the oocytes of *P. lineatus* showed differences in the micropylar region and *S. brasiliensis* and *P. mesopotamicus* sperm were midpieces smaller than on the other species.

Taking into account that the morphology of the micropyle and sperm are criteria for species identification, conservation and breeding, this study may contribute in this regard. However, it is still necessary to ascertain the relationship between the size of the midpiece with the number of mitochondria and their influence on sperm motility.

6 ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the Companhia Energética de Minas Gerais and the Laboratorio de Microscopia e análise ultraestrutural da Universidade Federal de Lavras for their technical expertise, as well as FAPEMIG and CAPES for financial support.

REFERENCES

Alavi, S. M. H.; Cosson, J., 2006: Sperm motility in fishes . (II)Effect of ions and osmolality: A review. *Cell Biology International* 30,1-14.

Alavi, S. M. H.; Rondina, 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.

Baccetti, B.; Burrini, A. G.; Callaini, G.; Mazzini, M.; Zerunian, S., 1984: Fish germinal cells. I. Comparative spermatology of seven cyprinid species. *Gamete Research*. 10, 373-396.

Crepaldi, D. V.; Faria, M. C.; Teixeira, A. P.; Costa, A. A. P.; Melo, D. C.; Cintra, A. P.; Prado, S. A.; Costa, F. A. A.; Drumond, M. L.; Lopes, V. E.; Moraes, V. E., 2006: Utilização de hormônios na reprodução induzida de surubim (*Pseudoplatystoma* spp). *Rev.Bras.Reprod Animal*, Belo Horizonte 30, 168-173.

Ganeco, L. N. & Nakaghi, L. S. O., 2003: Morfologia da micrópila e da superfície dos ovócitos de piracanjuba, *Bryconorbignyanus* (Osteichthyes, Characidae), sobmicroscopia eletrônica de varredura. *ActaScientiarum: Biological Sciences*, Maringá 25, 227-231.

Ishijima, S.; Hara, M.; Okiyama, M., 1998: Comparative studies on spermatozoa and motility of Japanese fishes. *Bull. Ocean Res. Inst. Uni. Tokyo*. 33, 139-152.

Lahnsteiner, F. & Patzner, R. A., 2008: Sperm morphology and ultrastructure in fish. In: *Fish Spermatology*. S. M. H. Alavi, J. J. Cosson, K. Coward and G. Rafiee (Eds). Alpha Science Ltd., Oxford, UK., 1-62.

Mansour, N.; Lahnsteiner, F.; Patzner, R.A., 2002: The spermatozoon of the African catfish: fine structure, motility, viability and its behaviour in seminal vesicle secretion. *J Fish Biol*. 60, 545-560.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. 2007. Biodiversidade e florestas: espécies ameaçadas. <http://www.mma.gov.br>. (Acesso: Julho 2011).

Nagahama, Y., 1983: The functional morphology of teleost gonads. In: Hoar, W. S. et al. (Ed) Fish Physiology IXa. Reproduction New York: Academic Press 9, 223-275.

Psenicka, M.; Alavi, H. S. M.; Rondina, M.; Cicova, Z.; Gela, D.; Cosson, J.; Nebesarova, J.; Linhart, O., 2007: Morphology and ultrastructure of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) spermatozoa using scanning and transmission electron microscopy. Biol. Cell, 99,103-115.

Psenicka, M.; Hadi Alavi, S. M.; Rondina, M.; Cicova, Z.; Gela, D.; Cosson, J.; Nebesarova, J.; Linhart, O., 2008: Morphology, chemical contents and physiology of chondrosteian fish sperm: a comparative study between Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) and sterlet (*Acipenser ruthenus*). J. Appl. Ichthyology 24, 371-377.

Psenicka, M.; Kaspar, V.; Alavi, S. M. H.; Rondina, M.; Gela, D.; Li, P.; Borishpolets, Cosson, J., 2011: Potential role of the acrosome of sturgeon spermatozoa in the fertilization process. Journal of Applied Ichthyology Verlag, Berlin 27, 678-682.

Redding, J. M. & Patinõ, R. 1993: Reproductive physiology. In: Evans, D.H. the Physiology of fishes CRC Press, Inc, USA, 592.

Riehl, R., 1993: Surface morphology and micropyle as a tool for identifying fish eggs by scanning electron microscopy. *Microsc.Analysis*, 29-31.

Rizzo, E.; Sato, Y.; Barreto, B. P.; Godinho, H. P., 2002. Adhesiveness and surface patterns of eggs in neotropical freshwater teleosts. *J. Fish Biol.*, London 61,615-632.

Sampaio, K. H., 2006. Superfície ovocitária e desenvolvimento inicial de quatro espécies de peixes de interesse comercial da bacia do Rio São Francisco. Dissertation, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 53.

Veríssimo Silveira, R.; Gusmão-Pompiani, P.; Vicentini, C. A.; Quagio-Grassiotto, I. 2006: Spermiogenesis and spermatozoa ultrastructure in *Salminus* and *Brycon*, two primitive genera in Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes). *Acta. Zoologica* 87, 305-313.

Wei, Q.; Li, P.; Psenicka, M.; Alavi, H. S. M., Shen, L.; Liu, J.; Peknicova, J.; Linhart, O.; 2007: Ultrastructure and morphology of spermatozoa in Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis* Gray 1835) using scanning and transmission electron microscopy. *Theriogenology* 67, 1269-1278.

Zohar, Y.; Mylonas, C. C.; 2001: Endocrine manipulations of spawning in cultured fish from hormones to genes. *Aquaculture*, Amsterdam 197, 99-136.

(VERSÃO PRELIMINAR)

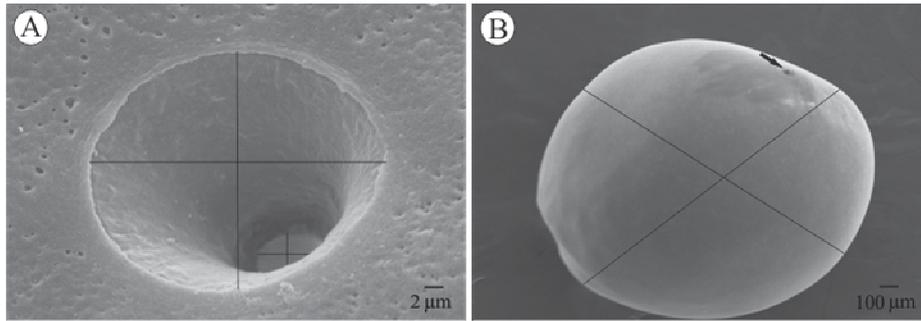


Figure 1. A- Diameters of the micropyle B- Diameters of the oocyte.

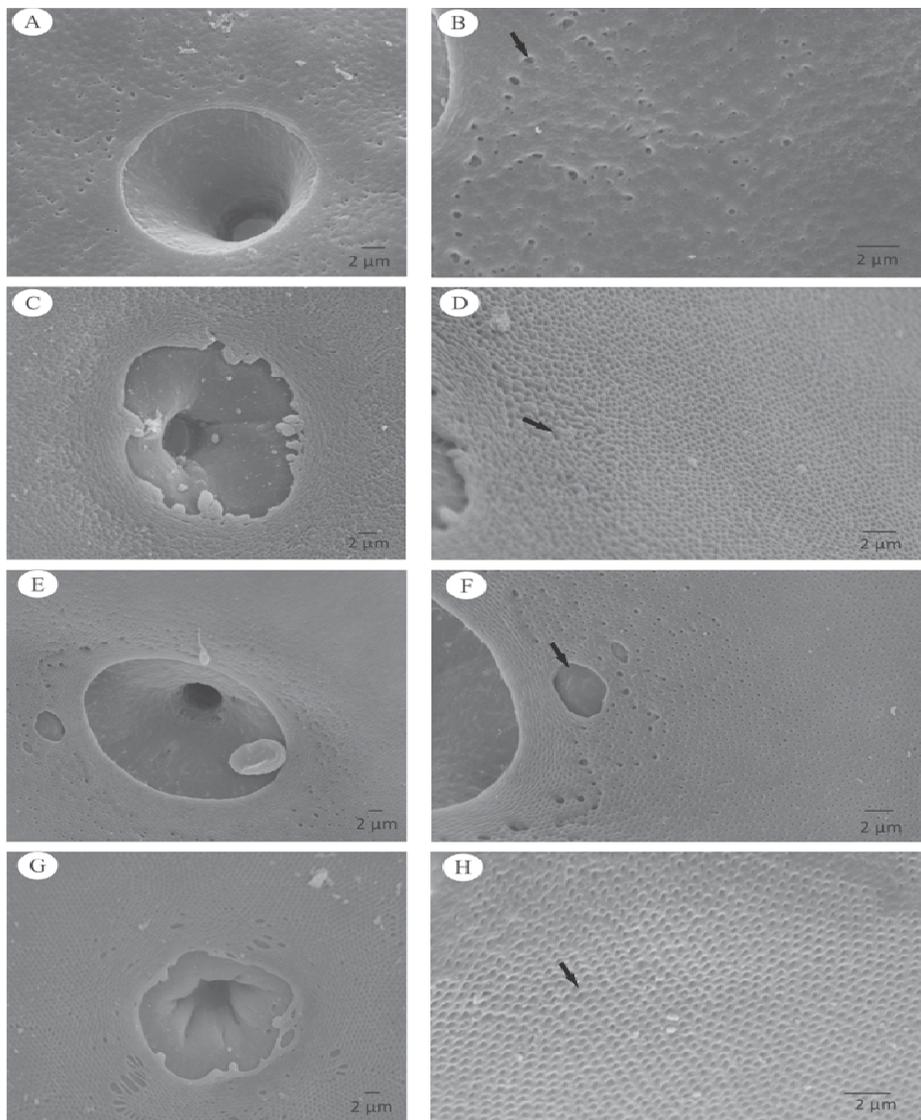


Figure 2. A- Micropyle of the *Prochilodus lineatus*, B-arrow indicates pores, C micropyle of the *Salminus brasiliensis*, D- arrow indicates pores, E- micropyle of the *Piaractus mesopotamicus*, F- arrow indicates ridges and folds, G- micropyle of the *Brycon orbignyianus*, H- arrow indicates pores.

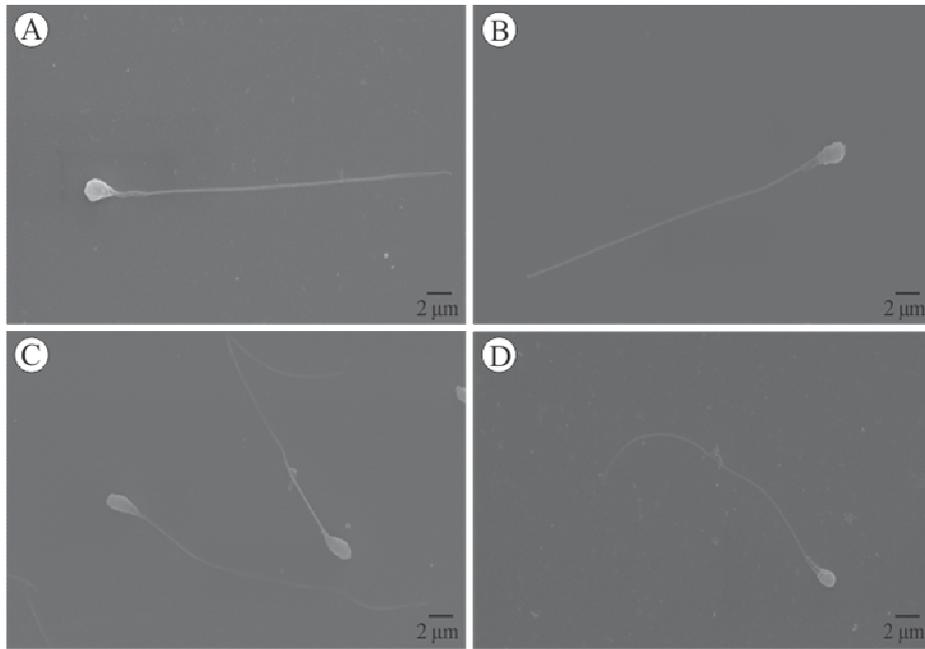


Figure 3. Sperm cells: A *Prochilodus lineatus*, B-*Salminus brasiliensis*, C-*Piaractus mesopotamicus*, D- *Brycon orbignyanus*.