

SECRETARIA DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

Steindachneridion parahybae (STEINDACHNER, 1876) (SILURIFORMES: PIMELODIDAE):
PRODUÇÃO ESPERMÁTICA AO LONGO DE UM CICLO REPRODUTIVO

Danilo Caneppele

Orientadora: Elizabeth Romagosa

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca, APTA - SAA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Aquicultura e Pesca.

São Paulo
Setembro – 2011

SECRETARIA DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

Steindachneridion parahybae (STEINDACHNER, 1876) (SILURIFORMES: PIMELODIDAE):
PRODUÇÃO ESPERMÁTICA AO LONGO DE UM CICLO REPRODUTIVO

Danilo Caneppele

Orientadora: Elizabeth Romagosa

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca, APTA - SAA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Aquicultura e Pesca.

São Paulo
Setembro – 2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Elaborada pelo Núcleo de Informação e Documentação. Instituto de Pesca, São Paulo

C221s Caneppele, Danilo
Steindachneridion parahybae (Siluriformes: Pimelodiade) produção espermática ao longo do ciclo reprodutivo. / Danilo Caneppele. – São Paulo, 2011.
v, 60f. ; il.

Dissertação (mestrado) apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca – APTA - Secretaria de Agricultura e Abastecimento.
Orientadora: Elizabeth Romagosa.

1. Sêmen. 2. Surubim do Paraíba. 3. Variação temporal. 4. Correlações.
I. Romagosa, Elizabeth. II. Título.

CDD 597

Permitida a cópia parcial, desde que citada a fonte – O autor

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

“*Steindachneridion parahybae* (Steindachner, 1876)
(Siluriformes: Pimelodidae): Produção espermática ao
longo de um ciclo reprodutivo”

AUTOR: DANILO CANEPPELE

ORIENTADORA: Prof^a. Dra. ELIZABETH ROMAGOSA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do título de
MESTRE EM AQUICULTURA E PESCA, Área de Concentração em
Aqüicultura, pela Comissão Examinadora:



Prof^a. Dr^a. ELIZABETH ROMAGOSA



Prof. Dr. ROBIE ALLAN BOMBARDELLI



Prof. Dr. MARCOS WEINGARTNER

Data da realização: 29 de setembro de 2011



Presidente da Comissão Examinadora
Prof^a. Dr^a. ELIZABETH ROMAGOSA

Dedico este trabalho:

Aos meus pais **Lori Vicente Caneppele** (*in memoriam*) e **Julieta Guariglia Caneppele**, responsáveis pela formação do meu caráter.

A minha esposa **Edlene**, que me completa com seu amor.

Aos meus filhos **Pedro e Vítor**, que são a razão da minha vida.

"Não existem ventos favoráveis para aqueles que não sabem o seu destino"

Agradecimentos

Ao Deus Pai, Mestre de toda a natureza que tentamos humildemente entender.

À Profa. Dra. Elizabeth Romagosa, pela orientação, conhecimento, carinho, apoio e paciência durante esta jornada.

Ao mentor e amigo Eduardo Antônio Sanches, pela "coorientação informal", análises de lâminas, estatística e principalmente pelo companheirismo.

À Companhia Energética de São Paulo - CESP, por permitir a realização deste estudo.

A toda equipe da Estação de Hidrobiologia e Aquicultura de Paraibuna, Benedito, Milton, Edmur, Vicente, Ielzo, Diego, César, José Adriano e Zequinha, que com sabedoria e inteligência suportaram meu mau humor e "ausência" durante este período.

À Equipe do Laboratório de Tecnologia de Sêmen - Universidade Federal de Lavras - UFLA, MG, Profa. Ana Viveiros, Laura, Ziara, Ariane, Thiciana, Isabel, Tati e Rafael, pela realização das análises de pH e osmolaridade do plasma seminal, além do incentivo e amizade.

A todos aqueles que de alguma forma me inspiraram na retomada dos estudos, João Henrique Pinheiro Dias, Alexandre Hilsdorf, Renata Moreira, Renato Honji, dentre tantos outros parceiros científicos.

Por fim, a todos os meus amigos que sabem que merecem o meu Muito Obrigado!

Sumário	
Resumo	i
Abstract.....	ii
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. OBJETIVOS	4
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	5
3.1 A bacia do Rio Paraíba do Sul e sua ictiofauna.....	5
3.2 A espécie escolhida: <i>Steindachneridion parahybae</i>	7
3.3 As ações da CESP na bacia.....	9
3.4 Propagação artificial e qualidade de gametas masculinos	11
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	16
5. APRESENTAÇÃO DOS ARTIGOS.....	23
CAPÍTULO 1	24
Resumo	25
Abstract.....	26
Introdução	26
Materiais e Métodos	28
Resultados e Discussão	31
Conclusões	39
Agradecimentos	39
Referências	40
CAPÍTULO 2.....	43
Resumo	44
Abstract.....	45
Introdução	45
Materiais e Métodos	47
Resultados e Discussão	50
Conclusões	56
Agradecimentos	56
Referências	56
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	60

Resumo

O *Steindachneridion parahybae*, comumente denominado surubim do Paraíba, pode ser considerada como um dos mais emblemáticos exemplos da situação de ameaça em que se encontra a ictiofauna brasileira. Endêmico da bacia do rio Paraíba do Sul foi importante para a pesca no passado, atualmente está classificado como regionalmente extinto no Estado de São Paulo e criticamente ameaçado nos demais estados banhados pela bacia. A necessidade urgente de ampliação de conhecimentos sobre a espécie, para o desenvolvimento de programas de reprodução em cativeiro e repovoamento, demanda o desenvolvimento de estudos. Neste sentido, objetivou-se avaliar a produção espermática da espécie ao longo de um ciclo reprodutivo, verificando o efeito da indução hormonal sobre os parâmetros seminais e possíveis correlações entre eles. Entre os meses de outubro de 2009 a abril de 2010 foram avaliados parâmetros quali-quantitativos de 156 amostras de sêmen fresco, coletadas de 26 exemplares, divididos em dois tratamentos (não induzidos e induzidos). Os exemplares utilizados foram produzidos em dezembro de 2003 a partir de reprodutores selvagens. Os parâmetros espermáticos avaliados foram: volume relativo; taxa de motilidade; tempo de motilidade; concentração espermática; osmolaridade do plasma seminal; pH do plasma seminal e alterações morfológicas, divididas em uma ou mais de uma ocorrência e classificadas em graves e leves. Os resultados obtidos submetidos à análise de variância ao nível de 5% de significância indicaram variação temporal na produção espermática da espécie, porém não foram observados efeitos significativos entre os tratamentos utilizados, mostrando não ser necessário o processo de indução hormonal para a obtenção de material fecundante proveniente de machos da espécie. Através da análise dos coeficientes de correlação de Pearson foram evidenciadas correlações entre a taxa e o tempo de motilidade, influenciadas pelo número e a gravidade das alterações morfológicas. A osmolaridade do plasma seminal se correlacionou à taxa de motilidade e a presença de alterações morfológicas, já o pH influenciou o tempo de motilidade. Também ficou evidente a relação inversa entre o volume relativo de sêmen e a concentração espermática e que o percentual de espermatozoides normais proporciona um significativo aumento nas taxas de motilidade.

Palavras Chave: Sêmen, surubim do Paraíba, variação temporal, correlações

Abstract

Steindachneridion parahybae, commonly called surubim do Paraíba, may be regarded as one of the most representative examples of the endangered situation of the Brazilian fish fauna today. Endemic to the Paraíba do Sul river basin, this species used to be important to fishing in the past. Nowadays, it is classified as regionally extinct in the state of São Paulo and critically endangered in the other states bordering the basin. There is an urgent need for more knowledge about this species for the development of programs of reproduction in captivity and repopulation, so more studies are required. The objective of this study was to assess the sperm production of this species over one reproductive cycle, verifying the effect of the hormonal induction on the seminal parameters and possible correlations between them. The quali-quantitative parameters of 156 samples of fresh semen collected from 26 units divided into two treatments (non-induced and induced) were evaluated between October 2009 and April 2010. The units used had been produced in December 2003 from wild broodfish. The sperm parameters assessed were: relative volume; motility rate; motility time; sperm concentration; osmolarity of the seminal plasma; pH of the seminal plasma and morphological changes, divided into one or more occurrences and classified into severe and mild. The results obtained were submitted to analysis of variance to the level of 5% significance and indicated temporal variation in the sperm production of the species. However, significant effects were not observed between the treatments, showing that the process of hormonal induction was not necessary for the production of fertile material obtained from males of this species. By means of the analysis of the Pearson correlation coefficient it was possible to show, among others, a strong correlation between motility rate and motility time influenced by the number and severity of the morphological changes. The osmolarity of the seminal plasma correlated with the motility rate and the presence of morphological changes, and the pH influenced the motility time. The inverse relationship between the relative volume of semen and the sperm concentration was also evident, as well as the fact that the percentage of normal spermatozoa provided a significant increase in the motility rate.

Key Words: Semen, surubim do Paraíba, temporal variation, correlations

1. INTRODUÇÃO GERAL

Estima-se que existam 55.000 espécies de vertebrados distribuídas pelo mundo das quais cerca de 28.000 mil são peixes, sendo que mais de 10 mil vivem em águas doces (Nelson, 2006). Deste total, de acordo com Bockup et al. (2007) o Brasil abriga 2587 espécies, possuindo uma das mais ricas biodiversidades de peixes de água doce do mundo, sendo importantes não só pela quantidade de espécies, mas também pela sua relevância como fonte de proteína para a humanidade. Entretanto, a perda da biodiversidade em ambientes aquáticos configura hoje como um dos principais problemas a serem enfrentados, sendo que dentre os fatores mais relevantes para o agravamento desta situação estão as diversas formas de destruição de habitats, que ocorrem hoje, principalmente nos países em desenvolvimento (Caneppele, 2007).

Carolsfeld et al. (2003) consideraram dentre as principais causas da diminuição dos estoques naturais de peixes a construção de barragens hidrelétricas, a urbanização, as atividades agrícolas, a sobrepesca, o desrespeito aos períodos de defeso e a introdução de espécies exóticas. Nas regiões sudeste e sul do Brasil populações de algumas espécies de peixes estão em acentuado declínio resultante das modificações ecológicas provocadas pelo crescimento demográfico. Somando-se aos impactos já destacados acima temos ainda a destruição das lagoas marginais e o desenvolvimento industrial, que provocam a queda da produtividade e a inadequação do ambiente (Godinho et al., 1984; Barbieri et al, 2004).

Com a perda da biodiversidade, estima-se que, em poucas décadas, diversas espécies poderão desaparecer por completo, sobretudo as endêmicas, isto é, aquelas que só existem em determinados ambientes aos quais estão bem adaptadas (SMA, 2009).

Neste sentido, principalmente para suprir a demanda crescente por proteína, a aquicultura encontra-se em plena expansão (Scorvo Filho, 2008), enquanto que ao mesmo tempo, as populações de peixes provenientes da natureza estão sendo devastadas, considerando-se como “urgente” a

necessidade de investigação sobre a reposição destes estoques (Romagosa, 2008).

A piscicultura está estreitamente relacionada com a capacidade de perpetuação das espécies, produzindo larvas para criação, repovoamento e a formação de plantéis de reprodutores (Godinho et al., 1984; Viveiros e Godinho 2009). Contudo para a grande maioria das espécies nativas de água doce, os processos de produção massiva de alevinos, ainda não são dominados, tornando-se imperativo o desenvolvimento de tecnologia para a produção em grande escala de peixes (Romagosa, 2006; Weingartner et al, 2008).

Ainda hoje de um modo geral, a reprodução de peixes nativos brasileiros se baseia na fertilização artificial pelo método a “seco”, que consiste na liberação “forçada” e mistura dos gametas até a homogeneização completa, para posterior adição de água promovendo a ativação dos espermatozóides e fertilização dos ovócitos (Ihering & Azevedo 1936). Entretanto, a eficiência desta técnica é limitada, pois pouco ainda se sabe sobre as características requeridas dos gametas, principalmente os masculinos. No que se refere às taxas de fertilização, a definição da melhor relação ovos/espermatozóides, ainda é incipiente (Bombardelli et al., 2006; Shimoda et al., 2007; Sanches et al., 2009; Weingartner, 2010), neste sentido, o conhecimento das características dos gametas e o aprimoramento dos processos de reprodução são essenciais para o uso racional de matrizes.

Dentre as terapias hormonais existentes para promover a reprodução artificial de peixes em cativeiro a mais amplamente utilizada é a hipofisação, realizada através da aplicação de extrato de pituitária de carpa (EPC) (Romagosa, 2008). Ainda segundo a autora, a eficiência deste método pode variar entre as diferentes dosagens, sendo que comumente são utilizadas duas doses 0,5 e 5,0 mg Kg⁻¹ aplicadas em intervalos de 12 horas, porém, ainda existe a necessidade de se aperfeiçoar os manejos hormonais, sua aplicação e quantidade, dependendo principalmente do modo de reprodução que determinada espécie apresenta.

Na maioria das estações de piscicultura, sejam elas, comerciais ou voltadas para a conservação, os reprodutores são utilizados rotineiramente apenas uma vez por ciclo reprodutivo, estimulados através dos agentes hormonais, e posteriormente estocados em tanques de quarentena até o início de um novo ciclo. Geralmente estes processos são executados sem a avaliação sistemática dos efeitos da indução sobre a produção dos gametas. Para [Kavamoto et al. \(1997\)](#) que estudaram a produção espermática do *Prochilodus scrofa* (*Prochilodus lineatus*), a utilização racional de machos mantidos em cativeiro e destinados à reprodução induzida é imprescindível, sendo de extrema importância o conhecimento da produção do material fecundante desses exemplares.

De uma maneira geral, a contínua dependência de machos reprodutores selvagens tem sido o gargalo da produção comercial ([Zaniboni-Filho & Nuñez, 2004](#)). Os estoques de machos, quando mantidos em confinamento, contribuem de forma irregular, quanto ao volume do sêmen, concentração e motilidade dos espermatozóides, com perdas frequentes de alelos ([Romagosa, 2008](#)). Através da reprodução artificial, realizada com sêmen fresco ou congelado, surgem possibilidades de limitar o estoque de machos na piscicultura, propiciando uma exploração mais racional de reprodutores geneticamente selecionados e uma redução nos custos de produção ([Fogli da Silveira et al., 1988](#)).

[Lahnsteiner \(2000\)](#) ressalta a importância de se conhecer as características morfológicas e funcionais dos espermatozóides para melhorar a produção de qualquer espécie de peixe quando mantidos em cativeiro. Assim, para se estabelecer o sucesso da piscicultura nacional e considerá-la uma atividade eficiente, é preciso controlar os passos da reprodução dos peixes nativos, obtendo-se gametas viáveis para a produção sistemática de juvenis de qualidade provenientes de matrizes selecionadas mantidas em confinamento ([Zaniboni-Filho e Nuñez, 2004](#); [Romagosa, 2006](#)).

Em programas de conservação de peixes nativos ameaçados nada disso é diferente, sendo que a carência de conhecimento básico é ainda maior, em função da pouca disponibilidade de matrizes. Esta situação limita a realização

de experimentos e o aprimoramento das técnicas de cultivo, além disso, informações sobre a biologia da espécie na natureza também são em geral muito restritas e algumas vezes equivocadas o que pode prejudicar o direcionamento das investigações realizadas em cativeiro.

Estudos direcionados para o cultivo e preservação de algumas espécies tropicais têm se intensificado nos últimos anos, não só por sua importância econômica, como também ambiental. Neste sentido, grupos formados por diferentes linhas de pesquisa trabalham para o conhecimento de uma determinada espécie, seu status genético populacional e o domínio do seu ciclo reprodutivo (Luz et al., 2001; Caneppele et al., 2009; Honji et al., 2009; Tolussi et al., 2010; Sanches et al., 2010; Okawara et al., 2011).

Considerando-se o estado de conservação do *Steindachneridion parahybae* na natureza e o reduzido número de exemplares selvagens disponíveis para a manipulação reprodutiva em cativeiro, decidiu-se pela realização do presente estudo, buscando caracterizar a produção espermática da espécie e a otimização do uso de matrizes.

2. OBJETIVOS

Avaliar a produção espermática do surubim do Paraíba *Steindachneridion parahybae* ao longo de um ciclo reprodutivo, verificando o efeito da indução hormonal sobre os parâmetros seminais e as possíveis correlações entre eles.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 A bacia do rio Paraíba do Sul e sua ictiofauna

Os rios do sudeste brasileiro que possuem a sua drenagem voltada diretamente para o oceano Atlântico são agrupados genericamente como “bacias do leste brasileiro” (Vieira & Rodrigues, 2010). Compreendidas entre a foz do rio São Francisco e o norte do estado de Santa Catarina, constituem a região de endemismo com o maior número de espécies de peixes ameaçadas (59). Esta situação é parcialmente explicável em função da grande extensão territorial desta área, mas deve-se, sobretudo, à degradação ambiental da região, combinado ao alto grau de endemismo da ictiofauna (MMA, 2008). Entretanto, essas bacias apresentam diferenças quanto à formação geológica e história evolutiva, resultando em faunas de peixes diferenciadas (Bizerril, 1994; Ribeiro, 2006).

Entre essas drenagens, a do rio Paraíba do Sul é reconhecida por sua ictiofauna peculiar, e dessa forma, considerada uma ecorregião distinta dentre as demais (Bizerril, 1994; Abell et al., 2008). Formado a partir da confluência dos rios Paraitinga e Paraibuna e com cerca de 1.100 km comprimento, o rio Paraíba do Sul (Figura 01) é hoje uma das regiões mais industrializadas do país, sendo que extensas regiões da bacia apresentam níveis de degradação elevados (Caneppele et al., 2008). Localizada no eixo principal de desenvolvimento do Brasil esta bacia sofre com a degradação ambiental desde os ciclos agropecuários (café, gado e silvicultura), porém, foi com a industrialização iniciada em meados do século XX que, outros processos relacionados à urbanização foram desencadeados, como a exploração de areia e construção de barramentos hidroelétricos (Hilsdorf e Petreere, 2002).

O processo desordenado de ocupação do Vale do Paraíba somado a outras atitudes equivocadas como a introdução de espécies de peixe alóctone e de alto nível trófico como o dourado, *Salminus brasiliensis*, introduzido em 1946 (Machado & Abreu, 1952), contribuíram para a redução de diversas populações nativas de peixes (Caneppele, 2007), estando incluídas entre essas as populações de *Steindachneridion parahybae*.

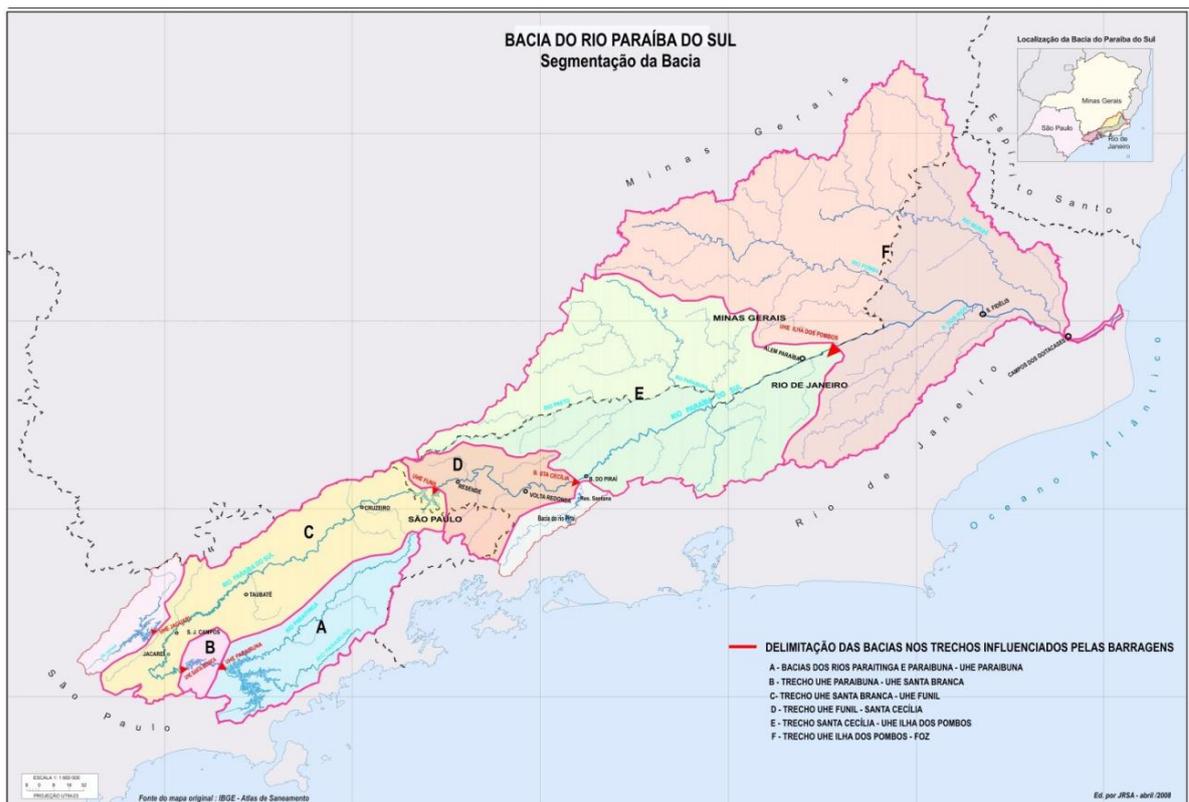


Figura 01: Bacia do Rio Paraíba do Sul – Segmentação por barramentos (FECD, 2008).

Assim como nos demais sistemas hídricos brasileiros, raras são as informações sobre a composição original da ictiofauna da bacia do rio Paraíba do Sul. Pode-se considerar que um dos primeiros registros foi o trabalho de [Miranda Ribeiro \(1902\)](#), que apresentou observações sobre oito espécies de peixes do rio Pomba, afluente da margem esquerda do Paraíba do Sul, que nasce em Minas Gerais e deságua no Rio de Janeiro próximo ao município de Itaocara.

O trabalho publicado por [Machado & Abreu \(1952\)](#) amplia a área de investigação, monitorando a pesca comercial no início da década de 50, no trecho paulista da bacia do Rio Paraíba do sul, sendo talvez o único registro mais completo sobre a composição pretérita da ictiofauna na região. Nesse trabalho foram relacionadas 26 espécies de peixes, dentre as quais, o popularmente conhecido surubim do Paraíba já aparecia na pesca da região, totalizando a captura de 1.989 Kg, entre os anos de 1950 e 1951 nos municípios paulistas da bacia, onde era considerada como uma das poucas espécies nobres.

Levantamentos mais recentes foram publicados abrangendo a ictiofauna característica da região Fluminense da bacia do rio Paraíba do Sul.

Coordenados pelos pesquisadores [Bizerril & Primo \(2001\)](#) e com o título “Peixes de Águas interiores do Estado do Rio de Janeiro”, foram registradas 165 espécies de peixes para a bacia do rio Paraíba do Sul, sendo que 15,15% deste total foram consideradas introduzidas, oriundas de outras bacias brasileiras ou de outros países, constituindo grande ameaça à ictiofauna local.

3.2 A espécie escolhida: *Steindachneridion parahybae*

Recomendada como espécie Criticamente Ameaçada ([MMA, 2008](#)) o *Steindachneridion parahybae* (Figura 2), é um bagre que pertence à ordem dos Siluriformes, família Pimelodidae. Tem corpo achatado, com o dorso escuro marcado por manchas pequenas e alongadas, seus olhos são pequenos devido à predominância de atividade noturna e sua percepção do ambiente é auxiliada pela presença de barbilhões ([Garavello, 2005](#)). Endêmico da bacia do rio Paraíba do Sul e com biologia pouco conhecida ([Honji et al., 2009](#); [Caneppele et al., 2009](#)), sua ocorrência natural é descrita normalmente associada a poções não muito profundos e a áreas intermediárias como os remansos do domínio das ilhas fluviais e os encontros de rios ([Bizerril, 1999](#)), porém, recentes capturas foram realizadas em meio à corredeiras, remansos profundos acima de cachoeiras e no período noturno em regiões mais rasas do rio, provavelmente quando saem em busca de alimento (comunicação pessoal¹).

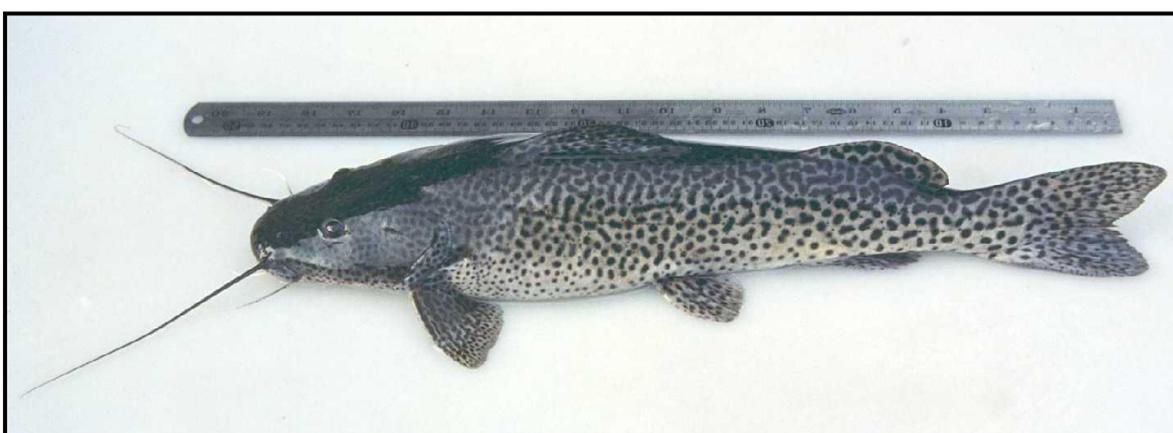


Figura 02: Surubim do Paraíba *Steindachneridion parahybae*.

¹ Caneppele “comunicação pessoal”, 2011, São Paulo, Brasil - CESP

Apesar de possuir características de espécie migradora (Garavello, 2005), não existem estudos sobre sua reprodução na natureza. Recentes investigações sobre sua reprodução em cativeiro indicam a espécie como de desova parcelada (comunicação pessoal²). Seu hábito alimentar é carnívoro bentóforo, com a dieta consistindo de peixes e crustáceos (Oliveira & Moraes Jr, 1997).

Oyakawa et al. (2009), descreveram a situação do surubim do Paraíba como um dos mais emblemáticos exemplos da situação de ameaça em que se encontra a fauna de peixes no estado de São Paulo, devido a mudança de status da espécie, anteriormente classificado na bacia como Criticamente em Perigo (CR) (MMA, 2008) consta na atual lista Paulista como Regionalmente Extinta (RE) (SMA, 2009).

Entretanto, em novembro de 2010, um único exemplar da espécie foi capturado no município de Lavrinhas – SP, pela equipe da Estação de Hidrobiologia e Aquicultura de Paraibuna, vinculada à Companhia Energética de São Paulo – CESP (comunicação pessoal³), porém, este fato não significa a presença de uma população resistente na localidade que atualmente se encontra em plena transformação com a implantação de duas Pequenas Centrais Hidrelétricas (PCHs) (CEIVAP, 2009).

No restante da bacia, as raras populações de surubim do Paraíba que foram localizadas nos estados do Rio de Janeiro e de Minas Gerais também estão em constante perigo. Só na última década foram registrados dois grandes desastres ambientais. No primeiro, ocorrido em março de 2003, o rio Pomba foi afetado severamente pelo vazamento de uma lagoa de tratamento de efluentes localizada no município de Cataguases, Minas Gerais, já o segundo, em novembro de 2008, foi provocado por um vazamento de organoclorados no Rio Pirapitinga, afluente do Rio Paraíba, em Resende, Rio de Janeiro, ambos provocando grande mortandade de peixes, entre os quais o surubim do Paraíba, (Oyakawa et al, 2009).

² Romagosa “comunicação pessoal”, 2011, São Paulo, Brasil – Instituto de Pesca

³ Caneppele “comunicação pessoal”, 2011, São Paulo, Brasil - CESP

As diferentes formas de pressão ambiental, instantâneas como as dos acidentes descritos acima, ou contínuas, relacionadas a mais de um século de transformações no hábitat original, implicam diretamente na estrutura da ictiofauna e na biologia das espécies de peixes do rio Paraíba do Sul, reforçando ainda mais a necessidade de investigações das características reprodutivas do surubim do Paraíba.

3.3 As ações da CESP na bacia

A Implantação de hidrelétricas, além dos benefícios gerados à sociedade, produz também consequências ambientais e significativas alterações sociais regionais (CESP, 1992). Na questão ambiental, o maior impacto produzido pelos barramentos se dá sobre a ictiofauna, principalmente devido à regularização da vazão do rio, o que atenua os picos de cheias, fato que interfere diretamente no mecanismo anual de enchimento e esvaziamento das áreas de reprodução de peixes de espécies migradoras (Torloni et al., 1986; Agostinho et al., 1992). Associado a esse impacto, também estão a redução ou eliminação de áreas de desova nos rios tributários e dos locais de desenvolvimento de formas jovens (lagoas e alagadiços marginais), em razão de seu encobrimento pelas águas represadas (CESP, 1996).

Esses ambientes, normalmente existentes ao longo do curso de um rio sem barramentos, são responsáveis pela manutenção sustentada das populações de peixes, principalmente das espécies migradoras, funcionando como berçário ou criadouros, de onde saem os peixes jovens que, tornam-se disponíveis à pesca, após terem efetuado várias reproduções e deixando descendência. Além disso, os barramentos impedem a realização de migrações reprodutivas e alimentares, e a dispersão de jovens, rio abaixo (Welcomme, 1985).

Apesar das pressões impostas à bacia do rio Paraíba do sul ao longo da história, a Companhia Energética de São Paulo – CESP, em função dos seus empreendimentos hidrelétricos implantados na região e consciente das transformações geradas por eles, implantou, dentre outras estruturas e ações

para mitigação destes impactos, a Estação de Hidrobiologia e Aquicultura de Paraibuna (EHA) (Figura 03).

Inaugurada em 08 de abril de 1981, a EHA de Paraibuna trabalhou inicialmente focada no incremento da produção pesqueira dos reservatórios e no fomento à piscicultura regional. A mais de 20 anos está voltada para a conservação de espécies da ictiofauna nativa da bacia do rio Paraíba do Sul, dentre as quais pode-se citar como prioritárias, aquelas que figuram nas listas de espécies ameaçadas estaduais e federais, como a pirapitinga do sul (*Brycon opalinus*), a piabanha (*Brycon insignis*) e o surubim do Paraíba (*Steindachneridion parahybae*) (MMA, 2008; SMA, 2009), sempre buscando parcerias para o desenvolvimento de tecnologias reprodutivas e o diagnóstico do status de conservação destas espécies na natureza.



Figura 03: Estação de Hidrobiologia e Aquicultura de Paraibuna, Unidade de Produção Rio Paraíba - CESP

O contínuo esforço da equipe da Companhia para a captura de exemplares selvagens dessas espécies deu origem a um projeto de pesquisa e desenvolvimento aprovado pela ANEEL (Agência Nacional de Energia Elétrica) direcionado para a formação de um banco genético vivo, caracterização genética das populações e o desenvolvimento de tecnologias de criopreservação de sêmen. Este projeto teve por objetivo principal resgatar na natureza o que ainda restou de variabilidade genética dessas três espécies e propor uma metodologia de reintrodução baseada no conhecimento da distribuição genética das populações selvagens (Caneppele et al., 2008).

Além disso, a ampliação qualitativa e numérica dos plantéis dessas espécies nos fornece a possibilidade de ampliação das investigações, facilitando o desenvolvimento de tecnologia para a produção de pirapitinga, piabanha e surubim do Paraíba em cativeiro ([Andrade-Talmelli, et al., 2001](#); [Caneppele et al., 2009](#); [Sanches et al., 2010](#); [Okawara et al., 2011](#)).

Especificamente no caso do surubim do Paraíba, a EHA de Paraibuna possui hoje 33 exemplares selvagens, capturados em quatro diferentes localidades da bacia do rio Paraíba do sul e um lote de 300 exemplares produzidos em dezembro de 2003, a partir dois casais selvagens, na primeira reprodução artificial registrada da espécie ([Caneppele et al., 2009](#)), disponibilizados para investigações científicas e a ampliação do seu conhecimento biológico.

Ainda são muitos os desafios, sendo que o presente estudo surgiu da necessidade do desenvolvimento de conhecimentos básicos, para que outros passos possam ser dados visando o domínio da reprodução artificial e a conservação do surubim do Paraíba.

3.4 Propagação artificial e qualidade de gametas masculinos

A propagação artificial ou reprodução induzida se configura como um dos principais aspectos para o avanço sustentável da produção piscícola ([Romagosa, 2006](#)), que impulsionada pelo constante aumento da população mundial e a crescente demanda por alimentos mais saudáveis, vem apresentando vertiginoso avanço em todo o mundo ([Donaldson, 2003](#)).

De acordo com [Zaniboni Filho e Nuñez \(2008\)](#) a piscicultura, também pode contribuir na conservação de populações selvagens por meio do aumento da oferta de pescado, reduzindo a pressão sobre os estoques naturais.

A consolidação da produção de alevinos, sejam eles destinados à engorda comercial em cativeiro ou para a reintrodução em ambientes naturais, depende fundamentalmente do conhecimento e do controle do processo

reprodutivo. Contudo para muitas espécies nativas de água doce tais processos ainda não são dominados a ponto de abastecer o mercado de alevinos em larga escala (Weingartner et al, 2008).

Um dos fatores limitantes para o controle e sucesso do processo reprodutivo é a utilização de gametas masculinos e femininos de qualidade que possam promover a máxima fertilização e o desenvolvimento normal dos embriões (Bobe & Labbé, 2009). Entretanto, os estudos por muito tempo estiveram mais focados na qualidade dos ovócitos e larvas, sem grandes preocupações com a qualidade do esperma. Segundo Rurangwa (2004) o esperma é frequentemente inadequado em termos de qualidade e quantidade durante a propagação artificial, comumente empregada nas estações de piscicultura.

Na maioria das espécies de peixes, os espermatozóides são imóveis nos testículos e no plasma seminal (Morisawa & Morisawa, 1990). Portanto, a motilidade é induzida logo após os espermatozóides serem liberados e entrarem em contato com o ambiente aquoso durante a reprodução natural ou com o diluente durante a propagação artificial (Cosson, 2010).

De um modo geral, encontram-se poucas informações na literatura mencionando o tempo de viabilidade dos gametas da ictiofauna nativa após a liberação sem ativação, sendo que o procedimento mais recomendado é a rápida homogeneização dos gametas (Zaniboni Filho & Weingartner, 2007), baseando-se na hipótese de que os ovócitos e o sêmen podem perder a viabilidade ao longo do tempo (Rizzo et al., 2003; Marques & Godinho, 2004; Sanches, 2009).

Murgas et al. (2011) destacam que a avaliação das características seminais é imprescindível na rotina de reprodução artificial em qualquer espécie. Para a descrição do perfil espermático, são necessárias análises das características do sêmen (volume, taxa e duração da motilidade espermática, concentração e morfologia), sendo que para a determinação da viabilidade espermática tais parâmetros podem ser relacionados às taxas de fertilização

(Fogli da Silveira et al., 1988; Billard & Cosson, 1992; Billard et al., 1995; Rurangwa et al., 2004; Sanches, 2009).

A produção espermática pode ser variável entre as diversas espécies e até mesmo dentro de uma mesma espécie de peixe, podendo ser influenciada pela estação do ano, clima, período de repouso (dormência) e método de coleta (Murgas et al., 2011).

Em relação à qualidade do sêmen, a motilidade espermática, usualmente expressa pela percentagem de espermatozóides móveis em sêmen adequadamente ativado (Marques & Godinho, 2004), é comumente utilizada na determinação da viabilidade espermática de peixes (Billard & Cosson, 1992; Rurangwa et al., 2004,). A motilidade é controlada através da sensibilidade à osmolaridade e as concentrações de íons, fenômeno este relacionado às atividades do canal iônico na membrana, que regulam os mecanismos de motilidade dos axonemas, a parte ativa dos flagelos (Cosson, 2010).

Em peixes de água doce a exposição do sêmen à hipotonicidade do meio induz à iniciação da motilidade espermática (Takai & Morisawa, 1995). Entretanto, a diminuição da capacidade de natação dos espermatozóides é originada em parte pela diminuição do estoque de energia ocorrida em função da rápida resposta de ativação pelo meio circundante elevando a brevidade do período móvel (Billard, 1990; Cosson et al, 1999). Provavelmente a exaustão de energia (ATP) contida na mitocôndria restringe também a motilidade, tendo como hipótese que a mitocôndria seja o reservatório endógeno de fonte de energia para a motilidade de espermatozóides de peixes ovulíparos (Gwo, 1995).

Cosson (2010) ressalta ainda que a duração da motilidade dos espermatozóides de peixes também é limitada por danos que aparecem durante a período de mobilidade, resultantes de defeitos de membrana gerados pelo estresse osmótico, bolhas citoplasmáticas ou por um processo de “curling” (enrolamento) desenvolvido na ponta do flagelo, reduzindo a eficiência das ondas de propagação. Uma das possíveis causas deste dano no sêmen é a

contaminação com urina no momento da extrusão (Dreanno et al, 1998; Perchec et al, 1998).

Para a estimativa da taxa de motilidade é comumente observada a movimentação dos espermatozóides (microscópios de luz ou em contraste de fase com aumentos variando entre 100 e 650x), logo após a introdução da solução ativadora (Billard & Cosson, 1992; Billard et al., 1993; Marques & Godinho, 2004; Sanches, 2009). Entretanto, Sanches (2009) ressalta que estas mensurações têm levantando dúvidas quanto a sua validação, pois, dependem basicamente da experiência do observador. Recentemente, por meio de softwares específicos, vem-se utilizando programas computacionais tais como, computer assisted sperm analysis (CASA), na avaliação espermática de peixes (Rurangwa et al., 2001; Wilson-Leedy & Ingermann, 2007; Matos et al., 2008; Sanches, 2009).

Este novo método pode ser útil no estabelecimento de padrões de comportamento espermático relacionados positivamente com taxas de fertilização e qualidade das larvas de peixes, identificando quais reprodutores do plantel são realmente mais eficazes, possibilitando assim a redução dos custos na piscicultura (Sanches, 2009). Porém a utilização dessa técnica depende de ajustes e validação do método, além do custo dos equipamentos necessários ainda estar fora da realidade da maioria das pisciculturas nacionais.

A concentração ou densidade espermática expressa a quantidade de espermatozóides por mL de sêmen e é normalmente determinada através da contagem em câmaras volumétricas, após uma diluição conhecida do sêmen em formolcitrato (Felizardo et al., 2010). Este parâmetro serve como base para a definição das doses inseminantes mais eficazes na fertilização dos ovócitos visando a economia de gametas, otimização e seleção de matrizes (Bombardelli et al., 2006; Shimoda et al., 2007; Sanches et al., 2009).

Em relação à morfologia espermática, alterações na estrutura dos espermatozóides são consideradas por Cosson et al. (1999) como responsáveis pela diminuição da motilidade, provocando a redução nas taxas de fertilização,

afetando a eficiência do reprodutor (Rurangwa et al., 2004). Para mamíferos, não é recomendada a utilização de sêmen com índices de alterações morfológicas acima de 30% para bovinos e de 20% para suínos (CBRA, 1998). Porém, para peixes ainda não estão definidos índices morfológicos que possam indicar até que ponto os reprodutores são viáveis (Sanches, 2009).

Segundo Luz et al. (2001) a produção e a qualidade seminal de peixes teleósteos pode variar conforme o tamanho do exemplar, época e metodologia de coleta. Outros fatores como a idade dos reprodutores (Bastardo et al., 2004), realização de coletas seminais sucessivas (Kavamoto et al., 1997), utilização ou não terapias hormonais (Kavamoto & Fogli da Silveira, 1986; Godinho, 2007); tipo de hormônio (Streit Jr. et al., 2003; Streit Jr. et al., 2004,; Bombardelli et al., 2006b) e a alimentação dos reprodutores (Sanches et al., 2006), também podem influenciar nos parâmetros espermáticos.

A composição bioquímica do plasma seminal varia amplamente entre as espécies e entre indivíduos da mesma espécie, relacionando-se a diferentes concentrações de proteínas, enzimas, lipídios (Perchec et al., 1993; Lahnsteiner et al., 1996), açúcares e ácidos (Piironen & Hyvärinen, 1983), e outras moléculas, as quais dão suporte aos espermatozóides mantendo a motilidade, a viabilidade e a capacidade para a fertilização (Wojtczak et al., 2005).

Ainda são observados muitas lacunas de conhecimento sobre a composição e as características do plasma seminal das espécies de peixes estudadas (Ciereszko, 2008).

Apesar da aparente evolução da ciência aplicada, falta ainda embasamento na pesquisa básica, o que tem dificultado a interpretação de resultados (Romagosa, 2008). Este fato justifica a necessidade do desenvolvimento de estudos que tenham como objetivo a investigação de aspectos básicos da biologia reprodutiva das espécies.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELL, R.; THIEME, M.L, REVENGA, C. et al. Freshwater ecoregions of the world: a new map of biogeographic units for freshwater biodiversity conservation. **BioScience**, v.58, n.5, p406-414, 2008.

AGOSTINHO, A.A. Manejo de recursos pesqueiros em reservatórios. In AGOSTINHO, A.A. & BENEDITO-CECÍLIO, E. (Ed.) **Situação atual e perspectivas da ictiologia no Brasil**. Maringá: Ed. UEM, 1992. p.106-121

ANDRADE-TALMELLI, E.F.; KAVAMOTO, E.T.; FENERICH-VERANI, N. Características seminais da piabanha, *Brycon insignis* (Steindachner, 1876), após estimulação hormonal. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v.27, n.2, p.149 - 154, 2001.

BARBIERI, G.; SALLES, F.A.; CESTAROLLI, M.A. et al. Estratégias reprodutivas do dourado, *Salminus maxillosus* e do curimatã, *Prochilodus lineatus* no Rio Mogi Guaçu, Estado de São Paulo, com ênfase nos parâmetros matemáticos da dinâmica populacional. Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Pirassununga. **Acta Scientiarum - Biological Sciences**, Maringá, v. 26, n. 2, p. 169-174, 2004.

BASTARDO, H.; GUEDEZ C.; LEON M. Características del semen de trucha arco-iris de diferentes edades, bajo condiciones de cultivo em Mérida, Venezuela. **Zootecnia Tropical**.v.22 n.3, p. 277-288, 2004.

BILLARD, R., Artificial insemination in fish. In: LAMMING, G.E., (Ed.) **Marshall's Physiology of Reproduction** . v.2. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1990, p.870-888.

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

BILLARD, R.; COSSON, J.; CRIM, L. W. Motility of fresh and aged halibut sperm. **Aquatic Living Resources**, v.6, p.67-75, 1993.

BILLARD, R.; COSSON, J.; CRIM, L.W. et al. Broodstock management and seed quality-General considerations. In: Bromage, N., Roberts, R. J. (Ed.). **Broodstock management and egg larval quality**. Oxford: Blackwell Science, 1995, p. 1-24.

BIZERRIL, C.R.S.F. A ictiofauna da bacia do rio Paraíba do Sul. Biodiversidade e padrões biogeográficos. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.42, n.2, p. 233-250, 1999.

BIZERRIL, C.R.S.F. Análise taxonômica e biogeográfica da ictiofauna de água doce do leste brasileiro. **Acta Biológica Leopoldensia**, v.16, p.51-80, 1994.

BIZERRIL, C.R.S.F.; PRIMO, P.B.S. **Peixes de águas interiores do estado do Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro: FEMAR-SEMADS. 2001, 417p.

BOBE, J.; LABBÉ, C. Egg and sperm quality in fish. **General and Comparative Endocrinology**, v.165, p.535-548, 2009.

BOCKUP, P.A.; MENEZES N.A.; GHAZZI, M.S. (Ed.). **Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil**. Rio de Janeiro. Museu Nacional, 2007. 195p

BOMBARDELLI, R.A.; MÖRSCHBÄCHER, E.F.; CAMPAGNOLO, R. et al. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá cinza *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35 n.4, p.1251-1257, 2006.

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

CANEPELE, D.. Peixes. in: FERREIRA, P.C. (Ed) **A Biologia e a Geografia do Vale do Paraíba: Trecho Paulista**. IEPA – Instituto Ecológico de Proteção da Natureza. São José dos Campos, 2007. p.91-103.

CANEPELE, D.; HONJI, R.M.; HILSDORF, A.W. S. et al. Induced spawning of the endangered neotropical species *Steindachneridion parahybae* (Siluriforme:Pimelodidae). **Neotropical Ichthyology**, v.7 n.4, p.759-762, 2009.

CANEPELE, D.; POMPEU, P.; GARAVELLO, J.C. Surubim do Paraíba (*Steindachneridion parahybae*). In: MACHADO, A.B.M.; DRUMMOND, G.M. & PAGLIA, A.P. (Ed.) **Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção**. Brasília, DF: MMA; Belo Horizonte – MG: Fundação Biodiversitas, 2008, vol II., p.236-238.

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

CEIVAP. **Pelas Águas do Paraíba**, Comitê de integração da Bacia Hidrográfica do Rio Paraíba do Sul – CEIVAP. Resende, RJ, n.3, ano III, 2009, 47p.

CESP. **Aspéctos limnológicos, ictiológicos e pesqueiros de reservatórios da CESP no período de 1986 a 1994**. Companhia Energética de São Paulo, Série Pesquisa e desenvolvimento n.136, São Paulo, SP, 1996, 81p.

CESP. **Plano Diretor do Reservatório de Paraibuna. 2ª edição**. Companhia Energética de São Paulo, Série Pesquisa e desenvolvimento n.68, São Paulo, SP, 1992, 291p.

CIERESZKO, A.. Chemical composition of seminal plasma and its physiological relationship with sperm motility, fertilizing capacity and cryopreservation in fish. In: ALAVI, S.M.H.; COSSON, J.J.; COWARD, K. et al. **Fish Spermatology**. Oxford: Alpha Science Ltd, 2008, p.215–240.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL – CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal**. 2. ed. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1998. 49p.

COSSON J. Frenetic activation of fish spermatozoa flagella entails short-term motility, portending their precocious decadence. **Journal of Fish Biology**, v.76, p.240-279, 2010.

COSSON, J.; BILLARD, R.; CIBERT, C. Regulation of axonemal wave parameters of fish spermatozoa by ionic factors. In: GAGNON, C. (Ed): **The male**

gamete: from basic knowledge to clinical applications. Paris: Cache River, 1999. p. 161-186.

DONALDSON, E.M. Reproductive endocrinology of fishes. **American Zoology**, v.13: p.909-927, 2003.

DREANNO, C.; SUQUET, M.; DESBRUYERES, E. et al. Effect of urine on semen quality in Turbot (*Scophthalmus maximus*). **Aquaculture**, v.169, p.247–262, 1998.

FECD. **Diagnóstico ambiental do Rio Paraíba do Sul no trecho Funil Santa Cecília com base no monitoramento da ictiofauna.** Vol. I Projeto FECD/CSN 2005/2007. Fundação Educacional Charles Darwin, 2008. 53p

FELIZARDO V.O.; MURGAS L.D.S.; DRUMOND M.M. et al. Dose inseminante utilizada na fertilização artificial de ovócitos de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). **Revista Ceres**, v.57, p.648-652, 2010.

FOGLI DA SILVEIRA, W.; KAVAMOTO, E.T.; RIGOLINO, M.G. Fertilidade do sêmen de truta arco-íris, *Salmo irideus gibbons*, em diferentes concentrações de espermatozoides por óvulo. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v.15 n.1, p.51-54, 1988.

GARAVELLO, J. C. Revision of genus *Steindachneridion* (Siluriformes: Pimelodidae). **Neotropical Ichthyology**, v.3 n.4, p.607- 623, 2005.

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

GODINHO, H.M.; ROMAGOSA, E.; CESTAROLLI, M.A. et al. Reprodução induzida de curimatá *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881) sob condições de cultivo experimental. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.8, n.2, p.113-119, 1984.

GWO, J. Ultrastructural study of osmolality effect on spermatozoa of three marine teleosts. **Tissue & Cell**, v.27, n.5, p.491-497, 1995.

HILSDORF, A.W.S.; PETRERE M. Conservação de peixes na bacia do rio Paraíba do Sul. **Ciência Hoje**, v.30, p.62-65, 2002.

HONJI, R.M.; CANEPPELE, D.; HILSDORF, A.W.S. et al. Threatened fishes of the world: *Steindachneridion parahybae* (Steindachner, 1877) (Siluriformes: Pimelodidae). **Environmental Biology of Fishes**, 85, 207–208, 2009.

IHERING, R.V.; AZEVEDO, P. A desova e a hipofização dos peixes. Evolução de dois Nematognathas. **Archivos Instituto Biológico** v.7 n.9, p.107-118, 1936.

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

KAVAMOTO, E.T.; MAINARDES-PINTO, C.S.R.; ANDRADE-TALMELLI, E.F. et al. Produção espermática do curimatá *Prochilodus scrofa*. Steindachner, 1881, **Boletim do Instituto de Pesca**, v.24, p.73-78, 1997.

LAHNSTEINER, F. Morphological, physiological and biochemical parameters characterizing the over-ripening of rainbow trout eggs. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.23, p.107– 118, 2000.

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

LUZ, R.K.; FERREIRA, A.A.; REYNALT, D.A.T. et al.. Avaliação qualitativa e quantitativa do sêmen do suruvi, *Steindachneridion scripta* (pimelodidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, v.27, n.1, p.39-42, 2001.

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

MARQUES, S.; GODINHO, H.P. Short-term Cold Storage of Sperm from Six Neotropical Characiformes Fishes. Brazilian **Archives of Biology and Technology**, 47 (5), 799-804, 2004.

MATOS, D.L; ARAÚJO, A.A.; ROBERTO, I.G. et al. Análise computarizada de espermatozoides: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.32, n.4, p.225-232, 2008.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE - MMA. **Livro Vermelho da Fauna Ameaçada de Extinção, 1ª.ed.** MACHADO, A.B.M., DRUMMOND, G. M., PAGLIA, A.P. (Ed). Brasília, DF: MMA; Belo Horizonte – MG: Fundação Biodiversitas, 2008, vol II. 1420 p.

MIRANDA-RIBEIRO, A. Oito espécies de peixes do Rio Pomba. **Boletim da Sociedade Nacional de Agricultura**. Rio de Janeiro, 1902. 1-8.

MORISAWA, M.; MORISAWA, S. Aquisition and initiation of sperm motility. In GAGNON, C. (Ed.) **Controls of Sperm Motility: Biological and Clinical Aspects** Boca Raton, FL: CRC Press, 1990. p. 137–152.

MURGAS, L.D.S.; FELIZARDO, V.O.; FERREIRA, M.R. et al. Importância da avaliação dos parâmetros reprodutivos em peixes nativos. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.35, n.2, p.186-191, 2011.

NELSON, J.S. **Fishes of the World**. 4ª ed, John wiley&Sons, 601p

OKAWARA, R.Y.; SANCHES, E.A.; CANEPPELE, D. et al. Fertilização de ovócitos de surubim-do-Paraíba, *Steindachneridion parahybae* em diferentes unidades térmicas acumuladas – UTAs. III Conferência Latinoamericana Sobre Cultivo de Peixes Nativos; III Congresso Brasileiro de Produção de Peixes Nativos, **Anais...**, Lavras, MG, 2011

OLIVEIRA, J.C.; MORAES JR., D.F.. Dados adicionais à descrição de *Steindachneridion parahybae* (Steindachner, 1876) (Teleostei, Siluroidei, Pimelodidae). **Boletim do Museu Nacional**, 384, 1-11, 1997.

OYAKAWA, O.T.; MENEZES, N.A.; SHIBATTA, O.A. Peixes de água doce. In: BRESSAN, P. M.; KIERULFF, M. C. M.; SUGIEDA, A. M. (Ed.). **Fauna ameaçada de extinção no Estado de São Paulo**. São Paulo: Fundação Parque Zoológico de São Paulo/Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, 2009, p.349-424.

PERCHEC, P.G.; COSSON, J.; ANDRÉ, F. et. al. La motilité des spermatozoïdes de truite (*Oncorhynchus mykiss*) et de carpe (*Cyprinus carpio*). **Journal Applied Ichthyology**, v.9, p.129-149, 1993.

PERCHEC, P.G.; PAXION, C.; COSSON, J. et. al. Initiation of carp spermatozoa motility and early ATP reduction after milt contamination by urine. **Aquaculture**, v.160, p.317–328, 1998.

PIIRONEN, J.; HYVÄRINEN, H. Composition of the milt of some teleost fishes. **Journal of Fish Biology**, v.22, p.351-361, 1983.

RIBEIRO, A.C. Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. **Neotropical Ichthyology**, v.4, n.2, p.225-246, 2006.

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

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

ROMAGOSA, E. Avanços na reprodução de peixes migradores. In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI E.C. (Ed.) **Tópicos Especiais em Biologia Aquática e Aqüicultura**. Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, Jaboticabal, SP, 2008. p. 1-16.

RURANGWA E.; VOLCKAERT F.A.M.; HUYSKENS G. et. al. Quality control of refrigerated and cryopreserved semen using computer-assisted sperm analysis (CASA), viable staining and standardized fertilization in african catfish (*Clarias gariepinus*). **Theriogenology**, v.55, p.751-769, 2001.

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.

SANCHES, E.A. **Efeito da estocagem a curto prazo e da temperatura sobre gametas de Jundiá, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824)**. Jaboticabal: UNESP, 2009. 88p. Dissertação (Mestrado em Aquicultura-CAUNESP), Campos Jaboticabal, 2009.

SANCHES, E.A.; BOMBARDELLI, R.A.; BAGGIO, D.M. et al. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de dourado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38 n.11, p.2091-2098, 2009.

SANCHES, E.A.; CANEPPELE D.; SANTOS D.R. et al.. Artificial fertilization of oocytes from surubim-do-paraíba *Steindachneridion parahybae*, with different insemination doses and water volume. In: AQUACULTURE EUROPE 2010 – WAS. **Anais...** Porto, Portugal, 2010. p. 1166-1167.

SANCHES, E.A.; MARCOS, R.M.; BAGGIO, D.M. et. al. Desempenho reprodutivo de machos de jundiá cinza (*Rhamdia quelen*) (Quoy & Gaimard, 1824) submetidos a dietas contendo diferentes níveis de energia digestível. In: SINPÓSIO NACIONAL DE ENGENHARIA DE PESCA, 2006, Toledo, **Anais...**Toledo: CECE Unioeste Campus Toledo (CD-ROM).

SCORVO FILHO, J.D.. Piscicultura em tanques-rede uma alternativa para grandes e pequenos corpos d'água. In: **AveSui América Latina**, Florianópolis Brasil, 2008.

SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE - SMA. **Fauna Ameaçada De Extinção no Estado de São Paulo: Vertebrados**. BRESSAN P.M.; KIERULFF M.C.M.; SUGIEDA A.M. (Coordenação). Fundação Parque Zoológico de São Paulo: SMA. São Paulo, SP, 2009. 645p

SHIMODA, E.; ANDRADE, D.R.; VIDAL JÚNIOR, M.V. et. al. Determinação da razão ótima de espermatozóides por ovócitos de piabanha *Brycon insignis* (pisces - characidae). **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.59, n.4, p.877-882, 2007.

STREIT JR., D.P.; MORAES, G.V.; RIBEIRO, R.P. et. al. Estudo comparativo da indução hormonal da espermição em piavuçu (*Leporinus macrocephalus*) com extrato de hipófise de frango, coelho e carpa. **Acta Scientiarum, Animal Sciences**, v.25, n.2, p.261-266, 2003.

STREIT JR., D.P.; MORAES, G.V.; RIBEIRO, R.P. et. al. Comparação do sêmen de Curimbá (*Prochilodus lineatus*) induzido por extrato de hipófise de frango, coelho ou carpa. **Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science**, v.41, p.147-153, 2004.

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**, v.108, p.1175–1181, 1995.

TOLUSSI, C.E.; HILSDORF, A.W.S.; CANEPPELE, D. et al. The effects of stocking density in physiological parameters and growth of the endangered teleost species piabanha, *Brycon insignis* (Steindachner, 1877). **Aquaculture**, v.310, p.221–228, 2010.

TORLONI, C.E.C.; GIRARDI, L.; NASCIMENTO, E.P. et. al. **Considerações sobre a utilização de escadas para peixes e de estações de aquicultura na conservação da fauna ictiica no Estado de São Paulo. 2ª Ed.** São Paulo: CESP (Coleção Ecossistemas Aquáticos, 003), 1986. 8p.

VIEIRA, F, RODRIGUES R R. A fauna de peixes dos afluentes do rio Paraíba do Sul no estado de Minas Gerais. **MG.BIOTA**, Belo Horizonte, v.3, n.1, p.5-23, 2010.

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

WEINGARTNER, M. **Aperfeiçoamento das técnicas de fertilização de ovócitos de Dourado, *Salminus brasiliensis* Cuvier, 1816 (Characiformes: Characidae), utilizando sêmen fresco e congelado durante o processo de reprodução induzida.** Florianópolis: UFSC, 2010. 81p. Tese (Doutorado_CCA_PG_AQI). 2010.

WEINGARTNER, M; FRACALLOSSI, D.M; BEUX, L.F. et al. Desenvolvimento de tecnologia de cultivo para peixes nativos do Alto Rio Uruguai. in: ZANIBONI-FILHO, E.; NUÑER, A.P.O. (Ed): **Reservatório de Itá: Estudos Ambientais**,

Desenvolvimento de Tecnologia de Cultivo e Conservação da Ictiofauna. Editora UFSC, Florianópolis, SC , 2008. p 257 a 306.

WELCOMME, R.L. **River fisheries.** FAO Fish. Tech. Pap. v.262, 1985, 330 p.

WILSON-LEEDY, J.G.; INGERMANN, R.L. Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. **Theriogenology**, v.67, p.661–672, 2007.

WOJTCZAK, M.; DIETRICH, G.J.; CIERESZKO, A. Transferrin and antiproteinases are major proteins of common carp seminal plasma. **Fish and Shellfish Immunology**, v.19, p.387-391, 2005.

ZANIBONI-FILHO, E.; NUÑER, A.P.O. Reprodução de peixes migradores de água doce. In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C.; FRACALOSSO, D.M.; CASTAGNOLLI, N.(Ed.) **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva.** São Paulo: TecArt, 2004. p.45–74.

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

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

5. APRESENTAÇÃO DOS ARTIGOS

Visando facilitar a publicação dos resultados obtidos, após a incorporação das sugestões que serão feitas pela banca, foram elaborados dois artigos científicos seguindo as normas de publicação das revistas a que serão submetidos, sendo aqui apresentados na forma de capítulos.

Capítulo I:

Produção espermática de *Steindachneridion parahybae* (Steindachner, 1876) e o efeito da indução hormonal ao longo de um ciclo reprodutivo

International Journal - *Aquaculture*, Elsevier, Amsterdam

Capítulo II:

Correlações entre parâmetros quali-quantitativos do sêmen fresco de *Steindachneridion parahybae* (Steindachner, 1876)

Revista Brasileira de Zootecnia, Viçosa, MG

CAPITULO I:
PRODUÇÃO ESPERMÁTICA DE *Steindachneridion parahybae*
(STEINDACHNER, 1876) E O EFEITO DA INDUÇÃO HORMONAL AO LONGO
DE UM CICLO REPRODUTIVO

International Journal - *Aquaculture*, Elsevier, Amsterdam

Produção espermática de *Steindachneridion parahybae* (Steindachner, 1876) e o efeito da indução hormonal ao longo de um ciclo reprodutivo

Danilo Caneppele^{a,b}, Eduardo Antônio Sanches^c, Elizabeth Romagosa^d

^aEstação de Hidrobiologia e Aquicultura de Paraibuna, CESP - Rod. dos Tamoios Km 38, Bairro Rio Claro, Paraibuna, SP, BR. CP 66 - danilo.caneppele@cesp.com.br

^bPrograma de Pós Graduação em Aquicultura Instituto de Pesca – APTA, SAA, São Paulo, SP, BR.

^cCentro de Aquicultura da UNESP, Jaboticabal, SP, BR

^dInstituto de Pesca – APTA, SAA, São Paulo, SP, BR.

Resumo

Steindachneridion parahybae é um bagre, endêmico da bacia do rio Paraíba do Sul e com biologia pouco conhecida. Sua pesca já foi importante na década de 50, porém, com a degradação da bacia hidrográfica do rio Paraíba do Sul, a espécie hoje está criticamente ameaçada de extinção. Com o objetivo de se aproveitar ao máximo a produção de sêmen dos escassos machos selvagens da espécie nos processos de reprodução artificial, fortalecendo assim o desenvolvimento de programas de conservação *ex situ*, o presente estudo avaliou a produção e as características seminais de *S. parahybae* mantidos em cativeiro, ao longo de um ciclo reprodutivo e o efeito da indução com Extrato de Pituitária de Carpa (EPC). Para tanto, entre os meses de outubro de 2009 a abril de 2010, foram realizadas 06 coletas de sêmen obtidas de 26 exemplares, divididos em dois tratamentos (não induzidos e induzidos). O efeito da indução hormonal nos parâmetros seminais avaliados não foi significativo ($P > 0,05$), tendo sido obtidas as seguintes médias e erros padrões para os tratamentos respectivamente: volume relativo de sêmen ($9,39 \pm 1,19$ e $9,87 \pm 1,03$ mL kg⁻¹); taxa de motilidade espermática ($79,05 \pm 1,85$ e $81,77 \pm 1,54\%$); tempo de motilidade ($38,76 \pm 0,74$ e $39,94 \pm 0,80$ s); concentração espermática ($9,24 \pm 0,88$ e $8,75 \pm 0,58 \times 10^9$ spz mL⁻¹); pH do plasma seminal ($7,23 \pm 0,06$ e $7,32 \pm 0,05$) e osmolaridade do plasma seminal ($263,21 \pm 2,40$ e $259,46 \pm 3,54$ mOSM kg⁻¹). Os resultados obtidos indicaram que a espécie possui produção espermática contínua, porém, variável durante o período avaliado, e que a indução hormonal não proporciona melhoras significativas nas características seminais da espécie.

Palavras Chave: Sêmen, propagação artificial, surubim do Paraíba, variação temporal.

Abstract

Steindachneridion parahybae is a catfish, endemic to the Paraíba do Sul river basin and with little known biology. It used to be important to fishing in the 50s, but with the degradation of the Paraíba do Sul river basin, the species is currently critically threatened with extinction. In order to make the most of the semen production of the scarce wild males of this species in the process of artificial reproduction, supporting the development of conservation programs *ex situ*, the present study assessed the production and the semen characteristics of *S. parahybae* kept in captivity over one reproductive cycle and the effect of the induction with Carp Pituitary Extract (CPE). Thus, 06 samples of semen were collected between October 2009 and April 2010 from 26 units divided into two treatments (non-induced and induced). The effect of hormonal induction on the seminal parameters studied was not significant ($P>0.05$). The following mean values and standard deviations were obtained for the treatments, respectively: relative volume of semen (9.39 ± 1.19 and 9.87 ± 1.03 mL kg⁻¹); sperm motility rate (79.05 ± 1.85 and $81.77 \pm 1.54\%$); motility time (38.76 ± 0.74 and 39.94 ± 0.80 s); sperm concentration (9.24 ± 0.88 and $8.75 \pm 0.58 \times 10^9$ spz mL⁻¹); pH of the seminal plasma (7.23 ± 0.06 and 7.32 ± 0.05) and osmolarity of the seminal plasma (263.21 ± 2.40 and 259.46 ± 3.54 mOSM kg⁻¹). The results obtained indicated that this species presents continuous sperm production, but variable during the period studied, and that the hormonal induction does not provide a significant improvement in the semen characteristics of the species.

Key Words: Semen, induced reproduction, surubim do Paraíba, temporal variation.

Introdução

Steindachneridion parahybae é um bagre, comumente denominado surubim do Paraíba que pode ultrapassar 60 centímetros de comprimento padrão (Oliveira e Moraes, 1997). Endêmico da bacia do rio Paraíba do Sul e com biologia pouco conhecida (Honji et al., 2009), possui características de espécie migratória ocorrendo em águas correntosas que fluem sobre o leito rochoso (Garavello, 2005).

Entre os anos de 1950 e 1951 foi relatada a captura de *S. parahybae* em 10 municípios da porção paulista da bacia o que totalizou 1989 kg (Machado e Abreu, 1952),

porém atualmente não existem registros comprovados da sua captura no estado de São Paulo (MMA, 2008).

A bacia hidrográfica do rio Paraíba do Sul, localizada no eixo principal de desenvolvimento do Brasil, vem sofrendo com a degradação ambiental, desde os ciclos agropecuários (café, gado e silvicultura), passando pela industrialização, urbanização, exploração de areia e barramentos hidroelétricos (Hilsdorf e Petrere, 2002). O processo desordenado de ocupação do Vale do Paraíba somado a outras atitudes equivocadas como a introdução do dourado, *Salminus brasiliensis*, espécie alóctone e de alto nível trófico, introduzido em 1946 (Machado e Abreu, 1952) contribuíram para a redução de populações nativas de peixes (Caneppele, 2007).

Este contexto explica em parte a situação atual de *S. parahybae*, que dentre as nove espécies de peixes ameaçadas na bacia do rio Paraíba do Sul, é a que apresenta a situação mais crítica (MMA, 2008), sendo considerada regionalmente extinta no estado de São Paulo, de acordo com o livro da Fauna Ameaçada de Extinção no Estado de São Paulo: Vertebrados (SMA, 2009).

Ações desenvolvidas para a conservação da ictiofauna local devem envolver, dentre outras, a reestruturação de habitats, o conhecimento biológico da espécie e a distribuição genética de suas populações na bacia. Além disso, para programas de conservação *ex situ*, que visam a produção de alevinos de qualidade para a introdução na natureza, o controle do processo reprodutivo é fundamental.

Romagosa (2006) define como um dos principais aspectos para a intensificação da produção piscícola sustentável, a utilização da propagação artificial ou reprodução induzida. Nesse sentido, para a promoção da máxima fertilização e subsequente desenvolvimento normal do embrião, devem ser utilizados gametas masculinos e femininos de qualidade (Bobe e Labbé, 2010). A qualidade dos espermatozóides pode ser

avaliada por meio de características que devem estar relacionadas às taxas de fertilização (Fogli da Silveira et al., 1988; Billard et al., 1995; Tuset et al., 2008; Galo, 2009), contudo os parâmetros relacionados à motilidade são comumente utilizados na determinação da viabilidade espermática (Billard e Cosson, 1992; Rurangwa et al., 2004).

As estações de aquicultura normalmente utilizam seus reprodutores masculinos apenas uma vez por ciclo, estimulando-os através de terapias hormonais, utilizando diferentes hormônios e dosagens, porém, geralmente sem a avaliação sistemática dos seus efeitos. Kavamoto et al. (1997) estudando *Prochilodus scrofa*, ressaltaram que para a utilização racional de machos mantidos em cativeiro e destinados à reprodução induzida, é imprescindível o conhecimento da capacidade de produção do material fecundante desses exemplares durante o período reprodutivo. Para espécies ameaçadas a racionalidade no uso de matrizes é ainda maior, tendo em vista a dificuldade de captura de exemplares selvagens.

Considerando-se o estado de conservação do *S. parahybae* na natureza e o reduzido número de exemplares selvagens disponíveis para a manipulação reprodutiva em cativeiro, a possibilidade de utilização do sêmen de um mesmo reprodutor mais de uma vez, em um único ciclo reprodutivo, abre uma nova perspectiva de produção seminal destinada à conservação de material genético de alta variabilidade.

Diante disso, o objetivo do presente estudo foi avaliar a produção e as características espermáticas de *S. parahybae*, mantidos em cativeiro, e o efeito da indução hormonal ao longo de um ciclo reprodutivo.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido entre os meses de outubro de 2009 e abril de 2010, na Estação de Hidrobiologia e Aquicultura de Paraibuna (S 23°24.888' W 45°35.991' e

altitude 640 m), pertencente a Companhia Energética de São Paulo – CESP, localizada no município de Paraibuna – SP/BR.

Para o início do estudo foram selecionados 26 exemplares machos, considerados maduros diante da constatação da liberação de sêmen após leve pressão abdominal. Os exemplares de *S. parahybae* selecionados faziam parte de um lote produzido a partir de reprodutores selvagens em dezembro de 2003 (Caneppele et al., 2009).

Os exemplares selecionados foram pesados individualmente, marcados eletronicamente e divididos em dois tratamentos, sendo manipulados de acordo com os princípios éticos estabelecidos por Van Zetphen et al. (2001). No tratamento um 13 machos ($542,3 \pm 39,3$ g) não foram submetidos à indução hormonal e a coleta de sêmen foi realizada através de massagem na cavidade abdominal do peixe no sentido encéfalo-caudal, em tubos de ensaio graduados (0,1 mL). No tratamento dois, outros 13 machos ($522,3 \pm 33,6$ g) foram submetidos à indução hormonal com Extrato de Pituitária de Carpa (EPC - $3,0 \text{ mg kg}^{-1}$), com o sêmen coletado da mesma forma, após um intervalo de 180 unidades térmicas acumuladas (UTA). Os exemplares submetidos aos diferentes tratamentos foram confinados em dois tanques de alvenaria de 10 m^3 ($2 \times 5 \times 1 \text{ m}$), separadamente, sendo mantidos sob as mesmas condições de alimentação e manejo.

Durante o período do experimento foram realizadas seis coletas de sêmen em cada tratamento (totalizando 156 amostras), com intervalos que variaram de 26 a 49 dias, não tendo ocorrido coleta em dezembro de 2009. Durante as coletas foram verificadas as numerações eletrônicas e repetidas as pesagens individuais.

Os valores de pH, oxigênio dissolvido (mg L^{-1}) e temperatura da água ($^{\circ}\text{C}$) foram registrados três vezes por semana nos tanques, durante o período do experimento, com a utilização de um Multianalizador (Horiba U50).

O volume do sêmen coletado (mL) foi medido por observação direta nos tubos de ensaios graduados e o volume relativo (mL kg^{-1}) calculado em função dos pesos dos exemplares registrados nas coletas. Cada amostra foi mantida em caixas de isopor contendo gelo (Marques e Godinho, 2004) durante a realização das análises.

As amostras foram avaliadas inicialmente em relação à pré-ativação, sendo as contaminadas por urina, sangue ou água descartadas (Tiersch e Green, 2011).

A motilidade espermática (%) foi obtida por meio de análise subjetiva dos movimentos progressivos em intervalos de incremento de 5 em 5%. O tempo de duração da motilidade (s) foi realizado considerando-se quando 50% dos espermatozóides pararam de se movimentar (Sanches et al., 2009; Romagosa et al., 2010). Para a mensuração foram utilizados 5 μL de sêmen, diluídos em 200 μL de solução ativadora (água dos tanques), obtendo uma diluição sêmen:água de 0,025, sendo utilizados 5 μL da solução resultante para a avaliação em um microscópio de luz ZEISS – Jenamed 2 - Germany (200 x), e para cada amostra de sêmen foram três repetições (Sanches et al., 2009).

Para a mensuração da concentração espermática (sptz mL^{-1}), 10 μL de sêmen de cada amostra foram adicionados a 3000 μL de formol salino tamponado, resultando em uma diluição de 1:300. A contagem de células espermáticas foi realizada em câmara hematimétrica de Neubauer (400x) (Wirtz e Steinmann, 2006; Sanches et al., 2009).

Amostras de sêmen com volumes acima de 1,5 mL foram submetidas a centrifugação por 30 minutos a 50 hertz em centrífuga Fanem 204 NR, para obtenção do plasma seminal, que foi armazenado em criotubos e congelado em nitrogênio líquido. O pH e a osmolaridade destas amostras foram posteriormente mensuradas no Laboratório de Tecnologia de Sêmen - Universidade Federal de Lavras – UFLA, MG com auxílio de um pHmetro Digimed DM22 e Osmômetro Semimicro osmometer K 7400 Knauer.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância dos efeitos principais (*main effects ANOVA*) ao nível de 5% de significância. Em caso de efeito, foi aplicado o teste de comparação de médias de Duncan ao mesmo nível. Os pressupostos foram avaliados conforme [Quinn e Keough \(2002\)](#). O *software* utilizado para as análises foi o Statistica 7.0[®] (Statsoft, 2005).

Resultados e Discussão

Os valores médios e os desvios padrões dos parâmetros limnológicos registrados durante o período do experimento nos tanques dos tratamentos foram: pH = $7,23 \pm 0,59$ e $7,26 \pm 0,57$; oxigênio dissolvido = $7,33 \pm 0,69$ e $7,65 \pm 0,72$ mg L⁻¹; temperatura da água = $21,85 \pm 0,77$ e $21,85 \pm 0,80$ °C, respectivamente, não sendo verificadas diferenças estatisticamente significativas (P<0,05), mantendo-se dentro dos limites estabelecidos para a aqüicultura ([CONAMA, 2005](#)).

A Tabela 01 mostra que os parâmetros seminais avaliados não apresentaram diferenças estatisticamente significativas (P>0,05), entre os dois tratamentos.

Tabela 1

Parâmetros seminais observados em *S. parahybae*, nos dois tratamentos, durante o período de outubro de 2009 a abril de 2010.

Parâmetros	Não Induzidos		Induzidos		p
	Média ± EP	n	Média ± EP	n	
Frequência de machos espermiando (%)	80,77±7,88	6	82,05±13,57	6	0.8759
Volume de sêmen relativo (mL kg ⁻¹)	9,39±1,19	76	9,87±1,03	74	0.8257
Produção total de sêmen (mL)	28,93±5,23	13	27,81±3,50	13	0.8598
Concentração espermática (x10 ⁹ spztz mL ⁻¹)	9,24±0,88	67	8,75±0,58	67	0.6839
Taxa de motilidade (%)	79,05±1,85	67	81,77±1,54	67	0.2441
Tempo de motilidade (s)	38,76±0,74	67	39,94±0,80	67	0.1302
Osmolaridade do plasma seminal (mOSM kg ⁻¹)	263,21±2,40	42	259,46±3,54	49	0.3541
pH do plasma seminal	7,23±0,06	42	7,32±0,05	49	0.0543

p: probabilidade obtida na análise de variância; Valores em média ± erro padrão; n = número de observações.

[Kavamoto et al. \(1996\)](#) constataram efeitos altamente significativos (P<0,01) da indução hormonal com Hormônio da Gonadotrofina Coriônica humana - HGC no volume de sêmen e na concentração espermática do *P. scrofa*, quando comparadas às coletas

realizadas antes da estimulação hormonal. [Bombardelli et al. \(2006\)](#) através da indução hormonal com EPC em *Rhandia quelen*, obtiveram volume de sêmen superior ($5,9 \pm 0,54$ mL) em comparação aos observados por [Ferreira et al. \(2001\)](#) e [Kavamoto e Fogli da Silveira \(1986\)](#), que registraram 0,41 mL em *R. quelen* e 0,8 mL em *R. hilarii*, respectivamente, em exemplares coletados no ambiente natural. [Streit Jr. et al. \(2006\)](#) avaliando o efeito da indução hormonal nas características qualitativas do sêmen de *Piaractus mesopotamicus* não verificaram efeitos significativos ($P > 0,05$) do processo.

Deve-se destacar que, a realização da indução hormonal é praticada com intuito de garantir um maior volume de sêmen, facilitando sua manipulação em procedimentos de reprodução artificial ([Carneiro e Mikos, 2008](#); [Viveiro e Godinho, 2009](#)). Porém, para que o processo utilizado tenha sucesso, além das diferenças específicas, o incremento na produção espermática em peixes também depende do tipo de hormônio utilizado e dos intervalos necessários para a sua efetiva ação, sendo que outras formas de estimulação à espermiacão para *S. parahybae* devem ser investigadas.

Como não foram verificadas diferenças significativas ($P > 0,05$), entre os tratamentos, em nenhum dos parâmetros analisados, para a avaliação temporal os 26 exemplares estudados foram considerados como um único grupo.

Desta forma foi constatada a espermiacão do *S. parahybae* durante o período avaliado nas condições de confinamento. Entretanto, uma redução significativa ($P < 0,05$) no número de peixes espermiando foi observada no mês de abril (Figura 01). Entre os meses de outubro de 2009 e março de 2010, o percentual de peixes que liberaram sêmen foi de $91,54 \pm 2,91\%$, sendo que em abril apenas $30,77 \pm 13,38\%$ espermiaram, indicando o final do período reprodutivo para a espécie.

[Kavamoto et al. \(1997\)](#) registraram a espermiacão de *P. scrofa* entre os meses de outubro a dezembro, tendo sido os exemplares submetidos a cinco coletas em intervalos de

14 dias e com temperatura média de 25 °C. Os autores observaram que machos dessa espécie podem ser utilizados até três vezes no mesmo ciclo reprodutivo, sem a perda da qualidade espermática.

A amplitude do período de espermiacão verificada para *S. parahybae* no presente estudo (Figura 01), pode estar relacionada com a estratégia reprodutiva da espécie ou com as médias de temperatura da água registradas durante o experimento. Essa hipótese é corroborada por Zaniboni-Filho et al. (2010), que, ao comparar duas localidades de cultivo de *Steindachneridion inscriptum*, verificaram que em regiões mais quentes o período reprodutivo é antecipado e, aparentemente, mais curto, sendo fortemente influenciado pela variação das médias de temperatura da água. Entretanto, sendo *S. parahybae* uma espécie ainda pouco conhecida, existe a necessidade de comparações entre criações localizados em diferentes regiões, a fim de se verificar a influência da temperatura na determinação do seu período de espermiacão.

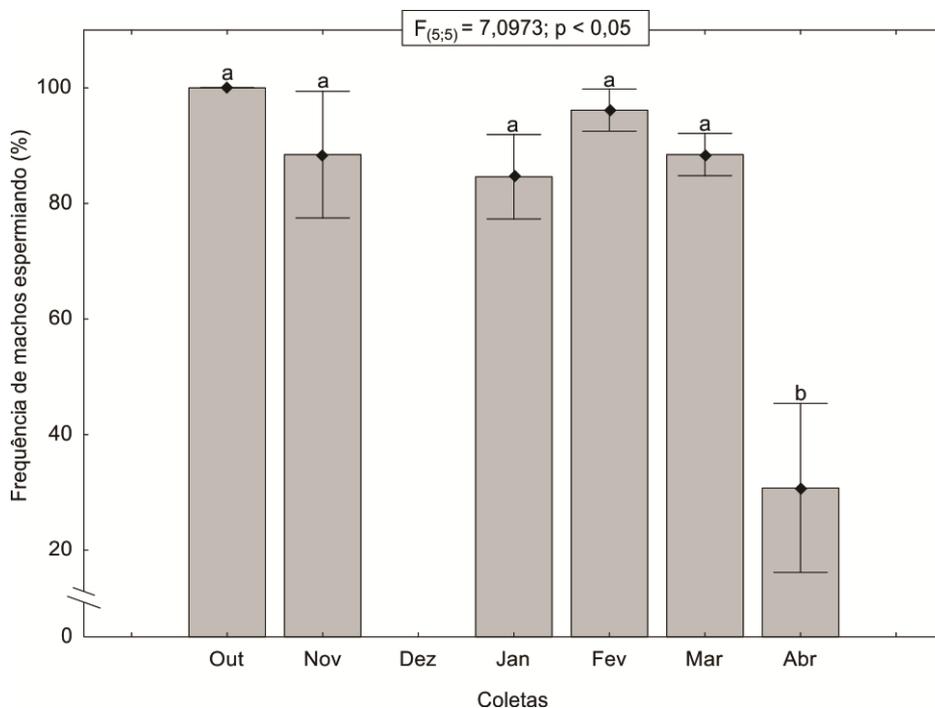


Figura 01: Porcentagem de *S. parahybae* espermiando, observadas durante a estação reprodutiva. Valores em média \pm erro padrão. Letras diferentes indicam $p < 0,05$.

As variações temporais das médias dos volumes relativos de sêmen podem ser verificadas na Figura 02A. Na primeira coleta (out/09) foram registrados os maiores valores, ocorrendo uma queda acentuada (nov/09), recuperando sua capacidade de espermição (fev/10), seguida de um período de declínio (mar e abr/10), indicando redução na produção espermática, o que corrobora em parte com informações preliminares do período reprodutivo da espécie de novembro a março (Caneppele et al., 2009). A variação do volume relativo de sêmen observada entre as duas primeiras coletas provavelmente está relacionada ao tempo de adaptação dos exemplares às condições experimentais.

Volumes relativos de sêmen obtidos por Luz et al. (2001) em *S. inscriptum* variaram de 1,60 a 9,09 mL kg⁻¹, sendo este variável e dependente do tamanho do exemplar, época e metodologia de coleta. Em relação ao tamanho, para *S. parahybae*, não foi verificada correlação (P>0,05) entre o volume de sêmen coletado (mL) e seus respectivos pesos. Os volumes somados por exemplar durante as seis coletas estiveram entre 8,2 a 67 mL, com coeficiente de variação de 55,44%. Kavamoto et al. (1996) também verificaram coeficientes de variação do volume de sêmen elevados (54,20%) estudando *P. scrofa*, sugerindo a ocorrência de variações individuais na capacidade de produção sêmen.

A concentração espermática é uma das medidas quantitativas utilizadas na pesquisa e rotina para a avaliação do sêmen de animais de fecundação interna e externa, para maximizar o aproveitamento do material fecundante e para ter melhores resultados na fertilização (Fogli da Silveira et al., 1990), podendo também ser utilizada como forma de avaliação da qualidade dos reprodutores.

Os valores observados de concentração espermática de *S. parahybae* variaram conforme apresentado na Figura 2B, e foram inferiores aos registrados por Luz et al. (2001) em *S. inscriptum* que variaram de 19,50 a 120,15 x 10⁹ spz mL⁻¹.

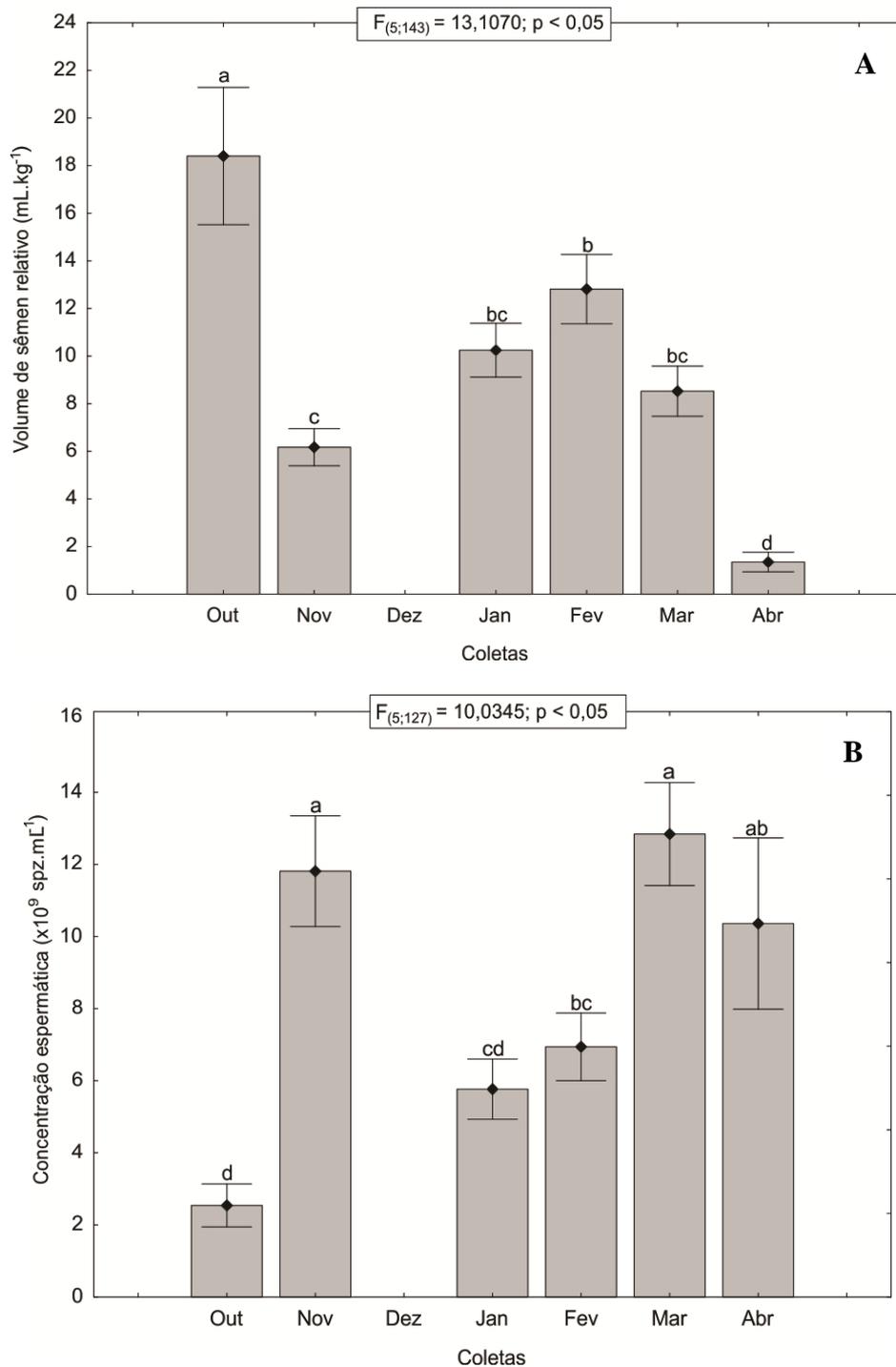


Figura 2: Variações de volume de sêmen relativo (A) e concentração espermática (B) do *S. parahybae*, observadas durante a estação reprodutiva. Valores em média \pm erro padrão. Letras diferentes indicam $p < 0,05$.

Estudos com *Rhamdia quelen* também apontaram médias superiores $50,00 \pm 12,00 \times 10^9$ a $66,00 \pm 36,00 \times 10^9$ spz mL⁻¹ (Borges et al., 2005), $55,80 \pm 5,69 \times 10^9$ spz mL⁻¹ (Fogli da Silveira et al., 1985) e $19,70 \times 10^9$ spz mL⁻¹ (Bombardelli et al., 2006). No entanto, os parâmetros quantitativos para avaliação espermática são influenciados por

diversos fatores como, a idade dos reprodutores (Bastardo et al., 2004), coletas seminais sucessivas (Kavamoto et al., 1997), indução hormonal (Kavamoto e Fogli da Silveira, 1986), hormônios aplicados durante o processo de indução hormonal (Streit Jr. et al., 2003; Bombardelli et al., 2006), época do ano (Borges et al., 2005) e metodologia de coleta (Ferreira et al., 2001).

Na Figura 3A e 3B são observadas variações significativas ($P < 0,05$) nas taxas de motilidade e duração do tempo de motilidade entre as coletas.

As médias das taxas de motilidade obtidas para *S. parahybae* atingiram, na primeira e terceira coletas (Figura 3A), valores próximos aos registradas para *Rhamdia quelen*, $88,3 \pm 2,9\%$ (Ferreira et al., 2001) e $81,90 \pm 9,67\%$ (Kavamoto e Fogli da Silveira, 1986), porém, no restante das coletas se mantiveram abaixo dos 80%. Em relação ao tempo de ativação (Figura 3B), considerando-se o momento quando 50% dos espermatozóides perdem sua motilidade (Sanches et al., 2009; Romagosa et al., 2010), os valores se apresentaram superiores aos encontrados para *Rhamdia quelen*, de $23,9 \pm 2,7$ a $26,2 \pm 3,4$ s (Hilbig et al., 2008) e $21,86 \pm 1,33$ s (Witeck et al., 2011). Luz et al. (2001) avaliando o sêmem de *S. inscriptum*, obtiveram tempos de motilidade variando entre 37 e 75 s, porém consideraram os momentos em que os espermatozóides cessavam totalmente seus movimentos.

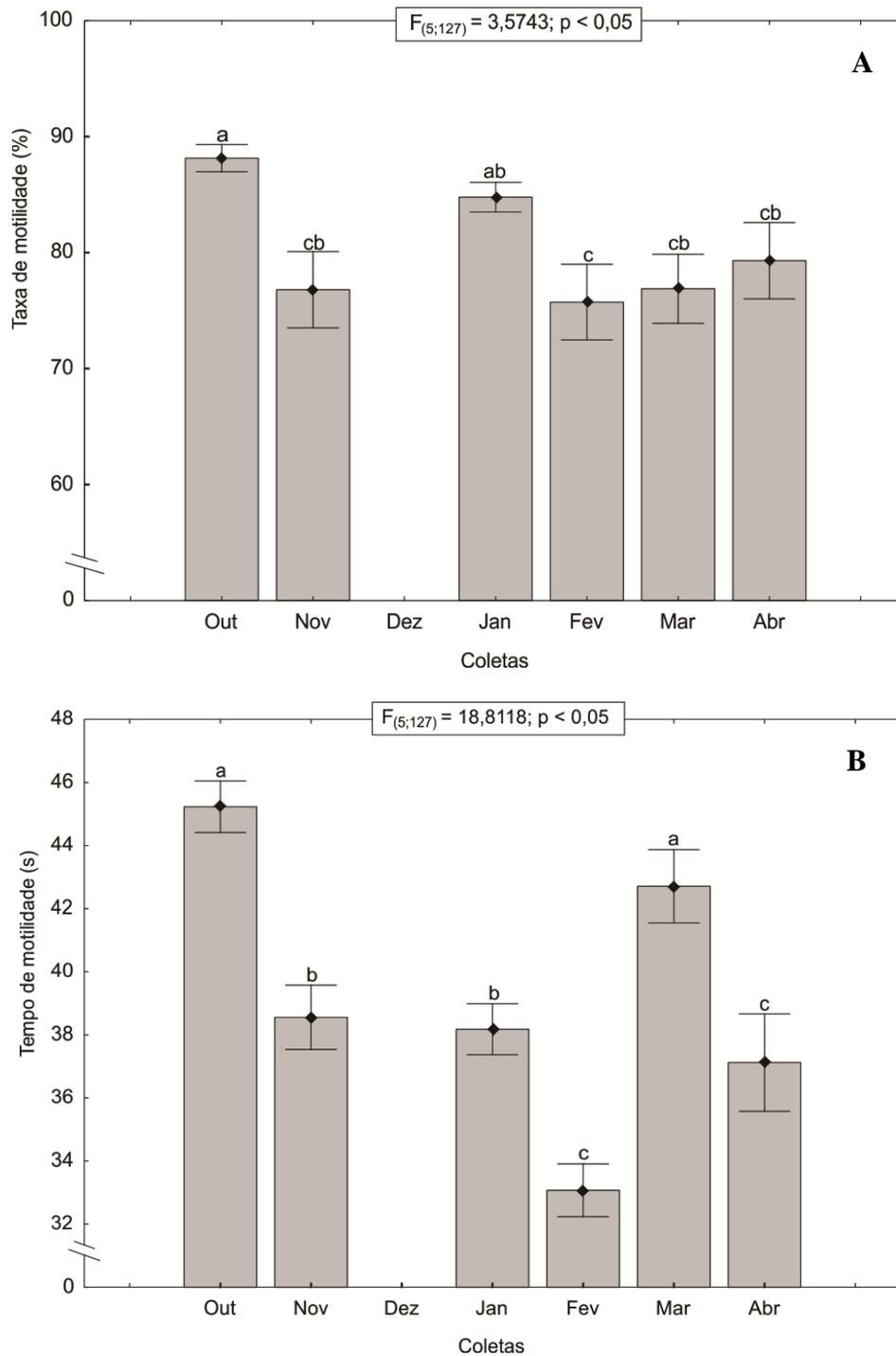


Figura 3: Variações da taxa de motilidade (A) e tempo de motilidade (B) do *S. parahybae*, observadas durante a estação reprodutiva. Valores em média \pm erro padrão. Letras diferentes indicam $p < 0,05$.

Na Figura 4 pode-se constatar que não ocorreram diferenças significativas ($P > 0,05$) nos valores médios de pH do plasma seminal do *S. parahybae* nas quatro primeiras coletas. Somente a partir da quinta coleta foram identificadas diferenças ($P < 0,05$), com o aumento gradativo desses valores no final do período de espermição. Em *R. quelen* foram

observados valores de pH de 8,0 e $8,0 \pm 0,3$, respectivamente (Mojica, 2004; Borges et al., 2005). Orfão et al. (2011) avaliaram sêmen fresco de *Brycon opalinus*, criados na mesma localidade do presente estudo, registrando valores médios de $8,3 \pm 0,1$.

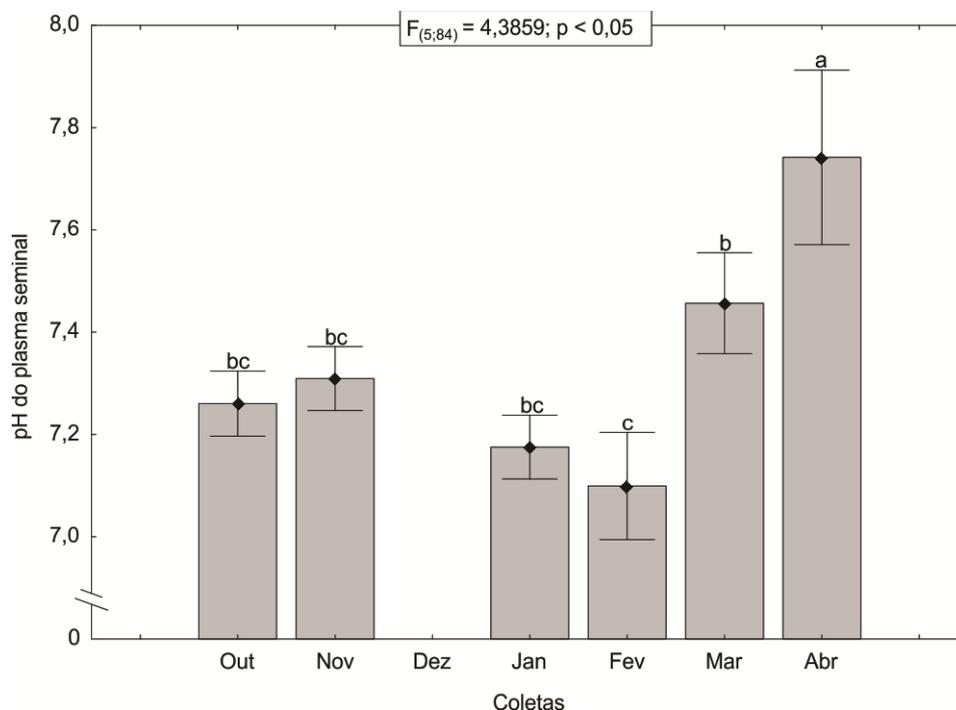


Figura 4: Variações do pH do plasma seminal do *S. parahybae*, observadas durante a estação reprodutiva. Valores em média \pm erro padrão. Letras diferentes indicam $p < 0,05$.

Os espermatozoides dos teleósteos de água doce permanecem imóveis em soluções com ou sem eletrólitos, quando a osmolaridade é isotônica ao plasma seminal. Entretanto, quando o sêmen de espécies de água doce encontra-se diluído em uma solução hiposmótica, os espermatozoides iniciam sua motilidade (Morisawa, 1994). Em teleósteos, as osmolaridades variam em torno de 300 a 350 mOsm.kg^{-1} em espécies de água doce (Morisawa e Susuki, 1980) e de 249 a 414 mOsm.kg^{-1} em espécies marinhas, podendo variar em função da família, espécie e condições em que se encontram (Alavi e Cosson, 2006).

As médias de osmolaridade do plasma seminal de *S. parahybae* não apresentaram diferenças significativas ($P > 0,05$) nas seis coletas deste estudo, com valores de $261,18 \pm 2,20 \text{ mOSM kg}^{-1}$. Para *R. quelen*, Mojica (2004) registrou valores médios de 300,66 mOsm

kg⁻¹. Na mesma espécie [Borges et al. \(2005\)](#) não verificaram diferenças de osmolaridade entre o verão e o inverno obtendo médias de $274 \pm 11,20$ mOSM kg⁻¹. Em *Brycon opalinus* [Orfão et al. \(2011\)](#) obtiveram médias de 318 mOsm.kg⁻¹, valores estes semelhantes aos observadas em sêmen fresco de outros peixes de água doce ([Viveiros e Godinho, 2009](#)).

Os valores de osmolaridade e as variações de pH do plasma seminal, registrados durante o período de espermiacão de *S. parahybae* devem contribuir no desenvolvimento de soluções visando o armazenamento a curto prazo ou a criopreservação do material fecundante, tendo em vista a necessidade do equilíbrio do pH e a isotonicidade das mesmas.

O conhecimento inédito aqui apresentado sobre a produção e características espermáticas do *S. parahybae* contribuirá para o manejo reprodutivo em cativeiro desta espécie, criticamente ameaçada, visando a sua conservação.

Conclusões

Os machos de surubim do Paraíba, nas condições desse experimento, apresentaram produção espermática contínua, porém, variável entre os meses de outubro a abril, sendo que exemplares podem ser utilizados até seis vezes durante um mesmo ciclo reprodutivo.

A indução hormonal, utilizada neste estudo, não proporcionou melhoras significativas na capacidade de produção e nas características seminais, sendo desnecessária nos trabalhos rotineiros de produção da espécie.

Agradecimentos

Somos gratos à CESP/ANEEL P&D (0061-017/2006); CNPq (478347/2009-0). Aos funcionários da Estação de Hidrobiologia e Aquicultura de Paraibuna – CESP e a Equipe do Laboratório de Tecnologia de Sêmen - Universidade Federal de Lavras – UFLA, MG, pela realização das análises de pH e osmolaridade do plasma seminal.

Referências

- Alavi, S.M.H., Cosson, J., 2006. Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: a review. *Cell Biology International*, London. 30, 1-14.
- Bastardo, H., Guedez C., Leon M., 2004. Características del semen de trucha arco-iris de diferentes edades, bajo condiciones de cultivo em Mérida, Venezuela. *Zootecnia Tropical*. 22 (3), 277-288.
- Billard, R., Cosson, J., Crim, L.W., Suquet, M., 1995. Broodstock management and seed quality-General considerations. In: Bromage, N., Roberts, R. J. (Ed.). *Broodstock management and egg larval quality*. Oxford: Blackwell Science, pp. 1-24.
- Billard, R., Cosson, M. P., 1992. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. *The Journal of Experimental Zoology*, 261, 122-131.
- Bobé, J., Labbé, C., 2010. Egg and sperm quality in fish. *General and Comparative Endocrinology*. 165, 535-548.
- Bombardelli, R.A., Mörschbacher, E.F., Campagnolo, R., Sanches, E.A., Syperreck, M.A., 2006. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824). *Revista Brasileira de Zootecnia*, 35 (4), 1251-1257.
- Borges A., Siqueira D.R., Jurinitz D.F., Zanini R., Grillo A.F., Lacerda M., Oberst E.R. e Wassermann G.F., 2005. Biochemical composition of seminal plasma and annual variations in sêmen characteristics of jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, Pimelodidae). *Fish Physiology and Biochemistry* 31, 45-53
- Caneppele, D., 2007. Peixes. Capítulo 4. in: *A Biologia e a Geografia do Vale do Paraíba: Trecho Paulista*. Ferreira, P. C. (Coord.). São José dos Campos: IEPA – Instituto Ecológico de Proteção da Natureza, pp. 91-103
- Caneppele, D., Honji, R.M., Hilsdorf, A.W.S., Moreira, R., 2009. Induced spawning of the endangered neotropical species *Steindachneridion parahybae* (Siluriforme:Pimelodidae). *Neotropical Ichthyology*, 7 (4), 759-762.
- Carneiro, P.F., Mikos, J.D., 2008. Gonadotrofina coriônica humana e hormônio liberador de gonadotrofina como indutores da reprodução do jundiá. *Acta Scientiarum, Animal Science*, 30 (3), 345-350.
- CONAMA, 2005. Resolução nº357. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento. Conselho Nacional de Meio Ambiente. MMA. <http://www.mma.gov.br/port/conama>
- Ferreira, A.A., Nunher, A.P.O., Luz, R.K., Tataje R.D.A., Esquivel J.R., Restrepo J.B., 2001. Avaliação qualitativa e quantitativa do sêmen de jundiá, *Rhamdia quelen*. *Boletim do Instituto de Pesca*, 27 (1), 57-60.
- Fogli da Silveira, W., Kavamoto, E.T., Narahara, M.Y., 1985. Avaliação da qualidade e criopreservação em forma de “pellets” do sêmen do bagre, *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840). *Boletim do Instituto de Pesca*, 12 (4), 7-11.
- Fogli da Silveira, W., Kavamoto, E.T., Cestarolli, M.A., Godinho, H.M., Ramos, S.M., Silveira, A.N., 1990. Avaliação espermática, preservação criogênica e fertilidade do sêmen do pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), proveniente de reprodução induzida. *Boletim do Instituto de Pesca*, 17, 1-13.
- Fogli da Silveira, W., Kavamoto, E.T., Rigolino, M.G., 1988. Fertilidade do sêmen de truta arco-íris, *Salmo irideus* gibbons, em diferentes concentrações de espermatozóides por óvulo. *Boletim do Instituto de Pesca, São Paulo*, 15 (1), 51-54.

- Galo, J.M., Streit Jr, D.P., Povh, J.A., Bauer L., Ribeiro, R.P., Yokoyama, M., Neumann E., 2009. Sêmen de jundiá *Leiarius marmoratus* (Gill, 1870) resfriado sem adição de solução crioprotetora 46º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, Maringá, PR, UEM.
- Garavello, J.C. 2005. Revision of genus *Steindachneridion* (Siluriformes: Pimelodidae). Neotropical Ichthyology, 3 (4), 607- 623.
- Hilbig, C.C, Bombardelli, R.A.; Sanches, E.A., 2008. Efeito do chumbo sobre a fertilização artificial e incubação de ovos de jundiá cinza (*Rhamdia quelen*). Acta Scientiarum. Animal Sciences, 30 (2), 217-224.
- Hilsdorf, A.W.S., Petrere M., 2002. Conservação de peixes na bacia do rio Paraíba do Sul. Ciência Hoje, 30, 62-65.
- Honji, R.M., Caneppele, D., Hilsdorf, A.W.S., Moreira R.G., 2009. Threatened fishes of the world: *Steindachneridion parahybae* (Steindachner, 1877) (Siluriformes: Pimelodidae). Environmental Biology of Fishes, 85, 207–208.
- Kavamoto, E.T., Ferraz, E.M., Andrade-Talmelli, E.F., Mainardes-Pinto, C.S.R., Romagosa, E., Narahara, M.Y., Barnabe, V.H., Campos, B.E.S., 1996. Estimulação da espermiacão em Curimatá *Prochilodus scrofa* (Steindachner) através da aplicação de HCG (OSTHEICHTHYES, CHARACIFORMES, PROCHILODONTIDAE). Revista Brasileira de Zoologia, 13 (1), 27-38.
- Kavamoto, E.T., Fogli da Silveira, W., 1986. Características físicas, químicas e microscópicas do sêmen do bagre, *Rhamdia hilarri* (Valenciennes, 1840) em condições de campo. Boletim do Instituto de Pesca, 13, 95-100.
- Kavamoto, E.T., Mainardes-Pinto, C.S.R., Andrade Talmelli, E.F., Campos, B.E.S., 1997. Produção espermiática do curimatá *Prochilodus scrofa*. Steindachner, 1881, Boletim do Instituto de Pesca, 24, 73-78.
- Luz, R.K., Ferreira, A.A., Reynalt-Tajate, D.A., Zaniboni-Filho, E., 2001. Avaliação qualitativa e quantitativa do sêmen do suruvi, *Steindachneridion scripta* (pimelodidae). Boletim do Instituto de Pesca, 27 (1), 39-42.
- Machado, C.E.M., Abreu H.C.F., 1952. Notas preliminares sobre a caça e a pesca no Estado de São Paulo. A pesca no Vale do Paraíba. Boletim da Indústria Animal, 13: 145-160.
- Marques, S., Godinho, H.P., 2004. Short-term Cold Storage of Sperm from Six Neotropical Characiformes Fishes. Brazilian Archives of Biology and Technology, 47 (5), 799-804.
- Mojica C.A.P., 2004. Análise ultraestrutural e avaliação do sêmen de peixes neotropicais, *Brycon orbignyanus*, *Rhamdia quelen* e *Brycon hilarii* (Pisces, Teleostei). Dissertação de mestrado, Centro de Aqüicultura da UNESP – CAUNESP, Jaboticabal, Brasil, 82 pp.
- MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA), 2008. Livro Vermelho da Fauna Ameaçada de Extinção. Angelo Barbosa Monterio Machado, Gláucia Moreira Drummond, Adriano Pereira Paglia (Eds). – 1.ed – Brasília, DF: MMA; Belo Horizonte, MG : Fundação Biodiversitas, 2008. (2). 1420 p.
- Morisawa, M., 1994. Cell signalling mechanism for sperm motility. Zoological Science., 11, 647-662.
- Morisawa, M., Suzuki, K., 1980. Osmolality and potassium ions: their roles in initiation of sperm motility in teleosts. Science , 210, 114-115.
- Oliveira, J.C., Moraes Jr, D.F., 1997. Dados adicionais à descrição de *Steindachneridion parahybae* (Steindachner, 1876) (Teleostei, Siluroidei, Pimelodidae). Boletim do Museu Nacional, 384, 1-11.
- Orfão, L.H., Nascimento, A.F., Corrêa, F.M., Cosson, J., Viveiros A.T.M., 2011. Extender composition, osmolality and cryoprotectant effects on the motility of sperm in the Brazilian endangered species *Brycon opalinus* (Characiformes). Aquaculture, 311, 241–247.

- Quinn, G.P., Keough, M.J., 2002. *Experimental Design and Data Analysis for Biologists*. Cambridge University Press, New York. 537p.
- Romagosa, E., 2006. Biologia reprodutiva e fisiologia de peixes em confinamento: o cachara *Pseudoplatystoma fasciatum* como modelo. In: *Tópicos Especiais em Biologia Aquática e Aqüicultura* (ed. By J.E.P. Cyrino & E.C. Urbinati, orgs.) 108-116. Aquabio, Jaboticabal, SP.
- Romagosa, E., Souza, B.E., Sanches, E.A., Baggio, D.M., Bombardelli, R.A., 2010. Sperm motility of *Prochilodus lineatus* in relation to dilution rate and temperature of the activating medium. *Journal Applied Ichthyology*, 26: 678–681
- Rurangwa, E., Kime, D.E., Ollevier, F., Nash, J.P., 2004. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture*, 234, 1–28.
- Sanches, E.A., Bombardelli, R.A., Baggio, D.M., Souza, B.E., 2009. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de dourado. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 38 (11), 2091-2098.
- SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE - SMA, 2009. *Fauna Ameaçada De Extinção no Estado de São Paulo: Vertebrados*. Bressan P. M., Kierulff M. C. M., Sugieda A. M.. (coord) - São Paulo: Fundação Parque Zoológico de São Paulo: SMA.
- Streit JR., D.P., Ribeiro, R.P., Moraes, G.V., Mendez, L.V., Gallo, J.M., Digmayer, M., Povh, J.A., 2006. Características qualitativas do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) após indução hormonal. *Bioscience Journal*, 22 (3): 119-125.
- Streit JR., D.P., Moraes, G.V., Ribeiro, R.P., Caçador, W.C., Sakaguti, E.S., Povh, J.A., Souza, E.D., 2003. Estudo comparativo da indução hormonal da espermiacão em piavuçu (*Leporinus macrocephalus*) com extrato de hipófise de frango, coelho e carpa. *Acta Scientiarum, Animal Sciences*, 25 (2), 261-266.
- Tiersch, T.R e Green, C.C., 2011. *Cryopreservation in Aquatic Species*. 2nd Edition. Word Aquaculture Society. Baton Rouge, USA, 2011. 1003p
- Tuset, V.M., Dietrich, G.J., Wojczak, M., Slowinska, M., Monserrat, J., Cieresko, A., 2008. Relationships between morphology, motility and fertilization capacity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Journal Applied Ichthyology*, 24, 393-397.
- Van Zutphen, L.F.M.; Baumans, V.; Beynen, A.C., 2001. *Principles of Laboratory Animal Science – A Contribution to the Humane Use and Care of Animals and to the Quality of Experimental Results*. Revised Edition, Elsevier, Amsterdam. 428p.
- Viveiros, A.T.M. e Godinho, H.P., 2009. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. *Fish Physiology and Biochemistry*, 35, 137-150.
- Wirtz, S. e Steinmann, P., 2006. Sperm characteristics in perch *Perca fluviatilis*. *Journal of Fish Biology*, 68, 1896-1902.
- Witeck, L., Bombardelli R.A., Sanches E.A., Oliveira J.D.S., Baggio D.M., Souza B.E., 2011. Motilidade espermática, fertilização dos ovócitos e eclosão dos ovos de jundiá em água contaminada por cádmio. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 40 (3), 477-481.
- Zaniboni-Filho, E., Tatage, R., Hermes-Silva, S., 2010. Cultivo de bagres do gênero *Steindacneridion*. Cap.13. *Espécies Nativas para Piscicultura no Brasil*. Baldisserotto, B. e Gomes, L.C. (org.) 2.ed.. Santa Maria, RS. Ed. da UFSM, pp. 363- 382

CAPÍTULO 2:
CORRELAÇÕES ENTRE PARÂMETROS QUALI-QUANTITATIVOS DO SÊMEN
FRESCO DE *Steindachneridion parahybae* (STEINDACHNER, 1876)
Revista Brasileira de Zootecnia, Viçosa, MG

Correlações entre parâmetros quali-quantitativos do sêmen fresco de *Steindachneridion parahybae* (Steindachner, 1876)

Danilo Caneppele^{a,b}, Eduardo Antônio Sanches^c, Elizabeth Romagosa^d

^aEstação de Hidrobiologia e Aquicultura de Paraibuna, CESP - Rod. dos Tamoios, Km 38, Bairro Rio Claro, Paraibuna, SP, BR. CP 66 - danilo.caneppele@cesp.com.br

^bPrograma de Pós-Graduação do Instituto de Pesca – APTA, SAA, São Paulo, SP, BR.

^cCentro de Aquicultura da UNESP, Jaboticabal, SP, BR

^dInstituto de Pesca – APTA, SAA, São Paulo, SP, BR.

Resumo

O objetivo foi avaliar os parâmetros espermáticos quali-quantitativos de *Steindachneridion parahybae* e suas possíveis correlações, foram analisadas 156 amostras de sêmen fresco, submetidas à análise de coeficiente de correlação de Pearson. Correlações significativas ($P < 0,05$) foram verificadas entre a porcentagem de espermatozóides normais e a taxa de motilidade (0,3470); porcentagem de espermatozóides com uma alteração morfológica e o tempo de motilidade (0,2524); taxa de motilidade e o tempo de motilidade (0,6055); taxa de motilidade e a osmolaridade do plasma seminal (0,2368); tempo de motilidade e o pH do plasma seminal (0,2706); porcentagem de espermatozóides com uma alteração morfológica e osmolaridade do plasma seminal (-0,2285); taxa de motilidade e porcentagem de alterações graves em espermatozóides com mais de duas alterações morfológicas (-0,2172); tempo de motilidade e a porcentagem de alterações graves em espermatozóides com mais de duas alterações morfológicas (-0,2337); volume relativo de sêmen e a concentração espermática (-0,3783). Sendo evidenciada a forte correlação entre a taxa e o tempo de motilidade influenciadas pelo número e a gravidade das alterações morfológicas. A osmolaridade do plasma seminal se correlacionou à taxa de motilidade e a presença de alterações morfológicas, sendo que o pH influenciou o tempo de motilidade. Também ficou evidente a relação inversa entre o volume relativo de sêmen e a concentração espermática e que o percentual de espermatozóides normais proporcionou um significativo aumento nas taxas de motilidade.

Palavras Chave: Características espermáticas, alterações morfológicas, surubim do Paraíba, machos

Abstract

In order to assess the quali-quantitative sperm parameters of *Steindachneridion parahybae* and their possible correlations, 156 samples of fresh semen were examined and submitted to analysis of the Pearson correlation coefficient. Significant correlations ($P < 0.05$) were verified between the percentage of normal spermatozoa and motility rate (0.3470); percentage of spermatozoa with one morphological change and motility time (0.2524); motility rate and motility time (0.6055); motility rate and osmolarity of the seminal plasma (0.2368); motility time and pH of the seminal plasma (0.2706); percentage of spermatozoa with one morphological change and osmolarity of the seminal plasma (-0.2285); motility rate and percentage of severe changes in spermatozoa with more than two morphological changes (-0.2172); motility time and the percentage of severe changes in spermatozoa with more than two morphological changes (-0.2337); relative volume of semen and sperm concentration (-0.3783). A strong correlation between motility rate and motility time influenced by the number and severity of the morphological changes was observed. The osmolarity of the seminal plasma correlated with motility rate and the presence of morphological changes and the pH influenced motility time. The inverse relationship between the relative volume of semen and the sperm concentration was also evident, as well as the fact that the percentage of normal spermatozoa provided a significant increase in the motility rates.

Key Words: Sperm characteristics, morphological changes, surubim do Paraíba, males

Introdução

A conservação de um determinado recurso biológico aquático exige o conhecimento de variáveis ecológicas, fisiológicas e comportamentais, importantes para definir como uma determinada espécie sobrevive e se reproduz (Hilsdorf & Petrele, 2002). Somado ao conhecimento destas variáveis, para o desenvolvimento de programas de conservação *ex situ*, é de fundamental importância o controle do processo reprodutivo, visando à produção de alevinos de qualidade para posterior introdução na natureza, porém segundo Weingartner et al. (2008) os processos envolvidos na produção em larga escala ainda não são dominados, necessitando de estudos que aumentem a sua eficiência.

A realização da investigação científica, conduzida em cativeiro com espécies ameaçadas, é imprescindível para o entendimento dos sistemas biológicos destes animais (Baldisserotto, 2002), sendo esta prática cada vez mais utilizada para o desenvolvimento da “Aqüicultura de Conservação” (Luz et al., 2001; Caneppele et al., 2009; Honji et al., 2009; Tolussi et al., 2010).

Para *Steindachneridion parahybae* a ampliação de conhecimentos sobre a sua biologia é de extrema importância, tendo em vista que, dentre as nove espécies de peixes ameaçadas na bacia do rio Paraíba do Sul, ela é a que apresenta a situação mais crítica (MMA, 2008), sendo considerada regionalmente extinta no estado de São Paulo (SMA, 2009).

Um dos principais aspectos para a intensificação de uma produção piscícola sustentável, passa pela utilização da propagação artificial ou reprodução induzida (Romagosa, 2006). Nesse sentido, para a promoção da máxima fertilização e subsequentemente desenvolvimento normal do embrião devem ser utilizados gametas masculinos e femininos de qualidade (Bobe & Labbé, 2010; Tierch & Green, 2011). Os espermatozoides podem ser avaliados por meio de características relacionadas às taxas de fertilização (Fogli da Silveira et al., 1988; Tuset et al., 2008; Galo et al., 2009).

A qualidade do sêmen pode ser avaliada por parâmetros como a motilidade espermática progressiva, o vigor espermático, pH, a concentração de espermatozoides e morfologia espermática. Dentre estes, a motilidade espermática é um fator preponderante para qualidade do sêmen (Cosson et al., 1999; Tierch & Green, 2011), sendo influenciada pela presença de alterações morfológicas nas células espermáticas, podendo provocar a redução nas taxas de fertilização (Galo et al, 2009; Cosson, 2010).

Raras são as investigações sobre as correlações entre os parâmetros espermáticos, sendo que quando observadas, normalmente estão relacionadas ao volume, concentração e taxas de fertilização (Viveiros & Godinho, 2009; Orfão et al, 2011).

Neste sentido objetivou-se no presente estudo avaliar os parâmetros quali-quantitativas do sêmen fresco de *Steindachneridion parahybae*, e suas possíveis correlações.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido entre os meses de outubro de 2009 e abril de 2010, na Estação de Hidrobiologia e Aquicultura de Paraibuna (S 23°24.888' W 45°35.991' e altitude 640 m), pertencente a Companhia Energética de São Paulo – CESP, localizada no município de Paraibuna – SP/BR.

Para o início do estudo, 26 exemplares machos foram selecionados de um lote de *S. parahybae*, produzido em dezembro de 2003 a partir de reprodutores selvagens (Caneppele et al., 2009). A constatação da liberação de sêmen após leve pressão da cavidade abdominal foi utilizada na confirmação de que os exemplares se encontravam maduros.

Os exemplares foram pesados individualmente, marcados eletronicamente e estocados em dois tanques de 10 m³ (2x5x1m), ficando cada um com 13 animais, mantidos sob as mesmas condições de alimentação e manejo.

Durante o período experimental, foram submetidos a seis coletas de sêmen, realizadas através de massagem na cavidade abdominal do peixe no sentido encéfalo-caudal, em tubos de ensaio graduados (0,1 mL). Um dos grupos foi submetido à indução hormonal com Extrato de Pituitária de Carpa (EPC - 3,0 mg kg⁻¹) e o outro não foi submetido à indução. A manipulação foi realizada de acordo com os princípios éticos estabelecidos por Van Zetphen et al. (2001). Porém, para a realização deste estudo os 26 exemplares estudados foram considerados como um único grupo.

Os valores de pH, oxigênio dissolvido (mg L^{-1}) e temperatura da água ($^{\circ}\text{C}$) foram registrados três vezes por semana nos tanques dos dois grupos, com a utilização de um Multianalizador marca Horiba mod. U50, Japão.

O volume de sêmen coletado (mL) foi medido por observação direta em tubos de ensaios graduados e o volume relativo (mL kg^{-1}), calculado em função dos pesos dos exemplares registrados a cada coleta. Cada amostra foi mantida em caixas de isopor contendo gelo (Marques & Godinho, 2004).

Antes do início das análises, as amostras foram avaliadas em relação à coloração e pré-ativação, sendo descartadas as amostras contaminadas por urina, sangue ou água (Tiersch & Green, 2011).

Os parâmetros avaliados foram a motilidade espermática (%), o tempo de duração da motilidade (s), a concentração espermática (sptz mL^{-1}), osmolaridade (mOSM Kg^{-1}), pH do plasma seminal e avaliação de alterações morfológicas.

A motilidade espermática (%) foi obtida por meio de análise subjetiva dos movimentos progressivos em intervalos de incremento de 5 em 5%. O tempo de duração da motilidade (s) foi realizado considerando-se quando 50% dos espermatozóides pararam de se movimentar conforme descrito por Sanches et al. (2009) e Romagosa et al. (2010). Para a mensuração foram utilizados $5 \mu\text{L}$ de sêmen, diluídos em $200 \mu\text{L}$ de solução ativadora (água dos tanques), obtendo uma diluição sêmen:água de 0,025, sendo utilizados $5 \mu\text{L}$ da solução resultante para a avaliação em um microscópio de luz ZEISS – Jenamed 2 - Germany (200 x). Para cada amostra de sêmen as análises foram realizadas em triplicata (Sanches et al., 2009).

Para a mensuração da concentração espermática (sptz mL^{-1}), $10 \mu\text{L}$ de sêmen de cada amostra foram adicionados a $3000 \mu\text{L}$ de formol salino tamponado, resultando em

uma diluição de 1:300. A contagem de células espermáticas foi realizada em câmara hematómica de Neubauer (400x) (Wirtz & Steinmann, 2006; Sanches et al., 2011).

Da mesma diluição utilizada para concentração espermática retirou-se uma alíquota de 500 µL na qual se adicionou 10 µL do corante Rosa de Bengala. Após leve agitação, retirou-se uma gotícula de 10 µL que foi adicionada sobre uma lâmina de vidro deixando-a escorrer e secar ao ar livre. Após a secagem, avaliou-se um número mínimo de 200 espermatozoides de cada exemplar em microscópio de luz ZEISS – Jenamed 2 - Germany (500 x). Os espermatozoides normais ou com a presença de alterações morfológicas (defeituosos) foram classificados seguindo a sequência apresentada na figura 1.

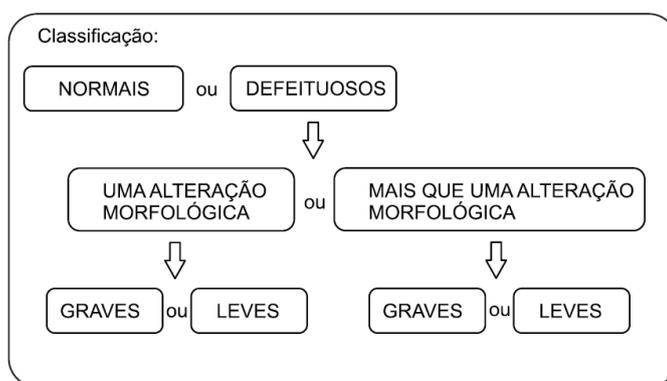


Figura 1. Sequência de classificação dos espermatozoides.

A classificação das alterações morfológicas dos espermatozoides foi adaptada de Streit Jr et al. (2006), sendo que as consideradas graves foram: cauda quebrada, enrolada, degenerada, curta, abaxial, bifurcada, trifurcada e corrugada, duas caudas, duas cabeças, cabeça delgada, requitiforme e periforme, microcefalia, macrocefalia e edema de colo. As alterações morfológicas consideradas leves foram: cauda dobrada nas porções inicial ou final, gota proximal ou distal, cabeça ou cauda solta.

Amostras de sêmen com volumes acima de 1,5 mL foram submetidas a centrifugação por 30 minutos a 50 Hertz, para obtenção do plasma seminal, que foi armazenado em criotubos e congelado em nitrogênio líquido. O pH e a osmolaridade destas amostras foram posteriormente mensuradas no Laboratório de Tecnologia de Sêmen

- Universidade Federal de Lavras – UFLA, MG (pHmetro digimed – DM22 e osmômetro semimicro osmometer K7400 – Knauer).

Os resultados obtidos foram submetidos a análise de estatística descritiva e posteriormente de correlação linear de Pearson ao nível de 5% de significância. O *software* utilizado para as análises foi o Statistica 7.0[®] (Statsoft, 2005).

Resultados e Discussão

Os valores médios verificados para o peso total, características quantitativas e qualitativas do sêmen fresco, osmolaridade e pH do plasma seminal de *S. parahybae* estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 1

Valores médios do peso total, parâmetros quali-quantitativos do sêmen fresco, osmolaridade e pH do plasma seminal de *S. parahybae*.

Parâmetros	n	Média	D P	Mínimo	Máximo
PESO	156	501,06	119,18	270,00	965,00
EN	133	66,95	13,44	20,00	86,89
UAM	133	92,82	5,84	71,28	100,00
GUAM	133	34,96	16,38	6,20	90,74
DAM	133	7,18	5,84	0,00	28,72
GDAM	126	69,33	16,78	50,00	100,00
VREL	150	9,63	9,60	0,00	60,67
%MOT	134	80,41	13,95	36,67	100,00
TMOT	134	39,35	6,35	25,93	54,31
CSPZ ($\times 10^9$)	134	9,00	6,10	0,95	37,76
OSM	91	261,20	21,02	204,00	325,00
pH	91	7,28	0,36	6,67	8,31

PESO (g); EN – Espermatozóides normais (%); UAM – Espermatozóides com uma alteração morfológica (%); GUAM – Alterações graves em espermatozóides com uma alteração morfológica (%); DAM – Espermatozóides com mais de uma alteração morfológica (%); GDAM - Alterações graves em espermatozóides com mais de uma alteração morfológica (%); VREL – Volume relativo de sêmen (ml Kg^{-1}); %MOT – Taxa de motilidade (%); TMOT – Tempo de motilidade (s); CSPZ – Concentração espermática (espermatozóides ml^{-1}); OSM – Osmolaridade do plasma seminal (mOSM Kg^{-1}); pH – pH do plasma seminal.

Os valores médios dos parâmetros avaliados durante este estudo estão na sua maioria dentro dos esperados para espécies tropicais (Viveiros e Godinho, 2009). Porém a

porcentagem média de espermatozóides que apresentaram alterações morfológicas é bastante expressiva.

Conforme [Kavamoto et al. \(1999\)](#), o estudo morfológico das células espermáticas e sua relação com a infertilidade dos machos alcançaram maior importância com o advento da inseminação artificial em mamíferos, especialmente na espécie bovina. Assim, foram realizadas pesquisas a fim de se evitar a expansão de doenças decorrentes de anormalidades espermáticas, responsáveis pelo baixo índice de fertilidade ([Blom, 1973](#) ; [Barth & Oko, 1989](#)).

O Colégio Brasileiro de Reprodução Animal recomenda não utilizar, na inseminação artificial, sêmen com índices de espermatozóides com anormalidade acima de 30%, em bovinos e eqüinos, e de 20%, em ovinos e suínos ([CBRA, 1998](#)). No entanto, para espécies icticas ainda não estão definidos tais limites.

[Kavamoto et al. \(1999\)](#) estudando alterações morfológicas presentes no sêmen de *Prochilodus lineatus* após indução hormonal com Hormônio da Gonadotrofina Coriônica (HCG) observaram médias de 9,54% de espermatozóides com alterações morfológicas. No entanto, [Moraes et al. \(2004\)](#) comparando o efeito de indução hormonal com diferentes extratos de hipófise (carpa, frango e coelho) na morfologia espermática de *Leporinus macrocephalus*, *Prochilodus lineatus* e *Cyprinus carpio*, obtiveram médias que variaram entre 68,8 a 35,8% de espermatozóides com alterações morfológicas. Da mesma forma [Streit Jr et al. \(2006\)](#) avaliando o efeito da indução hormonal com EPC na morfologia espermática de *Piaractus mesopotamicus* verificaram médias de 41,8% para os exemplares induzidos e de 37,4% para os não induzidos, sem diferenças significativas entre os tratamentos.

Do valor médio de 33,05% de espermatozóides com alterações morfológicas obtido para *S. parahybae* no presente estudo, destaca-se que 92,82% do total apresentavam apenas

uma alteração, sendo que destas 34,96% foram classificadas como graves. Já nos espermatozoides que apresentaram mais de uma alteração morfológica (7,18%) a porcentagem de alterações classificadas como graves sobe para 69,33%. Segundo [Bart & Oko \(1989\)](#) em mamíferos as alterações morfológicas primárias (graves) originan-se, dentre outros fatores, de idade avançada, de doenças infecciosas ou genéticas, da consanguinidade e do estresse dos reprodutores. Para *S. parahybae*, a pressão ambiental exercida sobre as suas populações naturais podem ter influenciado a fisiologia destes animais refletindo na qualidade espermática da espécie.

Na Tabela 2 são apresentadas as correlações de Pearson entre os parâmetros avaliados, sendo sublinhadas as significativas ao nível de confiança de 95%.

Tabela 2

Coefficientes de correlações lineares de Pearson entre peso e as características seminais de *S. parahybae*.

	PESO	EN	UAM	GUAM	GDAM	VREL	%MOT	TMOT	CSPZ	OSM	pH
PESO	1,0000										
EN	-0,0584	1,0000									
UAM	0,0407	0,0029	1,0000								
GUAM	0,0140	0,0332	0,0295	1,0000							
GDAM	0,0676	-0,1009	-0,2087	-0,0828	1,0000						
VREL	-0,1366	-0,0277	0,0261	-0,0317	0,0313	1,0000					
%MOT	0,1288	<u>0,3470</u>	0,1664	-0,0324	<u>-0,2172</u>	0,0742	1,0000				
TMOT	0,0106	0,1431	<u>0,2524</u>	0,0733	<u>-0,2337</u>	0,1303	<u>0,6055</u>	1,0000			
CSPZ	-0,1092	0,0671	0,0570	0,1946	-0,1046	<u>-0,3783</u>	0,1031	0,0382	1,0000		
OSM	-0,0119	0,0153	<u>-0,2285</u>	0,1087	-0,1568	0,0580	<u>0,2368</u>	0,0870	0,1493	1,0000	
pH	0,0090	0,0716	0,1071	0,0216	-0,0074	-0,1675	0,0579	<u>0,2706</u>	-0,0759	0,0638	1,0000

P < 0,05.

PESO – peso dos reprodutores (g); EN – Espermatozoides normais (%); UAM – Espermatozoides com uma alteração morfológica (%); GUAM – Alterações graves em espermatozoides com uma alteração morfológica (%); GDAM - Alterações graves em espermatozoides com mais de uma alteração morfológica (%); VREL – Volume relativo de sêmen (ml Kg⁻¹); %MOT – Taxa de motilidade (%); TMOT – Tempo de motilidade (s); CSPZ – Concentração espermática (espermatozoides ml⁻¹); OSM – Osmolaridade do plasma seminal (mOSM Kg⁻¹); pH – pH do plasma seminal.

Os valores do peso, verificados nos exemplares avaliados, não apresentaram correlação significativa (P>0,05) com nenhum dos demais parâmetros espermáticos investigados.

Para bovinos correlações positivas entre o peso dos animais e a motilidade espermática volume ejaculado e idade dos animais foram observadas por [Salvador et al. \(2008\)](#), no presente estudo estas correlações não foram identificadas possivelmente por se tratar de um lote único de reprodutores de mesma idade e pouca variação deste parâmetro.

Entre os parâmetros qualitativos, número (uma ou duas) e tipo (leves ou graves) de alterações morfológicas, também não foram observadas correlações significativas ($P > 0,05$) (Tabela 2), mostrando que as alterações morfológicas provavelmente estejam relacionadas com outros fatores intrínsecos ou ambientais. Para [Bromage \(1995\)](#), dentre outros fatores, a qualidade da alimentação dos reprodutores, condições ambientais, estresse causado na captura, manejo de indução, características genéticas e o estágio de maturação podem influenciar os índices reprodutivos, sendo que conforme [Romagosa \(2008\)](#) salienta, o desenvolvimento gonadal é governado pelo balanço dos fatores genéticos e ambientais.

O volume relativo de sêmen e a concentração espermática apresentaram correlação negativa (**- 0,3783**), sendo inversamente influenciados, entretanto, com relação aos demais parâmetros avaliados não foram observadas outras correlações significativas com o volume relativo e a concentração espermática da espécie (Tabela 2). Esses resultados sugerem que, quanto maior a liberação de sêmen dos exemplares de *S. parahybae*, menor será a concentração espermática. Além disso, no decorrer do experimento foi observado subjetivamente que a coloração também é um aspecto importante com relação ao volume e a concentração, pois quanto mais branco o aspecto do sêmen, menor o volume e maior a sua concentração espermática, sendo que quando os volumes eram maiores e as concentrações menores o sêmen se apresentava mais transparente.

Estes resultados podem ser aplicados na prática em laboratórios de reprodução, onde na maioria das vezes a mensuração da concentração espermática não é realizada por falta de equipamentos e/ou mão de obra qualificada ([Sanchez et al., 2011](#)), além disso,

constitui indicativo para o estabelecimento da dose inseminante adequada para a espécie nas rotinas de indução (Bombardelli et al., 2006; Sanches et al., 2009)

Orfão et al. (2011) também observaram correlação negativa entre o volume e concentração espermática em *Brycon opalinus*. A relação entre a concentração espermática e o volume de sêmen é frequentemente relatada em peixes quando comparados antes e após tratamento hormonal, pois o hormônio normalmente estimula a produção de fluido seminal, provocando a diluição do sêmen (Viveiros & Godinho, 2009).

A taxa de motilidade apresentou correlação positiva (**0,6055**) com o tempo de motilidade, significando uma maior duração da motilidade quando verificadas taxas de motilidade mais elevadas. Para Stoss (1983) e Cosson et al. (1999), o tempo de vida dos espermatozóides, apresenta variação entre as espécies de peixes e coincide, geralmente, com o período de fertilização dos ovócitos. Porém, a correlação encontrada entre estes parâmetros nesse estudo, sugere que outros fatores como as diferentes reservas de energia (ATP) nas células espermáticas, problemas na morfologia dos espermatozóides e ou modificações provocadas pelo estresse químico, podem estar atuando sobre as taxas de motilidade e o tempo de motilidade de maneira similar. Conforme salienta Cosson (2010) a duração da motilidade dos espermatozóides de peixes também é limitada por danos que aparecem durante a ativação, resultantes de defeitos de membrana, gerados pelo estresse osmótico, provocando o surgimento de bolhas citoplasmáticas que emergem em diferentes lugares ao longo do comprimento flagelar ou um processo de “curling” (enrolamento) desenvolvido na ponta do flagelo, o que obviamente reduz, em parte, a eficiência na propagação das ondas ao longo do flagelo. Tal observação deve afetar não apenas o tempo de duração mas também as taxas de motilidade, podendo sugerir uma explicação para a forte correlação verificada no presente estudo.

Outro parâmetro que apresentou correlação positiva com o tempo de motilidade (s) foi o pH do plasma seminal (**0,2706**), indicando que quanto maior o pH do plasma maior foi o tempo em que os espermatozóides permaneceram móveis. Neste sentido, já foram verificadas que condições alcalinas podem aumentar a percentagem de células móveis e a capacidade de fertilização dos espermatozóides de salmonídeos (Billard, 1981), influenciando o comportamento da motilidade (Boitano & Omoto, 1992).

A osmolaridade do plasma seminal apresentou correlação positiva com as taxas de motilidade (**0,2368**), e negativa com o percentual de espermatozóides que apresentaram uma alteração morfológica (**-0,2285**). Porém, Babiak et al. (2006) relacionaram a degeneração dos espermatozóides de *Hippoglossus hippoglossus* (espécie marinha) com o aumento da osmolaridade do plasma seminal. Entretanto em espécies de água doce este efeito pode ser inverso, conforme observado nesse estudo, o que deverá ser investigado em outras espécies, buscando indicativos da viabilidade do sêmen.

O aumento do percentual de alterações morfológicas graves em espermatozóides com mais de uma alteração se correlacionou negativamente com o tempo e taxa de motilidade **-0,2337** e **-0,2172**, respectivamente, tendo sido verificada correlação positiva entre o percentual de espermatozóides normais e as taxas de motilidade (**0,3470**). Tais resultados são corroborados por Cosson et al., (1999) que consideraram as anormalidades morfológicas das células espermáticas como responsáveis pela diminuição na motilidade espermática, provocando a redução nos valores das taxas de fertilização.

Os resultados apresentados demonstram indicativos relacionados à perda de viabilidade espermática, porém, outros estudos deverão ser realizados com o intuito de verificar os efeitos destes parâmetros sobre a capacidade de fertilização de ovócitos de *S. parahybae*.

Conclusões

Para *S. parahybae*, sob as condições experimentais, o tempo de motilidade apresentou correlação positiva com a taxa de motilidade. Esses parâmetros foram influenciados negativamente pelo número e gravidade das alterações morfológicas presentes nos espermatozóides, sendo que o aumento na porcentagem de espermatozóides normais proporciona uma significativa elevação nas taxas de motilidade. Também foi evidenciada a relação inversa entre o volume relativo de sêmen e a concentração espermática.

Agradecimentos

Somos gratos à CESP/ANEEL P&D (0061-017/2006); CNPq (478347/2009-0). Aos funcionários da Estação de Hidrobiologia e Aquicultura de Paraibuna – CESP e a Equipe do Laboratório de Tecnologia de Sêmen - Universidade Federal de Lavras – UFLA, MG, pela realização das análises de pH e osmolaridade do plasma seminal.

Referências

- BABIAK, I.; OTTESEN, O.; RUDOLFSEN, G. et al. Quantitative characteristics of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*, semen throughout the reproductive season. **Theriogenology**, v.65, p.1587-1604, 2006.
- BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de Peixes Aplicada a Piscicultura**. Santa Maria: Ed. UFSM, 2002. 212p.
- BARTH, A.D.; OKO, R.J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames, Iowa State University Press, 1989. 285 p.
- BILLARD, R. Short-term preservation of sperm under oxygen atmosphere in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. **Aquaculture**, v.23, p.287–293, 1981.
- BLOM, E. Ultrastrukturen af nogle spermiedefekter of for slag til et nyt klassificerings-system for tyrens spermogram. The ultrastructure of some characteristic sperm defect and a proposal for a new classification of bull spermogram. **Nordisk Veterinaer Medicin.**, v.25, n.7-8, p.383-391, 1973.
- BOBE, J.; LABBÉ, C. Egg and sperm quality in fish. **General and Comparative Endocrinology**, v.165, p.535-548, 2010.
- BOITANO, S.; OMOTO, C.K. Trout sperm swimming patterns of role of intracellular Ca²⁺. **Cell Motility and the Cytoskeleton** v.21, p.74–82, 1992.

BOMBARDELLI, R.A.; MÖRSCHBÄCHER, E.F.; CAMPAGNOLO, R. et al. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.4, p.1251-1257, 2006.

BROMAGE, N. Broodstock management and seed quality. General considerations. In: BROMAGE, N.; ROBERTS, R.J. (Ed.). **Broodstock management and egg larval quality**. Oxford: Blackwell Science, 1995. p.1-24.

CANEPPELE, D.; HONJI, R.M.; HILSDORF, A.W.S. et al. Induced spawning of the endangered neotropical species *Steindachneridion parahybae* (Siluriforme: Pimelodidae). **Neotropical Ichthyology**, v.7 n.4, p.759-762, 2009.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL – CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal**. 2. ed. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1998. 49p.

COSSON J. Frenetic activation of fish spermatozoa flagella entails short-term motility, portending their precocious decadence. **Journal of Fish Biology**, v.76, p.240-279, 2010.

COSSON, J.; BILLARD, R.; CIBERT, C. et al. Regulation of axonemal wave parameters of fish spermatozoa by ionic factors. In: GAGNON, C. (Ed): **The male gamete: from basic knowledge to clinical applications**. Paris: Cache River, 1999. p. 161-186.

FOGLI DA SILVEIRA, W.; KAVAMOTO, E.T.; RIGOLINO, M.G. Fertilidade do sêmen de truta arco-íris, *Salmo irideus gibbons*, em diferentes concentrações de espermatozoides por óvulo. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v.15, n.1, p.51-54, 1988.

GALO, J. M.; STREIT, JR D.P.; POVH, J.A. et al. Sêmen de jundiá *Leiarius marmoratus* (Gill, 1870) resfriado sem adição de solução crioprotetora **46º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Maringá, PR, UEM, 2009.

HILSDORF, A.W.S.; PETRERE M. Conservação de peixes na bacia do rio Paraíba do Sul. **Ciência Hoje**, v.30, p.62-65, 2002.

HONJI, R.M.; CANEPPELE, D.; HILSDORF, A.W.S. et al. Threatened fishes of the world: *Steindachneridion parahybae* (Steindachner, 1877) (Siluriformes: Pimelodidae). **Environmental Biology of Fishes**, v.85, p.207-208, 2009.

KAVAMOTO, E.T.; BARNABE, V.H.; CAMPOS, B.E.S. et al. Anormalidades morfológicas nos espermatozoides do curimatá, *Prochilodus lineatus* (Steindachner, 1881) (Osteichthyes, Characiformes, Prochilodontidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v.25, p.61-66, 1999.

LUZ, R.K.; FERREIRA, A.A.; REYNALT, D.A.T et al. Avaliação qualitativa e quantitativa do sêmen do suruvi, *Steindachneridion scripta* (Pimelodidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, v.27, n.1, p.39-42, 2001.

MARQUES, S.; GODINHO, H.P.. Short-term Cold Storage of Sperm from Six Neotropical Characiformes Fishes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.47, n.5, p.799-804, 2004.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE - MMA. **Livro Vermelho da Fauna Ameaçada de Extinção**. MACHADO, A.B.M., DRUMMOND, G. M., PAGLIA, A.P. (Ed). – 1.ed – Brasília, DF: MMA; Belo Horizonte, MG : Fundação Biodiversitas, 2008. (Vol.2). 1420 p.

MORAES G.V. de; STREIT JR. D.P.; RIBEIRO R.P. et al. Ação de diferentes indutores reprodutivos hormonais no aparecimento de anormalidades morfológicas em espermatozoides de Piavuçu (*Leporinus macrocephalus*), Curimbatá (*Prochilodus lineatus*) e Carpa Comum (*Cyprinus carpio*). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v.30, n.2, p.109-116, 2004.

ORFÃO, L.H.; NASCIMENTO, A.F.; CORRÊA, F.M. et al. Extender composition, osmolality and cryoprotectant effects on the motility of sperm in the Brazilian endangered species *Brycon opalinus* (Characiformes). **Aquaculture**, v.311, p.241–247, 2011.

QUINN, G.P.; KEOUGH, M.J. **Experimental Design and Data Analysis for Biologists**. Cambridge University Press, New York, 2002. 537p.

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

ROMAGOSA, E. Avanços na reprodução de peixes migradores. In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI E.C. (Ed) **Tópicos Especiais em Biologia Aquática e Aqüicultura**. Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, Jaboticabal, SP, 2008. p.1-16.

ROMAGOSA, E., SOUZA, B.E., SANCHES, E.A. et al Sperm motility of *Prochilodus lineatus* in relation to dilution rate and temperature of the activating medium. **Journal Applied Ichthyology**, v.26, p.678–681, 2010.

SALVADOR, D.F.; ANDRADE V.J.; VALE FILHO V.R. et al. Associação entre o perfil andrológico e a congelamento de sêmen de touros da raça Nelore aos dois anos de idade, pré-selecionados pela classificação andrológica por pontos (CAP) **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.**, v.60, n.3, p.587-593, 2008.

SANCHES, E. A., BOMBARDELLI, R. A., BAGGIO, D. M. et al. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de dourado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.11, p.2091-2098, 2009.

SANCHES, E.A., MARCOS R.M., BAGGIO D.M. et al. Estimativa da concentração espermática do sêmen de peixe pelo método de espermátocrito. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, n.6, p.1163-1167, 2011.

SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE - SMA. **Fauna Ameaçada De Extinção no Estado de São Paulo: Vertebrados**. BRESSAN P.M.; KIERULFF M.C.M.; SUGIEDA A.M. (Coord.). Fundação Parque Zoológico de São Paulo: SMA. São Paulo, SP, 2009. 645p

STOSS, J. Fish gamete preservation and spermatozoan physiology. In: HOAR, W.S.; RANDALL, D.J.; DONALDSON, E.M.. (Ed). **Fish physiology**. Orlando: Academic, 1983, p. 305-350.

STREIT JR., D.P.; RIBEIRO, R.P.; MORAES, G.V. et al. Características qualitativas do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) após indução hormonal. **Bioscience Journal**, v.22, n.3, p.119-125, 2006.

TIERSCH, T.R & GREEN, C.C. **Cryopreservation in Aquatic Species**. 2nd Edition. Word Aquaculture Society. Baton Rouge, USA, 2011. 1003p.

TOLUSSI, C.E.; HILSDORF, A.W.S.; CANEPPELE, D. et al.. The effects of stocking density in physiological parameters and growth of the endangered teleost species piabanha, *Brycon insignis* (Steindachner, 1877). **Aquaculture**, v.310, p.221–228, 2010.

TUSET, V.M.; DIETRICH, G.J.; WOJCZAK, M. et al. Relationships between morphology, motility and fertilization capacity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. **Journal Applied Ichthyology**, v.24, p.393-397, 2008.

VAN ZUTPHEN, L.F.M.; BAUMANS, V.; BEYNEN, A.C. **Principles of Laboratory Animal Science** – A Contribution to the humane use and care of animals and to the quality of experimental results. Revised edition, Elsevier, Amsterdam, 2001.428p.

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

WEINGARTNER, M; FRACALOSSO, D.M; BEUX, L.F. et al. Desenvolvimento de tecnologia de cultivo para peixes nativos do Alto Rio Uruguai. in: ZANIBONI-FILHO, E.; NUÑER, A.P.O. (Ed): **Reservatório de Itá: Estudos Ambientais, Desenvolvimento de Tecnologia de Cultivo e Conservação da Ictiofauna**. Editora UFSC, Florianópolis, SC , 2008. p 257 a 306.

WIRTZ, S.; STEINMANN, P. Sperm characteristics in perch *Perca fluviatilis*. **Journal of Fish Biology**, 68, 1896-1902, 2006.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Levando-se em conta o avanço tecnológico do método computacional cada vez mais presente na caracterização espermática de peixes no Brasil, sugerimos que os resultados aqui apresentados sejam corroborados futuramente através desta técnica. Outro fator imprescindível, para a utilização plena dos conhecimentos obtidos durante a realização deste estudo, principalmente no que tange à produção de sêmen ao longo do ciclo reprodutivo, é o estabelecimento de experimentos de fertilização, para verificação de correlações entre os parâmetros analisados e o efetivo cumprimento das funções dos gametas masculinos, como altas taxas de fecundação e produção de larvas de qualidade, contribuindo para a conservação de *Steindachneridion parahybae*.