

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE - ICBS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:FISIOLOGIA

**VALORES HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS SÉRICOS, EFEITOS DE
DOSES SUB-LETAIS DA CIPERMETRINA E CARACTERÍSTICAS FÍSICO-
QUÍMICAS DO SÊMEN DO JUNDIÁ *RHAMDIA QUELEN***

Adriana Borges

Tese apresentada ao Curso de
Pós-graduação em Ciências Biológicas:
Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
como requisito para a obtenção do título de Doutora em Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Guillermo Federico Wassermann

Porto Alegre, agosto de 2005

**Aos meus pais (*in memoriam*) e a Deus,
por terem me dado o dom da vida...**

**Ao meu esposo Gleyer a minha filha Laura,
que são as maiores alegrias da minha vida**

**Ao meu Orientador,
pela oportunidade de trabalhar em seu grupo,
pela confiança, dedicação, pelo valioso exemplo de profissional e ensinamentos de vida**

AGRADECIMENTOS

A minha mãe, pelo seu jeito alegre e tranqüilo, sua coragem, amor e incentivo na busca dos meus objetivos.

Aos meus irmãos, pela amizade, carinho, e estímulo para enfrentar novos desafios.

Ao meu sogro e sogra, pelo apoio e por terem cuidado da minha filha com tanto amor, proporcionando paz e tranqüilidade para eu desenvolver este trabalho.

Às bolsistas de iniciação científica, Daniele, Daiane, Rebeca e Fernanda, o meu sincero obrigado pela amizade, comprometimento, perseverança e seriedade, demonstrados tanto nas experiências que tivemos êxito, como nos momentos mais difíceis.

Ao Marcelo, pela amizade e companheirismo, por ter disponibilizado a sua sala, pelo auxílio na busca dos animais e pela importante participação em parte deste trabalho.

À Ender, pela amizade, auxílio constante no desenvolvimento das técnicas de sêmen e colaboração nas mais diferentes situações.

À técnica Elsa Pires, por ter mantido as melhores condições no Laboratório, pela ajuda importantíssima na aquisição dos animais. Por sua presença alegre, sua atuação responsável e prestativa.

À Eliane, pela ajuda na utilização e interpretação do programa de análises toxicológicas.

À Eloísa, pelo apoio, amizade e colaboração.

Aos colegas do Laboratório Ana Paula, Márcia, Esther e Débora, pelo prazeroso convívio diário e por terem contribuído com amizade e coleguismo em diferentes momentos.

Ao Sérgio e a Sra. Regina, pela amizade, por terem nos fornecido animais de qualidade, pelo atendimento prestativo e pelo interesse a este trabalho.

Ao Setor de transporte da UFRGS, por terem disponibilizado automóveis e motoristas para o transporte dos animais, pelos cuidados necessários e pela paciência dos funcionários.

À Luciana, pelo carinho e amizade, interesse na pesquisa de novas metodologias aplicáveis ao jundiá.

Aos professores, pela oportunidade de poder aprender através do relato de suas próprias experiências e dos conhecimentos já adquiridos, pelo interesse e incentivo.

Aos amigos, colegas e familiares, que direta ou indiretamente contribuíram na execução deste trabalho.

Ao CNPq, FAPERGS, PROPESQ-UFRGS, pelo apoio financeiro.

ÍNDICE

Lista de Figuras	ix
Lista de Tabelas.....	x
Lista de Abreviaturas.....	xii
Resumo.....	xiii
1. Introdução.....	01
1.1. Jundiá <i>Rhamdia quelen</i>.....	01
1.2. Parâmetros sangüíneos em peixes.....	02
1.2.1. Aspectos gerais da hematopoiese.....	04
1.2.2. Células sangüíneas em peixes.....	06
1.3. Características físico-químicas do sêmen de peixes.....	08
1.3.1. Os espermatozóides.....	08
1.3.2. O plasma seminal.....	11
1.4. Efeitos dos piretróides em peixes: toxicidade e modificações nos parâmetros bioquímicos e hematológicos.....	14
2. Justificativa.....	17
3. Objetivos.....	18
3.1. Objetivos gerais.....	18
3.2. Objetivos específicos.....	18
4. Material e Métodos.....	20
4.1. Análise sangüínea.....	20
4.2. Efeito da cipermetrina	23
4.3. Estudo do sêmen.....	27
5. Capítulo 1	
“Hematologic and Serum Biochemical Values for Jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>)”	32

6. Capítulo 2	
“Biochemical Values of Seminal Plasma and Annual Variations of Physical Characteristics of the Milt from Jundiá <i>Rhamdia quelen</i> (Quoy and Gaimard, Pimelodidae)”	38
7. Capítulo 3	
“Toxicity of Cypermethrin in Jundiá <i>Rhamdia quelen</i>. Changes in Haematological and Serum Biochemical Values Due to Sub-Lethal Concentrations of Cypermethrin”	70
8. Discussão Geral	94
9. Conclusões	103
9.1. Conclusões gerais	103
9.2. Conclusões específicas	103
10. Perspectivas Futuras	107
11. Referências Bibliográficas	109
12. ANEXO	
Artigo submetido “Biochemical Values of Seminal Plasma and Annual Variations of Physical Characteristics of the Milt from Jundiá <i>Rhamdia quelen</i> (Quoy and Gaimard, Pimelodidae)” <i>contendo as modificações sugeridas pelos revisores</i>	127

Lista de Figuras

*numeração das páginas conforme numeração descrita nos artigos

Capítulo 2		*
Figura 1.	Jundiá <i>Rhamdia quelen</i> (5 meses de idade).....	22
Figura 2.	Espermatozóides do jundiá <i>Rhamdia quelen</i> . Microscopia óptica (x400).....	23
Figura 3.	Influência do tempo de centrifugação sobre o espermátócrito do jundiá. Cada ponto representa a média de pelo menos 15 amostras de sêmen coletadas de 5 machos.....	24
Figura 4.	Valores do espermátócrito e da contagem dos espermatozóides do jundiá durante o ano ■ espermátócrito ● contagem ($\times 10^9/\text{ml}$)	25
Figura 5.	Volume of sêmen extraído por peixe em um dia nos diferentes meses. O número de peixes está entre os parênteses.....	26
Figura 6.	Volume total de sêmen extraído ($\text{ml day}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ peixe) durante meses representativos das estações. O número de peixes está entre os parênteses.....	27
Figura 7.	Produção de espermatozóides em diferentes estações (número de espermatozóides $\times \text{ml}^{-1} \times$ volume of sêmen (ml) $\times \text{day}^{-1}$). O número de peixes está entre os parênteses.....	28
Figura 8.	Duração da motilidade dos espermatozóides do jundiá (em percentual de movimento progressivo e vigoroso) após a ativação com água doce na temperatura ambiente (24°C). Todos espermatozóides foram imóveis após 45 segundos. Cada ponto representa a média de pelo menos 45 amostras de sêmen coletadas de 15 machos.....	29

Figura 9.	Influência do tempo de armazenamento sobre a duração da motilidade dos espermatozóides. A linha horizontal representa o tempo após a coleta ou o período de armazenamento em horas após a retirada do sêmen numa sala à temperatura ambiente (24°C). n=5 amostras para cada tempo.....	30
Figura 10.	Motilidade dos espermatozóides do jundiá em diferentes pHs. Em pH3 as células precipitaram e em pH12 as células ficaram completamente dissolvidas. n=5 por grupo (triplicatas de sêmen coletado em todos peixes).....	31
Capítulo 3		*
Figura 1.	Mortes acumulativas durante o período de 24, 48, 72 e 96 horas após a exposição do jundiá a diferentes concentrações de cipermetrina.....	23

Lista de Tabelas

*numeração das páginas conforme numeração descrita nos artigos

Capítulo 1		*
Tabela 1.	Parâmetros físico-químico da qualidade da água, peso médio e medidas dos peixes.....	22
Tabela 2.	Média ± EPM e limites de confiança (95%) dos valores bioquímicos séricos dos peixes (machos de Jundiá)	23
Tabela 3.	Média ± EPM e limites de confiança (95%) dos valores hematológicos dos peixes (machos de Jundiá).....	23

Capítulo 2	*
Tabela 1. Parâmetros físico-químico da qualidade da água nos tanques de armazenamento do Jundiá <i>Rhamdia quelen</i>	20
Tabela 2. Média \pm EPM e amplitude dos valores do fluido seminal e média \pm EPM dos valores bioquímicos séricos dos machos do jundiá.....	21
Capítulo 3	*
Tabela 1. Parâmetros físico-químicos da qualidade da água	18
Tabela 2. Toxicidade da cipermetrina ao jundiá <i>Rhamdia quelen</i> (em ppm) calculada com as concentrações 0.10, 0.12, 0.16, 0.20, 0.24, 0.32 e 0.36 ppm.....	19
Tabela 3. Valores bioquímicos do soro sanguíneo - normal e após tratamento com cipermetrina 0.08 ppm. Valores representam a média \pm EPM.....	20
Tabela 4. Valores bioquímicos do soro sanguíneo - normal e após tratamento com cipermetrina 0.12ppm. Valores representam a média \pm EPM.....	21
Tabela 5. Valores hematológicos do plasma sanguíneo - normal e após tratamento com cipermetrina 0,08, 0,10 e 0,12ppm. Valores representam a média \pm EPM.....	22

Lista de Abreviaturas

CI	células imaturas
CL ₁₆	concentração letal para 16% dos animais utilizados no mesmo grupo
CL ₅₀	concentração letal para 50% dos animais utilizados no mesmo grupo
CL ₈₄	concentração letal para 84% dos animais utilizados no mesmo grupo
CST	células semelhantes aos trombócitos
dl	decilitro
EDTA	ácido etilenodiaminotetra-acético
EPM	erro padrão médio
g	grama
GABA	ácido γ -aminobutírico
GPT	glutâmico-pirúvico transaminase
GOT	glutâmico-oxaloacetato transaminase
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Hb	hemoglobina
Ht	hematócrito
ICBS	Instituto de Ciências Básicas da Saúde
l	litro
LDH	lactato desidrogenase
μ g	micrograma
μ l	microlitro
μ mol	micromol
MCHC	média da concentração de hemoglobina corpuscular
mEq	miliequivalente
mg	miligrama
min	minuto
MHC	média de hemoglobina corpuscular
ml	mililitro
mm	milímetro
MVC	média de volume corpuscular
pg	picograma
pH	potencial hidrogeniônico
ppm	parte por milhão
seg	segundo
UI	unidade internacional

RESUMO

Este trabalho teve três objetivos principais: a) Estabelecer valores de referência para os parâmetros bioquímicos e hematológicos do jundiá cultivado em açude; b) Determinar a CL_{50} da cipermetrina ao jundiá, bem como verificar o efeito nos parâmetros sanguíneos; c) Determinar as características físicas e químicas do sêmen do jundiá. Os animais foram obtidos de açudes de um Produtor de Peixes em Rolante, RS e conduzidos ao Laboratório do ICBS, UFRGS, onde permaneceram em tanques de 500l. O sangue era obtido por punção do vaso caudal através de seringa descartável, transferidos a tubos com e sem EDTA 10%, e os testes bioquímicos e hematológicos realizados no HCPA. Para a avaliação da CL_{50} da cipermetrina no jundiá grupos ($n \geq 10$) de animais foram tratados com a exposição a 8 diferentes concentrações de cipermetrina (ppm) (0:controle; 0,08; 0,1; 0,12; 0,16; 0,2; 0,24; 0,36). Os peixes foram observados após 24, 48, 72 e 96h do início do tratamento para avaliar o percentual de mortalidade. No estudo do estresse metabólico, grupos ($n \geq 6$) receberam os tratamentos: ausência de exposição ao pesticida (controle) e duas doses (0,08 e 0,12 ppm) de cipermetrina. Foram feitas coletas de sangue antes, após 2, 4 e 8 dias da aplicação do pesticida para análise no HCPA. Para o estudo do sêmen, este foi obtido em diferentes períodos durante as 4 estações. A densidade espermática foi medida pela técnica do espermatócrito e pela contagem microscópica. A duração da motilidade espermática foi observada num microscópio, usando para interpretação uma escala arbitrária variando de 0 a 5. Parte do sêmen foi centrifugado para a obtenção do fluido seminal, o qual foi imediatamente congelado a $-20^{\circ}C$ até análise no HCPA. Os resultados mostraram que a cipermetrina é altamente tóxica aos peixes, embora o efeito seja

menor que o observado em outras espécies. Através dos resultados obtidos com a exposição à cipermetrina, foi visto que com a menor dose (0,08ppm) durante os períodos de tratamento (2, 4 e 8 dias) houve um aumento significativo de Mg, P, uréia, glicose, colesterol, creatinina, GOT, fosfatase alcalina e LDH, e uma diminuição significativa das proteínas totais e triglicerídeos. Com a maior dose (0,12 ppm) de cipermetrina ocorreu uma elevação significativa do Na, Mg, P, uréia, glicose, colesterol, creatinina e fosfatase alcalina, e uma diminuição significativa das proteínas totais, triglicerídeos, GPT e GOT. O sêmen foi de cor branca, sem odor, aspecto cremoso e pH $8,0 \pm 0,03$. O volume total de sêmen foi 1,06 ml durante o verão (máximo) e 0,23 ml durante o inverno (mínimo). O espermatócrito mostrou valores na primavera e começo do verão de 79 a 82%, alcançando 65 a 69% no outono e inverno. A contagem das células espermáticas oscilou entre 48 a $75 \times 10^9 \text{ ml}^{-1}$. Imediatamente após a diluição na água, 90-100% (Grau 5) dos espermatozoides apresentaram motilidade vigorosa e progressiva, que permaneceu por pelo menos 20 segundos. Este padrão de motilidade foi mantido por mais que 2 horas após a permanência do sêmen na temperatura ambiente (24°C). O pH das soluções entre 5 e 10 não influenciou a motilidade espermática. Através dos resultados obtidos foram estabelecidos valores normais da bioquímica do soro, da hematologia e do fluido seminal de uma população de jundiá cultivada em açudes. As análises sanguíneas utilizadas rotineiramente por produtores de jundiá em sistemas de aquicultura permitem controlar as condições nutricionais e sanitárias dos peixes. Embora o aspecto geral dos peixes estivesse normal durante o tratamento com a menor dose de cipermetrina, a análise sanguínea mostrou alterações produzidas pelo pesticida. Com a concentração 0,12 ppm as variações bioquímicas foram incrementadas e já se observaram alterações nos movimentos e no equilíbrio. Em estações

de aqüicultura, produtores podem realizar avaliação periódica em uma pequena população de seus peixes, quantificando o grau de estresse metabólico. Esses indicadores de estresse podem ser precocemente detectados apesar da aparência exterior e comportamentos normais dos peixes. A técnica para a medida da densidade espermática através do espermatócrito apresentou correlação com a contagem celular por microscópio, com a vantagem de ser mais simples, rápida e econômica. As características que foram encontradas no sêmen parecem ser bons indicadores da qualidade espermática e podem auxiliar na seleção de machos doadores de gametas de alta qualidade em sistemas de cultivo deste peixe.

1. INTRODUÇÃO

1.1. JUNDIÁ *Rhamdia quelen*

O jundiá é um peixe teleósteo, da ordem Siluriformes, família Heptapteridae, que possui ampla ocorrência, muito encontrado em rios do interior do Rio Grande do Sul. Esta espécie é nativa da América do Sul, caracterizando-se por resistir bem o frio do inverno e por crescer rápido no verão, sendo assim, uma espécie aceitável para sistemas de produção em regiões da parte sul da América do Sul, por se adaptar muito bem ao clima temperado e subtropical. Em sistemas de aquicultura pode atingir 600 a 800 g de massa corporal em apenas 8 meses ao ser cultivada numa densidade de dois a quatro peixes por m² (Barcellos *et al.*, 2003; Lermen *et al.*, 2004).

O corpo do jundiá é revestido por couro, apresentando uma longa nadadeira adiposa. Os alevinos podem suportar a salinidade de 9g/l de sal comum e pH na faixa de 8,0 a 8,5. Seu hábito alimentar é omnívoro com tendência a piscívoro. O melhor alimento artificial para as larvas desta espécie baseia-se em lecitina de soja, fígado bovino e levedura. Estes animais possuem a estrutura bucal de tamanho grande, sem dentes e com três pares de barbilhões sensitivos do lado externo. É uma espécie que apresenta a pele de coloração variada podendo ser desde o cinza-esverdeado escuro no dorso até a coloração esbranquiçada no ventre. É considerada uma espécie euritérmica, resistindo a grandes oscilações de temperatura, embora o ideal térmico situe-se entre 22-28⁰C. Suporta níveis baixos de oxigênio na água. Sua reprodução ocorre em águas na faixa de temperatura de 22-25⁰C, coincidindo com o início da primavera (Pouey *et al.*, 1999; Carneiro *et al.*, 2002).

A maturidade sexual do jundiá é atingida no primeiro ano de vida, o que favorece muito a reprodução. É uma espécie ovulípara e, na natureza, os cardumes

desovam em locais com águas limpas, calmas e fundo pedregoso. Não apresenta cuidado parental. Possui dois picos reprodutivos por ano (um na primavera e outro no verão) com desova múltipla (Gomes *et al.*, 2000).

Muitas comunidades aproveitam o jundiá como fonte alimentar, uma alternativa de alimentação de fácil aquisição, alto valor nutritivo e fácil digestibilidade. A sua carne é praticamente desprovida de espinhas intramusculares e o seu sabor é considerado muito bom. A produção intensiva do jundiá tem se desenvolvido nos últimos anos por ser uma espécie que apresenta as vantagens do crescimento rápido, ser de fácil manejo, de eficiente conversão alimentar e boa aceitabilidade pela população, além do custo para a produção ser relativamente barato (Canton *et al.*, 2004).

A preocupação com as espécies nativas favorece a utilização do jundiá na aquicultura, preservando a espécie, aumentando a produção do pescado e atingindo um número maior de consumidores. Esse sistema de produção gera trabalho com mão-de-obra familiar em açudes de pequeno porte ou, mesmo, gera empregos para um maior número de pessoas em açudes de maior capacidade de cultivo, tornando-se uma alternativa de renda.

1.2. PARÂMETROS SANGÜÍNEOS EM PEIXES

O estudo das características sangüíneas pode fornecer subsídios importantes para o diagnóstico e prognóstico de condições mórbidas em populações de peixes e ainda contribuir para a compreensão da fisiologia comparativa, relação filogenética, condições alimentares e outros parâmetros ecológicos (Tavares-Dias & Mataqueiro, 2004).

Alterações fisiológicas dos peixes são refletidas na composição sanguínea, modificando os parâmetros bioquímicos e hematológicos (Hrubec *et al.*, 1997). Assim, a análise sanguínea pode revelar disfunções agudas e crônicas, atribuíveis à nutrição, qualidade da água, presença de toxinas e doenças, entre outros fatores (Hrubec *et al.*, 2001). As alterações das atividades das enzimas LDH, GOT e GPT têm sido usadas para demonstrar o dano tecidual em peixes (Wrobelski & LaDue, 1955; Nemcsók & Boross, 1982; Szegletes *et al.*, 1995). O aumento do nível de glicose sanguínea tem sido correlacionado com o estresse metabólico (Wedemeyer, 1970; Nemcsók & Boross, 1982; Szegletes *et al.*, 1995).

No momento, a amostragem rotineira de uma população de peixes não é normalmente utilizada, mas como a aquicultura do jundiá está tornando-se uma atividade comercial em escala industrial, a necessidade de valores de referência para os parâmetros hematológicos e bioquímicos está aumentando. Além disso, devem ser estabelecidas alterações desses valores de referência de uma população definida de indivíduos sob as mesmas condições com valores encontrados em indivíduos com patologias específicas e desordens metabólicas.

Ainda existem poucas ferramentas disponíveis a veterinários e produtores de peixes para avaliar as doenças. Muitas das técnicas usadas para o uso clínico em mamíferos não foram desenvolvidas para serem usadas em peixes. Com a expansão da aquicultura, faz-se necessário uma melhora nos métodos de diagnóstico (Hrubec *et al.*, 2000).

A utilização de métodos que fazem parte da rotina de laboratórios clínicos facilita as análises, uma vez que os laboratórios regionais podem realizar exames sanguíneos e conseqüentemente diagnosticar variações nos valores de referência.

Os produtores de peixes poderiam usar amostragens periódicas para verificar os desvios sanitários e as condições nutricionais de uma população inteira, permitindo o diagnóstico precoce de anormalidades.

1.2.1. Aspectos gerais da hematopoiese

Os peixes são desprovidos de medula óssea e de linfonodos; assim os tecidos mielóide e linfóide estão, geralmente, associados no mesmo órgão. Nos teleósteos, o rim cefálico além de ser o principal tecido hematopoiético possui função endócrina (Rocha & Flores, 2001) e imunológica promovendo a interação imuno-endócrina, de importância para ambos os sistemas, atuando na produção de anticorpos e de catecolaminas (Weyts *et al.*, 1999). A atividade hematopoiética varia entre as diferentes famílias de peixes (Ishizeki *et al.*, 1984). Em *Oncorhynchus mykiss* o rim cefálico é o principal responsável pela hematopoiese (Forero, 1995). No *Carassius auratus* o rim também é o principal sítio de formação de eritrócitos quando comparado com a reduzida atividade eritropoiética do baço (Houston *et al.*, 1996).

O sangue dos peixes teleósteos é formado por eritrócitos, leucócitos e trombócitos, sendo que a produção estimada de células sangüíneas em um peixe de 120g está na ordem de 10^{12} células. As espécies mais ativas apresentam maior número de eritrócitos (Tandon & Joshi, 1976), maior concentração de hemoglobina, mas menor volume (Lay & Baldwin, 1999). Nesses peixes é alta a demanda de oxigênio e o metabolismo (Rambhaskar & Srinivasa-Rao, 1987).

O hematócrito também acompanha o aspecto evolutivo do peixe. Menores valores ocorrem em peixes mais primitivos na escala evolutiva, nos de ambiente lântico, nos sedentários e nos bentônicos. Já os maiores valores ocorrem em espécies marinhas ativas (Rambhaskar & Srinivasa-Rao, 1987).

Existem dificuldades na padronização da nomenclatura, contagem e métodos para classificar os leucócitos. Constatou-se que a padronização de terminologia é urgente, visto que há grande divergência, principalmente para granulócitos. Essa situação dificulta a comparação de resultados entre diferentes autores para a mesma espécie. Soma-se a esse problema a diversidade de técnicas para a quantificação e identificação dos leucócitos. A contagem dos leucócitos também é difícil, em decorrência da presença dos núcleos de eritrócitos e de trombócitos que não são eliminados pelos métodos rotineiros. Diante dessas dificuldades foram propostos métodos indiretos para contagem dos leucócitos totais (Tavares-Dias *et al.*, 2002). Essas técnicas em geral utilizam a contagem de eritrócitos em hemocítômetro e a contagem dos leucócitos em extensões sangüíneas coradas. Natt & Herrick (1952) consideram os métodos indiretos imprecisos, pois para sua exatidão seria necessário que as células sangüíneas estivessem igualmente distribuídas na extensão sangüínea. Entretanto, os leucócitos polimorfonucleares tendem a concentrar-se ao longo da extensão sangüínea (Tavares-Dias & Moraes, 2004).

Os trombócitos totais em peixes são quantificados, geralmente, por métodos indiretos. Esses métodos são semelhantes àqueles empregados na contagem de leucócitos, pois não há metodologia adequada, devido à dificuldade de diferenciá-los na câmara de contagem, apenas por coloração (Tavares-Dias & Moraes, 2004).

1.2.2. Células sanguíneas em peixes

Os eritrócitos são as células sanguíneas mais numerosas. São ovais com citoplasma eosinofílico não-granular e o núcleo é oval e basofílico (Tocidlowski *et al.*, 1997).

Sob a microscopia comum, os linfócitos são células predominantemente arredondadas, de tamanho variado, com citoplasma basofílico e sem granulações visíveis. O núcleo possui forma arredondada, cromatina densa, sendo elevada a sua relação com o citoplasma. Os linfócitos, em geral, apresentam projeções citoplasmáticas, o que facilita a diferenciação dos trombócitos nas extensões sanguíneas (William & Warner, 1976; Blaxhall, 1983; Fujimaki & Isoda, 1990).

Entre os leucócitos, os linfócitos ocorrem em maior percentual na circulação dos peixes (Hines & Yashouv, 1970; Alkahem, 1994). Durante a contagem diferencial dos leucócitos é comum a observação de linfócitos com tamanhos distintos. Devido a este fato, pesquisadores os classificam usualmente em pequenos e grandes (Saunders, 1966; Satake *et al.*, 1989; Burrows *et al.*, 2001).

Na tilápia *Oreochromis hybrid* os linfócitos pequenos têm o núcleo púrpuro escuro, redondo a oval e com padrão de cromatina condensada. O citoplasma é profundamente azul e muitas vezes consiste em apenas uma fina camada ao redor do núcleo. Os linfócitos grandes têm um núcleo redondo, são maiores e possuem um padrão de cromatina mais aberto que os linfócitos pequenos. O citoplasma dos linfócitos grandes é mais basofílico e abundante que os linfócitos pequenos (Hrubec *et al.*, 2000).

Em contraste com as plaquetas de mamíferos que são fragmentos de células anucleadas, os trombócitos de peixes são células completas. Ao microscópio de luz comum são células predominantemente elípticas, com núcleo fusiforme e hipercoreado. Algumas

vezes o citoplasma é escasso ou pobremente corado com corantes ácido-básico, não sendo possível sua observação (Tavares-Dias & Moraes, 2004).

Células semelhantes aos trombócitos podem ser claramente observadas entre os leucócitos como um distinto tipo de célula no “striped bass” (híbrido fêmeas *Morone chrysops* x machos *Morone saxatilis*). São células grandes muito similares aos trombócitos, entretanto o citoplasma destas células é acinzentado, maior e o padrão de cromatina no núcleo é menos condensado que dos trombócitos (Hrubec *et al.*, 1996b; Hrubec *et al.*, 2000).

Em peixes os neutrófilos são células fagocíticas com importante papel na defesa contra infecções (Lehmann *et al.*, 1987). A presença de grânulos de glicogênio no citoplasma está intimamente associada ao fornecimento de energia para a realização da fagocitose. Estas células podem ter um núcleo redondo, oval ou reniforme, com padrão de cromatina aberto (Vale *et al.*, 2002).

O citoplasma dos monócitos contém poucos pseudópodes, grande quantidade de mitocôndrias e vacúolos, algum retículo endoplasmático e complexo de Golgi. O núcleo ocupa 1/3 a 1/4 da célula (Doggett & Harris, 1989). Os monócitos do sangue periférico se transformam em macrófagos e migram para o foco inflamatório (Griffin, 1984). A atividade fagocítica dos monócitos no sangue e/ou tecidos está descrita em peixes cartilagosos (Morrow & Pulsford, 1980) e em peixes teleósteos (Elsaesser *et al.*, 1985; Dogget *et al.*, 1987).

As células imaturas são leucócitos em um estágio precoce de diferenciação, podendo variar de tamanho em diferentes preparações. Estas células se assemelham a linfócitos ou monócitos pequenos e apresentam citoplasma de coloração intensamente basofílica (Tavares-Dias *et al.*, 2001).

Os eosinófilos podem estar ausentes no sangue periférico dos peixes mas quando aparecem se apresentam com baixa frequência (Modrá *et al.*, 1998; Eiras *et al.*, 1998). Esses granulócitos não foram observados no sangue circulante de *Onchorhynchus mykiss* (Powell *et al.*, 1990; Forero, 1995), na circulação e em órgãos hematopoiéticos de *Pleuronectes platessa* (Ellis, 1976).

À semelhança dos eosinófilos, os basófilos estão presentes no sangue periférico de peixes em baixo percentual (Ueda *et al.*, 1997; Ranzani-Paiva & Eiras, 1992) e raramente são encontrados (Campbell, 1988). Grizzle & Rogers (1985) observaram que basófilos ocorrem em algumas espécies de teleósteos, mas não em *Ictalurus punctatus*.

1.3. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO SÊMEN DE PEIXES

O sêmen dos peixes consiste em espermatozóides e plasma seminal (ou fluido seminal) (Ciereszko *et al.*, 2000).

1.3.1. Os espermatozóides

O sucesso da fertilização dos peixes está fortemente correlacionado com a qualidade espermática (Linhart *et al.*, 2000). Esta qualidade pode ser observada através de diferentes indicadores, como a mobilidade das células espermáticas, o volume de sêmen coletado e a concentração dos espermatozóides (Suquet *et al.*, 1992). Outras variáveis relatadas como importantes são a coloração, a viscosidade e o espermatócrito (Kruger *et al.*, 1984).

a. Mobilidade dos espermatozóides

Embora várias investigações tenham sido feitas sobre a qualidade espermática, a mobilidade sem dúvida é a mais importante, uma vez que os espermatozóides com alto padrão de mobilidade são um pré-requisito para a fertilização, e apresentam correlação com as taxas de fertilizações já estudadas (Rurangwa *et al.*, 2004).

Os espermatozóides da maior parte dos peixes teleósteos diferem dos espermatozóides dos mamíferos em quatro importantes aspectos: são imóveis no momento da ejaculação, a mobilidade é induzida em contato com a água, os espermatozóides tornam-se totalmente imóveis em menos de dois minutos e não possuem acrossoma (Kime *et al.*, 2001).

As informações disponíveis sobre a mobilidade dos espermatozóides originam-se na grande maioria da truta arco-íris e da carpa, espécies que vivem em ambientes de água doce (Perchec *et al.*, 1995; Glogowski *et al.*, 1999).

Com a ativação das células espermáticas, ocorre uma diminuição do tamanho e do número de mitocôndrias, sugerindo que a fonte energética necessária para a mobilidade está localizada principalmente nesta organela (Gwo, 1995). Durante o período de movimento flagelar o metabolismo é aumentado, os espermatozóides apresentam estímulos na via glicolítica, ciclo do ácido tricarboxílico, fosforilação oxidativa, catabolismo lipídico, β -oxidação e nos processos de osmorregulação (Mansour *et al.*, 2003).

Em geral, a duração da mobilidade é mais curta em espécies de peixes de água doce que em espécies de peixes marinhos (Stoss, 1983; Billard, 1990). A mobilidade espermática pode ser prolongada na presença de substâncias produzidas pelas fêmeas,

podendo ser modulada pela concentração dos íons Na^+ , K^+ e pelo pH (Ciereszko *et al.*, 2002).

Os espermatozóides de peixes teleósteos de água doce são quiescentes na osmolalidade do plasma seminal, referida como uma condição isotônica (aproximadamente 300 mOsmol/kg). Eles começam a se mover quando suspensos em solução hipotônica (<300 mOsmol/kg) e exibem alta mobilidade (como % espermatozóides móveis) em água doce (4 mOsmol/kg). De modo oposto os espermatozóides de teleósteos marinhos começam a se mover quando liberados em solução hipertônica (> 300mOsmol/kg), e exibem sua mais alta mobilidade aproximadamente em 1000 mOsmol/kg, que é o equivalente ao encontrado na água do mar (Morisawa & Suzuki, 1980; Oda & Morisawa, 1993).

A ativação da mobilidade na maior parte das espécies é induzida pelo choque osmótico quando as células são misturadas com a água no ambiente de desova natural, ou sob condições de laboratório (Morisawa & Suzuki, 1980; Perchec *et al.*, 1993). Durante a ativação dos espermatozóides num meio de baixa osmolalidade ocorre um inchamento das células, conduzindo a ruptura da membrana plasmática com modificações na permeabilidade, na organização da bicamada lipídica (Márian *et al.*, 1993) e na hiperpolarização da membrana (Krasznai *et al.*, 2003).

b. Concentração dos espermatozóides

A concentração dos espermatozóides no sêmen tem sido verificada por três técnicas: contagem em um hemocitômetro (Câmara de Neubauer) (Leung-Trujillo &

Lawrence, 1987), espermátocrito (Munkittrick & Moccia, 1987) e avaliação espectrofotométrica (Billard *et al.*, 1971).

A estimação segura da concentração das células espermáticas é necessária para muitos experimentos de reprodução, assim como para as técnicas de armazenamento dos espermatozóides (Ciereszko & Dabrowski, 1993).

Uma relação entre a contagem espermática e o espermátocrito tem sido estabelecida para várias espécies de salmonídeos (Bouck & Jacobson, 1976; Baynes & Scott, 1985; Piironen, 1985; Munkittrick & Moccia, 1987; Poole & Dillane, 1998), *Coreogonus clupeaformis* (Ciereszko & Dabrowski, 1993) e *Perca flavescens* (Ciereszko & Dabrowski, 1993), mas não para *Scophthalmus maximus* (Suquet *et al.*, 1992).

1.3.2. O plasma-seminal

O plasma seminal e o fluido ovariano têm funções importantes na fertilização por criarem um ambiente favorável para o movimento das células espermáticas (Billard, 1986).

O plasma seminal cria condições para o armazenamento do sêmen no sistema reprodutivo onde os espermatozóides permanecem num estado quiescente, são mantidas as suas propriedades funcionais e o metabolismo, preservando a viabilidade e as fontes energéticas. Alguns componentes do plasma seminal estão envolvidos nestas funções. Os minerais, tais como o potássio, o sódio, o cloreto e o cálcio têm o papel de proteger a imobilidade das células espermáticas e o início da mobilidade no momento da liberação das células no meio (Piironen, 1994; Ciereszko *et al.*, 2000). A composição do plasma seminal normalmente inibe a mobilidade espermática nos testículos e ductos espermáticos, assim

como outros fluidos que são isotônicos a este meio (Krasznai *et al.*, 1995). Os espermatozoides começam a se mover após uma diluição num meio hipoosmótico (Ciereszko *et al.*, 2002).

Muito pouco se sabe sobre a composição química do plasma seminal, e os dados disponíveis tratam principalmente dos constituintes inorgânicos (Glogowski *et al.*, 1999). O conhecimento das características físicas e químicas do plasma seminal é essencial para determinar a viabilidade reprodutiva dos peixes (Cruea, 1969).

O fluido seminal da maior parte dos peixes teleósteos é um produto secretório dos testículos e do ducto espermático (Loir *et al.*, 1990, Lahnsteiner *et al.*, 1993, 1994). Alguns componentes do plasma seminal originam-se das células do sistema reprodutivo e espermatozoides, e possivelmente refletem o metabolismo ou o dano destas células. As mudanças na concentração de quaisquer destes componentes pode ter um valor diagnóstico do sistema reprodutivo e dos espermatozoides (Ciereszko *et al.*, 2000).

Alguns parâmetros do plasma seminal normalmente analisados são (1) os compostos inorgânicos que atuam sobre a mobilidade (pH, sódio, potássio, cálcio) (Morisawa *et al.*, 1983), (2) os compostos orgânicos indicadores do metabolismo energético (triglicerídeos, glicose, lactato) (Lahnsteiner *et al.*, 1993), (3) enzimas líticas (fosfatase alcalina) responsáveis pela eliminação de espermatozoides danificados no final da estação de desova (Lahnsteiner *et al.*, 1994), e enzimas que possivelmente são extravasadas dos espermatozoides (lactato desidrogenase, aspartato aminotransferase).

Entre os minerais presentes no plasma seminal, os dois íons que predominam são o sódio e o cloreto. Suas concentrações estão entre 75 a 175 mM para o sódio e 112 a 183 mM para o cloreto. Outros dois íons que contribuem significativamente são o cálcio e

o magnésio, suas concentrações na grande maioria dos peixes teleósteos estão entre 1 a 2 mM (Morisawa, 1985; Suquet *et al.*, 1994).

Geralmente, as concentrações de potássio no plasma seminal dos peixes de água doce são maiores que às encontradas no sangue. Esta alta concentração de potássio no plasma seminal resulta da presença da barreira sangue-testículo (Viljoen & Van Vuren, 1992), absorção de sódio e secreção de potássio pelo epitélio do ducto espermático (Marshall *et al.*, 1989). A mobilidade espermática é inibida por uma alta concentração de íons potássio e é estimulada pela diminuição da concentração deste íon (Ciereszko *et al.*, 2000).

As concentrações de proteínas no plasma seminal da maior parte dos peixes são baixas, com poucas exceções. As proteínas do plasma seminal estão envolvidas na proteção da integridade das membranas (lipoproteínas), se originam do sangue ou são produzidas no sistema reprodutivo (Ciereszko *et al.*, 2000).

Várias enzimas já foram detectadas no plasma seminal (Breton *et al.*, 1974, Kruger *et al.*, 1984; Lahnsteiner *et al.*, 1993, 1995, Billard *et al.*, 1995). A origem destas enzimas pode ser dos testículos, glândulas acessórias, ducto espermático e sangue. A atividade destas enzimas apresenta um importante valor diagnóstico dos possíveis danos dos espermatozoides.

1.4. EFEITOS DOS PIRETRÓIDES EM PEIXES: TOXICIDADE E MODIFICAÇÕES NOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E HEMATOLÓGICOS

Atualmente, vários tipos de pesticidas são usados na agricultura no mundo inteiro para o controle de plantas e animais, incluindo os inseticidas, fungicidas e herbicidas, entre outros (Khalaf-Allah, 1999).

Os piretróides estão sendo utilizados principalmente a partir das últimas duas décadas, como possíveis alternativas aos inseticidas organofosforados, carbamatos e organoclorados (Saxena & Seth, 2002) devido a sua baixa toxicidade em mamíferos, sua eficácia e maior biodegradabilidade (Dörücü & Girgin, 2001). Os análogos sintéticos dos piretróides, extraídos da planta ornamental *Chrysanthemum cinerariaefolium*, têm sido desenvolvidos para eliminar a fotodegradação encontrada nos pesticidas naturais (Baser *et al.* 2003).

Os piretróides são amplamente usados como pesticidas domésticos, pediculicidas humanos e veterinários, e estão entre os mais potentes inseticidas conhecidos (Smith & Stratton, 1986). Estes piretróides são usados contra as pestes terrestres e aquáticas (Singh & Srivastava, 2000).

Os resíduos dos pesticidas, extensivamente usados na agricultura, alcançam muitas vezes o ecossistema aquático. Eles podem ser transferidos do fitoplâncton para os peixes e, finalmente, aos humanos. Os pesticidas são também usados diretamente na agricultura para o controle de ectoparasitos (Das & Mukherjee, 2003). Na aquicultura de peixes a cipermetrina é usada contra infestações por piolhos (Sommerville, 1995; Braidwood & Hart, 1998; Hart *et al.*, 1997; Das & Mukherjee, 2003).

Os pesticidas carregados pelas chuvas e inundações para açudes e rios alteram as propriedades físico-químicas da água (Richardson, 1988).

O uso generalizado destes piretróides conduz a exposição de trabalhadores da indústria de fabricação, dos aplicadores no campo, do ecossistema e dos humanos aos possíveis efeitos tóxicos destes pesticidas. Eles são considerados não-persistentes e não bioacumulados através da cadeia alimentar (Polat *et al.*, 2002).

O controle dos riscos ecotoxicológicos causados pelos pesticidas ao ecossistema estão baseados em dados sobre a toxicidade e efeitos de preparações do pesticida a organismos não-alvos. Os peixes estão entre o grupo de organismos não-alvos (Svobodová *et al.*, 2003)

Os piretróides têm potentes propriedades inseticidas e são praticamente não-tóxicos para a maior parte dos animais não-alvos, especialmente humanos (Haya, 1989). Entretanto, os piretróides são relatados como extremamente tóxicos aos peixes e alguns artrópodes aquáticos (Bradbury & Coats, 1989; Srivastav *et al.*, 1997).

Edwards *et al.* (1986) observaram que a cipermetrina foi metabolizada e eliminada significativamente de forma mais lenta por peixes que por mamíferos ou pássaros, o que pode explicar o fato desse composto apresentar uma maior toxicidade para peixes em relação a outros organismos (peixes>anfíbios>mamíferos>pássaros).

Devido a sua lipofilicidade, os piretróides apresentam um alto grau de absorção pelas brânquias, ainda que em muito baixas concentrações na água, o que seria um fator importante da sensibilidade dos peixes às exposições aquosas. A principal reação envolvida no metabolismo da cipermetrina e da deltametrina é a clivagem da ligação ester por possuir ação de carboxiesterase (Viran *et al.*, 2003).

As brânquias são órgãos complexos e multifuncionais que permitem o contato íntimo com a água circulante. O epitélio branquial separa o ambiente interno do fluxo contínuo do ambiente externo, é o local das trocas gasosas, regulação iônica, balanço ácido-

base, excreções nitrogenadas e é muito sensível aos poluentes ambientais. Qualquer alteração resulta em uma mudança na composição de eletrólitos sangüíneos (Srivastav *et al.*, 1997; Çaliskan *et al.*, 2003). De acordo com Michael (1989), os piretróides, em peixes, acessam diretamente a corrente sangüínea pelas brânquias, persistindo e causando alterações fisiológicas.

Os inseticidas piretróides contendo o grupo α -ciano-fenoxi-benzila, como a cipermetrina, atuam sobre o sistema nervoso de vertebrados (Edwards *et al.*, 1986). O mecanismo de seus efeitos, no caso de peixes, é o mesmo de outros piretróides que contenham este grupo α -ciano-fenoxi-benzila. Eles atuam bloqueando canais de sódio dos filamentos nervosos, encurtando a fase despolarizante. Além disso, eles interagem com os receptores GABA nos filamentos nervosos (Hayes, 1994; Bradbury & Coats, 1989; Svobodová *et al.*, 2003).

A cipermetrina, além de seus efeitos benéficos, é considerada perigosa aos organismos aquáticos, uma vez que ela persiste por longos períodos na água. Ruscoe (1977) relatou que a rápida absorção deste inseticida pelos sedimentos dos açudes e pela matéria orgânica, diminui significativamente a sua concentração na água e, assim, a necessidade e os riscos para os organismos aquáticos.

A toxicidade aguda da cipermetrina varia em diferentes espécies de peixes. A CL_{50} 96 horas da cipermetrina no *Labeo rohita* é 0,139 ppm (Das & Mukherjee, 2003) e no *Lebistes reticulatus* é 0,021 ppm (Çaliskan *et al.*, 2003).

Os efeitos fisiológicos provocados pelos tóxicos, entre eles, a cipermetrina podem ser avaliados através das análises sangüíneas de uma população exposta aos mesmos tratamentos (Hrubec *et al.*, 1996a).

Szegletes *et al.* (1995) relataram que as alterações das atividades das transaminases GOT e GPT são provavelmente devidas a distúrbios hepáticos em peixes. Já as alterações na atividade do LDH poderiam indicar mudanças metabólicas, principalmente nas células musculares: o catabolismo do glicogênio em direção à formação do lactato, o que pode ser letal para os peixes (Nakono & Tomlinson, 1967; Simon *et al.*, 1983).

As características bioquímicas do sangue estão entre os mais importantes parâmetros do meio interno dos peixes (Edsall, 1999). As mudanças no perfil bioquímico refletem mudanças no metabolismo e em processos celulares do organismo, resultantes dos efeitos de vários poluentes, tornando possível estudar os mecanismos dos efeitos destas substâncias (Lusková *et al.*, 2002).

2. JUSTIFICATIVA

a. A determinação dos valores sanguíneos normais do jundiá possibilita que produtores avaliem periodicamente amostras representativas, permitindo o controle das condições sanitárias e favorecendo o cultivo deste peixe em sistemas de aquicultura.

b. Os açudes de cultivo dos peixes muitas vezes se encontram próximo a áreas agrícolas, onde para o crescimento das plantas e para o combate de pestes terrestres/aquáticas se usam os pesticidas. Estes agentes podem ocasionar variações ambientais e serem detectados através de mudanças nos parâmetros bioquímicos e hematológicos do jundiá.

c. O estudo das características do sêmen do jundiá pode ser importante na otimização de processos de fertilização através da seleção de reprodutores de alta qualidade.

3. OBJETIVOS

Os objetivos gerais e específicos deste trabalho utilizando o jundiá *Rhamdia quelen* estão relacionados a seguir.

3.1. OBJETIVOS GERAIS

- a. Estabelecer os valores dos parâmetros sanguíneos normais e compará-los aos valores obtidos em peixes expostos a concentrações subletais da cipermetrina
- b. Determinar as características físico-químicas do sêmen através de indicadores da qualidade espermática e da composição bioquímica do plasma seminal

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Estabelecer valores de referência dos parâmetros bioquímicos dos eletrólitos (Cl, Na, K, Ca, Mg, P), metabólitos (creatinina, uréia, amônia, glicose, proteína total, triglicerídeos, colesterol, bilirrubina) e enzimas (alanina e aspartato aminotransferase, fosfatase alcalina e lactato desidrogenase) do soro sanguíneo

- b. Estabelecer valores de referência dos parâmetros hematológicos (eritrócitos, leucócitos, Ht, Hb, MVC, MHC, MCHC)

- c. Identificar as flutuações temporais de indicadores da qualidade espermática, como a concentração dos espermatozóides, o espermatócrito e o volume de sêmen liberado

- d. Verificar o padrão de mobilidade dos espermatozóides

- e. Verificar o efeito de soluções de diferentes pH sobre a mobilidade dos espermatozóides

- f. Determinar a bioquímica do plasma seminal através dos valores de eletrólitos, metabólitos e enzimas

- g. Comparar a composição bioquímica do plasma seminal com a do soro sanguíneo

- h. Determinar a toxicidade aguda da cipermetrina através dos valores da CL_{50} (24, 48, 72 e 96 horas)

- i. Avaliar o efeito de concentrações subletais da cipermetrina sobre os valores dos eletrólitos, metabólitos e enzimas

- j. Investigar o efeito de concentrações subletais da cipermetrina nos valores hematológicos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Análise sanguínea

Qualidade da água

A qualidade da água foi monitorada usando um kit de análises comercial (Alfa Tecnoquímica, Florianópolis, SC, Brasil) como segue: pH, temperatura, concentração de amônia, alcalinidade, dureza, nitrito, nitrato, cloreto, concentrações de oxigênio dissolvidas. Os valores da qualidade da água nos dias que os peixes foram amostrados (Tabela 1- capítulo 1) são representativos da qualidade da água de toda a semana do estudo.

Peixes

Os jundiás machos adultos para os estudos foram obtidos de um produtor de peixes em Rolante, RS, Brasil na última semana de janeiro de 2003. No laboratório, os peixes foram mantidos em tanques de 500 l por 3 dias sob foto período normal (13,5 horas luz: 10,5 horas escuro) e temperatura ambiente ($25 \pm 1^{\circ}\text{C}$). Aproximadamente 100l da água dos tanques era trocada diariamente. Os peixes ficavam numa densidade de 5 g/l e eram alimentados com ração comercial SUPRA (proteína crua mínimo 36%, amido 21,5%, lipídio mínimo 7,5%, fibras 3,8%, cinzas 12%, umidade máximo 12%, enriquecimento por kg de ração: vitamina A 10.000UI, vitamina C 250 mg, vitamina D₃ 3.000UI, vitamina E 80 mg, vitamina B₁ 5 mg, vitamina B₂ 10 mg, vitamina B₆ 6 mg, vitamina B₁₂ 100μg, vitamina K₃ 5mg, ácido fólico 1 mg, colina 1.500 mg, ácido pantotênico 50 mg, biotina 0,5 mg, niacina 80 mg, inositol 150 mg, Cu 20 mg, Fe 40 mg, I 5 mg, Mn 30 mg, Se 0,4 mg, Zn 180 mg, Ca máximo 3,2%, P mínimo 1,5%; 3.216 kcal/kg de ração) uma vez ao dia (1% do peso corporal), e ficavam sem alimento 24 horas antes da amostragem. No início do estudo

os peixes foram aclimatados aos procedimentos de rotina tais como a limpeza diária, trocas de água, amostragem da água e pesca periódica, de modo a minimizar quaisquer alterações bioquímicas e hematológicas associadas aos procedimentos de rotina. Cada peixe foi pesado e medido (comprimento total e largura do abdômen) no momento da amostragem. A média do peso do corpo (em g), comprimento e largura do corpo (em cm) dos peixes durante os experimentos estão apresentados na Tabela 1-capítulo1.

Coleta sangüínea

Todos peixes apareceram clinicamente saudáveis em boas condições corporais (sem lesões externas visíveis) antes dos experimentos. Durante a amostragem, cuidados foram tomados para minimizar o estresse nos peixes retirados e nos peixes que permaneciam nos tanques. O sangue foi removido por punção do vaso caudal com seringas descartáveis de 3 ml e colocado em tubos de vidro. As amostras sangüíneas que foram difíceis de coletar eram descartadas para evitar a contaminação por fluidos teciduais e pela hemólise. Os peixes foram sacrificados por decapitação.

Análise Hematológica

O sangue coletado foi colocado dentro de tubos individuais contendo EDTA10%. O hematócrito (Ht) foi determinado em tubos capilares em uma centrífuga de micro-hematócrito operada a 15.000 rpm por 5 min. O conteúdo de hemoglobina (Hb) foi medido espectrofotometricamente (A 540) usando a reação da cianometemoglobina, seguida de centrifugação (3.500 g por 6 min.) para remover interferentes. As contagens dos eritrócitos, leucócitos e trombócitos foram determinadas manualmente com uma câmara de Neubauer após diluição 1/200 do sangue em 0,9% de solução salina. As contagens das

células também foram realizadas manualmente por que os eritrócitos dificultam a contagem no analisador automatizado. Esfregaços sanguíneos foram corados com May-Grünwald e Giemsa para fotografia e discriminação entre os leucócitos e para determinar os trombócitos (com aumento de 400 e 1000x) do seguinte modo: Para a contagem diferencial, os leucócitos e os trombócitos foram contados até que 200 leucócitos e trombócitos tenham sido obtidos. Então, o percentual de cada tipo de leucócitos e dos trombócitos foram multiplicados pelo número total de leucócitos mais trombócitos para dar as contagens celulares finais. O número de trombócitos foi subtraído do número de leucócitos e trombócitos para dar o número de leucócitos totais. As amostras sanguíneas também foram analisadas com o contador hematológico clínico MICROS ABX e os resultados foram comparados às contagens manuais. As fotografias foram feitas com uma câmara Sony acoplada ao microscópio óptico Zeiss e ao microcomputador.

Análises bioquímicas

O sangue coletado dos animais foi colocado dentro de tubos individuais. A hemólise foi evitada por cuidadosa transferência do sangue para o tubo, evitando o esvaziamento rápido do sangue através da agulha. Os tubos contendo o sangue foram manuseados cuidadosamente, evitando agitação excessiva. O sangue nos tubos foi deixado coagular numa sala com temperatura ambiente (aproximadamente 25⁰C) por 30 min. E então foi centrifugado a 3.000 rpm por 5 min. para separar o soro. O soro foi removido e congelado a - 20⁰C até ser analisado. As amostras foram analisadas dentro de 48 horas da coleta e degeladas antes de serem analisadas. Todos os eletrólitos, metabólitos e enzimas foram determinados usando um sistema automatizado com padrões apropriados (ADVIA 1650 Chemistry System, Bayer, Tóquio, Japão). O sistema automatizado foi regularmente

monitorado para segurança e precisão de acordo com “Boas práticas em laboratório”. Os parâmetros foram medidos e expressos pelas unidades que seguem: colesterol, triglicerídeos, glicose, bilirrubina, uréia, creatinina, magnésio, fósforo, cálcio (mg/dl); amônia ($\mu\text{mol/l}$); alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, fosfatase alcalina, lactato desidrogenase (U/l); cloreto, potássio, sódio (mEq/l); albumina, proteína total (g/dl). A concentração de globulinas foi calculada (proteína total menos concentração de albumina).

Análise estatística

Os dados são apresentados como a média \pm erro padrão médio (EPM). Os limites de confiança (95%) foram determinados para cada parâmetro bioquímico e hematológico usando um programa estatístico comercial (versão Instat 3,0, San Diego, USA).

4.2. Efeito da cipermetrina

Peixes

Os peixes (peso médio $336,8 \pm 11,5$) foram coletados em açudes em Rolante, RS, foram conduzidos ao laboratório de fisiologia, UFRGS, dentro de 2 horas após a coleta. Os animais foram transportados em sacos plásticos com oxigênio disponível e colocados sub a superfície da água do tanque por aproximadamente 15 minutos. Após, os sacos foram cortados e os peixes liberados para nado na água doce livre de cloro, com temperatura e

oxigênio dissolvido controlado. A densidade de estoque foi 5g/l. Os peixes foram alimentados com ração comercial SUPRA (proteína crua mínimo 36%, amido 21,5%, lipídio mínimo 7,5%, fibras 3,8%, cinzas 12%, umidade máximo 12%, enriquecimento por kg de ração: vitamina A 10.000UI, vitamina C 250 mg, vitamina D₃ 3.000UI, vitamina E 80 mg, vitamina B₁ 5 mg, vitamina B₂ 10 mg, vitamina B₆ 6 mg, vitamina B₁₂ 100µg, vitamina K₃ 5mg, ácido fólico 1 mg, colina 1.500 mg, ácido pantotênico 50 mg, biotina 0,5 mg, niacina 80 mg, inositol 150 mg, Cu 20 mg, Fe 40 mg, I 5 mg, Mn 30 mg, Se 0,4 mg, Zn 180 mg, Ca máximo 3,2%, P mínimo 1,5%; 3.216 kcal/kg de ração) uma vez ao dia em 1% do peso corporal, e sem alimento 24 horas antes do início dos experimentos.

Água

A água dos tanques foi substituída 20% diariamente. O controle de qualidade para 9 parâmetros foi feito semanalmente e sempre antes do começo dos experimentos. As características físico-químicas da água do tanque nos experimentos estão mostradas na Tabela 1-Capítulo2.

Cipermetrina

A cipermetrina (com o nome comercial de cypergold CE200, produzida por Aventis Cropscience, São Paulo, Brasil) foi adquirida em uma agropecuária (Tedesco, Porto Alegre, Brasil) na concentração de 20%.

Toxicidade aguda

O teste de toxicidade aguda foi realizado para determinar o valor da CL₅₀ da cipermetrina. A cipermetrina nas concentrações de 0,08, 0,10, 0,12, 0,16, 0,20, 0,24, 0,32 e 0,36 ppm foi diluída nos tanques. Para cada concentração um grupo de 10 peixes foi aleatoriamente colocado nos tanques. Este procedimento foi repetido pelo menos 3 vezes.

O número de peixes mortos e as mudanças comportamentais foram observados após 24, 48, 72 e 96 horas. Os peixes mortos foram imediatamente removidos dos tanques.

A CL₁₆, CL₅₀ e a CL₈₄ foram calculadas pelo método de probito, conforme Greenberg *et al.*, (1985) para os períodos de 24, 48, 72 e 96 horas. Duas concentrações subletais (30% e 45% da CL₅₀ 48 horas) foram usadas para a avaliação dos efeitos bioquímicos, hematológicos e comportamentais nos peixes.

Efeitos bioquímicos e hematológicos da cipermetrina

Após os testes de toxicidade aguda da cipermetrina no jundiá, as concentrações subletais de 0,00 (controle), 0,08 e 0,12 ppm do piretróide foram selecionadas para estudar os efeitos na composição bioquímica e hematológica dos peixes. O sangue foi coletado antes e após 2, 4 e 8 dias do tratamento com a cipermetrina. As amostras de sangue foram obtidas por punção do vaso caudal com seringa plástica de 3ml estéril. Após a coleta de sangue, os peixes foram sacrificados por decapitação. Os parâmetros sanguíneos foram analisados no Laboratório de patologia Clínica do HCPA (Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brasil) de acordo com Borges *et al.*, 2004.

Para os testes hematológicos, o sangue foi colocado dentro de tubos contendo EDTA10% como anticoagulante. Os seguintes parâmetros foram determinados: contagem das células vermelhas totais (eritrócitos), contagem das células brancas totais (leucócitos), conteúdo de hemoglobina e hematócrito. Os índices corpusculares incluindo a média de hemoglobina corpuscular (MHC), a média do volume corpuscular (MCV) e a média da concentração de hemoglobina corpuscular (MCHC) foram calculados por fórmulas padrões a partir do hematócrito, hemoglobina e eritrócitos.

Para os testes bioquímicos, o sangue foi colocado em tubos e deixados coagular na temperatura ambiente, aproximadamente 25⁰C por 30 minutos. O soro foi removido do coagulado após centrifugação a 3.000 rpm por 5 minutos e congelado a - 20⁰C até a análise. Os eletrólitos (cloreto, sódio, potássio, cálcio, magnésio, fósforo), metabólitos (triglicerídeos, colesterol, uréia, creatinina, glicose, proteína total) e enzimas (alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, fosfatase alcalina, lactato desidrogenase) foram determinados por um sistema automatizado (ADVIA 1650, Bayer, Chemistry System, Tóquio, Japão) com adequados padrões.

Análise Estatística

Os dados são mostrados como percentual da média de mortalidades acumulativas. As concentrações letais (CL₁₆, CL₅₀ e CL₈₄), limites de confiança (95%) e os parâmetros de inclinação, correlação e intercepto foram calculados pelo método Litchfield & Wilcoxon (1949) através de um software de computador (LETAL.EXE, US. 1.3. FKS, 1991).

Para os estudos bioquímicos e hematológicos os valores foram apresentados como a média ± erro padrão médio (EPM) de 5-53 indivíduos. As diferenças entre os

valores do controle e dos animais tratados foram realizadas pelo teste-t pareado e pela ANOVA de uma via seguida dos testes de comparações múltiplas Bonferroni e Tukey-Kramer. Foi usado um programa estatístico comercial (Graphpad Instat versão 3,0, San Diego, USA). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4.3. Estudo do sêmen

Peixes

Pelo menos 188 machos de jundiá *Rhamdia quelen* com peso médio de 253 ± 8 g e comprimento médio de $30,4 \pm 0,4$ cm foram obtidos de um produtor de peixes em Rolante, RS, durante 2002 e 2003. Os peixes foram retirados dos açudes durante diferentes meses do ano, transportados ao laboratório e mantidos em tanques de água doce de 500l, livre de cloro, sob foto período natural e temperatura controlada ($24 \pm 2^{\circ}\text{C}$). Os peixes foram conservados na densidade de 5g/l nos tanques e foram mantidos por 3 dias antes da amostragem.

Os animais foram alimentados com ração comercial SUPRA (proteína crua mínimo 36%, amido 21,5%, lipídio mínimo 7,5%, fibras 3,8%, cinzas 12%, umidade máximo 12%, enriquecimento por kg de ração: vitamina A 10.000UI, vitamina C 250 mg, vitamina D₃ 3.000UI, vitamina E 80 mg, vitamina B₁ 5 mg, vitamina B₂ 10 mg, vitamina B₆ 6 mg, vitamina B₁₂ 100µg, vitamina K₃ 5mg, ácido fólico 1 mg, colina 1.500 mg, ácido pantotênico 50 mg, biotina 0,5 mg, niacina 80 mg, inositol 150 mg, Cu 20 mg, Fe 40 mg, I 5 mg, Mn 30 mg, Se 0,4 mg, Zn 180 mg, Ca máximo 3,2%, P mínimo 1,5%; 3.216 kcal/kg

de ração) uma vez ao dia em 1% do peso corporal, e sem alimento 24 horas antes da amostragem.

Qualidade da água

A qualidade da água foi monitorada usando um kit de análises comercial (Alfa Tecnoquímica, Florianópolis, SC, Brasil) como segue: pH, temperatura, concentração de amônia, alcalinidade, dureza, nitrito, nitrato, cloreto, concentrações de oxigênio dissolvidas. Os valores da qualidade da água nos dias que os peixes foram amostrados (Tabela 1-Capítulo3) são representativos da qualidade da água durante o estudo.

Coleta do sêmen

O sêmen foi obtido de 91 machos, que foram aleatoriamente selecionados nos tanques. O abdômen era limpo com gaze e após o sêmen foi coletado com seringas plásticas (sem agulha) por cuidadosa pressão da porção anterior do abdômen em direção ao gonadopóro do peixe. Cuidado foi tomado para prevenir a contaminação do sêmen com a urina, o muco e as fezes.

Características do sêmen

A cor de cada amostra de sêmen foi discriminada visualmente, imediatamente após a coleta. O volume do ejaculado (excluindo a primeira porção aquosa) foi medido em seringas plásticas. O pH foi determinado por fitas indicadoras (Merck, Alemanha) (para menores volumes de sêmen: <1,0 ml) e por pHmetro digital DIGIMED (\geq 1ml de sêmen).

Densidade espermática

A densidade espermática foi determinada através do espermatócrito e da contagem dos espermatozoides em um microscópio óptico.

Espermatócrito

Tubos capilares de microhematócrito (75mm de comprimento e 1,1-1,2 mm i.d.) foram preenchidos (aproximadamente 70%) com sêmen e a ponta de cada tubo foi selada com fogo para a centrifugação dos tubos em uma centrífuga de microhematócrito a 12.000 x g. Um experimento inicial foi conduzido para determinar o tempo de centrifugação necessário para encontrar leituras estáveis. O espermatócrito foi medido em intervalos de 5 minutos até 65 minutos de centrifugação. Medidas foram feitas em triplicata para cada amostra e a média das três medidas foram usadas para os resultados. O espermatócrito era medido dentro de três horas da coleta do sêmen. Durante este período os tubos foram mantidos a 4^oC. O espermatócrito, definido como a relação do volume de material sólido no tubo pelo volume de sêmen x 100, foi medido em triplicatas de 91 machos de jundiá.

Contagem espermática

Uma câmara de contagem Neubauer de cristal (BOECO, Alemanha) foi usada para a contagem espermática como Tvedt *et al.*, 2001 com pequenas modificações. Para as contagens, o sêmen foi diluído 1.500 vezes em solução salina (2,94% de citrato de sódio em formaldeído 4%). A contagem foi estimada em triplicatas a partir de 91 machos de jundiá.

Análise da mobilidade espermática

A mobilidade dos espermatozóides foi estimada num microscópio óptico (x 400) logo após a coleta do sêmen. A mobilidade espermática foi determinada por diluição de 10µl de sêmen em 1 ml de água do tanque e com soluções de diferentes valores de pH. Uma gota deste preparado era colocada sobre uma lâmina que após era coberta com uma lamínula para visualização no microscópio. As observações da mobilidade foram feitas a temperatura ambiente, usando três triplicatas por amostra. Uma pessoa conduziu todas as observações de mobilidade espermática para diminuir o grau de variação.

Avaliação da mobilidade

A mobilidade espermática foi determinada por estimativas subjetivas do percentual de células espermáticas e pela duração da mobilidade (período antes que a maior parte das células se tornassem imóveis) através de um cronômetro. A mobilidade foi estimada usando uma escala arbitrária em que 0 representa 0%, 1≅0-25%, 2≅25-50%, 3≅50-75%, 4≅75-90% e 5≅90-100% de espermatozóides móveis. A influência do armazenamento do sêmen à temperatura ambiente (24⁰C) foi determinada. A mobilidade do sêmen foi analisada após um tempo de armazenamento de 0, 1, 2, 3, 4 e 5 horas.

Plasma seminal

O sêmen de cada amostra foi centrifugado (10.000 x g, 10 minutos) e o plasma seminal foi removido e conservado a -20⁰C para posterior análise no Laboratório de Patologia Clínica do HCPA (Hospital de Clínicas de Porto Alegre). Todos eletrólitos, metabólitos e enzimas foram determinados usando um sistema automatizado com padrões

adequados (ADVIA 1650, Bayer, Tokyo, Japão, 2000). O sistema automatizado foi regularmente monitorado para segurança e precisão de acordo com as “Boas práticas de laboratório”. Os parâmetros foram medidos e expressos pelas unidades que seguem: colesterol, triglicerídeos, glicose, bilirrubina, uréia, creatinina, magnésio, fósforo, cálcio (mg/dl); amônia ($\mu\text{mol/l}$); alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, fosfatase alcalina, lactato desidrogenase (U/l); cloreto, potássio, sódio (mEq/l); albumina, proteína total (g/dl). A concentração de globulinas foi calculada (proteína total menos concentração de albumina).

Microscopia óptica dos espermatozoides do jundiá

Esfregaços de sêmen diluído 1:100 em uma solução tamponada de formol salina foram corados pelo método de Cerovsky (Cerovsky, 1976) e observados (x 400) em um microscópio Nikon Eclipse E600. As fotografias dos espermatozoides do jundiá foram obtidas por uma câmara Sony DX A151 acoplada a um microscópio Zeiss sob óleo de imersão (x 1000), usando um software KS 300 (Kontron Electronic).

Análise estatística

A média \pm erro padrão médio foi calculada para cada característica de sêmen usando triplicatas das amostras em pelo menos 5 machos por semana. Foi usado um programa comercial estatístico (Instat versão 3,0, San Diego, USA).

5. CAPÍTULO 1

“Hematologic and Serum Biochemical Values for Jundiá (*Rhamdia quelen*)”

(Artigo publicado na revista Fish Physiology and Biochemistry)

**HEMATOLOGIC AND SERUM BIOCHEMICAL VALUES FOR JUNDIÁ
(*RHAMDIA QUELEN*)**

Adriana Borges¹, Luciana V Scotti², Daniele R Siqueira¹, Daiane F Jurinitz¹ and Guillermo F Wassermann¹

Laboratório de Endocrinologia Experimental¹, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Sarmento Leite, 500, CEP 90050 170, Porto Alegre, RS, Brazil (Phone/FAX +51-3316 3302, E-mail: adriana.borges@ufrgs.br).

Serviço de Patologia Clínica², Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

Key words: fish, hematology, serum chemistry, jundiá, *Rhamdia quelen*, RBC, WBC

Abstract

The determination of hematologic parameters for jundiá *Rhamdia quelen* cultivated in ponds is an easy and useful tool for the control of their sanitary and nutritional conditions. In the present work hematologic indices (RBC, WBC, Ht, Hb, MCV, MCH, MCHC), electrolytes (Cl, Na, K, Ca, Mg, P), metabolic products (creatinine, urea, ammonia, glucose, total protein, triglycerides, cholesterol, bilirubin) and enzymes (alanine and aspartate aminotransferase, alkaline phosphatase, lactate dehydrogenase) were measured in a population of jundiá. The mean \pm SEM and the confidence limits (95%) were established.

Introduction

The jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy and Gaimard) is a South American teleost fish that belongs to the Siluridae order, Pimelodidae family and Heptapterinae subfamily (Gomes et al., 2000). It is an important species for aquaculture in temperate and subtropical climates, raised as a source of dietary protein, but little is still known about its basic physiology. Some aspects of its metabolism (Barcellos et al., 2001_a; Barcellos et al., 2003) and its reproductive endocrinology have been described in recent papers, where seasonal variations have been reported in females (Barcellos et al., 2001_b) as well as in males (Barcellos et al., 2002). The main of the present paper is to provide the fish producers with a reference value to control the health of their jundiá cultivated in ponds, measuring periodically some representative samples.

Material and Methods

Animals: Jundiá males were obtained from a fish producer in Rolante, RS, Brazil, in the last week of January 2003. In the laboratory, the fishes were kept in 500l tanks for 3 days under normal photoperiod (13.5 h light: 10.5 h dark and ambient temperature $25\pm 1^\circ\text{C}$). Tanks received an exchange of 15% fresh water per day. The fishes were kept at a stocking density of approximately 5g/l. The fish were fed with 'SUPRA' commercial fish pellets (containing crude protein, Ca, P, vitamins A, C, D₃, E, B₁, B₂, B₆, B₁₂, K₃, folic acid, pantothenic acid, biotin, niacin, inositol, Cu, Fe, I, Mn, Se and Zn) each day at 1% body weight per day and without any feeding for 24 hours before sampling. Average body weight, body lengths and heights of fish during the experiment are presented in Table 1.

Water quality: The tanks were monitored for water quality at each sampling period (Table1) using a commercial analysis kit (Alfa Tecnoquímica, Florianópolis, SC, Brazil): temperature, pH, ammonia concentration (measured daily); dissolved oxygen concentrations, nitrite, nitrate, alkalinity, hardness, chloride (measured twice weekly).

Sample collection: Blood samples were taken from jundiá netted and restrained without anesthetic, caught by the random selection method. During sampling, care was taken to

minimize stress in the netted fish and in the fish remained in the tank. For all determinations blood samples were taken by puncture of the caudal blood vessels into sterile 1ml plastic syringes and a 23-gauge needle. After blood collect, fishes were sacrificed by decapitation.

Hematologic parameters: The blood was placed into tubes containing EDTA as anticoagulant. The packed cell volume or hematocrit was determined in capillary tube with a microhematocrit centrifuge spun at 12,000 rpm for 5 min (Morris, 1996). Manual method for counting red (erythrocyte), white(leukocyte) blood cell and thrombocyte were performed within 6 hours of collection on a standard Neubauer cell counting chamber (Hemocytometer), after 1/200 dilution of blood in 0.9% saline solution. The cyanmethemoglobin method was adopted for Hemoglobin determination. The blood solution was centrifuged (3,500 g for 6min) to remove interferents, after was measured spectrophotometrically (A 540) (Stoskopf, 1993). Blood smears were fixed and stained with May-Grünwald and Giemsa to determine the thrombocyte and differential WBC counts. The analysis of hematological composition was made according to Hrubec et al., 2001 and Bain, 1997. The following parameters were determined: neutrophils, monocytes, small lymphocytes, large lymphocytes, immature cells and TLC (thrombocytes like cells). Corpuscular indices including the mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular volume (MCV) and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) were calculated by standard formulas from hematocrit, blood hemoglobin and red cell count values. The blood samples were also analyzed with a clinical hematologic counter (MICROS 60 ABX[®]) (Table 4) and the results were compared to the manual counts.

Biochemical parameters: The blood in the tubes was allowed to clot at room temperature, approximately 25°C, for 30 min. Serum was removed from the clotted sample after centrifugation at 3.000rpm for 5 min and frozen at 20°C until chemical analysis. Samples were analyzed within 48 hours of collection and thawed immediately prior to analysis. All electrolytes, metabolites and enzymes were determined using an automated system with appropriate standards (ADVIA 1650 Chemistry System, Bayer, Tokyo, Japan). Every day the automated system was calibrated and monthly monitored for accuracy and precision. The following parameters were measured and expressed in the given units: cholesterol, triglyceride, glucose, bilirubin, urea, creatinine, magnesium, phosphorus, calcium (mg/dl); ammonia ($\mu\text{mol/l}$); alanine aminotransferase (ALP), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase, lactate dehydrogenase (U/l), chloride, potassium, sodium (mEq/l); albumin, total protein (g/dl). The concentration of globulins was calculated (total protein minus albumin concentrations).

Statistical tests: Data are presented as means \pm standard error(SEM). Confidence limits (95%) were determined for each hematologic and biochemical parameter using a commercial statistical program (Instat version 3.0, San Diego, USA). Non-parametric methods were used to establish the reference intervals.

Results

The results of hematologic analysis of jundiá are shown in Table 4. The majority of the hematologic values found were similar to those described for other fishes (Hrubec et al., 1996; Tavares-Dias et al., 1999; Ozretić et al., 2001).

Discussion

The jundiá is recognized as one of the leading fish species in terms of aquaculture potential in South America. However, their hematology and other blood parameters, as well as their variability, have not been sufficiently documented. This study was, therefore, designed to catalogue the basic values of jundiá hematology and associated biochemical parameters from farmed fish in order to establish the statistical variability of a population subjected to the same environmental conditions. As mentioned previously, the important values for clinical diagnosis are the reference intervals defined by a specified proportion (usually 95%) of the range of values found in a healthy reference population.

Not all leukocyte types have been reported for the fish species in which cellular morphology has been described. For example, catfish (*Ictalurus punctatus*) has thrombocytes, neutrophils, monocytes, basophils and eosinophils (Williams and Warner 1976).

Generally, the hematologic values determined for jundiá in this study are similar to the ones published for catfish and also some of our results are comparable with the values reported recently by Barcellos et al.(2003). Thus, in the current study the small lymphocyte was the most abundant leukocyte, followed by large lymphocytes, monocytes and neutrophils. In the analyzed samples no eosinophils or basophils were found, similar to the low or zero values found in Red pacu by Tocidlowski et al. (1997) and in Striped bass by Hrubec et al. (1997). Thrombocytes were found in large numbers, close to $30 \times 10^3/\mu\text{l}$.

It was reported by Atamanalp et al.(2002) that hematological and biochemical parameters are adequate indicators of the changes in environmental conditions. Base in this concept we are at present analyzing the effect of chronic and acute exposition to contaminants on the blood reference values of jundiá communicated in this paper.

Acknowledgments

This work was supported by grants from FAPERGS (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul), CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa), and PROPESQ-UFRGS (Pró-Reitoria de pesquisa, Universidade Federal do Rio Grande do Sul). AB is a PhD student supported by the CNPq. DRS and DFJ are students and hold a IC fellowship. The authors are indebted to Elsa Pires for maintenance of the best laboratory conditions and to Professor Marcelo Grillo and Rebeca Zanini for their generous help.

References

- Atamanalp, M., Yanik, T., Haliloglu, H.I. and Aras, M.S. 2002. Alterations in the hematological parameters of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, exposed to cypermethrin. The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh 54(3), 99-103.
- Bain, B.J. 1997. Células Sangüíneas: Um Guia Prático. Porto Alegre: Artes Médicas, 334p.
- Barcellos, L.J.G., Kreutz, L.C., Rodrigues, L.B., Fioreze, I., Quevedo, R.M., Cericato, L., Conrad, J., Soso, A.B., Fagundes, M., Lacerda, L.A., Terra, S. 2003. Haematological and biochemical characteristics of male jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard *Pimelodidae*): changes after acute stress. Aquaculture Research 34, 1465-1469.
- Barcellos, L.J.G., Wassermann, G.F., Scott, A.P., Woehl, V.M., Quevedo, R.M., Itzès, I., Krieger, M.H. and Lulhier, F. 2002. Plasma steroid concentrations in relation to reproductive cycle of cultured male *Rhamdia quelen*. Journal of Fish Biology 61, 751-763.
- Barcellos, L.J.G., Wassermann, G.F., Scott, A.P., Woehl, V.M., Quevedo, R.M., Itzès, I., Krieger, M.H. and Lulhier, F. 2001_a. Steroid profiles in cultured female Jundiá, the Siluridae *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaymard, Pisces Teleostei), during the first reproductive cycle. General and Comparative Endocrinology 121, 325-332.
- Barcellos, L.J.G., Woehl, V.M., Wassermann, G.F., Quevedo, R.M., Itzès, I. and Krieger, M.H. 2001_b. Plasma levels of cortisol and glucose in response to capture and tank transference in *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard), a South American catfish. Aquaculture research 32, 121-123.
- Gomes, L.C., Golombieski, J.I., Gomes, ARC and Baldisserotto, B. 2000. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). Revisão Bibliográfica. Ciência Rural, Santa Maria, v. 30: 179-185.
- Hrubec, T.C., Cardinale, J.L. and Smith, S.A. 2000. Hematology and plasma chemistry reference intervals for cultured Tilapia (*Oreochromis hybrid*). Veterinary Clinical Pathology, 29 (1): 7-12.
- Hrubec, T.C., Robertson, J.L. and Smith, S.A. 1997. Effects of temperature on hematologic and serum biochemical profiles of hybrid striped bass (*morone chrysops* X *Morone saxatilis*). American Journal Veterinary Research, 58(2):126-130.
- Hrubec, T.C. and Smith, S.A. 1999. Differences between plasma and serum samples for the evaluation of blood chemistry values in Rainbow Trout, Channel Catfish, Hybrid Tilapias, and Hybrid Striped Bass. Journal of Aquatic Animal Health 11: 116-122.
- Hrubec, T.C., Smith, S.A., Robertson, J.L., Feldman, B., Veit, H.P., Libey, G. and Tinker, M.K. 1996. Blood biochemical reference intervals for sunshine bass (*Morone chrysops* X *Morone saxatilis*) in three culture systems. American Journal Veterinary Research 57(5): 624-627.
- Hrubec, T.C., Smith, S.A. and Robertson, J.L. 2001. Age-related changes in hematology and plasma chemistry values of Hybrid Striped Bass (*Morone chrysops* X *Morone saxatilis*). Veterinary Clinical Pathology, 30(1): 8-15.
- Morris, M.W., Davey, F.R. 1996. Basic examination of blood. In: Henry, J.B. Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. New York, cap. 24.
- Ozretić, M.K., Ozretić, B., Petrović, S. and Nikolić, T. 2001. Seasonal variations of some blood parameters in farmed sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) Peridicum Biologorum, 103(1), 67-75.

- Stoskopf, M.K., 1993. Clinical Pathology. In: Fish Medicine. Philadelphia, W. B. Saunders, 882, cap. 9.
- Tavares-Dias, M., Frascá-Scorvo, C.M.D., Campos-Filho, E. and Moraes, F.R. , 1999. Hematological characteristics of brazilian teleosts. IV. Parameters of matrinxã (*Brycon cephalus* Günther, 1869) (OSTEICHTHYES: CHARACIDAE). *Ars Veterinaria*. 15(3): 149-153.
- Tocidlowski, M.E., Lewbart, G.A. and Stoskopf, M.K. 1997. Hematological study of Red pacu (*Colossoma brachypomum*). *Veterinary Clinical Pathology*, 26(3): 119-125.
- Williams R.W. and Warner M.C. 1976. Some observations on the stained blood cellular elements of catfish, *Ictalurus punctatus*. *Journal of Fish Biology*, 9:491-497.

Table 1. Physical and chemical parameters of water quality, mean weights and body measurements of fish

Parameter	Value
Temperature (°C)	25
Total alkalinity (mg/l)	69.5
Total hardness (mg/l)	76.1
Dissolved oxygen (mg/l)	7.0
pH	7.1
NH ₃ un-ionized (mg/l)	0.006
NO ₂ - N (mg/l)	0,2
NO ₃ - N (mg/l)	4.5
Chloride (mg/l)	38,5
Body weight (g)	198.3
Length (cm)	29.4
Height (cm)	15.3

Table 2. Mean \pm SEM and confidence limits (95%) of serum biochemical values of males of jundiá

Parameter	Mean \pm SEM	n	Confidence limits 95% (Lower-Upper)
Chloride (mEq/l)	123.0 \pm 1.0	23	120.9-125.1
Sodium (mEq/l)	139.6 \pm 0.6	25	138.3-140.9
Potassium (mEq/l)	2.3 \pm 0.2	22	1.9-2.7
Total Calcium (mg/dl)	13.8 \pm 0.3	21	13.1-14.4
Magnesium (mg/dl)	3.5 \pm 0.2	22	3.1-3.8
Phosphorus (mg/dl)	9.8 \pm 0.6	24	8.5-11.0
Creatinine (mg/dl)	0.12 \pm 0.06	39	0.10-0.13
Urea (mg/dl)	5.6 \pm 0.4	29	4.7-6.5
Ammonia (μ mol/l)	214.2 \pm 20.8	23	171.0-257.3
Glucose (mg/dl)	65.1 \pm 3.6	22	57.6-72.5
Total protein (g/dl)	4.2 \pm 0.1	20	4.0-4.4
Albumin (g/dl)	1.9 \pm 0.06	20	1.8-2.0
Globulin (g/dl)	2.3 \pm 0.08	20	2.2-2.4
Triglycerides (mg/dl)	427.3 \pm 49.5	28	325.8-528.8
Total cholesterol (mg/dl)	170.7 \pm 10.2	21	149.4-192.0
HDL-cholesterol (mg/dl)	81.8 \pm 1.8	22	78.0-85.5
LDL-cholesterol (mg/dl)	27.2 \pm 4.0	20	18.8-35.7
Total bilirubin (mg/dl)	0.28 \pm 0.02	21	0.25-0.31
Indirect bilirubin (mg/dl)	0.18 \pm 0.01	21	0.14-0.21
Direct bilirubin (mg/dl)	0.1 \pm 0.0	21	0.1-0.1
Alanine aminotransferase (ALP or GPT)(U/l)	34.5 \pm 2.2	38	30.1-38.9
Aspartate aminotransferase (AST or GOT) (U/l)	114.1 \pm 7.1	42	99.7-128.5
Alkaline phosphatase (U/l)	90.2 \pm 5.2	40	79.7-100.8
Lactate dehydrogenase (U/l)	1053.7 \pm 86.7	27	875.5-1123.2

Table 3. Mean \pm SEM and confidence limits (95%) of hematologic values of males of jundiá.

Parameter	Mean \pm SEM	n	Confidence limits 95% (Lower-Upper)
Erythrocytes ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	3.7 \pm 0.1	38	3.5-3.9
Hemoglobin (g%)	8.7 \pm 0.1	38	8.4-9.0
Hematocrit (%)	43.0 \pm 1.2	38	40.6-45.4
MCV (fl)	120.9 \pm 6	38	108.3-133.5
MCH (pg)	24.3 \pm 0.9	38	22.3-26.3
MCHC (g/dl)	20.7 \pm 0.5	38	19.7-21.7
Total leukocytes ($10^3/\mu\text{l}$)	101.0 \pm 10.1	30	80.4-121.7
Neutrophils (%)	2.9 \pm 0.4	30	2.0-3.7
Monocytes (%)	15.1 \pm 1.6	30	11.9-18.4
Small lymphocytes (%)	50.1 \pm 2.6	30	44.8-55.4
Large lymphocytes (%)	30.4 \pm 1.5	30	27.4-33.5
Immature cells (%)	1.2 \pm 0.18	30	0.8-1.6
TLC (%)	0.2 \pm 0.09	30	0.01-0.38
Neutrophils ($10^3/\mu\text{l}$)	2.8 \pm 0.5	30	1.8-3.8
Monocytes ($10^3/\mu\text{l}$)	13.8 \pm 1.8	30	10.1-17.6
Small lymphocytes ($10^3/\mu\text{l}$)	53.1 \pm 6.6	30	39.4-66.7
Large lymphocytes ($10^3/\mu\text{l}$)	30.1 \pm 3.3	30	23.3-36.9
Immature cells ($10^3/\mu\text{l}$)	0.9 \pm 0.15	30	0.6-1.2
TLC ($10^3/\mu\text{l}$)	0.16 \pm 0.07	30	0.0-0.3
Thrombocytes ($10^3/\mu\text{l}$)	28.9 \pm 5.5	30	17-40

Table 4. Comparative values from automated and manual techniques

Parameter	Values mean ± SEM (manual technique)	n	Confidence limits 95% (Lower- Upper)	Values mean ± SEM (automated technique)	Confidence limits 95% (Lower- Upper)
Erythrocytes (x10 ⁶ /mm ³)	3.7 ± 0.1	38	3.5-3.9	2.5 ± 0.06	2.3-2.6
Hemoglobin (g%)	8.7 ± 0.1	38	8.4-9.0	10.6 ± 0.2	10.1-11.1
Hematocrit (%)	43.0 ± 1.2	38	40.6-45.4	38.5 ± 1.08	36.2-40.7
MCV (fl)	120.9 ± 6	38	108.3-133.5	156 ± 2.0	151.8-160.1
MCH (pg)	24.3 ± 0.9	38	22.3-26.3	43.3 ± 0.7	41.8-44.7
MCHC (g/dl)	20.7 ± 0.5	38	19.7-21.7	27.7 ± 0.3	27.1-28.3
Total leukocytes (x10 ³ /mm ³)	101.0 ± 10.1	30	80.4-121.7	61.6 ± 5.2	50.5-72.7

6. CAPÍTULO 2

“Biochemical Values of Seminal Plasma and Annual Variations of Physical

Characteristics of the Milt from Jundiá *Rhamdia quelen*

(Quoy and Gaimard, Pimelodidae)”

(Artigo submetido à revista Fish Physiology and Biochemistry)

Biochemical values of seminal plasma and annual variations of physical characteristics of the milt from jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, Pimelodidae)

Adriana Borges, Daniele Rodrigues Siqueira, Daiane Follmann Jurinitz, Rebeca Zanini, Fernanda do Amaral, Marcelo Lacerda Grillo, Ender Rosana Oberst and Guillermo Federico Wassermann.

Laboratório de Endocrinologia Experimental, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Sarmiento Leite, 500, CEP 90050 170, Porto Alegre, RS, Brazil (Phone/FAX +51-3316 3302, E- mail: adriana.borges@ufrgs.br).

*Department of Veterinary Clinical Pathology, UFRGS.

Key words: Silver catfish, semen, spermatozoa, spermatocrit, sperm motility, seminal fluid

Abstract

This study investigated the composition of milt of the South American silver catfish (*Rhamdia quelen*) or jundiá. The semen was taken from jundiá in different periods during the four seasons. The biochemical composition of seminal fluid and the characteristics of sperm were analyzed. The total extractable volume of milt per fish in one day was 1.06 ml during summer (maximum) and 0.23 ml during winter (minimum). Sperm density (spermatocrit) showed higher values in the spring and in the beginning of the summer (79-82%) decreasing slightly afterwards reaching 65 to 69% in the fall and winter. Immediately after water dilution 90-100% of the spermatozoa presents vigorous straightforward motility that remains for at least 20 seconds. This pattern of motility is maintained for more than 2 hours after stocking the milt at room temperature. The pH from 5 to 10 of the water dilution do not influence the sperm motility. The mean seminal pH and osmolality values were 8.7 ± 0.07 and 274.8 ± 11.2 , respectively. The ion concentration was: Na 153.7 ± 2.4 , K 10.7 ± 2.4 , Cl 139.4 ± 2.1 (mEq/l), Ca 8.0 ± 0.4 , Mg 1.8 ± 0.1 , P 0.9 ± 0.08 (mg/dl). The total protein was 6 ± 0.5 mg/dl and cholesterol concentration 0.36 ± 0.02 mmol/l.

Introduction

The jundiá *Rhamdia quelen* (Siluridae, Pimelodidae) or silver catfish occurs from Southern Mexico to Central Argentina. This fish can withstand cold winters and grow fast in the summer. Jundiá is a suitable species for fish production in the southern part of South America, making it ideal for any region with a temperate or subtropical climate (Barcellos et al., 2001; Barcellos et al., 2002; Borges et al., 2004) because of its good growth rate, omnivorous feeding habit, a high fertilization and hatching rates (Gomes et al., 2000). No less important is the fact that they are very well accepted by the consumers.

To have a controlled and successful production in aquaculture systems is necessary to have an adequate knowledge of the morphological, physical and chemical characteristics of the milt in order to determine the reproductive viability of cultivated fish. Also the ionic and organic constituents of the seminal fluid can reflect the efficacy of fish fertilization capacity (Ciereszko et al., 2000).

The aim of the present investigation is to determine the physical and chemical characteristics of milt of the jundiá *Rhamdia quelen*. The comparison of the chemical composition of the seminal plasma with of the blood serum of jundiá was also made.

Materials and methods

1. Fish

At least 188 sexually mature male jundiá, *Rhamdia quelen* with mean weight 253 ± 8 g and a mean length of 30.4 ± 0.4 cm were obtained in freshwater ponds from fish producer in

Rolante, RS, during 2002 and 2003. The fishes were caught during different months of the year, transported to the Laboratory and kept in 500 l freshwater tanks with dechlorinated circulating water under natural photo period and controlled temperature ($24 \pm 2^\circ\text{C}$). The fishes were kept at a stocking density of approximately 5g/l in the tanks and were maintained for 3 days prior to stripping .

The animals were fed with commercial fish pellets SUPRA (containing crude protein, Ca, P, vitamins A, C, D3, E, B1, B2, B6, B12, K3, folic acid, pantothenic acid, biotin, niacin, inositol, Cu, Fe, I, Mn, Se and Zn) each day at 1% body weight per day and without any feeding 24 hours prior to sampling.

2. Water quality control

Water quality was monitored using a commercial water analysis kit (Alfa Tecnoquímica, Florianópolis, SC, Brazil) as follows: pH, temperature, ammonia concentration, alkalinity, hardness, nitrite, nitrate, chloride and dissolved oxygen concentrations. Water quality values on days that the fish were sampled are shown (Table 1) and were representative of water quality over the duration of the study.

3. Milt collection

The semen was obtained from 91 males, that were randomly selected from the holding tanks. The abdomen was wiped clean with gauze, and after the milt collected with plastic syringes (without needle) by gently pressing the abdomen from the anterior portion towards the gonopore of the fish. Care was taken to prevent contamination with urine, mucus and feces.

4. Characteristics of semen

The color of each sample was judged visually, immediately after collection. The volume of the ejaculated (excluding the first watery portion) was measured in plastic syringes. The pH was determined by indicator strips non-bleeding (Merck, Germany) (to lower semen volume: < 1.0 ml) and digital pH meter DIGIMED (\geq upper semen volumes \geq 1.0 ml).

5. Sperm estimation

Sperm density was determined measuring spermatocrit value and also through microscopic sperm counting.

5.1. Spermatocrit

Microhaematocrit capillary tubes (75 mm length and 1,1-1,2 mm i.d.) were filled (approximately 70%) with semen and one end of each tube was sealed with fire for tubes centrifugation in a microhaematocrit centrifuge spun at 12.000 g. An initial experiment was conducted to determine the time of centrifugation required to achieve stable readings. It was measured the spermatocrit at 5 min intervals up to 65 min of centrifugation. Measurements were done in triplicate for each sample and the average of three measurements was used for the results. Spermatocrit was measured within three hours of semen collection. During this time the tubes were kept at 4°C. Spermatocrit, defined as the ratio of volume of solid packed material to total volume of semen x 100, was measured in triplicate from 91 males.

5.2. Sperm count

An improved Neubauer counting chamber Bright line (BOECO, Germany) was used for sperm counting as Tvedt et al., 2001 with small modifications. For the counts, semen was diluted 1500-fold in 2,94% solution of sodium citrate, formaldehyde 4%. The counting was estimated in triplicates from 91 males.

6. Sperm motility analysis

Spermatozoa motility was estimated under a light microscope (x 400) right after the semen collection. Sperm motility was determined by diluting 10 μ l of milt in 1ml of freshwater tank and solution with distinct pH values. A wet mount (slide and cover slip) was prepared with a droplet of this diluted milt and placed under a microscope. Sperm motility observations were done at room temperature, using at least three replicates per sample. One person conducted all the sperm motility observations in order to decrease the degree of variation.

6.1. Motility evaluation

Sperm motility was determined by subjective estimates of percentage of motile sperm cells and by the duration of motility (length of time before most cells became immobile) by a stopwatch. Motility was assessed using an arbitrary scale in which 0 represents 0%, 1 \cong 0-25%, 2 \cong 25-50%, 3 \cong 50-75%, 4 \cong 75-90%, 5 \cong 90-100% of motile spermatozoa. The influence of semen stockage at room temperature (24⁰C) was determined. The motility of collected milt was analyzed after a stocking time of 0, 1, 2, 3, 4 and 5 hours.

7. Seminal plasma

Milt from each sample was centrifuged (10.000 x g, 10 min.) and the seminal plasma was removed and kept at -20°C for further analysis in the Laboratory of Clinical Pathology at the CHPA (Clinical Hospital of Porto Alegre). All electrolytes, metabolites and enzymes were determined by using an automated system with adequate standards (ADVIA 1650 Chemistry System, Bayer, Tokyo, Japan, 2000). The automated system was regularly monitored for accuracy and precision in accordance with “good laboratory practices”. The following parameters were measured and expressed in the following units: cholesterol, bilirubin, urea, creatinine, magnesium, phosphorus, calcium (mg/dl); alanine aminotransferase (ALP), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (U/l), chloride, potassium, sodium (mEq/l); albumin, total protein (g/dl). The concentration of globulins was calculated (total protein minus albumin concentrations).

8. Light microscopy of jundiá sperm

Smears of semen diluted 1:100 in a buffered formol saline solution were stained with Cerovsky method (Cerovsky, 1976) and observed (x400 magnification) in a Nikon Eclipse E 600 microscope. The photographed jundiá sperm were obtained by a DX A151 Sony Camera, connected to a Zeiss standard microscope under oil immersion (x1000 magnification), using a KS 300 software (Kontron Electronic).

9. Statistical Tests

Means \pm standard error(SEM) was calculated for each milt characteristics using triplicates samples for at least 5 males per week. We use a commercial statistical program (Instat version 3.0, San Diego, USA).

Results

1. Anatomy

Fig 1 illustrates one specimen of jundiá *Rhamdia quelen* of 5 months of age. The mean weight of the jundiá of this age is 253 ± 8 g, their length 30.4 ± 0.37 cm and the width (at the abdomen) 15.66 ± 0.33 cm. The paired testes have a sperm duct; the two sperm ducts join caudally forming a terminal duct that opens into a genital papilla. The testes are composed by lobes with numerous fringes and their general aspect is similar to the ones described for the *Iheringichthys labrosus* (Santos et al., 2001).

2. Characteristics of the semen

2.1. Spermatozoa

The spermatozoa of jundiá is represented in the Fig. 2. They have an oval head of about $3.1 \mu\text{m} \pm 0.24$ of length and $2 \mu\text{m} \pm 0.28$ of width. The flagellum has a longitudinal dimension between 15 to 25 μm .

2.2. Physical characteristics of semen

The semen of jundiá has white color, without any odor, creamy aspect and its pH is 8.0 ± 0.03 .

2.3. Spermatocrit and sperm density

The spermatocrit values found after different times of centrifugation are showed in Fig. 3. After 25 min. of centrifugation the percentage of packed sperm cells reached a plateau. In all subsequent experiments the time of centrifugation was fixed in 30 min. The profile of the spermatocrit values from September to July is showed in Fig 4. The values of sperm concentration are also showed as a reference. The sperm cell count was found to be between $48 - 75 \times 10^9 \text{ ml}^{-1}$.

2.4. Volume of semen

Fig. 5 shows the volume of semen obtained per fish in one day of each month of the year. The total semen extracted per day.kg^{-1} fish during representative months of seasons is shown in Fig. 6. The number of spermatozoa extracted for fish in different seasons is in Fig. 7.

2.5. Motility of spermatozoa

2.5.1. Motility analysis

The spermatozoa remain immobile in the semen but were activated after water dilution. The motility duration after dilution was defined in an arbitrary scale from zero to five (0-5).

Zero represents the immobile spermatozoa and five the 100% mobile spermatozoa with forward, rapid and strong motility (Fig. 8).

2.5.2. Sperm motility and semen stockage

The stockage of semen at room temperature (24⁰C) has a significantly ($p < 0.05$) influence on the duration of the spermatozoa motility after water dilution. (Fig. 9). The normal motility is preserved at least up to 2 hours of stockage at room temperature.

2.5.3. Influence of pH on the spermatozoa motility

The influence of the pH of the dilution water on the duration of sperm motility is represented in Fig. 10. Between pH 5 to 10 the pH did not have significantly influence. At pH 3 and 12 the spermatozoa suffered physical damage.

3. Seminal Fluid

The concentration of electrolytes, metabolites and enzymes of jundiá seminal fluid is shown in Table 2. It can also be observed that the composition of the fluid diverges to the composition of blood serum of jundiá in practically all parameters measured. The pH of seminal fluid is 8.7 ± 0.07 and its osmolality is 274.8 ± 11.2 .

Discussion

The results reported here allow us to conclude that the spermatozoa of jundiá have an ovoid head with a length of $3.1 \pm 0.24 \mu\text{m}$ and a width of $2 \pm 0.28 \mu\text{m}$. The flagellum is 15 to 25 μm long. The values of the spermatocrit found vary from 79-82% in spring and beginning of the summer and between 65-69% in fall and winter.

The total volume of expressible milt per fish was 1.06 ml during December (maximum) and 0.23 ml in July (minimum). This represents 4.2 ml.kg^{-1} fish in November, 3.6 ml in January, 1.7ml in April and 1.1 ml in July. In red porgy *Pagrus pagrus L.* it was found mean values of 1.7ml to 5.3 ml.kg^{-1} of expressible milt during the year (Mylonas et al., 2003).

The spermatozoa reach class five (5) motility (vigorous and straightforward movement) immediately after water dilution and remain in this class approximately 20 seconds. Approximately 1 min after water dilution, the spermatozoa were all immobile. The stocking time in the milt preserved the class 5 motility during at least two hours at room temperature (24°C). The pH of the dilution water did not have influence on the duration of class 5 motility, between the range of pH 5 to 10. Similar results were observed by Kime and Tveiten (2002) with spermatozoa of *Anarhichas minor* submitted to variation of pH between 6.0 to 9.0. Also in the *Odontesthes bonariensis*, spermatozoa became motile in a wide range of pH (5.4-8.3). Thus, pH appears to have little, if any, effect on motility activation (Strüssmann et al., 1994). The electrolyte concentration of jundiá on the seminal plasma showed in table 2 indicates that the Na^+ and K^+ levels are higher than in blood serum and these high concentrations are in part responsible for the suppression of

sperm motility (Billard, 1975; Benau & Ternier, 1980; Morisawa et al., 1983, Morisawa, 1985.).

The motility of sperm in most species is induced by the osmotic shock, when it is mixed with water either during natural spawning, or under laboratory conditions (Morisawa e Suzuki, 1980; Perchec et al. 1993). The spermatozoa of jundiá are activated immediately in contact with freshwater, and the high percentage of vigorous and forward moving motile spermatozoa is maintained only for a very short time (20seconds, Fig. 7). The spermatozoa of *Clarias gariepinus* are activated immediately after dilution and the motility spermatozoa is maintained for a very short time (30 seconds) at the spawning temperature of the fish (28°C) (Mansour et al., 2003).

The spermatocrit increased during the spawning season indicating a variation of sperm concentration (Fig. 4) during the period of the study. From the methods used for the milt evaluation, spermatocrit is the easiest and fastest to be used as a routine analysis. The relationship found between spermatocrit and sperm density recommends the use of spermatocrit as a simple, rapid and economic method to determine the sperm density also in jundiá (Fig. 4). This relationship has previously been reported for several other teleost species (Bouck and Jacobson, 1976; Piironen, 1985; Ciereszko and Dabrowski, 1993; Rakitin et al., 199, Tvedt et al, 2001).

In seminal plasma of rainbow trout Ciereszko and Dabrowski (1993) found a mean protein concentration of $1.3 \pm 0.7 \text{ mg.ml}^{-1}$. In *Sparus aurata* Kara et al. found between 4.3 ± 0.6 to $6.7 \pm 1.5 \text{ mg.ml}^{-1}$ total protein in seminal fluid. In jundiá the concentration of protein found in seminal plasma was $0.6 \pm 0.05 \text{ mg.ml}^{-1}$. The concentration of globulin was predominant: $0.42 \pm 0.03 \text{ mg.ml}^{-1}$. The concentration of albumin was

0.18±0.01 mg.ml⁻¹. The concentration of triglycerides of seminal fluid of jundiá was relatively low: 0.15 mmol.l⁻¹; the values in *Sparus aurata* were between 0.2±0.04 to 0.52±0.03 mmol.l⁻¹ (Kara et al., 1996).

For cholesterol the value in jundiá seminal fluid was 0.36±0.02 mmol.l⁻¹. In *Cyprinus carpio* the concentration found ranges from 0 to 0.22 mmol.l⁻¹ (Kruger et al., 1984), and in *Sparus aurata* the values found were between 0.36±0.1 to 4.6±0.1 mmol.l⁻¹.

The ion concentration of seminal plasma was different with respect to the concentration of blood serum. The values of chloride, sodium and especially potassium are higher than the ones found in blood serum. On the contrary, calcium, magnesium and phosphorus have lower values. The relationship between the high concentration of potassium and low concentration of calcium seems to be the cause of the inhibition of sperm motility. Baynes et al. 1981, in *Salmo gairdnerii* fish demonstrated that the high calcium concentration antagonizes the potassium effect on the sperm motility. It means that the high ration potassium/calcium produced inhibition of the spermatozoa motility.

The information of the normal physical and chemical characteristics of seminal plasma of jundiá should help to optimize the process for selecting high quality donor males for aquaculture operations.

Acknowledgements

A. Borges is a doctoral fellow of CNPq at the Department of Physiology, ICBS, UFRGS. This work was supported by grants from FAPERGS (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul), CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa), and PROPESQ-UFRGS (Pró-Reitoria de pesquisa, Universidade Federal do Rio Grande do Sul). The authors are grateful to E. Pires for maintenance of the best laboratory conditions.

References

- Barcellos, L.J.G., Woehl, V.M., Wassermann, G.F., Quevedo, R.M., Itzéz, I. and Krieger, M.H. 2001. Plasma levels of cortisol and glucose in response to capture and tank transference in *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard), a South American catfish. *Aquaculture research* 32:121-123.
- Barcellos, L.J.G., Wassermann, G.F., Scotts, A.P., Woehl, V.M., Quevedo, R.M., Itzéz, I., Krieger, M.H. and Lulhier, F. 2002. Plasma steroid concentrations in relation to reproductive cycle of cultured male *Rhamdia quelen*. *Journal of Fish Biology* 61:751-763.
- Baynes, S.M., Scott A.P. and Dawson A.P. 1981. Rainbow trout, *Salmo gairdnerii* Richardson, spermatozoa: effects of cations and pH on motility. *J. Fish Biol.* 19:259-267.

- Benau, D. and Turner, C. 1980. Initiation, prolongation and reactivation of the motility of salmonid spermatozoa. *Gamete Res.* 3:247-257.
- Billard, R. 1975. L'insémination artificielle de la truite *Salmo gairdneri* Richardson. IV Effets des ions K^+ et Na^+ sur la conservation du pouvoir fécondant des gamètes. *Bull. Fr. Piscic.* 256:88-98.
- Borges, A., Scotti, L.V., Siqueira, D.R., Jurinitz, D.F. and Wassermann, G.F. 2004. Hematologic and serum biochemical values for jundiá (*Rhamdia quelen*). *Fish Physiology and Biochemistry.* 00:00-00.
- Bouck, G.R. and Jacobson, J. 1976. Estimation of salmonid sperm concentration by microhematocrit technique. *Trans. Am. Fish. Soc.* 105:534-535.
- Cerovsky, J. 1976. Metoda barveni kancich spermü pro morfologicke hodnocem. *Zivoc. Vyr.* 21 (5): 361-366.
- Ciereszko, A. and Dabrowski, K. 1993. Estimation of sperm concentration of rainbow trout, whitefish and yellow perch using a spectrophotometric technique. *Aquaculture* 109:367-373.
- Ciereszko, A., Glogowski, J. and Dabrowski, K. 2000. Biochemical characteristics of seminal plasma and spermatozoa of freshwater fishes. In: *Cryopreservation in Aquatic Species.* pp 20-48. Edited by Tiersch, T.R. and Mazik, P.M. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana.
- Gomes, L.C., Golombieski, J.I., Gomes, A.R.C. and Baldisserotto, B. 2000. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). *Revisão Bibliográfica. Ciência Rural, Santa Maria, v. 30:* 179-185.

- Kara, M. H., Derbal, F. and Labeled, S. 1996. Composition du liquide seminal de *Sparus aurata* au cours d'une saison de spermiation. J. Appl. Ichthyol. 12:69-70.
- Kime, D. and E. Tveiten, H. 2002. Unusual motility characteristics of sperm of the spotted wolffish. Journal of Fish Biology 61:1549-1559.
- Kruger, J.C. De W., Smit, G.L., Van Vuren, J.H.J. and Van Ferreira, J.T. 1984. Some physical and chemical characteristics of the semen of *Cyprinus carpio* L. and *Oreochromis mossambicus* (Peters). J. Fish Biol. 24: 263-272.
- Mansour, N., Lahnsteiner, F. and Berger, B. 2003. Metabolism of intratesticular spermatozoa of a tropical teleost fish (*Clarias gariepinus*). Comparative Biochemistry and Physiology Part B 135:285-296.
- Morisawa, M. and Suzuki, K. 1980. Osmolality and potassium ion: their role in initiation of sperm motility in teleosts. Science 210:1145-1147.

- Morisawa, M., Suzuki, K., and Morisawa, S. 1983. Effects of potassium and osmolality on spermatozoan motility of salmonid fishes. *J. Exp. Biol.* 107, 105-113.
- Morisawa M. 1985. Initiation mechanism of sperm motility at spawning in teleosts. *Zool. Sci.* 2, 605-615.
- Mylonas, C.C., Papadaki, M. and Divanach, P. 2003. Seasonal changes in sperm production and quality in the red porgy *Pagrus pagrus* (L.). *Aquaculture Research*. 13:1161-1170.
- Perchee, G., Cosson, J., André and Billard, R. 1993. La motilité des spermatozoïdes de truite (*Oncorhynchus mykiss*) et de carpe (*Cyprinus carpio*). *Journal of Applied Ichthyology* 9, 129-149.
- Piironen, J. 1985. Variation in the properties of milt from the Finnish landlocked salmon (*Salmo salar m. sebago* Girard) during a spawning season. *Aquaculture*. 48:337-350.
- Rakitin, A., Ferguson, M. M. and Trippel, E. A. 1999. Spermatocrit and spermatozoa density in Atlantic cod (*Gadus morhua*): correlation and variation during the spawning season. *Aquaculture* 170:349-358.
- Sansone, G., Fabbrocini, A., Zupa, A., Lavadera, S. L., Rispoli, S. and Matassino, D. 2001. Inactivator media of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) spermatozoa motility. *Aquaculture* 202:257-268.
- Santos, J.E., Bazzoli, N., Rizzo, E. and Santos, G.B. 2001. Morphofunctional organization of the male reproductive system of the catfish *Iheringichthys labrosus* (Lütken, 1874) (Siluriformes: Pimelodidae). *Tissue & Cell* 33 (5): 533-540.
- Strüssmann, C. A., Renard, P., Ling, H. and Takashima, F. 1994. Motility of pejerrey *Odontesthes bonariensis* spermatozoa. *Fisheries Science* 60 (1):9-13.

Tvedt, H. B., Benfey, T. J., Martin-Robichaud, D. J. and Power, J. 2001. The relationship between sperm density, spermatocrit, sperm motility and fertilization success in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*. *Aquaculture* 194:191-200.

Legends of the Figures

Figure 1

Five months-old jundiá *Rhamdia quelen*

Figure 2

Spermatozoa of jundiá *Rhamdia quelen*. Light microscopy (magnification 400 X).

Figure 3

Influence of centrifugation time on spermatocrit in jundiá. Each point represents the mean of least 15 milt samples collected from 5 males.

Figure 4

Values of spermatocrit and cell counts of jundiá during the year.

● cell count ($\times 10^9/\text{ml}$) ■ spermatocrit

Figure 5

Volume of semen extracted per fish in one day of each month of the year. The number of fish are between brackets.

Figure 6

Total semen extracted ($\text{ml day}\cdot\text{kg}^{-1}$ fish) during representative months of the seasons. The number of fish are between brackets.

Figure 7

Production of spermatozoa in different seasons (number of spermatozoa \times ml^{-1} \times volume of semen (ml) \times day^{-1}). The number of fish are between brackets.

Figure 8

Motility duration of jundiá sperm (in percentages of vigorous and straightforward moving spermatozoa) after activation with tank fresh water at room temperature (24°C). All spermatozoa were immobile after 45 seconds. Each point represents the mean of least 45 milt samples collected from 15 males.

Figure 9

Influence of stocking time on the duration of sperm motility. The horizontal line represents the time after collection or storage period in hours after withdrawal of the semen at room temperature (24°C). $n=5$ samples for each time.

a different of b and c ($p<0.05$); b different of c ($p<0.05$).

Figure 10

Motility of jundiá spermatozoa in different pHs. In pH3 the cell were precipitated and in pH12 the cells were completely dissolved. $n=5$ for group (triplicates milt collected for all fishes).

Table 1. Physical and chemical parameters of the water of the stocking tanks

Parameter	Values
Temperature (°C)	24.3
Total alkalinity (mg/dl)	75.3
Total hardness (mg/l)	82.7
Dissolved O ₂ (mg/l)	7.0
pH	7.2
NH ₃ un-ioniz.(mg/l)	0.006
NO ₂ – N (mg/l)	0.18
NO ₃ – N (mg/l)	4.1
Chloride(mg/l)	35

Table 2. Mean \pm SEM and Range of the seminal fluid and Mean \pm SEM blood serum biochemical values of males of jundiá

PARAMETERS	SEMINAL FLUID			BLOOD SERUM*	
	Mean \pm SEM	n	Range	Mean \pm SEM	n
Chloride (mEq/l)	139.4 \pm 2.1	21	125 – 149	123.0 \pm 1.0	23
Sodium (mEq/l)	153.7 \pm 2.4	20	142 – 162	139.6 \pm 0.6	25
Potassium (mEq/l)	10.7 \pm 0.5	21	8.0 – 14.1	2.3 \pm 0.2	22
Total Calcium (mg/dl)	8.4 \pm 0.4	20	5.8 – 12.4	13.8 \pm 0.3	21
Magnesium (mg/dl)	1.8 \pm 0.1	20	1.1 – 3.0	3.5 \pm 0.2	22
Phosphorus (mg/dl)	0.9 \pm 0.08	20	0.5 – 1.1	9.8 \pm 0.6	24
Creatinine (mg/dl)	0.8 \pm 0.06	19	0.4 – 1.0	0.12 \pm 0.06	39
Urea (mg/dl)	6.7 \pm 0.7	20	4 – 13	5.6 \pm 0.4	29
Acid uric (mg/dl)	0.24 \pm 0.02	18	0.1 – 0.4		
Total protein (g/dl)	0.6 \pm 0.05	19	0.2 – 0.9	4.2 \pm 0.1	20
Albumin (g/dl)	0.18 \pm 0.01	19	0.1 – 0.3	1.9 \pm 0.06	20
Globulin (g/dl)	0.42 \pm 0.03	19	0.1 – 0.6	2.3 \pm 0.08	20
Triglycerides (mg/dl)	10.9 \pm 0.8	18	6 – 14	427.3 \pm 49.5	28
Total cholesterol (mg/dl)	13.9 \pm 0.9	20	10 – 17	170.7 \pm 10.2	21
HDL-cholesterol (mg/dl)	3.3 \pm 0.4	17	1 – 6	81.8 \pm 1.8	22
LDL-cholesterol (mg/dl)	9.0 \pm 0.9	17	5 – 14	27.2 \pm 4.0	20
Total bilirubin (mg/dl)	0.2 \pm 0.01	20	0.1 – 0.2	0.28 \pm 0.02	21
Indirect bilirubin (mg/dl)	0.11 \pm 0.006	20	0.1 – 0.2	0.18 \pm 0.01	21
Direct bilirubin (mg/dl)	0.09 \pm 0.01	20	0.0 – 0.1	0.1 \pm 0.0	21
Alanine aminotransferase (ALP or GPT)(U/l)	8.9 \pm 0.6	20	5 – 13	34.5 \pm 2.2	38
Aspartate aminotransferase (AST or GOT) (U/l)	247.8 \pm 23.4	19	146 – 331	114.1 \pm 7.1	42
Alkaline phosphatase (U/l)	3.8 \pm 0.3	19	2 – 6	90.2 \pm 5.2	40
Osmolality (Osm/kg)	274.8 \pm 11.2	5	231 – 295.1		

* Borges et al., 2004.

Fig.1.

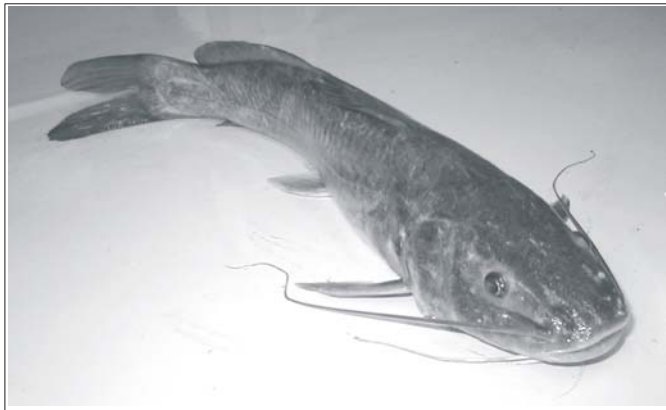


Fig.2

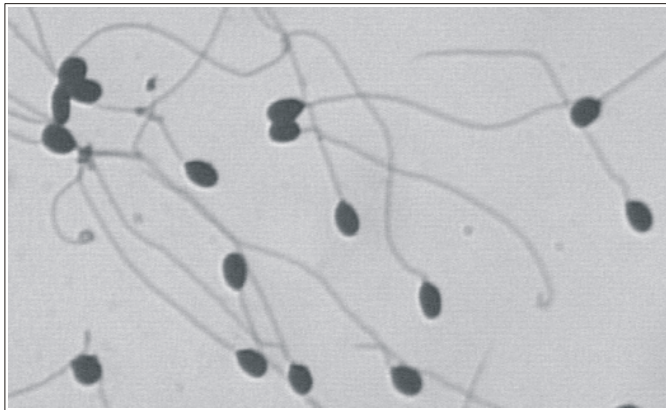


Fig.3

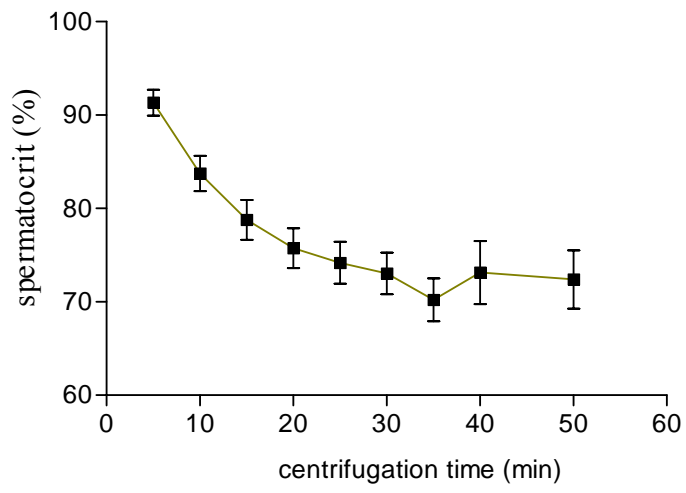


Fig.4

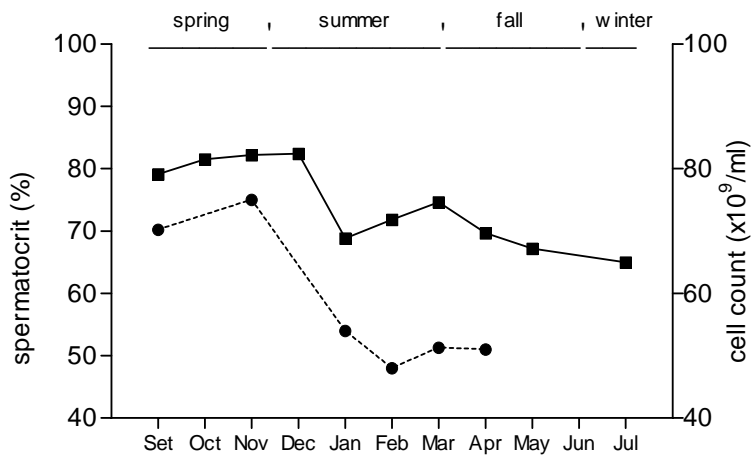


Fig.5

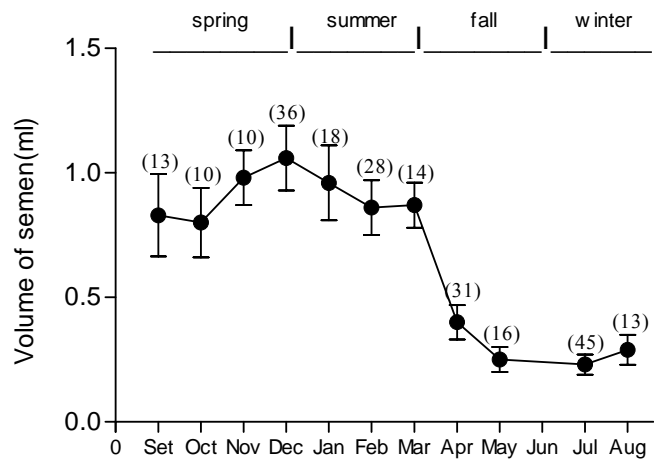


Fig.6

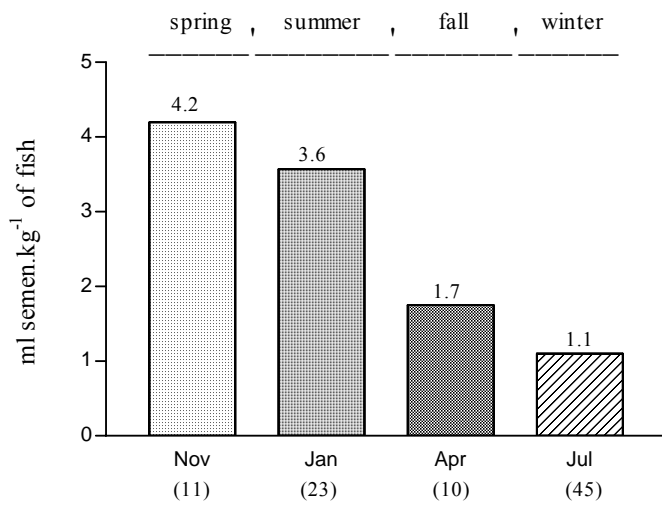


Fig.7

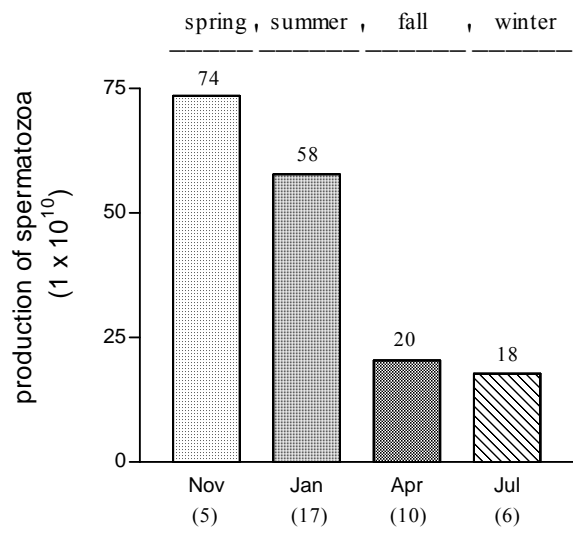


Fig.8

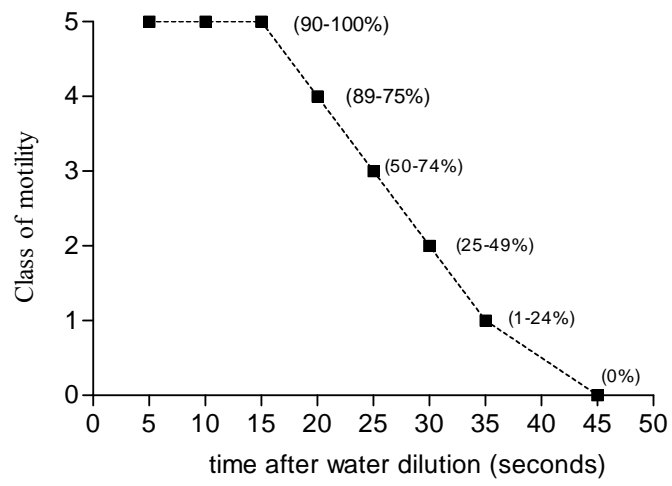


Fig.9

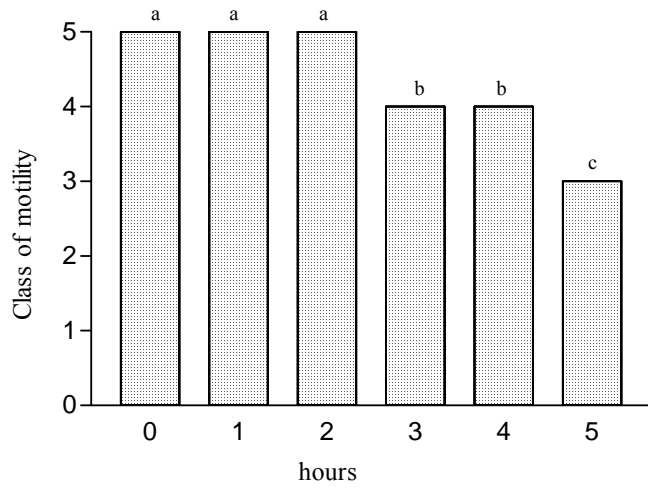
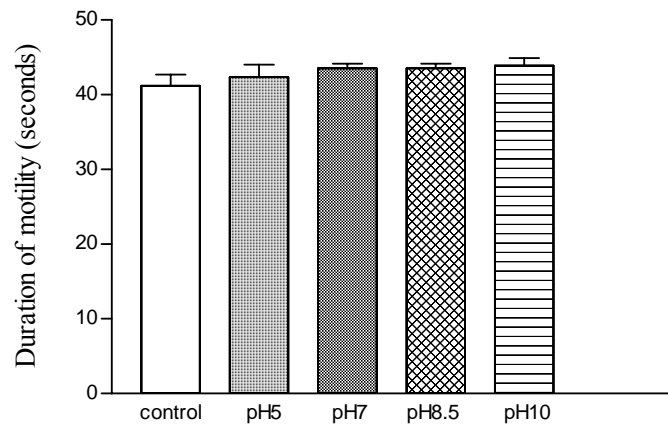


Fig.10



7. CAPÍTULO 3

“Toxicity of cypermethrin in jundiá *Rhamdia quelen*. Changes in haematological and serum biochemical values due to sub-lethal concentrations of cypermethrin”

(Artigo submetido à revista Fish Physiology and Biochemistry)

Toxicity of cypermethrin in jundiá *Rhamdia quelen*. Changes in haematological and serum biochemical values due to sub-lethal concentrations of cypermethrin

Adriana Borges¹, Luciana V Scotti², Daniele R Siqueira¹, Rebeca Zanini¹, Fernanda do Amaral¹, Daiane F Jurinitz¹ and Guillermo F Wassermann¹

Laboratório de Endocrinologia Experimental¹, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Sarmiento Leite, 500, CEP 90050 170, Porto Alegre, RS, Brazil (Phone/FAX +51-3316 3302, E-mail: adriana.borges@ufrgs.br).

Serviço de Patologia Clínica², Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS,

Brazil

Keywords: cypermethrin, jundiá, *Rhamdia quelen*, acute toxicity, serum biochemical, haematology

Abstract

Jundiás (*Rhamdia quelen*, Quoy and Gaimard), a South American teleostean fish, were exposed to sub-lethal concentrations of cypermethrin (30% and 45% of 48h DL₅₀ of 0.265 ppm) for 2, 4 and 8 days. Serum biochemical, haematological values and the behavioral changes were studied. The 30% DL₅₀ or 0.08 ppm produced significant elevations of Mg²⁺, P, K⁺, creatinine, urea, glucose, cholesterol, AST, alkaline phosphatase and LDH, and decrease of total proteins and triglycerides in serum. The fish did not present behavioral changes. The 45% DL₅₀ or 0.12 ppm produced significant elevation of Na⁺, Mg²⁺, P, K⁺, creatinine, urea, glucose, cholesterol and alkaline phosphatase, and diminution of triglycerides, ALP and AST levels in serum. At this concentration the fish showed hyper-excitability, struggle for better oxygenation and the gills and mouth widely open. The haematological values remained normal except for Hb and MCHC which became higher with both concentrations. Results of the present work show that biochemical analysis of serum can be useful to detect incipient cypermethrin intoxication of the shoal.

Introduction

Cypermethrin is a type II pyrethroid compound classified as a toxicity class III chemical (moderately toxic). In the last decades, this pyrethroid has displaced in the agriculture, due to the low toxicity for birds and mammals, the organochlorine, organophosphorus and carbamates insecticides.

The pyrethroids however are very toxic to fish due to their low capability to hydrolyze these compounds (Haya, 1989). Consequently the pesticides carried away from farming fields by the rain into lagoons, ponds and rivers, became a source of high toxicity for fish aquaculture. Furthermore this contamination can also be transferred through phytoplankton to fish.

Due to their lipophilicity, pyrethroids have a high rate of gill absorption even from very low concentration in water. This in turn would be a contributing factor to the sensitivity of the fish to aqueous pyrethroid exposures, since fish seem to be unable to metabolize the pyrethroids efficiently (Viran et al., 2003).

The synthetic α -cyano-fenoxy-benzyl-containing pyrethroid insecticides act on the central nervous system of vertebrates (Edwards et al., 1986). They block the sodium channels of nervous fibers, thereby lengthening their depolarization phase; moreover, they affect the GABA receptors in the nervous fibers (Hayes, 1994; Bradbury and Coats, 1989ab; Svobodová et al., 2003). These insecticides have been postulated to be involved in interactions not only with Na^+ channels, but also with neurotransmitters, receptor-ionophore complexes and ATPases (Szegletes et al., 1995; Dorman and Beasley, 1991). Reddy and Philip, (1994) reported that cypermethrin inhibited both Mg^{2+} and Na-K

dependent ATPases probably leading to a decrease in nerve impulse transmission and impairment of ionic regulation.

Pirethroids are highly toxic to the gills themselves, producing serious alteration in their epithelium, impairing the gaseous exchange (Çaliskan et al., 2003). These compounds are also toxic to fish liver, kidney, brain and muscle (Das and Mukherjee, 2003).

The acute toxicity of cypermethrin varies depending on the fish species. The 96-h LC_{50} for cypermethrin varies from 0.021 ppm in the guppy (Çaliskan et al., 2003) to 0.139 ppm in *Labeo rohita* (Das and Mukherjee, 2003).

The jundiá or silver catfish (*Rhamdia quelen*, Quoy and Gaimard) is a South American teleost fish that belongs to the Siluridae order, Pimelodidae family and Heptarinae subfamily (Gomes et al., 2000; Lermen et al. 2004). It is an important species raised as a source of dietary protein and recognized as one of the leading fish species for aquaculture in temperate and subtropical climates.

The aim of the present study was to determine the DL_{50} (24, 48, 72 and 96 hours) of cypermethrin in the jundiá and evaluate short term effect (2,4 and 8 days) of two sub-lethal doses (30% and 45% of 48 h LC_{50}) on haematological and serum biochemical values.

Materials and methods

Fish

The fish (mean weight 336.8 ± 11.5) were collected from ponds in Rolante, RS, and brought to the Laboratory of Physiology, UFRGS within 2h of collection. The animals were transported in plastic bags with enough air and were placed under tank water surface for about 15 min. Afterwards, the bags were cut open and the fish released to swim into the dechlorinated fresh water tank, that have temperature and dissolved oxygen controlled. The stock density was 5g/l. The fish were fed with SUPRA commercial fish pellets (containing crude protein, Ca, P, vitamins A, C, D3, E, B1, B2, B6, B12, K3, folic acid, pantothenic acid, biotin, niacin, inositol, Cu, Fe, I, Mn, Se and Zn) at 1% body weight daily. The fish were maintained in the tanks for at least 3 days and were fasted 24 hours before the starting of the experiments.

Water

The tank water was replaced (20%) every other day. The quality control for nine parameters was made weekly and always before the beginning of the experiments. The physic-chemical characteristics of tank water used in the experiments are shown in Table1.

Chemical

Cypermethrin (with the name of cypergold CE200, produced by Aventis Cropscience, São Paulo, Brazil) was purchased from a dealer (Tedesco, Porto Alegre, Brazil) at 20% concentration.

Acute toxicity

Four-day static acute toxicity test was performed to determine the LC₅₀ value of cypermethrin. Cypermethrin at the concentrations 0.08, 0.10, 0.12, 0.16, 0.20, 0.24, 0.32 and 0.36 ppm were diluted in the tanks. For each concentration a group of 10 fish was randomly placed in the tanks. This procedure was repeated at least 3 times.

The number of dead fish and the behavioral changes of the animals were observed after 24, 48, 72, and 96 hours. The dead fish were immediately removed from the tanks.

The DL₁₆, DL₅₀ e DL₈₄ were calculated by probit method according to Greenberg et al. (1985) for the periods of 24, 48, 72 and 96 hours. Two sub-lethal concentrations (30% and 45% of LC₅₀ 48h) were used for the evaluation of the biochemical, haematological and behavioral effects on fish.

Biochemical and haematological effects of the cypermethrin

After the tests of acute toxicity of cypermethrin in jundiá, absence to the exposure (control) and the sub-lethal concentrations 0.08 and 0.12 ppm of the pyrethroid were selected to study the effects in the serum biochemical and haematological composition of the fish. Blood was collected before and after 2, 4 and 8 days of treatment with cypermethrin. Blood samples were taken by puncture of the caudal blood vessels with sterile 3ml plastic syringes. After blood collection, the fish were sacrificed by decapitation. The blood parameters were analyzed in the Laboratory of Clinical Pathology at the HCPA (Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brazil) according Borges et al., 2004.

For the haematology tests, the blood was placed into tubes containing EDTA as anticoagulant. The following parameters were determined: total red blood cells

(erythrocytes) count, total white blood cells (leukocytes) count, hemoglobin content and hematocrit. The corpuscular indices including the mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular volume (MCV) and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) were calculated by standard formulas from hematocrit, blood hemoglobin percentage and red cell count values.

For the biochemical tests, the blood was placed in tubes and allowed to clot at room temperature, approximately 25⁰C, for 30 min. Serum was removed from the clotted sample after centrifugation at 3.000rpm for 5 min and frozen at -20⁰C until analysis. The electrolytes (chloride, sodium, potassium, calcium, magnesium, phosphorus), metabolites (triglycerides, cholesterol, urea, creatinine, glucose, total protein) and enzymes (alanine aminotransferase (ALP), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase, lactate dehydrogenase) were determined by using an automated system with adequate standards.

Statistical Tests

Data are shown as percentage of cumulative mortalities mean. Lethal concentrations (LC₁₆, LC₅₀, LC₈₄), 95% confidence limits and the parameters of inclination, correlation and intercept were calculated by the method Litchfield and Wilcoxon (1949) through a computer software (LETAL.EXE, US. 1.3. FKS, 1991).

For the biochemical and haematological studies the values are presented as the mean \pm standard error (SEM) of 5-53 individuals. The differences between the data of control and treated animals were performed by a paired t-test and one-way ANOVA with Bonferroni and Tukey-Kramer multiple comparisons post tests. We used a commercial

statistical program (Graphpad Instat version 3.0, San Diego, USA). Differences were considered to be significant when $p < 0.05$.

Results

Acute toxicity

The results of the tests for lethal toxicity of cypermethrin are represented in Table 2. Probit analysis showed that the lethal concentrations 50% for 24, 48, 72 and 96 hours were 0.298, 0.265, 0.196 and 0.193 ppm, respectively (Table 2). The mortality rate for the period of 96 hours for all cypermethrin concentrations is represented in Figure 1.

Behavioral observations

The control and the 0.08 and 0.10 ppm groups showed normal behavior during the test period. The first signs of cypermethrin intoxication were observed with the 0.12 ppm concentration: excitability, struggle for better oxygenation, gills and mouth widely open, color darkening and loss of body mucus. The higher concentrations produced obvious signs and symptoms of general intoxication.

Serum biochemical modifications

The serum biochemical components were analyzed in fish exposed to the sub-lethal concentrations of 30% and 45% of the 48 hours - DL₅₀ (0.265ppm). With the concentration of 0.08ppm it was observed a significantly increase in the values of K⁺, Mg⁺⁺ and P as well as creatinine, urea (after 4 and 8 days), glucose (after 2 and 8 days) and cholesterol. Total proteins and triglycerides were reduced. From the enzymes measured, GOT (after 4 and 8 days), alkaline phosphatase (after 2 and 8 days) and Lactate dehydrogenase (after 4 and 8 days) have higher values (Table 3) The concentration of 0.12ppm produced an elevation of Na⁺ (after 4 and 8 days), Mg⁺⁺ and P levels. Also creatinine, glucose and cholesterol were increased. Triglycerides were reduced. The ALP and AST (after 4 and 8 days) were also reduced. The alkaline phosphatase increased (Table 4). The haematological values remained normal except in case of hemoglobin and MCHC that increased with 0.08 and 0.12 ppm (after 4 and 8 days) (Table 5).

Discussion

The results reported in the present study allow us to draw the following conclusions: The DL₅₀ for 24, 48, 72 and 96 h at 25⁰C for the jundiá *Rhamdia quelen* were 0.295, 0.265, 0.198 and 0.193 ppm respectively. The biochemical signs of intoxication preceded the first signs of behavioral distress produced by cypermethrin.

The exposure of jundiá for 2, 4 or 8 days to cypermethrin at a concentration of 30% DL₅₀ (0.08ppm) did not produce obvious signs of distress in the fish, their appearance

and movements were normal. The haematological parameters were also unaltered with the exception of hemoglobin and MCHC after 4 and 8 days. The earlier sign of cypermethrin toxicity was observed in serum biochemical values: K^+ , Mg^{++} , P, urea, glucose, cholesterol, creatinine, AST, alkaline phosphatase and LDH were significantly increased while total proteins and triglycerides were reduced.

The toxicity of cypermethrin varies depending on the fish species. In guppies *Poecilia reticulata*, Polat et al., 2002 reported a 48h LC_{50} value of $21.4\mu g.l^{-1}$. The 96 h LC_{50} values for *Lebistes reticulatus* (guppies) was found to be $21.3\mu g.l^{-1}$ (Çaliskan et al., 2003). In *Labeo rohita* Das and Mukherjee (2003) found a 96h LC_{50} of 0.139ppm, close to the values observed for jundiá (96h LC_{50} 0.183 ppm). The values of LC_{50} for jundiá were relatively elevated which may indicate some form of tolerance of the *Rhamdia quelen* to cypermethrin.

The first behavioral signs produced by cypermethrin appear at the concentration of 0.12 ppm and they have respiratory characteristics: the gills and mouth remain open. At this concentration the fish have color darkening and reduction of body mucus. The metabolic alterations produced by the toxic are probably aggravated by the gills lesions produced by cypermethrin. Çaliskan et al. (2003) reported that the most common changes produced by zeta-cypermethrin are the lifting of the epithelial layer from gill lamellae and some necrosis. They also found exudation and hyperplasia. These severe damages of the gills affect the gas-exchange capabilities of the fish producing hypoxia and respiratory failure.

As in the case of 0.08 ppm concentration the biochemical values of serum for Na^+ , Mg^{2+} , P, urea, glucose, cholesterol, creatinine and alkaline phosphatase were higher than normal but triglycerides, ALP and ASP were lower.

The serum biochemical changes produced by the cypermethrin (increase in glucose, urea, creatinine, cholesterol; diminution of protein and triglycerides) are probably reflecting the lesions produced by the pyrethroid in the kidney, liver and muscle, (Das and Mukherjee, 2003) worsened by the stress produced by the toxic with the consequent elevation of cortisol values (Barcellos et al., 2001). These modifications allows us to calculate metabolic coefficients which could help in the early detection of the intoxication of the fish and could be useful as indicators or biomarkers of cypermethrin contamination in the shoal.

coefficient	Control	Cypermethrin (0.08ppm)	Cypermethrin (0.12ppmpm)
Glucose(mg.dl ⁻¹)/protein(g.dl ⁻¹)	14.6	22.5	22.6
cholesterol/triglycerides(mg.dl ⁻¹)	0.42	1.26 - 1.46	1.19 – 1.97

In our experiments the haematological parameters were not altered with the different concentrations and periods of exposure used, except for the hemoglobin content and MCHC after 4 and 8 days of treatment. Similar values were obtained by Svobodová et al., 2003 using Deltamethrin in the *Cyprinus carpio*. Some others reports on the effect of cypermethrin in haematological values appear contradictory; Atamanalp et al. 2002 found an increase in RBC on the rainbow trout; Saxena and Seth (2002) observed a decrease of RBC in the *Channa Punctatus*, Das and Mukherjee (2003), using *Labeo rohita*, found a reduction of the percentage of Hb without changes in RBC and an increase in the total

leukocyte counts. The different concentrations, periods of exposure and species make difficult to establish a solid, valid and comparative evaluation of the pyrethroids effects on fish haematological parameters.

The jundiá exposed to cypermethrin showed higher values than controls of glucose, urea, creatinine and cholesterol and lower than controls values of protein. Similar results were obtained in other fish by different authors. In *Labeo rohita* (Philip et al., 1995) it was observed that cypermethrin increases glyceamic values. Deltamethrin produced in the *Cyprinus carpio* hyperglycemic values (Szegletes et al., 1995) and hypoproteinemia (David et al., 2004). Also, Das and Mukherjee (2003) found a decrease in protein content after treatment with cypermethrin. Ceron (1997) reported a significant glucose increase in common eel following a 96 h treatment with diazinon. It, seems that glucose increase is a general response of fish to pollutant effect (Svobodová, 1971; Srivastava, 1981, Sancho et al., 1997), probably as a sign of stress with the consequent increase in cortisol levels. In agreement with our results, Reddy et al. (1991) reported elevated levels of cholesterol in *Tilapia mossambica*.

The modifications of enzyme activity after cypermethrin intoxications varies with the different concentrations and fish considered. In *Cyprinus carpio* the levels of ALP or GPT and AST or GOT were elevated (David et al., 2004). In jundiá the levels of ALP were not altered. AST was increased or remained unchanged with cypermethrin.

The levels of lactate dehydrogenase were increased by cypermethrin according Philip et al., 1995, Das and Mukherjee 2003, Ceron et al., 1997 and Sancho et al., 1997. In jundiá this enzyme activity did not change or had an increase. The increase of LDH activity may indicate the activation of the glycolitic process with anaerobic metabolism

(Szegletes, 1995). Sivakumari et al. (1997) studying the cypermethrin toxicity in *Cyprinus carpio* suggest that changes of dehydrogenase activity in pesticide treated fish may be due to severe cellular damage leading to the release of enzymes and impaired carbohydrate and protein metabolism.

Cypermethrin produced in jundiá a significantly elevation of the alkaline phosphatase in almost all periods of exposure and concentrations used.

In conclusion, the results found in the present study show that biochemical analysis of serum can be useful for fish breeders to detect incipient cypermethrin intoxication of the shoal.

Acknowledgements

The present work was supported by FAPERGS (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul), CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa) and PROPESQ-UFRGS (Pró-Reitoria de Pesquisa, Universidade Federal do Rio Grande do Sul). AB is a PhD student supported by CNPq. DRS, DFJ, RZ and FA are students and hold a IC fellowship. The authors are indebted to Bioensaios Ltda, Viamão, RS, Brazil for technical help and to Elsa Pires for maintenance of the best laboratory conditions and generous help with fish.

References

- Atamanalp, M., Yanik, T., Haliloglu, H.İ. and Sitki, A.M. 2002. Alterations in the haematological parameters of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, exposed to cypermethrin. *The Israeli Journal of Aquaculture*. 54(3):99-103.
- Barcellos, L.J.G., Woehl, V.M., Wassermann, G.F., Quevedo, R.M., Itzész, I. and Krieger, M.H. 2001. Plasma levels of cortisol and glucose in response to capture and tank transference in *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard), a South American catfish. *Aquaculture research*. 32, 121-123.
- Borges, A., Scotti, L.V., Siqueira, D.R., Jurinitz, D.F. and Wassermann, G.F. 2004. Hematologic and serum biochemical values for jundiá (*Rhamdia quelen*). *Fish Physiology and Biochemistry*. 00:00-00.
- Bradbury, SP and Coast, JR. 1989a. Comparative toxicology of the pyrethroid insecticides. *Environmental Contamination and Toxicology*. 108: 134-177.

- Bradbury, SP and Coast, JR. 1989b. Toxicokinetics and toxicodynamics of pyrethroid insecticides in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 8: 373-380.
- Çaliskan, M.; Erkmen, B. and Yerli, S.V. 2003. The effects of zeta cypermethrin on the gills of common guppy *Lebistes reticulatus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology.* 14:117-120.
- Ceron, J.J., Sancho, E., Ferrando, M.D., Gutierrez, C. and Andreu, E. 1997. Changes in carbohydrate metabolism in the eel *Anguilla anguilla*, during short-term exposure to diazinon. *Toxicol. Environ. Chem.* 60:201-210.
- Das, B. K. and Mukherjee, S.C. 2003. Toxicity of cypermethrin in *Labeo rohita* fingerlings: biochemical, enzymatic and haematological consequences. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C.* 134: 109-121.
- David, M., Mushigeri, S.B., Shivakumar, R. and Philip, G.H. 2004. Response of *Cyprinus carpio* (Linn) to sublethal concentration of cypermethrin: alterations in protein metabolic profiles. *56:347-352.*
- Dorman, D.C. and Beasley, V.R. 1991. Neurotoxicology of pyrethrin and the pyrethroid insecticides. *Veter. Human Toxicol.* 33; 238-243.
- Edwards, R.; Millburn, P. and Hudson, H.D. 1986. Comparative toxicity of *cis*-cypermethrin in rainbow trout, frog, mouse and quail. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 84: 512-522.
- Gomes, L.C., Golombieski, J.I., Gomes, A.R.C. and Baldisserotto, B. 2000. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). *Revisão Bibliográfica. Ciência Rural, Santa Maria, v. 30: 179-185.*
- Greenberg, A.E.; Trussell, R.R. and Clesceri, L.S. 1985. Standard methods for the examination of water. APHA, AWWA, WPCF, Washington, 1269p.

- Haya, K. 1989. Toxicity of pyrethroid insecticides to fish. *Environ. Toxicol. chem.* 8: 381-391.
- Hayes, AW. 1994. Principles and methods of toxicology. Raven Press, New York, 1468p.
- Lermen CL, Lappe R, Crestani M, Vieira VP, Gioda CR, Schetinger MRC, Baldisserotto B, Moraes G, Morsch VM. 2004. Effect of different temperature regimes on metabolic and blood parameters of silver catfish *Rhamdia quelen*. *Aquaculture*. 239(1-4): 497-507.
- Litchfield JT and Wilcoxon FWJ. 1949. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 96:99-113.
- Philip, G.H., Reddy, P.M. and Sridevi, G. 1995. Cypermethrin-induced *in vivo* alterations in the carbohydrate metabolism of freshwater fish, *Labeo rohita*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 31:173-178.
- Reddy, A.T.V., Ayyana, K. and Yellamma, K. 1991. Cypermethrin induced modulations in lipid metabolism of freshwater teleost *Tilapia mossambica*. *Biochem. Internat.* 23(5): 963-967.
- Reddy, P.M. and Philip, G.H. 1994. In vivo inhibition of AChE and ATPase activities in the tissues of freshwater fish, *Cyprinus carpio* exposed to technical grade cypermethrin. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 52: 619-626.
- Sancho, E., Ferrando, M.D. and Andreu, E. 1997. Sublethal effects of an organophosphate insecticide on the European eel, *Anguilla anguilla*. *Ecotoxicology Environmental Safety*. 36: 57-65.
- Saxena, K. K. and Seth, N. 2002. Toxic effects of cypermethrin on certain haematological aspects of fresh water fish *Channa punctatus*. *Environmental Contamination and Toxicology*. 69: 364-369.

- Sivakumari, K., Manavalaramanujam, R., Ramesh, M. and Lakshmi, R. 1997. Cypermethrin toxicity; sublethal effects on enzyme activities in a fresh water fish, *Cyprinus carpio* var. *communis*. J. Environ. Biol. 18:121-125.
- Srivastav, A.K. 1981. Effects of acute exposure of methylparathion on carbohydrate metabolism of Indian catfish (*Heteropneustes fossilis*). Acta Pharmacol. Toxicol. 48:26-34.
- Svobodová, Z. 1971. Some haematological and metabolic changes in fish occurring after pesticide intoxication. Bulletin VÚR Vodňany. 7:29-36.
- Svobodová, Z., Lusková, V., Drastichová, J., Svoboda, M. and Žlábek, V. 2003. Effect of deltamethrin on haematological indices of common carp (*Cyprinus carpio* L.). Acta Vet. Brno. 72: 79-85.
- Szegletes, T., Polyhos, C.S., Bálint, T., Rady, A.A., Láng, G., Kufcsák, O. and Nemcsók, J. 1995. *In vivo* effects of deltamethrin on some biochemical parameters of carp (*Cyprinus carpio* L.) Environmental Monitoring and Assessment. 35:97-111.
- Viran, R., Erkoç, F. Ü., Polat, H. and Koçak, O. 2003. Investigation of acute toxicity of deltamethrin on guppies *Poecilia reticulata*. Ecotoxicology and Environmental Safety. 55:82-85.

Legend of the Figure:

Figure 1

Cumulative death during the period of 24, 48, 72 and 96 hours of jundiá following exposed to different cypermethrin concentration

Table 1. Physical and chemical parameters of water quality

Parameter	Value
Temperature (°C)	22.7
Total alkalinity (mg.l ⁻¹)	79.7
Total hardness (mg.l ⁻¹)	85.3
Dissolved oxygen (mg.l ⁻¹)	7.0
PH	7.2
NH ₃ un-ionized (mg.l ⁻¹)	0.008
NO ₂ - N (mg.l ⁻¹)	0.2
NO ₃ - N (mg.l ⁻¹)	4.2
Chloride (mg.l ⁻¹)	33.8

Table 2. Toxicity of cypermethrin to jundiá *Rhamdia quelen* (in ppm) calculated with the concentrations 0.10, 0.12, 0.16, 0.20, 0.24, 0.32 and 0.36 ppm

Time (h)	LC ₅₀ (ppm)	95% Confidence limits		LC ₁₆	LC ₈₄
		upper	lower		
24	0.298	0.345	0.257	0.153	0.578
48	0.265	0.312	0.224	0.123	0.569
72	0.196	0.219	0.176	0.121	0.318
96	0.193	0.214	0.174	0.121	0.308
		24 h	48 h	72 h	96 h
Inclination		-0.290	-0.335	-0.212	-0.204
Intercept of axis		-0.526	-0.577	-0.708	-0.714
Correlation coefficient		0.879	0.979	0.993	0.990
Slope inclination		0.070	0.031	0.011	0.013
Slope intercept		0.061	0.021	0.010	0.012

Table 3. Biochemical values of blood serum – normal and after cypermethrin 0.08 ppm.
Values are mean \pm SEM

	Parameter	control	After 2 days n=7	After 4 days n=7	After 8 days n=8
Electrolytes n = 33	Chloride (mEq.l ⁻¹)	122.2 \pm 0.8	118.1 \pm 1.1	121.1 \pm 2.7	117.8 \pm 1.1
	Sodium (mEq.l ⁻¹)	139.5 \pm 0.5	139.8 \pm 1.1	146.4 \pm 1.8*	141.0 \pm 0.8
	Potassium (mEq.l ⁻¹)	2.3 \pm 0.1	3.8 \pm 0.3*	3.9 \pm 0.2*	4.3 \pm 0.2*
	Total Calcium (mg.dl ⁻¹)	14.7 \pm 0.4	15.7 \pm 0.8	14.0 \pm 0.5	15.3 \pm 0.7
	Magnesium (mg.dl ⁻¹)	3.4 \pm 0.1	4.1 \pm 0.1*	4.4 \pm 0.1*	3.8 \pm 0.1***
	Phosphorus (mg.dl ⁻¹)	9.6 \pm 0.4	12.4 \pm 0.9*	14.6 \pm 0.8*	13.1 \pm 0.6*
Metabolites n = 31	Creatinine (mg.dl ⁻¹)	0.12 \pm 0.005			0.18 \pm 0.012*
	Urea (mg.dl ⁻¹)	5.3 \pm 0.4	4.8 \pm 0.5	8.1 \pm 0.7*	8.6 \pm 0.8*
	Glucose (mg.dl ⁻¹)	62.9 \pm 3.2	81.1 \pm 5.4**	68.8 \pm 2.6	90.6 \pm 8.5*
	Total protein (g.dl ⁻¹)	4.3 \pm 0.1	3.6 \pm 0.09*	3.2 \pm 0.2*	3.4 \pm 0.1*
	Triglycerides (mg.dl ⁻¹)	402.4 \pm 38.2	208.0 \pm 30.3*	162.4 \pm 14.1*	177.5 \pm 14.8*
	Total cholesterol (mg.dl ⁻¹)	170.4 \pm 7.7	263.0 \pm 31.5*	224.0 \pm 5**	259.0 \pm 18.0**
Enzymes n = 53	Alanine aminotransferase (ALP or GPT)(U.l ⁻¹)	35.2 \pm 1.8	17.1 \pm 3.1*	39.4 \pm 1.6	37.1 \pm 4.1
	Aspartate aminotransferase (AST or GOT) (U.l ⁻¹)	116.9 \pm 6.3	95.0 \pm 11.2	188.0 \pm 15.3*	172.8 \pm 22.6*
	Alkaline phosphatase (U.l ⁻¹)	98.8 \pm 4.4	157.7 \pm 23.8*	111.0 \pm 12.8	155.6 \pm 22.9*
	Lactate dehydrogenase (U.l ⁻¹)	1033.9 \pm 70.7	945.3 \pm 132.7	1534.6 \pm 145.6**	1360.2 \pm 158.2**

*** = p< 0.05 (t test one tail p value)

** = p< 0.05 (t test two-tail p value)

* = p<0.05 (one-way ANOVA with Bonferroni and Tukey-Kramer multiple comparisons post tests)

Table 4. Biochemical values of blood serum – normal and after cypermethrin 0.12ppm. Values are mean \pm SEM

Parameter	control	After 2 days	After 4 days	After 8 days	
		n=6	N=8	n=8	
Electrolytes n = 33	Chloride (mEq.l ⁻¹)	122.2 \pm 0.8	121.5 \pm 1.2	119.4 \pm 1.0	124.5 \pm 0.8
	Sodium (mEq.l ⁻¹)	139.5 \pm 0.5	140.1 \pm 1.6	146.1 \pm 0.9 *	149.0 \pm 0.7 *
	Potassium (mEq.l ⁻¹)	2.3 \pm 0.1	3.0 \pm 0.3 **	2.9 \pm 0.3 **	2.3 \pm 0.3
	Total Calcium (mg.dl ⁻¹)	14.7 \pm 0.4	16.3 \pm 1.3	16.2 \pm 0.5	13.8 \pm 0.5
	Magnesium (mg.dl ⁻¹)	3.4 \pm 0.1	4.3 \pm 0.3 *	4.3 \pm 0.12 *	3.7 \pm 0.1
	Phosphorus (mg.dl ⁻¹)	9.6 \pm 0.4	12.9 \pm 1.0 *	13.8 \pm 0.9 *	13.5 \pm 0.9 *
Metabolites n = 31	Creatinine (mg.dl ⁻¹)	0.12 \pm 0.005			0.22 \pm 0.016 *
	Urea (mg.dl ⁻¹)	5.3 \pm 0.4	5.8 \pm 0.7	5.1 \pm 0.51	9.3 \pm 0.5 *
	Glucose (mg.dl ⁻¹)	62.9 \pm 3.2	87 \pm 10.5 **	116.7 \pm 16.7 *	91.4 \pm 9.3 **
	Total protein (g.dl ⁻¹)	4.3 \pm 0.1	3.9 \pm 0.14	4.3 \pm 0.07	4.2 \pm 0.09
	Triglycerides (mg.dl ⁻¹)	402.4 \pm 38.2	166.3 \pm 9.0 *	194.0 \pm 16.1 **	125.6 \pm 9.7 *
	Total cholesterol (mg.dl ⁻¹)	170.4 \pm 7.7	240.1 \pm 22.0 *	230.5 \pm 25.2 *	246.5 \pm 21.8 *
Enzymes n = 53	Alanine aminotransferase (ALP or GPT)(U.l ⁻¹)	35.2 \pm 1.8	19.5 \pm 2.8 *	16.1 \pm 1.6 *	13.5 \pm 1.1 *
	Aspartate aminotransferase (AST or GOT) (U.l ⁻¹)	116.9 \pm 6.3	123.6 \pm 10.2	80.4 \pm 6.07 **	90.8 \pm 6.4 **
	Alkaline phosphatase (U.l ⁻¹)	98.8 \pm 4.4	172.1 \pm 16.7 *	136.1 \pm 15.4 *	151.8 \pm 14.5 *
	Lactate dehydrogenase (U.l ⁻¹)	1033.9 \pm 70.7	1367.8 \pm 192.95	911.5 \pm 106.3	1040.1 \pm 181.4

* * * = p < 0.05 (t test one tail p value)

* * = p < 0.05 (t test two-tail p value)

* = p < 0.05 (one-way ANOVA with Bonferroni and Tukey-Kramer multiple comparisons post tests)

Table 5. Haematological values of blood plasma – normal and after cypermethrin 0.08, 0.10 and 0.12 ppm. Values are mean \pm SEM

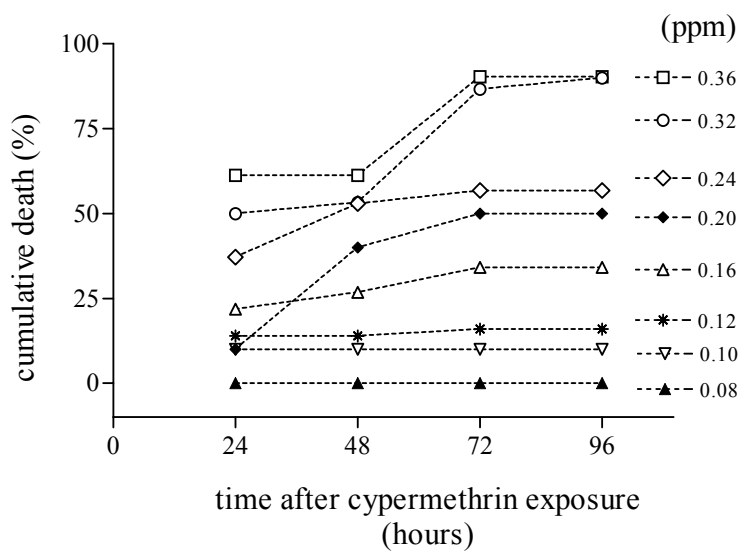
Parameter	Control n=47	cypermethrin 0.08ppm			Cypermethrin 0.10ppm	Cypermethrin 0.12ppm
		After 2 days n=5	After 4 days n=5	After 8 days n=8	After 4 days n=8	After 8 days n=8
Eritrocytes ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	3.7 \pm 0.1	3.5 \pm 0.2	3.4 \pm 0.3	3.7 \pm 0.2	3.7 \pm 0.2	3.9 \pm 0.3
Hemoglobin (g%)	8.9 \pm 0.1	9.1 \pm 0.5	9.7 \pm 0.6 **	10.2 \pm 0.4 *	9.3 \pm 0.4	9.9 \pm 0.3 *
Hematocrit (%)	42.2 \pm 1.0	39.8 \pm 1.4	39.8 \pm 1.1	39.9 \pm 1.6	42.5 \pm 1.7	36.4 \pm 1.4
MCHC (g.dL ⁻¹)	21.6 \pm 0.5	23.1 \pm 1.6	24.4 \pm 0.9 ***	25.8 \pm 0.9 *	22.0 \pm 0.3	27.4 \pm 0.5 *
MCV (fL)	119.4 \pm 5.7	116.4 \pm 10.9	120.4 \pm 9.4	109.7 \pm 5.7	114.5 \pm 4.1	94.6 \pm 5.3
MCH (pg)	24.9 \pm 0.9	26.8 \pm 2.8	29.0 \pm 1.2	28.0 \pm 0.8	25.2 \pm 0.9	26.0 \pm 1.6
Total leukocytes ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	115.2 \pm 11.7	167.0 \pm 42.0	125.2 \pm 35.5	111.8 \pm 23.7	_____	131.6 \pm 9.6

* * * = p < 0.05 (t test one tail p value)

* * = p < 0.05 (t test two-tail p value)

* = p < 0.05 (one-way ANOVA with Bonferroni and Tukey-Kramer multiple comparisons post tests)

Fig.1



8. DISCUSSÃO GERAL

Os resultados obtidos com o jundiá possibilitam o uso deste peixe como animal experimental, por ser de baixo custo, fácil manuseio e necessitar de infra-estrutura relativamente simples, com pouco espaço e equipamento para a manutenção. Pode ser utilizado em aulas práticas em análises comparativas bioquímicas, fisiológicas e morfológicas, entre outras. Esses estudos aumentarão o conhecimento das especificidades deste animal nativo, permitindo melhores condições de cultivo e estratégias de produção.

Segundo Proença & Bittencourt (1994) entre os critérios de seleção para uma espécie ser considerada adequada para o cultivo se destacam as seguintes características: apresentar bom crescimento em condições de cativeiro, ser resistente ao manejo, aceitar alimento não-vivo, de preferência ração peletizada, não apresentar canibalismo inter ou intra-específico e ter boa aceitação no mercado. O jundiá parece possuir todas essas características e ser um forte candidato para a produção em larga escala através de viveiros naturais ou artificiais.

A inserção do jundiá nos sistemas de aquicultura preserva a espécie com suas características, se torna uma fonte de renda e um meio de difundir o peixe para mais consumidores. O jundiá pode ser utilizado para o consumo humano, a pesca esportiva, o povoamento e o repovoamento de áreas.

Soluções criativas de cultivos em áreas relativamente pequenas com altos índices de produtividade, transformando alimentos de pouco valor nutritivo ou subprodutos da agricultura e pecuária em proteínas de alta qualidade, podem melhorar o padrão alimentar das pessoas. Além disso, a população interiorana passa a dispor de pescado

fresco e a baixo custo, já que os de origem marinha quando obtidos já contam com o acréscimo das despesas relativas ao transporte e aos cuidados com a refrigeração.

O Brasil com seu imenso estoque de águas interiores tem uma posição de grande destaque para o desenvolvimento piscícola. Suas condições climáticas favorecem o implemento do cultivo de peixes de água doce, podendo ser melhores aproveitados os recursos hídricos existentes e mais valorizadas as áreas até então improdutivas.

Para o cultivo do jundiá é fundamental que se tenha um controle rígido sobre a qualidade da água a ser utilizada. Devem ser observadas a temperatura, o pH, a alcalinidade, a dureza, a presença de substâncias tóxicas, entre outras variáveis. A má qualidade leva os peixes a ficarem estressados, tornando-os sensíveis às enfermidades em geral. O estresse afeta a homeostase dos peixes, com conseqüente alteração do seu sistema imunológico, diminuindo a capacidade desses animais de reagir a patógenos (Pavanelli *et al.*, 1998). No regime de confinamento os peixes são submetidos ao estresse crônico pelo manuseio diário dos tanques, pela degradação da qualidade da água e pelos produtos de secreção.

As grandes concentrações de animais constituem um fator a mais para o aparecimento de doenças. Isso é particularmente importante na piscicultura em que a concentração de peixes é elevada por unidade de área, fazendo com que, quando existente algum tipo de enfermidade senão combatida a tempo, toda a população de peixes seja colocada em risco.

As enfermidades dos peixes podem ser causadas por agentes infecciosos ou não. Os infecciosos são, principalmente, bactérias, fungos, vírus e parasitas. Os não infecciosos são a má-qualidade da água e as deficiências nutricionais (Proença & Bittencourt, 1994).

Assim, com a expansão da aquicultura, ou seja, com o aumento da concentração de jundiá, os produtores destes peixes precisarão contar com ferramentas importantes para diagnosticar as condições sanitárias e as possíveis enfermidades que podem influenciar a sua produção.

Segundo Hrubec *et al.* (2000) as análises sanguíneas periódicas podem aumentar a produção de pescado por facilitar a detecção precoce de doenças infecciosas e a identificação das condições subletais que afetam o desenvolvimento dos animais. Isto contribuiria para o tratamento das doenças de modo mais específico, efetivo e no momento adequado.

Como a normalidade dos valores dos parâmetros sanguíneos demonstra o equilíbrio interno dos indivíduos, a padronização dos valores sanguíneos normais para o jundiá foi uma das prioridades neste estudo. Esses dados foram obtidos de uma população de peixes sob as mesmas condições.

Para outras espécies de peixes, como a truta arco-íris (Wedemeyer & Nelson, 1975), o “striped bass” (Tisa & Strange, 1983), “milkfish” (Bhaskar & Rao, 1989) e “catfish” (Warner & Williams, 1977) diferentes intervalos de referências dos parâmetros bioquímicos já foram determinados. Esses intervalos de referência são usados para determinar se o valor de um parâmetro para um indivíduo de uma população definida está acima ou abaixo do que é encontrado numa população. Este intervalo deve ser amplo o bastante para acomodar as diferenças nos valores das flutuações diárias nas condições ambientais, e ainda estreito o suficiente para detectar mudanças associadas aos distúrbios metabólicos e doenças (Hrubec *et al.*, 1996b). Para o diagnóstico clínico, a média das amostras nunca seria usada.

A relevância do diagnóstico dos parâmetros já está estabelecida para os mamíferos. Se forem documentadas correlações dos parâmetros com as respostas patológicas nas diferentes espécies de peixes, grande parte do trabalho realizado em mamíferos poderá ser aproveitado (Hrubec *et al.*, 1996a).

Os valores normais dos parâmetros bioquímicos e hematológicos obtidos no jundiá são importantes para o controle sanitário e identificação de fatores externos que podem modificar as propriedades da água. Outras análises que considerem padrões sanguíneos de peixes provenientes de diferentes condições de cultura, assim como de outros métodos de coleta sanguínea (punção cardíaca e canulação) deverão posteriormente ser verificados.

Os parâmetros medidos neste estudo foram escolhidos por duas razões. Primeiro, os parâmetros podem ser facilmente medidos em laboratórios de grandes centros, como em pequenas localidades do país, não sendo necessários equipamentos sofisticados para as análises. Segundo, os parâmetros são medidos usando equipamentos automatizados e padronizados, que reduzem a variação dos resultados. Os analisadores automatizados são utilizados em amostras humanas, mas podem ser adaptados para o uso em outros animais (Hrubec *et al.*, 1996).

Para o fortalecimento seguro da aquíicultura é necessário o acompanhamento dos impactos ambientais que podem ser ocasionados por produtos metabólitos contidos nas fezes, urina dos peixes, hormônios e medicações, os quais são aplicados nos peixes e/ou diretamente no meio aquático.

Em muitas situações os ecossistemas aquáticos estão integrados com áreas para plantio, uma relação de proximidade que facilita a irrigação e a drenagem, dependendo da

época e da quantidade de chuvas. Entretanto, se as atividades agrícolas se situarem às margens de açudes e fizerem uso de pesticidas, estes podem ser carregados pelas chuvas, alcançar os reservatórios de águas, aumentar a contaminação e a degradação do ambiente, provocando efeitos adversos na saúde dos peixes, observados na forma de sinais clínicos, morbidade e mortalidade (Swarup & Patra, 2005).

Quando os peixes se tornam doentes por ação de fatores externos, como pela presença de pesticidas, os sinais clínicos mais comuns são o escurecimento da pele, a natação anormal, a letargia ou atividade exacerbada, a permanência excessiva na superfície ou junto às margens, manchas brancas ou cinzentas e alterações do muco, entre outras características (Proença & Bittencourt, 1994).

A cipermetrina, um piretróide amplamente utilizado como pesticida terrestre e aquático atua sobre o funcionamento do sistema nervoso central através dos canais iônicos nas células nervosas, provocando hiperatividade e subsequente falta de controle das funções normais (Wijngaarden *et al.*, 2004).

Em nossas observações com a dose menor de cipermetrina (0,08 ppm), embora já se verificassem alterações bioquímicas, nenhuma mudança comportamental pode ser estabelecida. Os primeiros sinais clínicos que o jundiá começou a manifestar após a exposição à cipermetrina nos testes de toxicidade aguda foi com a dose de 0,12 ppm, quando puderam ser visualizadas a presença das brânquias abertas, movimentos em círculos na superfície da água, alterações na coloração dos corpos e redução do muco de revestimento. Isto demonstra que os sinais comportamentais seguem as mudanças nos parâmetros sanguíneos, logo, embora as doses do piretróide sejam consideradas baixas para efeito de toxicidade, as mesmas podem estar alterando o equilíbrio interno do peixe.

Embora a cipermetrina seja muito utilizada no controle das pestes, para a sua aplicação é necessário um monitoramento adequado devida à toxicidade que a mesma pode exercer sobre os diferentes animais. Entre os peixes em que foi detectada a toxicidade aguda da cipermetrina o jundiá foi o que precisou de uma concentração maior para causar a mesma taxa de mortalidade, o que demonstra que o jundiá, em relação a presença deste piretróide no ecossistema aquático, parece ser mais resistente que outros peixes descritos na literatura.

Estudos anteriores já mostraram que os fatores ambientais podem influenciar os valores sanguíneos (McDonald & Milligan, 1992; Bhaskar & Rao, 1989). Os resultados encontrados neste trabalho permitiram a detecção de alterações nos parâmetros sanguíneos com a exposição à cipermetrina antes mesmo que os animais começassem a apresentar sintomas e sinais externos de patologia. Isto deve ser levado em conta pelos produtores de peixes em sistemas de aquicultura e de pesquisadores em seus procedimentos experimentais, uma vez que mesmo sem alterações externas visíveis, a saúde do peixe pode estar gravemente afetada.

Além da padronização dos valores sanguíneos do jundiá e do efeito do disruptor ambiental cipermetrina sobre esses valores, um outro ponto analisado foram as características físico-químicas do sêmen deste peixe.

Os resultados obtidos com o sêmen do jundiá são importantes para produtores nos sistemas de aquicultura e servem como subsídio para a pesquisa, principalmente em análises dos aspectos reprodutivos do peixe. Como a piscicultura do jundiá está em ascensão, há uma necessidade de informações que facilitem os procedimentos visando a

reprodução artificial, a preservação dos genes característicos da espécie e o povoamento/repovoamento da ictiofauna em ecossistemas alterados.

Os machos do jundiá iniciam o processo de maturação gonadal com 13,4 cm e a partir de 16,5 cm todos os exemplares machos estão potencialmente aptos para a reprodução (Narahara *et al.* 1985). Para os machos maduros uma pequena pressão sobre o abdômen próximo do orifício sexual ocasiona a saída do sêmen, com o aspecto branco e cremoso. Quando os machos estão fora das estações de desova a quantidade de sêmen expelida é reduzida e expulsa sob forte pressão e, algumas vezes, mesclada com sangue. O período de maior liberação dos espermatozóides do jundiá foi de setembro a março, aproximadamente o mesmo período (outubro a abril) relatado por Büyükhatipoglu & Holtz (1984) e Munkittrick & Moccia (1987) no *Salmo gairdneri*.

Na natureza, o sêmen é liberado muito próximo aos ovos, e os espermatozóides alcançam estes dentro de segundos (Perchec *et al.*, 1996). Nas condições experimentais do laboratório, após a coleta do sêmen os espermatozóides conservam a capacidade de movimento vigoroso e progressivo após diluição até 2 horas de armazenamento na temperatura ambiente (24⁰C). Essa observação pode ser útil quando o sêmen tiver que ser coletado distante de onde será manuseado, por que a mobilidade dos espermatozóides, indicadora da qualidade espermática e fundamental para o sucesso da fertilização, se mantém inalterada neste período de armazenamento do sêmen.

Através da determinação do volume de sêmen, espermátocrito, concentração e mobilidade dos espermatozóides, se verificou um padrão específico de mobilidade para as células espermáticas do jundiá e a existência de uma flutuação no decorrer do ano nas variáveis analisadas.

A mobilidade dos espermatozóides foi ativada pela diminuição da osmolalidade do meio, visto pela diluição das células espermáticas na água. Os espermatozóides do jundiá apresentaram movimento progressivo e vigoroso por pelo menos 20 segundos após a ativação na água e nas soluções testadas. Aproximadamente 1 minuto após a diluição na água todos espermatozóides já estavam imóveis. Perchec *et al.* (1995) observou 30 segundos de duração da mobilidade nos espermatozóides da carpa *Cyprinus carpio* e sugeriu que esse curto tempo é devido principalmente à supressão metabólica, devido a falta de reservas energéticas. A entrada de água nas células afeta a mobilidade por diluição do meio citoplasmático e por alteração mecânica da célula espermática.

O alto percentual de espermatozóides com movimento progressivo e vigoroso tem sido usado como um parâmetro para a avaliação da qualidade do sêmen (Sansone *et al.*, 2001). E este alto percentual de espermatozóides com esse tipo de movimento está diretamente relacionado com a capacidade de inseminação de uma amostra de sêmen (Dreanno *et al.*, 1998; Wang & Crim, 1999), assim como um percentual baixo de mobilidade é um indicativo de possível dano celular (Lahsteiner *et al.*, 1996; Yao *et al.*, 2000).

Além disso, foi visto que as características da mobilidade espermática do jundiá após a diluição em soluções de diferentes pHs não foram significativamente diferentes da mobilidade observada na água. Alavi & Cosson (2005) também verificaram que o ph do meio de nado dos espermatozóides tem pouca influência nos parâmetros de mobilidade em ciprinídeos, salmonídeos e esturjões.

O espermatócrito e a contagem espermática estiveram correlacionados um ao outro no período analisado. A relação observada entre esses dois parâmetros permite o uso do espermatócrito como método para estimar a densidade espermática no jundiá por necessitar de menor tempo para a avaliação. Embora o resultado não seja expresso em número de espermatozóides, a estimativa é segura e é mais fácil de ser utilizada sob condições práticas.

A composição do fluido seminal foi verificada através dos valores dos eletrólitos, metabólitos e enzimas. Esses parâmetros seminais normais refletem as condições de armazenamento dos espermatozóides, protegem a capacidade fertilizante, mobilidade, metabolismo e as fontes energéticas necessárias para a ativação espermática no momento adequado (Ciereszko *et al.*, 2000).

9. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos com o jundiá *Rhamdia quelen* permitem as seguintes conclusões:

9.1 Conclusões gerais

O jundiá mostrou ser um animal de fácil manuseio para as condições experimentais trabalhadas. É uma espécie nativa, com poucos estudos de seus aspectos fisiológicos já realizados. Como se adapta às condições climáticas do Rio Grande do Sul e tem boa aceitabilidade pela população, este peixe é indicado para a produção em larga escala em sistemas de aquicultura.

A obtenção dos valores sanguíneos normais permite o controle da saúde dos animais, como a detecção de doenças e o tratamento mais específico de patologias. A presença de disruptores ambientais, como a cipermetrina, modificou a composição bioquímica sanguínea e muito pouco da hematologia destes peixes durante o período analisado. A análise bioquímica do soro pode ser útil para criadores de peixes detectarem precocemente a intoxicação de cipermetrina em cardumes.

A qualidade espermática do jundiá, como o seu padrão de mobilidade, as variações anuais no volume de sêmen, espermatócrito, concentração espermática e o conhecimento da bioquímica do fluido seminal informam produtores das características específicas deste peixe possibilitando estratégias reprodutivas. Essas informações também otimizam o processo de seleção de machos doadores de alta qualidade para operações na aquicultura.

9.2 Conclusões específicas

Análise sanguínea

- a. Os parâmetros bioquímicos e hematológicos investigados poderiam ser utilizados no monitoramento das condições sanitárias de jundiá cultivado em açude.
- b. Dos valores hematológicos determinados para o jundiá os linfócitos pequenos foram os leucócitos mais abundantes, seguido pelos monócitos e neutrófilos. Nas amostras analisadas nenhum eosinófilo e basófilo foi encontrado.

Efeito da cipermetrina

- a. A CL_{50} da cipermetrina para o jundiá *Rhamdia quelen* após 24, 48, 72, 96 horas a 25⁰C foram 0,295, 0,265, 0,198 e 0,193 ppm, respectivamente.
- b. Os primeiros sinais bioquímicos de intoxicação precedem os sinais de estresse comportamental produzidos pela cipermetrina.
- c. Os primeiros sinais comportamentais produzidos pela cipermetrina apareceram na concentração de 0,12 ppm e eles tiveram características respiratórias: as brânquias e a boca permaneceram abertas. Nesta concentração os peixes tiveram cor escura e redução do muco do corpo. Na concentração de 0,08 ppm os valores bioquímicos séricos de Na, Mg, P, Uréia, Glicose, Colesterol, Creatinina e Fosfatase Alcalina foram maiores que os valores normais, mas os triglicerídeos, a alanina aminotransferase e a aspartato aminotransferase foram menores.

- d. Os parâmetros hematológicos não foram alterados com as diferentes concentrações e períodos de exposição de cipermetrina usados, exceto para o conteúdo de hemoglobina e MCHC após 4 e 8 dias de tratamento.

Estudo do sêmen

- a. O espermatócrito aumentou durante a estação de desova indicando uma variação da concentração espermática durante o período do estudo. Os valores do espermatócrito variaram de 70-82% na primavera e começo do verão e entre 65-69% no outono e inverno.
- b. O volume total de sêmen liberado pelos peixes foi de 1,06ml durante o mês de dezembro (máximo) e 0,23 ml no mês de julho (mínimo). Isto representa $4,2 \text{ ml.kg}^{-1}$ de peixe em novembro, 3,6 ml em janeiro, 1,7 ml em abril e 1,1 ml em julho.
- c. Os espermatozóides alcançaram a classe 5 de mobilidade (movimento vigoroso e progressivo) imediatamente após a diluição na água e permaneceram nesta classe aproximadamente 20 segundos. Após 1 minuto da diluição na água os espermatozóides estavam todos imóveis. O espermatozóides permaneceram na classe 5 de mobilidade, mesmo durante 2 horas de armazenamento na temperatura ambiente (24°C).
- d. O pH entre 5 e 10 das soluções não influenciou na duração da classe 5 de mobilidade.
- e. As seguintes concentrações foram encontradas no fluido seminal: eletrólitos (Cl $139,4 \pm 2,1$; Na $153,7 \pm 2,4$; K $10,7 \pm 0,5$; Ca $8,4 \pm 0,4$; Mg

1,8±0,1; P 0,9±0,08), metabólitos (Creatinina 0,8±0,06; Uréia 6,7±0,7; Ácido úrico 0,24±0,02; Proteína total 0,6±0,05; Albumina 0,18±0,01; Globulina 0,42±0,03; Triglicérides 10,9±0,8; Colesterol total 13,9±0,9; HDL-Colesterol 3,3±0,4; LDL-colesterol 9,0±0,9; Bilirrubina total 0,2±0,01; Bilirrubina indireta 0,11±0,006; Bilirrubina direta 0,09±0,01) e enzimas (Alanina aminotransferase 8,9±0,6; Aspartato aminotransferase 247,8±23,4; Fosfatase alcalina 3,8±0,3; Osmolalidade 274,8±11,2).

- f. A concentração dos eletrólitos no sêmen do jundiá indicou que os níveis de Na⁺ e K⁺ são maiores que no soro sangüíneo e, os níveis de cálcio, magnésio e fósforo tiveram valores menores que os valores séricos.

10. PERSPECTIVAS FUTURAS

Através dos padrões sanguíneos normais obtidos para o jundiá, o estudo da patologia clínica deste peixe poderá ser implementado, comparando os valores de referência com valores presentes em determinadas patologias. Ainda, a análise dos valores alterados poderá servir de diagnóstico na detecção precoce de doenças ou mesmo de processos patológicos já instalados.

Os disruptores ambientais, quando presentes no ambiente aquático, também poderão ser detectados pelas análises dos parâmetros bioquímicos dos peixes. O desvio dos valores normais poderá demonstrar a influência exercida pelo pesticida na fisiologia do animal. Outros estudos complementares poderão seguir, como a medida da quantidade de pesticida nos diferentes tecidos do animal, alterações morfológicas e a relação da presença do disruptor com a patologia desencadeada.

Os processos de fertilização do jundiá na aquicultura poderão utilizar os indicadores da qualidade e da quantidade de células presentes no sêmen que foram avaliados neste trabalho. As resultados obtidos podem auxiliar produtores de peixes a otimizar o processo de seleção de machos de jundiá para a aplicação em técnicas de inseminação, armazenamento do sêmen a curto e a longo prazo através de criopreservação.

A composição iônica do diluente tem um papel importante na ativação e inativação da mobilidade (Sansone *et al.*, 2001). Sendo assim, é importante a pesquisa de meios de diluição do sêmen do jundiá que favoreçam a preservação desde o momento da coleta até a utilização, mantendo o sêmen com as propriedades físico-químicas estáveis. Estas soluções, entretanto, devem induzir uma inativação temporária da mobilidade, prevenindo o desgaste das reservas energéticas intracelulares.

Uma vez que, em outros peixes de água doce já estudados, a mobilidade dos espermatozoides está correlacionada com efeitos iônicos na membrana plasmática (Perchee *et al.*, 1997), com o choque hipoosmótico e conseqüente alteração do potencial da membrana (Krasznai *et al.*, 2000), poderão ser analisadas as modificações de diferentes concentrações de potássio, cálcio e sódio, assim como o efeito de bloqueadores e agonistas de canais iônicos sobre a mobilidade dos espermatozoides do jundiá.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALAVI, S.M.H.; COSSON, J. 2005. Sperm motility in fishes. I. Effects of temperature and pH: a review. *Cell Biology International*. 29:101-110.
- ALKAHEM, H.F. 1994. The toxicity of nickel and the effects of sublethal levels on haematological parameters and behaviour of the fish *Oreochromis niloticus*. *Journal Univers Kuwait*. 21:243-252.
- BARCELLOS, L.J.G., KREUTZ, L.C., RODRIGUES, L.B., FIOREZE, I., QUEVEDO, R.M., CERICATO, L, CONRAD, J., SOSO, A.B., FAGUNDES, M., LACERDA, L.A., TERRA, S. 2003. Haematological and biochemical characteristics of male jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard *Pimelodidae*): changes after acute stress. *Aquaculture Research* 34, 1465-1469.
- BASER, S.; ERKOÇ, F.; SELVI, M.; KOCAK, O. 2003. Investigation of acute toxicity of permethrin on guppies *Poecilia reticulata*. *Chemosphere*. 51:469-474.
- BAYNES, S.M.; SCOTT, A.P. 1985. Seasonal variation in parameters of milt production and plasma concentration of sex steroid in male rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 57:150-160.
- BHASKAR, B.R.; RAO, K.S. 1989. Influence of environmental variables on hematology, and compendium of normal hematological ranges of milkfish, *Chanos chanos* (Forskal) in brackish culture. *Aquaculture*. 83:123-136.
- BILLARD, R. 1986. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. *Reproduction, Nutrition and Development*. 26:877-920.

- BILLARD, R. 1990. artificial insemination in fish. *In*: Marshall's Physiology of Reproduction, Volume 2, Reproduction in the Male. LAMMING, G.E., editor. Churchill Livingstone, Edingurgh, Scotland. Pp.870-888.
- BILLARD, R.; BRETON, B.; JALABERT, B. 1971. La production spermatogénétique chez la truite. *Ann. Biol. Anim.* 11:119-212.
- BILLARD, R.; COSSON, G.; PERCHEC, G.; LINHART, O. 1995. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. *Aquaculture.* 129:95-112.
- BLAXHALL, P.L. 1983. Electron microscope studies of fish lymphocytes and thrombocytes. *Journal Fish Biol.* 22:223-229.
- BOUCK, G.R.; JACOBSON, J. 1976. Estimation of salmonid sperm concentration by microhematocrit technique. *Trans. Am. Fish. Soc.* 105:534-535.
- BRADBURY, S.P.; COATS, J.R. 1989. Toxicokinetics and toxicodynamics of pyrethroid insecticides in fish. *Environ Toxicol Chem.* 8:373-380.
- BRAIDWOOD, J.C.; BRETON, B.; MENEZO, Y.; BILLARD, R. 1974. Mise en évidence de quelques enzymes dans le sperme de la carpe *Cyprinus carpio* L. et de la truite *Salmo gairdneri* Richardson et dans le liquide coelomique de la truite. *Comptes Rendus de la Academie des Sciences, Paris.* 278D:1285-1288.
- BRAIDWOOD, J.C.; HART, J.L. 1998. Control of sea lice in fish. *ASFA*.pp. 800-869.
- BURROWS, A.S.; FLETCHER, T.C.; MANNING, M.J. 2001. Haematology of turbot, *Psetta maxima* L: ultrasctrural cytochemical and morphological properties of peripheral blood leukocytes. *Journal Appl Ichthyol.* 17(2):77-84.

- BÜYÜKHATİPOĞLU, B.; HOLTZ, W. 1984. Sperm output in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) – effect of age, timing and frequency of stripping and presence of females. *Aquaculture*. 37:63-71.
- CAMPBELL, T.W. 1988. Fish cytology and hematology. *Vet. Clin. North Am.: Small Animal Practice*. 18(2):349-364.
- CARNEIRO, P.C.F.; BENDHACK, F.; MIKOS, J.; SCHORER, M.; OLIVEIRA FILHO, P.; BALDISSEROTTO, B.; GOLOMBIESKI, J.; SILVA, L.V.; MIRON, D.; ESQUIVEL, B.M. E GARCIA, J.R. 2002. Jundiá: um grande peixe para a região sul. *Panorama da Aqüicultura*.
- CANTON, R.; WEINGARTNER, M.; FRACALOSSO, D.M.; ZANIBONI, E.F. 2004. Efeito da frequência alimentar sobre o desempenho de alevinos de jundiá *Rhamdia quelen*. I Congresso da sociedade brasileira de aqüicultura e biologia aquática. Vitória, Espírito Santo, p104.
- ÇALISKAN, M.; ERKMEN, B.; YERLI, S.V. 2003. The effects of zeta cypermethrin on the gills of common guppy *Lebistes reticulatus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 14:117-120.
- CEROVSKY, J. 1976. Metoda barveni kancich spermü pro morfologicke hodnocem. *Zivoc. Vyr.* 21 (5): 361-366.
- CIERESZKO, A.; DABROWSKI, K. 1993. Estimation of sperm concentration of rainbow trout, whitefish and yellow perch using a spectrophotometric technique. *Aquaculture* 109:367-373.

- CIERESZKO, A.; DABROWSKI, K.; TOTH, G. P.; CHRIST, S. A.; GLOGOWSKI, J. 2002. Factors affecting motility characteristics and fertilizing ability of sea lamprey spermatozoa. *Transactions of the American Fisheries Society* 131:193-202.
- CIERESZKO, A., GLOGOWSKI, J.; DABROWSKI, K. 2000. Biochemical characteristics of seminal plasma and spermatozoa of freshwater fishes. In: *Cryopreservation in Aquatic Species*. pp 20-48. Edited by Tiersch, T.R. and Mazik, P.M. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana.
- CRUEA, D.D. 1969. Some chemical and physical characteristics of fish sperm. *Transactions of the American Fisheries Society*. 4:785-788.
- DAS, B.K.; MUKHERJEE, S.C. 2003. Toxicity of cypermethrin in *Labeo rohita* fingerlings: biochemical, enzymatic and haematological consequences. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 134: 109-121.
- DOGGET, T.A.; HARRIS, J.E. 1989. Ultrastructure of the peripheral blood leukocytes of *Oreochromis mossambicus*. *Journal Fish Biology*. 33:747-756.
- DOGGET, T.A.; WRATHMELL, A.B.; HARRIS, J.E. 1987. A cytochemical and light microscopical study of the peripheral blood leukocytes of *Oreochromis mossambicus* Cichlidae. *Journal Fish Biol.* 31: 147-153.
- DÖRÜCÜ, M.; GIRGIN, A. 2001. The effect of cypermethrin on some haematological parameters of *Cyprinus carpio*. *Aquaculture International*. 9(2):183-187.
- DREANNO, C.; SUQUET, M.; DESBRUYERES, E.; COSSON, J.; Le DELIOU, h.; BILLARD, R. 1999. Effects of osmolality, morphology perturbations and intracellular nucleotide content during movement of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) spermatozoa. *Journal Reproduction Fertilit.* 116:113-125.

- EDSALL, C.C. 1999. A blood chemistry profile for lake trout. J. Aq. Animal Health. 11:81-86.
- EDWARDS, R.; MILLBURN, P.; HUDSON, H.D. 1986. Comparative toxicity of *cis*-cypermethrin in rainbow trout, frog, mouse and quail. Toxicol. Appl. Pharmacol. 84: 512-522.
- EIRAS, A.C.; RANZANI-PAIVA, M.J.T.; FELIZARDO, N.N. 1998. Contagem diferencial de leucócitos em tilápia-do-Nilo *Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1757, criadas em tanques-rede na represa de Guarapiranga, SP. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE ORGANISMOS AQUÁTICOS, 5, 1998, Maringá. Anais...p.45.
- ELLIS, A.E. 1976. The leukocytes of fish. A review. Journal Fish Biology. 8:143-156.
- ELLSAESSER, C.F.; MILLER, N.W.; CUCHENS, M.A.; LOBB, C.J.; CLEM, W. 1985. Analysis of channel catfish peripheral blood leukocytes by bright-field microscopy and flow cytometry. Trans. Am. Fish. Soc. 114:279-285.
- FORERO, A.R. 1995. Determinación de algunos aspectos hematológicos de *Oncorhynchus mykiss* (Salmonidae). Rev Biol Trop. 43:283-288.
- FUJIMAKI, Y.; ISODA, M. 1990. Fine-structural study of leucocytes in the goldfish *Carassius auratus*. Journal Fish Biology. 36:821-831.
- GLOGOWSKI, J.; BABIAK, I.; KUCHARCYK, D.; LUCYNSKI, M.; PIROS, B. 1999. Some properties of bream *Abramis brama* L. sperm and its cryopreservation. Aquaculture Research. 30:765-772.
- GOMES, L.C., GOLOMBIESKI, J.I., GOMES, A.R.C. AND BALDISSEROTTO, B. 2000. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). Revisão Bibliográfica. Ciência Rural, Santa Maria, v. 30: 179-185.

- GREENBERG, A.E.; TRUSSELL, R.R.; CLESCERI, L.S. 1985. Standard methods for the examination of water. APHA, AWWA, WPCF, Washington, 1269p.
- GRIFFIN, B.R. 1984. Random and directed migration of trout (*Salmo gairdneri*) leukocytes: activation by antibody, complement and normal serum components. *EV Comp Immunol.* 8:589-597.
- GRIZZLE, J.M.; ROGERS, W.A. 1985. Anatomy and histology of the channel catfish. Auburn University, Auburn. 94p.
- GWO, J.-C. 1995. Ultrastructural study of osmolality effect on spermatozoa of three marine teleosts. *Tissue & Cell* 27(5):491-497.
- HART, J.L.; THACKER, J.R.M.; BRAIDWOOD, J.C.; FRASER, N.R.; MATHEWS, J.E.D. 1997. Novel cypermethrin formulation for the control of sea lice on salmon (*Salmo salar*). *Vet. Record* 140, 179-181.
- HAYA, K. 1989. Toxicity of pyrethroid insecticides to fish. *Environ Toxicol Chem.* 8:383-391.
- HAYES, A.W. 1994. Principles and methods of toxicology. Raven Press, New York, 1468p.
- HINES, R.S.; YASHOUV, A. 1970. Differential leukocyte counts and total leukocyte and erythrocyte counts for same normal israeli mirror carp. *Israeli. Journal Aquaculture-Bamidgeh.*22:106-113.
- HOUSTON, A.H.; ROBERTS, W.C.; KENNINGTON, J.A. 1996. Hematological response in fish: pronephric and splenic involvements in the goldfish *Carassius auratus* L. *Fish Physiol Biochem.* 15(6):481-489.
- HRUBEC, T.C., SMITH, S.A., ROBERTSON, J.L., FELDMAN, B., VEIT, H.P., LIBEY, G.; TINKER, M.K. 1996a. Blood biochemical reference intervals for sunshine bass

- (*Morone chrysops X Morone saxatilis*) in three culture systems. American Journal Veterinary Research 57(5): 624-627.
- HRUBEC, T.C., SMITH, S.A., ROBERTSON, J.L., FELDMAN, B., VEIT, H.P., LIBEY, G.; TINKER, M.K. 1996b. Comparison of hematologic reference intervals between culture system and type of hybrid striped bass. American Journal Veterinary Research, 57(5):618-623.
- HRUBEC, T.C., CARDINALE, J.L.; SMITH, S.A. 2000. Hematology and plasma chemistry reference intervals for cultured tilapia (*Oreochromis hybrid*). Veterinary Clinical Pathology. 29 (1): 7-12.
- HRUBEC, T.C., ROBERTSON, J.L.; SMITH, S.A. 1997. Effects of temperature on hematologic and serum biochemical profiles of hybrid striped bass (*Morone chrysops X Morone saxatilis*). American Journal Veterinary Research, 58(2):126-130.
- HRUBEC, T.C., SMITH, S.A.; ROBERTSON, J.L. 2001. Age-Related changes in hematology and plasma chemistry values of hybrid striped bass (*Morone chrysops X Morone saxatilis*). Veterinary Clinical Pathology, 30(1): 8-15.
- ISHIZEKI, K.; NAWA, T.; TACHIBANA, T.; SAKAKURA, Y.; LIDA, S. 1984. Hematopoietic sites and development of eosinophil granulocytes in the loach *Misgurnus anguillicaudatus*. Cell Tissue Res. 235:419-426.
- KHALAF-ALLAH, S.S. 1999. Effect of pesticide water pollution on some haematological, biochemical and immunological parameters in *Tilapia nilotica* fish. Dtsch. tierärztl. Wschr. 106: 67-71.
- KIME, D.E.; Van LOOK, B.G.; HUYSKENS, G.; RURANGWA, E.; OLLEVIER, F. 2001. Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. Comparative Biochemistry and Physiology. C-130:425-433.

- KRASZNAI, Z.; MÁRIÁN, T.; BALKAY, L.; GÁSPÁR, R. TRÓN, L. 1995. Potassium channels regulate hypo-osmotic shock-induced motility of common carp (*Cyprinus carpio*) sperm. *Aquaculture*. 129: 129-128.
- KRASZNAI, Z.; MÁRIÁN, T.; IZUMI, H.; DAMJANOVICH, S.; BALKAY, L.; TRÓN, L.; MORISAWA, M. 2000. Membrane hyperpolarization removes inactivation of Ca²⁺ channels, leading to Ca²⁺ influx and subsequent initiation of sperm motility in the common carp. *PNAS* 97:2052-2057.
- KRASZNAI, Z.; MORISAWA, M.; MORISAWA, S.; KRASZNAI, Z.T.; TRÓN, L.; GÁSPÁR, R. AND MÁRIÁN, T. 2003. Role of ion channels and membrane potential in the initiation of carp sperm motility. *Aquat. Living Resour.* 16, 445-449.
- KRUGER, J.C.W.; SMIT, G. L.; Van VUREN, J.H.; Van FERREIRA, J.T. 1984. Some physical and chemical characteristics of the semen of *Cyprinus carpio* L. and *Oreochromis mossambicus* (Peters). *Journal Fish Biology*. 24:263-272.
- LAHSTEINER, F.; BERGER, B.; WIESMANN, T.; PATZNER, R. 1995. Finestrukture and motility of spermatozoa and composition of the seminal plasma in the perch. *Journal of Fish Biology*. 47:492-508.
- LAHSTEINER, F.; BERGER, B.; WIESMANN, T.; PATZNER, R. 1996. The influence of various cryoprotectants on semen quality of the rainbow trout (*O. mykiss*) before and after cryopreservation. *Journal Appl. Ichthyol.* 112:99-106.
- LAHSTEINER, F.; PATZNER, R.; WEISMANN, T. 1994. The testicular main duct and the spermatic duct in some cyprinid fishes. Composition of the seminal fluid. *Journal of Fish Biology*. 44:459-467.

- LAHSTEINER, F.; PATZNER, R.; WEISMANN, T. 1993. The spermatic duct of salmonid fishes (Salmonidae, Teleostei). Morphology, histochemistry and composition of secretion. *Journal of Fish Biology*. 42:79-93.
- LAY, P.A.; BALDWIN, J. 1999. What determines the size of teleost erythrocytes? Correlations with oxygen transport and nuclear volume. *Fish Physiol Biochem*. 20:31-35.
- LEHMANN, J.; STUERENBERG, F.J.; MOCK, D. 1987. The changes of the haemogram of the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) to an artificial and a natural infection with *Yersinia ruckeri*. *Journal Appl. Ichthyol*. 4:174-183.
- LERMEN, CL; LAPPE, R; CRESTANI, M ; VIEIRA, VP; GIODA, CR; SCHETINGER, MRC; BALDISSEROTTO, B; MORAES, G; MORSCH, VM. 2004. Effect of different temperature regimes on metabolic and blood parameters of silver catfish *Rhamdia quelen*. *Aquaculture*. 239(1-4): 497-507.
- LINHART O, RODINA M, COSSON J. 2000. Cryopreservation of sperm in common carp *Cyprinus carpio*: Sperm motility and hatching success of embryos. *Cryobiology*. 41 (3): 241-250.
- LITCHFIELD J.T.; WILCOXON F.W.J.. 1949. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 96:99-113.
- LOIR, M. 1990. Trout steroidogenic testicular cells in primary culture. Steroidogenic activity in interstitial cells, Sertoli cells and spermatozoa. *General and Comparative Endocrinology*. 78:388-398.
- LUSKOVÁ, V.; SVOBODÁ, M.; KOLAROVA, J. 2002. The effect of diazinon on blood plasma biochemistry in carp (*Cyprinus carpio* L.). *Acta Vet. Brno*. 71: 117-123.

- MANSOUR, N., LAHNSTEINER, F. AND BERGER, B. 2003. Metabolism of intratesticular spermatozoa of a tropical teleost fish (*Clarias gariepinus*). Comparative Biochemistry and Physiology Part B 135:285-296.
- MARSHALL, W.S.; BRYSON, S.E.; IDLER, R.D. 1989. Gonadotropin stimulation of K⁺ secretion and Na⁺ absorption by brook trout *Salvelinus fontinalis* sperm duct epithelium. General and Comparative Endocrinology. 75:118-128.
- MÁRIÁN, T.; KRASZNAI, Z.; BALKAY, L.; BALÁZS, M.; EMRI, M.; BENE, L.; TRÓN, L. 1993. Hypo-osmotic shock induces an osmolality-dependent permeabilization and structural changes in the membrane of carp sperm. Histochem. Cytochem. 41, 291-297.
- MCDONALD, D.G.; MILLIGAN, C.L. 1992. Chemical properties of blood. In: HOAR W.S.; RANDALL, D.J.; FARRELL, A.P. eds. Fish Physiology. v ol. 12, part B, The Cardiovascular System. New York: Academic Press.
- MICHAEL, E. 1989. The pyrethroids, early discovery, recent advances and the future. Pestic Sci. 27:337-351.
- MODRÁ, H.; SVOBODOVÁ, Z.; KOLÁROVÁ, J. 1998. Comparison of differential leukocyte counts in fish of economic and indicator importance. Acta Vet. Brno. 67:215-226.

- MORISAWA M. 1985. Initiation mechanism of sperm motility at spawning in teleosts. *Zool. Sci.* 2, 605-615.
- MORISAWA M.; SUZUKI, K. 1980. Osmolality and potassium ion: their role in initiation of sperm motility in teleosts. *Science* 210:1145-1147.
- MORISAWA, M.; SUZUKI, K.; MORISAWA, S. 1983. Effects of potassium and osmolality on spermatozoan motility of salmonid fishes. *J. Exp. Biol.* 107, 105-113.
- MORROW, W.J.W.; PULSFORD, A. 1980. Identification of peripheral blood leukocytes of the dogfish (*Scyliorhinus canicula L.*) by electron microscopy. *Journal Fish Biol.* 17: 461-475.
- MUNKITTRICK, K.R.; MOCCIA, R.D. 1987. Seasonal changes in the quality of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) semen: Effect of a delay in stripping on spermatocrit, motility, volume and seminal plasma constituents. *Aquaculture.* 64:147-156.
- NAKONO, T.; TOMLINSON, N. 1967. Catecholamine and carbohydrate concentrations in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in relation to physical disturbances. *Journal Fisheries Research Board.* 24:1701-1715.
- NARAHARA, M.Y.; GODINHO, H.M.; ROMAGOSA, E. 1985. Estrutura da população de *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840) (Osteichthyes, Siluriformes, Pimelodidae). *Boletim do Instituto de Pesca*, v.12, n.3, p.123-137.
- NATT, M.P.; HERRICK, C.A. 1952. A new blood diluent for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken. *Poult Sci.* 31:735-738.
- NEMCSÓK, J.; BOROSS, L. 1982. Comparative studies on the sensitivity of different fish species to metal pollution. *Acta Biologica Academ.* 33:23-27.

- ODA, S. AND MORISAWA, M. 1993. Rises of intracellular Ca^{2+} and pH mediate the initiation of sperm motility by hyperosmolality in marine teleosts. *Cell Motil Cytoskel.* 25, 171-178.
- PAVANELLI, G.C; EIRAS, J.C.; TAKEMOTO, R.M. 1998. Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento. Maringá, Nupélia.
- PERCHEC, G.; COSSON, J.; BILLARD, R. 1993. La motilité des spermatozoïdes de truite (*Oncorhynchus mykiss*) et de carpe (*Cyprinus carpio*). *Journal of Applied Ichthyology* 9, 129-149.
- PERCHEC, G.; COSSON, M.P.; COSSON, J.; JEULIN, C.; BILLARD, R. 1996. Morphological and kinetic changes of carp (*Cyprinus carpio*) spermatozoa after initiation of motility in distilled water. *Cell motility and the cytoskeleton.* 35:113-120.
- PERCHEC, G.; GATTI, J. L.; COSSON, J.; JEULIN, C.; FIERVILLE, F.; BILLARD, R. 1997. Effects of extracellular environment on the osmotic signal transduction involved in activation of motility of carp spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* 110:315-327.
- PERCHEC, G.; JEULIN, C.; COSSON, J.; ANDRÉ, F.; BILLARD, R. 1995. Relationship between sperm ATP content and motility of carp spermatozoa. *Journal of Cell Science.* 108, 747-753.
- PIIRONEN, J. 1985. Variation in the properties of milt from the Finnish landlocked salmon (*Salmo salar m. sebago* Girard) during a spawning season. *Aquaculture.* 48:337-350.
- PIIRONEN, J. 1994. Composition and cryopreservation of sperm from some finnish freshwater teleost fish. *Finnish Fisheries Research.* 15:27-48.

- POLAT, H.; ERKOÇ, F. Ü.; VIRAN, R.. 2002. Investigation of acute toxicity of beta-cypermethrin on guppies *Poecilia reticulata*. *Chemosphere*. 49: 39-44.
- POOLE, W.R.; DILLANE, M.G. 1998. Estimation of sperm concentration of wild and reconditioned brown trout *salmo trutta L.* *Aquaculture Research*. 29:439-445.
- POUEY, J. L. O. F.; MIOTTO, H.C., KUNZ, T. L.; CAMARGO, S. G .O. 1999. xxxvi Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. principais componentes corporais do jundiá (*Rhamdia sp.*) cultivado na densidade de um peixe/m² e dividido em quatro faixas de peso. Porto Alegre, n.1.
- POWELL, M.D.; WRIGHT, G.M.; BURKA, J.F. 1990. Eosinophilic granule cells in the gills of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: evidence of migration? *Journal Fish Biology*. 37:495-497.
- PROENÇA, C.E.M.; BITTENCOURT, P.R.L. 1994. Manual de piscicultura tropical. Brasília: IBAMA.
- RAMBHASKAR, B; SRINIVASA-RAO, K. 1987. Comparative haematology of the species of marine fish from Visakhapatnam coast. *Journal fish Biol*. 30:59-66.
- RANZANI-PAIVA, M.J.T.; EIRAS, A.C. 1992. Células sangüíneas e contagem diferencial de leucócitos de 13 espécies de teleósteos do Rio Paraná – PR. An. 7^o Simp. Brasil. Aquicul., 2^o Enc. Brasil Patol. Organ. Aquat. Peruíbe, 173-182.
- RICHARDSON, M.L. 1988. Risk assessment of chemicals in the environment. UK RSC Publications.
- ROCHA, R.M.; FLORES, C.Q. 2001. The ultrastructure of the hematopoietic tissue in the head kidney of matrinxã *Brycon cephalus* Günher, 1869 (Teleostei – Characidae). *Acta microscópica*, Supl. B:207-208.

- RURANGWA, E.; KIME, D.E.; OLLEVIER, F.; NASH, J.P. 2004. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture*. 234 (1-4):1-28.
- RUSCOE, C.N.E. 1977. The new NRDV pyrethroids as agricultural insecticides. *Pestic Sci.* 8:236-242.
- SANSONE, G.; FABBROCINI, A.; ZUPA, A.; LAVADERA, S.L.; RISPOLI, S.; MATASSINO, D. 2001. Inactivator media of sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*) spermatozoa motility. *Aquaculture* 202: 257-268.
- SATAKE, T.; NUTTI-SOBRINHO, A.; PAULA-LOPES, O.V.; LOPES, R.A.; LEMESANTOS, H.S. 1989. Estudo hematológico de peixes brasileiros. XI. As células brancas do cascudo *Hypostomus paulinus* Inhering 1905 (Pisces, Loricaridae). *Ars Veterinária*, 5:107-111.
- SAXENA, K.K.; SETH, N. 2002. Toxic effects of cypermethrin on certain hematological aspects of fresh water fish *Channa punctatus*. *Environmental Contamination and Toxicology*. 69: 364-369.
- SAUNDERS, D.C. 1966. Differential blood cell counts of 121 species of marine fishes of Puerto Rico. *Trans Am Micros Soc.* 85(3):427-449.
- SIMON, L.M. NEMCSÓK, J.; BOROSS, L. 1983. Studies on the effect of paraquat on glycogen mobilization in liver of common car *Cyprinus carpio L.* *Comp. Biochem. Physiol.* 75C:167-169.
- SINGH, A.; SRIVASTAVA, V. K. 1999. Toxic effect of synthetic pyrethroid permethrin on the enzyme system of the freshwater fish *Channa striatus*. *Chemosphere*. 39:1951-1956.

- SMITH, T.M.; STRATTON, G.W. 1986. Effects of synthetic pyrethroid insecticides on nontarget organisms. *Res. Rev.* 97:93-119.
- SOMMERVILLE, C. 1995. Latest weapon in the war on lice. *Fish Farmer*. 18:53-55.
- SRIVASTAV, A.K. AND SRIVASTAVA, S.K. 1997. Impact of deltamethrin on serum calcium and inorganic phosphate of freshwater catfish *Heteropneustes fossilis*. *Environmental Contamination and Toxicology*. 59: 841-846.
- STOSS, J. 1983. Fish gamete preservation and spermatozoan physiology. In: *Fish Physiology IXB*. HOAR, W.S.; RANDALL, D.J.; DONALDSON, E.M., editors. Academic Press, New York. Pp.305-350.
- SUQUET, M.; OMNES, M.H.; NORMANT, Y.; FAUVEL, C. 1992. Assessment of sperm concentration and motility in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture*. 101:177-185.
- SUQUET, M.; BILLARD, R.; COSSON, J.; DORANGE, G.; CHAUVAUD, L.; MUGNIER, C.; FAUVEL, C. 1994. Sperm features in turbot (*Scophthalmus maximus*): a comparison with other freshwater and marine species. *Aquat. Living Resour.* 7:283-294.
- SVOBODOVÁ, Z., LUSKOVÁ, V., DRASTICHOVÁ, J., SVOBODA, M., ŽLÁBEK, V. 2003. Effect of deltamethrin on haematological indices of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Acta Vet. Brno*. 72: 79-85.
- SWARUP, D.; PATRA, R.C. 2005. Environmental pollution and its impact on domestic animals and wildlife. *Indian Journal of Animal Sciences*. 75(2):231-240.
- SZEGLETES, T., POLYHOS, C.S., BÁLINT, T., RADY, A.A., LÁNG, G., KUFCSÁK, O. AND NEMCSÓK, J. 1995. *In vivo* effects of deltamethrin on some biochemical

- parameters of carp (*Cyprinus carpio* L.) Environmental Monitoring and Assessment. 35:97-111.
- TANDON, R.S.; JOSHI, B.D. 1976. Total red and white blood cell count of 33 species of fresh water teleosts Z. Tierphysiol. Tierernährg. Futtermittelkde. 37:293-297.
- TAVARES-DIAS, M.; MATAQUEIRO, M.I.; PERECIN, D. 2002. Total leukocyte counts in fishes by direct or indirect methods? B. Inst. Pesca. 28(2):155-161.
- TAVARES-DIAS, M.; MATAQUEIRO, M.I. 2004. Características hematológicas, bioquímicas e biométricas de *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae) oriundos de cultivo intensivo. I Congresso da sociedade brasileira de aquicultura e biologia aquática. Vitória, Espírito Santo, p260.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. 2004. Hematologia de peixes teleósteos. 144p.
- TAVARES-DIAS, M.; SANDRIM, E.F.S.; MORAES, F.R.; CARNEIRO, P.C.F. 2001. Physiological responses of “tambaqui” *Colossoma macropomum* (Characidae) to acute stress. B. Inst. Pesca. 27(1):43-48.
- TISA, M.S.; STRANGE, R.J. 1983. Hematology of striped bass in fresh water. Prog Fish-Cult. 45:41-44.
- TOCIDLOWSKI, M.E., LEWBART, G.A.; STOSKOPF, M.K. 1997. Hematological study of red pacu (*Colossoma brachypomum*). Veterinary Clinical Pathology, 26(3): 119-125.
- TVEDT, H.B., BENFEY, T.J., MARTIN-ROBICHAUD, D.J.; POWER, J. 2001. The relationship between sperm density, spermatocrit, sperm motility and fertilization success in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*. Aquaculture 194:191-200.
- UEDA, I.K.; EGAMI, M.I.; SASSO, W.S.; MATUSHIMA, E.R. 1997. Estudos hematológicos em *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) (Cichlidae, Teleostei) – Parte I. Braz. Journal Vet. Res. Anim. Sci. 34:270-275.

- VALE, A.; AFONSO, A.; SILVA, M.T. 2002. The professional phagocytes of sea bass *Dicentrarchus labrax l.*: cytochemical characterization of neutrophils and macrophages in the normal and inflamed peritoneal cavity. *Fish Shellfish and Immunol.* 13:183-198.
- VILJOEN, B.C.S.; Van VUREN, J.H.J. Physical composition of the semen of *Labeo ruddi* and *Labeo rosae* (Pisces: Ciprinidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 98A(3-4)459-462.
- VIRAN, R.; ERKOÇ, F. Ü.; POLAT, H.; KOÇAK, O. 2003. Investigation of acute toxicity of deltamethrin on guppies *Poecilia reticulata*. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 55:82-85.
- WANG, z.; CRIM, L.W. 1999. Good sperm motility increases egg fertilization rates in ocean pout (*Macrozoarces americanus*). *Bull. Aquacult. Assoc. Can.* 98:44-46.
- WARNER, M.C.; WILLIAMS, R.W. 1977. Comparison between serum values of pond and intensive raceway cultured channel catfish *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *Journal Fish Biology.* 11-385-391.
- WEDEMEYER, G.A. 1970. The role of stress in the disease resistance of fishes. In: SNIESKO, S.F. (ed.) A simposium on diseases of fishes and shellfishes. Amer Fish Soc Spec. 5:30-35.
- WEDEMEYER, G.A.; NELSON, N.C. 1975. Statistical methods for estimating normal blood chemistry ranges and variance in rainbow trout (*Salmo gairdneri*), shasta strain. *Journal Fish Research Board Can.* 32: 551-554.
- WEYTS, F.A.A.; COHEN, N.; FLINK, G.; VERBURG, B.M.L. 1999. Interactions between the immune system and the hypothalamo-pituitary-interrenal axis in fish. *Fish and Shellfish Immunology.* 9:1-20.

- WIJNGAARDEN, R.P.A.V.; BROCK, T.C.M.; BRINK, P.J.V.D. 2004. Threshold levels for effects of insecticides in freshwater ecosystems: a review. *Ecotoxicology*. 14: 355-380.
- WILLIAMS R.W.; WARNER M.C. 1976. Some observations on the stained blood cellular elements of catfish, *Ictalurus punctatus*. *Journal of Fish Biology*, 9:491-497.
- WROBELSKI, F.; LaDUE. 1955. Serum glutamate oxaloacetate transaminase as an index of liver cell injury. *Proc Soc Experimental Biol*. 90:210.
- YAO, Z.; CRIM, L.W.; RICHARDSON, G.F.; EMERSON, C.J. 2000. Motility, fertility and ultrastructural changes of ocean pout (*Macrozoarces americanus L.*) sperm after cryopreservation. *Aquaculture*. 181:361-375.

12. ANEXO

Artigo submetido à revista *Fish Physiology and Biochemistry* “Biochemical Values of Seminal Plasma and Annual Variations of Physical Characteristics of the Milt from Jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, Pimelodidae)” contendo as modificações sugeridas pelos revisores

Biochemical composition of seminal plasma and annual variations in semen characteristics of jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, Pimelodidae)

Adriana Borges, Daniele Rodrigues Siqueira, Daiane Follmann Jurinitz, Rebeca Zanini, Fernanda do Amaral, Marcelo Lacerda Grillo, Ender Rosana Oberst and Guillermo Federico Wassermann.

Laboratório de Endocrinologia Experimental, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Sarmiento Leite, 500, CEP 90050 170, Porto Alegre, RS, Brazil (Phone/FAX +51-3316 3302, E-mail: adriana.borges@ufrgs.br).

*Departamento de Patologia Clínica Veterinária UFRGS.

Key words: Silver catfish, seasonal changes, semen, spermatozoa, spermatocrit, sperm motility, seminal plasma

Abstract

This study investigated the composition of milt of the South American silver catfish (*Rhamdia quelen*) or jundiá. The semen was taken from jundiás in different periods during the four seasons. The biochemical composition of seminal fluid and the characteristics of sperm were analyzed. The semen quantity which can be extracted per fish in one day was 0.95 ± 0.08 ml during spring (maximum) and 0.24 ± 0.03 ml during winter (minimum). Sperm density (spermatocrit) showed higher values in the spring (75.1 ± 1.3 %) decreasing slightly afterwards reaching 63.0 ± 2.4 to 65.0 ± 2.2 % in the fall and winter. Immediately after water dilution 90-100% of the spermatozoa presented vigorous straightforward motility that remained for at least 20 seconds. The total duration of the motility was 47.9 ± 1.3 seconds in the spring and 38.6 ± 0.6 seconds in the other seasons ($p < 0.05$). This pattern of motility is maintained for more than 2 hours after storage of the milt at room temperature. The pH from 5 to 10 of the water dilution does not influence the sperm motility. The mean seminal pH and osmolality values were 8.7 ± 0.07 and 274.8 ± 11.2 (mOsm.Kg⁻¹), respectively. The ion concentration was: Na 153.7 ± 2.4 , K 10.7 ± 2.4 , Cl 139.4 ± 2.1 , Ca 4.2 ± 0.2 , Mg 0.9 ± 0.05 , P 0.9 ± 0.08 (mEq/l). The total protein was 0.6 ± 0.05 mg/dl and cholesterol concentration was 13.9 ± 0.9 mg/dl.

Introduction

The jundiá *Rhamdia quelen* (Siluridae, Pimelodidae) or silver catfish occurs from Southern Mexico to Central Argentina. This fish can withstand cold winters and grows fast in the summer. Jundiá is a suitable species for fish production in the southern part of South America, making it ideal for any region with a subtropical climate or temperate (Barcellos et al., 2001; Barcellos et al., 2002; Borges et al., 2004) because of its good growth rate, omnivorous feeding habit, a high fertilization and hatching rates (Gomes et al., 2000). No less important is the fact that they are very well accepted by the consumers.

The jundiá reaches the sexual maturity during the first year of life. In the wild the fishes spawn in clear and calm waters with rocky ground. They have two reproductive peaks during the year: one in spring and the other in summer with multiple spawning (Gomes et al., 2000). In jundiá, as in other seasonal-spawning teleosts, there are huge

changes in the size of the gonads throughout the year (Barcellos et al., 2001, 2002). In male jundiá, gonado-somatic index (I_G) rapidly increased during the spring and remained high for most of the summer (spring $8.03 \pm 0.64\%$, summer $8.25 \pm 0.82\%$, fall $0.81 \pm 0.34\%$, winter $1.6 \pm 0.25\%$). Plasma testosterone concentrations started to increase with an increase in the I_G (late winter, August), and reached a peak at the time the fish began to spermiate (middle spring, November). Afterwards the testosterone concentrations decreased progressively and the minimum levels were observed in autumn (Barcellos et al., 2002).

In order to have a controlled and successful production in aquaculture systems it is necessary to have an adequate knowledge of the physical and chemical characteristics of the milt in order to determine the reproductive viability of cultivated fish. Also the ionic and organic constituents of the seminal fluid can reflect the efficiency of fish fertilization capacity (Ciereszko et al., 2000).

The aim of the present investigation was to determine the physical and chemical characteristics of milt of the jundiá *Rhamdia quelen* and also testing seasonal changes in milt quality.

Materials and methods

Fish

188 sexually mature jundiá males (*Rhamdia quelen*), with mean weight of 253 ± 8 g and a mean length of 30.4 ± 0.4 cm were obtained in freshwater ponds from a fish producer in Rolante, RS, during 2002 and 2003. The fishes were caught monthly, transported to the laboratory and kept between 3 to 5 days in 500 l freshwater tanks with dechlorinated circulating water under natural photoperiod and controlled temperature ($24 \pm 2^\circ\text{C}$) before extraction. The stocking density was approximately of 5g/l in the tanks.

The animals were fed with SUPRA commercial fish pellets (containing crude protein, Ca, P, vitamins A, C, D3, E, B1, B2, B6, B12, K3, folic acid, pantothenic acid, biotin, niacin, inositol, Cu, Fe, I, Mn, Se and Zn) each day at 1% body weight per day and without any feeding 24 hours prior to sampling.

Climatic conditions

The atmospheric temperatures were recorded daily. The natural day length was calculated from sunrise to sunset, and the rainfall levels were obtained at the Regional Meteorological Station (Fig.1).

Milt collection

The semen was obtained from monthly collected males after 3 to 5 days in the laboratory. A total of 5-15 fish each month were randomly selected from the holding tanks. The abdomen was wiped clean with gauze, and the milt collected with plastic syringes (without needle) by gently pressing the abdomen from the anterior portion towards the gonopore of the fish. Care was taken to prevent contamination with urine, mucus and feces.

Physical characteristics of semen

The color of each sample was judged visually, immediately after collection. The volume of the ejaculated (excluding the initial watery portion) was measured in plastic syringes. The pH was determined by indicator strips non-bleeding (Merck, Germany) (to lower semen volume: < 1.0 ml) and digital pH meter DIGIMED (\geq upper semen volumes \geq 1.0 ml).

Sperm density was determined measuring spermatocrit value and also through microscopic sperm counting.

Microhaematocrit capillary tubes (75 mm length and 1.1-1.2 mm i.d.) were filled (approximately 70%) with semen and one end of each tube was sealed with fire for tube centrifugation in a microhaematocrit centrifuge at 12 000xg. An initial experiment was conducted to determine the time of centrifugation required to achieve stable readings. The spermatocrit was measured at 5 min intervals up to 65 min of centrifugation (Fig. 2). Measurements were done in triplicate for each sample and the average of three measurements was used for the results. Spermatocrit was measured in the four seasons, within three hours of semen collection. During this time the tubes were kept at 4°C. Spermatocrit, defined as the ratio of solid packed material volume to total volume of semen x 100, was measured in triplicate from 144 males.

An improved Neubauer counting chamber Bright line (BOECO, Germany) was used for sperm counting as Tvedt et al., 2001 with small modifications. Prior to the counting the semen was diluted 1500-fold in a 2.94% solution of sodium citrate and formaldehyde 4%. The counting was estimated in triplicates from 100 males.

Evaluation of semen motility

Spermatozoa motility was estimated using a light microscope (x 400) right after the semen collection. Sperm motility was determined by diluting 10 μ l of milt in 1ml of fresh tank water (pH 7.2), or tank water at pH 3 or 5 by addition of HCl (0.01M) or at pH 8.5, 10 and 12 by the addition NaOH (0.01M). A wet mount (slide and cover slip) was prepared with a droplet of this diluted milt and placed in a microscope. Sperm motility observations were done at room temperature (24 $^{\circ}$ C), using at least three replicates per sample. One person conducted all the sperm motility observations in order to decrease the degree of variation. Sperm motility was determined by subjective estimates of percentage of motile sperm cells and by the duration of motility (length of time before most cells became immobile) by a stopwatch. Motility was assessed using an arbitrary scale in which 0 represents 0%, 1 \cong 0-25%, 2 \cong 25-50%, 3 \cong 50-75%, 4 \cong 75-90%, 5 \cong 90-100% of motile spermatozoa. The influence of semen storage at room temperature (24 $^{\circ}$ C) was determined. The motility of collected milt was analyzed after a storing time of 0, 1, 2, 3, 4 and 5 hours.

Analysis of seminal plasma

Milt from each sample was centrifuged (10 000 x g, 10 min.) and the seminal plasma was removed and kept at -20 $^{\circ}$ C for further analysis in the Laboratory of Clinical Pathology at the CHPA (Clinical Hospital of Porto Alegre). All electrolytes, metabolites and enzymes were determined using an automated system with adequate standards (ADVIA 1650 Chemistry System, Bayer, Tokyo, Japan, 2000). The automated system was regularly monitored for accuracy and precision in accordance with “good laboratory practices”. The following parameters were measured and expressed in the following units: cholesterol,

bilirubin, urea, creatinine (mg/dl); alanine aminotransferase (ALP), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (U/l), chloride, potassium, sodium, magnesium, phosphorus, calcium (mEq/l); albumin, total protein (g/dl). The concentration of globulins was calculated (total protein minus albumin concentrations). The methodology of enzyme assays is shown in Table 1.

Statistical Tests

Means \pm standard error (SEM) was calculated for each milt characteristic using triplicates samples for at least 5 males per week. Statistical evaluation was performed by one-way ANOVA with Bonferroni's post test using GraphPad InStat version 3.01, 32 bit for Windows 95/NT (GraphPad Software, San Diego, California, USA, www.graphpad.com). Differences were considered to be significant at $p < 0.05$.

Results

Physical characteristics of the semen

The milt of jundiá has white color, with creamy aspect and without any odor. The spermatocrit values during the seasons are showed in Fig. 3. The values of sperm concentration are also showed (Fig. 4). The sperm cell count was found to be between 50 ± 1.2 in winter to $66 \pm 3.6 \times 10^9$ cells.ml⁻¹ in spring. The individual maximum value of sperm production released per extraction was 125×10^9 cells.ml⁻¹ in spring.

Volume of semen

Fig. 5 shows the volume of semen obtained per fish in one day during different seasons of the year. In spring and summer the volume was more than 3 times the amount collected in fall and winter.

Motility of spermatozoa

Motility analysis

The spermatozoa remained immobile in the semen and were activated after water dilution.

The motility duration after dilution was defined in an arbitrary scale from zero to five (0-5).

Zero represents the immobile spermatozoa and five the 100% mobile spermatozoa with forward, rapid and strong motility. During the four seasons the spermatozoa maintain the class 5 motility for at least 20 seconds (Fig. 6). The total motility (class 1 to 5) in spring is sustained for 47.9 ± 1.3 seconds. In all other seasons, the total motility lasted only 38.6 ± 0.5 seconds. The difference was statistical significant ($p < 0.05$) (Fig. 6 insert).

Sperm motility and semen storage

The storage of semen at room temperature (24°C) has a significantly ($p < 0.05$) influence on the duration of the spermatozoa motility after water dilution (Fig. 7). The normal motility is preserved at least up to 2 hours of storage.

Influence of pH on the spermatozoa motility

The influence of the pH of the dilution water on the duration of sperm motility is represented in Fig. 8. The pH between 5 to 10 did not have significantly influence. At pH 3 and 12 the spermatozoa suffered physical damage.

Seminal plasma composition

The pH, the osmolality and the concentrations of electrolytes, metabolites and enzymes of jundiá seminal fluid is shown in Table 2. Comparison of the values of seminal plasma during spring and summer did not show any difference (data not shown). For this reason the values were pooled. It can also be observed that the composition of the fluid diverges to the composition of blood serum of jundiá in practically all parameters measured.

Discussion

The total volume of expressible milt per fish was 0.95 ± 0.08 ml during spring (maximum) and 0.24 ± 0.03 ml in July (minimum). In fall and winter the individual volume of milt was insufficient to obtain adequate amount of seminal plasma for biochemical determination. Usually in spring and summer the extraction was successful in almost 100% of the males, in fall and winter this percentage dropped to 0-40% depending upon the atmospheric temperature. Also in the last winter (2004) due to the rigorous climatic condition, in 22 pond fishes collected, the extraction was unproductive.

The spermatozoa reach class five (5) motility (vigorous and straightforward movement) immediately after water dilution and remain in this class for approximately 20 seconds. Approximately 1 min. after water dilution, the spermatozoa were all immobile. The storing of the milt at room temperature (24°C) preserved the class 5 motility for at least 2 hours.

The pH of the dilution water did not have influence on the duration of class 5 motility, between the ranges of pH 5 to 10. Similar results were observed by Kime and Tveiten (2002) with spermatozoa of *Anarhichas minor* submitted to variation of pH between 6.0 to 9.0. Also in the *Odontesthes bonariensis*, spermatozoa became motile in a wide range of pH (5.4-8.3). Thus, pH appears to have little, if any, effect on motility activation (Strüssmann et al., 1994).

The Na^+ and K^+ concentration of jundiá on the seminal plasma shown in table 2 are very high and are probably responsible for the suppression of sperm motility due to their osmotic effect (Billard, 1975; Benau and Turner, 1980; Morisawa et al., 1983, Morisawa, 1985). Sperm quiescence in undiluted milt occurs roughly at $300 \text{ mOsmol.kg}^{-1}$. Thus activation occurs when osmolality is lowered for milt of fresh water species. On the other hand Guest et al., (1996) reported that spermatozoa of the channel catfish *Ictalurus punctatus* are motile in a 222 mOsm.kg^{-1} NaCl solution. Consequently, hypotonic ambient is not the only factor explaining motility induction in fresh water species (Cosson, 2004).

Suquet et al (1994) reported that in other fresh water species the osmolality observed was 297 ± 15 in rainbow trout; 302 ± 5 in carp and 317 ± 11 in goldfish.

The relationship between the high concentration of potassium and low concentration of calcium seems to be important for the inhibition of sperm motility. Baynes et al. 1981, in *Salmo gairdneri* demonstrated that the high calcium concentration antagonizes the potassium effect on the sperm motility. It means that the high ration potassium/calcium can produce inhibition of the spermatozoa motility.

The motility of sperm in most species is induced by the osmotic shock, when it is mixed with water either during natural spawning, or under laboratory conditions (Morisawa e Suzuki, 1980; Perchec et al. 1993). The spermatozoa of jundiá are activated immediately when in contact with freshwater, and the high percentage of vigorous and forward moving motile spermatozoa is maintained only for a very short time (20seconds, Fig. 7). The spermatozoa of *Clarias gariepinus* are activated immediately after dilution and the spermatozoa motility is maintained also for a short time (30 seconds) at the spawning temperature of the fish (28°C) (Mansour et al., 2003).

The values found for the spermatocrit vary from $75.1\pm 1.3\%$ in spring to $63.2\pm 2\%$ in fall. The values of spermatocrit and cell count during spring were significantly higher than in other seasons (Fig 3 and Fig 4).

Significant correlation between spermatozoa density and spermatocrit was reported in rainbow trout (Baynes and Scott, 1985) and for several other teleost species (Bouck and Jacobson, 1976; Piironen, 1985; Ciereszko and Dabrowski, 1993; Rakitin et al., 1999, Tvedt et al, 2001). The relationship found between spermatocrit and sperm density in jundiá also recommends the use of spermatocrit as a simple, fast and cheap method of determining the sperm density in this fish.

Although the *Rhamdia quelen* have two reproductive peaks during the year (Barcellos et al., 2002), the results found indicate that in spring the spermatocrit, cell count, milt volume and total spermatozoa motility duration were higher than in other seasons, indicating a better milt quality. Therefore the information of the normal physical and chemical characteristics of seminal plasma of jundiá presented in this paper should help optimize the selecting process for high quality male donors for aquaculture operations.

Acknowledgements

A. Borges is a doctoral fellow of CNPq at the Department of Physiology, ICBS, UFRGS. This work was supported by grants from FAPERGS (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul), CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa), and PROPESQ-UFRGS (Pró-Reitoria de pesquisa, Universidade Federal do Rio Grande do Sul). The authors are grateful to E. Pires for maintenance of the best laboratory conditions.

References

- Barcellos, L.J.G., Wassermann, G.F., Scott, A.P., Woehl, V.M., Quevedo, R.M., Ittzés, I., Krieger, M.H. and Lulhier, F. 2001. Steroid profiles in cultured female Jundiá, the Siluridae *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaymard, Pisces Teleostei), during the first reproductive cycle. *General and Comparative Endocrinology* 121, 325-332.
- Barcellos, L.J.G., Wassermann, G.F., Scott, A.P., Woehl, V.M., Quevedo, R.M., Ittzés, I., Krieger, M.H. and Lulhier, F. 2002. Plasma steroid concentrations in relation to reproductive cycle of cultured male *Rhamdia quelen*. *Journal of Fish Biology* 61:751-763.
- Baynes, S.M., Scott A.P. and Dawson A.P. 1981. Rainbow trout, *Salmo gairdnerii* Richardson, spermatozoa: effects of cations and pH on motility. *J. Fish Biol.* 19:259-267.
- Baynes, S.M. and Scott, A.P. 1985. Seasonal variation in parameters of milt production and plasma concentration of sex steroid in male rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 57:150-160.

- Benau, D. and Ternier, C. 1980. Initiation, prolongation and reactivation of the motility of salmonid spermatozoa. *Gamete Res.* 3:247-257.
- Bergmeyer H.U. 1983. *Methods of Enzymatic Analysis*. Verlag Chemie. 118-125.
- Bergmeyer H.U., Scheibe P., Wahlefeld A.W. 1978. Optimization of methods for aspartate-aminotransferase and alanine aminotransferase. *clinical chemistry.* 24 (1): 58-73.
- Bergmeyer H.U., Horder M, Rej R. 1986. Approved recommendation on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes .IFCC method for aspartate-aminotransferase (l-aspartate - 2-oxoglutarate aminotransferase, EC-2611). *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry.* 24 (7): 497-510.
- Bergmeyer, H.U., Horder, M., Rej, R. 1986. Approved recommendation on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes . IFCC method for alanine aminotransferase (l-alanine - 2-oxoglutarate aminotransferase, EC-2612). *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry.* 24 (7): 481-495.
- Billard, R. 1975. L'insémination artificielle de la truite *Salmo gairdneri* Richardson. IV Effets des ions K^+ et Na^+ sur la conservation du pouvoir fécondant des gamètes. *Bull. Fr. Piscic.* 256:88-98.
- Borges, A., Scotti, L.V., Siqueira, D.R., Jurinitz, D.F. and Wassermann, G.F. 2004. Hematologic and serum biochemical values for jundiá (*Rhamdia quelen*). *Fish Physiology and Biochemistry.* 30:21-25.

- Bouck, G.R. and Jacobson, J. 1976. Estimation of salmonid sperm concentration by microhematocrit technique. *Trans. Am. Fish. Soc.* 105:534-535.
- Ciereszko, A. and Dabrowski, K. 1993. Estimation of sperm concentration of rainbow trout, whitefish and yellow perch using a spectrophotometric technique. *Aquaculture* 109:367-373.
- Ciereszko, A., Glogowski, J. and Dabrowski, K. 2000. Biochemical characteristics of seminal plasma and spermatozoa of freshwater fishes. In: *Cryopreservation in Aquatic Species*. pp 20-48. Edited by Tiersch, T.R. and Mazik, P.M. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana.
- Gomes, L.C., Golombieski, J.I., Gomes, A.R.C. and Baldisserotto, B. 2000. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). *Revisão Bibliográfica. Ciência Rural, Santa Maria*, v. 30: 179-185.
- Kaplan, A., Szabo, L.L., Opheim, K.E. 1988. *Clinical Chemistry: Interpretation and techniques*. Philadelphia: Lea and Febiger, 190-191.
- Kara, M. H., Derbal, F. and Labeled, S. 1996. Composition du liquide seminal de *Sparus aurata* au cours d'une saison de spermiation. *J. Appl. Ichthyol.* 12:69-70.
- Kime, D. and E. Tveiten, H. 2002. Unusual motility characteristics of sperm of the spotted wolffish. *Journal of Fish Biology* 61:1549-1559.
- Kruger, J.C. De W., Smit, G.L., Van Vuren, J.H.J. and Van Ferreira, J.T. 1984. Some physical and chemical characteristics of the semen of *Cyprinus carpio* L. and *Oreochromis mossambicus* (Peters). *J. Fish Biol.* 24: 263-272.

- Mansour, N., Lahnsteiner, F. and Berger, B. 2003. Metabolism of intratesticular spermatozoa of a tropical teleost fish (*Clarias gariepinus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 135:285-296.
- Morisawa M. 1985. Initiation mechanism of sperm motility at spawning in teleosts. *Zool. Sci.* 2, 605-615.
- Morisawa, M. and Suzuki, K. 1980. Osmolality and potassium ion: their role in initiation of sperm motility in teleosts. *Science* 210:1145-1147.
- Morisawa, M., Suzuki, K., and Morisawa, S. 1983. Effects of potassium and osmolality on spermatozoan motility of salmonid fishes. *J. Exp. Biol.* 107, 105-113.
- Mylonas, C.C., Papadaki, M. and Divanach, P. 2003. Seasonal changes in sperm production and quality in the red porgy *Pagrus pagrus* (L.). *Aquaculture Research*. 13:1161-1170.
- Perchee, G., Cosson, J., André and Billard, R. 1993. La motilité des spermatozoïdes de truite (*Oncorhynchus mykiss*) et de carpe (*Cyprinus carpio*). *Journal of Applied Ichthyology* 9, 129-149.
- Piironen, J. 1985. Variation in the properties of milt from the Finnish landlocked salmon (*Salmo salar m. sebago* Girard) during a spawning season. *Aquaculture*. 48:337-350.
- Rakitin, A., Ferguson, M. M. and Trippel, E. A. 1999. Spermatocrit and spermatozoa density in Atlantic cod (*Gadus morhua*): correlation and variation during the spawning season. *Aquaculture* 170:349-358.

- Sansone, G., Fabbrocini, A., Zupa, A., Lavadera, S. L., Rispoli, S. and Matassino, D. 2001. Inactivator media of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) spermatozoa motility. *Aquaculture* 202:257-268.
- Santos, J.E., Bazzoli, N., Rizzo, E. and Santos, G.B. 2001. Morphofunctional organization of the male reproductive system of the catfish *Iheringichthys labrosus* (Lütken, 1874) (Siluriformes: Pimelodidae). *Tissue & Cell* 33 (5): 533-540.
- Strüssmann, C. A., Renard, P., Ling, H. and Takashima, F. 1994. Motility of pejerrey *Odontesthes bonariensis* spermatozoa. *Fisheries Science* 60 (1):9-13.
- Suquet, M.; Billard, R.; Cosson, J.; Dorange, G.; Chauvaud, L.; Mugnier, C. and Fauvel, C. 1994. Sperm features in turbot (*Scophthalmus maximus*): a comparison with other freshwater and marine species. *Aquatic Living Resources*. 7:283-294.
- Tietz, N.W., Rinker, A.D., Shaw L.M.. 1983. IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. IFCC method for alkaline-phosphatase. *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*. 21 (11): 731-748.
- Tvedt, H. B., Benfey, T. J., Martin-Robichaud, D. J. and Power, J. 2001. The relationship between sperm density, spermatocrit, sperm motility and fertilization success in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*. *Aquaculture* 194:191-200.

Legends of the Figures

Figure 1

Climatic conditions in the region of Rolante, RS (Brazil) during the experimental period. (A) Photoperiod (hours of light) (B) Rainfall (mm) (C) Atmospheric temperature.

Figure 2

Influence of centrifugation time on spermatocrit in jundiá. Each point represents the mean of least 15 milt samples collected from 5 males.

Figure 3

Values of spermatocrit of jundiá during the year. One-way ANOVA followed by Bonferroni post-test as compared with summer, fall and winter * ($p < 0.05$) (Means \pm SEM) (n of fish are between brackets).

Figure 4

Values of cell counts of jundiá during the year. One-way ANOVA followed by Bonferroni post-test as compared with summer, fall and winter * ($p < 0.05$) (Means \pm SEM) (n of fish are between brackets).

Figure 5

Semen quantity which can be stripped during the year. One-way ANOVA followed by Bonferroni post-test as compared with fall and winter * ($p < 0.05$) (Means \pm SEM) (n of fish are between brackets).

Figure 6

Motility duration of jundiá sperm (in percentages of vigorous and straightforward moving spermatozoa) after activation with tank fresh water at room temperature (24°C). Each point represents the mean of least 45 milt samples collected from 15 males. Insert: Total duration

of spermatozoa motility during seasons. One-way ANOVA followed by Bonferroni post-test as compared with summer, fall and winter ^{*}($p < 0.05$)(Means \pm SEM) (n=15).

Figure 7

Influence of stocking time on the duration of sperm motility. The horizontal line represents the time after collection or storage period in hours after withdrawal of the semen at room temperature (24°C). One-way ANOVA followed by Bonferroni post-test as compared 3,4 and 5 hours ^{*}($p < 0.05$), as compared 5 hours ^{**}($p < 0.05$) (Means \pm SEM). n=5 (Each bar represents the mean of 15 milt samples collected from 5 males).

Figure 8

Motility of jundiá spermatozoa in different pHs. In pH3 the cell were precipitated and in pH12 the cells were completely dissolved. n=5 (Each bar represents the mean of 15 milt samples collected from 5 males).

Table 1. Methodology of enzyme assays

Enzyme	Method	Substrate	Ref.
Alanine aminotransferase	UV spectrophotometry	Pyridoxal phosphate	(Bergmeyer et al., 1978; 1986a)
Aspartate aminotransferase	UV spectrophotometry	Pyridoxal phosphate	(Bergmeyer et al, 1978; 1986b)
Alkaline phosphatase	Cinetic colorimetry	p-nitrophenyl phosphate	(Tietz et al., 1983; Kaplan et al, 1988)
Lactate dehydrogenase (LDH)	UV spectrophotometry	pyruvate	(Bergmeyer et al., 1983)

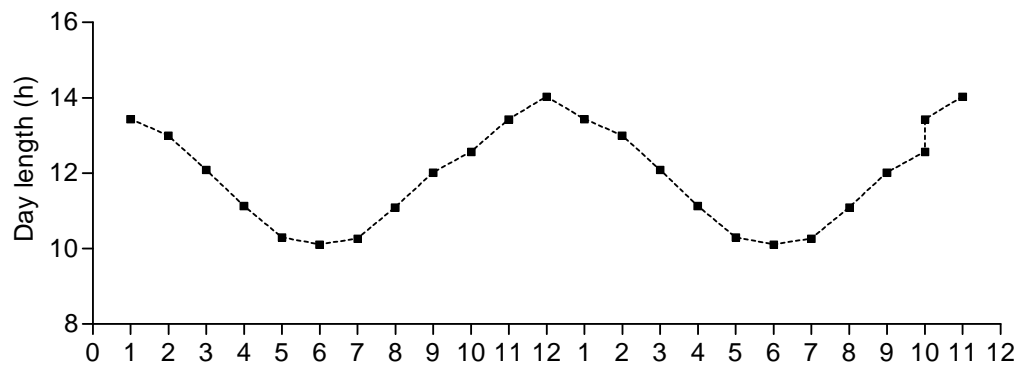
Table 2. Mean \pm SEM and Range of the seminal fluid and Mean \pm SEM blood serum biochemical values of males of jundiá

PARAMETERS	SEMINAL FLUID			BLOOD SERUM*	
	Mean \pm SEM	n	Range	Mean \pm SEM	n
Chloride (mEq/l)	139.4 \pm 2.1	21	125 – 149	123.0 \pm 1.0	23
Sodium (mEq/l)	153.7 \pm 2.4	20	142 – 162	139.6 \pm 0.6	25
Potassium (mEq/l)	10.7 \pm 0.5	21	8.0 – 14.1	2.3 \pm 0.2	22
Total Calcium (mEq/l)	4.2 \pm 0.2	20	5.8 – 12.4	6.9 \pm 0.15	21
Magnesium (mEq/l)	0.9 \pm 0.05	20	1.1 – 3.0	1.7 \pm 0.1	22
Phosphorus (mEq/l)	0.9 \pm 0.08	20	0.5 – 1.1	9.8 \pm 0.6	24
Creatinine (mg/dl)	0.8 \pm 0.06	19	0.4 – 1.0	0.12 \pm 0.06	39
Urea (mg/dl)	6.7 \pm 0.7	20	4 – 13	5.6 \pm 0.4	29
Acid uric (mg/dl)	0.24 \pm 0.02	18	0.1 – 0.4		
Total protein (g/dl)	0.6 \pm 0.05	19	0.2 – 0.9	4.2 \pm 0.1	20
Albumin (g/dl)	0.18 \pm 0.01	19	0.1 – 0.3	1.9 \pm 0.06	20
Globulin (g/dl)	0.42 \pm 0.03	19	0.1 – 0.6	2.3 \pm 0.08	20
Triglycerides (mg/dl)	10.9 \pm 0.8	18	6 – 14	427.3 \pm 49.5	28
Total cholesterol (mg/dl)	13.9 \pm 0.9	20	10 – 17	170.7 \pm 10.2	21
HDL-cholesterol (mg/dl)	3.3 \pm 0.4	17	1 – 6	81.8 \pm 1.8	22
LDL-cholesterol (mg/dl)	9.0 \pm 0.9	17	5 – 14	27.2 \pm 4.0	20
Total bilirubin (mg/dl)	0.2 \pm 0.01	20	0.1 – 0.2	0.28 \pm 0.02	21
Indirect bilirubin (mg/dl)	0.11 \pm 0.006	20	0.1 – 0.2	0.18 \pm 0.01	21
Direct bilirubin (mg/dl)	0.09 \pm 0.01	20	0.0 – 0.1	0.1 \pm 0.0	21
Alanine aminotransferase (ALP or GPT)(U/l)	8.9 \pm 0.6	20	5 – 13	34.5 \pm 2.2	38
Aspartate aminotransferase (AST or GOT) (U/l)	247.8 \pm 23.4	19	146 – 331	114.1 \pm 7.1	42
Alkaline phosphatase (U/l)	3.8 \pm 0.3	19	2 – 6	90.2 \pm 5.2	40
Osmolality (mOsm.kg ⁻¹)	274.8 \pm 11.2	5	231 – 295.1		
pH	8.7 \pm 0.07	9	8.5-8.8		
PH of milt	8.0 \pm 0.03	54	7.9-8.1		

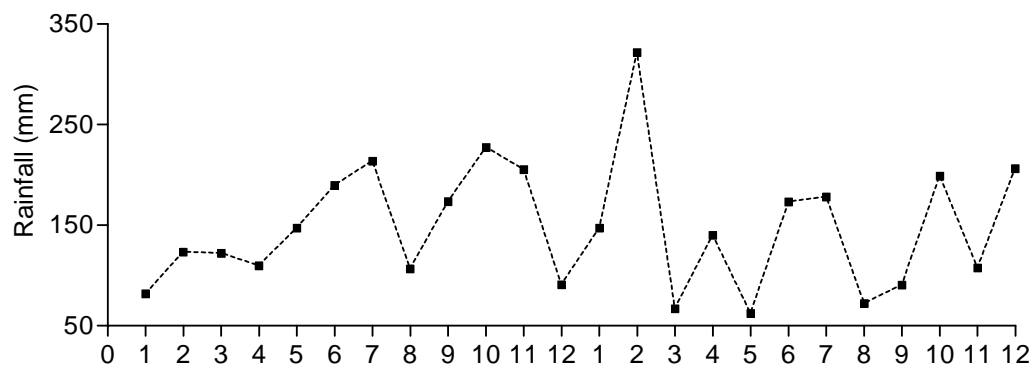
* Borges et al., 2004.

Fig.1

A.



B



C

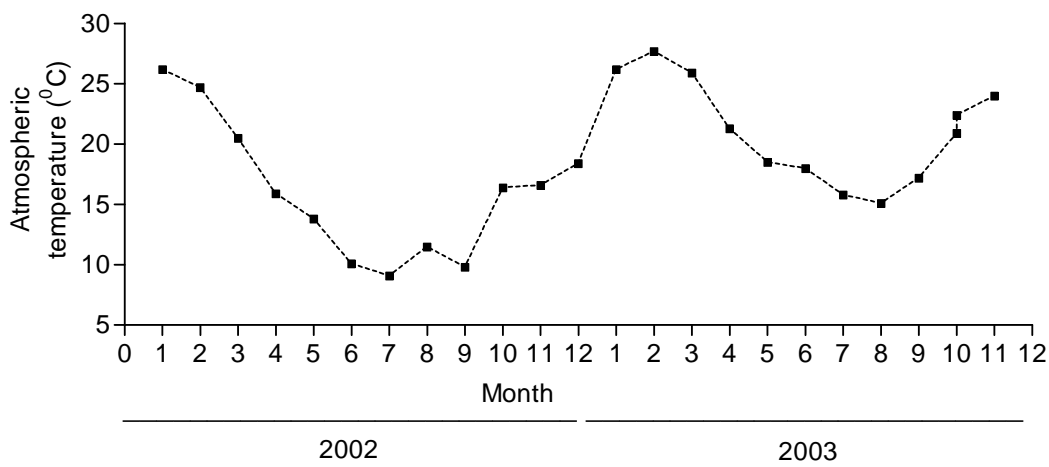


Fig.2

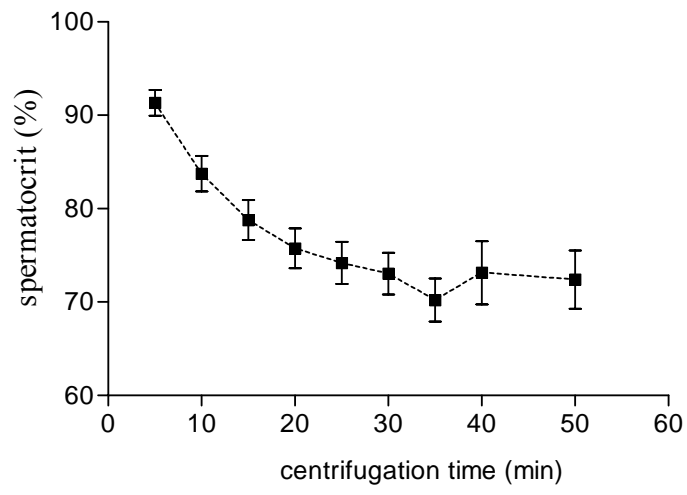


Fig.3

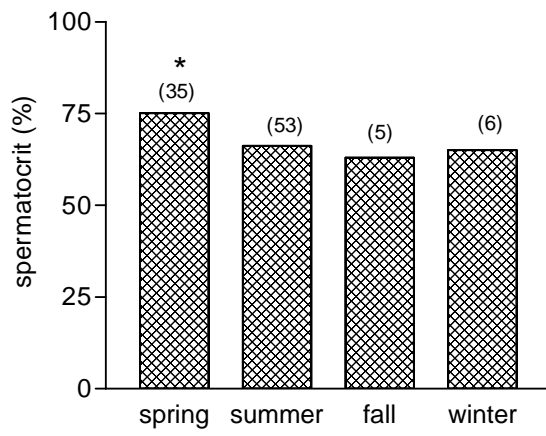


Fig.4

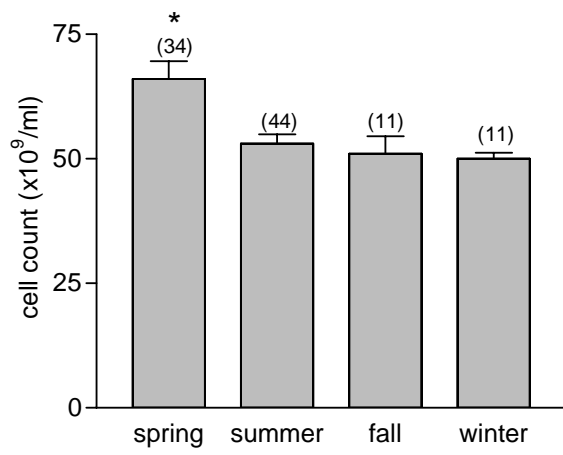


Fig.5

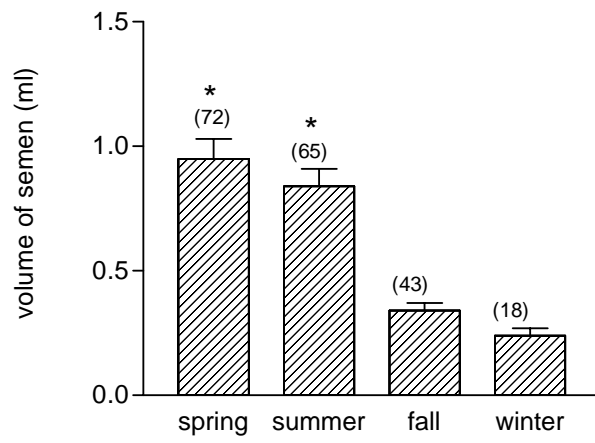
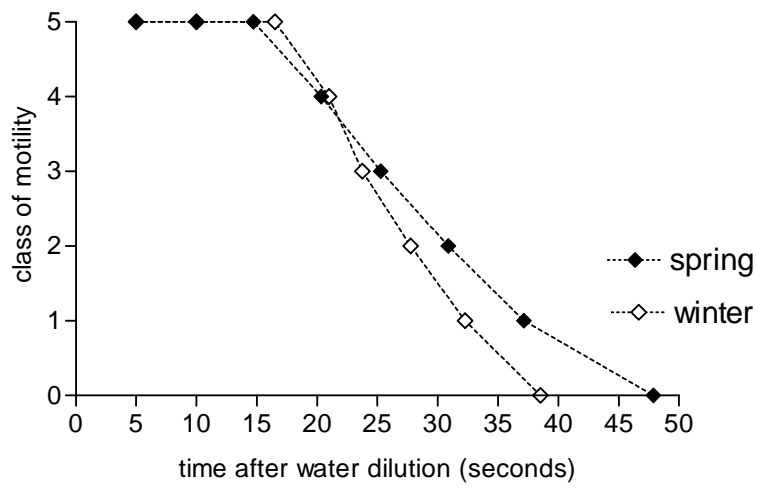


Fig.6



Insert:

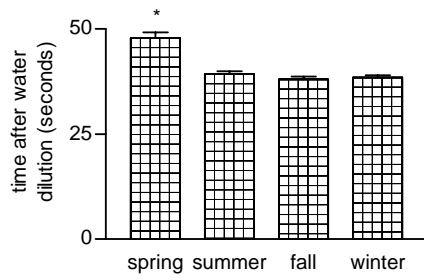


Fig. 7

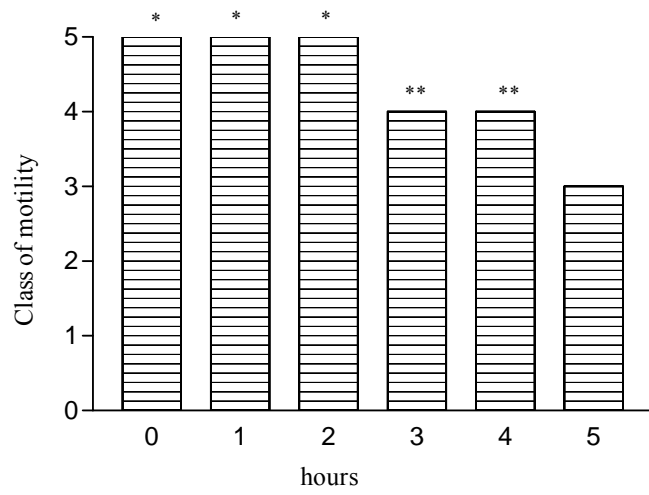


Fig. 8

