**Ativação espermática e fertilização dos ovocitos DE *Rhandia quelen* EM SOLUÇÕES CONTENDOBICARBOANTO DE SÓDIO**

**Ahiana Cássia de Oliveira Pedreira¹\*; Giovano Neumann²; Jeferson Machado Vargas³; Tais Voelkl Chagas³; Robie Allan Bombardelli¹.**

[1oliveira.ahiana@hotmail.com](mailto:1oliveira.ahiana@hotmail.com). Doutoranda em Recursos Pesqueiros e Eng. de Pesca/Unioeste.

²[giovanoneumann@hotmail.com](mailto:giovanoneumann@hotmail.com). Doutorando em Recursos Pesqueiros e Eng. de Pesca/Unioeste.

³[jefferson\_mvargas@hotmail.com](mailto:jefferson_mvargas@hotmail.com). Graduando em Eng. de Pesca/ Unioeste.

³[tais\_voelkl@hotmail.com](mailto:tais_voelkl@hotmail.com). Graduanda em Eng. de Pesca/ Unioeste.

[1rabombardelli@gmail.com](mailto:1rabombardelli@gmail.com). Prof. Dr. no Programa de Recursos Pesqueiros e Eng. de Pesca/ Unioeste.

**RESUMO**

Este trabalho avaliou os efeitos de diferentes concentrações de Bicarbonato de sódio na solução ativadora, sobre a motilidade espermática em sêmen descongelado e sobre a fertilização dos ovócitos de *Rhamdia quelen*. Foram utilizados 24 machos e quatro fêmeas manipulados hormonalmente. As amostradas de sêmen foram criopreservadas, descongeladas e ativadas em cinco diferentes concentrações de Bicarbonato de sódio (0%, 0,20%, 0,40%, 0,60%, 0,80% e 1,00%). O movimento espermático foi mensurado pelo *plugin* CASA em *software* livre, a cada dois segundos, entre o 12o e o 70o segundo após o início da ativação. Nos ensaios de fertilização, foram utilizados 2mL de ovócitos (2.026±4,93 ovócitos), misturados ao sêmen descongelado, disponibilizando 70.000 espermatozóides móveis:ovócito. As taxas de fertilização dos ovócitos foram mensuradas pela amostragem de 300 ovos de cada unidade experimental. O resultado de movimento espermático foi submetido à analise se regressão múltipla pelo modelo de superfície de resposta. Em caso de efeito das concentrações de bicarbonato de sódio, os resultados foram plotado em gráficos 3D e adicionadas as linhas de máximo desempenho. Os resultados de fertilização foram submetidos ao protocolo de análise variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey. A motilidade e a velocidade espermática foram influenciadas de forma interativa (p<0,05) pelos níveis de bicarbonato de sódio presente nas soluções ativadoras e pelo tempo decorrido após o início da ativação espermática (mot=28,30+5,32x-0,44x2-0,81y+0,002y2+0,02xy r2=0,69 p<0,01), (VE=50,64+5,34x-0,35x2-1,54y+0,007y2 +0,06xy r2=0,79 p<0,01) respectivamente. O movimento espermático (24,06±5,71%; 38,98±3,33μm/s) foi maximizado quando empregado ativadores contendo 1% de bicarbonato de sódio, porém na fertilização não resultou efeito. O movimento espermático no sêmen descongelado de jundiá (*Rhamdia quelen)* pode ser otimizado quando empregada soluções ativadoras compostas por 1% de bicarbonato de sódio e agua destilada, porém na fertilização não houve efeito.

**Palavras-chave:** CASA,criopreservação, gametas, solução iônica, movimento espermático.

**ABSTRAT**

This work evaluated the effects of different concentrations of sodium bicarbonate on the activating solution, on sperm motility in thawed semen and on the fertilization of oocytes of Rhamdia quelen. Twenty-four males and four females were hormonally manipulated. Samples of semen were cryopreserved, thawed and activated at five different concentrations of sodium bicarbonate (0%, 0.20%, 0.40%, 0.60%, 0.80% and 1.00%). The spermatic movement was measured by the CASA plugin in free software, every two seconds, between the 12th and the 70th second after activation. In the fertilization tests, 2mL of oocytes (2,026 ± 4,93 oocytes) were used, mixed with thawed semen, providing 70,000 mobile spermatozoa: oocyte. Oocyte fertilization rates were measured by sampling 300 eggs from each experimental unit. The spermatic motion result was analyzed for multiple regression by the response surface model. In case of effect of sodium bicarbonate concentrations, the results were plotted in 3D graphs and added the lines of maximum performance. The fertilization results were submitted to the analysis protocol of variance (ANOVA), followed by the Tukey test. Motility and sperm velocity were influenced interactively (p <0.05) by the levels of sodium bicarbonate present in the activating solutions and by the time elapsed after the beginning of sperm activation (mot = 28,30 + 5,32x-0 , 44x2-0.81y + 0.002y2 + 0.02x and r2 = 0.69 p <0.01), (VE = 50.64 + 5.34x-0.35x2-1.54y + 0.007y2 + 0.06xy R2 = 0.79 p <0.01) respectively. Sperm movement (24.06 ± 5.71%, 38.98 ± 3.33 μm / s) was maximized when using activators containing 1% sodium bicarbonate, but fertilization did not have an effect. The sperm movement in the thawed semen of jundiá (Rhamdia quelen) can be optimized when using activating solutions composed of 1% sodium bicarbonate and distilled water, but at fertilization there was no effect.

**Key words:** CASA, Cryopreservation, gametes, ionic solution, spermatic movement.

1. **INTRODUÇÃO**

A técnica de criopreservação é uma ferramenta facilitadora na gestão dos reprodutores e de inegável interesse à aquicultura (Martinez-paramo *et al*., 2012). Contudo, mesmo considerando as boas perspectivas desta técnica, este processo está associado à danos nas membranas celulares, à redução da atividade enzimática, à ocorrência de inchaço e/ou ruptura celular (Thundathil *et al*., 1999), os quais causam o declínio da motilidade e da velocidade espermática após o descongelamento (Li *et al.*, 2010; Bansal *et al*., 2010). Como a motilidade dos espermatozoides é diretamente relacionada e determinante no sucesso da fertilização dos ovócitos (Rurangwa et al., 2004), estes danos celulares certamente prejudicam a produção e o desenvolvimento das proles (Pérez-cerezales *et al*., 2010).

Pesquisas recentes focadas na busca de estratégias para minimizar ou compensar estes danos celulares têm recebido atenção dos pesquisadores. Neste sentido, o desenvolvimento de diluentes e/ou ativadores espermáticos que potencializam o movimento espermático após o descongelamento podem contribuir na busca pela melhora da viabilidade dos espermatozoides (Zarski *et al*., 2012), permitindo otimizar o uso dos espermatozoides, além de aumentar as taxas de fertilização e por consequência, reduzir a demanda das proporções espermatozoides móveis: ovócito (Adames *et al*., 2015).

Como os principais mecanismos envolvidos no controle da ativação espermática em peixes de água doce estão relacionados com a exposição das células espermáticas à meio hipotônicos e/ou à presença de diferentes íons (K+, Na+, Ca+ e Mg2+) (Cosson 2004), o emprego de soluções iônicas (Krasznai *et al.,* 1995; Cosson, 2010) na ativação de espermatozoides de peixes têm recebido atenção. Normalmente estas soluções precisam atender à particularidades espécie-específicas, a exemplo de espermatozoides de *Cyprinus carpio*, que entram em movimentos após o processo de despolarização das membranas, estimulado pelos íons Na+2, que desencadeia o início da ativação espermática ([Scott & Baynes, 1980](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1065699505002118#bib108); [Billard & Cosson, 1992](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1065699505002118#bib14)), enquanto que em salmonídeos este mecanismo está relacionado ao efluxo de K+ e o influxo de Ca² (Prokopchuk *et al*., 2016).

Apesar destas perspectivas e, considerando que a criopreservação de sêmen é uma técnica aplicada mundialmente em diversas espécies de peixes como o *Brycon orbignyanus* eo *Leporinus obtusidens* (Carolsfeld *et al*., 2003), o *Gadus morhua L.* (Butts *et al.,* 2011), o *Dicentrarchus labrax* (Martínez *et al.,* 2012) e o *Lutjanus synagris* (Gaitán *et al*., 2013), os protocolos voltados para peixes neotropicais ainda necessitam de melhorias para garantir o pleno estabelecimento dos bancos de sêmen criopreservado.

Dentre as espécies neotropicais, o *Rhamdia quelen* está se destacando na aquicultura devido às boas taxas de crescimento (Barcellos *et al.,* 2010) e a aceitação da sua carne pelo mercado consumidor (Fracalossi *et al*., 2004). Este conjunto de fatores motivou nos últimos anos o uso destes peixes como modelo biológico em pesquisas voltadas à fisiologia (Barcellos *et al.,* 2001), hematologia (Barcellos *et al.,* 2004), reprodução e conservação de gametas (Sanches *et al.,* 2011a), nutrição de reprodutores (Tessaro *et al.,* 2012a) e toxicologia (Fabregat, *et al*., 2015). Contudo, apesar destas perspectivas, atualmente a produção em larga escala deste peixe é limitada pela inviabilidade dos programas de melhoramento genético e, uma importante barreira a ser superada é o desenvolvimento de técnicas reprodutivas eficientes que viabilizem a formação dos bancos de semen criopreservado(Adames *et al.,* 2015).

Neste contexto, o objetivo desta pesquisa foi avaliar os efeitos de diferentes concentrações de Bicarbonato de sódio na solução ativadora, sobre a motilidade espermática em sêmen descongelado e sobre a fertilização dos ovócitos de *Rhamdia quelen.*

# MATERIAL E MÉTODOS

## *Espécimes, estrutura experimental e coleta do sêmen*

Foram utilizados 24 reprodutores (218,62±69,86g) de jundiá (*Rhamdia quelen*) que apresentavam características de maturação gonadal (Bombardelli *et al.,* 2006). Durante o período que antecedeu esta pesquisa, os reprodutores foram alojados por 12 meses e alimentados diariamente (3% da biomassa ao dia), com ração comercial.

Os reprodutores selecionados foram transferidos para o Laboratório de Tecnologia da Reprodução de Animais Aquáticos, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, onde foram alojados em tanques de alvenaria (1,44m3), instalados em sistema de recirculação com filtro mecânico, filtro biológico, controle de temperatura por meio de aquecimento elétrico (24,0±1,0ºC) e esterilização por ultravioleta. Os reprodutores foram submetidos ao procedimento de manipulação hormonal com aplicação de 3,0 mg de extrato bruto de pituitária (EPC)/kg e, a coleta do sêmen foi realizada após um período de 240 horas-grau (10h; água à 24ºC) (Adames, *et al.*, 2015).

O sêmen foi coletado individualmente de cada reprodutor em tubos Falcon (15,0± 0,1mL) e mantido sob resfriamento (±12°C) durante o período de realização das análises seminais e espermáticas e, ao longo do processamento das amostras para criopreservação.

Em seguida, as amostras de sêmen foram misturadas para dar origem à quatro amostras compostas ou *pools* de sêmen. Cada *pool* foi constituído por alíquotas de sêmen provenientes de seis reprodutores. Cada reprodutor contribuiu com um mililitro de sêmen para compor o *pool* de sêmen.

## *Avalição seminal e espermática do sêmen fresco*

Após a mensuração do volume de sêmen liberado (9,58±2,36mL) pelos reprodutores, de cada um dos *pools* de sêmen foram mensurados o pH, a osmolaridade seminal (mOsm/kg), a concentração espermática (espermatozoides/mL), o percentual de espermatozoides morfologicamente normais (%), as taxas de motilidade (%) e as velocidades curvilinear (µm/s), média de deslocamento (µm/s) e em linha reta (µm/s) dos espermatozoides.

O pH seminal (7,5±0,3) foi mensurado pelo método colorimétrico utilizando papel tornassol (Merck®), segundo Mewes *et al.*(2016). A osmolaridade seminal foi mensurada a partir de amostras do sêmen fresco submetidas à centrifugação (Famem® BabyI® Centrifuge mod. 206) à 3.500 rpm pelo período de 20min. Destas amostras, 2,5mL do plasma seminal foram armazenados à -20°C. A osmolaridade do plasma seminal (245,0±29,50 mOsm/kg) foi mensurada em osmômetro crioscópico (PZL® mod. 1000) (Adames *et al.,* 2015).

Em seguida, amostras de sêmen fresco foram diluídas (1:1.000) e fixadas em solução de formol salina tamponado (Sanches *et al*., 2013). A partir destas amostras, a concentração espermática (4,79±0,40X1010 espermatozoide/mL) foi mensurada pela contagem das células espermáticas em câmara hematimétrica de Neubauer. Das mesmas amostras, fixadas em solução de formol salino tamponado, alíquotas de sêmen foram utilizadas para mensuração do percentual de espermatozoides morfologicamente normais (65,72±27,16%). Estas análises foram realizadas com o sêmen corado em rosa de bengala. Pelo menos 300 espermatozoides de cada lâmina foram avaliados em microscópio óptico (40X; Nikon Eclipse®, E200), segundo a metodologia descrita por Adames *et al.* (2015).

As taxas de motilidade e as velocidades espermáticas foram mensuradas no sêmen fresco, diluído em água destilada a uma proporção de 1:1000 (sêmen:água; v/v) e analisado pelo sistema CASA em *software* livre (Tessaro et al., 2012a; Adames et al., 2015). Os vídeos do movimento espermático foram obtidos em microscópio óptico (Nikon Eclipse®, E200) em objetiva 10X, acoplado à uma câmera de vídeo (Basler, A602fc). As avaliações foram realizadas ao longo de um segundo de imagem, no 12o segundo após o início da ativação espermática. Os resultados gerados pelo *plugin* CASA foram: as taxas de motilidade (75,20±5,34%), a velocidade curvilínear (61,60±4,63μm/s), a velocidade média de deslocamento (44,34±4,95μm/s) e a velocidade em linha reta (41,71±4,91μm/s). Devido a existência de uma alta correlação, os resultados das três velocidades foram agrupados por meio da análise de componentes principais (PCA), gerando uma nova variável determinada velocidade espermática (49,71±4,9 μm/s) (Tessaro *et al.,* 2012a).

## *Criopreservação e descongelamento do sêmen*

As alíquotas de sêmen de cada *pool* foram diluídas na proporção de 1:3 (sêmen: solução diluidora; v/v) em solução contendo 5% de D-frutose (Sigma®), 5% de leite em pó (Nestle Ninho®) e 10% de metanol P.A. (Biotec®). Em seguida o material foi envasado em palhetes de 0,25mL e imediatamente transferido para botijão de vapor de nitrogênio (*Dry shipper MVE sc2/1v*). Após 12 horas, as palhetas foram transferidas e armazenadas pelo período de 30 dias em nitrogênio líquido à -196°C (Adames *et al.,* 2015). Após este período, o sêmen foi descongelado por meio da imersão das palhetas em água à temperatura ambiente (±25°C) durante 10 segundos.

As amostras de sêmen descongelado foram submetidas à mensuração da concentração espermática (2,32±0,30X1010 espermatozoide/mL) e do percentual de células espermáticas morfologicamente normais (20,40±17,09%), conforme descrito anteriormente para o sêmen fresco.

## *Delineamento experimental e ensaios de ativação espermática*

O sêmen descongelado foi diluído e os espermatozoides ativados em soluções compostas por diferentes concentrações de bicarbonato de sódio diferentes (Tabela 1). Todas as soluções foram elaboradas por meio da diluição das diferentes substâncias em água destilada.

Os ensaios de ativação espermática foram realizados em um delineamento experimental em blocos casualizados em esquema fatorial 5X30, com quatro repetições. Os tratamentos foram constituídos por cinco diferentes concentrações de bicarbonato de sódio (0%, 0,20%, 0,40%, 0,60%, 0,80% e 1,00%) e, 30 avaliações do movimento dos espermatozoides em diferentes tempos após o início da ativação espermática (entre 12 e 70s). Foi considerado como um bloco, cada um dos *pools* de sêmen.

Assim, as taxas de motilidade e as velocidades espermáticas foram mensuradas a cada dois segundos, entre o 12º e 70º segundos após o início do movimento dos espermatozoides, conforme descrito anteriormente para o sêmen fresco. Neste caso a ativação dos espermatozoides foi realizada com a diluição do sêmen descongelado na proporção de 1:200 (sêmen: solução ativadora; v/v) em cada uma das respectivas soluções (Tabela 1).

## *Ensaios de fertilização artificial dos ovócitos*

Para a realização destes procedimentos ao longo da estação reprodutiva, foram obtidas alíquotas de sêmen de outros 24 reprodutores para constituíção de quatro *pools* de sêmen. As amostras desses *pools* foram submetidas à criopreservação e ao descongelamento conforme descrito anteriormente. Também foram utilizadas quatro fêmeas de jundiá (*Rhamdia quelen*) que apresentavam evidências de maturação gonadal, segundo Tessaro *et al.* (2012b). Estas fêmeas foram submetidas à manipulação hormonal para sincronização da ovulação, empregando-se 5,5 mg EPC/kg e, os ovócitos foram coletados após um período de 240 horas-grau (10h; água à 24ºC) (Goes *et al*., 2016).

Os ensaios de fertilização foram realizados em delineamento experimental em blocos casualizados, compostos por três tratamentos e quatro repetições. Os tratamentos foram constituídos por três soluções (água destilada; 0,8% NaHCO3 e 1,00% NaHCO3) empregadas na ativação dos gametas durante a fertilização artificial de ovócitos de jundiá (*Rhamdia quelen*). Foi considerado como bloco um *pool* de sêmen e, as unidades experimentais, uma parcela de ovócitos fertilizados com sêmen descongelado e ativado com cada uma das soluções.

Tabela 1- Concentração, pH e osmolaridade de soluções empregadas para ativação espermática em sêmen descongelado de jundiá (*Rhamdia quelen)*.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Solução | Concentração (%) | pH | Osmolaridade (mOsm/kg) |
| Água destilada | --- | 6,54 | 0 |
| Bicarbonato de sódio (NaHCO3) | 0,20 | 8,27 | 38 |
|  | 0,40 | 8,50 | 83 |
|  | 0,60 | 8,71 | 127 |
|  | 0,80 | 8,68 | 180 |
|  | 1,00 | 8,66 | 206 |

Nos ensaios de fertilização, 2mL de ovócitos (2.026±4,93 ovócitos) foram misturados ao sêmen descongelado, disponibilizando 70.000 espermatozóides móveis:ovócito. Esta proporção espermatozóide:ovócito foi inferior à recomendada como ideal para a espécie (90.000 à 100.000 espermatozoide:ovocito; Bombardelli et al., 2006), mas foi propositalmente utilizada para evitar a possibilidade de mascaramento ou sombreamento dos resultados, uma vez que algumas soluções ativadoras potencializaram o movimento dos espermatozóides. O sêmen descongelado estava com 2,29±0,16X1010 espermatozoide/mL e as taxas de motilidade e as velocidades variaram conforme o ativador (Tabela 2).

Após a mistura dos gametas, foram adicionados 20mL de cada solução ativadora, à 24ºC, para promover a ativação dos espermatozoides e dos ovócitos. O material foi suavemente homogeneizado por 60 segundos e, em seguida transferido para as incubadoras experimentais confeccionadas em PVC e com volume útil de 2,5 L, instaladas em um sistema de recirculação de água com 2.000L, com filtro mecânico, filtro biológico, esterilização por UV e aquecimento elétrico.

Doze horas após a fertilização artificial, após o fechamento do blastóporo (Pereira *et al.,* 2006), foram mensuradas as taxas de fertilização dos ovócitos por meio da amostragem de 300 ovos de cada unidade experimental (Adames *et al.,* 2015).

*Análise estatística*

Os resultados das taxas de motilidade e as velocidades espermáticas foram analisados por meio da regressão múltipla pelo modelo de superfície de resposta. Foram checados os pressupostos de homogeinidade e normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk (Kéry *&* Hatfield, 2003). Foram verificados os efeitos interativos ou efeitos principais das diferentes concentrações de bicarbonato de sódio e, do tempo após o inicio da ativação espermática sobre os parametros de movimento dos espermatozoides. Em caso de efeito dos tratamentos, os resultados foram plotados em gráficos 3D e adicionadas a linha de máximo desempenho.

As taxas de fertilização foram expressas em média ± desvio padrão e, os resultados foram submetidos ao protocolo de análise variância (ANOVA), seguido pelo teste de comparação múltipla de médias de Tukey. Os pressupostos de homogeinidade e normalidade dos residuos foram checados pelos testes de levene’s e Shapiro-Wilk respectivamente.

Todos os protocolos estatísticos foram realizados considerando nível de 5% de significancia. Para a realização das análises estatísticas foi utilizado o software Statistica 7.0®.

# RESULTADOS E DISCUSSÃO

### As concentrações de NaHCO3 e o tempo após o início da ativação espermática influenciaram de forma interativa (p<0,05) o movimento espermático (Figura 1A; Figura 1B). O ativador contendo 1% de NaHCO3 em água destilada promoveu maiores taxas de motilidade (24,06%) e velocidades espermáticas (38,98μm.s-1), prolongando o tempo em que os espermatozoides permaneceram em movimento (Figura 1A; Figura 1B).

1B

1A

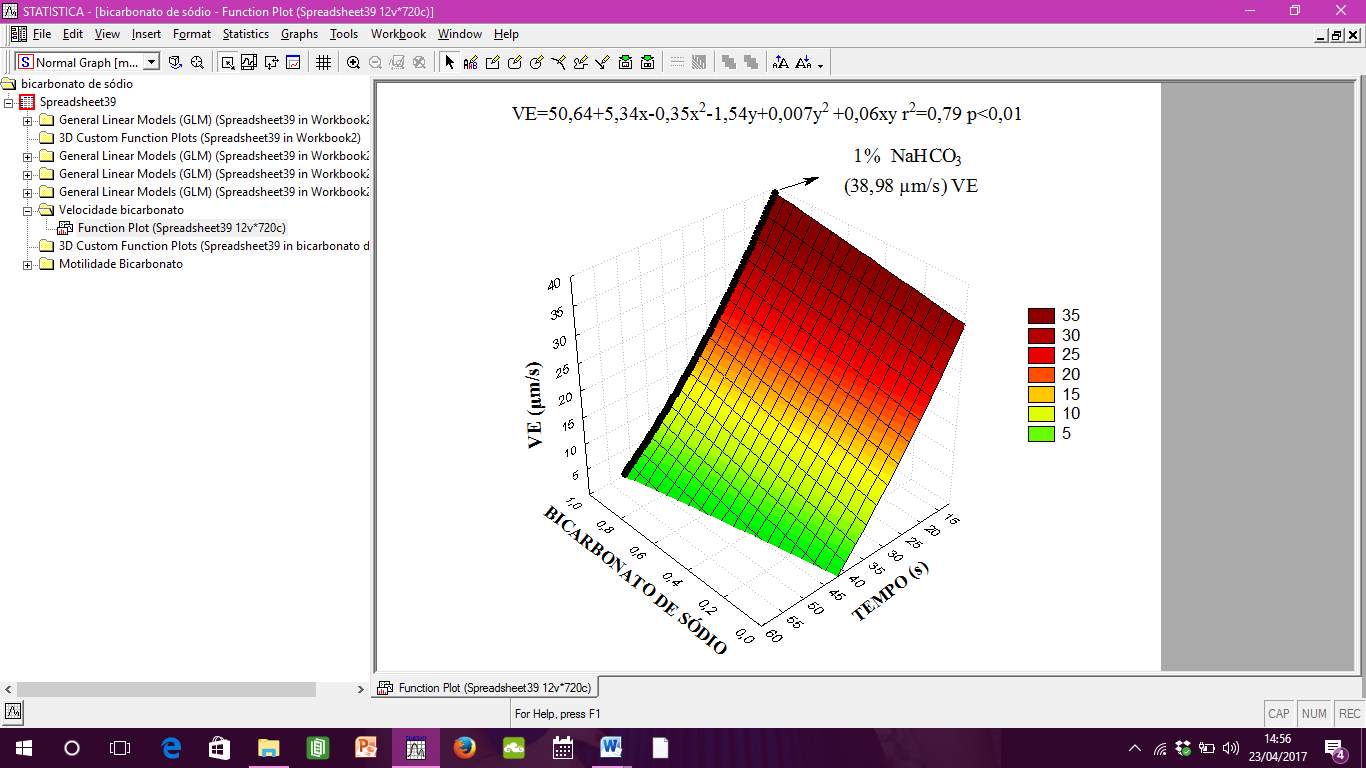
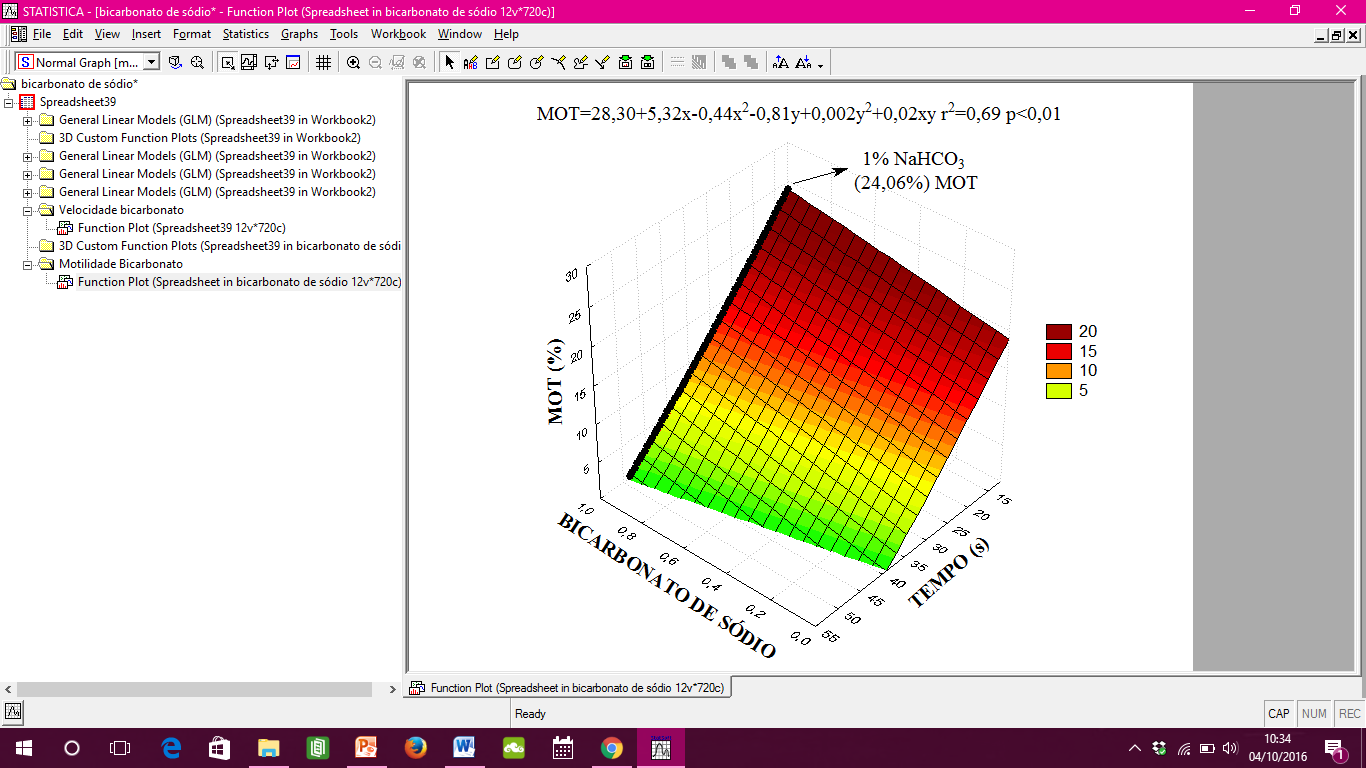


Figura 1 – Movimento espermático em sêmen descongelado de jundiá (*Rhamdia quelen*) ativado com soluções contendo diferentes concentrações de bicarbonato de sódio (NaHCO3). Mot (%)=Motilidade espermática. VE(µm/s)=Velocidade espermática.

O aumento da motilidade espermática com o uso do bicarbonato de sódio, deve-se aos efeitos positivos dos íons de sódio (Na+)presentes nas soluções ativadoras, pois têm sido relacionado com a despolarização das membranas celulares, cuja consequência normalmente implica no influxo de íons e o estímulo das reações em cascatas que levam à produção de ATP e promovem o movimento flagelar dos espermatozoides (Alavi & Cosson 2006).

Apesar do efeito positivo do bicarbonato de sódio sobre a ativação dos espermatozoides, a taxa de fertilização dos ovócitos não sofreu influencia das soluções ativadoras. Este efeito também foi verificado no trabalho de Fogli, et al. (1990), onde o bicarbonato de sódio não causou benefícios na taxa de fertilização dos ovócitos de *Piaractus mesopotamicus*.

Tabela 2- Motilidade e velocidade espermática e, taxas de fertilização de ovócitos de jundiá (*Rhamdia quelen*) provenientes de sêmen criopreservado e ativados com bicarbonato de sódio.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Produto | Concentração (%) | Motilidade  (%) | Velocidade  (μm/s) | Taxa de Fertilização  (%) |
| Água destilada | - | 35,34±5,17 | 37,16±2,70 | 7,94±4,53ab |
| Bicarbonato de sódio  (NaHCO3) | 0,80 | 40,13±4,71 | 56,41±3,47 | 14,21±7,70ab |
| 1,00 | 21,55±3,81 | 62,76±3,20 | 13,00±2,69ab |
| *p*-valor |  |  |  | 0,8380 |

Dados representados pela média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam médias diferentes (p<0,05) de acordo com o teste de comparação múltipla de médias de Tukey.

**4- CONCLUSÃO**

O movimento espermático no sêmen descongelado de jundiá (*Rhamdia quelen)* pode ser otimizado quando empregada solução ativadora composta por 1% de bicarbonato de sódio e água destilada, porém sem benefícios aparentes à fertilização dos ovócitos.

**6- REFERÊNCIA**

Adames, M. S., Toledo, C. P. R., Neumann, G., Buzzi, A. H., Buratto, C. N., Piana, P. A., Bombardelli, R. A, 2015. Optimization of the sperm:oocyte ratio and sperm economyin the artificial reproduction of Rhamdia quelen using fructoseas a sperm motility modulator. Animal Reproduction Science 161, 119–128.

Alavi, S. M. H., Cosson J, 2005. Sperm motility in fishes: (I) effects of temperature and pH. Cell Biology International 29, 101–110.

Bansal AK., Bilaspuri GS., 2010. Impacts of oxidative stress and anti-oxidants on semen functions. Veterinary Medicine Internationa 6, 86-137.

Barcellos, L.J.G., Marqueze, A., Trapp, M., Quevedo, R.M., Ferreira, D., 2010. The effects of fasting on cortisol, blood glucose and liver andmuscle glycogen in adult jundiá *Rhamdia quelen*. Aquaculture 300, 231–236.

Billard, R.; Cosson, M.P., 1992. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. J Exp Zool 261, 122–131.

Bombardelli, R. A., Morschbacher, E. F., Campagnolo, R., Sanches, E. A., Syperreck, M. A., 2006. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá cinza, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimardm, 1824). Revista Brasileira de Zooctecnia. 35(4): 1251-1257.

Butts, I. A. E., Babiak, I., Ciereszko, A., Litvak, M. K., Słowinska, K., Soler, C., Trippel, E. A., 2011. Semen characteristics and their ability to predict sperm cryopreservation potential of Atlantic cod, Gadus morhua L. Theriogenology 75, 1290–1300.

Carolsfeld S, J., Godinho, H., Zaniboni, E., Harvey, B. J., 2003. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. Journal of fish biology 63, 472-489.

Cosson, J., 2010. Frenetic activation of fish spermatozoa flagella entails short-term motility, portending their precocious decadence. Fish biology 76, 240–279.

Cosson, J., 2004. The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa. Aquaculture International 12, 69–85.

Fogli, S., W.; Kavamoto, E. T.; Cestarolli, M. A.; Godinho, H. M.; Ramos, S. M. and Silveira, A. N. (1990), Avaliação espermática, preservação criogênica e fertilidade do sêmen do pacu, *Piaractus mesopotâmicus*(Holmberg, 1887), proveniente de reprodução induzida. *B. Inst. Pesca*, **17**, 1-13.

Fracalossi, D. M., Meyer, G., Santamaria, F. M., Weingartner, M., Zaniboni F. E., 2004. Desempenho do jundiá, Rhamdia quelen, e do dourado, Salminus brasiliensis, em viveiros de terra na região sul do Brasil. Acta Scientiarum. Animal Sciences 26, 345-352.

Gaitán-espitia, Juan D.; Martínez-silva María A.; Borrero, Carlos E.; Ramírez, Lucas; Valencia Juan P, 2013. Cryogenic preservation of sperm from lane snapper (Lutjanus synagris):Testing the effects of extenders and freezing rates on sperm quality. Aquaculture 384-387, 6-12.

Goes, M. D., Reis, E. S. G., Ribeiro, R. P., Lopera-barrero, N. M., Castro, P. L., Bignotto, T. S., Bombardelli, R. A., 2016. Natural and artificial spawning strategies with fresh and cryopreserved semen in Rhamdia quelen: reproductive parameters and genetic variability of offspring. Theriogenology 88, 254-263.

Kéry, M., Hatfield, J. S., 2003. Normality of Raw data in general linear models: the most widespread myth in Statistics. Conservation Ecology 4, 92-94.

Krasznai Z., Marian, T., Balkay, L., Gasper, J. R., Tron L., 1995. Potassium channels requlate hypo-osmotic shock-induced motility of common carp, Cyprinus carpio, sperm. Aquaculture 129 123-1288.

### Li P, Li Z-H., Dzyuba, B., Hulak, M., Rodina, M., Linhart, O., 2010. Evaluating the impacts of osmotic and oxidative stress on com-mon carp (Cyprinus carpio, L.) sperm caused by cryopreservation techniques. [Biology of Reproduction](http://www.biolreprod.org/) 83, 852–58.

Martinez-p. S., Diogo, P., Dinis, M. T., Herráez, M. P., Sarasquete, C., Cabrita, E., 2012. Incorporation of ascorbic acid and tocopherol to the extender media to enhance antioxidant system of cryopreserved sea bass sperm. Theriogenology 77, 1129-1136.

[Mewes, J.K.](http://lattes.cnpq.br/6141724502743187), Meurer, F., [Tessaro, L.](http://lattes.cnpq.br/5365539556512785), [Buzzi, A. H.](http://lattes.cnpq.br/3290972679542513), Syperreck, M. A., Bombardelli, R. A. 2016. Diets containing crude glycerin damage the sperm characteristics and modify the testis histology of Nile tilapia broodstock. Aquaculture (Amsterdam) 164-171.

Pereira, C.R., Barcellos, L.J.G., Kreutz, L.C., Quevedo, R.M., Ritter, F., Silva,L.B., 2006. Embryonic and larval development of jundiá (Rhamdiaquelen, Quoy & Gaimard, 1824, Pisces, Teleostei), a South Americancatfish. Braz. J. Biol. 66, 1057–1063.

Pérez-cerezales S., Martínez-páramo S., Beirão, J., Herráez, P., 2010. Fertilization capacity with rainbow trout DNA damaged sperm and embryo developmental success. Reproduction 139, 1–10.

# Prokopchuk, G., Dzyuba B., Marek R., Cosson, J., 2016. Control of sturgeon sperm motility: Antagonism between K+ ions concentration and osmolality. Animal Reproduction Science 164, 82-89.

Rurangwa, E., Kime, D.E., Ollevier, F., Nash, J.P., 2004. The measurementof sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish.Aquaculture, v.234, p. 1–28.

Sanches, E. A., Marcos, R. M., Okaware, R. Y., Caneppele, D., Bombardelli, R. A., Romagosa, E., 2013. Sperm motility parameters for *Steindachneridion parahybae* based on open-source software. J. Appl. Ichthyol. 29, 1114-1122.

Sanches, E.A., Baggio, D.M., Piana, P.A., Souza, B.S., Bombardelli, R.A., 2011a. Artificial fertilization of oocytes and sperm activation inpacu: effects of the spermatozoa:oocyte ratio, water volume, and innatura semen preservation. R. Bras. Zootec. 40, 1–6.

Scott, A.P.; Baynes, S.M, 1980. A review of the biology, handling and storage of Salmonid spermatozoa.J Fish Biol, 17, 707–739.

Tessaro, L., [Toledo, C. P. R.](http://lattes.cnpq.br/6576339062841321), Neumann, G., Krause, R. A., [Meurer, F.,](http://lattes.cnpq.br/9503774221227922) [Marçal, N. M. R.,](http://lattes.cnpq.br/5721178588513838)  [Bombardelli, R. A](http://lattes.cnpq.br/9229153363435258)., 2012a. Growth and reproductive characteristics of Rhamdia quelen males fed on different digestible energy levels in the reproductive phase. Aquaculture (Amsterdam) 326, 74-80.

Thundathil, J., Gil, J., Januskauskas, A., Larsson, B., Soderquist, L.,Mapletoft, R., Rodriguez-Martinez, H., 1999. Relationship betweenthe proportion of capacitated spermatozoa present infrozen–thawed bull semen and fertility with artificial insemination.Int. J. Androl. 22, 366–373.

Zarski, D., Horváth, A., Kotrik, L., Targonska, K., Palinska, K., Krejszeff, S.,Bokor, Z., Urbányi, B., Kucharczyk, D., 2012. Effect of differentactivating solutions on the fertilization ability of Eurasian perch,Perca fluviatilis L., eggs. J. Appl. Ichthyoly 28, 967–972.