



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MARINHAS TROPICAIS

MAYRA BEZERRA VETTORAZZI

CARACTERIZAÇÃO DO SÊMEN DE ARIACÓ, *Lutjanus synagris* (LINNAEUS,  
1758)

FORTALEZA

2012

MAYRA BEZERRA VETTORAZZI

CARACTERIZAÇÃO DO SÊMEN DE ARIACÓ, *Lutjanus synagris* (LINNAEUS,  
1758)

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais do Instituto de Ciências do Mar, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Marinhas Tropicais.

Área de concentração: Utilização e Manejo de Ecossistemas Marinhos e Estuarinos

Orientador: Prof. Rodrigo Maggioni,  
Ph.D.

FORTALEZA  
2012

MAYRA BEZERRA VETTORAZZI

CARACTERIZAÇÃO DO SÊMEN DE ARIACÓ, *Lutjanus synagris* (LINNAEUS, 1758)

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais do Instituto de Ciências do Mar, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Marinhas Tropicais. Área de concentração: Utilização e Manejo de Ecossistemas Marinhos e Estuarinos.

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA

---

Prof.: Rodrigo Maggioni, Ph.D. (Orientador)

Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Profa.: Carminda Sandra Brito Salmito-Vanderley (Co-orientadora)

Universidade Estadual do Ceará – UECE

---

Prof.: Manuel Antonio de Andrade Furtado Neto, Ph.D.

Universidade Federal do Ceará – UFC

Aos meus pais

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente aos meus pais, pela educação, incentivo e apoio. Pelos anos que vivemos juntos, nos quais pude reimprimir sua dignidade, honestidade e paixão pela vida;

À minha grande família, principalmente à minha tia e avó, que proporcionaram um ambiente agradável e adequado à realização deste trabalho, à Giovânia e Estélio pela prontidão e auxílio;

Aos meus orientadores, professor Manuel Antonio de Andrade Furtado Neto, pela oportunidade de trabalho; professor Rodrigo Maggioni, pela boa vontade, acolhida e contribuição intelectual deste trabalho;

À minha co-orientadora, professora Carminda Sandra Brito Salmito Vanderley, pela acolhida e oportunidade da realização deste trabalho no Núcleo Integrado de Biotecnologia – NIB, pela contribuição efetiva na dinâmica do laboratório e suas preciosas sugestões;

Ao amigo e colaborador Rossi Lelis Muniz, pelo apoio, intelectual e emocional, tão necessário nos momentos difíceis.

Ao amigo Roberto Kobayashi, Koba, pela prontidão e dedicação às práticas de manejo no UPPMAR, CEAC;

À equipe do UPPMAR, Cássio Ribeiro, Thiago, Hermano e Bruno pela disponibilidade de apoio nas práticas, e pelo bom humor nas horas tensas;

À Liliane, Cássia, Mônica, Jordana, Júlia, Renan, pela simpatia, gentileza e atenção nas atividades laboratoriais e pela troca de informação tão valiosa para o aperfeiçoamento;

Ao amigo Antônio Glaydson, Tidy, pela gentileza e esclarecimentos fundamentais para a conclusão do trabalho;

À minha amiga e mentora Erivânia Gomes que mesmo de longe pôde auxiliar;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior – CAPES pelo apoio financeiro, na concessão da bolsa;

*“Feliz o homem que encontrou a sabedoria e alcançou o entendimento, porque a sabedoria vale mais do que a prata, e o fruto que se obtém é melhor que o fino ouro.” Prov. 3, 13-15.*

## RESUMO

A aquicultura tem assumido crescente importância como fonte de alimentos ricos em proteína. O ariacó, *Lutjanus synagris* está entre as dez principais espécies capturadas nas pescarias da costa central do Brasil e nos EUA movimentou 157,745 mil dólares nas pescarias de 2010. Um dos pré-requisitos para a domesticação e o estabelecimento da indústria sustentável é a capacidade de controlar a reprodução em cativeiro. O cultivo intensivo e a propagação artificial requerem tecnologias próprias de manipulação dos gametas, as quais incluem o armazenamento em curto prazo para facilitar a reprodução artificial ou mesmo para melhorar sua eficácia. O conhecimento da biologia da espécie é importante para concluir o processo de fertilização e para o desenvolvimento de técnicas de estocagem de sêmen a curto e longo prazos. O objetivo deste trabalho foi caracterizar quantitativa e qualitativamente o sêmen fresco de ariacó, *L. synagris* utilizando o sistema computadorizado de análise seminal (CASA). As amostras de sêmen foram analisadas quanto à concentração espermática, volume ejaculado, osmolaridade, pH, morfologia, morfometria e motilidade espermática. As médias de concentração espermática, volume ejaculado, osmolaridade, pH foram  $2,43 \pm 0,42 \times 10^{10}$  spz/mL,  $0,39 \pm 0,2$  mL,  $378,5 \pm 65,1$  mOsm/Kg e  $7,9 \pm 0,17$ , respectivamente. O sêmen de *L. synagris* apresentou 34,6% de patologias primárias e 24,25% de patologias secundárias; os espermatozoides apresentaram comprimento, largura, área e perímetro médio de  $3,06 \mu\text{m}$ ,  $2,73 \mu\text{m}$ ,  $7,63 \mu\text{m}^2$  e  $9,70 \mu\text{m}$  respectivamente. A motilidade espermática total do sêmen fresco foi de 78,8%, sendo 22,32% considerados de velocidade rápida; a retidão e oscilação médias foram 63,24 e 67% respectivamente; a velocidade curvilínea média foi de  $35,13 \mu\text{m/s}$ , a velocidade média em linha reta foi  $13,04 \mu\text{m/s}$ , a velocidade média de percurso foi  $22,14 \mu\text{m/s}$ ; o deslocamento lateral médio da cabeça dos espermatozoides foi  $2,84 \mu\text{m}$  e a frequência de batimento lateral da cauda foi de 4,04 Hz. A utilização do sistema CASA para avaliação da morfologia e motilidade espermáticas foi bem sucedida e mostrou ser um método prático e objetivo para a avaliação de grandes números de espermatozoides.

**Palavras-chave:** *Lutjanus synagris*. Morfometria espermática. Motilidade espermática. Sistema Computadorizado de Análise de Sêmen – CASA.

## ABSTRACT

Aquaculture has become an important source of protein. *Lutjanus synagris*, lane snapper, is amongst the ten main species caught in the Brazilian central coast fisheries and, in the U.S., generated \$ 157,745 in 2010. One of the prerequisites for the industry settlement of sustainable fish farming is the ability to control reproduction in captivity. The intensive breeding and artificial propagation requires appropriated technologies for gametes handling, which include short-term storage to supply the activity or even to improve its effectiveness. The knowledge of the species biology is important to complete the fertilization process and to develop techniques for semen storage in a short and long term. This study aim was to characterize quantitative and qualitatively the *L. synagris* fresh semen using the Computed Assisted Semen Analysis (CASA). Semen samples were analyzed regarding the sperm concentration, ejaculated volume, osmolality, pH, morphology, morphometry and sperm motility. The average sperm concentration, ejaculated volume, osmolality and pH was  $2.43 \pm 0.42 \times 10^{10}$  sperm / mL,  $0.39 \pm 0.2$  mL,  $378.5 \pm 65.1$  mOsm / kg and  $7.9 \pm 0.17$ , respectively. *L. synagris* semen presented 34.6% of primary abnormalities and 24.25% of secondary abnormalities, the mean spermatozoa length, width, area and perimeter were  $3.06 \mu\text{m}$ ,  $2.73 \mu\text{m}$ ,  $7.63 \mu\text{m}^2$  and  $9.70 \mu\text{m}$ , respectively. The total sperm motility of fresh semen was 78.8% being 22.32% considered of high velocity; the mean straightness and wobble were 63.24 and 67% respectively; the average of curvilinear velocity was  $35.13 \mu\text{m/s}$ , the main straight line velocity was  $13.04 \mu\text{m} / \text{s}$ , the main path velocity was  $22.14 \mu\text{m} / \text{s}$ , the main lateral displacement of spermatozoa head was  $2.84 \mu\text{m}$  and beat cross frequency was 4.04 Hz. The use of CASA for evaluation of sperm morphology and motility was successful and proved to be a practical method for the evaluation of large numbers of sperm.

**Key-words:** *Lutjauns synagris*. Sperm morphometry. Sperm motility. Computed Assisted Semen Analysis - CASA



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|  |    |
|--|----|
| Figura 1 - <i>Lutjanus synagris</i> , o ariacó. Exemplar utilizado no presente estudo.....   | 21 |
| Figura 2 - Ocorrência do ariacó ( <i>L. synagris</i> ) indicada em vermelho.....   | 23 |
| Figura 3 - Esquema ilustrativo da sequência de estímulos hormonais que precede a formação dos gametas em teleósteos.....   | 25 |
| Figura 4 - Esquema ilustrativo das condições gerais de osmolaridade requeridas para a ativação da motilidade espermática em peixes marinhos ou dulcícolas.....   | 31 |
| Figura 5 - Desenho esquemático de um espermatozoide de peixe.....  | 34 |
| Figura 6 - Esquema ilustrativo dos parâmetros de motilidade espermática analisados pelo sistema CASA. VCL – velocidade curvilinear; VSL – velocidade em linha reta; VAP – velocidade de percurso; ALH amplitude de deslocamento lateral da cabeça.....   | 37 |
| Figura 7 - Vista aérea do CEAC. (A) UPPMAR; (B) Estuário do rio Pacoti...  | 39 |
| Figura 8 - Sistema de cultivo coberto na UPPMAR. No detalhe (A) o tanque de estocagem dos reprodutores utilizados neste estudo..   | 39 |
| Figura 9 - (A) Captura dos animais com o auxílio de puçás; (B) Imersão em solução anestésica (Egenol 4%); (C) e (D) Biometria dos animais, medição e pesagem respectivamente.....  | 41 |
| Figura 10 - Aplicação de pressão abdominal para a verificação da presença de sêmen como indicador de maturação gonadal nos machos....  | 41 |
| Figura 11- Aplicação de Gonadotrofina Coriônica Humana (HCG – Chorulon Intervet) em ariacó ( <i>L. synagris</i> ) para indução à espermição.....   | 42 |
| Figura 12- Coleta de sêmen de ariacó ( <i>L. synagris</i> ) utilizando seringa graduada com cateter acoplado.....  | 43 |
| Figura 13- Esquema de contagem de células espermáticas na câmara de Nubauer. Foram considerados para contagem os quadrantes marcados em vermelho.....  | 44 |
| Figura 14- Imagem capturada pelo software SCA <sup>®</sup> no momento da medição da motilidade espermática do sêmen de ariacó ( <i>L. synagris</i> ). Em vermelho a rota dos espermatozoides com velocidade progressiva rápida; em verde, progressiva lenta; em azul, não progressiva e em amarelo espermatozoide imóveis..... | 46 |
| Figura 15- Imagem da cabeça de um espermatozoide de ariacó ( <i>L.</i>   |    |

|            |   |    |
|------------|---|----|
|            | <i>synagris</i> ) captada e analisada pelo software SCA® .....  | 47 |
| Figura 16- | Ilustração esquemática das medidas morfométricas analisadas pelo software SCA® .....  | 48 |
| Figura 17- | Imagens de espermatozóides de <i>L. synagris</i> normal (a); com macrocefalia (b); microcefalia (c); cabeça degenerada (d); cauda com simples dobra (e); cauda fortemente enrolada (f); cauda quebrada (g) e cabeça normal livre (h). As setas indicam as anormalidades detectadas..... | 65 |
| Quadro 1-  | Produção aquícola de lutjanídeos por tipo de ambiente de cultivo. Adaptado no anuário da FAO 2008. (B) Água salobra; (M) Água salgada.....  | 20 |
| Quadro 2-  | Espécies estudadas quanto aos parâmetros que induzem a motilidade espermática. Adaptado de Cosson (2010).....   | 32 |
| Quadro 3-  | Descrição das patologias analisadas em espermatozóides de ariacó ( <i>L. synagris</i> ) (adaptada de Miliorini et al., 2010).....   | 50 |

## LISTA DE TABELAS

|            |  |    |
|------------|--|----|
| Tabela 1 - | Valores médios $\pm$ desvio padrão e coeficiente de variação das características seminais de <i>L. synagris</i> .....  | 55 |
| Tabela 2 - | Valores médios dos parâmetros da motilidade espermática do sêmen de ariacó ( <i>L. synagris</i> ).....   | 58 |
| Tabela 3 - | Valores experimentais de velocidade em linha reta de espermatozoides de algumas espécies de peixes marinhos.....   | 60 |
| Tabela 4 - | Valores médios ( $\pm$ desvio padrão) de tamanho e forma da cabeça de espermatozoides de <i>L. synagris</i> . Letras iguais na mesma linha representam ausência de diferença significativa para teste de Tukey com $p \leq 0,05$ .....   | 63 |
| Tabela 5 - | Anormalidades dos espermatozoides presentes no sêmen de <i>L. synagris</i> . Valores médios expressos em porcentagem $\pm$ desvio padrão. MC –Macrocefalia; MIC – Microcefalia; CD – Cabeça degenerada; CF Cauda fraturada; CFE – Cauda fortemente enrolada; CNL – Cabeça normal livre; CSD – Cauda com simples dobra..... | 66 |

## SUMÁRIO

|         |   |    |
|---------|---|----|
| 1.      | INTRODUÇÃO.....                                       | 14 |
| 1.1     | OBJETIVOS.....  | 16 |
| 1.1.1   | OBJETIVOS ESPECIFICOS.....                            | 16 |
| 2.      | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....                            | 17 |
| 2.1     | Situação dos estoques pesqueiros.....                 | 17 |
| 2.2     | Aquicultura.....                                      | 17 |
| 2.2.1   | Brasil.....   | 18 |
| 2.3     | Família Lutjanidae.....                               | 19 |
| 2.3.1   | <i>Lutjanus synagris</i> (ariacó).....                | 20 |
| 2.4     | Reprodução de peixes.....                             | 24 |
| 2.4.1   | Fisiologia da Reprodução.....                         | 25 |
| 2.4.2   | Indução Hormonal.....                                 | 27 |
| 2.5     | Conservação de sêmen.....                             | 28 |
| 2.5.1   | Parâmetros Espermáticos.....                          | 30 |
| 2.5.1.1 | Metabolismo Espermático.....                          | 31 |
| 2.5.1.2 | Morfologia Espermática.....                           | 34 |
| 2.5.1.3 | Concentração Espermática.....                         | 36 |
| 2.6     | Análise de sêmen assistida por computador (CASA)..... | 36 |
| 3.      | MATERIAIS E MÉTODOS.....                              | 39 |
| 3.1     | Locais de realização do estudo.....                   | 39 |
| 3.2     | Captura das matrizes.....                             | 40 |
| 3.3     | Obtenção de sêmen.....                                | 41 |
| 3.3.1   | Indução Hormonal.....                                 | 41 |
| 3.3.2   | Coleta de sêmen.....                                  | 44 |
| 3.4     | Análise de sêmen.....                                 | 45 |
| 3.4.1   | Aspectos Físico-Químicos.....                         | 45 |
| 3.4.2   | Volume de sêmen ejaculado.....                        | 46 |
| 3.4.3   | Concentração espermática.....                         | 46 |
| 3.4.4   | Produção total de espermatozóides.....                | 47 |
| 3.4.5   | Motilidade espermática.....                           | 48 |
| 3.4.6   | Morfometria.....                                      | 49 |
| 3.4.7   | Morfologia.....                                       | 51 |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 3.5   | Análise estatística.....   | 52 |
| 4.    | RESULTADOS E DISCUSSÃO.....  | 53 |
| 4.1   | Obtenção de sêmen.....   | 53 |
| 4.1.1 | Indução Hormonal.....  | 53 |
| 4.1.2 | Coleta de sêmen.....   | 53 |
| 4.2   | Análise de sêmen.....  | 54 |
| 4.2.1 | Cor e aspecto.....   | 54 |
| 4.2.2 | Concentração espermática, volume de sêmen ejaculado,<br>produção total de espermatozóides, osmolaridade e<br>pH..... | 54 |
| 4.2.3 | Motilidade espermática.....  | 58 |
| 4.2.4 | Morfometria.....   | 62 |
| 4.2.5 | Morfologia.....  | 64 |
| 5.    | CONCLUSÃO.....   | 67 |
| 6.    | CONSIDERAÇÕES FINAIS.....  | 68 |
|       | REFERÊNCIAS.....   | 69 |

## CARACTERIZAÇÃO DO SÊMEN DE ARIACÓ, *Lutjanus synagris* (Linnaeus, 1758)

MAYRA BEZERRA VETTORAZZI

### 1. INTRODUÇÃO

Sabe-se que as populações humanas crescem a taxas maiores que os meios de subsistência (MALTHUS, 1999), e que o homem se preocupa em manter sustentáveis as atividades agrícolas e de extração (FAO, 2011).

Mesmo assim, as pescarias apresentam declínio em quase todos os seguimentos que identificamos (pelágicas e de fundo, costeiras e oceânicas), e em toda parte do globo terrestre (FAO, 2010). Em contrapartida, as comunidades científicas alertam para a importância da aplicação de técnicas sustentáveis, mas no caso de algumas espécies, é possível dizer que não há mais chance de crescimento da exploração.

O alimento advindo do mar é uma excelente fonte de proteína animal, rico em micronutrientes essenciais, incluindo vitaminas, minerais, óleos essenciais da família ômega 3 (que têm propriedades anti-inflamatórias, antitrombóticas, antiarrítmicos e reduzem os lipídeos do sangue) e tem sido cada vez mais consumido. Neste íterim, a aquicultura marinha vem ganhando espaço cada vez maior no seguimento econômico de produção de alimento (KIME et al., 2001).

Neste ponto a cooperação com a comunidade científica se torna essencial. Há um esforço cada vez mais intenso em se produzir conhecimento da biologia e fisiologia de espécies apreciadas como alimento, de modo a proporcionar um contexto propício para retomarmos o controle da produção de alimento de qualidade.

Sendo a aquicultura a modalidade que produz animais em ambientes confinados, é elementar que esta atividade domine as técnicas de reprodução mais adequadas fisiológica e economicamente às espécies e regiões em que se trabalha (OSTRENKSY et al., 2008). Isso, levando-se em conta que os animais necessitam

de estímulos ambientais para desencadear as respostas fisiológicas envolvidas nos mecanismos de reprodução, e muitas vezes o confinamento não propicia tais exigências.

O estabelecimento do cultivo de uma nova espécie de peixe marinho deve disponibilizar ovos de qualidade e fornecer um suprimento contínuo de juvenis para a engorda. Com a alta demanda por espécies de peixes lutjanídeos em geral e a constante pressão dos setores de pesca tanto comercial quanto esportiva, uma fonte alternativa destes indivíduos é necessária (TURANO et. al., 2000).

Diversos arranjos foram planejados para as diversas exigências das espécies cultivadas. Foram melhorados os meios de cultivos (gaiolas circulares, raceways, sistemas de alimentação automatizados), otimizados os protocolos de manejo (controle da luminosidade, aplicação de anestésicos, identificação eletrônica individualizada), lançou-se mão do melhoramento genético (reversão sexual, produção de híbridos), porém ainda restam muitas lacunas a serem preenchidas.

A conservação de gametas apresenta-se como ferramenta bastante útil para eliminar assincronias de maturação gonadal entre machos e fêmeas, para a transferência de gametas entre laboratórios e contribui para a variabilidade genética, que em populações confinadas representa um gargalo a ser contornado (SUQUET et al., 2000; CAROLSFELD et al., 2003; RIBEIRO e GODINHO, 2003).

Para a conservação dos gametas (sendo os gametas masculinos mais comumente utilizados nesta técnica), é imperativa a adição de substâncias que confirmam um ambiente propício ao estoque destas células: diluidores e criopreservantes (BILLARD e COSSON, 1992; PADHI e MANDAL, 2000). Para a determinação das condições ótimas que um diluidor ou criopreservante tenha é necessário que se tenha definido os parâmetros seminais. Tanto quanto também é necessário saber em quais condições morfológicas (qualitativas) e morfométricas (merísticas) se encontra o sêmen antes e depois da submissão aos conservantes para gerar um relatório de viabilidade da técnica de preservação empregada.

## 1.1 Objetivos

O objetivo deste trabalho foi caracterizar quantitativa e qualitativamente o sêmen fresco de ariacó, *L. synagris* utilizando o sistema computadorizado de análise seminal (CASA).

### 1.1.1 Objetivos específicos

- Determinar o aspecto e cor do líquido seminal
- Determinar o pH do sêmen fresco;
- Determinar a osmolaridade do sêmen fresco;
- Determinar a concentração espermática;
- Determinar o volume médio de sêmen produzido por indivíduo.
- Determinar os parâmetros de motilidade espermática utilizando o sistema CASA;
- Determinar os valores de morfometria da cabeça dos espermatozóides utilizando o sistema CASA;
- Determinar a morfologia dos espermatozóides;



## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Situação dos estoques pesqueiros

A pesca industrial tem levantado sérias preocupações quanto aos efeitos ecológicos (MYERS & WORM, 2003) relativos à depleção dos estoques, à captura de fauna acompanhante e destruição de *habitats*. Em todo o globo são percebidas mudanças na biomassa capturada de importantes espécies. Juntamente com a percepção da ação das mudanças climáticas nas populações de peixes, uma consciência generalizada de que uma simples abordagem para o manejo das pescarias não é suficiente (TEGNER & DAYTON, 1999) vem se instalando aos poucos. Steele e Schumacher (2000), investigando teorias ecológicas de como teriam sido as populações selvagens antes da instalação das pescarias industriais, sugeriu que, caso a comunidade científica estivesse interessada nas consequências destas pescarias em estoques recém descobertos, ou mesmo na recuperação daqueles em depleção, seria imperativo considerar os efeitos não só sobre as populações sob estresse, mas em todos os componentes do sistema.

Com isso, a aquicultura tem assumido crescente importância como fonte de alimentos ricos em proteína (KIME et al., 2001; NAYLOR et al., 2000).

### 2.2 Aquicultura

A pesca marinha mundial capturou 79,9 milhões de toneladas de pescado em 2009, pouco mais do que o valor atingido em 2008, 79,5 milhões de toneladas (FAO, 2010). Esses números mantiveram-se nestes patamares durante toda a década de 2000, em uma sucessão de altas e baixas que caracteriza a estagnação da atividade. Em contrapartida, a aquicultura marinha vem, embora modestamente, crescendo em toda a década, tendo atingido, em 2009, 20,1 milhões de toneladas de pescado, com um aumento de 2,03% em relação a 2008 (FAO, 2010). Se

buscarmos uma série histórica mais expressiva, ainda analisando dados da FAO (2010) veremos que no período de 1970–2008, a produção aquícola mundial de peixe (continental e marinho) cresceu a uma taxa de 8,3% ao ano, enquanto que a população mundial cresceu a uma taxa média de 1,6% ao ano.

Apesar da longa tradição das práticas aquícolas em alguns países, esta atividade, no contexto global, é um setor relativamente novo, que cresceu vertiginosamente nos últimos 50 anos. Em 2008, a produção aquícola, excluindo-se plantas aquáticas, movimentou 98,4 bilhões de dólares (FAO, 2010).

### 2.2.1 Brasil

Segundo o Ministério da Pesca e Aquicultura do Brasil - MPA (2010), a produção aquícola e pesqueira brasileira alcançou um volume de 1.156.423 t em 2008, ocupando a 21ª colocação dentre os maiores produtores mundiais de pescado do mundo. Em 2008, a região nordeste foi a região mais produtiva do país, com 374.815 t, respondendo por 32% da produção nacional. O Ceará contribuiu com 83,153 mil toneladas de pescado em 2008, sendo o quarto estado que mais produziu neste ano (7,2% da produção nacional) (MPA, 2010).

Ainda segundo a mesma fonte, em termos de aquicultura, o Brasil, teve produção de 415.649 t em 2009, ocupando a 16ª posição no ranking mundial. Deste total, a maricultura contribuiu com 78.296 t (18,84%), sendo o Ceará responsável por 20.515 toneladas, o segundo estado que mais produziu.

Em 2008 a produção da aquicultura marinha brasileira estava basicamente concentrada na região Nordeste, 99,99% sendo representada pela produção de camarão e 0,01% por ostras, não constando nas estatísticas qualquer produção piscícola (OSTRENSKY et al. 2008).

De acordo com Ostrensky et al. (2008), o uso de um maior número de espécies em empreendimentos aquícolas implica na necessidade de maiores investimentos em pesquisas de base e aplicadas, para o desenvolvimento do que se

convencionou chamar de “pacotes tecnológicos”, direcionados não apenas às espécies, mas também às diferentes regiões brasileiras.

### 2.3 Família *Lutjanidae*

Lutjanidae é uma família composta de quatro subfamílias, 17 gêneros e 103 espécies (FAO, 1985), sendo em sua maioria composta de peixes marinhos habitantes de regiões recifais. Internacionalmente são conhecidos como *snappers*. Embora os representantes da família Lutjanidae estejam presentes mais comumente em regiões marinhas tropicais e sub-tropicais, três espécies do gênero *Lutjanus* do Índio-Pacífico habitam águas continentais, e os juvenis de diversas outras espécies são encontrados em águas salobras de estuários. A família está dividida em quatro discretas faunas geográficas: Pacífico Oriental, Indo-Pacífico Ocidental, Atlântico Ocidental e Atlântico Oriental (FAO, 1985).

Lutjanidae é uma das maiores famílias de peixes teleósteos (CHOW et al., 1993) que são geralmente carnívoros, piscívoros ou planctófagos. Mais da metade das espécies de peixes lutjanídeos pertencem à subfamília Lutjanidae das quais 14 espécies pertencentes a três gêneros (*Lutjanus*, *Ocyurus* e *Rhomboplites*) foram descritas no Atlântico Oeste (CHOW et al., 1993).

A família Lutjanidae figura na lista de espécies cultivadas da FAO (quadro 1) e já foi reportada em diversos estudos com foco em biologia pesqueira, reprodução, idade e crescimento, sistema de cultivo, nutrição, desova e larvicultura (BARROS et al., 1996; BENETTI et al., 2002; KAMUKURU e MGAYA, 2004; DUMAS et al., 2004; VARGASMACHUCA et al., 2007; EDWARDS, 2006; SZEDLMAYER, 1998; EMATA et al., 1994; TURANO et al., 2000). No entanto, apesar de já terem sido apontados como potenciais espécies para o cultivo (DUMAS et al., 2004; TUCKER AND JORY, 1991) são poucas as técnicas totalmente desenvolvidas aplicadas ao cultivo destas espécies.

Quadro 1 – Produção aquícola de Lutjanideos por tipo de ambiente de cultivo. Adaptado do anuário da FAO 2008. (B) Água salobra; (M) Água salgada.

| Espécie                    | Ambiente | 1999 | 2000 | 2001 | 2002 | 2003 | 2004 | 2005 | 2006 | 2007 | 2008 |
|----------------------------|----------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|                            |          | t    | t    | t    | t    | t    | t    | t    | t    | t    | t    |
| Lutjanidae                 | B        | 115  | 46   | 134  | 125  | 312  | 90   | 24   | 6    | 4    | 2    |
|                            | M        | 61   | 16   | 63   | 311  | 254  | -    | -    | -    | -    | 75   |
| <i>L. argentimaculatus</i> | B        | 1315 | 3085 | 2049 | 1502 | 2352 | 3962 | 3452 | 4549 | 4484 | 3411 |
|                            | M        | 321  | 73   | 117  | 25   | 122  | 150  | 247  | 134  | 136  | 91   |
| <i>L. bohar</i>            | B        | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 4    | -    | -    | -    |
| <i>L. goldei</i>           | M        | -    | -    | -    | -    | 8    | 49   | 3    | 33   | 5    | -    |
| <i>L. guttatus</i>         | B        | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 1    | 1    | 2    | 1    |
| <i>L. johnii</i>           | B        | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 3485 |
|                            | M        | -    | -    | -    | -    | 10   | 11   | 55   | 20   | 66   | 53   |
| <i>L. russelli</i>         | M        | 83   | 263  | 392  | 231  | 115  | 72   | 116  | 33   | 10   | 19   |
| <i>Lutjanus ssp</i>        | B        | 36   | 20   | -    | 4    | 5    | 7    | -    | -    | -    | -    |
|                            | M        | 70   | 152  | 61   | 29   | 1    | 2    | 2    | 2    | 7    | 102  |

### 2.3.1 *Lutjanus synagris* (ariacó)

*Lutjanus synagris*, o ariacó (figura 1), foi descrito por Carolus Linnaeus, em 1758. Apresenta corpo moderadamente alto, focinho pontudo, caninos moderadamente desenvolvidos em ambas as mandíbulas. Nadadeira dorsal com 10 espinhos e 12 (raramente 13) raios, nadadeira anal arredondada com três espinhos e oito a nove raios, sendo as nadadeiras peitorais relativamente curtas, não atingindo o nível do ânus, apresentando 15 ou 16 raios. Acima da linha lateral apresenta listras amarelas oblíquas e o abdômen é coberto de listras amarelas horizontais, geralmente de oito a 10. Tem dorso rosado ou avermelhado e a porção inferior das laterais e ventre prateada amarelada, com nadadeiras amareladas a avermelhadas. Próximo ao pedúnculo caudal, acima da linha lateral e abaixo dos raios da nadadeira dorsal, vê-se uma mancha preta difusa, maior que o olho, eventualmente não mais que 1/3 desta mancha pode se localizar abaixo da linha lateral (FAO, 1985; FROESE, R. E D. PAULY, 2011).

Taxonomicamente sua classificação segue o modelo:

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Superclasse: Osteichthyes

Classe: Osteichthyes

Subclasse: Neopterygii

Infraclasse: Teleostei

Superordem: Acanthopterygii

Ordem: Perciformes

Família: Lutjanidae

Subfamília: Lutjaninae

Gênero: *Lutjanus*

Espécie: *Lutjanus synagris*

Esta espécie se distribui no Atlânticoidental, desde a Carolina do Norte (EUA) até Santos (Brasil) (figura 2), sendo bastante abundante em todo o mar do Caribe e Golfo do México.

O ariacó é encontrado associado a diversos tipos de substratos, porém destaca-se próximos a regiões recifais. Alimenta-se durante a noite de pequenos peixes, camarões, gastrópodes e cefalópodes (FAO, 1985).

Figura 1 – *Lutjanus synagris*, o ariacó. Exemplar utilizado no presente estudo.



Na língua inglesa recebeu denominação de *lane snapper*, em francês *vivaneau gazou* e em espanhol *pargo biajaiba*. No nordeste brasileiro é conhecido como ariacó. O ariacó possui hábitos demersais e vive em águas quentes, estando frequentemente associados a fundos coralinos e rochosos, entre a zona costeira e a profundidade de 400 m. Ocorre desde a Carolina do Norte, Estados Unidos, até o sudeste brasileiro, incluindo todo o mar do Caribe e o Golfo do México (figura 2). Destaca-se por sua carne saborosa e pele avermelhada, que o valoriza economicamente (MENEZES e FIGUEIREDO, 1980; ALLEN, 1985).

No Golfo do México o ariacó aparece como uma espécie comercialmente importante, e já foram estudados sua biologia pesqueira (TORRES et al., 1990), ecologia e dinâmica populacional (RIVERA-ARRIAGA et al., 1996). Em Cuba, sua ecologia, ciclo de vida, reprodução e biologia pesqueira são conhecidas (CLARO, 1981a/b e 1982).

No Brasil, as primeiras investigações sobre o ariacó foram realizadas no estado do Ceará através de estudos de idade e crescimento (ALEGRIA e MENEZES, 1970) e fecundidade (GESTEIRA e ROCHA, 1976). Recentemente foi determinado por Sousa-Júnior et al. (2008) que, na conata do Ceará, esta espécie se reproduz ao longo de todo o ano com picos entre janeiro e abril. Os mesmo autores determinaram o comprimento médio de primeira maturação de 23,4 cm (comprimento total). Lima (2004) realizou estudos em idade e crescimento em estoques capturados na costa norte da Bahia, justificando a importância comercial da espécie que, segundo Klippel e Pérez (2002), está entre as dez principais espécies capturadas na pesca de linha da costa central do Brasil. O mesmo ocorre no Ceará, onde se destaca com a quinta posição dentre as espécies de peixes mais capturadas, através de uma produção estimada de 804,5 toneladas no ano de 2006, movimentando 4.102.950,00 reais (IBAMA, 2008).

Figura 2 – Ocorrência de ariacó (*L. synagris*) indicada em vermelho.



Nos Estados Unidos, em 2010, o desembarque doméstico de vermelhos (*snappers*) alcançou a marca de 190,538 toneladas e movimentou 12,903 bilhões de dólares. Em Porto Rico, em 2010, o desembarque doméstico de peixes desta família somou 188,810 toneladas e a espécie *L. synagris* participou desta cota com 30.592Kg, movimentando 157,745 mil dólares (NATIONAL MARINE FISHERIES SERVICE OFFICE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, 2010). Juntamente com *Ocyurus chrysurus* é capturado mais frequentemente do que outros lutjanídeos em águas rasas do mar do Caribe (FAO, 1985).

No Brasil, o desembarque de ariacó somou, em 2009, 2.046 toneladas de um total de 510.523 toneladas de pescado (MPA, 2010).

Com grande aceitação de mercado nacional e internacional, características sensoriais bastante apreciadas e relativa rusticidade, o ariacó apresenta-se como uma espécie com grande potencial para a aquicultura marinha.

#### 2.4 Reprodução em cativeiro

Um dos pré-requisitos para a domesticação e o estabelecimento da indústria sustentável de cultivo de peixes é a capacidade de controlar o processo

reprodutivo em cativeiro (MYLONAS, FOSTIER E ZANUY, 2009). Porém muitas espécies de alto valor comercial ainda dependem da disponibilidade de juvenis selvagens (OTTOLENGHI et al., 2004).

Para que a reprodução de peixes tenha êxito é necessário que haja uma sincronização das matrizes e destas com o meio no qual estão inseridos. Esta sincronização permite que ocorra uma cascata de eventos hormonais internos da qual decorrerá a maturação. Várias espécies conseguem atingir a maturidade em cativeiro normalmente (HONG e ZHANG, 2002), porém a desova em condições laboratoriais (muitas vezes bastante distintas das encontradas no ambiente natural) pode representar grande dificuldade. Não raros são reportadas falhas na maturação final dos ovócitos, em fêmeas (ZOHAR, 1989b; PETER et al., 1993), e pequena produção e/ou baixa qualidade de sêmen em machos (BILLARD, 1986, 1989).

Tais problemas podem, em alguns casos, serem mitigados com a manipulação de fatores abióticos como temperatura, fotoperíodo, salinidade, volume de água no tanque (profundidade), substrato, etc (ZOHAR, 1989b; MUNRO et al., 1990; YARON, 1995). Em algumas espécies, para vencer a ausência dos estímulos naturais à reprodução, somente a manipulação hormonal exógena pode ser confiável no controle da reprodução.

Em machos a indução hormonal também pode ser vantajosa, uma vez que peixes de desova parcelada frequentemente apresentam dificuldade na coleta simultânea de material gamético de machos e fêmeas (KIME et al., 2001).

#### 2.4.1 Fisiologia da reprodução

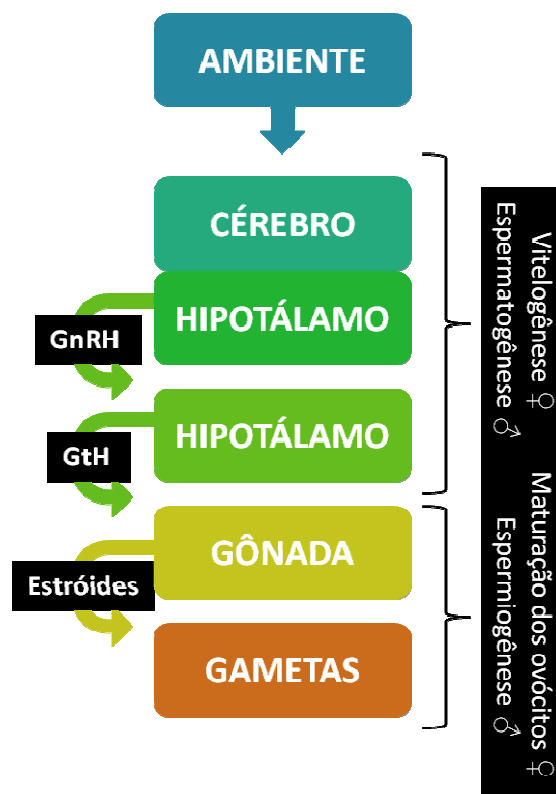
A reprodução é uma função orgânica regulada por fatores ambientais externos que funcionam como gatilhos para o desencadeamento de liberações hormonais internas (ROTTMANN, SHIREMAN e CHAPMAN, 1991).

O ciclo reprodutivo de teleósteos é similar ao de outros vertebrados e ocorre em duas fases (figura 3). A primeira fase consiste da proliferação, crescimento e diferenciação dos gametas (chamada de vitelogênese e



espermatogênese, em fêmeas e machos, respectivamente), enquanto que a segunda fase abrange a liberação dos ovócitos e espermatozóides (maturação dos ovócitos e espermiogênese, em fêmeas e machos, respectivamente).

Figura 3 – Esquema ilustrativo da sequencia de estímulos hormonais que precede a formação dos gametas em teleósteos.



O processo interno regulatório do processo reprodutivo responde ao eixo cérebro-hipotálamo-hipófise-gônada. O estímulo ambiental indicador do período reprodutivo (maior luminosidade, temperatura, nutrientes dissolvidos, etc.) é recebido pelo cérebro e encaminhado para sua porção chamada hipotálamo. O hipotálamo produz o hormônio liberador de gonadotropina (GnRH) que estimula a glândula hipófise. Uma vez estando a hipófise estimulada, esta produz e libera hormônios gonadotrópicos (GtH), ou gonadotrofinas, que caem na corrente sanguínea e se dirigem às gônadas (ovários e testículos). Os hormônios

gonadotrópicos ativam os esteroides que induzem à maturação final e liberação de ovócitos e sêmen.

Em machos, a primeira fase (espermatogênese) inclui a proliferação das espermatogônias, células primitivas que dão origem a células diferenciadas, as espermatídes. O processo é completado com a produção do espermatozoide flagelado, isto é, a espermatogênese (BILLARD, 1986; SCHULZ e MIURA, 2002), um importante passo para a diferenciação das espermatídes haplóides em espermatozoides flagelados e durante o qual a morfologia do espermatozoide espécie-específico é determinada (BILLARD et al., 1986; PUDNEY, 1995; SCHULZ e MIURA, 2002).

Em peixes, a espermição corresponde à liberação do espermatozoide nos dutos espermáticos. Ao mesmo tempo a produção de fluido seminal é observada (LAFLEUR e THOMAS, 1991). Pelo menos em algumas espécies, este processo pode ser associado com a aquisição da capacidade de fertilização do espermatozoide (SCHULZ e MIURA, 2002). O espermatozoide é liberado em dutos espermáticos durante a segunda fase do ciclo reprodutivo masculino, ou seja, espermição, que ocorre durante a estação reprodutiva. O sêmen é ejaculado espontaneamente pelo peixe ou pode ser, em caso de animais em cativeiro, extraído com aplicação de pressão abdominal (extrusão). A espermição e ejaculação podem ser sincronizadas com a desova das fêmeas via comunicação feromonal (STACEY, 2003).

A espermatogênese e espermição podem ser temporariamente separadas e durante a estação reprodutiva os testículos podem conter exclusivamente espermatozoides (BILLARD, 1986; MALISON et al., 1994). Na maioria das espécies, entretanto, existe uma sobreposição significativa entre os dois processos, com ambas espermatogênese e espermição ocorrendo durante a estação reprodutiva (JACKSON e SULLIVAN, 1995; MYLONAS et al., 2003; RAINIS et al., 2003).

Normalmente, machos apresentam um período mais longo de espermição, o qual engloba a estação de desova das fêmeas, e podem fertilizar ovos de várias fêmeas na natureza. Adicionalmente, uma fêmea pode desovar com mais de um macho, seja em apenas uma ocasião ou em diferentes e sucessivas

ocasiões (PETERSSON e JÄRVI, 2001). Esse comportamento masculino e feminino garante o sucesso reprodutivo do indivíduo e favorece a manutenção da variabilidade genética dentro de uma população selvagem, o que não ocorre necessariamente em populações confinadas.

O estímulo da espermiacção no início do período reprodutivo parece ser bastante útil, quando machos e fêmeas pertencem a diferentes plantéis e estão submetidos a diferentes regimes de manejo (BILLARD, 1986). Por esta razão o uso de recursos tecnológicos de preservação de sêmen é bastante indicado para o armazenamento e também para o transporte (KIME et al., 2001).

#### 2.4.2 Indução Hormonal

Em se tratando de machos, a maioria dos métodos de indução à reprodução empregados em aquicultura não são destinados à indução da espermatogênese, que é um longo processo durando muitos dias ou semanas, mas somente à indução da espermiogênese e à produção do flúido seminal que por sua vez permite um maior número de espermatozoides serem expelidos dos testículos (MYLONAS et al., 1997b, 1998a). Neste caso, é aplicada a técnica que atuará diretamente na gônada, as gonadotrofinas.

A principal vantagem da Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG) e demais hormônios gonadotróficos é a de agir diretamente sobre as gônadas não sendo necessária a ativação da hipófise. Possui como desvantagem o fato de desencadear resposta imune nos peixes após longos períodos de tratamento sendo imuno neutralizado. O resultado é que são necessárias doses cada vez maiores, ou então o tratamento deixa ser efetivo (ZOHAR e MYLONAS, 2001).

Os métodos utilizados para induzir à espermiacção são requeridos em algumas situações nas quais este processo é bloqueado completamente. Por exemplo, em casos de domesticação fraca ou quando as condições de cultivo não estão de acordo com a ecobiologia da espécie. O controle da espermiacção pode também ser necessário para sincronizar a produção de sêmen com a ovulação das

fêmeas, para um bom manejo das matrizes. Finalmente, o sêmen necessita ser avaliado no exato momento e com a quantidade e qualidade requeridas quando planos de reprodução estão sendo executados para propósitos de seleção genética, ou para criopreservação, para preservar recursos genéticos de interesse (HOLT, 2000).

Várias espécies de lutjanídeos já foram alvos de experimentos com indução hormonal: *L. griseus*, *L. erythropterus*, *L. russelli*, *L. argentimaculatus*, *L. peru*, *L. guttatus*, *L. campechanus* e *L. synagris* (CABRERA, BARRIOS e QUIJADA, 1998; HONG e ZHANG, 2002, EMATA, 2002 e 2003; DUMAS et al., 2004; IBARRA-CASTRO e DUNCAN, 2007; BOZA-ABARCA et al., 2008; IBARRA-CASTRO e LAJONCHERE, 2009; PHELPS et al., 2009; PASSOS-NETO, 2010).

## 2.5. Conservação de sêmen

O conhecimento sobre a preservação de sêmen de peixe vem avançando desde a década de 50. Os primeiros trabalhos foram realizados por Barret (1951), que verificou a viabilidade de células germinativas de salmonídeos depois da estocagem e por Blaxter (1953), que procurou viabilizar o cruzamento de duas variedades de arenque que desovam em épocas diferentes do ano.

O desenvolvimento de técnicas para o armazenamento de sêmen de peixes pode ser justificado tanto por razões ambientais quanto econômicas. As agressões ambientais, promovidas nos últimos anos, principalmente em ambientes aquáticos, afetam diretamente as populações de espécies nativas de peixes, que mesmo antes de entrarem para a lista daquelas ameaçadas de extinção, algumas de suas características genéticas já podem ter sido alteradas ou perdidas como estratégia de adaptação as condições ambientais alteradas (CARNEIRO, 2007). As estratégias de recuperação da ictiofauna de corpos d'água que passam por período de reversão de um processo de deterioração podem ser grandemente auxiliadas por sêmen coletado num período anterior e armazenado sob baixas temperaturas (RANA, 1995; KIME, 1998, apud Kime, 2001).

Quanto à questão econômica, existem muitas vantagens no uso de técnicas de conservação de sêmen de peixes. O cultivo intensivo e a propagação artificial requerem tecnologias próprias de manipulação dos gametas, as quais incluem o armazenamento em curto prazo para facilitar a reprodução artificial ou mesmo para melhorar sua eficácia (KOVÁCS, 1990).

Dentre os diversos benefícios da preservação do sêmen, pode-se destacar a exclusão da assincronia de desova entre machos e fêmeas, conservação da variabilidade genética em populações domesticadas e a facilidade no estabelecimento de programas de melhoramento genético (SUQUET et al., 2000; CAROLSFELD et al., 2003; RIBEIRO e GODINHO, 2003).

A preservação de gametas pode ser realizada em curto prazo, que consiste em manter a viabilidade espermática por um período de horas ou dias sob temperatura de refrigeração (OLIVEIRA et al., 2007) e em longo prazo, que envolve procedimentos de armazenamento de espermatozoides em nitrogênio líquido, mantendo-se a viabilidade dos gametas por tempo indefinido (MURGAS et al., 2007).

Sob refrigeração, os espermatozoides de peixes podem ser armazenados por algumas horas ou dias, dependendo da espécie, facilitando os trabalhos de rotina dentro de um laboratório de reprodução induzida e favorecendo a concentração dos esforços para o trabalho com as fêmeas (BILLARD et al., 2004). A técnica de refrigeração possibilita ainda a redução nos custos de manutenção do plantel de matrizes e trocas de material genético entre laboratórios (CARNEIRO et al., 2006). Segundo Franciscatto et al. (2002), a conservação seminal em curto período de tempo permite que o sêmen esteja apto para a fecundação de ovócitos sem a presença do macho, melhorando a eficiência das reproduções em cativeiro.

A refrigeração consiste na simples coleta do sêmen e posterior estocagem no refrigerador, ou caixa isotérmica contendo gelo, mantendo-se a temperatura em torno de 0 a 4°C e o sêmen coletado pode ser estocado sem diluição ou diluído, utilizando-se solução diluidora. A diluição aumenta a disponibilidade de oxigênio para as células e também reduz a concentração de proteínas do plasma seminal que podem degenerar com o tempo, comprometendo a qualidade seminal (BILLARD e COSSON, 1992; PADHI e MANDAL, 2000).

A conservação de sêmen por longos períodos tem a finalidade de abastecer a necessidade de genes para aumentar a variabilidade genética de uma determinada população. O armazenamento de sêmen de peixes por longos períodos de tempo é uma ferramenta importante que possibilita a manutenção da variabilidade genética de uma população para uso futuro (CARNEIRO, 2007).

### 2.5.1 Parâmetros espermáticos

Espermatozoides são células de natureza única dentre aquelas geradas pelos componentes do reino *Animalia*. Em espécies de fertilização externa, eles são liberados em meio hostil aonde têm que lidar com condições extremamente agressivas, seja em água doce, salgada ou salobra (COSSON, 2003).

Os espermatozoides de peixes variam em estrutura (JAMIESON, 1991), refletindo sua história evolutiva de mais de 550 milhões de anos (JANVIER, 1999), variação genética e adaptação espacial ao ambiente (SUQUET et al., 2000).

O conhecimento da biologia da espécie é importante basicamente por dois aspectos. Primeiramente para concluir o processo de fertilização sob condições de cativeiro (levando-se em consideração que os parâmetros espermáticos variam bastante entre os espécimes e dentro do período reprodutivo). E também para o desenvolvimento de técnicas de estocagem de sêmen a curto e longo prazos, incluindo criopreservação (GROISON et al., 2010).

#### 2.5.1.1 Metabolismo espermático

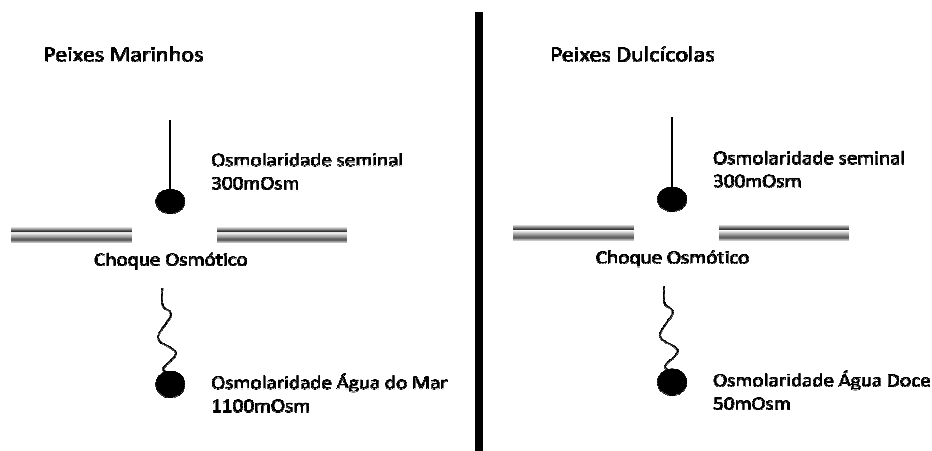
Na maioria das espécies de peixes os espermatozoides são imóveis no plasma seminal, dentro do testículo (TAKAI e MORISAWA, 1995; STOSS, 1983; BILLARD, 1986) em contraste do que ocorre em répteis e mamíferos (KRASZNAI et al., 2003). Por isso, a motilidade é induzida logo após a liberação do sêmen no meio aquoso. Existem relações entre a composição do fluido seminal e as do meio

aquoso em que a reprodução deve proceder. A motilidade é afetada por muitos fatores, sendo os principais a concentração de componentes osmoticamente ativos (osmolaridade), pressão osmótica, pH e temperatura.

A mudança na osmolaridade e concentração iônica do ambiente externo são os gatilhos para o início da motilidade espermática (TAKAI e MORISAWA, 1995). O plasma seminal de peixes marinhos apresenta concentração de íons  $K^+$  e  $Na^+$  similar às do plasma sanguíneo (MORISAWA, 1985; COSON, 2010). Além disto, a concentração de células no trato genital normalmente é muito alta, o que contribui para a imotilidade pela exaustão de  $O_2$  e a grande liberação de  $CO_2$  no plasma seminal, como no caso de peixes achatados (Inaba et al., 2003). As células epiteliais do ducto espermático parecem ter papel importante na secreção dos íons responsáveis pela isosmolaridade.

Os espermatozoides permanecem imóveis no plasma seminal isosmótico ao sangue até que sejam diluídos (expelidos) em solução hiperosmótica (água do mar), enquanto que nos peixes de água doce ocorre o oposto, ou seja, a imotilidade é superada pela hiposmolaridade da água doce (figura 4). Esta dinâmica já foi reportada para uma vasta gama de peixes marinhos (quadro 2).

Figura 4 – Esquema ilustrativo das condições gerais de osmolaridade requeridas para a ativação da motilidade espermática em peixes marinhos ou dulcícolas.



O início da motilidade é seguido imediatamente de uma resposta natatória veloz, que requer um alto consumo de energia pelo espermatozoide, levando, conseqüentemente, a um período móvel bastante breve (COSSON et al., 1999).

Quadro 2 – Espécies estudadas quanto aos parâmetros que induzem a motilidade espermática. Adaptado de Cosson (2010).

| NOME VULGAR                  | NOME CIENTÍFICO   | REFERÊNCIA                             |
|------------------------------|---|--|
| Bacalhau                     | <i>Gadus morhua</i> L.  | Westin & Nissling, 1991                |
| Linguado                     | <i>Pleuronectes yokohamae</i> ;<br><i>Kareius bicoloratus</i> | Morisawa & Suzuki, 1980                |
|                              | <i>D.labrax</i>   | Dreanno et al., 1999                   |
| Gilthead sea bream (dourada) | <i>Sparus aurata</i>  | Billard, 1978                          |
| Tainha                       | <i>Mugil cephalus</i>   | Lee et al., 1992; Yeganeh et al., 2008 |
| Mediterranean horse mackerel | <i>Trachurus mediterraneus</i>                                | Lahnsteiner<br>& Patzner, 1998         |
| Tainha                       | <i>Mullus barbatus</i>  |  |
| Bogue                        | <i>Boops boops</i>  |  |
| White sea bream              | <i>Diplodus sargus</i>  |  |
| Halibut                      | <i>Hippoglossus hippoglossus</i>                              | Billard et al., 1993                   |
| Linguado                     | <i>Psetta maxima</i>  | Chauvaud et al., 1995                  |
| Atum do Atlântico            | <i>Thunnus thynnus</i>  | Cosson et al., 2008a, b                |
| Bacalhau                     | <i>G. morhua</i>  |  |
| Merluza                      | <i>Merluccius merluccius</i>                                  |  |
| Gilthead sea bream (dourada) | <i>S. aurata</i>  |  |
| Senegalese sole              | <i>Solea senegalis</i>  | Cabrita et al., 2008                   |

A motilidade contabiliza a percentagem de espermatozoides móveis presentes numa amostra de sêmen. A progressividade consiste na capacidade que o espermatozoide tem em “percorrer um caminho”, enquanto que a mobilidade apenas diz respeito à aptidão do espermatozoide para se movimentar, ainda que



seja no mesmo sítio (mobilidade *in situ*). Segundo a *World Health Organization* (Organização Mundial de Saúde) (2010) a motilidade espermática pode ser classificada de três maneiras: (I) Motilidade Progressiva, que inclui espermatozoides em movimentos ativos, seja em linha reta ou em círculos; (II) Motilidade Não Progressiva, inclui espermatozoides com movimentos de vibração flagelar sem necessariamente se deslocar; (III) Imotilidade, ausência completa de atividade motora. Para que o espermatozoide consiga alcançar o ovócito, é mais importante uma boa progressividade do que uma boa mobilidade.

A energia para a motilidade e o metabolismo básico dos espermatozoides é derivada da quebra de nutrientes exógenos e endógenos na presença ou ausência de oxigênio (STOSS, 1983), processo que ocorre na mitocôndria, na peça intermediária (ALAVI et al., 2009).

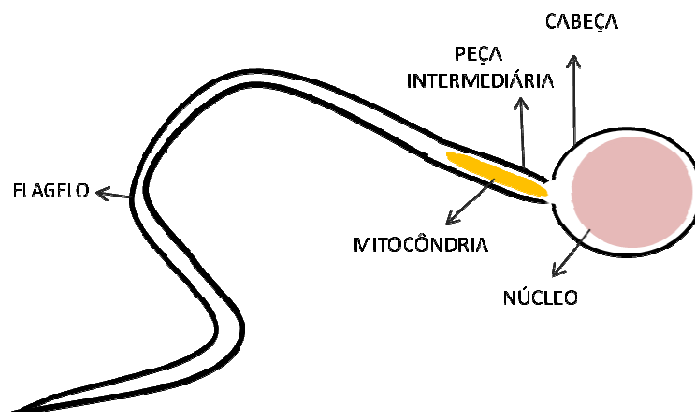
Durante o período no qual a célula espermática está móvel, observa-se o decréscimo dos parâmetros que descrevem a motilidade. O batimento flagelar apresenta padrões característicos em cada período da fase móvel. Na primeira fase da motilidade, a cauda apresenta padrão ondulatório pleno, ou seja, em toda a sua extensão; em um segundo momento, a cauda assume um padrão intermediário, com movimento ondulatório observado somente em sua parte proximal; no final do período móvel ocorre a restrição do movimento ondulatório à terceira ou quarta parte do comprimento da cauda, levando a uma restrição do batimento ondulatório até o completo repouso da cauda. Toda a evolução do movimento flagelar é marcada pelo batimento flagelar, que inicialmente é máximo e pode chegar a 100 Hz, mas normalmente permanece entre 50 e 70 Hz, variando com a espécie (COSSON et al., 1997). Este parâmetro é essencial ao analisarmos a qualidade espermática, pois trata-se justamente do aparato mecânico que impulsionará o espermatozoide em direção ao óvulo e dele depende o sucesso da potencial fecundação.

#### 2.5.1.2 Morfologia espermática

Segundo Billard (1970, apud ALAVI et al., 2007), os espermatozoides podem ser morfológicamente subdivididos em cabeça, peça intermediária e cauda

(figura 5). Na maioria dos grupos de peixes falta o acrossoma (AFZELIUS, 1978), que ocorre na ordem dos Acipenseriformes (LINHART e KUDO, 1997) e em todos os outros grupos de vertebrados. A morfologia dos espermatozoides parece refletir no seu modo de fertilização. A carência do acrossoma é compensada pela presença da micrópila, um orifício no córion do óvulo para a penetração do espermatozoide (GISNBURG, 1972 *apud* ALAVI et al., 2007). Ginzburg (1972) (*apud* ALAVI et al., 2007) descreveu os espermatozoides de algumas espécies de peixes como sendo estruturas constituídas, além da peça intermediária e cauda, por cabeça com acrossomo. Todavia, o mesmo autor constatou, por métodos citológicos, que os espermatozoides da maioria dos teleósteos não possuem acrossomo.

Figura 5 – Desenho esquemático de um espermatozoide de peixe



A cauda dos espermatozoides está disposta em arranjos de microtúbulos do tipo “9+2”, significando nove microtúbulos periféricos ao redor de dois centrais. Estes microtúbulos deslizam simultaneamente um após o outro promovendo a oscilação do flagelo e o deslizamento da célula espermática. Cosson (2007b) descreveu este movimento em todos os seus pormenores.

A cabeça contém o núcleo e, portanto, o material genético. A energia requerida para a motilidade espermática é originada na mitocôndria, localizada na peça intermediária (ALAVI et al., 2009).

Linhart et al. (1991) (*apud* ALAVI et al., 2007) revisou extensamente a literatura e compilou dados de dimensões espermáticas de mais de 30 espécies de

peixes: a cabeça mede de dois a quatro  $\mu\text{m}$ , com exceção de esturjões e *paddle fishes* (LINHART et al., 1995; PSENICKA et al., 2007), que são alongados e medem 9  $\mu\text{m}$  de comprimento e dois  $\mu\text{m}$  de largura, o flagelo atinge de 20 a 100  $\mu\text{m}$  e cada espermatozoide contém de um a nove mitocôndrias.

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 realizados estudos a fim de se evitar a expansão de doenças decorrentes de anormalidades espermáticas, responsáveis pelo baixo índice de fertilidade (BLOM, 1973; BARTH e OKO, 1989; COSSON et al., 1999).

Em verificação de alterações morfológicas de espermatozoides de mamíferos, inúmeros corantes são utilizados a fim de evidenciar as células espermáticas, como: Williams modificado (VALE FILHO, 1980), coloração de Karras (CBRA, 1998), eosina-nigrosina (CASSINELLO et al., 1998), eosina-anelina azul e corante Giemsa (BARTH & OKO, 1989; CASSINELLO et al., 1998), tinta da China e coloração supravital (HAFEZ & HAFEZ, 2000), Vermelho Congo (AGUIAR et al., 1994; AGUIAR et al., 1996), Rosa Bengala (RODRIGUES & RODRIGUES, 1998; GALVANI et al., 2000), uranil acetato e citrato chumbo (TADDEI et al., 2001), além de muitos outros.

### 2.5.1.3 Concentração espermática

A concentração dos espermatozoides no sêmen é frequentemente usada para caracterizar o sêmen. Este parâmetro é facilmente acessado por diferentes técnicas como contagem microscópica, espectrofotometria, e espermatócrito. Segundo Billard et al. (1993) a concentração espermática é um dos principais parâmetros para avaliar a qualidade seminal de peixes. No entanto, Maria et al. (2005) afirmou que não é considerada uma medida específica da capacidade de fertilização e pode variar muito interespecificamente, ao longo da vida do indivíduo, de acordo com coletas sucessivas no mesmo indivíduo, a realização de indução hormonal e os hormônios utilizados, a época de coleta e o tamanho do peixe

(GONDINHO, 2007; BASTARDO et al., 2004; KAVAMOTO et al., 1997; STREIT et al., 2004; BORGES et al., 2005; BILLARD, 1993).

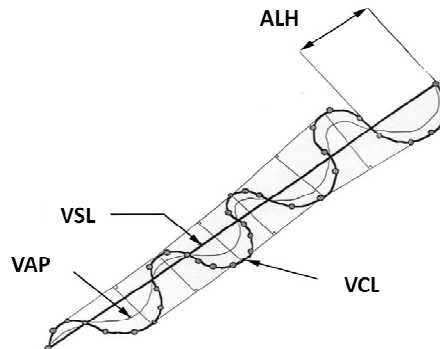
A criopreservação de sêmen tem sido estudada com diferentes protocolos em mais de 200 espécies de peixes de água doce tais como: truta, *Salmo trutta caspius* (SARVI et al., 2006), bagres, *Clarias gariepinus*, *Silurus glanis* e *Pangasius hypophthalmus* (VIVEIROS et al., 2000; LINHART et al., 2005; KWANTONG e BART, 2009), carpa, *Labeo rohita* (ROUTRAY et al., 2006) e mais de 32 espécies marinhas tais como salmão, *Oncorhynchus tshawytscha* (ROSENGRAVE, 2008), esturjão, *Acipenser sturio* (KOPEIKA et al., 2000) e vermelhos, *Lutjanus campechanus*, *Lutjanus argentimaculatus* (RILEY et al., 2004; VULTHIPHANDCHAI et al., 2009).

## 2.6 Análise de sêmen assistida por computador (CASA)

Os softwares que realizam análises de espermatozoides por computador (CASA) atuam como metodologia para o acesso rápido e complexo à qualidade espermática, seja da motilidade ou morfometria. Funciona de modo a capturar a imagem das posições sucessivas da cabeça dos diversos espermatozoides (simultaneamente) em movimento e integrando-as em forma de vídeo para calcular suas trajetórias e/ou suas características morfométricas (FAUVEL et al., 2010).

O sistema CASA descreve diferentes parâmetros da natação de espermatozoides, por exemplo, velocidade curvilínea (VCL), que descreve a velocidade do percurso real; velocidade retilínea (VSL), que descreve a velocidade progressiva entre o ponto inicial e final de percurso (em linha reta) realizado; velocidade do percurso (VAP), calculada pela média da velocidade curvilínea e velocidade em linha reta  $((VCL + VSL) / 2)$ ; frequência do batimento lateral da cauda (BLC), que descreve o número de ondas propagadas a partir da área proximal (próxima à cabeça) por segundo; amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH), que descreve a distância linear correspondente à mudança de direção da cabeça de um lado da trajetória linear ao lado oposto (se relaciona indiretamente com o BCF); dentre outros (figura 6). Analisa também parâmetros morfométricos como comprimento, largura, perímetro, área, elipsidade, regularidade, rugosidade da cabeça dos espermatozoides.

Figura 6 – Esquema ilustrativo dos parâmetros de motilidade espermática analisados pelo sistema CASA. VCL – velocidade curvilinear; VSL – velocidade retilinear; VAP – velocidade de percurso; ALH – amplitude de deslocamento lateral da cabeça.



Adaptado de Alavi et al. (2007)

Atualmente, dezenas de sistemas CASA estão disponíveis no mercado, mas deve-se atentar para alguns pontos. Estes softwares têm custo elevado, geralmente adaptado para capturar motilidades longas, com as de mamíferos. No entanto, pode-se adaptá-los para o uso com sêmen de peixes, caso o modelo escolhido consiga gerar os resultados em curtos períodos de tempo, para que se possa acessar a motilidade espermática de peixes, que é bastante breve (FAUVEL et al., 2010).

A maioria dos sistemas CASA é projetada para obter informações da cabeça em movimento, sendo a resolução da imagem insuficiente para permitir observações sobre o flagelo (COSSON, 2010).

Para análises de morfometria, estes softwares representam um método assaz objetivo e compreensível, em comparação aos demais (WILSON-LEEDY e INGERMANN, 2007). Por isso, o CASA tem sido empregado para determinar as variações individuais da qualidade espermática nas diferentes espécies (LAHNSTEINER e PATZNER, 1998), exercendo um papel fundamental na aquicultura, otimizando as condições de processamentos de dados (KIME et al., 2001).

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Locais de realização do estudo

O presente trabalho foi executado entre março de 2010 e dezembro de 2011, em duas etapas. A primeira dela se consistiu na estocagem e maturação dos animais e coleta de sêmen sendo realizada na Unidade de Pesquisa e Produção Marinha – UPPMAR, localizada no Centro de Estudos Ambientais Costeiros (CEAC) (figura 7) do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR) da Universidade Federal do Ceará (UFC).

O CEAC (S3°49', W38°25') está localizado próximo a Praia do Porto das Dunas (à 21 km de Fortaleza), situado às margens do estuário do Rio Pacoti e abrangendo uma área de 4,4 ha.

A segunda etapa consistiu na análise do sêmen coletado e foi realizada em sua totalidade no Laboratório de Biotecnologia da Reprodução de Peixes (LPRP), que se localiza do Núcleo Integrado de Biotecnologia da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará – UECE.

Figura 7– Vista aérea do CEAC. (A) UPPMAR; (B) Estuário do rio Pacoti.



### 3.2 Captura das matrizes, estocagem e manejo geral

Os exemplares de ariacó, *L. synagris*, foram capturados em várias incursões realizadas próximo à costa da praia do Mucuripe, em Fortaleza, Ceará. Os animais, juvenis e adultos, foram obtidos por meio de pesca com anzol entre março de 2010 e julho de 2011. Ao chegar ao laboratório os indivíduos foram cuidadosamente inspecionados e selecionados segundo a ausência de ectoparasitas e sinais de patologia (presença de ulcerações, exoftalmia, nadadeiras danificadas, dentre outros).

Os indivíduos foram em seguida estocados em tanque circular de fibra de vidro com volume útil de 10m<sup>3</sup>, localizado em um galpão coberto (figura 8), submetidos a um regime de recirculação de água com filtragem mecânica e biológica. A iluminação provinha de um sistema individualizado, constituído por refletores e duas lâmpadas de 160 W mantidos sob fotoperíodo controlado, com 14 horas de claro (05h00min às 19h00min) e 10 horas de escuro.

Figura 8 – Sistema de cultivo coberto na UPPMAR. No detalhe (A) o tanque de estocagem dos reprodutores utilizados neste estudo.



O regime alimentar obedecia a um trato diário com ração semi-úmida a base de peixe, camarão e concentrado protéico. Para a finalização do processo de

maturação gonadal, os peixes foram alimentados uma vez ao dia *ad libitum* alternando-se entre peixe (*Sardinella* spp.), camarão (*Penaeus* spp.) e lula (*Loligo* sp.).

### 3.3 Obtenção de sêmen

#### 3.3.1 Indução hormonal

A primeira etapa para a obtenção de sêmen foi a de verificação da condição de maturação gonadal dos peixes. Para tal, a coluna de água do tanque de estocagem era drenada para cerca de 30 cm. Os indivíduos eram capturados com o auxílio de um puçá, e seguiam para a anestesia. Esta era feita com banho em água contendo solução estoque de eugenol a 4%. A solução estoque de anestésico era preparada diluindo-se 100 mL de eugenol concentrado (Vetec®) em 900 mL de álcool etílico 98° (1:9). Os peixes eram mantidos imersos em tanque circular com capacidade de 100L até atingirem o estágio de completa anestesia.

Após a anestesia, os animais eram medidos com o auxílio de um ictiômetro, pesados em uma balança digital (Bel Instrumentos LTDA.), com precisão de 0,5 cm e 0,1 g, respectivamente (figura 9), e inspecionados quanto à liberação de sêmen sob leve pressão abdominal (figura 10).

As induções hormonais foram conduzidas utilizando-se injeções de gonadotrofina coriônica humana (hCG) (Chorulon, Intervet®) na base da nadadeira peitoral (figura 11), em dose única. A dosagem utilizada foi de 500UI/Kg de peso corpóreo em cada animal, 24 horas antes da coleta de sêmen.



Figura 9 – (A) Captura dos animais com o auxílio de puçás; (B) Imersão em solução anestésica (Eugenol 4%); (C) e (D) Biometria dos animais, medição e pesagem respectivamente.

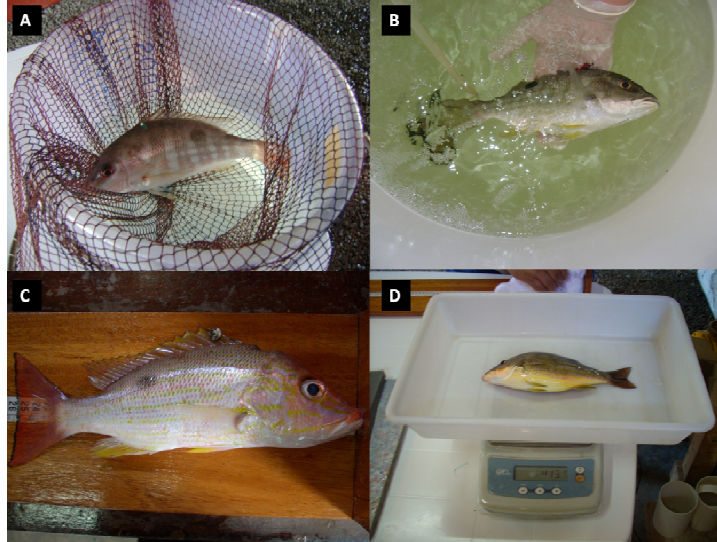


Figura 10 – Aplicação de pressão abdominal para a verificação da presença de sêmen como indicador de maturação gonadal nos machos de *L. synagris*.



Figura 11 – Aplicação de Gonadotrofina Coriônica Humana (HCG – Chorulon Intervet) em ariacó (*L. synagris*) para indução à espermição.



### 3.3.2 Coleta de sêmen

Após 24 horas da aplicação da dose hormonal indutora da espermição, os animais foram acessados para a coleta de sêmen. A coleta foi realizada após a anestesia dos reprodutores, como forma de minimizar o estresse dos animais e possibilitar uma maior precisão da técnica de coleta.

A anestesia foi feita como descrita anteriormente, com eugenol a 4%. Os peixes anestesiados eram colocados sobre base acolchoada e envoltos em toalha molhada para evitar qualquer injúria. Aplicava-se a massagem abdominal no sentido ântero-posterior para a extrusão do líquido seminal. Toda a região urogenital era limpa e seca com papel toalha evitando a contaminação do sêmen com fezes, urina ou muco. A coleta foi realizada com a utilização de seringas plásticas, descartáveis e graduadas de volume máximo de 3mL acopladas à cateteres especialmente ajustados para maior eficiência da coleta (figura 12).

As amostras coletadas eram verificadas quanto à ausência de motilidade espermática por meio de visualização em microscópio ótico (aumento 40x) de uma alíquota da mesma. A amostra só foi estocada para as análises subsequentes quando não havia sinais de ativação espermática e, portanto, de contaminação.

Figura 12 – Coleta de sêmen de ariacó (*L. synagris*) utilizando seringa graduada com cateter acoplado.



Em seguida o conteúdo seminal era transferido para *Eppendorfs* de 2 $\mu$ L, individualizados e armazenados em refrigerador, em temperaturas de aproximadamente 4°C.

Ao fim da coleta, as amostras eram acondicionadas em caixas térmicas de isopor contendo gelo em escama e, sem contato direto com o gelo, imediatamente transportadas até o LPRP - UECE aonde foram feitas as análises.

### 3.4 Análise de sêmen

#### 3.4.1 Aspectos físico-químicos

A cor foi determinada entre branco leitoso, branco amarelado, amarelo ou transparente e o aspecto do sêmen foi analisado segundo Velásquez-Medina (2008) como denso, semi-denso ou ralo.

A osmolaridade do sêmen fresco foi obtida com o auxílio de osmômetro eletrônico Roebling®.

O pH de sêmen fresco foi medido por peagâmetro digital com microeletrodo Hanna Instruments®.

### 3.4.2 Volume de sêmen ejaculado

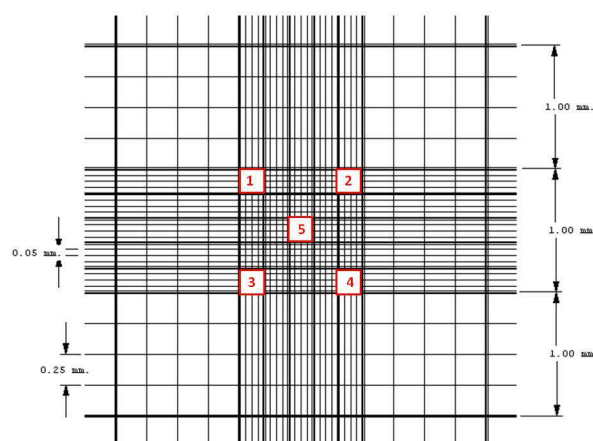
O sêmen foi coletado em seringas plásticas descartáveis de 3 mL e o volume aferido com precisão de 0,1 mL. Este parâmetro foi determinado individualmente de cada espécime.

### 3.4.3 Concentração espermática

A concentração espermática foi acessada em câmara de Neubauer a partir do sêmen fixado em solução de formol salino (0,1%) na proporção de 1:4000 (sêmen:formol salino). Uma alíquota de 10 $\mu$ L de sêmen fixado foi colocada sobre cada grade da câmara e levado ao microscópio óptico Nikon®, na objetiva de 40X.

As células foram contadas em duplicata por um único observador nos campos 1, 2, 3, 4 e 5 de cada grade de acordo com a figura 13.

Figura 13 – Esquema de contagem de células espermáticas na câmara de Neubauer. Foram considerados para contagem os quadrantes marcados em vermelho.



Os valores médios encontrados nas duas grades de contagem da câmara de Neubauer (n) foram multiplicados pelo fator de diluição:

$$n \times 200,05 \times 10^6$$

#### 3.4.4 Produção total de espermatozoides

A concentração de espermática ( $C_e$ ) juntamente com o volume de sêmen ejaculado ( $V$ ), de um mesmo indivíduo, é utilizada para estimar a produção total de espermatozoides durante um evento reprodutivo (TRIPPEL, 2003). É calculada pelo produto das duas variáveis:

$$C_e \times V$$

#### 3.4.5 Motilidade espermática

A motilidade espermática foi analisada pelo software SCA (*Sperm Class Analyzer*, SCA®2005, Microptics S.L., Espanha) que utiliza o sistema de análise CASA (*Computer Assisted Sperm Analyzer*).

Uma alíquota de 2 $\mu$ L de sêmen fresco foi colocada sobre a câmara de *Mackler*, ativada e homogeneizada com 100 $\mu$ L de água do sistema de cultivo a 1120 mOsm. As imagens foram analisadas imediatamente sob filtro pH1, na objetiva de 10X (figura 14). Foram consideradas as motilidades de, no mínimo 2000 espermatozóides por amostra de sêmen.

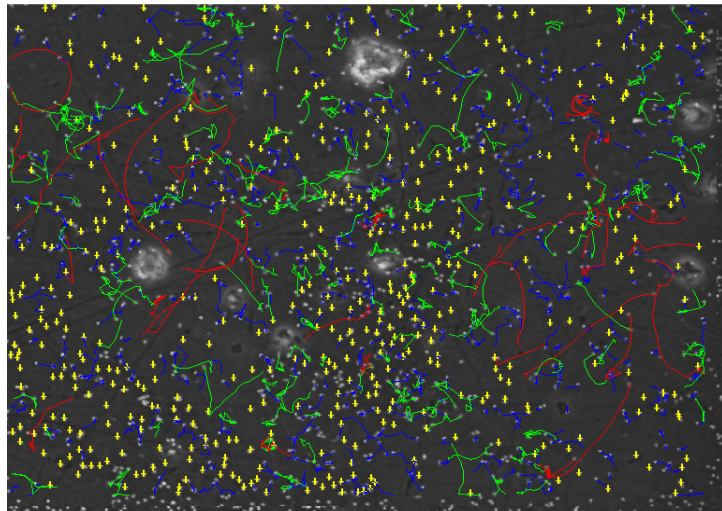
Os parâmetros considerados neste aspecto foram:

- a. Progressão: espermatozóides estáticos e com motilidade total (não progressiva e progressiva). Quantificados em porcentagem do total de espermatozoides presentes no campo de análise microscópico;
- b. Velocidade: rápidos e médios (com média de velocidade entre 20 e 42  $\mu$ m/s) e lentos (com velocidade média menor que 20  $\mu$ m/s),

quantificados em porcentagem do total de espermatozoides presentes no campo de análise microscópico. Também foram calculadas a retidão (VSL / velocidade média x 100) e oscilação da trajetória curvilínea, quantificadas em porcentagem. Foram particularizadas as velocidades curvilínea (VCL) (correspondente à velocidade do percurso real do espermatozoide, incluindo todo e qualquer desvio da cabeça do espermatozoide) e em linha reta (VSL) (correspondente à distância em linha reta entre o ponto inicial e final do percurso do espermatozoide, dividido pelo tempo decorrido entre o início e o final da motilidade) e velocidade de percurso (VAP) e foram quantificadas em  $\mu\text{m/s}$ .

- c. Amplitude: Deslocamento Lateral da Cabeça - ALH ( $\mu\text{m}$ ) e Frequência do Batimento Lateral da Cauda - BCF (Hz)

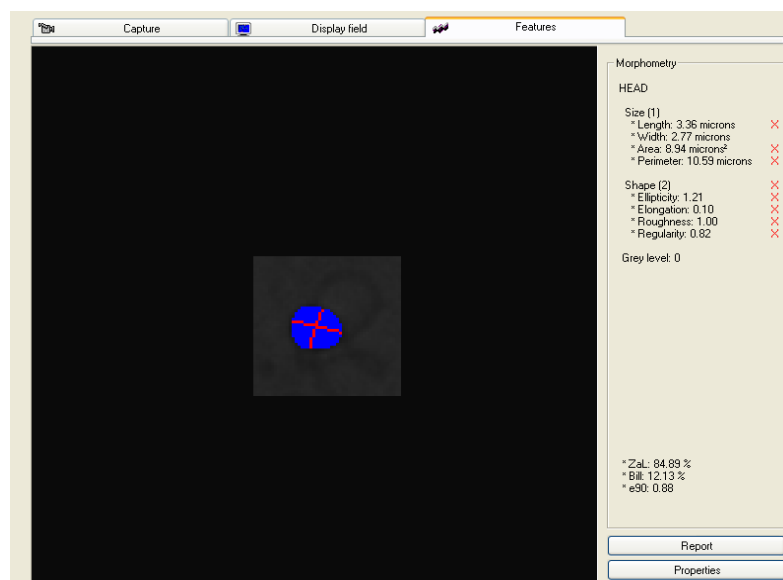
Figura 14 – Imagem capturada pelo software SCA<sup>®</sup> no momento da medição da motilidade espermática do sêmen de ariacó (*L. synagris*). Em vermelho a rota dos espermatozoides com velocidade progressiva rápida; em verde, progressiva lenta; em azul, não progressiva e em amarelo os espermatozoides imóveis.



### 3.4.6 Morfometria

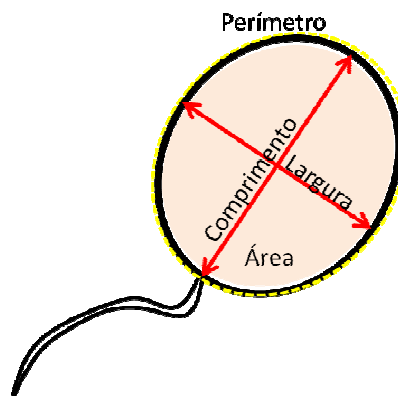
Para as análises de morfometria da cabeça do espermatozoide foi necessária a preparação de solução de sêmen fixado em formol salino (0,1%), na proporção de 1:10 (sêmen fresco:formol salino). Para a confecção do esfregaço foi pipetado uma alíquota de 2 $\mu$ L de sêmen fixado, o qual foi submetido à coloração com Panótico de Hemograma (um minuto submergido em cada estágio). Em seguida, a lâmina foi coberta com lamínula e levada para análise no software SCA<sup>®</sup>. As análises foram feitas sob filtro pH1 e aumento de 40x. O processo foi feito manualmente por um único observador, para que fosse evitada a escolha de partículas presentes na lâmina. O sistema computadorizado detectava os limites da cabeça dos espermatozoides lançando uma sombra azulada em cima da imagem captada. O observador descartou todas as células que não tiveram seu limite claramente delimitado pela sombra azulada (figura 15).

Figura 15- Imagem da cabeça de um espermatozoide de ariacó (*L. synagris*) captada e analisada pelo software SCA<sup>®</sup>.



Os parâmetros observados foram: comprimento (C), maior eixo da cabeça do espermatozoide (medido em  $\mu\text{m}$ ), largura (L), menor eixo da cabeça do espermatozoide (medido em  $\mu\text{m}$ ), perímetro (P), distância correspondente ao contorno da cabeça do espermatozoide (medido em  $\mu\text{m}$ ), área (A) medida de toda a superfície da cabeça do espermatozoide (medida em  $\mu\text{m}^2$ ) (figura 16). Destes dados o programa calculou elipsidade, rugosidade e regularidade. A elipsidade ( $C/L$ ) é a relação entre comprimento e largura. Quando é igual a 1, a cabeça do espermatozoide é considerada redonda, quando maior que um, um elipsoide. A rugosidade ( $4\pi A / P^2$ ) é a relação entre o perímetro de uma elipse e o perímetro da cabeça do espermatozoide. Quanto mais próximo de 1, mais uniforme é a superfície da cabeça do espermatozoide. A regularidade ( $\pi CL / 4A$ ) é a relação da área teórica de um elipsoide e da área real da cabeça do espermatozoide. Quanto mais próximo de 1, mais similar à forma da elipse. Foram analisados 200 espermatozoides de cada amostra de sêmen.

Figura 16 – Ilustração esquemática das medidas morfométricas analisadas pelo software SCA<sup>®</sup>.



### 3.4.7 Morfologia

Para a análise de morfologia dos espermatozoides foi necessária a formulação de solução de sêmen fixado em formol salino (0,1%), na proporção de 1:10 (sêmen:formol salino). Para a confecção do esfregaço foi pipetado uma alíquota



de 1 $\mu$ L de sêmen fixado, o qual foi submetido à coloração com Panótico de Hemograma (cinco minutos submerso em cada um dos três estágios). Após a secagem natural, as lâminas foram submetidas à varredura microscópica para a contagem e caracterização da morfologia e patologias espermáticas. A varredura foi realizada por um único observador.

A classificação das patologias espermáticas foi adaptada da técnica aplicada por Miliorini et al. (2011) para *Prochilodus lineatus* e considerou como patologias primárias os defeitos decorrentes do processo de espermatogênese, e secundárias os defeitos decorrentes da técnica de fixação e/ou esfregaço. A descrição das patologias apresenta-se no quadro 3.

Quando apresentada ambos os defeitos primários e secundários, a célula espermática foi classificada como portador de defeito primário. Quando apresentado mais de um defeito de uma mesma natureza na mesma célula, a classificação foi feita de acordo com o defeito que mais afeta a fertilização (CD> CF>CFE>MC/MIC ou CNL>CSD) (adaptada de Miliorini et al., 2011).

A contagem foi feita utilizando-se um contador manual (Digitimer) que registra até oito categorias. A varredura era interrompida sempre que a contagem total das células atingia média de 200 espermatozoides.

### 3.5 Análise estatística

Os parâmetros de concentração espermática, volume de sêmen ejaculado, produção total de espermatozoides, osmolaridade e pH foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão e calculado o coeficiente de variação pelo software Microsoft Office Excel<sup>®</sup> 2007, assim como as médias percentuais de anormalidades morfológicas  $\pm$  desvio padrão. Os dados de motilidade espermática foram obtidos a partir do software SCA<sup>®</sup> 2005, Microptics S.L. Os dados de morfometria foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) entre os machos utilizados neste estudo com  $p \leq 0,05$ , e quando houve diferença estatística à Teste de Tukey, ambos pelo software BioEstat 5.0.

Quadro 3 – Descrição das patologias analisadas em espermatozóides de ariacó (*L. synagris*) (adaptada de Miliorini et al., 2011).

| Natureza da Patologia | Tipo de Patologia               | Descrição   |
|-----------------------|---------------------------------|---|
| Primária              | Macrocefalia (MC)               | Espermatozóides apresentando cabeça grande  |
|                       | Microcefalia (MIC)              | Espermatozóides apresentando cabeça pequena   |
|                       | Cabeça degenerada (CD)          | Cabeça, livre ou não, apresentando contorno irregular   |
|                       | Cauda fraturada (CF)            | Cauda com fratura e ausência da porção final  |
|                       | Cauda fortemente enrolada (CFE) | Cauda enrolada em si mesma ou ao redor da cabeça. Inclui reflexo da parte final da peça intermediária |
| Secundária            | Cabeça normal livre (CNL)       | Cabeça sem cauda, sem alteração da forma  |
|                       | Cauda com simples dobra (CSD)   | Todas as dobras da cauda, exceto as enroladas em si mesmas ou ao redor da cabeça                      |

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Obtenção de sêmen

#### 4.1.1 Indução hormonal

A gonadotrofina coriônica humana (hCG), amplamente utilizada para induzir o término da maturação de peixes teleósteos de água doce (LEONARDO et al., 2004, LEVAVI-SIVAN et al., 2004) e água salgada (MATSUYAMA et al., 1998, WATANABE et al., 1995, LEU; CHOU, 1996; CAYLOR et al., 1994, SCHIAVONE et al., 2006), se mostrou eficaz na indução da espermição do ariacó, *L. synagris*. Previamente esta espécie já havia sido alvo de testes com este hormônio, tendo tido sucesso na obtenção de ovos fertilizados (PASSOS NETO, 2010).

#### 4.1.2 Coleta de sêmen

A massagem abdominal, como forma de extrusão de sêmen, não remove todo o líquido seminal dos testículos e ducto espermático, porém é o método mais utilizado em peixes cultivados (CAMPBELL et al., 1992; SANSONE et al. 2002; GAGE et al., 2002; DEGRAAF e BERLINSKY, 2004; SCHIAVONE et al., 2006; TUSET et al., 2008; GROISON et al., 2010) . A remoção dos testículos (YANG et al., 2006; TIERSCH et al., 2004; RILEY et al., 2004) também é utilizada para análises, porém implica, obviamente, na morte dos espécimes.

A coleta de sêmen em seringas graduadas acopladas a cateteres foi bem sucedida, uma vez que nenhuma amostra foi contaminada com muco, fezes ou urina. A contaminação com urina diminui a porcentagem de espermatozoides móveis, a velocidade de motilidade, a capacidade de fertilização e a possibilidade de estocagem (SUQUET et al., 2000).

A utilização do cateter promoveu a sucção do sêmen gradualmente a pequenos volumes possibilitando a interrupção da sucção sempre que houvesse extrusão de urina. Quando isto ocorria, era realizada a limpeza do poro urogenital com papel toalha e recomeçava-se a massagem abdominal e a sucção do sêmen expelido. A faixa de graduação da seringa possibilitou a aferência do volume de sêmen extrusado. Outros métodos de coleta já foram testados com sucesso (TUSET et al.,2008; GONDINHO et al 2003), porém, no presente trabalho, esta técnica pareceu ser a mais indicada.

## 4.2 Análise de sêmen

### 4.2.1 Cor e aspecto

Em todas as amostras do presente estudo o sêmen de *L. synagris* teve coloração branca leitosa e seu aspecto foi caracterizado como denso em todas as amostras obtidas. Segundo a pesquisa bibliográfica realizada neste trabalho não há relatos sobre a cor ou aspecto do sêmen de *L. synagris*. Campos (2006) afirmou que o sêmen de *L. peru* apresentou aspecto flúido após a indução hormonal com LHRHa, porém antes da indução aparentava ser pouco ou nada flúido.

### 4.2.2 Concentração espermática, volume de sêmen ejaculado, produção total de espermatozóides, osmolaridade e pH

A concentração média de células espermáticas no líquido seminal de ariacó foi de  $2,43 \pm 0,42 \times 10^{10}$  (tabela 1) e variou entre  $1,65 \times 10^{10}$  e  $2,92 \times 10^{10}$ . A concentração encontrada por Sanches e Cerqueira (2010) para a mesma espécie foi menor,  $2,2 \pm 0,2 \times 10^9$  espermatozóides/mL. Os espécimes utilizados neste trabalho foram mantidos em sistema de recirculação coberto, enquanto que os analisados por Sanches e Cerqueira (2010) estiveram submetidos às condições marinhas da costa

de Ubatuba-SP, o que pode ter influenciado na maior hidratação do sêmen e, conseqüentemente, em uma menor concentração espermática.

Para *L. argentimaculatus* (VUTHIPHANDCHAI et al., 2009) o valor de concentração espermática foi bastante similar e variou entre  $1.3 \times 10^{10}$  e  $2.8 \times 10^{10}$  espermatozoides/mL. Para outras espécies do mesmo gênero este valor foi menor: *L. peru* (CAMPOS, 2006), quando foi aplicada dose de LHRHa,  $4,8 \times 10^9$  espermatozoides/mL; *L. campechanus* (RILEY et al., 2004),  $1,0 \times 10^9$  espermatozoides/mL. Estes dados demonstram que há variação da concentração espermática entre espécies diferentes e dentro de uma mesma. Portanto, de acordo com Billard et al. (1995), ao se trabalhar com reprodução assistida de peixes, deve-se sempre avaliar este parâmetro, já que influencia de sobremaneira na fertilização.

Tiba et al. (2009), ao trabalharem com robalo, *Centropomus parallelus*, obtiveram resultado de  $2,5 \times 10^{10}$  espermatozoides/mL; Suquet et al. (2010) trabalhando com atum do Atlântico, *Thunnus tynnus*, obtiveram  $3,8 \pm 1,3 \times 10^{10}$  espermatozoides/ml. Já garoupa verdadeira *Epinephelus marginatus* (SANCHES et al., 2008) e *Merluccius merluccius* (GROISON et al., 2010) apresentaram valores de  $2,9 \pm 0,4 \times 10^9$  e  $6,6 \pm 3,2 \times 10^9$  espermatozoides/mL, respectivamente.

Fauvel et al. (1999) atestaram que em peixes marinhos a concentração espermática decresce durante a estação reprodutiva, já Rouxel et al (2008) relataram um aumento na concentração espermática seguido de um decréscimo em bacalhau da espécie *Gadus mohrua* L. Estes autores sugerem que a diferença encontrada dentro da estação reprodutiva deve-se ao envelhecimento das células espermáticas durante uma espermição descontínua. Estudos que avaliem a concentração espermática ao longo da estação reprodutiva são de grande importância para a obtenção de bons resultados quando da realização de reprodução assistida, indicando não somente quais espécimes utilizar, mas a melhor época de acasalar.

Tabela 1 – Valores médios  $\pm$  desvio padrão e coeficiente de variação das características seminais de *L. synagris*.

| <b>Características seminais</b>   | <b>Média <math>\pm</math> D.P.</b> | <b>C.V. (%)</b> |
|---|------------------------------------|-----------------|
| <b>Concentração espermática (x 10<sup>10</sup> espermatozóides/ mL)</b>     | 2,43 $\pm$ 0,42                    | 17,19           |
| <b>Volume de sêmen ejaculado (mL)</b>                                       | 0,39 $\pm$ 0,20                    | 51,28           |
| <b>Produção total de espermatozóides (x10<sup>10</sup> espermatozóides)</b> | 1,20 $\pm$ 0,73                    | 60,83           |
| <b>Osmolaridade (mOsm/Kg)</b>   | 378,5 $\pm$ 65,1                   | 17,2            |
| <b>pH</b>   | 7,9 $\pm$ 0,17                     | 2,15            |

O volume médio de sêmen extrusado obtidos das amostras de *L. synagris* no presente trabalho foi de 0,39  $\pm$  0,2 mL. Sanches e Cerqueira (2010), em experimento de resfriamento de sêmen de *L. synagris*, cultivados na costa de Ubatuba-SP, reportaram que o volume médio de sêmen ejaculado foi de 0,61  $\pm$  0,35 mL, sendo um pouco superior ao obtido nas presentes análises, porém se ponderados os valores de desvio padrão podem ser considerados similares.

Em se tratando de parâmetros que se correlacionam, como volume e concentração espermática, é esperado que quanto mais hidratado seja o sêmen (maior volume) menos concentrado ele esteja. E em se comparando indivíduos mantidos em cativeiro e em ambiente natural, o esperado é que aqueles estocados na natureza apresentem melhores índices seminais. Porém, quando utilizado tratamento hormonal (manipuladas as condições fisiológicas) a qualidade seminal dos animais estocados em tanques tende a ser semelhante à daqueles estocados na natureza. O contraste dos valores médios de volume de sêmen ejaculado entre os espécimes do presente trabalho (estocados em tanques cobertos) e os utilizados por Sanches e Cerqueira (2010) (estocados em tanques-rede na costa paulista) demonstram a superioridade do ambiente natural em relação à qualidade fisiológica dos peixes.

Segundo Vulthiphandchai et al. (2009), o volume expressivo coletado para *L. argentimaculatus* variou entre 0,6 e 3,1 mL. Para *L. peru* (CAMPOS, 2006), o volume médio coletado após indução hormonal com LHRHa foi de 3,13  $\pm$  1,04 mL, valor bastante acima dos encontrados para *L. synagris*.

O volume de sêmen ejaculado em *E. malabaricus*, reportado por Chao et al. (1992), foi menor que 0,5 mL, tendo sido similar ao valor médio apresentado para *L. syngnis* no presente estudo. Já em 2008, Sanches et al., trabalhando com *E. marginatus*, encontraram valores de 12 mL, bastante superiores aos encontrados em 1992 para *E. malabaricus* e para *L. syngnis*. O volume médio encontrado para *M. merluccius* (GROISON et al., 2010b) foi de 3,9 e 2,6 mL para espécimes da Noruega e França, respectivamente. O volume de sêmen ejaculado por *T. tynnus* (SUQUET et al., 2010) variou entre 0,1 - 5 mL, valores superiores aos de *L. syngnis*.

O resultado de volume de sêmen obtido neste trabalho teve alta variação (C.V. 51,28%). De acordo com Viveiros e Godinho (2009), o volume de sêmen é bastante variável em teleósteos. Esta característica sofre influência de vários fatores, como estado nutricional, peso do indivíduo, nível de maturação gonadal, tipo de indução e dose hormonal e técnica de coleta. Outros fatores como estação do ano, dosagem hormonal e o tempo entre a aplicação do hormônio e coleta de sêmen podem influenciar no volume coletado.

A produção total média de espermatozoides foi de  $1,20 \pm 0,73 \times 10^{10}$  espermatozoides por indivíduo. Este parâmetro considera a concentração de espermatozoides por mililitro e o volume médio de sêmen produzido por cada indivíduo. No caso de espécies que produzem pequenos volumes de sêmen, a produção total média de espermatozoides parece ser mais indicada para avaliar e definir a proporção de machos e fêmeas utilizada na hora da formação de casais quando da reprodução em cativeiro. Mesmo assim, trabalhos com concentração espermática são mais frequentes na literatura, e este parece ter sido o primeiro para teleósteos marinhos considerando a produção total de espermatozoides. O alto C.V. demonstra que este índice varia bastante e que, para o sucesso das reproduções assistidas, existe a necessidade da pré-seleção dos machos para a formação de casais.

Os valores médios de osmolaridade encontrados por Riley et al. (2008) para *L. griseus* e *L. campechanus* foram  $428 \pm 15$  e  $411 \pm 5$  mOsm/kg, respectivamente, sendo maiores que os valores encontrados para *L. syngnis* no presente trabalho que foi de  $378,5 \pm 65,1$  mOsm/kg.

Segundo Morisawa (1985) o plasma seminal de teleósteos apresenta osmolaridade média de 300 mOsm/kg, o que corrobora o valor encontrado neste trabalho. Groison et al., (2010), em estudo realizado com *M. merluccius*, encontrou valor médio de osmolaridade de  $349 \pm 28$  mOsm/Kg, Rouxel et al. (2008), encontrou valor médio de  $362,9 \pm 15$  mOsm/Kg para *G. morhua* valores bastante similares ao encontrado aqui.

A osmolaridade é um importante fator a ser considerado quando se trata de motilidade espermática, uma vez que a diferença de osmolaridade é o gatilho principal para o início da natação. A tolerância à diferença de osmolaridade já foi estudada para Lutjanídeos e diversas outras espécies e é variável interespecificamente. Segundo Rilley et al., (2008), a motilidade espermática de *L. campechanus* e *L. griseus* é totalmente suprimida quando a osmolaridade da solução ativadora (água salgada) é igual ou menor que 400mOsm . Em *Centropomus undecimalis* a motilidade é iniciada em osmolaridade de 370 mOsm e totalmente atingida com 680 mOsm (TIERSCH et al., 2004); em *Psetta maxima* (CHAUVAUD et al., 1995; DREANNO et al., 1999b) a motilidade é iniciada em osmolaridade maior ou igual a 300 mOsm/L; em *Dicentrarchus labrax* (DREANNO et al., 1999a), em osmolaridade maior ou igual a 400 mOsm/L. Em *Hippoglossus hippoglossus* e *Tunnus thynnus* (BILLARD et al., 1993; COSSON et al., 2007a), soluções compostas somente de NaCl e com osmolaridades entre 350 e 1200 mOsm/L permitem a motilidade.

É relevante salientar que dados de osmolaridade de sêmen de peixes que ocorrem na costa brasileira são raros na literatura. Segundo Cosson (2010), a regra geral para espécies marinhas é que o gradiente de osmolaridade externamente deve ser suficientemente diferente e positivo (ou negativo, em espécies dulcícolas) para o início da motilidade.

O valor médio de pH encontrado foi de  $7,9 \pm 0,17$  e teve baixo coeficiente de variação (2,15%). Vettorazzi et al. (2010), utilizando fitas graduadas, encontraram pH, 8,0 para o sêmen de *L. synagris*. O pH do sêmen de *M. merluccius* encontrado por Groison et al. (2010) foi de  $7,6 \pm 0,1$ , sendo um pouco menor que o encontrado neste trabalho. Este parâmetro pode sofrer mudanças significativas ao longo do período reprodutivo, como observou Rouxel et al. (2008) para *G. morhua*.



Estes autores encontraram valores variando de  $7,87 \pm 0,17$  a  $8,41 \pm 0,21$ , sendo esta variação atribuída ao envelhecimento das células durante o período de espermição descontínuo.

#### 4.2.3 Motilidade espermática

Os valores médios relacionados à velocidade da motilidade espermática estão descritos na tabela 2. A velocidade curvilinear atingiu uma média máxima de  $113,90 \mu\text{m/s}$ , e em linha reta de  $41,46 \mu\text{m/s}$ .

Nestas análises os espermatozóides de *L. synagris* apresentaram progressão total de 78,8%, sendo que somente 22,32% foram considerados de velocidade rápida a média. Vettorazzi et al. (2010) analisando subjetivamente a motilidade inicial do sêmen fresco de *L. synagris* encontraram valor de  $82,5 \pm 12,5\%$ . O valor encontrado no presente trabalho foi um pouco menor, porém a técnica empregada nas análises feitas aqui foi assaz mais rigorosa, já que é realizada por software.

Utilizando o mesmo método de análise (CASA), Tuset et al. (2008) demonstraram que a velocidade de natação de espermatozóides varia entre espécimes de bacalhau (*G. mohrua*) com um intervalo máximo de velocidade curvilinear de  $151,5\text{--}201,5 \mu\text{m/s}$ . Babiak et al. (2006), em estudos com linguado (*H. hippoglossus*), encontraram VCL de  $145 \mu\text{m/s}$ , já em merluzas (*M. merluccius*) (GROISON et al., 2010a) os resultados foram entre 69 e  $102 \mu\text{m/s}$ . Lahnsteiner e Patzner (1998) em estudo da motilidade espermática de quatro espécies marinhas mediterrâneas *Boops boops*, *Diplodus sargus*, *Mullus barbatus* e *Trachurus mediterraneus* encontraram valores de VCL de  $125,5 \mu\text{m/s}$ ,  $127,2 \mu\text{m/s}$ ,  $161,4 \mu\text{m/s}$  e  $119,4 \mu\text{m/s}$ . Em relação aos resultados obtidos no presente trabalho, podemos inferir que espermatozóides de *G. mohrua*, *H. hippoglossus*, *B. boops*, *D. sargus*, *M. barbatus* e *T. mediterraneus* atingem velocidade curvilineares maiores que as de ariacó.

Tabela 2 – Valores médios dos parâmetros da motilidade espermática do sêmen de ariacó, (*L. synagris*). Espermatozóides com velocidade entre 20 e 42 $\mu$ m/s foram considerados com velocidade rápida e média, e com velocidades <20 $\mu$ m/s, lentos.

| <b>Parâmetros</b>                                   | <b>Valores médios</b> |
|---|-----------------------|
| <b>Progressão (%)</b>                               |                       |
| Total   | 78,8                  |
| Estáticos   | 21,2                  |
| <b>Velocidade (%)</b>                               |                       |
| Rápidos/Médios                                      | 22,32                 |
| Lentos  | 56,5                  |
| Retidão   | 63,24                 |
| Oscilação da trajetória curvilínea                  | 67                    |
| <b>Velocidade (<math>\mu</math>m/s)</b>             |                       |
| Curvilínea (VCL)                                    | 35,13                 |
| Retilínea (VSL)                                     | 13,04                 |
| Velocidade de Percurso (VAP)                        | 22,14                 |
| <b>Amplitude</b>                                    |                       |
| Deslocamento Lateral da Cabeça - ALH ( $\mu$ m)     | 2,84                  |
| Frequência do Batimento Lateral da Cauda - BCF (Hz) | 4,04                  |

Para a velocidade retilínea, a tabela 3 sumariza alguns resultados de trabalhos com peixes marinhos. Os valores máximos obtidos neste trabalho de velocidade retilínea encontram-se similares àqueles com merluza e com bagre marinho da espécie *Anarhichas minor* (Anarhichadidae), uma espécie demersal setentrional. Porém quando comparado a outras espécies, este valor encontra-se inferior.

Tabela 3 – Valores experimentais de velocidade em linha reta de espermatozóides de algumas espécies de peixes marinhos.

| <b>Espécie (Referência)</b>   | <b>Velocidade em linha reta <math>\mu\text{m/s}</math></b> |
|---|--|
| <b><i>Anarhichas minor</i></b><br>(Kime & Tveiten, 2002)                            | 40–50  |
| <b><i>Merluccius merluccius</i></b><br>(GROISON et al., 2010a)                      | 51   |
| <b><i>Gasterosteus aculeatus</i></b><br>(Elofsson et al., 2003)                     | 80   |
| <b><i>Merluccius merluccius</i></b><br>(Cosson et al., 2007b)                       | 65–100   |
| <b><i>Hippoglossus hippoglossus</i></b><br>(Babiak et al., 2006)                    | 110  |
| <b><i>Dicentrarchus labrax</i></b><br>(Dreanno et al., 1999a; Abascal et al., 2007) | 120  |
| <b><i>Gadus morhua</i></b><br>(Cosson et al., 2007a, b)                             | 130  |
| <b><i>Solea senegalensis</i></b><br>(Cabrita et al., 2008)                          | 140–150  |
| <b><i>Thunnus thynnus</i></b><br>(Cosson et al., 2007a)                             | 215–230  |
| <b><i>Lutjanus synagris</i></b><br>(Dados obtidos neste estudo)                     | 23-63  |

Segundo Kime et al. (2001) os sistemas CASA foram primeiramente projetados para tratamentos de infertilidade em humanos, mas adaptações têm sido feitas para que a técnica tenha sucesso em teleósteos. Os espermatozóides da maioria dos teleósteos diferem dos de mamíferos nos seguintes aspectos: (1) as trajetórias dos espermatozóides de peixes são geralmente mais complexas; (2) a motilidade dura um curto período; (3) não apresentam acrossoma e penetram no ovócito através da micrópila. A procura da micrópila exige que o espermatozoide promova sucessivas evoluções ao redor do ovócito e, portanto, a análise da velocidade curvilínea é de suma importância. No presente estudo, foi observada uma maior velocidade curvilínea, em relação à velocidade linear, o que indica o grande potencial de fecundação dos espermatozóides de *L. synagris*.

Com relação à velocidade de percurso (VAP), o resultado obtido das amostras de sêmen de *L. synagris* foi de 22,14 $\mu\text{m/s}$ . Os resultados encontrados para *B. boops*, *D. sargus*, *M. barbatus* e *T. mediterraneus* por Lahnsteiner e Patzner (1998) foram de 70,2  $\mu\text{m/s}$ , 76,6  $\mu\text{m/s}$ , 92,2  $\mu\text{m/s}$  e 69,5  $\mu\text{m/s}$  respectivamente.

A velocidade de natação inicial parece ser aquela na qual os espermatozóides atingem sua maior velocidade, portanto, seria neste período o momento mais propício à fertilização, e assim o momento exato de uma possível inseminação artificial (COSSON, 2010).

O sêmen de *L. synagris* apresentou uma das menores velocidades espermática entre os teleósteos marinhos, e embora a variação da osmolaridade da solução ativadora não tenha sido investigada, é possível que o sêmen não tenha atingido sua total ativação com a solução utilizada neste trabalho.

Outro fator que influencia a qualidade do sêmen, mas pouco discutido na literatura, é a utilização de anestésicos nos procedimentos de manejo. Alguns autores relatam que a duração da motilidade espermática do sêmen diminui gradativamente com o aumento da concentração de anestésico. Para *Oncorhynchus mykiss* e *Carassius Gibelio*, quando anestesiados com eugenol, a duração da motilidade foi afetada, porém a porcentagem de células móveis, não (WAGNER et al., 2002; FARÁHI et al., 2011). Wagner et al. (2002) em seu estudo com *O. mykiss* testou ainda a influência de tricáina metano sulfonato (MS-222) e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e o resultado foi o mesmo de eugenol, duração da motilidade reduzida com o aumento da concentração do anestésico, e mesmo percentual de células móveis. Portanto, estudos mais aprofundados neste quesito são recomendados.

O resultado de retidão média e oscilação da trajetória curvilinear encontrado no presente trabalho foi de 63,24% e 67%, respectivamente. Tuset, et al. (2008), em análise do sêmen de *G. mohrua* após 30s de ativação da motilidade encontrou retidão média de 85,43% e 85% de oscilação da trajetória curvilinear.

Quanto ao deslocamento lateral da cabeça (ALH), Tuset, et al. (2008), em análise do sêmen de *G. mohrua* após 30s de ativação da motilidade encontrou valor de 1,9 µm; Lahnsteiner e Patzner (1998) em estudo com *B. boops*, *D. sargus*, *M. barbatus* e *T. mediterraneus* encontraram valores de 50,3µm, 43,6µm, 69,9µm e 48,9µm respectivamente.

Quanto à frequência de batimento lateral da cauda (BCF), Tuset, et al. (2008), em análise do sêmen de *G. mohrua* após 30s de ativação da motilidade encontrou valor de 7,9 Hz, valor acima do encontrado no presente estudo para *L. synagris*; enquanto que Lahnsteiner e Patzner (1998) em estudo da motilidade espermática de quatro espécies marinhas mediterrâneas *B. boops*, *D. sargus*, *M. barbatus* e *T. mediterraneus* encontraram valores de 0,7 Hz, 0,8 Hz, 0,8 Hz e 0,8 Hz, respectivamente, valores abaixo dos encontrados para *L. synagris*.

Segundo Cosson (2010), a frequência do batimento lateral da cauda é máxima no momento da ativação da motilidade e envolve alto consumo de energia. Uma elevada frequência significaria um alto consumo de energia, e poder-se-ia esperar um curto período de motilidade total. Todavia o mesmo autor ressalta que a amplitude e o comprimento de onda (e não só a frequência do batimento) também influenciam na exaustão energética da célula espermática. Segundo Pavlov (2006) os parâmetros de ALH e BCF são raramente utilizados para caracterização de qualidade seminal de peixes.

Mundialmente o sistema CASA já foi utilizado em estudos com *Acipenser fulvescens*, *Psetta maxima*, *Hippoglossus hippoglossus*, *Pargus major*, *Dicentrarchus labrax*, *Sparus aurata*, *Merluccius merluccius* L, *Thunnus thynnus* (TOTH et al., 1997; DREANNO, et al., 1999c; BABIAK et al., 2006; OTTESEN et al., 2008; LIU et al., 2007; ABASCAL et al., 2007; ZILI et al., 2008; GROISON et al., 2010a; SUQUET e tal., 2010), porém é interessante ressaltar a pouca quantidade de trabalhos que se utilizam do sistema CASA para análises de motilidade de sêmen de teleósteos marinhos e ainda menos com os de ocorrência na costa brasileira. Pela pesquisa bibliográfica realizada neste trabalho este seria um dos primeiros a relatar resultados decorrentes das análises de sêmen de peixe no Brasil e o primeiro para uma espécie marinha.

#### 4.2.4 Morfometria

Este trabalho provou que a técnica de coloração de espermatozoides de *L. synagris* com Panótico de Hemograma é possível e factível. O software SCA®, mais utilizado para análises espermáticas em mamíferos, foi utilizado com sucesso nas análises de morfometria espermática de peixe apresentando resultados dentro do esperado. O Panótico de Hemograma demonstrou ser um corante adequado em se tratando de delimitar o contorno da célula espermática permitindo o acesso à análise computadorizada. O filtro pH1 apresentou excelente contraste aliado às configurações de brilho do SCA®

Quanto à morfometria da cabeça dos espermatozoides de *L. synagris* foram visualizadas duas formas: arredondada e sutilmente elíptica, sendo a elipsidade média de 1,12. Os espermatozoides apresentaram superfície bastante uniforme (rugosidade média 1,01) e não apresentaram acrossoma. Segundo a análise de variância, houve diferença significativa entre a elipsidade média da cabeça dos espermatozoides dos cinco machos utilizados neste estudo. Tuset et al. (2008), em estudo de morfometria de sêmen de bacalhau (*G. morhua*) encontraram dois grupos distintos de espermatozoides quanto à forma da cabeça. Oitenta e cinco por cento e meio de espermatozoides com cabeça alongada (elipsidade média de 1,72), contra 14,5% com cabeça arredondada (elipsidade média de 1,09). Já o espermatozoide de esturjões apresenta-se fundamentalmente diferente, com acrossoma e forma alongada (PSENICKA et al, 2011).

Os valores médios de comprimento, largura, área, perímetro, rugosidade, regularidade e da análise de variância entre os valores médios, de tamanho e forma da cabeça, obtidos das amostras de cada macho encontram-se na tabela 4.

Tabela 4 – Valores médios ( $\pm$  desvio padrão) de tamanho e forma da cabeça de espermatozoides de *L. synagris*. Letras iguais na mesma linha representam ausência de diferença significativa para teste Tukey com  $p \leq 0,05$ .

| Característica                                    | Macho 1<br>(n= 200)           | Macho 2<br>(n= 200)           | Macho 3<br>(n= 200)           | Macho 4<br>(n= 200)           | Macho 5<br>(n= 200)           | Média<br>(n= 1000) |
|---|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------|
| <b>Comprimento<br/>(<math>\mu\text{m}</math>)</b> | 3,08 $\pm$ 0,38 <sub>ab</sub> | 3,16 $\pm$ 0,21 <sup>ac</sup> | 2,79 $\pm$ 0,24 <sup>d</sup>  | 3,03 $\pm$ 0,36 <sup>b</sup>  | 3,23 $\pm$ 0,3 <sup>c</sup>   | 3,06               |
| <b>Largura<br/>(<math>\mu\text{m}</math>)</b>     | 2,83 $\pm$ 0,35 <sup>a</sup>  | 2,82 $\pm$ 0,17 <sup>a</sup>  | 2,49 $\pm$ 0,24 <sup>b</sup>  | 2,67 $\pm$ 0,28 <sup>c</sup>  | 2,85 $\pm$ 0,25 <sup>a</sup>  | 2,73               |
| <b>Área<br/>(<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>      | 7,93 $\pm$ 1,52 <sup>a</sup>  | 8,00 $\pm$ 0,57 <sup>a</sup>  | 6,48 $\pm$ 0,78 <sup>b</sup>  | 7,43 $\pm$ 1,19 <sup>c</sup>  | 8,32 $\pm$ 1,12 <sup>d</sup>  | 7,63               |
| <b>Perímetro<br/>(<math>\mu\text{m}</math>)</b>   | 9,90 $\pm$ 1,08 <sup>a</sup>  | 9,97 $\pm$ 0,40 <sup>a</sup>  | 8,91 $\pm$ 0,58 <sup>b</sup>  | 9,57 $\pm$ 0,90 <sup>c</sup>  | 10,18 $\pm$ 0,74 <sup>d</sup> | 9,70               |
| <b>Elipsidade</b>                                 | 1,10 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup>  | 1,12 $\pm$ 0,09 <sup>ab</sup> | 1,13 $\pm$ 0,13 <sup>ab</sup> | 1,14 $\pm$ 0,11 <sup>b</sup>  | 1,14 $\pm$ 0,11 <sup>b</sup>  | 1,12               |
| <b>Rugosidade</b>                                 | 1,01 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>  | 1,01 $\pm$ 0,02 <sup>ab</sup> | 1,02 $\pm$ 0,02 <sup>c</sup>  | 1,01 $\pm$ 0,02 <sup>ab</sup> | 1,01 $\pm$ 0,02 <sup>ab</sup> | 1,01               |
| <b>Regularidade</b>                               | 0,87 $\pm$ 0,06 <sup>ab</sup> | 0,88 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>  | 0,84 $\pm$ 0,06 <sup>c</sup>  | 0,86 $\pm$ 0,06 <sup>bc</sup> | 0,87 $\pm$ 0,05 <sup>ab</sup> | 0,86               |

Marco-Jiménez et al. (2008) utilizou o mesmo software (SCA<sup>®</sup>) para a avaliação da morfometria da cabeça dos espermatozoides de *Sparus aurata* e *Diplodus puntazzo* (família Sparidae) e encontrou valores de comprimento de 1,97  $\pm$  0,01 e 2,57  $\pm$  0,01  $\mu\text{m}$ ; largura, 1,80  $\pm$  0,01 e 2,22  $\pm$  0,02  $\mu\text{m}$ ; área, 3,16  $\pm$  0,03 e 4,44  $\pm$  0,02  $\mu\text{m}^2$  e perímetro 6,52  $\pm$  0,04 e 7,70  $\pm$  0,02  $\mu\text{m}$ , respectivamente para as duas espécies. Os dados permitem concluir que os espermatozoides de ariacó são

em torno de 40% e 24% maiores que os de *S. aurata* e *D. puntazzo*. Os autores ainda relataram que, em ambas as espécies, a cabeça dos espermatozoides apresentou-se arredondada, porém não citaram em seus resultados os valores de elipsidade, que confirmam a afirmação.

Para os espermatozóides de cabeça arredondada de *G. mohrua* (TUSET et al. 2008) o valor médio de comprimento de cabeça foi 2,15  $\mu\text{m}$ , o de largura foi 1,98  $\mu\text{m}$ , a área foi 3,65  $\mu\text{m}^2$  e o perímetro foi 6,83  $\mu\text{m}$ ; já para os de cabeça alongada estes valores foram de 3,10  $\mu\text{m}$ , 1,81  $\mu\text{m}$ , 4,84  $\mu\text{m}^2$  e 8,39  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Quando ao contorno da cabeça dos espermatozóides, os resultados obtidos para *G. mohrua* (TUSET et al., 2008), de cabeça arredondada, foram para elipsidade média, 1,09, para rugosidade, 0,98, e regularidade, 0,92. Estes resultados foram considerados similares aos obtidos para *L. synagris*.

Lahnsteiner e Patzner (1998) em estudo com quatro espécies marinhas mediterrâneas *B. boops*, *D. sargus*, *M. barbatus* e *T. mediterraneus* encontraram valores de comprimento da cabeça de 2,6  $\mu\text{m}$ , 2,6  $\mu\text{m}$ , 3,4  $\mu\text{m}$  e 3,9  $\mu\text{m}$ , respectivamente, sendo os espermatozóides de *B. boops* e *D.sargus* em torno de 15% menores que os de *L. synagris* e os de *M. barbatus* e *T. mediterraneus* bastante similares.

Pode-se observar que a morfometria dos espermatozóides é bastante peculiar a varia consideravelmente dentro de uma mesma espécie. O sistema de análise de sêmen auxiliado por computador (CASA) tem sido utilizado para análise dos parâmetros de motilidade espermática (FAUVEL et al., 2010), porém são raros os relatos de dados morfométricos para teleósteos em geral. No Brasil, um dos primeiros trabalhos foi desenvolvido por Melo (2010), no LPRP – UECE, para piraptinga (*Piaractus brachypomus*), peixe dulcícola amazônico. Melo avaliou o efeito de diferentes diluidores e crioprotetores em sêmen fresco e congelado. Os valores médios de comprimento, largura, perímetro, área, elipsidade, rugosidade e regularidade da cabeça de espermatozoides de sêmen fresco foram  $3,48 \pm 0,14 \mu\text{m}$ ,  $2,39 \pm 0,04 \mu\text{m}$ ,  $10,06 \pm 0,44 \mu\text{m}$ ,  $7,52 \pm 0,53 \mu\text{m}^2$ ,  $1,45 \pm 0,03 \mu\text{m}$ ,  $0,96 \pm 0,04 \mu\text{m}$  e  $0,87 \pm 0,05 \mu\text{m}$ .

Segundo estudo conduzido por Noveiri et al. (2006), que relacionou as medidas morfométricas da cabeça de espermatozoides de *Acipenser persicus* com

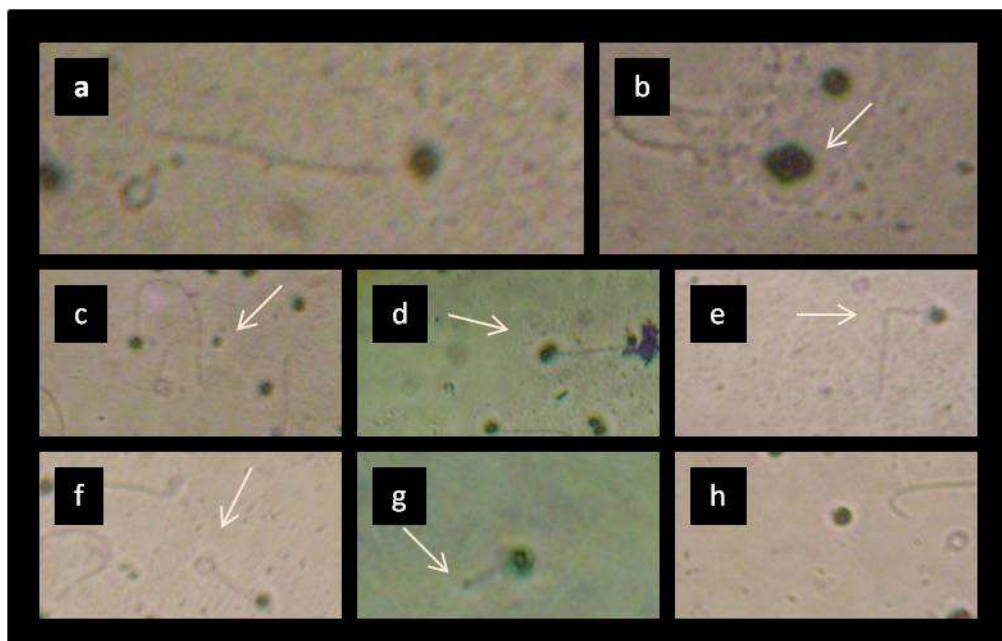
as medidas morfométricas dos reprodutores, existe uma fraca ou nenhuma relação entre peso, comprimento e fator de condição do reprodutor e comprimento total do espermatozoide.

#### 4.2.5 Morfologia

Segundo a análise morfológica, os espermatozoides regulares (41,15%) de *L. synagris* apresentam cabeça circular, sem acrossoma e um único flagelo (figura 17 - a). As anormalidades e suas ocorrências encontram-se expostas na tabela 5.

O percentual de patologias primárias observadas neste estudo foi 34,6%, e o de secundárias foi 24,25%. As deformidades morfológicas estão associadas com deficiências funcionais e influenciam negativamente a motilidade espermática e consequentemente a habilidade de fertilização (RURANGWA et al., 1998).

Figura 17 – Imagens de espermatozoides de *L. synagris* normal (a); com macrocefalia (b); microcefalia (c); cabeça degenerada (d); Cauda com simples dobra (e); cauda fortemente enrolada (f); cauda quebrada (g) e cabeça normal livre (h). As setas indicam as anormalidades detectadas. Imagens obtidas de microscópio ótico aumento 40x.





Trabalhos explorando a morfologia dos espermatozoides e suas patologias para peixes marinhos ainda são raros. Streit Jr et al. (2009), analisando os efeitos do congelamento no sêmen de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, encontraram média de 59,87% de espermatozoides *in natura* apresentando pelo menos uma patologia, sendo que destes, 46,73 apresentaram pelo menos uma patologia primária e 13,14% pelo menos uma patologia secundária. Em relação ao ariacó, o percentual de patologias total encontra-se bastante parecido. Galo et al. (2011), em trabalho com piracanjuba, *Brycon obgnyanus*, encontraram um percentual de  $62,20 \pm 17,86$  de espermatozoides normais, no sêmen *in natura*, valor acima do encontrado para *L. synagris*.

Tabela 5 – Anormalidades dos espermatozoides presentes no sêmen de *L. synagris*. Valores médios expressos em porcentagem  $\pm$  desvio padrão. MC – Macrocefalia; MIC – Microcefalia; CD – Cabeça degenerada; CF – Cauda fraturada; CFE – Cauda fortemente enrolada; CNL – Cabeça normal livre; CSD – Cauda com simples dobra.

| Natureza da Patologia             | Tipo de patologia | Porcentagem $\pm$ D.P. | Total        |
|-----------------------------------|-------------------|------------------------|--------------|
| 1 <sup>a</sup>                    | MC                | 0,37 $\pm$ 0,69        | 34,6         |
|                                   | MIC               | 0,06 $\pm$ 0,18        |              |
|                                   | CD                | 0,87 $\pm$ 1,18        |              |
|                                   | CF                | 10,19 $\pm$ 3,96       |              |
|                                   | CFE               | 23,11 $\pm$ 7,70       |              |
| 2 <sup>a</sup>                    | CNL               | 17,91 $\pm$ 12,05      | 24,25        |
|                                   | CSD               | 6,34 $\pm$ 4,36        |              |
| <b>Total de anormalidades (%)</b> |                   |                        | <b>58,85</b> |

Lesões na cabeça do espermatozoide, como edemas, relatado por Cosson et al. (1999), estão relacionadas a um meio hiposmótico, em que a osmolaridade do meio diluidor é a principal responsável pelas injúrias provocadas nas caudas e na cabeça dos espermatozoides. Então, pode-se supor que a macrocefalia tenha surgido devido a um possível choque osmótico atribuído ao fixador utilizado neste trabalho, embora não tenha sido verificada sua osmolaridade.

Embora as técnicas de coloração possam produzir alterações morfológicas, ou mascarar defeitos no núcleo espermático, as anormalidades, em geral, são melhores detectadas com a aplicação destas técnicas (CHACÓN, 2001).

O formato e tamanho da cabeça dos espermatozoides pode ser um dos pré-requisitos para a penetração na micrópila (GINSBURG, 1972). Diferentes formatos de cabeça são encontrados para teleósteos (ALAVI et al., 2009). De acordo com o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998) existem valores máximos desejáveis para anomalias morfológicas não interferirem nas taxas de fertilização (equinos e bovinos 30%; carneiros e javalis 20%). Porém, não há valores oficiais definidos para peixes.

## 5. CONCLUSÃO

Como a piscicultura marinha se expande, há a necessidade crescente de aplicar técnicas de preservação de gametas, devendo-se conhecer a fisiologia dos peixes cultivados e conseqüentemente, a biologia dos espermatozoides.

O alto valor de coeficiente de variação da produção total de espermatozoides e volume extrusado encontrado no presente estudo sugere a necessidade de selecionar os machos para a formação de casais quando da reprodução assistida, como meio de maximizar a taxa de fertilização.

No presente estudo, a utilização do sistema Computadorizado de Análise de Sêmen (CASA) para a avaliação da motilidade espermática e da morfologia da cabeça dos espermatozoides do sêmen de *Lutjanus synagris* foi bem sucedida, e mostrou ser um método prático para a avaliação de grande número de espermatozoides.

Os espermatozoides de *L. synagris* apresentaram uma das menores velocidades curvilíneas e em linha reta entre os teleósteos marinhos já estudados sob este parâmetro.

A cabeça dos espermatozoides de *L. synagris* apresenta-se com duas formas distintas, arredondadas e sutilmente elípticas.

Foi observada uma alta porcentagem de deformidades primárias nos espermatozoides de *L. synagris*.

Os resultados gerados por este trabalho podem ser aplicados em trabalhos futuros com conservação de sêmen, ajudando a elucidar questões envolvidas, por exemplo, aos danos causados por diluidores e criopreservantes.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando os resultados deste estudo, recomenda-se a investigação dos parâmetros seminais durante toda a estação reprodutiva, como meio se determinar a melhor época para acasalar e os melhores espécimes a serem utilizados.

Também é relevante a condução de testes de fertilização para saber qual a dose inseminante de espermatozoides, bem como para o completo entendimento da relação existente entre os parâmetros seminais e a taxa de fertilização.

De acordo com a literatura, a utilização de anestésicos no processo de coleta de sêmen parece influenciar as características seminais. Recomenda-se que sejam realizados testes para a confirmação ou exclusão desta hipótese.

## REFERÊNCIAS

- ABASCAL, F. J., COSSON, J. & FAUVEL, C., Characterization of sperm motility in European sea bass. The effect of heavy metals and physicochemical variables on sperm motility. **Journal of Fish Biology**, v.70, p.509–522, 2007.
- AFZELIUS, B. A., Fine Structure of the Garfish Spermatozoon, **Journal Of Ultrastructure Research**, v.64, p.309-314, 1978.
- AGUIAR, P.H.P., ABREU, J.J., COSTA, M.E.L.T. et al. Coleta e avaliação de sêmen canino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.46, n.5, p.537-544, out. 1994.
- AGUIAR, P.H.P., ANDRADE, V.J., ABREU, J.J. et al. Aspectos físicos e morfológicos e pH do sêmen de reprodutores bubalinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.48, n.3, p.325-331, jun. 1996.
- ALAVI, S.M.H, COSSON, J.J., COWARD, K., RAFIEE, G., **Fish Spermatology**, Alpha Science International LTDA., Oxford, UK, 2007
- ALAVI, S.M.H, RODINA, M., VIVEIROS, A. T.M., COSSON, J., GELA, D., BORYSHPOLETS, S., LINHART, O., Effects of osmolality on sperm morphology, motility and flagellar wave parameters in Northern pike (*Esox lucius* L.), **Theriogenology**, v.72, p.32–43, 2009.
- ALEGRIA, J. R. C. & MENEZES, M. F. Edad y crecimiento del ariacó, *Lutjanus synagris* (Linnaeus), em el Nordeste del Brasil. **Arquivo de Ciências do Mar**, v. 10, n. 1, p. 65-68, 1970.
- ALLEN, G. R. Snappers of the world: an annotated and illustrated catalogue of lutjanid species know to date. **FAO Fish Synopsis**, v.6, n.125, p.1-280, 1985.
- BABIAK, I.; OTTESEN, O.; RUDOLFSSEN, G.; JOHNSEN, S., Quantitative characteristics of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L., semen throughout the reproductive season. **Theriogenology**, v.65, p1587–1604, 2006.

BARROS, M.; CORREA, J; MANJARRES, L., Análisis biológico pesquero del pargo rayado *Lutjanus synagris* (Linnaeus, 1758) en el área de Santa Marta, Caribe colombiano: **Boletín Científico INPA**, v.4, p.79-105, 1996.

BARRET, I. 1951. Fertility of salmonid eggs and sperm after storage. Em: STOSS, J.; BÜYÜKHATİPOĞLU, S.; HOLTZ, W. Short-term and cryopreservation fo raibow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) sperm. **Ann. Boil. Anim. Bioch. Biophys.** v. 18, p. 10777-1082. 1978.

BARTH, A. D. & OKO, R.J., **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames, Iowa State University Press, 285 p., 1989, Disponível em [http://books.google.com.br/books?printsec=frontcover&vid=LCCN89001770&redir\\_e sc=y#v=onepage&q&f=false](http://books.google.com.br/books?printsec=frontcover&vid=LCCN89001770&redir_e sc=y#v=onepage&q&f=false). Acesso em fevereiro de 2012.

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

BLAXTER, J.H.S., 1953. Sperm storage and cross-fertilization of spring and autumn spawning herring. In: RILEY, K. L. Cryopreservation of sperm of red snapper (*Lutjanus campechanus*). **Aquaculture**, v. 238, p.183–194, 2004.

BENETTI, D. D., et al., Growth, survival and feed conversion rates of hatched reared Mutton Snapper *Lutjanus anilis* cultured in floating net cages, **Journal of Aquaculture Society**, v. 33(3), p. 349-357, 2002.

BILLARD, R., Ultrastructure comparée de spermatozoïdes de quelques poissons téléostéens. In: **Fish Spermatology** (Alavi, S. M. H., Cosson, J. J., Coward, K. & Rafiee, G., eds.), cap.2, p. 63–102. Oxford: Alpha Science, 2007.

BILLARD, R., Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species, **Reprod. Nutr. Develop.**, v.26, p.877–920, 1986.

BILLARD, R., Endocrinology and fish culture, **Fish Physiol. Biochem.**, v.7,p. 49–58, 1989.

BILLARD, R., Changes in structure and fertilizing ability of marine and fresh water fish spermatozoa diluted in media of various salinities, **Aquaculture**, v.14, p.187–198, 1978.

BILLARD, R., COSSON, J. & CRIM, L. W., Motility and survival of halibut sperm during short term storage. **Aquatic Living Resources**, v.6, p.67–75, 1993.

BILLARD, R.; COSSON, J.; CRIM, L. W.; SUQUET, M., 1995: Sperm physiology and quality. In: N. R. BROMAGE, R. J. ROBERTS, **Broodstock management and egg and larval quality**. (Eds). Cambridge University Press, Cambridge, pp. 25–52.

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

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

BLOM, E., The ultrastructure of some characteristic sperm defect and a proposal for a new classification of bull spermogram. **Nord. Vet. Med.**, v.25(7-8), p.383-91, 1973.

BORGES, A., SIQUEIRA, D.R., JURINITZ, D.F., Biochemical composition of seminal plasma and annual variations in semen characteristics of jundiá *Rhamdia quelen* (Quoyand Gaimard, Pimelodidae). **Fish Physiology and Biochemistry**, v.31, p. 45-53, 2005.

BOZA-ABARCA, J., CALVO-VARGAS, N SOLIS-ORTIZ, J KOMEN, Induced spawning and larval rearing of spotted rose snapper, *Lutjanus guttatus*, at the Marine Biology Station, Puntarenas, Costa Rica, **Ciencias Marinas**, v.34(2), p. 239–252, 2008.

CABRERA, J.R., T.C., BARRIOS e J.M., QUIJADA, Inducción al desove del pargo de mangle, *Lutjanus griseus*, Linnaeus (Pisces: Lutjanidea), sexualmente maduro en cativeiro. **Arq. Cien. Mar.**, v.31, p. 57-63, 1998.

CABRITA, E., MARTINEZ-PASTOR, F., SOARES, F. & DINIS, M. T. (2008). Motility activation and subpopulation analysis in *Solea senegalensis* spermatozoa. *Cybium* 32, 185–186.

CAMPBELL, P.M., T.G. POTFINGER, J.P. SUMPTER, Stress Reduces the Quality of Gametes Produced by Rainbow Trout, **Biology Of Reproduction**, v.47, p.1140-1150, 1992.

CAMPOS, V.T.P., **Inducción a la ovulación y espermiogénesis en el huachinango del Pacífico *Lutjanus peru* (Nichols y Murphy, 1922) y almacenamiento de su semen**. Tese de Mestrado (Maestro en Ciencias con Especialidad en Manejo de Recursos Marinos). Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, Instituto Politécnico Nacional. La Paz, Bolívia, 2006.

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

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

CARNEIRO P. C. F.; SEGUI M. S.; IÓRIS-FILHO C. R.; MIKOS J. D. Viabilidade do sêmen do jundiá, *Rhamdia quelen*, armazenado sob refrigeração. **Revista Acadêmica**, v.4, n.3, (no prelo), 2006.

CASSINELLO, J., ABAIGAR, T., GOMENDIO, M. et al. Characteristics of the semen of three endangered species of gazelles (*Gazella dama mhorr*, *G. dorcas neglecta* and *G. cuvieri*). **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v.113, n.1, p.35-45, may. 1998.

CAYLORA, R.E., P.M. BIESIOT, J.S. FRANKS, Culture of cobia (*Rachycentron canadum*): cryopreservation of sperm and induced spawning, **Aquaculture**, v.125(1-2), p. 81-92, 1994.

CBRA - COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal**, 2. ed. Belo Horizonte: CBRA, 49p. 1998.

CHACÓN, J.:. Assessment of sperm morphology in zebu bulls, under field conditions in the tropics. **Rep. Dom. Anim.** v.36, p.91, 2001.



CHAO, N.H., TSAI, H.P., LIAO, I.C., Short and long term Cryopreservation of sperm and sperm suspension of the grouper, *Epinephelus malabaricus* (Block and Schineider), **Asian Fisheries Science**, v.5, p.103-116, 1992.

CHAUVAUD. L., COSSON, J., SUQUET, M. & BILLARD, R., Sperm motility in turbot, *Scophthalmus maximus*, initiation of movement and changes with time of swimming characteristics. **Environmental Biology of Fish**, v.43,p. 341–349, 1995.

CHOW, S.; CLARKE, M.E.; WALSH, P.J. PCR-RFLP analysis on thirteen western Atlantic snappers (subfamily Lutjaninae): a simple method for species and stock identification. **Fishery Bulletin**, [Seattle], v.91, n. 4, p.619-627, nov. 1993.

CLARO, R. Ecología y ciclo de vida de la biajaiba, *Lutjanus synagris* (Linnaeus), en la plataforma cubana. II - biología pesquera, **Rep. Invest. Inst. Oceanol.**, v.177, p.1-53, 1981.

CLARO, R. Ecología y ciclo de vida de la biajaiba, *Lutjanus synagris* (Linnaeus), en la plataforma cubana. III - nutrición, **Ciências Biológicas.**, v.6, p.93-110, 1981.

CLARO, R. Ecología y ciclo de vida de la biajaiba, *Lutjanus synagris* (Linnaeus), en la plataforma cubana. IV – reproducción. **Rep. Invest. Inst. Oceanol.**, v 5, p.1-37. 1982.

COSSON, J, ET AL., Moviments of fish sperm flagella studied by high speed videomicroscopy coupled to computer assisted image analyses. **Pol. Arch. Hydrobiol.**, v.44, p.103, 113, 1997.

COSSON, J., DREANNO, C., BILLARD, R., SUQUET, M. and CIBERT, C., 1999. Regulation of axonemal wave parameters of fish spermatozoa by ionic factors. In GAGNON, C. (org.). **The male gamete: From basic science to clinical applications**. Cache River Pres, 516 p. 1999.

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. (2007a). Methods to analyse the movements of fish spermatozoa and their flagella In ALAVI, S. M. H., COSSON, J. J., COWARD, K. & RAFIEE, G., **Fish Spermatology**, cap. 2, pp. 63–102. Oxford: Alpha Science, 2007.

COSSON, J. (2007b). The motility apparatus of fish spermatozoa. In ALAVI, S. M. H., COSSON, J. J., COWARD, K. & RAFIEE, G., **Fish Spermatology**, cap. 9, pp. 281–316. Oxford: Alpha Science, 2007.

COSSON, J., LINHART, O., MIMS, S., SHELTON, W. & RODINA, M., Analysis of motility parameters from paddlefish (*Polyodon spathula*) and shovelnose sturgeon (*Scaphirhynchus platyrhynchus*) spermatozoa. **Journal of Fish Biology**, v.56, p.1348–1367, 2000.

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

DEGRAAF, J.D., D.L. BERLINSKY, Cryogenic and refrigerated storage of Atlantic cod (*Gadus morhua*) and haddock, (*Melanogrammus aeglefinus*) spermatozoa, **Aquaculture**, v.234, p. 527–540, 2004.

DREANNO, C., et al., Effects of osmolality, morphology and intracellular nucleotid content during the movement of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.116, p.113–125, 1999a.

DREANNO, C., et al., Metabolism of turbot (*Scophthalmus maximus*) spermatozoa: relationship between motility, intracellular nucleotid content and mitochondrial respiration. **Molecular Reproduction and Development**, v.53, p.230–243 1999b.

DREANNO, C., et al., Nucleotide Content, Oxydative Phosphorylation, Morphology, and Fertilizing Capacity of Turbot (*Psetta maxima*) Spermatozoa During the Motility Period, **Molecular Reproduction And Development**, v.53, p.230–243, 1999.

DUMAS, S.; ROSALES-VELÁZQUEZ, M. O.; CONTRERAS-OLGUÍN, M.; HERNÁNDEZ-CEBALLOS, D.; SILVERBERG, N., Gonadal maturation in captivity and hormone-induced spawning of the Pacific red snapper *Lutjanus peru*, **Aquaculture** v.234, p.615–623, 2004.

ELOFSSON, H., VAN LOOK, K., BORG, B. & MAYER, I., Influence of salinity and ovarian fluid on sperm motility in the fifteen-spined stickleback. **Journal of Fish Biology**, v.63, p.1429–1438, 2003.

EDWARDS, R. R. C., Growth of Lutjanidae (snappers) in tropical Australian waters, **Journal of Fish Biology**, v. 26 (1), p. 1-4, 2006.

EMATA, A. C., Reproductive performance in induced and spontaneous spawning of the mangrove red snapper, *Lutjanus argentimaculatus*: a potential candidate species for sustainable aquaculture, Philippines, **Aquaculture Research**, v. 34, p. 849-857, 2003.

EMATA, A.; EULLARAM, B.; BAGARINAO, T., Induced spawning and early life history description of the mangrove red snapper, *Lutjanus argentimaculatus*. **Aquaculture**, v.121, p.381-387, 1994.

EMATA, A.C., Spawning of mangrove red snapper, **Aquaculture Research**, v.34,p. 849-857, 2003.

EMATA, A. C., Breeding and Seed Production of the Mangrove Red Snapper, **Aquaculture Asia**, v. VII, n.3, 2002.

FAO, **Fats and oils in human nutrition**. Paper n. 57, 1994.

FAO, **The State Of World Fisheries And Aquaculture 2010**, Rome, 197p., 2010.

FAO, **Yearbook, 2008**, Disponível em [ftp://ftp.fao.org/FI/CDrom/CD\\_yearbook\\_2008/navigation/index\\_content\\_aquaculture\\_e.htm#C](ftp://ftp.fao.org/FI/CDrom/CD_yearbook_2008/navigation/index_content_aquaculture_e.htm#C). Acessado em janeiro/2012.

FAO Fisheries Synopsis No. 125, Volume 6, **An Annotated and Illustrated Catalogue of Lutjanid Species Known to Date, G-R. Allen, Western Australian Museum, Perth, Western Australia**, Rome, 208p., December 1985.

FAO, **THE STATE OF FOOD AND AGRICULTURE 2010-2011**, Rome, 148p., 2011.

FAO Yearbook 2008, **Fishery and Aquaculture Statistics**. Disponível em: [ftp://ftp.fao.org/FI/CDrom/CD\\_yearbook\\_2008/root/aquaculture/d0.pdf](ftp://ftp.fao.org/FI/CDrom/CD_yearbook_2008/root/aquaculture/d0.pdf). Acessado em março de 2012.

FARAH, A., KASIRI, M., TALEBI, A., SUDAGAR, M., Effects of Clove Extract as an Anesthetic on Sperm Motility Traits and Some Hematological Parameters in Prussian Carp *Carassius Gibelio*, **Advances in Environmental Biology**, v.5, n.6, p.1406-1410, 2011.

FARIA, P. M. C. et al. A situação da aquacultura e da pesca no Brasil e no Mundo - 2008. **PUBVET**, v. 3, p. 19, 2009.

FAUVEL, C., SUQUET, M., COSSON, J, Evaluation of fish sperm quality, **J. Appl. Ichthyol.**, v.26, p. 636–643, 2010.

FAUVEL et al., Characteristics of sperm of captive seabass (*Dicentrarchus labrax*) in relation to its fertilization potential, **Journal of Fish Biology**, v.54, p.356-369, 1999.

FRANCISCATTO, R. et al. Qualidade do sêmen de curimba *Prochilodus lineatus* e taxa de fertilidade após o resfriamento. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v. 26, p. 213-215, 2002.

FROESE, R. E D. PAULY. Editors. 2009.FishBase. Disponível em < <http://www.fishbase.org/Summary/speciesSummary.php?ID=181&genusname=Lutjanus&speciesname=synagris&lang=Portuguese> >. Acessado em novembro de 2011.

GAGE et al., Relationships between sperm morphometry and sperm motility in the Atlantic salmon, **Journal of Fish Biology**, v.61, p.1528–1539, 2002.

GALVANI, F., COSTA, E.P., TORRES, C.A.A. et al. Perímetro escrotal, características físicas do sêmen e morfopalógicas dos espermatozoides de touros Nelore de alta libido comparados com animais de libidos inferiores. **Ars Veterinária, Jaboticabal**, v.16, n.2, p.97-103, ago. 2000.

GESTEIRA, T. C. V. e ROCHA, C. A. S, Estudo sobre a fecundidade do ariacó *Lutjanus synagris* (Linnaeus), da costa do Ceará. **Arquivo de Ciências do Mar**, Fortaleza, v. 16, n. 1, p. 19-22, 1976.

GINZBURG, A.S. 1972. In ALAVI, S. M. H., COSSON, J. J., COWARD, K. & RAFIEE, G., **Fish Spermatology**, , cap. 9, pp. 281–316. Oxford: Alpha Science, 2007.

GIOVANNI et al., Effects of extender composition, cooling rate, and freezing on the motility of sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) spermatozoa after thawing, **Cryobiology**, v.44, p. 229–239, 2002.

GODINHO, H. P.; AMORIM, V. M. C.; PEIXOTO, M. T. D. Criopreservação do sêmen de tilápia-nilótica *Oreochromis niloticus*, var. Chitralada: crioprotetores, soluções ativadoras e refrigerador criogênico, **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32 (6), p. 1537-1543, 2003.

GODINHO, H. P, 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.

GROISON, et al., Some characteristics of sperm motility in European hake (*Merluccius merluccius*, L., 1758), **J. Appl. Ichthyol.**, v.26, p.682–689, 2010, a.

GROISON et al., Sperm motility in European hake, *Merluccius merluccius*, and characterization of its spermatozoa concentration and volume, spermatocrit, osmolality and pH, **Aquaculture** v.301, p.31–36, 2010, b.

HAFEZ, E.S.E; HAFEZ, B. (ed). **Reproduction in farm animals**. 7. ed. Philadelphia: Lippicott Williams and Wickins, 509p., 2000.

HOLT, W.V., Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences, **Theriogenology**, v.53, p.47-58, 2000.

HONG WAN-SHU, ZHANG QI-YONG, Artificial Propagation And Breeding Of Marine Fish In China, **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, v.20(l), p.41-51, 2002.

IBAMA, **Estatística da pesca 2006 Brasil: grandes regiões e unidades da federação**, Brasília, 174 p., 2008.

IBARRA-CASTRO, L. N.J. DUNCAN, GnRH $\alpha$ -induced spawning of wild-caught spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*, **Aquaculture**, v.272, p.737–746, 2007.

IBARRA-CASTRO, L. AND L. ALVAREZ-LAJONCHERE, Improved Induced-Spawning Protocol for the Spotted Rose Snapper (*Lutjanus guttatus*), *The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh* v.61(2), p.121-133, 2009.

INABA, K., DREANNO, C. & COSSON, J., Control of sperm motility by CO<sub>2</sub> and carbonic anhydrase in flatfish. **Cell Motility and the Cytoskeleton**, v.55, p.174–187, 2003.

JACKSON, L.F., SULLIVAN, C.V., Reproduction of white perch: the annual gametogenic cycle. **Trans. Am. Fish. Soc.** v.124, p.563–577, 1995.

JAMIESON, B. G. M., **Fish evolution and systematics: evidence from spermatozoa**. Cambridge: Cambridge University Press, 319 p., 1991.

KAMUKURU, A. T., MGAYA, Y. D., Effects of exploitation on reproductive capacity of black spotted snapper, *Lutjanus fulviflamma* (Pisces:Lutjanidae) in Mafia Island, Tanzania, **African Journal of Ecology**, v. 42, p. 270-280, 2004.

KAVAMOTO, E.T., MAINARDES-PINTO, C.S.R., ANDDRAGE-TALMELLI, E.F., Produção espermiática do curimatá *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881). **Boletim do Instituto de Pesca**, v.24, p.73-78, 1997.

KIME, D.E., 1998. Endocrine Disruption in Fish. Kluwer, Dordrecht. In Kime et al., Computer-assisted sperm analysis CASA as a tool for monitoring sperm quality in fish, **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.130, p.425-433, 2001.

KIME, D. E. & TVEITEN, H., Unusual motility characteristics of sperm of the spotted wolffish. **Journal of Fish Biology**, v.61, p.1549–1559, 2002.

KIME, D.E., VAN LOOK, K.J.W., MCALISTER, B.G., HUYSKENS, G., RURANGUA, E., OLLEVIER, F., Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for

monitoring sperm quality in fish, **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.130, p.425-433, 2001.

KLIPPEL, S. & PERES, M.B., **Resultados da avaliação de estoques das dez principais espécies na pesca de linha de mão da costa central do Brasil**. Programa REVIZEE, Relatório Técnico, 60 p., Rio Grande, 2002.

KOLDRAS, M., LOIR, M., MAISSE, G., LE GAC, F., Study of the composition of seminal fluid and of sperm motility along the genital tract, during a spawning season, in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquat. Living Resour.**, v.9, p.337–345, 1996.

KOPEIKA, E. F.; WILLIOT, P.; GONCHAROV, B. F. Cryopreservation of Atlantic sturgeon *Acipenser sturio* L., 1758 sperm: First results and associated problems. **Bol. Inst. Esp. Oceanogr.**, v. 16, p. 167-173, 2000.

KOVÁCS, G. **Tecnologia da criopreservação do sêmen de peixes**. Ministério da Agricultura. Departamento Nacional de Obras contra as Secas – DNOCS/AGROBER. Fortaleza. 1990.

KRASZNAI, Z., MORISAWA, M., KRASZNAI, Z. T., MORISAWA, S., INABA, K., BAZSANE, Z. K., RUBOVSKY, B., BODNAR, B., BORSOS, A. & MARIAN, T., Gadolinium, a mechano-sensitive channel blocker, inhibits osmosis-initiated motility of sea and freshwater fish sperm, but does not affect human or ascidian sperm motility. **Cell Motility and the Cytoskeleton** 55, 232–243, 2003.

KWANTONG, S.; BART, A. N. Fertilization efficiency of cryopreserved sperm from striped catfish, *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage), **Aquaculture Research**, v. 40, p. 292- 297, 2009.

LAFLEUR, G.J., THOMAS, P., Evidence for a role of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in the hydration of Atlantic croaker and spotted seatrout oocytes during final maturation, **J. Exp. Zool.**, v.258, p.126–136, 1991.

LAHNSTEINER, F.; PATZNER, R., Sperm motility in the marine teleosts Boops boops, *Diplodus sargus*, *Mullus barbatus* and *Trachurus mediterraneus*. **J. Fish Biol.**, v.52, p.726–742, 1998.

LEE, C. S., TAMARU, C. D., KELLEY, A., MORIWAKE, A. & MIYAMOTO, G. T., The effect of salinity on the induction of spawning and fertilization in the striped mullet, *Mugil cephalus*, **Aquaculture**, v.102, p.289–296, 1992.

LEONARDO, A. F. G.; ROMAGOSA, E.; BORELLA, M. I.; BATLOUNI, S. R. Induced spawning of hatchery-raised Brazilian catfish, cachara *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1766). **Aquaculture**, [Amsterdam], v. 240, n. 1-4, p. 451-461, 2004.

LEU, M. Y.; CHOU, Y. H. Induced spawning and larval rearing of captive yellowfin porgy, *Acanthopagrus latus* (Houttuyn). **Aquaculture**, [Amsterdam], v. 143, n. 2, p. 155-166, 1996.

LEVAVI-SIVAN, B.; VAIMAN, R.; SACHS, O.; TZCHORI, I. Spawning induction and hormonal levels during final oocyte maturation in the silver perch (*Bidyanus bidyanus*). **Aquaculture**, [Amsterdam], v. 229, n. 1-4, p. 419-431, 2004.

LIMA, W.B., **Idade e crescimento do ariacó, *Lutjanus synagris*, Linnaeus, 1758 (Teleostei: Lutjanidae) das costa norte da Bahia-Brasil**. Dissertação de Mestrado, Departamento de Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal do Espírito Santo, 40p., Vitória, 2004.

LINHART, O., SLECHTA, V. e SLAVIK, T., Fish sperm composition and biochemistry, **Bull. Inst. Zool. Academia Sinica**, v.16, p.285-311, 1991.

LINHART, O. et al. Cryopreservation of European catfish *Silurus glanis* sperm: Sperm motility, viability, and hatching success of embryos. **Cryobiology**, v. 51, p. 250-261, 2005.

LINHART, O., KUDO, S., Surface ultrastructure of paddlefish eggs before and after fertilization, **J. Fish Biol.**, v.51, p.573–582, 1997.

LIU, et al., Use of computer-assisted sperm analysis (CASA) to evaluate the quality of cryopreserved sperm in red seabream (*Pagrus major*), **Aquaculture**, v.263, p.20-25, 2007.

LUO et al., Comparative sperm ultrastructure of three species in *Siniperca* (Teleostei: Perciformes: Sinipercaidae), **Micron**, v.42, p.884-891, 2011.



MALISON, J.A., PROCARIONE, L.S., BARRY, T.P., KAPUSCINSKI, A.R., KAYES, T.B., Endocrine and gonadal changes during the annual reproductive cycle of the freshwater teleost, *Stizostedion vitreum*. **Fish Physiol. Biochem.**, v.13, p.473–484, 1994.

MALTHUS, T.R., **Ensaio sobre o principio da população**, Primeira Edição, 252 pp., Editora Europa – Améria Pt, 1999.

MARIA, A.N., **Diluidores e crioprotetores no resfriamento e congelamento do sêmen de piracanjuba (*Brycon obrignyanus*)**. Dissertação de Mestrado. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 71p. – Universidade Federal de Lavras, 2005

MARCO-JIMÉNEZ ET AL., Morphometric characterization of sharpsnout sea bream (*Diplodus puntazzo*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) spermatozoa using computer-assisted spermatozoa analysis (ASMA), **Journal of Applied Ichthyology**, n24, p.382-385, 2008.

MATSUYAMA, M.; MORITA, S.; NASU, T.; KASHIWAGI, M. Daily spawning and development of sensitivity to gonadotropin and maturation-inducing steroid in the oocytes of the bamboolief wrasse, *Pseudolabrus japonicus*. **Environmental Biology of Fishes**, [Dordrecht], v. 52, p. 281-290, 1998.

MENEZES, N.A. & FIGUEREDO, J.L., **Manual de peixes marinhos do Sudeste do Brasil. IV. Teleostei** (3), Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, 96p., São Paulo, 1980.

MILIORINI, A.B. et al., A morphological classification proposal for curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm damages after cryopreservation, **Aquaculture Research**, v.42, p.177-187, 2011

MIURA, T., YAMAUCHI, K., TAKAHASHI, H., NAGAHAMA, Y., The role of hormones in the acquisition of sperm motility in salmonid fish. **J. Exp. Zool.**, v.261, p.359–363, 1992.

MORISAWA, M. & SUZUKI, K., Osmolality and potassium ion: their role in initiation of sperm motility. **Science**, v.210, p.1145–1147, 1980.

MORISAWA, M., Initiation mechanism of sperm motility at spawning in teleosts. **Zool. Sci.** 2, 605–615, 1985.

MORISAWA, S., MORISAWA, M., Acquisition of potential for sperm motility in rainbow trout and chum salmon, **J. Exp. Biol.**, v.126, p.89–96, 1986.

MORISAWA, S., MORISAWA, M., Induction of potential for sperm motility by bicarbonate and pH in rainbow trout and chum salmon. **J. Exp. Biol.**, v,136, p.13–22, 1988.

MORISAWA, S., ISHIDA, K., OKUNO, M., MORISAWA, M., Roles of pH and cyclic adenosine monophosphate in the acquisition of potential for sperm motility during migration from the sea to the river in chum salmon. **Mol. Reprod. Dev.**, v.34,p. 420–426, 1993.

MORITA, M., TAKEMURA, A. & OKUNO, M., Requirement of Ca<sup>2+</sup> on activation of sperm motility in euryhaline tilapia (*Oreochromis mossambicus*), **Journal of Experimental Biology**, v.207, p.337–345, 2004.

MPA – MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA, **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura, Brasil 2008-2009**, Brasília, 100p., 2010.

MUNRO, A.D., SCOTT, A.P. AND LAM, T.J., **Reproductive Seasonality in Teleosts: Environmental Influences**. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 254 pp., 1990

MURGAS, L. D. S. Criopreservação do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) mediante adição de diferentes diluidores, ativadores e crioprotetores. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.3, p. 526-531, 2007.

MYERS, R., A. & WORM, B., Rapid worldwide depletion of predatory fish communities, **Nature**, v.423, p.280-283, 2003.

MYLONAS, C.C., SCOTT, A.P., VERMEIRSSSEN, E.L.M., ZOHAR, Y., Changes in plasma gonadotropin II and sex steroid hormones, and sperm production of striped

bass after treatment with controlled-release gonadotropin-releasing hormone agonist-delivery systems. **Biol. Reprod.**, v.57, p.669–675, 1997.

MYLONAS, C.C., WOODS III, L.C., THOMAS, P., SCHULZ, R.W., ZOHAR, Y., Hormone profiles of captive striped bass (*Morone saxatilis*) during spermiation, and longterm enhancement of milt production, **J. World Aquat. Soc.**, v. 29, p.379–392, 1998.

MYLONAS, C.C., PAPADAKI, M., DIVANACH, P., Seasonal changes in sperm production and quality in the red porgy *Pagrus pagrus* (L.). **Aquat. Res.**, v.34, p.1161–1170, 2003.

MYLONAS, C.C., et al. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v.165 (3), p.516–534, 2010.

NATIONAL MARINE FISHERIES SERVICE OFFICE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, Fisheries of The United States 2009 and 2010, Disponível na internet via <<http://www.sr.nmfs.noaa.gov/st1>>. Acessado em janeiro/2011.

NAYLOR et al., Effect of Aquaculture on World Fish Supplies, **Nature**, v.405, p.1017-1024, 2000.

NOVEIRI, S.B., ALIREZA, A. E PORKAZEMI, M., Sperm morphometry, density and spermatocrit study in Persian sturgeon (*Acipenser persicus*), **Journal of Applied Ichthyology**, v.22, p.380-383, 2006.

OLIVEIRA, A. V. et al. Sucesso do resfriamento e congelamento de sêmen de pirapitinga *Brycon nattereri*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, p.1509-1515, 2007.

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

OSTRENSKY, A., BORGUETTI, J R., SOTO, D., **Aquicultura no Brasil, o desafio é crescer**, Brasília, 276p., 2008.

OTTESEN, O.H., BABIAK, I., DAHLE, G., Sperm competition and fertilization success of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.), **Aquaculture**, doi:10.1016/j.aquaculture.2008.09.018, 2008.

OTTOLENGHI, F., SILVESTRI, C., GIORDANO, P., LOVATELLI, A., NEW, M.B., **Capture-based Aquaculture: The fattening of eels, groupers, tunas and yellowtails**. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 2004.

PADHI, B.K.; MANDAL, R.K. 2000. Applied fish genetics. Fishing Chimes In: YASUI, G. S. **Variação temporal da motilidade espermática da tilápia do nilo em amostras refrigeradas e ativadas**. Dissertação (Mestrado em Produção animal) Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes– RJ – 2007.

PASSOS NETO, O.P., **Avaliação da desova induzida hormonalmente e qualidade dos ovos de ariacó, *Lutjanus synagris* (Linnaeus, 1758)**, Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) Instituto de Ciências do Mar. Universidade federal do Ceará, Fortaleza – CE, 2010.

PAVLOV, D.A., A Method for the Assessment of Sperm Quality in Fish, **Journal of Ichthyology**, v.46, n.5, p.391–398, 2006.

PETER, R.E., LIN, H.R., VAN DER KRAAK, G. AND LITTLE, M., Releasing hormones, dopamine antagonists and induced spawning. In: MUIR, J.F. AND ROBERTS, R.J. (eds.), **Recent Advances in Aquaculture**. Vol. IV. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 25–30, 1993.

PETERSSON, J., JÄRVI, T., ‘False orgasm’ in female brown trout: trick or treat? **Anim. Behav.**, v.61, p.497–501, 2001.

PHELPS, R. P., PAPANIKOS, N., BOURQUE, B. D., BUENO, F. T., HASTEY, R. P., MAUS, D. L., FERRY, A. AND DAVIS, D. A., Spawning of Red Snapper (*Lutjanus campechanus*) in Response to Hormonal Induction or Environmental Control in a Hatchery Setting, **Reviews in Fisheries Science**, v.17(2), p.149 — 155, 2009.

PSENICKA et al., Potential role of the acrosome of sturgeon spermatozoa in the fertilization process, **J. Appl. Ichthyol.**, v.27, p.678–682, 2011.

PSENICKA et al., Morphology and ultrastructure of Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*, spermatozoa using scanning and transmission electron microscopy. **Biology of the Cell**, v.99 (2), p.103-115, 2007.

PSENICKA, M.; RODINA, M.; NEBESAROVA, J.; LINHART, O., Ultrastructure of spermatozoa of tench *Tinca tinca* observed by means of scanning and transmission electron microscopy. **Theriogenology**, v.66, p.1355–1363, 2006.

PUDNEY, J., Spermatogenesis in non mammalian vertebrates. **Microsc. Res. Tech.**, v.32, p.459–497, 1995.

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

RAINIS, S., MYLONAS, C.C., KYRIAKOU, Y., DIVANACH, P., Enhancement of spermiation in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) at the end of the reproductive season using GnRH $\alpha$  implants. **Aquaculture**, v.219, p.873–890, 2003.

RILEY et al., Cryopreservation of sperm of red snapper (*Lutjanus campechanus*) **Aquaculture**, v.238, p.183–194, 2004.

ROTTMANN, R.W., SHIREMAN, J.V.E CHAPMAN, F.A., Hormonal Control of Reproduction in Fish for Induced Spawning, **Southern Regional Aquaculture Center**, No. 424, 1991.

RODRIGUES, B.A., RODRIGUES, J.L. Efeito da adição de diferentes concentrações de albumina sérica bovina (BSA) ao diluidor à base de tris sobre a viabilidade in vitro do sêmen canino criopreservado, **Arquivo da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v.26, n.2, p.32-49, 1998.

RIVERA-ARRIAGA, E.; LARA-DOMÍNGUEZ, A.; RAMOS-MIRANDA, J.; SÁNCHEZ-GIL, P. & YÁNEZ-ARANCIBIA, A. Ecology and population dynamics of *Lutjanus synagris* on Campeche Bank. **ICLARM**, Manila, n.48, p.11-18, 1996.

RIBEIRO, R. I. M. A.; GODINHO, H. P., Criopreservação do sêmen testicular do teleósteo piau-açu *Leporinus macrocephalus*. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, v. 55, p. 1-7, 2003.

RIBEIRO, R. I. M. A.; GODINHO, H. P., Criopreservação do sêmen testicular do teleósteo piau-açu *Leporinus macrocephalus*. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, v. 55, p. 1-7, 2003.

RILEY, K. L. et al. Cryopreservation of sperm of red snapper (*Lutjanus campechanus*). **Aquaculture**, v. 238, p. 183–194, 2004.

RILEY et al., Field Collection, Handling, and Refrigerated Storage of Sperm of Red Snapper and Gray Snapper, **North American Journal of Aquaculture**, v.70, p.356-364, 2008.

ROSENGRAVE, P. et al. Chemical composition of seminal and ovarian fluids of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and their effects on sperm motility traits. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 152, p. 123-129, 2008.

ROUTRAY, P. et al. Cryopreservation of dead fish spermatozoa several hours after death of Indian major carp, *Labeo rohita* and its successful utilization in fish production. **Aquaculture**, v. 261, p. 1204–1211, 2006.

ROUXEL et al., Changes in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) sperm quality during the spawning season, **Aquaculture Research**, v.39, p.434-440, 2008.

RURANGWA, E., ROELANTS, I., HUYSKENS, G., EBRAHIMI, M., KIME, D.E., OLLEVIER, F., The minimum effective spermatozoa: egg ratio for artificial insemination and the effects of mercury on sperm motility and fertilization ability in *Clarias gariepinus*. **J. Fish Biol.**, v.53, p.402–413, 1998.

SANCHES, E.G., CERQUEIRA, V.R., Refrigeração do sêmen de ariacó, *Lutjanus synagris*, **Boletim do Instituto de Pesca**, são Paulo, v.36, n.4, p.293-305, 2010.

SANCHES, E.G., OLIVEIRA, I.R., SERRALHEIRO, P.C.S., Crioconservação do sêmen da garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus*, **Bioikos**, v.22(2), p.81-90, 2008.

SARVI, K. et al. Cryopreservation of semen from the endangered Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*). **Aquaculture**, v. 256, p. 564–569, 2006.

SCHULZ, R.W., MIURA, T., Spermatogenesis and its endocrine regulation. **Fish Physiol. Biochem.**, v.26, p.43–56, 2002.

SCHIAVONE et al., Human chorionic gonadotropin induces spermatogenesis and spermiation in 1-year-old European sea bass (*Dicentrarchus labrax*): Assessment of sperm quality, **Aquaculture**, v.255, p.522–531, 2006.

SOUSA JÚNIOR, V. B., SILVA, J. R. F., SALLES, R., Análise ovariana do ariacó, *Lutjanus synagris* (Actinopterygii: Lutjanidae) e considerações sobre sua reprodução no estado do Ceará, **Arquivo de Ciências do Mar**, v. 48(1), p.90-97, 2008.

STACEY, N., Hormones, pheromones and reproductive behavior. **Fish Physiol. Biochem.**, v.28, p.229–235, 2003.

STEELE, J.H., M. SCHUMACHER, Ecosystem structure before fishing, **Fisheries Research**, v.44, p. 201-205, 2000.

STOSS, J., Fish gamete preservation and spermatozoan physiology. In HOAR, W. S., RANDALL, D. J. & DONALDSON, E. M., **Fish Physiology**, Vol. IX pp. 305–350. New York, NY: Academic Press, 1983.

STREIT JR. et al. Motilidade, Vigor e Patologias Seminal In Natura e Pós Criopreservação de *Piaractus mesopotamicus*, **B. Inst. Pesca**, São Paulo, v.35(2), p.159 - 167, 2009.

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

SUQUET et al., Sperm features of captive Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*), **J. Appl. Ichthyol.**, v.26, p.775–778, 2010.

SUQUET, M. et al. Cryopreservation of sperm in marine fish. **Aquaculture Research**, v. 31, p. 231–43. 2000.

SZEDLMAYER, S. T., Comparison of growth rate and formation of otolith increments in age-0 red snapper, **Journal of Fish Biology**, v. 53, p. 58-65, 1998.

TADDEI, A. R., BARBATO, F., ABELLI, L. et al. Is cryopreservation a homogeneous process? Ultrastructure and motility of untreated, prefreezing, and postthawed spermatozoa of *Diplodus puntazzo* (Cetti). **Cryobiology**, San Diego, v.42 (4), p.244-255, 2001.

TAKAI, H.; MORISAWA, M., Change in intracellular K<sup>+</sup> concentration caused by external osmolality change regulates sperm motility of marine and freshwater teleosts. **J. Cell. Sci.**, v.108, p.1175–1181, 1995.

TIERSCH et al., Transport and cryopreservation of sperm of the common snook, *Centropomus undecimalis* (Bloch), **Aquaculture Research**, v.35, p.278-288, 2004.

TORRES, R.L.; PÉREZ, L.A A. & MARQUÉZ, S.S. Determinación de algunos parámetros de la reproducción de la rubia, *Lutjanus synagris*, en las costas de Veracruz en 1983. **Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología**, 1990.

TOTH et al., Objective sturgeon, analysis of sperm motility in the lake *Acipenser fulvescens*: activation and inhibition conditions, **Aquaculture**, v.154, p.337-348, 1997.

TRIPPEL, E.A., Estimation of male reproductive success of marine fishes, **Journal Northwest Atlantic Fishes Science**, v.33, p.81-113, 2003.

TUCKER, J. AND JORY, D., Marine fish culture in the Caribbean region. **World Aquaculture**, v.22, p.10-25, 1991.

TURANO, M. J., DAVIS, D. A., ARNOLD, C. R., Observations and techniques for maturation, spawning and larval rearing of the yellowtail snapper *Ocyurus chrysurus*. **Journal of Aquaculture Society**, v. 31 (1), 2000.



TUSET, V. M.; TRIPPEL, E. A.; DE MONSERRAT, J., Sperm morphology and its influence on swimming speed in Atlantic cod. **J. Appl. Ichthyol.**, v.24, p.398–405, 2008.

VALE FILHO, V.R. **Patologia do sêmen**. 2.ed. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais – Escola de Veterinária, 54p. , 1980.

VARGASMACHUCA, S. C., PONCE-PALAFIX, J. T., ORTÍZ, E. C., ARREDONDO-FIGUEROA, J. L., Effect on initial body weight on growth of spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869) in marine floating cages, **Revista de Biología Marina y Oceanografía**, v. 43(3), p. 261-267, 2007.

VETTORAZZI, M.B., GOMES, E.T., SOUZA, R.L.M., CÉSAR, J.R.O e FURTADO NETO, M.A.A., Motilidade espermática do sêmen de ariacó, *Lutjanus synagris*, **Arquivo de ciências do Mar**, Fortaleza, v.43(2), p.21-26, 2010.

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

VIVEIROS, A. T. M.; SO, N.; KOMEN, J. Sperm cryopreservation of African catfish (*Clarias gariepinus*): cryoprotectants, freezing rates and sperm: egg dilution ratio. **Theriogenology**, v. 54, p. 1305–1308, 2000.

VULTHIPHANDCHAI, V., CHOMPHUTHAWACH, S., NIMRAT, S., Cryopreservation of red snapper (*Lutjanus argentimaculatus*) sperm: Effect of cryoprotectants and cooling rates on sperm motility, sperm viability, and fertilization capacity, **Theriogenology**, vol. 72, p.129-138, 2009.

WAGNER, E., ARNDT, R., HILTON, B., Physiological stress responses, egg survival and sperm motility for rainbow trout broodstock anesthetized with clove oil, tricaine methanesulfonate or carbon dioxide. **Aquaculture**, v.211, p.353–366, 2002.

WATANABE, W. O.; ELLIS, S. C.; ELLIS, E. P.; HEAD, W. D.; KELLEY, C. D.; MORIWAKE, A.; LEE, G. S.; BIENFANG, P. K. Progress in controlled breeding of Nassau grouper (*Epinephelus striatus*) broodstock by hormone induction. **Aquaculture**, [Amsterdam], v. 138, n. 1-4, p. 205-219, 1995.

WESTIN, L. & NISLING, A., Effects of salinity on spermatozoa motility, percentage of fertilised eggs and egg development of Baltic cod (*Gadus morhua*) and implications for cod stock fluctuations in the Baltic. **Marine Biology**, v.108, p.5–9, 1991.

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.

WORLD HEALTH ORGANIZATION **Laboratory manual for the Examination and processing of human semen**, 5 ed, Switzerland, 271p. 2010.

YANG et al., Effect of osmotic immobilization on refrigerated storage and cryopreservation of sperm from a viviparous fish, the green swordtail *Xiphophorus helleri*, **Cryobiology**, v.52. p.209–218, 2006.

YARON, Z., Endocrine control of gametogenesis and spawning induction in the carp. **Aquaculture**, v.129, p.49–73, 1995.

YEGANEH, S., AMIRI, B. M. & ALAVI, S. M. H., Motility of *Mugil cephalus* L. spermatozoa in coelomic fluid, seminal fluid and saline media. **Journal of Applied Ichthyology**, v.24, p.517–518, 2008.

ZILI, et al., Effect of cryopreservation on phosphorylation state of proteins involved in sperm motility initiation in sea bream, **Cryobiology**, v.57, p. 50–155, 2008.

ZOHAR, Y.; MYLONAS, C. C.; Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. **Aquaculture**, [Amsterdam], v. 197, n. 1-4, p. 99-136, jun. 2001.

ZOHAR, Y. (1989b) Fish reproduction: Its physiology and artificial manipulation. In: SHILO, M. AND SARIG, S. (eds.), **Fish Culture in Warm Water Systems: Problems and Trends**. CRC Press, Boca Raton, pp. 65–119, 1989.