

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Graduação em Ciências Biológicas - Bacharelado



Trabalho de Conclusão de Curso

Qualidade espermática do jundiá
***Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) exposto a**
diferentes concentrações salinas

Gabriel Bernardes Martins

Pelotas, 2009

Gabriel Bernardes Martins

**Qualidade espermática do jundiá
Rhamdia quelen (Quoy & Gaimard, 1824) exposto a
diferentes concentrações salinas**

Trabalho de conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Ricardo Berteaux Robaldo

Pelotas, 2009

Banca examinadora:

Ricardo Berteaux Robaldo, Dr. (Orientador)

Denise Calisto Bongalhardo, PhD.

Juvêncio Luís Osório Pouey, Dr.

Luis André Nassr de Sampaio, Dr. (suplente)

Resumo

MARTINS, Gabriel Bernardes. **Qualidade espermática do jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) exposto a diferentes concentrações salinas.** 2009. 28F. Trabalho de Conclusão de Curso – Ciências Biológicas/Bacharelado. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O jundiá *Rhamdia quelen*, é uma espécie de siluriforme que apresenta ampla distribuição na América do Sul, ocorrendo desde o sul do México até o centro da Argentina. Trata-se de uma espécie rústica e euritêmica com sucesso na reprodução e desenvolvimento nos cultivos em zonas temperadas, porém apresentando elevada mortalidade nas fases iniciais de cultivo mediante infecções massivas pelo protozoário *Ichthyophthirius multiffilis*. Na tentativa de melhoria do desempenho de produção, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da manutenção de reprodutores em diferentes concentrações salinas (0, 2, 4, 6 e 8‰ de sal marinho não iodado) sobre a viabilidade e qualidade dos gametas masculinos. Os resultados demonstraram que percentual de motilidade permaneceu inalterado nas concentrações salinas entre 0 e 4‰, foi reduzido a 6‰ e que os espermatozoides ficaram imóveis a 8‰. O grau de motilidade não diferiu entre os tratamentos, apresentando deslocamento rápido sempre que houve motilidade. O tempo médio de motilidade oscilou entre $226 \pm 79s$ (6‰) e $38 \pm 10s$ (0‰). Os resultados demonstram que meios de ativação com concentração salina entre 2 e 6‰ apresentam desempenho superior em relação ao tempo de motilidade, existindo clara evidência da importância do aumento da osmolaridade até o ponto isosmótico do plasma seminal da espécie, sendo determinante para o aumento da capacidade de fecundação e um método profilático viável para a ictioftiríase.

Palavras chave: jundiá, reprodução, sêmen, salinidade, ictio.

Abstract

MARTINS, Gabriel Bernardes. **Sperm quality of *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) silver catfish exposed to different saline concentrations.** 2009. 28F. Trabalho de Conclusão de Curso – Ciências Biológicas/Bacharelado. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The silver catfish *Rhamdia quelen* is a siluriform species with wide geographical distribution throughout South America, occurring from Mexico to Argentina. It is a rustic and eurithermic fish, with successful reproduction and development under temperate farming. However, it presents high mass mortality by *Ichthyophthirius multifiliis* protozoa infestations. Attempting to improve production performance, this study evaluated the effects of maintaining male breeders in different saline concentrations (0, 2, 4, 6 and 8‰ brut marine salt not iodized) on semen quality. The results showed that sperm percent motility is constant between 0 and 4‰, it is reduced at 6‰ and that sperm became immotile at 8‰ salinity. Motility status did not differ among treatments; sperm showed fast displacement in all saline concentrations bellow 8‰. Motility time (mean \pm SD) ranged between 38 ± 10 s (0‰) and 226 ± 79 s (6‰), being the best performance achieved in activation media with saline concentrations between 2 and 6‰. Therefore, increasing media osmolality until the isosmotic point of this species is clearly important and decisive to improve fertilization capacity; and it also is a practicable prophylactic method for ichthyophthiriasis.

Keywords: jundia, reproduction, semen, salinity, ichthyo.

Lista de Figuras

Figura 1	Efeito do tempo de centrifugação (min.) na avaliação do espermátócrito (%; Média \pm DP).....	18
Figura 2	Efeito da concentração da salinidade (‰) do meio de ativação sobre a o tempo de motilidade (s) espermática de <i>Rhamdia quelen</i>	21

Lista de Tabelas

Tabela 1	Efeito da salinidade do meio de ativação no espermátocrito, volume total de sêmen, percentual de células móveis, tempo e grau de motilidade espermática do jundiá <i>Rhamdia quelen</i>	18
----------	---	----

Sumário

Introdução.....	09
Revisão de literatura.....	10
Metodologia.....	15
Resultados e Discussão.....	17
Conclusões.....	21
Referências.....	21

1. Introdução

O jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy & Gaimard, 1824), distribuído desde o sul do México até o centro da Argentina, é uma espécie de siluriforme que suporta o frio do inverno e apresenta rápido crescimento no verão, características essenciais para o cultivo de espécies em zonas subtropicais e temperadas (BRAUN et al., 2006). Alguns estudos considerando o efeito de parâmetros de qualidade da água como pH (LOPES et al., 2001), dureza da água (TOWNSEND; BALDISSEROTTO, 2001) e níveis de oxigênio dissolvido (BRAUN et al., 2006) têm sido desenvolvidos com o jundiá para melhor ajuste dos sistemas de cultivo.

O controle da reprodução é uma questão chave na aquicultura e um dos fatores limitantes no sucesso reprodutivo é a qualidade dos gametas (BOBE; LABBÉ, 2009). Entretanto, a indústria do cultivo de peixe tem sido mais focada na qualidade dos ovos e larvas do que na qualidade do esperma. O esperma é frequentemente inadequado em termos de qualidade e quantidade durante a fertilização artificial, comumente empregada na piscicultura (RURANGWA, 2003).

O gameta masculino dos peixes tem como característica ser quiescente dentro do ducto seminal, tornando-se móvel quando liberado no meio. A ativação espermática está intimamente relacionada à capacidade de fecundação do ovócito. Assim, o conhecimento dos fatores de ativação do esperma irá proporcionar uma melhora na taxa de fecundidade e conseqüentemente potencial melhora no sucesso reprodutivo (COSSON et al., 2008a).

Algumas condições do meio estão associadas à motilidade espermática, como: pH, osmolaridade, temperatura, concentração de íons (Na^+ , K^+ e Ca^{+2}) e taxa de diluição (ALAVI, 2005; 2006; COSSON, 2004). Em Salmonídeos (BILLARD, 1992) e Acipenserídeos (ALAVI, 2004; COSSON, 1999; 2006) os espermatozóides são imóveis nos testículos devido à alta concentração do íon potássio (K^+) no plasma seminal (WESTING; NISSLING, 1991). Quando os espermatozóides são liberados no meio externo (água-doce), a concentração de K^+ decresce por diluição, induzindo uma hiperpolarização da membrana que provoca a ativação dos espermatozóides

(BOITANO; OMOTO, 1991). Geralmente, a motilidade dos espermatozoides também pode ser induzida por pressão hiperosmótica em peixes de água salgada e por hiposmótica em peixes de água doce (ALAVI, 2007).

Uma das dificuldades para o desenvolvimento da produção massiva de alevinos de jundiá é a elevada frequência de ocorrência do protozoário ciliado *Ichthyophthirius multifiliis*, conhecido como o agente da doença dos pontos brancos (BALDISSEROTTO; RADÜNZ, 2005). Esse ciliado é responsável pela mortalidade de milhares de alevinos e juvenis em poucos dias, ou então, sob intensidades de infestação sub-letal, aumentam a suscetibilidade a outras doenças que geralmente culminam em mortalidades massivas (BOIJINK; BRANDÃO, 2001). Miron et al. (2003) comprovaram a eficiência de banhos de cloreto de sódio na concentração de 4g/L sobre a infestação de *I. multifiliis* em juvenis do jundiá, o que foi posteriormente corroborado por Andrade et al. (2006). Estes últimos autores ainda demonstraram o sinergismo benéfico entre sal e o antibiótico oxitetraciclina, no tratamento de juvenis infestados conjuntamente por *I. multifiliis* e a bactéria *Aeromonas hydrophila*. Concentrações reduzidas de NaCl também são indicadas como método profilático à infestação por fungos durante a incubação de ovos de peixes de água-doce, como foi demonstrado para o peixe-rei *Odontesthes bonariensis* (SAMPAIO; PIEDRAS, 2005).

Assim sendo, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de diferentes concentrações de sal marinho não iodado na viabilidade e qualidade dos gametas masculinos de *Rhamdia quelen*, como forma de melhorar o desempenho de sua produção sob o emprego deste agente profilático.

2. Revisão de literatura

2.1 Jundiá

O jundiá (*Rhamdia quelen*) apresenta distribuição neotropical, do sudeste do México ao norte, e centro da Argentina ao sul (SILFVERGRIP, 1996). Segundo este mesmo autor, apresenta a seguinte classificação taxonômica: Classe: Osteichthyes, Série: Teleostei, Ordem: Siluriformes,

Família: Pimelodidae, Gênero: *Rhamdia*, espécie: *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824).

Esta espécie apresenta características favoráveis ao seu cultivo, como, por exemplo, boa eficiência alimentar, carne saborosa e sem espinhos, crescimento a baixas temperaturas e rusticidade do manejo (CARNEIRO et al., 2002; FRACALOSSO et al., 2004). A maturidade sexual é atingida por volta de um ano de idade nos dois sexos, os machos iniciam o processo de maturação gonadal com 13,4cm e as fêmeas com 16,5cm. A partir de 16,5cm e 17,5cm, todos os exemplares de machos e fêmeas, respectivamente, estão potencialmente aptos para reprodução (NARAHARA; GODINHO; ROMAGOSA, 1985). Segundo Ferreira et al. (2001), esta espécie pode iniciar a maturação gonadal em temperaturas a partir de 17°C. A desova do jundiá é do tipo parcelada com desenvolvimento oocitário assincrônico, com óvulos sendo liberados em várias ocasiões do período reprodutivo, que ocorre de agosto a março no Sul do Brasil. Em cativeiro, muitas vezes, devido às condições inadequadas para ocorrer desova natural, é necessário realizar indução hormonal da espermição e desova. Dentre as substâncias indutoras mais utilizadas para o jundiá estão o extrato hipofisário e as gonadotrofinas de mamíferos (BALDISSEROTTO; NETO, 2004). As desovas induzidas são seguidas de fertilização *in vitro*, e de acordo com Bombardelli et al. (2006) a relação de 89.497 espermatozóiode.ovócito⁻¹ é indicada por apresentar elevada taxa de fertilização (86,68%).

Além da necessidade de dados complementares sobre exigências nutricionais e reprodutivas, a ocorrência de doenças atua como um limitante para produção do jundiá em larga escala. O protozoário ciliado *Ichthyophthirius multifiliis*, é um importante patógeno, devido principalmente a sua elevada letalidade e aumento da suscetibilidade dos peixes a outras infestações e/ou infecções secundárias promovidas por este ciliado. Dentre essas, a septicemia hemorrágica causada por *Aeromonas hydrophila* é bastante conhecida, sendo um agente etiológico responsável por substanciais perdas econômicas na aquicultura (BOIJINK; BRANDÃO, 2001).

A aplicação de banhos com NaCl, verde de malaquita, permanganato de potássio e formalina, são os tratamentos comumente utilizados no controle

de doenças ocasionadas por ectoparasitas, como a ictioftíriase (KUBITZA, 1999). Carneiro et al.(2006) demonstraram que o tratamento com banhos de NaCl em alevinos de jundiá infectados com *I. multifiliis* apresenta menor taxa de mortalidade (33%) em comparação a verde malaquita (80%). Entretanto, os banhos de NaCl não eliminaram completamente a presença de pontos brancos nos peixes sobreviventes ao final do período experimental, enquanto os sobreviventes ao tratamento de verde malaquita demonstraram não haver infecção pelo protozoário. Além disso, também comprovaram que a concentração de formalina (0,2 ml/L), indicada para maioria das espécies tropicais, é letal para a espécie. No entanto, desde 2002 o uso de verde malaquita tem sido banido em diferentes países, como, por exemplo, a União Européia, devido a seus efeitos tóxicos e carcinogênicos (TORTO-ALALIBO et al., 2005; NISKA et al., 2009). Estudos sobre tratamentos profiláticos alternativos, embora raros, comprovam a correlação entre dieta e estímulo do sistema imune. Vargas et al. (2008) demonstrou que dietas com altos níveis de ácidos graxos altamente insaturados da série n-3 proporcionam um aumento da sobrevivência de jundiás infestados com *I. multifiliis*.

Alguns estudos demonstram quais parâmetros de qualidade da água apresentam melhores desempenhos de produção para *R. quelen*. Maffezzoli e Nuñez (2006), testando diferentes concentrações de oxigênio na água, demonstraram a correlação positiva entre aumento da concentração de oxigênio dissolvido e aumento de peso e comprimento em alevinos de jundiá; entretanto, a menor concentração de oxigênio ($1,3 \pm 0,07$ mg/L) apresentou taxa de sobrevivência satisfatória, podendo haver ingestão mesmo em baixas concentrações de oxigênio. Lopes et al. (2001) comprovaram que a melhor faixa de pH para sobrevivência e crescimento de larvas de jundiá está entre 8,0-8,5. Segundo Marchioro e Baldisserotto (1999), alevinos de *R. quelen* suportam a transferência de água de 0 a 10% (água do mar), o que indica que essa espécie é estenoalina. Zaians e Baldisserotto (2000) demonstraram para juvenis de *R. quelen*, que os mesmos não apresentaram mortalidade significativa na faixa de pH de 4,0-9,0 (dureza de 30,0 mg/L CaCO₃) em 96 h, contudo, verificou-se que a exposição de exemplares desta espécie a águas ácidas e alcalinas provoca uma redução dos níveis corporais de Na⁺ e K⁺.

Como alternativa para diminuir situações de stress, peixes dulceaquícolas são transferidos para meios salinos como forma de diminuir o gradiente osmótico entre fluidos internos e o meio externo, estimulando produção de muco e ainda reduzindo o stress durante o transporte de peixes adultos e juvenis. Neste contexto, Souza-Bastos e Freire (2009) avaliou a capacidade de regulação osmótica do tecido muscular de *R. quelen* sob adição de NaCl na água por 1h. Seu resultado demonstra que há um aumento nos íons plasmáticos e na osmolaridade do tratamento de maior concentração (25g/L) em relação ao controle de água doce, aumentando de 260 ± 5 para 419 ± 2 mOsm.Kg⁻¹. A exposição de jundiá por 1h a 25g/L demonstrou efeito nocivo para homeostase osmótica, com aumento da glicose, ativação da anidrase carbônica branquial e alteração das funções motoras, revelando claramente uma resposta ao stress, embora sem aumento na concentração de cortisol plasmático.

Ainda são necessários estudos para melhorar o desempenho nutricional, controle de patógenos, parâmetros físico químicos da água, melhoramento genético e principalmente ajustar as técnicas de reprodução.

2.2 Qualidade espermática

Para fertilização eficiente, a qualidade do sêmen, além de outros fatores, como a qualidade da água utilizada no processo, são de vital importância. Fatores físicos e químicos da água interferem na fertilização, uma vez que podem atuar sobre a viabilidade do sêmen (FERREIRA et al., 2001).

Desde que Gray (1928) reportou pela primeira vez que os espermatozoides de ouriço do mar são quiescentes nos testículos, iniciando o movimento espermático pelo efeito de diluição na água do mar; alguns fatores foram propostos para iniciação da motilidade espermática: aumento da tensão de oxigênio dissolvido, decréscimo de dióxido de carbono, exposição ao pH alcalino marinho, ou mesmo a exposição a metais como cobre ou zinco na água do mar (MORISAWA et al., 1983).

Alguns parâmetros do meio externo aquoso, como concentração de íons (K⁺, Na⁺, Ca⁺², Mg⁺² e Cl⁻), pressão osmótica, pH, temperatura e diluição afetam o tempo de motilidade do espermatozoide (COSSON, 2004). Morisawa

e Suzuki (1980) demonstraram que os espermatozoides de “goldfish” permanecem imóveis em soluções isotônicas em relação ao plasma seminal, e tornam-se móveis quando suspensos em soluções hipotônicas, demonstrando que a osmolaridade atua como um dos principais fatores reguladores da motilidade espermática para algumas espécies (MORISAWA et al., 1983). Estudos complementares especificaram as condições osmóticas associadas à motilidade e quiescência dos espermatozoides de diferentes espécies, como por exemplo, para “halibut” que possui osmolaridade ótima para motilidade em torno de 900-1100 mOsm.kg⁻¹ (BILLARD et al., 1995), 333-645 mOsm.Kg⁻¹ para tilápia (LINHART et al., 1999) e 150-210 mOsm.Kg⁻¹ para “zebrafish” (JING et al., 2009).

Marshall et al. (1993) estudando mecanismos hormonais da motilidade espermática em truta marrom, determinaram que as gonadotropinas induzem diretamente a secreção de K⁺ para o fluido seminal e a reabsorção de Na⁺, como consequência desse transporte ativo, o fluido seminal com baixa concentração de Na⁺ e alta de K⁺ mantém os espermatozoides quiescentes até sua liberação no ambiente aquoso externo.

De uma forma geral, tem sido demonstrado que o pH possui pouco efeito sobre a ativação dos espermatozoides de peixes (ALAVI; COSSON, 2005). Borges et al. (2006) utilizando diferentes valores de pH, demonstraram que a motilidade espermática para *R. quelen* não apresenta influência do pH em uma faixa de 5 a 10.

A motilidade espermática é um pré-requisito chave para determinação da qualidade e habilidade de fertilização do sêmen, e alguns parâmetros têm sido usados para avaliar motilidade. O mais utilizado tem sido o tempo em que os gametas permanecem em movimento até alcançarem o término relativo da atividade, variável chamada de “duração de motilidade”. Estudos mais recentes referem-se ao percentual de células móveis observadas visualmente ou gravadas, através do método CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) (INGERMANN et al., 2002; COSSON, J., 2008b). Análises de motilidade são muito utilizadas para comparar diferentes condições experimentais, como: procedimentos de coleta, meio de diluição e condições de armazenamento do sêmen. Além disso, a motilidade espermática é também utilizada para avaliar o

efeito de biotecnologias, como, por exemplo, a criopreservação (BOBE; LABBÉ, 2009).

Parece estar bem estabelecido que dois principais fatores característicos do plasma seminal previnem a iniciação da motilidade espermática, são eles: alta concentração de K^+ , em Salmonidae (MORISAWA et al, 1983; STOSS, 1983) e Acipenseridae (GALLIS, 1991; ALAVI; COSSON, 2004) e a osmolaridade, baixa em relação ao meio externo, para peixes marinhos ou alta para peixes de água-doce (COSSON et al., 2008a; MORISAWA et al., 1983; BILLARD et al., 1995). A inibição da motilidade espermática por concentrações milimolares de K^+ pode ser superada pelo aumento da concentração externa de Ca^{+2} . Alguns resultados demonstram que a concentração intracelular de Ca^{+2} aumenta quando a motilidade é iniciada (COSSON; BILLARD; LETELLIER, 1989; BOITANO; OMOTO, 1991).

Independentemente da habilidade de fertilização, a motilidade espermática é uma qualidade integrativa associada a alguns compartimentos celulares responsáveis pela ativação da motilidade e sustentação do movimento progressivo. Entre esses, a membrana plasmática condiciona o sinal iônico de ativação da motilidade e mantém a barreira de permeabilidade em ordem para prevenir a fuga de componentes intracelulares importantes. A atividade mitocondrial resulta em um estoque energético adequado, e a estrutura e composição do axonema são responsáveis pela eficiência do movimento do espermatozóide (BOBE; LABBÉ, 2009).

Borges et al. (2005) estudando *R. quelen*, demonstrou a composição do plasma seminal e as variações nas características do sêmen ao longo do ano. Os resultados indicam que na primavera o espermatócrito, contagem celular, volume de sêmen e a duração da motilidade espermática foram maiores do que nos outros períodos, indicando ter nesse período uma boa qualidade seminal. A comparação dos valores do plasma seminal para eletrólitos, metabolitos e enzimas não diferiu entre primavera e inverno.

Ainda faltam estudos que demonstrem, para *R. quelen*, os mecanismos de ativação espermática, características físicas, bioquímicas, morfológicas do espermatozóide e também a padronização de técnicas que avaliem a qualidade

seminal. Estes conhecimentos são de fundamental importância para que haja uma melhora no desempenho reprodutivo da espécie.

3. Metodologia

O experimento foi realizado no período de fevereiro de 2009. Foram utilizados 25 machos adultos, com um ano de idade, produzidos pelo Laboratório de Ictiologia da Universidade Federal de Pelotas.

Os exemplares foram distribuídos em delineamento experimental ao acaso, em cinco tratamentos: 0, 2, 4, 6 e 8‰ de sal marinho não iodado. As unidades experimentais foram caixas plásticas de 180L com sistema de recirculação de água, filtro biológico, aeração constante, fotoperíodo natural e temperatura ambiente, sob taxa de renovação semanal de 80% do volume total.

Os peixes foram aclimatados as unidades experimentais por 15 dias mediante choque osmótico. Diariamente foram alimentados com ração comercial extrusada (Supra Aqualine; 42% de proteína bruta) a uma taxa diária de 10% da biomassa. A qualidade da água foi monitorada diariamente através das concentrações de oxigênio dissolvido, temperatura e pH, e semanalmente para amônia total.

Para coleta do sêmen, três indivíduos de cada tratamento foram selecionados aleatoriamente; medidos (comprimento padrão e total) e pesados. Precedente a coleta, a região do poro genital foi devidamente seca, e através de massagem abdominal o sêmen foi extrusado e recolhido em seringa descartável. O volume total (VT) de sêmen produzido foi determinado pelo aparecimento de sangue durante a extrusão, e padronizado em relação ao peso do macho extrusado ($VT = \text{volume coletado (mL)} / \text{peso do macho (g)}$).

Após a coleta, 5 μL de sêmen foram transferidos para lâmina e ativados com 50 μL dos respectivos meios de tratamento. Imediatamente, a lâmina foi sobreposta com lamínula para análise em microscópio sob aumento de 400x. Desta forma foi realizado para cada indivíduo. A contagem do tempo de motilidade foi procedida com auxílio de um cronômetro (1s). O percentual de motilidade foi determinado por estimativa subjetiva, através de escala arbitrária

em intervalos de 25%. O tempo total de motilidade foi estimado no momento em que até 25% das células espermáticas permaneciam móveis.

O grau de motilidade foi classificado segundo os parâmetros estabelecidos por Hogan e Nicholson (1978), da seguinte forma: 2- deslocamento rápido; 1- vibração sem deslocamento; 0 – inativo sem movimento.

Para determinação do espermátócrito foi utilizada centrífuga de Micro-hematócrito (modelo DMH2 13.000 RPM) e tubos capilares para micro-hematócrito não heparinizados, sendo o resultado determinado através da percentagem de volume ocupado pelo precipitado em relação ao volume total de sêmen no capilar. Para padronização do tempo de centrifugação, foi realizado ensaio que determinou a relação entre o espermátócrito e o tempo de centrifugação, sendo utilizados três machos e seis tubos capilares para cada um, correspondentes a cada tempo de centrifugação, em intervalos de 5 até 30 min de centrifugação.

Os parâmetros de volume total de sêmen, tempo de motilidade e espermátócrito foram submetidos à análise de variância ANOVA (uma via) seguida de teste de Tukey, os de percentual e grau de motilidade foram comparados mediante ANOVA não paramétrica de Kruskal-Wallis, todos sob nível de significância de 95%.

4. Resultados e discussão

Durante o ensaio as variáveis relacionadas à qualidade da água apresentaram os seguintes valores médios (\pm desvio padrão): O₂ dissolvido 8,14 \pm 0,7mg/L, amônia total não detectável ($< 0,01$ mg/L), temperatura 22 \pm 1,7°C e pH 8,57 \pm 0,07. Os exemplares não demonstraram diferença significativa para peso médio (136 \pm 56g) e comprimento total (25,2 \pm 3,4 cm).

Para ajustar o tempo necessário à estabilização do espermátócrito, foi realizado ensaio piloto com 5, 10, 15, 20, 25 e 30 min de centrifugação. Como demonstrado na Fig. 1, no tempo de 15 min observou-se uma tendência de estabilização do espermátócrito. Este tempo foi utilizado então para a determinação do espermátócrito da espécie.

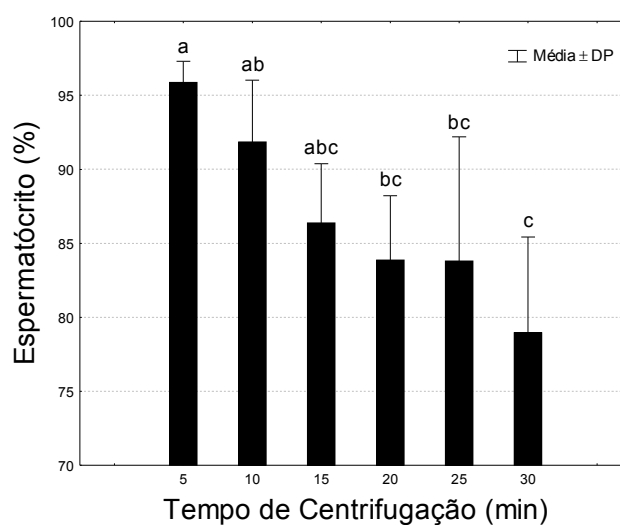


Figura 1 – Efeito do tempo de centrifugação (min.) na avaliação do espermatócrito (%; Média \pm DP).

Os valores de espermatócrito, percentual de células móveis, tempo e grau de motilidade dos espermatozóides e do volume total de sêmen são apresentados na Tab. 1.

Tabela 1 - Efeito da salinidade no espermatócrito, volume total de sêmen, percentual de células móveis, tempo e grau de motilidade espermática do jundiá *Rhamdia quelen*.

Salinidade (%)	Espermatócrito (%)	Volume de Sêmen (mL.g ⁻¹)	Percentual de células móveis (%)	Tempo de motilidade (s)	Grau de motilidade
0	88,9 \pm 4,3 ^{ab}	4,0 \pm 2,2 ^a	75-100	38 \pm 10 ^{ab}	2
2	89,5 \pm 3,1 ^{ab}	1,7 \pm 0,4 ^a	75-100	206 \pm 118 ^c	2
4	91,4 \pm 3,6 ^b	3,3 \pm 1,5 ^a	75-100	200 \pm 52 ^{bc}	2
6	88,5 \pm 1,8 ^{ab}	2,9 \pm 2,1 ^a	25-50	226 \pm 79 ^c	2
8	87,0 \pm 2,8 ^a	3,0 \pm 2,9 ^a	0	0 \pm 0 ^a	0

Letras diferentes demonstram diferença significativa entre médias (HSD Tukey; $p \leq 0,05$).

Embora o tratamento a 8‰ não tenha sido capaz de iniciar a motilidade espermática, para verificar se realmente havia possibilidade dos espermatozóides tornarem-se móveis, a amostra foi ativada com água a uma

concentração salina de 2‰, ocorrendo ativação e obtendo motilidade média de 75s. A inatividade observada pode ser explicada pelo fato da osmolaridade daquela solução estar muito próxima ao ponto isosmótico do plasma sanguíneo (260mOsm.kg^{-1}), como também do plasma seminal da espécie (275mOsm.kg^{-1}) (SOUZA-BASTOS; FREIRE, 2009; BORGES et al., 2005). Desta forma, *R. quelen* demonstra possuir padrão de motilidade espermática semelhante a maioria dos teleósteos de água doce, onde apenas soluções hiposmóticas em relação ao plasma seminal promovem a ativação dos espermatozóides (MORISAWA, 1994).

Para “catfish” (*Clarias batrachus*), os espermatozóides permanecem móveis entre 0 e 100mOsm.kg^{-1} (NaCl, KCl e solução de manitol), entretanto em 150mOsm.kg^{-1} ocorre decréscimo da motilidade e a 250mOsm.kg^{-1} o espermatozóide permanece totalmente imóvel (MORITA et al., 2006). Alavi et al. (2009) demonstraram um padrão semelhante de ativação para o lúcio (*Esox lucius*), onde a máxima motilidade espermática é alcançada em uma faixa de $125\text{-}235\text{mOsm.Kg}^{-1}$, sendo a motilidade suprimida quando o meio de ativação possui 375mOsm.Kg^{-1} (NaCl) ou 400mOsm.Kg^{-1} (manitol). A osmolaridade do plasma seminal dos machos amostrados para esse estudo foi 284mOsm.kg^{-1} . Recentemente, Jing et al. (2009), demonstraram que os espermatozóides de zebrafish tornam-se móveis entre $25\text{-}270\text{mOsm.Kg}^{-1}$, porém a maior motilidade observada ocorreu entre $150\text{-}210\text{mOsm.Kg}^{-1}$, já a osmolaridade para completa inatividade ($\geq 300\text{mOsm.Kg}^{-1}$) foi semelhante a do plasma sanguíneo (315mOsm.Kg^{-1}). Diferentemente do padrão apresentado, os espermatozóides de goldfish, carpa e góbio tornam-se móveis apenas quando diluídos em solução isotônica em relação ao plasma seminal (MORISAWA, 1983; MORITA et al., 2006).

Os valores observados para o volume de sêmen e espermátócrito mostraram-se semelhantes aos apresentados por Borges et al. (2005). O volume de sêmen liberado correlacionado ao peso do indivíduo não demonstrou diferença entre os tratamentos. Apesar da diferença significativa para o espermátócrito apontada para os tratamentos 4 e 8‰, a variação observada parece não responder direta e proporcionalmente a osmolaridade do meio.

Alguns autores sugerem que os peixes se aclimatam a variação de salinidade, depois de um tempo relativamente prolongado de exposição, voltando a estabilizar suas condições fisiológicas, como a osmolaridade plasmática (ROCHE; CHAAR; PÉRÈS, 1989). Camargo et al. (2006) conclui em seu estudo que diferentes salinidades (0, 2, 4, 6 e 8‰) por um período de 30 dias, não demonstram diferença significativa em relação aos parâmetros eritrocitários, como número total de eritrócitos, hematócrito, volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média e concentração de hemoglobina corpuscular média. Recentemente, Chew et al (2009) estudando juvenis de góbio (*Oxyeleotris marmorata*), demonstrou que a exposição por um dia a água do mar resulta em uma rápida perturbação na osmolaridade sanguínea e concentração iônica, entretanto, quando expostos por 14 dias, há uma aclimação osmorregulatória branquial, pois há um aumento na densidade e na atividade da proteína Na^+/K^+ ATPase nas células de cloreto (ricas em mitocôndrias).

Diferenças na composição química do plasma seminal e sanguíneo podem ocorrer devido à barreira sangue-testículos, situada entre o sangue e os espermatozoides em teleósteos, e entre sangue-espermatócitos em mamíferos (STEYN; VAN VUREN, 1986). As gonadotropinas podem regular diretamente as funções de transporte de íons da barreira sangue-testículos, deste modo regulando a composição iônica do plasma seminal (MARSHALL et al., 1989).

Em relação aos parâmetros de motilidade, o jundiá demonstrou tempo de motilidade típico de teleósteos dulceaquícolas, tanto no meio controle quanto nos meios hiposalinos, com cerca de 30-40s de atividade em água-doce e até 200s nos meios de salinidade reduzida (Figura 2). Os espermatozoides de jundiá são ativados imediatamente quando em contato com água doce, e a alta porcentagem de espermatozoides vigorosos e ativos movendo-se é mantida por um curto período de tempo (20s) (BORGES et al., 2005). Em estudo realizado por Morita et al. (2006), com Carpa-java (*Puntius javanicus*) e “catfish” (*Clarias batrachus*) apresentaram tempos de motilidade de 10 e 90s, respectivamente.

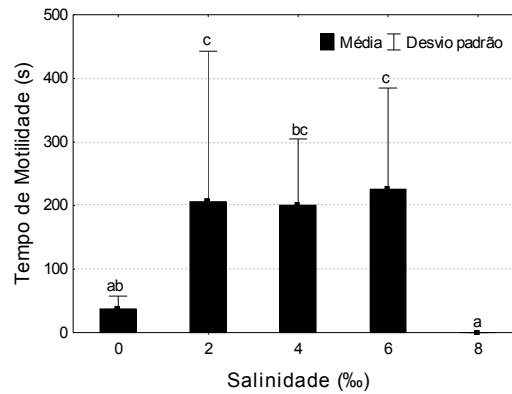


Figura 2. Efeito da salinidade (‰) sobre o tempo de motilidade espermática (s; Média \pm DP) de *Rhamdia quelen*.

De acordo com os resultados obtidos, o maior tempo de motilidade ocorreu em soluções hiposmóticas em relação ao plasma seminal, entretanto foi observado que a pressão osmótica promove alterações morfológicas da cabeça espermática (visível aumento de volume devido a entrada de água do meio externo), o que explica o curto tempo de motilidade (MORISAWA et al., 1983; TAKAI; MORISAWA, 1995; COSSON, 1999) encontrado quando a concentração salina foi zero. De forma semelhante, o espermatozóide de carpa, quando diluído em meio hipotônico, nada ativamente por uma fração de segundos após ativação. Quando o espermatozóide é diluído em água destilada, ocorre um progressivo inchaço da cabeça e da parte distal do flagelo, seguido por um progressivo enrolamento da extremidade do flagelo, o comprimento flagelar diminuiu e o espermatozóide para sua motilidade progressivamente, pois o flagelo torna-se excessivamente curto para permitir alguma propagação de batimento (COSSON, 2008). Ainda, a permeabilidade e a estrutura da membrana plasmática apresentam modificação devido à reorganização da bicamada lipídica (MÀRIÀN et al., 1993; 1997). Diferentemente, Wilson-Leddy et al. (2009) demonstraram para *Danio rerio*, que meios hiposmóticos em relação ao plasma seminal resultam em atraso no início da motilidade, entretanto aumenta a intensidade de deslocamento e ainda o tempo total de motilidade.

Há uma clara evidência da importância do aumento da osmolaridade até o ponto isosmótico do plasma seminal no jundiá, visto que, conforme indicado para outros peixes dulceaquícolas, a ação de hidratação dos espermatozoides em meio hiposmótico promove a diluição da concentração intracelular do K^+ , constituindo o principal evento de ativação da motilidade espermática (TAKAI; MORISAWA, 1995; WILSON-LEEDY et al. 2009). Diferentemente de outras espécies, estudos anteriores com o jundiá demonstraram que o pH não apresenta influência sobre a capacidade de ativação e tempo de motilidade espermático (FERREIRA et al., 2001). Em Ciprinídeos, por exemplo, há influência de pH intracelular e extracelular sobre a capacidade de ativação e motilidade espermática (MÀRIÀN, 1997).

5. Conclusões

A exposição crônica (até 15 dias) de reprodutores de jundiá sob salinidade até 6‰ de sal marinho não prejudica a qualidade espermática, além disso, poderá potencializar o sucesso de fecundação devido o expressivo aumento do tempo de motilidade. Assim, o emprego de meios hiposalinos para fins de controle do protozoário *Ichthyophthirius multifiliis* durante a produção de machos adultos, em salinidades entre 2 e 6‰ (NaCl), pode ser utilizada, sem que haja perda na qualidade dos gametas masculinos.

6. Referências

- ALAVI, S. M. H; COSSON, J.; KARAMI, M.; AMIRI, B. M.; AKHOUNDZADEH, A. Spermatozoa motility in the Persian sturgeon, *Acipenser persicus*: effects of pH, dilution rate, ions and osmolality. **Reproduction Research**, v.128, p.819–28, 2004.
- ALAVI, S. M. H; COSSON, J. Sperm motility in fishes: I. Effects of pH and temperature. **Cell Biology International**, v.29, p.101–10, 2005.
- ALAVI, S. M. H.; COSSON, J. Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolaity. **Cell Biology International**, v.30, p.1–14, 2006.
- ALAVI, S. M. H.; RODINA, M; POLICAR, T; KOZAK, P.; PSENICKA, M.; LINHART, O.. Semen of *Perca fluviatilis* L.: Sperm volume and density, seminal plasma indices and effects of dilution ratio, ions and osmolality on sperm motility. **Theriogenology**, v.68, p.276–283, 2007.

ANDRADE, L. S.; ANDRADE, R. L. B.; BECKER, A. G.; BALDISSEROTTO, B. Survival and behavior of silver catfish, *Rhamdia quelen*, submitted to antibiotics and sodium chloride treatments. **Ciência Rural** (Santa Maria, RS) v.36, n.3, p.1004-1007, 2006.

BALDISSEROTTO, B.; NETO, J. R. Reprodução. In: Criação de Jundiá. Santa Maria: Ed. UFSM, 2004. p.95-105.

BALDISSEROTTO, B.; NETO, J. R. Jundiá (*Rhamdia* sp.). In: BALDISSEROTTO, B., GOMES, L.C. **Espécies nativas para a piscicultura no Brasil**. Santa Maria: Editora UFSM, 2005. p.303-325.

BILLARD, R.; COSSON, M. P. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. **The Journal of Experimental Zoology**, v.261, p.122-31, 1992.

BILLARD, R.; COSSON, J.; PERCHEC, G.; LINHART, O. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. **Aquaculture**, v.124, p.95-112, 1995.

BOBE, J.; Labbé, C. Egg and sperm quality in fish. **General and Comparative Endocrinology**, 2009. Disponível em: <doi:10.1016/j.ygcen.2009.02.011>. Acesso em: 12 dez. 2009.

BOIJINK, C. L.; BRANDÃO, D. A. Alterações histológicas e comportamentais provocadas pela inoculação de suspensão bacteriana (*Aeromonas hydrophila*) em juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*). **Ciência Rural** (Santa Maria), v.31, n.4, p.687-690, 2001.

BOITANO, S.; OMOTO, K.C. Membrane hyperpolarization activates trout sperm without an increase in intracellular pH. **Journal of Cell Science**, v.98, p.346-349, 1991.

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

BORGES, A.; SIQUEIRA, D. R.; JURINITZ, D. F.; ZANINI, R.; AMARAL, F.; GRILLO, M. L.; OBERST, E. R.; WASSERMANN, G. F. Biochemical composition of seminal plasma and annual variations in semen characteristics of jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, Pimelodidae). **Fish Physiology and Biochemistry**, v.31, p.45-53, 2005.

BRAUN, N.; LIMA, R. L.; MORAES, B.; LORO, V. L.; BALDISSEROTTO, B. Survival, growth and biochemical parameters of silver catfish, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824), juveniles exposed to different dissolved oxygen levels. **Aquaculture Research**, v.37, p.1524-1531, 2006.

CAMARGO, S. G. O.; POUHEY, J. L. O. F.; VAZ, B. S. Efeito da salinidade nos parâmetros hematológicos do jundiá (*Rhamdia quelen* – Quoy & Gaimard, 1824). **Revista Brasileira de Agrociência**, v.12, n.4, p.453-460, 2006.

CARNEIRO, P. C. F.; BENDHACK, F.; MIKOS, J. D.; SCHORER, M.; OLIVEIRA FILHO, P. R. C. Jundiá: um grande peixe para a região sul. **Panorama da Aqüicultura**, v.12, n.69, p.41-46, 2002.

CARNEIRO, P. C. F.; CIRIO, S. M.; SCHORER, M. Estudo anatomopatológico de alevinos de jundiá infectados experimentalmente por *Ichthyophthirius multifiliis* e submetidos a tratamentos convencionais. **Archives of Veterinary Science**, v.11, n.1, p.33-38, 2006.

CHEW, S. F.; TNG, Y. Y. M.; WEE, N. L. J.; WILSON, J. M.; IP, Y. K. Nitrogen metabolism and branchial osmoregulatory acclimation in the juvenile marble goby, *Oxyeleotris marmorata*, exposed to seawater. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v.154, p.360-369, 2009.

COSSON, M. P.; BILLARD, R.; LETELLIER, L. Rise in intracellular Ca^{2+} accompanies the initiation of trout sperm motility. **Cell Motility and the Cytoskeleton**, v.14, p.424-434, 1989.

COSSON, J.; BILLARD, R.; CIBERT, C.; DREANNO, C.; SUQUET, M. Ionic factors regulating the motility of fish sperm. In: Gagnon C, editor. The male gamete: from basic to clinical applications. Vienna: Cache Rive Press, 1999. p.161–86.

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

COSSON, J.; GROISON, A. L.; SUQUET, M.; FAUVEL, C.; DREANNO, C.; BILLARD, R. Studying sperm motility in marine fish: an overview on the state of the art. **Journal of Applied Ichthyology**, v.24, p.460–86, 2008.

COSSON, J. 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**. Oxford, U.K.: Alpha Science International Ltd. 2008, p.63–102.

FERREIRA, A. A.; NUÑER, A. P. O.; LUZ, R. K.; TATAJE, D. A. R.; ESQUIVEL, J. R.; RESTREPO, J. B. Avaliação qualitativa e quantitativa do sêmen de jundiá, *Rhamdia quelen*. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.27, n.1, p.57-60, 2001.

FRACALOSSO, D. M.; MEYER, G.; SANTAMARIA, F. M.; WEINGARTNER, M.; FILHO, E. Z. Desempenho do jundiá, *Rhamdia quelen*, e do dourado, *Salminus brasiliensis*, em viveiros de terra na região sul do Brasil. **Acta Scientiarum (Animal Sciences)**, v.26, n.3, p.345-352, 2004.

GALLIS, J. L.; FEDRIGO, E.; JATTEAU, P.; BONPUNT, E.; BILLARD, R. Siberian sturgeon spermatozoa: effects of dilution, pH, osmotic pressure,

sodium and potassium ions on motility. In: Williot P, editor. **Acipenser**. Bordeaux: Cemagref; p.143–151, 1991.

GOMES, L. C.; GOLOMBIESKI, J. I.; GOMES, A. R. C.; BALDISSEROTTO, B. Biologia do Jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). **Ciência Rural**, v.30, n.1, p.179-185, 2000.

GRAY, J. The effect of dilution on the activity of spermatozoa. **Journal of experimental Biology**, v.5, p.337-344, 1928.

HOGAN, A. E.; NICHOLSON, J. C. Sperm motility of Sooty Grunter, *Hephaestus fuliginosus* (Macleay), and jungle perch, *Kuhlia rupestris* (Lacépède), in different salinities. **Australian Journal of Marine and Freshwater Research**, v.38, p.523-528, 1987.

INGERMANN, R.L.; HOLCOMB, M.; ROBINSON, M.L.; CLOUD, J.G. Carbon dioxide and pH affect sperm motility of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). **Journal of Experimental Biology**, v.205, p.2885-2890, 2002.

JING, R.; HUANG, C.; BAI, C.; TANGUAY, R.; DONG, Q. Optimization of activation, collection, dilution, and storage methods for zebrafish sperm. **Aquaculture**, v.290, n.1-2, p.165-171, 2009.

KRASZNAI, Z.; MÁRIÁN, T.; IZUMI, H.; DAMJANOVICH, S.; BALKAY, L.; TRON, L. Membrane hyperpolarization removes inactivation of Ca⁺² channels leading to Ca⁺² influx and initiation of sperm motility in the common carp. **Biophysics**, v.97, p.2052-2067, 2000.

KUBITZA, F. Principais parasitoses e doenças dos peixes cultivados. Piracicaba: Degaspari, 1999. p.96.

LINHART, O.; WALFORD, J.; SIVALOGANATHAN, B.; LAM, T. J. Effects of osmolality and ions on the motility of stripped and testicular sperm of freshwater- and seawater-acclimated tilapia, *Oreochromis mossambicus*. **Journal Fish Biology**, v.55, p.1344-1358, 1999.

LOPES, J.M.; SILVA, L. V. F.; BALDISSEROTTO, B. Survival and growth of silver catfish larvae exposed to different water pH. **Aquaculture International**, v.9, p.73-80, 2001.

MAFFEZZOLLI, G.; NUÑER, A. P. O. Crescimento de alevinos de jundiá, *Rhamdia quelen* (Pisces, Pimelodidae). Em diferentes concentrações de oxigênio dissolvido. **Acta Scientiarum, Biological Science**, v.28, n.1, p.41-45, 2006.

MARCHIORO, M. I.; BALDISSEROTTO, B. Sobrevivência de alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard, 1824) à variação de salinidade da água. **Ciência Rural** (Santa Maria), v.29, n.2, p.315-318, 1999.

- MÀRIÀN, T.; KRASZNAI, Z.; BALKAY, L.; BALAZS, M.; EMRI, M.; BENE, L.; TRON, L. Hypo-osmotic shock induces an osmolality dependent permeabilisation and structural changes in the menmbrane of carp sperm. **Journal of Histology and Citology**, v.41, p.291-297, 1993.
- MÀRIÀN, T.; KRASZNAI, Z.; BALKAY, L.; EMRI., M.; TRÓN, L. Role of extracellular and intracellular pH in carp sperm motility and modifications by hyperosmosis of regulation of NaC/HC exchanger. **Cytometry**, v.27, p.374-382, 1997.
- MARSHALL, W. S.; BRYSON, S.E.; IDLER, D. R. Gonadotropin action on brook trout sperm duct epithelium: ion transport stimulation mediated by cAMP and calcium. **General and Comparative Endocrinology**, v.90, p.232-242, 1993.
- MIRON, D. S.; SILVA, L. V. F.; GOLOMBIESKI, J. I; BALDISSEROTTO, B. Efficacy of different salt (NaCl) concentrations in the treatment of *Ichthyophthirius multifiliis* infected silver catfish, *Rhamdia quelen*, fingerlings. **Journal of Applied Aquaculture**, v.14, p.155-161, 2003.
- MORISAWA, M; SUZUKI, K. Osmolality and potassium ion: their roles in initiation of sperm motility in teleosts. **Science**, v.210, p.1145-1147, 1980.
- MORISAWA, M.; SUZUKI, K.; SHIMIZU, H.; MORISAWA, S.; YASUDA, K. Effects of osmolality and potassium on motility of spermatozoa from freshwater Cyprinid fishes. **Journal Experimental of Biology**, v.107, p.95-103, 1983.
- MORISAWA, M. Cell signaling mechanisms for sperm motility. **Zoological Science**, v.11, p.647-662, 1994.
- MORISAWA, M.; ODA, S.; YOSHIDA, M.; TAKAI, H. Transmembrane signal transduction for the regulation of sperm motility in fishes and ascidians. In: Gagnon C, editor. The male gamete: from basic to clinical applications. Vienna: Cache Rive Press; p.149-60, 1999.
- MORITA, M.; OKUNO, M.; SUSILO, E. S.; SETYO, B. P.; MARTARINI, D.; HARNADI, L.; TAKEMURA, A. Changes in sperm motility in response to osmolality/Ca²⁺ in three Indonesian fresh water teleosts: Goby (*Oxyeleotris marmorata*), Java carp (*Puntius javanicus*), and catfish (*Clarias batrachus*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v.143, p.361-367, 2006.
- NARAHARA, M. Y.; GODINHO, H. M.; ROMAGOSA, E. Estrutura da população de *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840) (Osteichthyes, Siluriformes, Pimelodidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, v.12, n.3, p.123-137, 1985.
- NISKA, K.; KORKEA-AHO, T.; LINDFORS, E.; KIURU, T.; TUOMAINEN, M.; TASKINEN, J.; PELTONEN, K. Disappearance of malachite green residues in fry rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after treatment of eggs at the hatching stage. **Aquaculture**, v.297, p.25-30, 2009.

RURANGWA, E.; KIME, D. E.; OLLEVIER, F.; NASH, J. P. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish.

Aquaculture, v.234, p.1 –28, 2004.

ROCHE H.; CHAAR, K.; PÉRÈS, G. The effect of a gradual decrease in salinity on the significant constituents of tissue in the sea bass (*Dicentrarchus labrax* Pisces). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v.93, n.4, p.785-789, 1989.

SAMPAIO, L. A.; PIEDRAS, S. R. N. Cultivo do peixe-rei marinho, *Odontesthes argentinensis*, e de água doce, *Odontesthes bonariensis*. In: BALDISSEROTO, B.; GOMES, L. C. Espécies nativas para piscicultura no Brasil. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, p.345-361, 2005.

SILFVERGRIP, A. M. C. A sistematic revision of the neotropical catfish genus *Rhamdia* (Teleostei, Pimelodidae). 1996. 156p. Thesis (PhD) - Department of Zoology, Stockholm University and Department of Vertebrate Zoology, Swedish Museum of Natural History, Stockholm, Sweden.

SOUZA-BASTOS, L. R.; FREIRE, C. A. The Handling of salt by the neotropical cultured freshwater catfish *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, v.289, p.167-174, 2009.

STOSS, J. Fish gamete preservation and spermatozoan physiology. In: Hoar WS, Randall DJ, Donaldson EM, editors. Fish physiology, vol. IXB. New York: Academic Press, 1983. p.305–350.

STEYN, G.J.; VAN VUREN, J.H.J. The role of the bloodtestis barrier in the chemical composition of the seminal plasma of the freshwater teleost *Clarias gariepinus*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v.86, p.421–425, 1986.

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

TORTO-ALIBO, T.; TIAN, M.; GAJENDRAN, K.; WAUGH, M. E.; WEST, P. V.; KAMOUN, S. Expressed sequence tags from the oomycete fish pathogen *Saprolegnia parasitica* reveal putative virulence factors. **Biomedical Central Microbiology**, v.5, p.46-59, 2005.

TOWNSEND, C. R.; BALDISSEROTTO, B. Survival of silver catfish exposed to acute changes of water pH and hardness. **Aquaculture International**, v.9, p.413-419, 2001.

VARGAS, R. J.; SOUZA, S. M. G.; MABILIA, R. G.; CARLET, F.; BAGGIO, S. R. Resposta fisiológica à infestação experimental com *Ichthyophthirius multifiliis* (FOUQUET, 1876) em alevinos de judiá (*Rhamdia quelen* Quoy e Gaimard, 1824) previamente alimentados com diferentes fontes lipídicas. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.12, n.2, p.81-86, 2008.

WESTING, L.; NISSLING, A. Effects of salinity on spermatozoa motility, percentage of fertilized eggs and egg development of Baltic cod (*gadus morhua*), and implications for stock fluctuations in the Baltic. **Marine Biology**, v.108, p.5-9, 1991.

WILSON-LEEDY, J. G.; KANUGA M.K.; INGERMANN R.L. Influence of osmolality and ions on the activation and characteristics of zebrafish sperm motility. **Theriogenology**, v.71, p.1054–1062, 2009.

ZAIONS, M. I.; BALDISSEROTTO, B. Na⁺ and K⁺ Body levels and survival of fingerlings of *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Pimelodidae) exposed to acute changes of water pH. **Ciência Rural**. v.30, n.6, p.1041-1045, 2000.