



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

FISIOLOGIA ANIMAL COMPARADA

JANAÍNA CAMACHO DA SILVA

**“EFEITOS DA OSMOLALIDADE E DO COBRE EM PARÂMETROS DE
QUALIDADE ESPERMÁTICA EM *Jenynsia multidentata* (ANABLEPIDAE-
CIPRINODONTIFORME)”**

RIO GRANDE-RS

Fevereiro, 2015

Janaína Camacho da Silva

“EFEITOS DA OSMOLALIDADE E DO COBRE EM PARÂMETROS DE QUALIDADE
ESPERMÁTICA EM *Jenynsia multidentata* (ANABLEPIDAE-
CIPRINODONTIFORME)”

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Ciências Fisiológicas – Fisiologia Animal
Comparada - PPGFAC da Universidade Federal do
Rio Grande - FURG, como requisito parcial à
obtenção do título de DOUTOR em Fisiologia Animal
Comparada.

Orientador: Carine Dahl Corcini

Coorientador: Elton Pinto Colares

Rio Grande - RS

2015

DEDICATÓRIA

Dedico esta Tese de Doutorado, bem como todas as conquistas em minha vida, a toda a minha família.

Em especial ao meu pai, **Glicério Marques da Silva** (*in memoriam*), meu maior incentivador aos estudos, mesmo sem nunca ter chegado a concluir o ensino médio.

A minha mãe, **Arlete Langorte Camacho**, minha alfabetizadora, de coração enorme e que acredita em mim quando até mesmo eu não acredito mais. Parabéns a ela, que depois dos 50 anos formou-se pedagoga, realizando o sonho de concluir uma graduação.

A minha irmã, **Sabrina Camacho da Silva**, que me conhece melhor que eu mesma, minha confidente, amiga, parceira e que esteve sempre presente, mesmo que distante fisicamente.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me permitir chegar até aqui. Não sem dificuldades, mas com saúde e com as pessoas que amo do meu lado;

Agradeço a FURG, ICB, PPG-FAC e CAPES, por me garantirem a estrutura de trabalho e de muitos momentos de lazer, como também o valor financeiro, porque sem bolsa, para mim, seria impossível concluir meu mestrado e doutorado;

Agradeço a todos os meus professores, desde a minha mãe no primário, até os discentes do programa de Pós-graduação em Fisiologia Animal Comparada. Todos, de alguma forma, me fizeram crescer profissionalmente, e muitos, pessoalmente também;

Agradeço a minha orientadora Carine Dahl Corcini e meu Co-orientador Elton Pinto Colares, pela aceitação da minha orientação, pela paciência, incentivo e encorajamento frente às dificuldades que surgiram, e que não foram poucas;

Agradeço ao professor Antonio Sergio Varela Junior, que muitas vezes fez o papel de orientador, e que com certeza me ensinou coisas que eu levarei para toda a minha vida;

Agradeço a todos os meus colegas de escola e Universidade, por compartilharem da minha trajetória acadêmica. Não poderia citar ninguém, sem citar todos.

Agradeço a todos os meus amigos, tanto presentes como ausentes, mas que acreditaram no poder da amizade e transformaram a minha caminhada mais feliz. Especialmente Suzana de Moura Pereira e Manoela Oliz, minhas amigas que estão mais presentes na minha vida nos últimos tempos;

Agradeço a todos os funcionários da FURG, especialmente aos técnicos (as) do ICB e as técnicas do Laboratório de Histologia. Além de ótimos profissionais, pessoas dedicadas, prestativas e que facilitaram e muito o trabalho feito;

Agradeço a Jessica Albaniz Sanchez e Marianna Basso Jorge, que me ajudaram na parte prática do trabalho, além de serem pessoas maravilhosas de se conviver e trabalhar;

Agradeço aos meus colegas de trabalho do grupo de pesquisa Reprodução Animal Comparada. Muito obrigada pela ajuda e pelas risadas;

E agradeço, finalmente, ao Professor Adalto Bianchini, pela ajuda financeira, intelectual e por ceder um pouco do seu tempo para enriquecer o meu trabalho.

RESUMO

O aumento populacional, urbanização e atividades industriais e agrícolas têm aumentado o aporte de poluentes em ecossistemas aquáticos. Para avaliar a qualidade da água e os efeitos dos poluentes na biota utiliza-se o biomonitoramento. Uma espécie de peixe nativa, vivípara e de pequeno porte potencialmente utilizável como biomonitora e modelo ecotoxicológico para espécies dulcícolas e estuarinas no país é a *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Ciprinodontiforme). Como a reprodução é uma das funções biológicas que podem ser afetadas pela poluição, e a qualidade dos espermatozoides pode contribuir para o sucesso reprodutivo, testes que avaliem sua qualidade produzem bioindicadores sensíveis e seguros de poluição aquática. Um dos parâmetros utilizados para medir a qualidade espermática é a motilidade, sendo esta influenciada principalmente pela osmolalidade do meio. Como não se encontrou estudos determinando a osmolalidade ideal para a *J. multidentata*, foi testado os efeitos de diferentes osmolalidades (240-460 mOsm/kg) da Solução Balanceada de Hanks (HBSS), na motilidade e outros parâmetros de qualidade espermática (potencial de membrana mitocondrial e integridade de membrana plasmática e DNA) em *J. multidentata*. Além disso, foi coletado sangue da artéria caudal e medida a osmolalidade plasmática. A osmolalidade plasmática em *J. multidentata* foi de $326 \pm 3,9$ mOsm/Kg. Osmolalidades entre 240 e 320 ativaram mais de 50% dos espermatozoides, sendo que as taxas de motilidade mais constantes e duradouras foram entre 300 e 320 mOsm/Kg (isosmoticidade), por até 7 dias. As maiores taxas de integridade de membrana foram entre 280-360 mOsm/Kg, potencial de membrana mitocondrial 300-460 mOsm/Kg, e as maiores taxas de integridade de DNA entre 260-380 mOsm/Kg no 4º dia de avaliação. Em 4 dias de avaliação, tanto a hipo (≤ 240 mOsm/Kg) ou hiperosmolalidade (≥ 460 mOsm/Kg) apresentaram as menores taxas de motilidade, integridade de membrana plasmática e integridade de DNA. O potencial de membrana mitocondrial foi reduzido somente na hipo-osmolalidade (≤ 240 mOsm/Kg) que também foi mais prejudicial a integridade de membrana plasmática. É provável que o estresse oxidativo gerado pelo choque osmótico seja um dos fatores que está reduzindo a qualidade espermática em meio não isosmótico, como relatada em mamíferos. Tendo definido a osmolalidade adequada do meio de armazenamento, foram

avaliado os efeitos do cobre na reprodução em machos de *J. multidentata*. O cobre é um metal essencial para os seres vivos, mas em concentrações elevadas torna-se tóxico. Uma das características conhecidas do cobre é a sua capacidade de provocar estresse oxidativo, e por suas características intrínsecas, os espermatozoides são suscetíveis a danos oxidativos. Como os mecanismos de toxicidade do cobre no sistema reprodutivo em peixes não estão elucidados, é possível que o estresse oxidativo seja um desses mecanismos. Sendo assim, avaliou-se os efeitos de concentrações ambientalmente de cobre presentes nos ecossistemas aquáticos de água doce (0, 4.5, 9 e 18 $\mu\text{g L}^{-1}$), de forma aguda (4 dias) e crônica (21 dias), em parâmetros de qualidade espermática (motilidade, potencial de membrana mitocondrial e integridade de membrana plasmática e DNA) e espermatogênese (concentração espermática) em *J. multidentata*. O ensaio bioquímico de lipoperoxidação foi utilizado como marcador de estresse oxidativo. Verificou-se aumento significativo (0,4907 $\mu\text{mol TMP/mg}$ de peso seco) ($p < 0,05$) deste marcador na exposição aguda e na maior concentração 18 $\mu\text{g L}^{-1}$, bem como redução da motilidade (61,22%) e potencial de membrana mitocondrial (6,33%) quando comparado ao controle. A concentração espermática também foi reduzida (47,38%), embora não significativamente, sendo que no grupo controle a concentração foi de $9,3 \times 10^6$ células por gônada. Por outro lado, a concentração de 4.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ provocou redução da integridade de membrana (7,81%), mesmo sem ter ocorrido lipoperoxidação. Portanto, o estresse oxidativo parece ser um dos mecanismos de toxicidade do cobre em exposições agudas na água doce, pelo menos em concentrações mais elevadas. Na exposição crônica não foram evidenciados aumentos de lipoperoxidação, mas a motilidade foi reduzida na concentração de 18 $\mu\text{g L}^{-1}$ (72,35%) e a concentração espermática na concentração 4.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ (44,67%) em relação ao controle ($p < 0,05$). Provavelmente, tanto os efeitos agudos e crônicos da menor concentração, como os efeitos crônicos na concentração superior, foram provocados por outro mecanismo de toxicidade do cobre que não o estresse oxidativo, como danos diretos em células e tecidos ou disfunção endócrina. Portanto, podemos concluir que osmolaridades entre 300-320 mOsm/Kg são as que mantiveram satisfatoriamente todos os parâmetros de qualidade espermática avaliados em *J. multidentata* por pelo menos 4 dias, e tanto a hiper quanto em hipo-osmolaridade são prejudiciais. A exposição ao cobre também afeta a qualidade dos espermatozoides e a espermatogênese, tanto aguda quanto

crônicamente, com exceção do DNA, que manteve sua integridade em ambas as concentrações e tempos experimentais. O estresse oxidativo parece ser o mecanismo de toxicidade aguda do cobre em concentrações elevadas. Portanto, parâmetros espermáticos podem ser utilizados tanto para avaliação dos efeitos da osmolalidade quanto como marcadores de exposição ao cobre na reprodução desta espécie.

Palavras chave: espermatozoide, estresse oxidativo, live-bearing, diluente, metais, poluição.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	OBJETIVO	24
2.1	Objetivos específicos	24
3	CAPÍTULO 1	25
	Effects of osmolality on sperm quality in <i>Jenynsia multidentata</i> (Ciprinodontiforme: Anablepidae)	
	ABSTRACT	26
	1. INTRODUCTION	26
	2. MATERIALS AND METHODS	28
	2.1. Collection and fish acclimation	28
	2.2. Collection of sperm	28
	2.3. Storage of sperm in HBSS with different osmotic pressures	28
	2.4. Motility	29
	2.5. Plasma membrane integrity	29
	2.6. Mitochondrial membrane potential	29
	2.7. DNA Integrity	30
	2.8. Statistical analysis	30
	3. RESULTS	30
	3.1. Plasma osmolality and Motility	30
	3.2. Plasma membrane integrity	31
	3.3. Mitochondrial Membrane Potential	31
	3.4. DNA Integrity	31

4. DISCUSSION	31
5. CONCLUSION	36
6. REFERENCES.....	36
4 CAPÍTULO 2	51
Sperm functionality in freshwater viviparous guppy <i>Jenynsia multidentata</i> (Anablepidae) acutely and chronically exposed to waterborne copper	
ABSTRACT	52
1. INTRODUCTION	53
2. MATERIAL AND METHODS	55
2.1. Fish collection and acclimation	55
2.2. Copper exposure	56
2.3. Cu accumulation analysis	57
2.4. Sperm functionality analysis	58
2.5. Lipid peroxidation analysis	60
2.6. Water chemistry analyses	60
2.7. Data presentation and statistical analysis	61
3. RESULTS	61
3.1. Water chemistry analyses	61
3.2. Cu accumulation, survival, biometric analyses.....	62
3.3. Sperm quality analyses	63
3.4. Lipid peroxidation (LPO) analyses	64
4. DISCUSSION	64
5. ACKNOWLEDGMENTS	69
6. REFERENCES	70
5 DISCUSSÃO GERAL	89
6 REFERENCIAS	96

1 INTRODUÇÃO

O aumento das atividades antropogênicas como agricultura, indústria e o crescimento urbano tem provocado um aporte de poluentes nos ecossistemas aquáticos. Poluentes ambientais tais como metais, pesticidas, e outros compostos orgânicos apresentam riscos graves para muitos organismos aquáticos (SCOTT E SLOMAN, 2004). Sendo assim, a qualidade da água não pode ser adequadamente avaliada simplesmente mensurando-se alterações em parâmetros físico-químicos, uma vez que alterações nestes parâmetros podem estar influenciando o conjunto de seres vivos que vivem nestes ambientes. Neste contexto surge o biomonitoramento, que consiste em utilizar respostas biológicas para avaliar as mudanças na qualidade da água e seus efeitos para a biota. O biomonitoramento, portanto, fornece informações sobre a presença de poluentes, seus efeitos na biota e oferece suporte a políticas ambientais.

Para o biomonitoramento ambiental, utilizam-se organismos denominados biomonitores (ou bioindicadores), os quais são capazes de responder ao estresse, em decorrência da exposição a agentes poluentes (ZHOUA et al., 2008). Espécies de peixes são consideradas como biomonitores adequados, devido a sua importância econômica e ecológica (JIRAUNGKOORSKUL et al., 2002). Por estarem presentes em praticamente qualquer corpo d'água e possuírem uma variedade de nichos ecológicos entre as espécies (VAN DER OOST et al., 2003), os peixes estão expostos continuamente a vários poluentes que adentram os ecossistemas aquáticos via descargas urbanas e industriais ou drenagem agrícola (RASHED, 2001). Além disso, as mudanças a nível celular e bioquímico em peixes estão entre as respostas biológicas mais sensíveis verificadas após a exposição a poluentes aquáticos (GLUSCZAK et al, 2007; SANDRINI et al, 2013).

Uma espécie que vem sendo utilizada com sucesso como modelo bioindicador na avaliação dos efeitos de poluentes no ambiente aquático é a *Jenynsia multidentata*, Anablepidae, Ciprinodontiforme (Figura 1) (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION [APHA] 1998; CAZENAVE et al., 2005; BALLESTEROS et al., 2007, 2011; HUED et al., 2012, 2013;). Esta é uma espécie neotropical amplamente distribuída na América do Sul (MALABARBA et al., 1998) e teve sua inclusão solicitada pelo Instituto Argentino de Padronização e Certificação (IRAM, 2007) como uma espécie nativa adequada para determinação da toxicidade letal aguda a diferentes compostos químicos. Além de habitar uma diversidade de ambientes, a *J.*

multidentata possui uma biologia reprodutiva caracterizada pela viviparidade e fecundação interna, fazendo com que esta espécie possa estar sendo afetada de maneira diferenciada pelos poluentes lançados nos ecossistemas aquáticos. Estas características, associadas a sua abundância e tamanho reduzido (facilitando sua manutenção em condições experimentais) fazem com que a *J. multidentata* seja um possível biomonitor e modelo ecotoxicológico para espécies dulcícolas e estuarinas no país.

Figura 01- Foto de um macho da espécie *Jenynsia multidentata*.



Fonte:Google imagens

Sendo a reprodução um dos fatores influenciados pelo aumento da poluição nos ambientes de água doce, a identificação de parâmetros responsivos e que forneçam respostas precoces à poluição torna-se uma necessidade. Segundo Kime et al. (1996) a qualidade dos espermatozoides é um dos fatores que podem contribuir para o sucesso reprodutivo de uma espécie, e testes que possam medir sua qualidade produzem um bioindicador sensível e seguro para a poluição aquática. Como os programas atuais de monitoramento de sistemas aquáticos requerem a integração entre análises químicas e ensaios biológicos que avaliem os efeitos dos diferentes contaminantes nos organismos (COUTLAUD et al., 2011; MACOVA et al., 2010), testes de qualidade espermática podem ser considerados como promissores ensaios de toxicidade para avaliação da qualidade ambiental (FABBROCINI et al., 2012), e têm sido utilizados para avaliação dos efeitos de diferentes poluentes na reprodução (LAHENSTEINER et al., 2004; JENKINS et al., 2006; HARAYASHIKI et al., 2013; LOPES et al., 2014).

Por apresentarem uma diversidade de espécies (em torno de 25.000 espécies) e habitarem uma grande variedade de ambientes, os peixes apresentam diferentes estratégias para alcançar o sucesso reprodutivo, incluindo gametas que são liberados no ambiente aquático (ovíparos com fecundação externa: a maioria dos peixes teleósteos), ou espermatozoides introduzidos no trato reprodutivo

feminino (fecundação interna), fertilizando ovos (ovovivíparos) ou com gestação interna de embriões (vivíparos) (VIZZIANO et al., 2008).

Estas diferentes estratégias reprodutivas determinam, por exemplo, modos de ativação e inibição da motilidade diferentes. No fluido seminal, os espermatozoides de peixes teleósteos são imóveis, e durante a reprodução natural, a motilidade é ativada após liberação dos espermatozoides no ambiente aquático (espécies ovíparas com fecundação externa) ou no trato genital feminino (espécies vivíparas e ovovivíparas com fecundação interna) (STOSS, 1983; BILLARD, 1986; BILLARD e COSSON 1990; CIRIESZKO et al., 2000). Por outro lado, em condições artificiais, é necessário uma solução de armazenamento para as células espermáticas, e um dos principais fatores que podem afetar a qualidade espermática é a pressão osmótica (osmolalidade), além do pH e composição iônica (MORISAWA e SUZUKI, 1980; ALAVI e COSSON, 2006; ALAVI et al., 2009).

A osmolalidade é a estimativa da concentração molar do plasma ou de outra solução, e é proporcional ao número de partículas por quilograma de solvente, expressa como mOsm/Kg (miliosmois). Como as membranas celulares são geralmente permeáveis à água, a osmolalidade gera uma força associada ao movimento da água, chamada pressão osmótica (MOYES e SHULTE, 2010). A pressão osmótica do fluido extracelular é aproximadamente igual à do fluido intracelular. Portanto, a osmolalidade do plasma sanguíneo pode ser usado como um guia para a osmolalidade intracelular, e mostra que alterações na osmolalidade extracelular exerce grande influência na osmolalidade intracelular.

Nas espécies ovíparas, os espermatozoides são ativados quando expostos a um meio hiperosmótico (peixes marinhos) ou hiposmótico (peixes de água doce) e permanecem imóveis em meio isosmótico (COSSON et al., 1999; CIRIERESZKO et al., 2000; COSSON, 2004; ALAVI e COSSON, 2006; COSSON, 2008). O tempo de duração da motilidade espermática também é muito curta e variada entre estas espécies. Em peixes de água doce, por exemplo, pode variar de 30-40 segundos, como em carpa *Cyprinus carpio* (BILLARD et al., 1995), até 486 segundos em pacu *Piaractus mesopotamicus* (MARIA et al., 2005).

O contrário tem sido descrito para algumas espécies de poecilídeos com fecundação interna, nos quais os espermatozoides são ativados em osmolalidades

próximas a osmolalidade plasmática (isosmótico), tornando-se imóveis em meio hipo ou hiperosmótico, além de a motilidade ser mantida por horas ou até dias (MORISAWA e SUZUKI, 1980; HUANG et al., 2004ab; YANG et al., 2006; SUN et al., 2010). No entanto, segundo Yang e Tiersch (2012), o modo de ativação descrito em poecilídeos não é representativa para todos os vivíparos, como em *Xentoca eiseni* da família Goodeidae (dados não publicados), e isso se deve ao fato de a viviparidade ter se desenvolvido independentemente em vários grupos e apresentar adaptações diferentes para resolver o problema da fertilização interna.

A morfologia e fisiologia dos espermatozoides de espécies vivíparas também são diferentes das espécies ovíparas, possuindo cabeça alongada, bainhas mitocondriais bem desenvolvidas na peça intermediária e atividade glicolítica comparável à encontrada em espermatozoides de mamíferos (GARDINER, 1978; STOSS, 1983; JAMIESON, 1991). Provavelmente, estas características sejam uma adaptação à sobrevivência dos espermatozoides em longo prazo no trato reprodutivo da fêmea após a cópula, uma vez que espécies vivíparas podem armazenar os espermatozoides vivos por meses até a fecundação dos oócitos maduros (POTTER e KRAMER, 2000).

Portanto, podemos observar que a osmolalidade é um dos principais fatores que influenciam a motilidade, tanto em espécies de fecundação externa quanto interna. No entanto, como maioria dos peixes teleósteos é ovípara com fecundação externa, os estudos dos efeitos da osmolalidade na ativação e inativação das células espermáticas concentra-se nestas espécies (ALAVI e COSSON, 2006; ALAVI et al., 2009). Os poucos trabalhos com espécies de fecundação interna são limitados a poecilídeos (MORISAWA e SUZUKI, 1980; HUANG et al., 2004; HUANG et al., 2009; YANG et al., 2006; SUN et al., 2010) e em ambas as espécies limitam-se a motilidade.

Além de alterações da motilidade, células submetidas à diferenças de pressão osmótica tendem a sofrer inúmeras alterações pelo fluxo de água e íons, na tentativa de manutenção da homeostasia, e que podem terminar por provocar apoptose. De acordo com Moyes e Shulte (2010), os animais possuem diversos sistemas homeostáticos de manutenção da composição iônica e osmótica, e variações nestes parâmetros podem afetar tanto a estrutura como a função de macromoléculas, como a concentração interna de metabólitos e enzimas prejudicando a regulação metabólica. Mas talvez os efeitos mais drásticos sejam de alteração do volume

celular. Variações de volume podem deformar o citoesqueleto e a membrana, alterando a função de receptores e transportadores. Em condições severamente hipotônicas, as células podem simplesmente explodir. Sendo assim, a utilização da osmolalidade adequada do meio artificial para armazenamento dos espermatozoides é imprescindível, e além da motilidade, outros parâmetros de qualidade espermática poderão ser avaliados.

Como o funcionamento normal dos espermatozoides está intimamente relacionado com a fertilidade, alguns testes são realizados para avaliar a qualidade espermática de machos, principalmente em estudos sobre os efeitos do processo de criopreservação. No entanto estes trabalhos têm relatado variações individuais em parâmetros avaliados, tais como: concentração espermática, motilidade, composição do plasma seminal, capacidade fertilizante e de armazenamento (RANA, 1995). Recentemente, testes mais precisos estão sendo incluídos, especialmente aqueles utilizando tecnologias fluorescentes. De acordo com (CABRITA et al., 2014), danos em membrana plasmática, mitocôndria, DNA e RNA podem ser usados como marcadores de qualidade espermática mais precisos, identificando alterações na motilidade dos espermatozoides, habilidade de fertilização, desenvolvimento embrionário e aptidão da progênie, sendo que técnicas utilizando microscopia de fluorescência mostram-se efetivas para avaliar estes parâmetros (PETRUKINA et al. 2003a, b; RATH et al. 2006; PETRUKINA e HARRISON 2013). Essas tecnologias se baseiam na propriedade marcadora de moléculas que emitem fluorescência nos seus estados excitados, criados por absorção de luz, e sua vantagem está na capacidade de identificar a localização topográfica do sinal fluorescente em células individuais (PETRUKINA e HARRISON, 2013).

A microscopia de fluorescência já foi amplamente utilizada para avaliar as propriedades funcionais dos espermatozoides de mamíferos como, por exemplo, defeitos na cromatina, integridade de membrana, integridade do acrossoma, fosforilação de proteínas, danos oxidativos e funcionalidade mitocondrial (HARRISON E VICKERS 1990; CHENG et al. 1996; PETRUKINA et al. 2003a, b; RATH et al. 2006). Por outro lado, em peixes, a avaliação de parâmetros de qualidade espermática por microscopia de fluorescência começou a ser utilizadas recentemente em processos de criopreservação (VARELA JUNIOR et al., 2012), e

mais recentemente ainda com outras finalidades, como por exemplo, para avaliar parâmetros espermáticos em machos de *zebrafish* transgênico que super expressavam o hormônio do crescimento (GH) (FIGUEIREDO et al., 2013), em *zebrafish* expostos ao glifosato, um herbicida sistêmico e não seletivo utilizado mundialmente na agricultura (LOPES et al., 2014.), e efeitos do Roundup, um herbicida a base de glifosato, em *Poecilia vivípara* (HARAYASCHIKI et al., 2013). Portanto, tanto os testes clássicos como os que se utilizam da microscopia de fluorescência são potencialmente utilizáveis para a avaliação dos efeitos da osmolalidade nas células espermáticas, bem como os efeitos de poluentes que afetem a reprodução em machos.

Entre os testes clássicos mais utilizados podemos destacar a motilidade e a concentração espermática. A motilidade determina a porcentagem de células com movimentação progressiva, medindo indiretamente a atividade metabólica das células espermáticas e permite a chegada dos espermatozoides até o oócito. Sendo assim, a motilidade é um dos principais parâmetros a serem considerados na análise da qualidade seminal de peixes, embora espermatozoides inférteis tenham apresentado algum tipo de motilidade, (BILLARD et al, 1995). Ela é amplamente utilizada na avaliação da manutenção da integridade desta célula nos processos de criopreservação (e.g. WATSON, 2000; HUANG et al., 2009; VARELA JUNIOR et al., 2012) e também na avaliação dos efeitos de poluentes aquáticos na reprodução (LAHENSTEINER et al., 2004; HARAYASHIKI et al., 2013).

A concentração espermática é outra medida quantitativa importante na pesquisa e rotina de avaliação do sêmen de peixes, tanto de fecundação interna quanto externa (FOGLI DA SILVEIRA et al., 1987). Ela fornece informações sobre o processo da espermatogênese, uma vez que fatores que perturbem a espermatogênese influenciam diretamente a produção e/ou qualidade espermática (EIDI et al., 2010). Pode ser expressa como a quantidade de espermatozoides por ml de sêmen ou total, podendo ser determinada por contagem em câmaras volumétricas, mediante diluição do sêmen em uma solução que imobilize e conserve as células, como as utilizando formol (FELIZARDO et al., 2010).

Por outro lado, entre os testes mais recentes utilizando epifluorescência, podemos citar a integridade da membrana plasmática, potencial de membrana mitocondrial e integridade do DNA. A membrana plasmática é a estrutura que envolve completamente o espermatozoide (PESCH e BERGMANN, 2006),

possuindo importante função na manutenção da homeostase celular, e atuando como barreira entre os meios interno e externo (AMMAN e PICKET, 1987). Em condições de estresse, as membranas podem sofrer rearranjos formando pontos vulneráveis induzindo a excessiva permeabilidade ou rompimento, além de ocorrer à transição dos lipídeos, a qual altera o estado funcional da membrana (HOLT, 2000). Desta forma a integridade da membrana plasmática é de fundamental importância para função espermática, pois somente uma célula intacta é capaz de sofrer determinados mecanismos fisiológicos no trato reprodutivo da fêmea, necessárias à fertilização do oócito (WATERHOUSE et al., 2004; WABERSKI et al., 2008; VALLORANI et al., 2010). Para avaliar a integridade da membrana plasmática (ou viabilidade), pode-se utilizar fluorocromos que diferenciem entre tipos celulares intactos ou danificados, como diacetato decarboxifluoresceína (CFDA) e iodeto de propídio (IP). O CFDA em membranas intactas sofre um processo de hidrólise transformando-se em carboxifluoresceína, a qual consegue penetrar a membrana e se acumula nos compartimentos celulares, emitindo fluorescência verde. Em células com membranas danificadas não ocorre a hidrólise do CFDA, portanto, não acumulam carboxifluoresceína. Por outro lado, o IP que não passa por membranas intactas, consegue penetrar nas células danificadas e se liga ao núcleo das células, passando a emitir fluorescência vermelha (HARRISON e VICKERS, 1990).

Outro parâmetro importante de qualidade espermática é a funcionalidade mitocondrial. A mitocôndria tem sido alvo de estudos mais intensos nas últimas duas décadas por ser essencial para a fisiologia espermática, sendo responsável pela produção da maior parte da energia que possibilita o movimento celular, a partir da geração de ATP, e potencial transmembrana está relacionado com a capacidade da mitocôndria para produzir ATP via fosforilação oxidativa (PETRUKIA e HARRISON, 2013). A mitocôndria também é a responsável pela maior parte da produção endógena de ROS e regula a apoptose celular (COPELAND, 2002). Altos níveis de ROS perturbam a integridade da membrana iniciando a cascata apoptótica (ARGAWAL e PRABAKARAM, 2005). Além disso, durante a espermatogênese, o número de mitocôndrias é reduzido e, portanto, alterações no potencial de membrana mitocondrial ou mutações no mtDNA podem interferir nas características espermáticas e na fertilidade masculina (CÂMARA e GUERRA, 2008). As mudanças

no potencial de membrana mitocondrial podem ser acompanhadas usando fluorocromos como a Rhodamina (Rh 123), onde células com potencial mitocondrial alto apresentam fluorescência verde intenso, enquanto células com potencial reduzido não apresentam fluorescência (GILLAN et al., 2005; ROBLES e MARTINEZ-PASTOR, 2013).

A avaliação da integridade do DNA também está sendo cada vez mais utilizado em pesquisas sobre a função reprodutiva. A manutenção da cromatina espermática (compacta e estável) é extremamente importante, pois permite que o DNA paterno transportado se fusione com o materno proporcionando a fertilização e desenvolvimento do embrião (FRASER e STRZEZEK, 2007). Há várias técnicas que podem determinar a fragmentação do DNA, entre elas, o laranja de acridina (TSAKMAKIDIS et al., 2010). O laranja de acridina é um corante metacromático utilizado na microscopia de epifluorescência ou citometria de fluxo, e emite fluorescência de coloração vermelho-alaranjado em espermatozoides com DNA desnaturado e verde em DNA íntegro, fornecendo desta forma uma medida do *status* de condensação da cromatina (FRASER e STRZEZEK 2007; BOE-HANSEN et al., 2008; PETRUKINA e HARRISON, 2013).

Entre os principais poluentes dos ecossistemas aquáticos que podem estar causando impactos negativos nas células espermáticas de peixes estão os metais. Os metais são uma parte essencial da nossa economia, pois devido às suas propriedades exclusivas como condutividade, maleabilidade, brilho e reciclagem, fornecem matérias-primas fundamentais para a infraestrutura e fabricação de produtos. Sendo assim, sua demanda deverá continuar crescendo nos países em desenvolvimento, devido à rápida industrialização, e nos países desenvolvidos pela exigência do uso de metais nas tecnologias modernas (VAN DER VOET et al., 2013). No entanto, a produção e utilização de metais estão associadas com potenciais impactos ambientais por se tratarem de poluentes conservativos, não biodegradáveis e que atravessam um ciclo hidrológico global, tendo a água como principal caminho (TAM e WONG, 1995). A contaminação aquática por metais é um dos principais problemas em muitas cidades com rápido crescimento, uma vez que a manutenção da qualidade da água e saneamento não acompanharam o crescimento populacional e urbanização, especialmente em países em desenvolvimento (SUNDARAY et al., 2006; KARBASSI et al., 2007; AKOTO et al., 2008; AHMAD et al., 2010).

Os metais poluentes mais comuns enumerados pela Agência de Proteção Ambiental (EPA) são: As (arsênio), Cd (cádmio), Cr (cromo), Cu (cobre), Hg (mercúrio), Ni (níquel), Pb (chumbo), e Zn (zinco) (ATHAR E VOHORA, 2001), e suas principais fontes antropogênicas de contaminação são: mineração, eliminação de efluentes não tratados ou parcialmente tratados contendo metais tóxicos, quelatos metálicos de diferentes indústrias e o uso indiscriminado de fertilizantes e pesticidas contendo metais em áreas agrícolas (HATJE et al., 1998 , AMMANN et al., 2002; NOURI et al., 2006, 2008). Nos ecossistemas brasileiros, a contaminação ocorre em diferentes regiões, como exemplificado na Tabela 1.

Tabela 1 . Alguns exemplos de contaminação por metais em ecossistemas brasileiros.

Local	Metais	Fonte	Autor
Baixo Jacuí – RS	Fe, Cu, Co, Cr, Ni	Processamento de carvão e aço	Teixeira et al., 1997
Rio dos Sinos – RS	Cu, An, Cr, Cd, Pb	Efluentes industriais	Hatje et al., 1998
Conselheiro Lafaiet – MG	Mn, Fe, Cd, Cu, Ni e Cr	Mineração	Jordão et al., 1999
Ilha de Santa Vitória – ES	Cu, Pb, Zn, Mn e Hg.	Efluentes domésticos e industriais	Jesus et al., 2004.
Caçapava – SP	Pb, Cu, Cd, Zn	Área industrial	Costa et al., 2008
Baía de Guanabara- RJ	Cu e Zn	Atividade Naval	Fonseca et al., 2009
Rio Piracicaba- SP	Zn, Cr, Ni, Cu, Pb	Plantação de cana-de-açúcar e esgoto.	Mortatti e Probst, 2010.

Fonte: Próprio autor

Alguns desses metais como o Cu, Fe (ferro), Mn (manganês), Ni e Zn são essenciais como micronutrientes para muitos processos vitais em animais e plantas, enquanto outros como Cd, Cr, Pb e Co (cobalto) não têm atividades fisiológicas conhecidas (KAR et al., 2008; SUTHAR E SINGH, 2008;. AKTAR et al, 2010). Embora muitos sejam essenciais, todos são tóxicos em concentrações elevadas (GHOSH E SINGH, 2005), sendo que a toxicidade de cada metal é variável, dependendo das suas características, concentração, forma química e biodisponibilidade (REZENDE e LACERDA, 1986; CHAPMAN et al., 1996).

O Cu é um metal considerado nutriente essencial para uma série de funções fisiológicas e reações bioquímicas nos seres vivos. Ele é encontrado em todos os

organismos no seu estado oxidado Cu^{2+} e reduzido Cu^+ , e a transição entre estes diferentes estados de oxidação permite sua participação em diversas atividades catalíticas próprias da transferência de elétrons (UAUY et al., 1998). Ele atua como cofator de metaloenzimas e suas respectivas funções: produção de energia (citocromo c oxidase), proteção de celular contra radicais livres (superóxido dismutase), neurotransmissores (dopamina hidroxilase e monooxigenase α -amidante de peptidil glicina), síntese de colágeno (lisil oxidase) e produção de melanina (tirosinase) (LALL, 2002; BREWER, 2009). O Cu também desempenha papel importante na regulação da expressão gênica. Vários estudos demonstram a existência de fatores de transcrição regulados pelo cobre (elementos que respondem a metais – MRE) (UAUY et al., 1998).

Além de ser um elemento essencial aos organismos, o Cu metálico é maleável, dúctil e um bom condutor térmico e elétrico, e devido a essa versatilidade, tem várias aplicações comerciais. Também é utilizado como algicida, fungicida e molusquicida, o que o torna um dos metais mais tóxicos para estes organismos. Por sua ação algicida, a aplicação de sulfato de cobre (CuSO_4) em represas no Brasil para o controle da floração de algas é frequente, e isso pode refletir numa possível contaminação da comunidade aquática nesses ambientes (SOLOMON, 2009).

Por serem receptores finais de efluentes industriais e urbanos, escoamento da água da chuva e deposição atmosférica (NRIAGU 1979, DAVIS et al., 2000), ecossistemas aquáticos são suscetíveis à poluição causada pelo Cu, e podem fornecer os primeiros sinais de alerta para os efeitos do excesso de poluição ambiental (KIME et al., 1996). A combustão de combustíveis fósseis e utilização de produtos anti-incrustantes, como tintas e conservantes de madeiras, também contribuem para o aumento dos níveis de Cu nos ecossistemas aquáticos (GROSELL, 2012). Segundo Alberta Environmental Protection (1996) concentrações de Cu em rios variam de 0.6 a $400 \mu\text{g.L}^{-1}$, com uma média de $10 \mu\text{g.L}^{-1}$.

Em muitos países, inclusive no Brasil, a regulamentação da emissão do Cu está baseada na concentração total do metal presente em efluentes e/ou no ambiente (FEPAM, 1995; CONAMA, 2005), e o Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) estabeleceu o valor de $9 \mu\text{g Cu.L}^{-1}$ para água doce do tipo 1 e 2 - consumo, recreação, irrigação, proteção das comunidades aquáticas e aquicultura (CONAMA, 2005).

No ambiente, o cobre pode ser encontrado em quatro diferentes estados de oxidação: cobre elementar (Cu^0), íon cuproso (Cu^{1+}), íon cúprico (Cu^{2+}) e íon trivalente (Cu^{3+}). O cobre elementar é pouco solúvel em água, enquanto o íon cuproso é altamente instável, sendo rapidamente dissociado em cobre metálico ou íon cúprico. Cu^{2+} é o estágio de oxidação mais prevalente do cobre em água doce, e também com maior potencial tóxico aos organismos aquáticos, por ser mais solúvel e reativo. Porém, fatores como dureza, alcalinidade, pH, oxigênio dissolvido (OD), matéria orgânica dissolvida (MOD) e temperatura da água afetam a sua toxicidade (GROSELL, 2012). No entanto, em água doce, com baixa alcalinidade, livre de substâncias orgânicas e pH baixo, o potencial tóxico do Cu é alto.

Níveis seguros de contaminantes para peixes são geralmente difíceis de serem estabelecidos, principalmente devido a variação na sensibilidade apresentada por cada espécie (DWYER et al., 2005). Na água doce, valores de 96 h LC50 para o Cu pode variar entre $2.7 \mu\text{g L}^{-1}$, para o salmonídeo *Arctic grayling*, dureza 41 mg L^{-1} (BUHL e HAMILTON, 1990) e $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ para *Lepomis macrochirus*, concentração de oxigênio dissolvido em torno de $8,0 \text{ mg L}^{-1}$, pH 7.0, alcalinidade 28 mg L^{-1} e dureza $40,2 \text{ mg L}^{-1}$ (TOMPSON et al., 1980). Já para a espécie vivípara *Poecilia reticulata*, a 96 h LC50 foi de $37,9 \mu\text{g L}^{-1}$ em pH 6.5, oxigênio dissolvido $6,3 \text{ mg L}^{-1}$, dureza $15,6 \text{ mg L}^{-1}$ (SHUHAIMI-OTHMAN et al., 2010). Mecanismos de regulação da homeostasia iônica espécie-específicos, bem como adaptações às condições ambientais locais podem estar relacionados às diferenças de sensibilidade encontrada em organismos aquáticos (DUARTE et al., 2009). Além das diferenças de sensibilidade entre as espécies, os efeitos tóxicos do cobre variam dependendo do estágio de desenvolvimento, idade, tamanho, atividade, ciclo reprodutivo e status nutricional dos animais (PELGROM, 1994). Apesar de as estimativas de toxicidade do Cu variarem entre espécies, estágios de vida e qualidade da água, valores entre 2 e $14 \mu\text{g.L}^{-1}$ são típicos em peixes de água doce (BRIX et al., 2001).

Sistemas homeostáticos sofisticados fazem o balanço entre deficiência e excesso de Cu nos organismos, ocorrendo toxicidade quando esses sistemas, dentro de um determinado compartimento, são sobrecarregados e/ou quando os mecanismos de reparo celular são destruídos (GROSSEL, 2012). Os efeitos adversos do excesso de Cu são variados. Em peixes de água doce, os mais

evidentes são na iono-osmorregulação (e.g. BLANCHARD AND GROSELL, 2005, 2006; GROSELL et al., 2007). Nas exposições agudas o Cu tem como principal alvo as brânquias, interferindo nos processos respiratórios pelo aumento da distância de difusão, e iono-osmorregulatórios, por inibição de processos chave na manutenção da homeostase iônica e osmótica, tais como a Na^+/K^+ ATPase (MALLAT, 1985; WOOD, 2001; GROSELL et al., 2007). Em peixes de água doce, a Na^+/K^+ ATPase é responsável pela captação ativa de Na^+ , bem como gera um gradiente que favorece o transporte de Cl^- . Desta forma, a inibição desta enzima gera um desequilíbrio iônico, caracterizado por uma reduzida concentração de Na^+ nos fluídos corporais (GROSELL et al., 2002, 2004a). A anidrase carbônica é outra enzima que pode ter sua atividade reduzida em função da presença de cobre (GROSELL et al., 2002), diminuindo o transporte de Na^+ branquial através do trocador Na^+/H^+ ou da bomba de prótons (H^+ -ATPase). Além disso, o cobre também pode alterar a permeabilidade da membrana plasmática, alterando o fluxo osmótico e iônico do organismo (VIARENGO et al., 1996). A potente toxicidade do Cu na ionorregulação é a principal causa de mortalidade em peixes de água doce (GROSELL et al., 2002).

Além das alterações iono-osmorregulatórias, o cobre pode provocar alterações do metabolismo energético (LIU et al., 2010; CHEN et al., 2013), alterações histológicas em tecidos e órgãos (FERNANDES e MAZON; LIU et al. 2010; CHEN et al. 2012), cito toxicidade (MAZON et al., 2002; FEI et al., 2013), disrupção endócrina (SCHANTZ e WIDHOLM, 2001; HANDY 2003), efeitos no sistema de defesa antioxidante, danos oxidativos e alteração da expressão gênica de proteínas (CRAIG et al., 2007; SAMPAIO et al., 2010; KONG et al., 2013; MACHADO et al., 2013), aumento de níveis de cortisol, glicose, lactato plasmático e redução da tiroxina livre (T4) (TELES et al., 2005), danos do DNA em eritrócitos (MACHADO et al., 2013), efeitos na capacidade olfatória (BALDWIN et al., 2003; MCINTYRE et al. 2008), e apoptose celular (MONTEIRO et al., 2009; LUZIO et al., 2013). Em peixes o Cu também provoca alterações reprodutivas, como por exemplo, redução do tamanho gonadal e da fertilidade (JAMES et al., 2003, 2008), inibição da produção de enzimas espermáticas essenciais para a manutenção da capacidade fertilizante (SAROSIEK et al., 2009) ou redução da secreção de estrogênios e androgênios (EBRAHIMI e TAHERIANFARD, 2011). Além disso, é considerado um fator de risco para a espermatogênese (MARZEC-WRÓBLEWSKA e LAKOTA, 2012). Portanto, concentrações de Cu acima das necessidades fisiológicas acabam por tornarem-se

tóxicas aos organismos aquáticos tanto de água doce como de água salgada (EBRAHIMPOUR et al., 2010; PINHO e BIANCHINI, 2010; TELLIS et al., 2012).

Além de afetar os ecossistemas, a contaminação de peixes por metais pode tornar-se um problema de saúde pública pela ingestão desses animais contaminados. Um exemplo mundialmente conhecido de toxicidade de humanos através da alimentação de peixes contaminados por metais é o desastre de Minamata no Japão, no qual dezenas de pessoas foram levadas à morte devido ao envenenamento por mercúrio, causado pelo consumo de peixes contaminados por metilmercúrio (DIAS, 2004).

Muitos dos efeitos atribuídos ao Cu são devido a sua capacidade de produzir grandes quantidade de espécies reativas de oxigênio (EROs), provocando danos oxidativos nas membranas ou macromoléculas (GAETKE e CHOW, 2003). Devido a mesma capacidade de mudança de estado de oxidação que dá ao Cu a sua versatilidade em atuar como catalizador de vários processos biológicos importantes, o Cu, assim como o Fe, podem participar de reações que resultam em altas produções de oxiradicais, ou EROs (BUTTKE E SANDSTROM, 1994), numa reação denominada Fenton. Estas são moléculas altamente reativas e podem provocar danos celulares em vários níveis, interagindo com proteínas, lipídios, DNA e RNA (LUSHCHAK, 2011; AITKEN et al., 2012; CABRITA et al., 2014), bem como diminuindo a produção de ATP e provocando danos em mitocôndrias e lisossomos (WHO, 1998). O desequilíbrio entre a produção de EROs e as defesas antioxidantes inicia uma cascata de oxiredução (estresse oxidativo) levando a perda da integridade delular. Portanto, a quantificação dos danos oxidativos provocados pelo excesso de EROs e os níveis de defesas contra danos oxidativos são potencialmente utilizáveis como marcadores de contaminação aquática por Cu.

Como citado anteriormente, um dos processos fisiológicos em peixes que pode ser afetado pelo Cu é a reprodução. Em um estudo anterior, comparando os efeitos do Cu na reprodução em duas espécies de peixes ornamentais, uma ovípara (*Carassius auratus*) e uma vivípara (*Xiphophorus helleri*), James et al. (2008) relataram uma redução do peso gonadal e índice gonadosomático em *X. helleri* e *C. Auratus*, com aumentos de concentrações sub-letais (0, 40, 80, 120 e 160 $\mu\text{g L}^{-1}$) de CuSO_4 . Em *X. helleri* o peso gonadal foi significativamente reduzido ($p < 0,01$) em

peixes expostos a 40 e 80 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cu, e em exposições a 120 e 160 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cu não houve desenvolvimento gonadal. O desempenho reprodutivo também foi diminuído significativamente com doses crescentes de Cu. Em *X. helleri*, os peixes controle lançaram 147 alevinos em dois cruzamentos, diminuindo significativamente ($p < 0,01$) para 88 e 72 em peixes expostos a 40 e 80 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Já os peixes expostos a concentrações mais elevadas (120 e 160 $\mu\text{g L}^{-1}$) não amadureceram sexualmente, nem se reproduziram. O comprimento médio e peso corporal dos alevinos também foram diminuídos nos animais expostos ao Cu. No *C. auratus* o Cu reduziu a fecundidade e diminuiu o peso e diâmetro dos ovos. Foi verificado também o acúmulo de cobre nos ovos de *C. auratus* e alevinos de *X. helleri*, no entanto não foi verificado acúmulo significativo de Cu nas gônadas de ambas as espécies ($p < 0,05$). De acordo com o mesmo autor, a espécie vivípara foi mais severamente afetada pelo Cu que a ovípara.

Os peixes vêm sendo expostos a muitos xenobióticos poluentes encontrados nos ecossistemas aquáticos, como o Cu, e que podem, dentre outros efeitos, interromper a função endócrina reprodutiva, atuando ao nível de vários órgãos, tais como o hipotálamo, gônadas e fígado. Perturbações em qualquer destes órgãos podem resultar em alterações na taxa de desenvolvimento gonadal ou viabilidade dos gametas, bem como falhas na gametogênese (KIME e NASH, 1999). Em espécies aquáticas, a exposição a metais de transição também pode provocar o aumento de EROs. Em mamíferos, muitos dos efeitos do Cu no sistema reprodutivo são consistentes com danos celulares causados pela capacidade do Cu em aumentar EROs (IAKOVIDIS et al., 2011). A produção de EROs em níveis adequados tem funções fisiológicas importantes como diferenciação celular (SOHAL et al., 1986) e capacitação espermática (DE LAMIRANDE et al., 1997), no entanto, EROs em concentrações superiores aos limites fisiológicos resultam em estresse oxidativo (EO), que é considerado um fator relevante na fisiopatologia espermática (AITKEN e KRAUSZ, 2001; BENNET e AITKEN, 2005). Porém, os mecanismos pelos quais o Cu influencia negativamente a reprodução em peixes não são bem conhecidos (GROSELL, 2012), e trabalhos relatando danos oxidativos provocados pela exposição ao Cu em peixes são raros, e quando existentes, concentram-se nos mesmos estudos utilizando as mesmas espécies (GROSELL, 2012), especialmente quando relacionados à reprodução.

Como as células espermáticas são especialmente vulneráveis aos danos provocados pelo EO, é possível que um dos mecanismos de toxicidade ao Cu na reprodução em peixes seja o aumento do EO afetando a funcionalidade espermática. A estrutura única dos espermatozoides os torna vulneráveis ao EO: possuem baixo volume citoplasmático, que é uma fonte rica em enzimas antioxidantes (AITKEN et al., 1992; AITKEN e KRAUSZ, 2001), e suas membranas plasmáticas são constituídas principalmente por lipídios na forma de ácidos graxos poliinsaturados, sendo estes especialmente vulneráveis aos ataques de EROs (WATHES et al., 2007). Portanto, danos oxidativos em lipídeos nas gônadas e/ou células espermáticas pode ser um bom marcador de EO na reprodução.

Para se quantificar os danos peroxidativos em lipídios provocados por EROs, um dos métodos amplamente utilizado é o ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), de acordo com Oakes e Van der Kraak (2003). O Método se baseia na reação do malondialdeído (MDA), gerado pelos danos lipídicos, com o ácido tiobarbitúrico (TBA), em altas condições de acidez e temperatura. Essa reação produz um cromógeno que pode ser medido por espectrofluorometria. Produções elevadas de EROs também estão ligadas a possíveis danos ao DNA espermático, produzindo fragmentação (DURU et al, 2000). Porém, se desconhece estudos avaliando o efeito ou possíveis mecanismos de toxicidade do Cu em parâmetros de qualidade espermática em peixes.

A hipótese do presente estudo é que a exposição aguda e crônica ao Cu em água doce afeta parâmetros espermáticos (motilidade, integridade de membrana plasmática, potencial de membrana mitocondrial e integridade de DNA) e espermatogênese (concentração espermática) em *J. multidentata*, sendo que o EO pode ser um dos mecanismos de toxicidade do Cu na reprodução. No entanto, para avaliar os efeitos do Cu nas células espermáticas, é necessário determinar previamente a melhor osmolalidade do meio de armazenamento para a manutenção da integridade destas células.

Portanto, a presente Tese fornecerá dados sobre o modo de ativação e os efeitos fisiológicos de diferentes osmolalidades nos parâmetros de qualidade espermática da espécie em estudo, bem como permitirá a definição da osmolalidade adequada do meio de armazenamento das células espermáticas, tanto para avaliações dos

efeitos do Cu e outros poluentes, como sua utilização em protocolos de criopreservação e inseminação artificial. Além disso, fornecerá dados sobre os efeitos bioquímicos e fisiológicos de concentrações ambientalmente relevantes de Cu na quantidade e qualidade dos espermatozoides de uma espécie de peixe vivípara, nativa e que vem se destacando como possível biomonitora e modelo ecotoxicológico para espécies dulcícolas e estuarinas no Brasil, identificando possíveis ferramentas no biomonitoramento da poluição aquática por Cu.

2 OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo central avaliar os efeitos fisiológicos da osmolalidade e os efeitos fisiológicos e bioquímicos da exposição aguda e crônica ao cobre, em parâmetros de qualidade espermática e espermatogênese em machos adultos da espécie vivípara *Jenynsia multidentata* aclimatados à água doce.

2.1 Objetivos específicos

- a) Determinar a osmolalidade plasmática do sangue;
- b) Determinar o modo de ativação das células espermáticas em *J. multidentata*;
- c) Avaliar os efeitos da variação de osmolalidade na qualidade espermática;
- d) Determinar a osmolalidade adequada do meio diluente para armazenamento dos espermatozoides;
- e) Determinar a concentração espermática;
- f) Avaliar a dose/resposta de diferentes concentrações de Cu (4.5, 9 e 18 $\mu\text{g L}^{-1}$), de forma aguda e crônica, na espermatogênese e parâmetros de qualidade espermática em machos de *J. multidentata* aclimatados em água doce;
- g) Avaliar alterações morfométricas como comprimento, peso corporal e peso das gônadas provocadas pela exposição ao Cu.
- h) Avaliar alterações na lipoperoxidação em gônadas como indicador de estresse oxidativo.

3 CAPÍTULO 1

Artigo submetido à revista *Theriogenology*:

The effects of osmolality on sperm quality in *Jenynsia multidentata* (Ciprinodontiforme: Anablepidae)

Janaína Camacho da Silva^a, Antonio Sergio Varela Junior^b, Josiê Shwartz Caldas^c, Clarissa da Silva Freitas^b, Joziel Gonçalves Botelho^b, Elton Pinto Colares^b, Carine Dahl Corcini^{f,*}

^a Post-graduate in Physiological Sciences: Comparative Animal Physiology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Rio Grande, Av 8 km Italy, Campus Carreiros, 96203-900 Rio Grande, RS, Brazil.

^b Institute of Biological Sciences, Federal University of Rio Grande, Av. Italy 8 km, 96203-900 Rio Grande, RS, Brazil.

^c Post-graduate in Aquatic Environments Continental Biology, Federal University of Rio Grande, Av. Italy 8 km, 96203-900 Rio Grande, RS, Brazil.

^d Department of Animal Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Federal University of Pelotas, University Campus, PO Box 354, 96001-970 Pelotas, Brazil.

Corresponding author: Carine Dahl Corcini
Universidade Federal de Pelotas (UFPel)
Faculdade de Veterinária
Departamento de Patologia Animal
PO Box 354, 96001-970 Pelotas, Brasil
Phone: + 55 53 32759161
E-mail: corcinicd@gmail.com

ABSTRACT

Sperm quality tests on fish are classically used for evaluating cryopreservation procedures, and they are also promising to assess aquatic toxicity and biomarkers of xenobiotic effects on reproduction. Osmotic shock from storage medium is one of the factors affecting sperm quality during evaluation. Thus, the objective of this study was to evaluate the effects of different osmolalities (240 to 460 mOsm/kg) for at least 4 days on the sperm quality parameters of viviparous fish *Jenynsia multidentata*. The plasma osmolality of *J. multidentata* is 326 ± 3.9 mOsm/kg. More than 50% of spermatozoa were activated of osmolalities between 240 and 320 mOsm/Kg, however the most constant and long-lasting rates were between 300 and 320 mOsm/kg (isosmotic), for up to 7 days. On the 4th day of evaluation, higher membrane integrity rates were observed between 280 and 360 mOsm/kg, higher mitochondrial membrane potential was observed between 300 and 460 mOsm/kg, and higher DNA integrity rates were observed between 260 and 380 mOsm/kg. Moreover, osmolalities ≤ 240 mOsm/kg (hypo-osmolality) and ≥ 460 mOsm/kg (hyperosmolality) resulted in the lowest motility, plasma membrane integrity and DNA integrity levels. The mitochondrial membrane potential was lower only in the hypo-osmolality (≤ 240 mOsm/kg), was more harmful also to the integrity of the plasma membrane. Therefore, we conclude that for sperm quality preservation in *J. multidentata*, an osmolality of 300-320 mOsm/Kg of the most suitable diluents is necessary. Furthermore, we conclude that the storage of sperm in a hyposmotic or hyperosmotic solution affects not only motility but also other sperm quality parameters.

Keywords: biomarker, cryopreservation, thinner, sperm, Live-bearing, viviparous.

1. INTRODUCTION

Sperm analysis has aroused interest in the ecotoxicology field. Current programs for water system monitoring require the integration of chemical and biological assays to assess the effects of different contaminants in organisms [1,2], and sperm quality tests are promising toxicity tests for environmental quality assessment [3] and have been successfully used as biomarkers of different xenobiotics effects on reproduction [4-7].

Fish sperm are immobile in seminal fluid, and during natural reproduction, motility is activated after sperm are release into the aquatic environment (oviparous species) or the female genital tract (viviparous and ovoviviparous species) [8-10]. Moreover, under artificial conditions, a storage solution for sperm cells is necessary. Both in natural conditions and in

artificial medium, there are several factors that interfere with motility: osmolality (osmotic pressure), ionic composition, pH and temperature are all crucial [11, 12]. Understanding the effects of these factors in different species not only provides knowledge of species-specific differences in motility [12-14] but also provides information for the development of new sperm cell storage methodologies [15,16]. However, because most teleost fish are oviparous and have external fertilization, development of suitable diluents or techniques for activating immobilized sperm cells has focused on oviparous species [11,12,17].

Viviparity is an unusual feature in teleost fish, and the sperm of viviparous species become mobile when suspended in a solution that is isosmotic to the seminal plasma but are immobilized in a hypo- or hyperosmotic solution [11,18-20], which is the opposite of what occurs in oviparous species. The morphophysiology of sperm in viviparous species is also different, and these sperm have an elongated head, well-developed mitochondrial sheaths and a glycolytic activity that is comparable to that of mammalian spermatozoa [8,21,22]. Viviparity has developed independently in several groups [23] and has been a variety of adaptations to address the problem of internal fertilization [24,25]; therefore, the described motility activation and variations in osmolality tolerance to media are not representative of all viviparous fish. Thus, there is a need to develop protocols for new markers of sperm quality in native viviparous fish species not yet studied, such as the neotropical species *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Ciprinodontiforme).

J. multidentata is a widely distributed species in South America [26], and its population is declining in many environments in Argentina [27]. This species has been successfully used as a biomarker of xenobiotic effects in the aquatic environment [28-34], and its inclusion was requested by the Argentine Institute of Standardization and Certification as an appropriate native species to determine the acute lethal toxicity of different chemical compounds [35]. Because of its abundance and ease of maintenance in experimental conditions, *J. multidentata* is a possible biomonitor and ecotoxicological model estuarine species in Brazil, and its sperm cells can be used as a reproductive toxicity biomarker. However, there are no studies on the effects of osmolality on the sperm quality of this species. Thus, the objective of this study was to evaluate the effects of different diluent osmolalities (240 to 460 mOsm/kg) on the sperm quality parameters of *J. multidentata*.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Collection and fish acclimation

Adult *J. multidentata* males (n=30) with an average (mean \pm SD) body length 2.42 ± 0.18 cm and body weight 0.29 ± 0.08 g were collected using dip nets in a river near Cassino Beach ($32^{\circ} 13'47.3$ "S and $52^{\circ} 12'25.8$ " W) located in Rio Grande, RS, Southern Brazil. Fishes were transferred to the aquatic animals vivarium at the Institute of Biological Sciences at the Federal University of Rio Grande (FURG) and acclimated for 15 days under constant environmental conditions: drinking water (salinity 0) that was properly dechlorinated, pH 7.0, with constant aeration, at a temperature of 26°C , and a photoperiod of 12 light: 12 dark. The fish were fed daily with commercial feed for omnivores fishes (Alcon Basic, Camboriu, SC, Brazil) ad libitum. The Ethics Committee on Animal Use at the Federal University of Rio Grande approved this study (CEUA-FURG; reference # Pq028 / 2013).

2.2. Collection of sperm

After the acclimation period described in the previous section (2.1), the fish were anesthetized with benzocaine 0.1 g L^{-1} by immersion in buffered solution at pH 7.0 and immediately euthanized. Gonads were dissected by abdominal incision and placed in 1.5 ml eppendorf tubes. Because spermatozoa are contained in cysts, they were released using gentle disruption of gonadal tissue repeatedly with the aid of fine surgical forceps tips and homogenized with a $10\ \mu\text{L}$ micropipette tip in Hanks Balanced Salt Solution (HBSS). The dilution was 1/100 (wt/vol) for each of the osmolalities tested [19], and a total of 9 replicates were analyzed for each osmolality as described below in Section (2.3). For convenience, the abbreviated osmolalities are each cited in the text; for example, 460 mOsm/kg is HBSS 460. All parameters were measured for 4 days. The suspensions containing sperm were kept refrigerated at 5°C over the entire period and were homogenised with a $10\ \mu\text{L}$ micropipette tip for each evaluation. Blood samples were collected using an insulin syringe with fixed needle from the caudal artery. A pool of blood samples obtained from 30 fish was used for analysis due to small volume of each fish [36]. After centrifuged at 10.000 rpm for 10 min, 5 replicates were obtained for the pooled sample of blood. The osmotic pressure of the plasma was measured with vapor osmometer (Wescor mod VAPRO -Vapor Pressure Osmometer).

2.3. The storage of sperm in HBSS with different osmotic pressures

The HBSS 500 stock solution was prepared by adjusting a 600 ml volume of the HBSS solution standard (0.137 M NaCl, 5.4 mM KCl, 0.25 mM Na₂HPO₄, 0.44 mM KH₂PO₄, 1.3 mM CaCl₂, 1.0 mM MgSO₄, 4.2 mM NaHCO₃ and 5.55 mM glucose, pH 7.2) to 1 L to produce HBSS 300 [37,38]. Other test solutions with final osmolalities of 240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400 and 460 mOsm/kg were made by adding double-distilled water to the stock solution. The osmolalities were measured with a vapor pressure osmometer (Wescor mod VAPRO - Vapor Pressure Osmometer) and the pH was measured with a pH meter (HANNA pH mod 21). All solutions were refrigerate at 5° C and used within 48 hours.

2.4. Motility

Motility was evaluated in fresh semen 20 to 30 s after dilution in HBSS at different osmolalities every 24 h for 4 days. Motility was estimated by visually observing a 5µl suspension on a glass slide under a cover slip using a phase contrast microscope (Olympus BX 51; America, São Paulo, SP, Brazil) at X 200 magnification. The results are expressed as the percentage (0 to 100%) of cells in a linear and progressive movement. Sperm that only vibrated were not considered mobile [39].

2.5. Plasma membrane integrity

Membrane integrity was evaluated in fresh semen 10 min after dilution in HBSS at different osmolalities every 24 h for 4 days. To evaluate the integrity of the plasma membrane, two fluorochromes were used to discriminate between intact and damaged cells: carboxyfluorescein diacetate (CFDA) and propidium iodide (PI). Cells with intact membrane showed green fluorescence, while injured membranes emitted red fluorescence [40]. The percentage (0 to 100%) of cells with intact membranes was determined by the proportion of cells emitting green fluorescence out of a total of 200 cells.

2.6. Mitochondrial membrane potential

The mitochondrial membrane potential was assessed 10 min after dilution in HBSS at different osmolalities every 24 h for 4 days. Rhodamine 123 (Rh-123 Sigma, Brazil) was used to measure the changes in mitochondrial membrane potential [41]. Sperm emitting intense green fluorescence (indicating Rh accumulation) from their middle portion were considered to have a high mitochondrial membrane potential, whereas sperm emitting low fluorescence

(matting) had a low mitochondrial membrane potential. The percentage (0 to 100%) of active mitochondria was measured by the proportion of cells emitting green fluorescence out of a total of 200 cells.

2.7. DNA Integrity

DNA integrity was assessed 10 min after dilution in HBSS at different osmolarities every 24 h for 4 days. We used a previously described method according to Varela Junior et al [40]. This method consists of using the metachromatic fluorescent dye acridine orange (AO), which binds DNA strands and emits green fluorescence when bound to double-stranded (intact DNA) and red fluorescence when bound to single-stranded DNA (condensed chromatin). The percentage (0 to 100%) of intact DNA was determined by calculating the percentage of cells emitting green or red fluorescence out of a total of 200 cells.

2.8. Statistical analysis

All statistical analyzes were performed at Statistix software 9.0 [42]. The normality of the data was analyzed with the Shapiro-Wilk test. Because the data were presented as non-parametric, they were analyzed with Kruskal-Wallis ANOVA followed by Duncan test. Data were expressed as mean \pm standard error (SEM) with a significance level of 95% ($p < 0.05$).

3. RESULTS

3.1. Plasma osmolality and motility

Plasma osmolality was 326.2 ± 3.9 mOsm/Kg for the *J. multidentata* species. The motility rates of the fresh semen (time 0) was greater than 90% at osmolalities of 280 to 320 mOsm/kg; however, they did not differ between the osmolalities of 240 to 340 mOs/kg ($p < 0,05$). At osmolalities above 380 mOsm/kg no motility was observed at time 0. However, after 24 h, a decrease in motility was observed at osmolalities ≤ 280 mOsm/kg, and an increase in motility was observed at osmolalities ≥ 340 mOsm/kg. At 24 h, the motility rate was greater than 90% in HBSS 300 and 320, where motility rates remained at approximately 80% during the 48 h. At the third and fourth days, HBSS 320 presented motility rates greater than 80%; however, at 4 days of storage, motility rates in HBSS 320 did not differ from those in HBSS 300 to 340 and 380, whereas HBSS 240 and HBSS 460 had lower motility rates (Table 1). In addition, HBSS 300 and 320 maintained motility rates up to 7 days of storage (data not shown).

3.2. Plasma membrane integrity

In fresh semen (time 0), membrane integrity was higher in HBSS 460, which differed from osmolalities below 340 mOsm/kg ($p < 0,05$), in which rates were lower. However, in a 4 days, plasma membrane integrity rates decreased in osmolalities ≤ 260 mOsm/kg and ≥ 400 mOsm/kg compared to osmolalities from 280 to 380 mOsm/kg, which did not differ from each other (Table 2).

3.3. Mitochondrial Membrane Potential

In fresh semen, significant differences in mitochondrial membrane potential were not observed between the tested osmolalities ($\sim 100\%$). However, after one to three days, the mitochondrial membrane potential showed a greater reduction in hypo-osmolality than hyperosmolality, and on the fourth day, HBSS 240 differed from higher osmolalities up to 360 mOsm/kg, with the exception of HBSS 400 ($p < 0,05$) (Table 3).

3.4. DNA Integrity

At the third day, both hypo-osmolality (HBSS 240) and hyperosmolality (HBSS 460) induced greater reductions in DNA integrity rates, and on the fourth day, there were differ from osmolalities between 320 and 380 mOsm/kg ($p < 0,05$) (Table 4).

4. DISCUSSION

For viviparous fish, most studies on the motility of spermatozoa and storage methods are focused on the Poeciliidae family [11,18,20,39,43], and there is little information on other species, such as the Anablepidae family. Anablepidae and Poeciliidae are closely correlated and have the same type of reproduction, although their internal fertilization and viviparity emerged independently during evolution [44,45]. Therefore, generalizations about sperm cell motility activation or adaptation modes to osmotic shock may not be accurate. One of the reproductive differences between these families is that mature Poeciliidae sperm are grouped and released into the oviduct within structures called spermatozeugmatas or spermatophores [46,47,48]; in contrast, in *Anableps anableps* and *Jenynsia lineata*, mature cysts containing sperm are broken, and free spermatozoa are released in the efferent ducts [46]. However, both

use a copulatory organ called gonopodium for sperm introduction into the the female genital pore, minimizing the loss of sperm into the environment.

In this study, blood osmolality in *J. multidentata* was 326 ± 3.9 mOsm/kg, similar to the plasma osmolality values in poeciliid, including *Xiphophorus helleri* at 320 mOsm/kg [18], *Poecilia reticulata* at 305 mOsm/kg [39,43], *Poecilia latipinna* at 326 mOsm/kg and *Xiphophorus couchianus* at 324 mOsm/kg [43]. The knowledge of species-specific internal osmolality can be used for the manufacture of a sperm diluent that mimics the natural conditions of sperm in the male reproductive tract, increasing the efficiency of sperm integrity preservation in sperm cells ex situ.

In *J. multidentata*, sperm were activated immediately when placed in HBSS 240 to 360, and higher osmolalities kept the cells immobilized. However, the highest percentage of mobile spermatozoa was at HBSS 280 to 320, close to the isosmoticity point. After 24 h of storage, a decrease in motility appeared in osmolalities ≤ 280 mOsm/kg, and an increase was observed in osmolalities ≥ 320 mOsm/kg; after 4 days, the rates were higher in HBSS 320 ($85.6 \pm 2.7\%$) ($p < 0.05$). This activation mode is different from oviparous species, in which sperm are activated when exposed to a hyperosmotic (marine fish) or hiposmotic medium (freshwater fish), and remaining immobilized in an isosmotic medium [49,10,50,12,51]. However, similar to the poeciliid *X. helleri*, motility increased when osmolality increased and was significantly higher ($67.0 \pm 8.0\%$) between 320 and 380 mOsm/Kg in sperm stored at 4° C for 15 min [18]. With longer storage time, sperm in HBSS 320 had the highest and most enduring motility rates, and the percentage of mobile cells did not differ between osmolalities of 230 and 440 mOsm/kg after more than 10 dayz. However, motility was lower in osmolalities below 320 mOsm/kg than in higher osmolalities [18]. *X. colchianus* also showed increased motility with increased HBSS osmolality, and the highest rates occurred in HBSS 270 ($71.0 \pm 3.0\%$) with fresh semen and were lower in osmolalities up to 390 mOsm/kg [36]. In *P. reticulata*, motility rates were higher in HBSS 330 ($60.0 \pm 10.0\%$), and lower in HBSS 360 and 400; however, spermatozoa kept in HBSS 300 had the most consistent motility rates throughout the experiment (12 h) except at time 0 h [39]. In addition, HBSS 300 was used as a diluent medium for *Poecilia vivipara* sperm to assess the effects of glyphosate, a non-selective systemic herbicide used worldwide and in agriculture [6], and for sperm cryopreservation in the viviparous species *P. reticulata* and *P. latipinna* [39,43].

Thus, in both *J. multidentata* and Poeciliidae, osmolalities near 320 mOsm/kg have the largest and most enduring effects on motility rates, and both hyposmotic (<260 mOsm/kg) and hyperosmotic (> 400 mOsm/kg) media are harmful to sperm motility.

In most teleost fish, sperm are immobile in seminal fluid, wherein the osmolality, ionic concentration and pH play key roles in the activation and maintenance of motility [52,12]. Studies in oviparous species show a large species-specific variability in the importance of each of these parameters for motility [12,43]. However, in fish species with internal reproduction, osmolality is one of the main factors controlling motility, and isosmotic activation has been shown in different species. Unlike oviparous species, but similar to mammals, sperm from species with internal fertilization do not undergo extreme changes in osmolality because they do not come into contact with the external environment. The internal osmolality in teleost fish, like in mammals, is kept almost constant (osmoregulators). Therefore, specific differences in sperm cell maintenance protocols for most teleost fish egg layers do not likely apply to viviparous fish, and the internal fertilization seems to be the determining factor for activation and motility maintenance.

This factor may also explain the reduction of motility in both hypotonic and hyperosmotic media. Cells have homeostatic mechanisms to maintain the internal medium osmolality and cell volume. According to the osmotic theory, changes in osmolality of water would result in the movement of water between the cytoplasm and the external environment by osmotic pressure until balance was reached [53]. However, the osmotic tolerance of spermatozoa varies among species [54]. Equine spermatozoa, for example, are able to regulate their volume when exposed to osmolalities between 75 and 900 mOsm/kg, however, the restoration of normal sperm function is only possible up to 450 mOsm/kg. Sperm quality parameters such as viability, mitochondrial membrane potential and motility are affected when sperm are exposed to both hypo- and the hyperosmolality [55].

To determine the effects of different osmolalities of *J. multidentata* structures, sperm were evaluated for cell membrane integrity, mitochondrial membrane potential and DNA integrity. In fresh semen, hyposmolality was more harmful to the plasma membrane integrity than hyperosmolality; however, mitochondrial membrane potential and DNA integrity did not differ significantly between the osmolalities. Cells have a tendency to gain water and increase in volume when exposed to a hyposmotic medium, and it is possible that the homeostatic

mechanisms of osmolality control and regulation of cell volume are not able to prevent the damage caused by hyposmotic shock to the plasma membrane because the membrane is the structure that defines the cell and through which ions and water move until equilibrium is reestablished. However, because mitochondria and DNA are in internal compartments they were not affected. During evaluations, changes were observed in cell morphology and movement patterns, particularly in hyposmotic conditions. Cells exposed to osmolalities lower than 300 mOsm/kg presented a head with increased volume, folded flagella, and increased vibratory movements during all experimental times. In osmolalities above 400 mOsm/kg, head swelling was also observed, but less intensely. Previous studies have reported damage in oviparous fish sperm caused by hyposmolality, wherein the membranes were seriously affected, as observed in this study in *J. multidentata*. Trout sperm incubated in fresh water showed drastic cellular changes such as swelling and disruption of the plasma and mitochondrial membrane [56]. In carp, sperm heads also underwent considerable swelling when exposed to freshwater, increasing three times in diameter, and the flagella showed a drastic winding [57]. Furthermore, the structure and permeability of the plasma membrane also changed when placed in fresh water, due to reorganization of the lipid bilayer [58,59].

However, during the evaluation period, the membrane integrity was significantly reduced in osmolalities below 260 mOsm/kg and in osmolalities above 400 mOsm/kg, and after 4 days, the highest membrane integrity rates were observed between HBSS 280 and 380. The mitochondrial membrane potential was also more affected by hiposmolality. At four days, osmolalitie of 240 mOsm/kg produced the lowest mitochondrial potential rates ($35.7 \pm 5.8\%$), and osmolalities of 360, 280 and 460 mOsm/kg showed the best rates; however this did not differ significatly from HBSS 300 or 320. DNA integrity only showed differences between the osmolalities on the 3rd day. On the 4th day, osmolalities of 240 and 460 mOsm/kg had the lowest DNA integrity rates, differing from the osmolalities between 320 and 380 mOsm/kg, which not showed difference. Therefore, prolonged storage reduce motility in osmolalities below 260 mOsm/kg followed by a decrease in plasma membrane integrity and a reduction in mitochondrial membrane potential and DNA integrity. Only exposure to osmolalities higher than 400 mOsm/kg had no effect on mitochondrial function. Some studies have reported that incubation of mammalian sperm in anisomotic medium results in increased reactive oxygen species (ROS) and lipid peroxidation [60,61], indicating that osmotic stress causes oxidative stress (OS) in sperm cells. OS is caused by imbalance between ROS production and antioxidant defenses. Excessive ROS cause cellular damage at

various levels, including oxidation of proteins and lipids, cleavage of DNA and RNA molecules [62-64], tiggering damage to critical organelles like mitochondria and lysosomes and ATP depletion [65]. Therefore, because viviparous sperm are considered more similar to mammalian sperm than oviparous fish sperm [8,39], the reduction in the parameters observed in *J. multidentata* in prolonged storage may be due to increased ROS.

Although hyposmolality caused further damage to sperm *J. multidentata*, hyperosmolality caused reduced motility, in addition to damage to the plasma membrane and DNA fragmentation. Hyperosmotic solutions that suppress fish sperm motility have been used to save energy stocks, maximizing reproductive success artificial fertilization techniques [12,17,66,67], especially if they are previously stored before insemination [67]. In viviparous fish, the use of a hyperosmotic medium (HBSS 500) pre-freezing was established by Yang et al. [20] in *X. helleri*. Motility after thawing was reactivated by reducing osmolality to approximate isosmoticity (320 mOsm/kg), and after thawing, motility rates (~ 55%) did not differ from samples initially stored at 300 mOsm/kg. Based on these results, HBSS 500 was subsequently used for assessment of artificial fertilization rates in *X. helleri* [68], *X. Couchianus* [69], *X. variatus* [38] and *X. maculatus* [37]. However, according to the results obtained in this study, hyperosmolality for prolonged periods, affect sperm quality parameters of *J. multidentata* that were connected to the tolerance capacity of the cell, fertilization capacity, embryonic development and progeny success. HBSS 460 not only caused reduced motility (which proved to be reversible by reduction of osmolality in other species) but also caused apparent irreversible damages to structures essential for sperm fertilization. Similar to *J. multidentata*, mammalian spermatozoa are more susceptible to damage caused by hyosmotic shock [61,70]. However, in dog sperm, which have a seminal osmolality of approximately 300 mOsm/Kg [72], osmolalities above 500 mOsm/Kg were sufficient to reduce the motility and integrity of the sperm plasma membrane [71]. Osmolality changes seem more harmful than exposure to a non-isosmotic medium. In horses, sperm are more sensitive to exchanges between hypo- and hyperosmotic media than to simple exposure to anisosmitic medium, and osmolality changes are more damaging to mitochondria than to the plasma membrane [70]. In humans, cells incubated in hyperosmotic medium that were transferred to low osmolalities were reported to swell [73]. Therefore, the sperm of viviparous species previously stored in HBSS 500, that subsequently had their osmolality reduced for

motility activation, probably suffered damage to cellular structures that reduce sperm quality, despite the maintenance of satisfactory motility rates.

5. CONCLUSION

The plasma osmolality of *Jenynsia multidentata* is 326.2 ± 3.9 mOsm/Kg. Activation of sperm occurred around the isosmoticity, and osmolalities greater than 380 mOsm/Kg, sperm remained inmotile. Osmolalities of 300 and 320 had the most enduring and constant motility rates and preserved the integrity of the sperm cells, with an osmolality suitable for *J. multidentata* sperm cell storage. Storage in both hypo- and hypertonic solution cause damage sperm quality.

Acknowledgments

We would like to acknowledge the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES – Programa Ciências do Mar, Brasília, DF, Brasil). C.D. Corcini is a research fellow from the Brazilian Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). We would also like to thank the members of the Comparative Animal Reproduction (Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, Brasil) group for their assistance.

6. REFERENCES

- [1] Coulaud R, Geffard O, Xuereb B, Lacaze E, Quéau H, Garric J, Charles S, Chaumot A. In situ feeding assay with *Gammarus fossarum* (Crustacea): modelling the influence of confounding factors to improve water quality biomonitoring. *Water Res* 2011; 4:6417–6429.
- [2] Macova M, Escher BI, Reungoat J, Carswell S, Lee Chue K, Keller J, Mueller JF. Monitoring the biological activity of micropollutants during advanced waste water treatment with ozonation and activated carbon filtration. *Water Res* 2010; 44:477–492.

- [3]Fabbrocini A, D'Adamo R, Del Prete F, Langellotti AL, Rinna F, Silvestri F, Sorrenti G, Vitiello V, Sansone G. Cryopreserved semen in ecotoxicological bioassays: sensitivity and reliability of cryopreserved *Sparus aurata* spermatozoa. *Ecotoxicol Environ Saf* 2011; 84:293–298.
- [4]Lahnsteiner F, Manosour N, Berger B. The effect of inorganic and organic pollutants on sperm motility of some freshwater teleosts. *J Fish Biol* 2004; 65:1283-1297.
- [5]Jenkins JA, Draugelis-Dale R. Bioindicators from mosquitofish (*Gambusia affinis*) sampled from the Imperial Valley in southern California: U.S. Geological Survey Open-File Report 2006-1307, 48 p.
- [6]Harayachiki CAY, Varela Junior AS, Machado AAS, Cabrera LC, Primel EG, Bianchini AB, Corcini CD. Toxic effects of the herbicide Roundup in the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to fresh water. *Aquatic Toxicol* 2013; 142-143:176-184.
- [7]Lopes, FM, Varela Junior AS, Corcini CD, Silva AC, Guazzelli VG, Tavares G, Rosa CE. Effect of glyphosate on the sperm quality of zebrafish *Danio rerio*. *Aquatic Toxicology* 2014; 155:322-326.
- [8]Stoss, J. Fish gamete preservation and spermatozoan physiology. In *Fish Physiology*, Vol. 9 (Hoar, W. S., Randall, D. J. & Donaldson, E. M., eds) San Diego, CA: Academic Press 1983, p.305-350.
- [9]Billard R. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. *Reprod Nutr Dev* 1986; 2:877-920.

[10]Ciereszko A, Glogowski J, Dabrowski K. Biochemical characteristics of seminal plasma and spermatozoa of fresh water fishes. In: Tiersch TR, Mazik PM, editors. Cryopreservation in aquatic species. Louisiana: WAS, Baton Rouge; 2000, p. 20-48.

[11]Morisawa M, Suzuki K. Osmolality and potassium ions: their roles in initiation of sperm motility in teleosts. *Science* 1980; 210:114-115.

[12]Alavi SMH, Cosson J. 2006. Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: a review. *Cell Biol Int*; 30:1-14.

[13]Morisawa M, Suzuki K, Shimizu H, Morisawa S, Yasuda K. Effects of osmolality and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes. *J Experiment Biol* (1983b); 107:95-103.

[14]Cosson J, Groison A-L, Suquet M, Fauvel C, Dreanno C, Billard R. Marine fish spermatozoa: racing ephemeral swimmers. *Reproduction* 2008; 136:277–294.

[15]Linhart O, Rodina M, Gela D, Kocour M. Optimization of artificial propagation in European catfish, *Silurus glanis* L. *Aquaculture* 2004; 235:619–632.

[16]Alavi SMH, Linhart O, Coward K, Rodina M. Fish spermatology: implications for aquaculture management. In: Alavi SMH, Cosson JJ, Coward K, Rafiee G, editors. *Fish Spermatol*. Oxford: Alpha Science Ltd. 2007, p. 397–460.

[17]Alavi SMH, Rodina M, Viveiros ATM, Cosson DG, Boryshpolets S, Linhart O. Effects of osmolality on sperm morphology, motility and flagellar wave parameters in Northern pike (*Esox lucius* L.). *Theriogenology* 2009; 72:32–43.

- [18]Huang C, Dong Q, Walter RB, Tiersch TR. Initial studies on sperm cryopreservation of a live-bearing fish, the green swordtail *Xiphophorus helleri*. *Theriogenology* 2004; 62:179–194.
- [19]Huang C, Dong Q, Walter RB, Tiersch TR. Sperm cryopreservation of green swordtail *Xiphophorus helleri*, a fish with internal fertilization. *Cryobiology* 2004; 48:295-308.
- [20]Yang H, Hazelwood L, Walter RB, Tiersch TR. Effect of osmotic immobilization on refrigerated storage and cryopreservation of sperm from a viviparous fish, the green swordtail *Xiphophorus helleri*. *Cryobiology* 2006; 52:209-218.
- [21]Gardiner DM. Utilization of extracellular glucose by spermatozoa of two viviparous fishes. *Comp Biochem Physiol* 1978; 59A:165–168.
- [22]Jamieson BGM. *Fish Evolution and Systematics: Evidence from Spermatozoa*, Cambridge University Press, Cambridge 1991.
- [23]Long JA, Trinajstic K, Young GC, Senden T. Live birth in the Devonian period. *Nature* 2008; 453:650–652.
- [24]Ryan MJ. Sexual selection, receiver biases, and the evolution of sex differences. *Science* 1998; 281:1999–2002.
- [25]DeMarais A, Oldis D. Matrotrophic transfer of fluorescent microspheres in Peociliid fishes. *Copeia* 2005; 3:632–636.
- [26]Malabarba LR, Reis ER, Vari RP Lucena CAS. *Phylogeny and classifications of neotropical fishes*. EDIPUCRS, Porto Alegre 1998. 603 p.

[27]Hued AC, Bistoni MA. Development and validation of a biotic index for evaluation of environmental quality in the central region of Argentina. *Hydrobiologia* 2005; 543:279-298.

[28]American Public Health Association, American Water Work Association, Water Environment Association, Clesceri LS, Greenberg, AH, Eaton AD (eds). *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 20th edn. APHA, Washington, DC 1998.

[29]Hued AC, Caruso MN, Wunderlin DA, Bistoni MA. A field and in vitro evaluation of ammonia toxicity on native fish species of the central region of Argentina. *Bull Environ Contam Toxicol* 2006; 76:984-999.

[30]Ballesteros ML, Gonzales M, Wunderlin MA, Bistoni MA, Miglioranza KSB. Uptake, tissue distribution and metabolism of the insecticide endosulfan in *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes) *Environmental Pollution* 2011; 159:1709-1714.

[31]Ferreira RS, Monserrat NM, Ferreira JLR, Kalb AC, Stegeman J, Bainy ACD, Zanette J. Biomarkers of organic contamination in the South American fish *Poecilia vivipara* and *Jenynsia multidentata*. *J Toxicol Environ Health A*. 2012; 75(16-17):1023-34.

[32]Guyón N, Bistoni M, Wunderlin D, Amé M. Inhibition of the brain cytochrome P450 aromatase isoform expression in *Jenynsia multidentata* reflects changes in water quality. *Ecotoxic Environ Cont- EEC* 2012; 97:104.

[33]Hued AC, Oberhofer S, Bistoni MA. Exposure to a commercial glyphosate formulation (Roundup®) alters normal Gill and liver histology and affects male sexual activity of *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes). *Arch Environ Cont Toxicol* 2012; 62:107–117.

- [34]Hued AC, Lo Nostro FL, Wunderlin DA, Bistoni, MA. Reproductive Impairment of a Viviparous Fish Species Inhabiting a Freshwater System with Anthropogenic Impact. *Arch of Environ Cont Toxicol* 2013; 64:281–290.
- [35]IRAM. Environmental quality. Water quality. Determination of the acute lethal toxicity of substances to freshwater fishes. Semi-static method. Norma IRAM 29112. Institute for Normalization and Certification of Argentina, Buenos Aires, Argentina 2007.
- [36]Huang C, Dong Q, Tiersch TR. Sperm cryopreservation of a live-bearing fish, the platyfish *Xiphophorus couchianus*, *Theriogenology* 2004; 62:971-989.
- [37]Yang H, Savage MG, Hazlewood L, Walter RB, Tiersch TR. Offspring production with cryopreserved sperm from a live-bearing fish *Xiphophorus maculatus* and implications for female fecundity. *Comp Biochem Phys C* 2012; 155:55-63.
- [38]Yang H, Cuevas-Urbe R, Savage, MG, Walter RB, Tiersch TR. Sperm Cryopreservation in Live-Bearing *Xiphophorus* Fishes: Offspring Production from *Xiphophorus variatus* and Strategies for Establishment of Sperm Repositories. *Zebrafish* 2012; 9:126-134.
- [39]Sun C, Huang C, Su X, Zhao X, Dong Q. Optimization of handling and refrigerated storage of guppy *Poecilia reticulata* sperm. *J Fish Biol* 2010; 77:54–66.
- [40]Varela Junior AS, Corcini CD, Gheller SMM, Jardim RD, Lucia Jr T, Streit Jr DP, Figueiredo MRC. Use of amides as cryoprotectants in extenders for frozen sperm of tambaqui, *Colossoma macropomum*. *Theriogenology* 2012; 78:244–251.

[41]Garner DL, Thomas CA, Joerg HW, Delarnette M, Marshall CE. Fluorometric Assessments of Mitochondrial Function and Viability in Cryopreserved Bovine Spermatozoa. *Biol Reprod* 1997; 57:1401-1406.

[42]Statistix. Statistix 9 for Windows. Analytical Software. 2008

[43]Huang C, Sun C, Su X, Zhao X, Miao M, Liu Y, Dong Q. Sperm cryopreservation in guppies and black mollies—A generalized freezing protocol for livebearers in Poeciliidae. *Cryobiology* 2009; 59:351–356.

[44]Parenti LR. A phylogenetic and biogeographic analysis of cyprinodontiform fishes (Teleostei, Atherinomorpha). *Bull Amer Mus Nat Hist* 1981; 168:335–557.

[45]Novarini, N.: Filogenesi molecolare ed evoluzione della fecondazione interna e della viviparità negli Atherinomorpha. PhD Thesis, Univ. of Padova, Padova, Italy 1994.

[46]Grier HJ. Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. *Amer Zool* 1981; 21:345–357.

[47]Grier HJ, Uribe–Aranzabal M C. The testis and spermatogenesis in teleosts. In: *Reproductive biology and phylogeny of fishes (Agnathans and Bony fishes)*. Jamieson, B. G. M. (ed.). Endfield, New Hampshire, Science Publishers 2009; p.119-42.

[48]Vicentini CA, Muñoz ME, Vicentini IBF. Ultrastructural aspects of spermatogenesis in *Phalloceros caudimaculatus* (Teleostei, Poeciliidae). *Int J Morphol* 2010; 28:951-956.

[49]Cosson J, Dreanno C, Billard R, Suquet M, Cibert C. Regulation of axonemal wave parameters of fish spermatozoa by ionic factors. In *The Male Gamete: from Basic Knowledge*

to Clinical Applications, Ed. C Gagnon. Montreal, Canada: Cache River Press. 1999. p.161-186.

[50]Cosson J. The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa. *Aquacult Int* 2004; 12:69-85.

[51]Cosson JJ . Methods to Analyse the Movements of Fish Spermatozoa and their Flagellain: *Fishspermatology*, S. M. H. Alavi, J. J. Cosson, K. Coward, G. RafieeEds. Alpha Science international Ltd, Oxford; 2008. p.65–102.

[52]Alavi SMH, Cosson J. Sperm motility in fishes: (I) effects of temperature and pH. *Cell Biol Int* 2005; 29:101-10.

[53]Pegg DE. The history and principles of cryopreservation. *Semin Reprod Med* 2002; 20:5-13.

[54]Sieme H, Harrison RAP,Petrukina AM.Cryobiological determinants of frozen semen quality, with special reference to stallion. *Anim Reprod Sci* 2008; 107:276–292.

[55]Pommer AC, Rutlant J, Meyers SA. The role of osmotic resistance on equine spermatozoal function. *Theriogenology* 2002; 58:1373–1384.

[56]Billard, R. Changes in structure and fertilizing ability of marine and fresh water fish spermatozoa diluted in media of various salinities; *Aquaculture* 1978; 14:187–198.

[57]Perchec G, Cosson MP, Cosson J, Jeulin C, Billard R. Morphological and kinetic changes of carp (*Cyprinus carpio*) spermatozoa after initiation of motility in distilled water. *Cell Motil Cytoskeleton* 1996; 35:113–120.

[58]Màriàn T, Krasznai Z, Balkay L, Balazs M, Emri M, Bene L, Tron L. Hypo-osmotic shock induces an osmolality dependent permeabilisation and structural changes in the membrane of carp sperm. *J Histochem Cytochem* 1993; 41:291–297.

[59]Màriàn T, Krasznai Z, Balkay L, Balazs M, Emri M, Tron L. Role of extracellular and intracellular pH in carp sperm motility and modifications by hyperosmosis or regulation of the Na⁺/H⁺ exchanger. *Cytometry* 1997; 27:374–382.

[60]McCarthy MJ, Baumber J, Kass PH, Meyers SA. Osmotic stress induces oxidative cell damage to Rhesus macaque spermatozoa. *Biol Reprod* 2010; 82:644–651.

[61]Burnaugh L, Ball BA, Sabeur K, Thomas AD, Meyers SA. Osmotic stress stimulates generation of superoxide anion by spermatozoa in horses. *Anim Reprod Sci* 2010; 117:249–260.

[62]Lushchak VI. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat. Toxicol* 2011; 101:13–30.

[63]Aitken RJ, Jones KT, Robertson SA. Reactive oxygen species and sperm function in sickness and in health. *J Androl* 2012; 33:1096-1106.

[64]Cabrita E, Martinez-Páramo S, Gavaia PJ, Riesco MF, Valcarce DG, Sarasquete C, Herráez MP, Robles V. Factors enhancing fish sperm quality and emerging tools for sperm analysis. *Aquaculture* 2014, 432:389-401.

- [65] World Health Organization (WHO). Health criteria and other supporting information. In: Guidelines for Drinking-water Quality, addendum to vol. 2, 2nd ed. World Health Organization, Geneva, Switzerland 1998, p. 95-110.
- [66] Gonçalves ACS, Nascimento AF, Costa AC, Leal MC, Viveiros ATM. Initiation and suppression of sperm motility is osmolality-dependent in two South American fish species: streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) and piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). Anim Reprod 2013; 10:62-70.
- [67] Yan H, Tiersch TR. Current Status of Sperm Cryopreservation in Biomedical Research Fish Models: Zebrafish, Medaka, and Xiphophorus. Comp Biochem Phys C 2009; 149:224-232.
- [68] Yang H, Hazlewood L, Heater SJ, Guerrero PA, Walter RB, Tiersch TR. Production of F-1 interspecies hybrid offspring with cryopreserved sperm from a live-bearing fish, the swordtail *Xiphophorus helleri*. Biol Reprod 2007; 76:401-406.
- [69] Yang H, Hazlewood L, Walter RB, Tiersch TR. Sperm cryopreservation of a live-bearing fish, *Xiphophorus couchianus*: Male-to-male variation in post-thaw motility and production of F1 hybrid offspring. Comp Biochem Phys C 2009; 149:233-239.
- [70] García BM, Moran AM, Fernandez LG, Ferrusola CO, Rodriguez AM, Bolaños JMG, et al. The Mitochondria of Stallion Spermatozoa Are More Sensitive Than the Plasmalemma to Osmotic-Induced Stress: Role of c-Jun N-terminal Kinase (JNK) Pathway. J Androl 2012; 33:105-113.
- [71] Songsasen N, Yu I, Murton S, Paccamonti DL, Eilts BE, Godke RA, Leibo SP. Osmotic sensitivity of canine spermatozoa. Cryobiology 2002; 44:79-90.

[72]Feldman EC, Nelson, RW. Canine and Feline Endocrinology and Reproduction. 2nd ed. Philadelphia, PA: WB Saunders 1996. p. 673-690.

[73]Gao DY, Ashworth E, Watson PF, Kleinhans FW, Mazur P, Critser JK. Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa: separate effects of glycerol, sodium chloride, and sucrose on spermolysis. Biol Reprod 1993; 49:112-123.

Table 1

Motility (%) of sperm *Jenynsia multidentata* exposed to different osmolalities (240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 460 mOsm/kg) for 4 days: mean \pm SEM. Different lowercase letters indicate statistical differences within the same experimental time ($p < 0.05$).

Osmolality (mOsm/Kg)	Motility (%)				
	0 days	1 day	2 days	3 days	4 days
240	55.0 \pm 14.2 (abc)	48.3 \pm 10.8 (abc)	38.3 \pm 14.4 (abc)	5.5 \pm 1.7 (c)	0,0 (e)
260	78.3 \pm 9.6 (ab)	61.7 \pm 5.8 (abc)	36.6 \pm 10.9 (abc)	26.7 \pm 10.9 (bc)	18.3 \pm 7.9 (bcde)
280	97.6 \pm 0.7 (a)	58.3 \pm 10.8 (ab)	28.3 \pm 11.6 (bc)	26.1 \pm 11.4 (bc)	18.3 \pm 9.2 (cde)
300	93.3 \pm 3.3 (a)	91.7 \pm 0.8 (a)	83.3 \pm 1.6 (ab)	74.4 \pm 3.0 (ab)	68.7 \pm 3.5 (ab)
320	96.7 \pm 1.7 (a)	90.0 \pm 1.4 (a)	86.7 \pm 14.2 (a)	88.3 \pm 6.6 (a)	85.6 \pm 2.7 (a)
340	16.7 \pm 4.4 (abc)	69.4 \pm 7.3 (ab)	78.7 \pm 5.2 (ab)	60.0 \pm 2.9 (abc)	55.0 \pm 1.9 (abcd)
360	10.0 \pm 5.0 (bc)	37.7 \pm 15.1 (abc)	58.7 \pm 14.8 (abc)	40.0 \pm 10.4 (bc)	20.0 \pm 5.7 (bcde)
380	0,0 (c)	25.0 \pm 6.6 (bc)	43.3 \pm 10.1 (abc)	63.3 \pm 4.4 (abc)	60.0 \pm 13.9 (abc)
400	0,0 (c)	60.0 \pm 10.4 (abc)	41.7 \pm 15.3 (abc)	38.3 \pm 13.1 (abc)	7.5 \pm 0.9 (bcde)
460	0,0 (c)	6.7 \pm 3.3 (c)	16.7 \pm 8.3 (c)	10.0 \pm 5.0 (c)	6.7 \pm 3.3 (de)

Table 2

Plasma membrane integrity (%) of sperm *Jenynsia multidentata* exposed to different osmolalities (240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 460 mOsm / kg) for 4 days: mean \pm SEM. Different lowercase letters indicate statistical differences within the same experimental time. (P <0.05).

Osmolality (mOsm/Kg)	Plasma membrane integrity (%)				
	0 day	1 day	2 days	3 days	4 days
240	80.3 \pm 1.3 (c)	82.3 \pm 4.1 (b)	49.0 \pm 11.4 (b)	47.3 \pm 9.8 (c)	24.3 \pm 5.5 (d)
260	89.0 \pm 1.5 (c)	83.6 \pm 1.6 (ab)	66.0 \pm 3.9 (b)	56.0 \pm 4.6 (c)	59.0 \pm 1.2 (bcd)
280	88.0 \pm 1.9 (c)	89.3 \pm 1.9 (ab)	80.3 \pm 5.8 (ab)	75.6 \pm 2.5 (abc)	64.0 \pm 5.7 (abcd)
300	90.6 \pm 1.6 (bc)	92.3 \pm 1.6 (ab)	86.0 \pm 1.7 (ab)	78.0 \pm 0.6 (abc)	77.5 \pm 4.7 (abc)
320	86.0 \pm 3.8 (bc)	90.0 \pm 0.3 (ab)	90.6 \pm 1.9 (a)	82.3 \pm 3.3 (ab)	85.0 \pm 1.1 (ab)
340	90.6 \pm 2.2 (bc)	93.6 \pm 0.6 (a)	93.6 \pm 0.6 (a)	86.3 \pm 1.0 (a)	73.2 \pm 5.0 (abc)
360	92.6 \pm 0.9 (abc)	89.0 \pm 2.7 (ab)	74.3 \pm 7.6 (ab)	84.7 \pm 1.8 (a)	87.6 \pm 2.3 (a)
380	97.0 \pm 0.6 (ab)	93.0 \pm 1.0 (ab)	89.0 \pm 1.9 (ab)	69.0 \pm 7.8 (abc)	58.0 \pm 8.6 (abcd)
400	93.6 \pm 0.2 (abc)	90.6 \pm 1.6 (ab)	77.3 \pm 5.1 (ab)	60.0 \pm 3.8 (c)	54.0 \pm 5.6 (bcd)
460	99.0 \pm 0.5 (a)	92.3 \pm 1.2 (ab)	77.0 \pm 4.8 (ab)	60.3 \pm 5.7 (bc)	53.0 \pm 6.0 (cd)

Table 3

Mitochondrial membrane potential (%) in *Jenynsia multidentata* sperm exposed to different osmolalities (240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 460 mOsm/kg) for 4 days: mean \pm SEM. different lowercase letters indicate statistical differences within the same experimental time. (P <0.05).

Osmolality (mOsm/Kg)	Mitochondrial membrane potential (%)				
	0 day	1 day	2 days	3 days	4 days
240	100.0 \pm 0.0	85.7 \pm 5.1 (ab)	67.0 \pm 7.8 (c)	57.6 \pm 8.5 (b)	35.7 \pm 5.8 (c)
260	100.0 \pm 0.0	82.0 \pm 6.1 (b)	78.0 \pm 7.1 (abc)	65.0 \pm 5.5 (b)	58.7 \pm 6.0 (abc)
280	100.0 \pm 0.0	79.0 \pm 4.5 (b)	82.3 \pm 8.1 (abc)	58.6 \pm 9.1 (b)	51.7 \pm 8.1 (bc)
300	93.0 \pm 3.5	97.7 \pm 1.2 (ab)	76.3 \pm 4.4 (c)	66.0 \pm 1.7 (b)	65.9 \pm 5.0 (abc)
320	98.3 \pm 0.8	97.3 \pm 0.7 (ab)	77.7 \pm 5.9 (bc)	75.0 \pm 5.3 (ab)	67.1 \pm 4.5 (abc)
340	100.0 \pm 0.0	99.3 \pm 0.3 (a)	77.0 \pm 9.8 (abc)	70.7 \pm 7.8 (ab)	69.5 \pm 9.7 (abc)
360	100.0 \pm 0.0	99.0 \pm 0.5 (ab)	99.6 \pm 0.2 (a)	96.0 \pm 0.3 (a)	85.3 \pm 0.8 (a)
380	100.0 \pm 0.0	99.6 \pm 0.2 (a)	97.3 \pm 1.3 (ab)	90.0 \pm 1.7 (ab)	81.7 \pm 6.0 (ab)
400	100.0 \pm 0.0	99.0 \pm 0.3 (ab)	95.3 \pm 2.3 (abc)	89.0 \pm 3.0 (ab)	75.9 \pm 3.3 (abc)
460	71.3 \pm 7.4	87.0 \pm 6.5 (ab)	96.6 \pm 0.9 (abc)	84.6 \pm 1.8 (ab)	83.3 \pm 0.8 (a)

Table 4

Sperm DNA integrity (%) in *Jenynsia multidentata* exposed to different osmolalities (240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 460 mOsm/kg) for 4 days: mean \pm SEM. Different lowercase letters indicate statistical differences within the same experimental time. ($P < 0.05$).

Osmolality (mOsm/Kg)	Sperm DNA integrity (%)				
	0 day	1 day	2 days	3 days	4 days
240	98.7 \pm 0.7	99.0 \pm 0.3 (ab)	100.0 \pm 0.0	95.0 \pm 0.3 (bc)	92.0 \pm 0.6 (c)
260	97.0 \pm 1.5	100.0 \pm 0.0 (a)	98.0 \pm 1.0	95.7 \pm 1.2 (abc)	95.3 \pm 1.4 (abc)
280	99.7 \pm 0.2	99.0 \pm 0.5 (ab)	98.3 \pm 0.4	97.0 \pm 0.8 (abc)	95.7 \pm 1.2 (abc)
300	100.0 \pm 0.0	98.3 \pm 0.8 (ab)	98.3 \pm 0.6	97.3 \pm 0.6 (abc)	98.5 \pm 0.6 (abc)
320	99.0 \pm 0.3	99.3 \pm 0.3 (ab)	100.0 \pm 0.0	100.0 \pm 0.0 (a)	99.5 \pm 0.2 (ab)
340	92.7 \pm 4.7	99.7 \pm 0.2 (ab)	95.7 \pm 2.0	96.0 \pm 1.5 (abc)	100.0 \pm 0.0 (a)
360	97.7 \pm 1.2	99.7 \pm 0.2 (ab)	98.0 \pm 0.7	99.0 \pm 0.3 (ab)	98.7 \pm 0.7 (ab)
380	96.0 \pm 1.5	97.0 \pm 1.0 (b)	99.7 \pm 0.2	99.3 \pm 0.3 (ab)	100.0 \pm 0.0 (a)
400	98.3 \pm 0.6	99.7 \pm 0.2 (ab)	98.7 \pm 0.4	98.7 \pm 0.7 (ab)	94.6 \pm 0.2 (bc)
460	99.0 \pm 0.5	99.0 \pm 0.3 (ab)	99.0 \pm 0.5	90.0 \pm 0.6 (c)	88.5 \pm 2.7 (c)

4 CAPÍTULO 2

Artigo submetido à revista Aquatic toxicology:

Sperm functionality in freshwater viviparous guppy *Jenynsia multidentata* (Anablepidae) acutely and chronically exposed to waterborne copper.

Janaína Camacho da Silva¹, Antonio Sergio Varela Junior², Marianna Basso Jorge², Estela Fernandes¹, Juliana Alves¹, Tainã Figueiredo Cardoso¹, Elton Pinto Colares², Cláudia Bueno dos Reis Martinez³, Adalto Bianchini², Carine Dahl Corcini^{4,*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas: Fisiologia Animal Comparada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Rio Grande, Av. Itália km 8, Campus Carreiros, 96201-900, Rio Grande, RS, Brasil

²Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Rio Grande, Av. Itália km 8, Campus Carreiros, 96201-900, Rio Grande, RS, Brasil

³ Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina, Campus Universitário Jardim Universitário, PO Box 6001, 86051-990, Londrina, PR, Brasil.

⁴ Departamento de Patologia Animal, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário, PO Box 354, 96001-970 - Pelotas, RS, Brasil.

Corresponding author: Carine Dahl Corcini
Universidade Federal de Pelotas (UFPel)
Faculdade de Veterinária
Departamento de Patologia Animal
PO Box 354, 96001-970 Pelotas, Brasil
Phone: + 55 53 32759161
E-mail:corcinicd@gmail.com

Abstract

Increasing contamination of freshwater ecosystems with copper (Cu) is a potential threat to animal reproduction. Therefore, there is a need for a better understanding of the mechanisms involved in Cu toxicity in aquatic organisms. The aim of the present study was to evaluate sperm quality and oxidative damage in the gonads of adult males of the viviparous guppy *Jenynsia multidentata* acclimated to freshwater and acutely (4 days) or chronically (21 days) exposed to environmentally relevant Cu concentrations [dissolved: control (0.08), 2.2, 5.5 and 9.3 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cu]. Fish acutely exposed to 9.3 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cu showed a significant increase on Cu accumulation in gonads tissue associated with a marked trend of reduction in the number of spermatozoa (47.4%), and a significant reduction in mitochondrial membrane potential (6.3%) and sperm motility (61.2%) when compared to those kept under control conditions (no Cu addition in the water). These effects were likely due to an oxidative stress condition, as evidenced by a significant increase in lipid peroxidation observed in fish acutely exposed to 9.3 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cu. In turn, fish acutely exposed to 2.2 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cu showed a reduction (7.8%) in membrane integrity with no significant change in lipid peroxidation in these fish or in those fish chronically exposed to any of the Cu concentrations tested. However, fish chronically exposed to 2.2 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cu showed a marked trend of reduction (44.7%) in the total number of spermatozoa while sperm of fish exposed to 9.3 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cu have reduced motility (72.4%) when compared to fish kept under control conditions. DNA integrity did not change in sperm of fish acutely or chronically exposed to any of the Cu concentration tested. These findings indicate that acute exposure to environmentally relevant concentrations of waterborne Cu affects negatively the sperm production and quality in males of the viviparous guppy *J. multidentata*. They also suggest that an oxidative stress condition is involved in the observed effects. However, most of the effects observed in guppies acutely exposed to Cu were no

longer more seen after the chronic exposure to environmentally relevant concentrations of Cu. In this case, only sperm motility was negatively affected by the chronic exposure to the highest concentration of Cu tested ($9.3 \mu\text{g L}^{-1}$ Cu). This finding suggests that sperm motility is not only affected by an oxidative stress condition induced by Cu, but also by other Cu effects on the sperm physiology, such as a possible effect of this metal on the cellular energy metabolism.

Keywords: copper acute and chronic toxicity, freshwater fish, mitochondrial functionality, oxidative stress, reproduction, sperm quality.

1. Introduction

Copper (Cu) is an essential transition metal for all aerobic organisms. It is part of several metalloenzymes, such as cytochrome c oxidase and Cu-Zn superoxide dismutase, which are involved in mitochondrial electron transport and free radicals detoxification, respectively (Uauy et al., 1998; Turnlund, 1999). However, Cu is an essential metal for aquatic organisms only at low concentrations. Elevated levels of this metal in the environment eventually become toxic to both freshwater and seawater organisms (Ebrahimpour et al., 2010; Pinho and Bianchini, 2010; Tellis et al., 2012).

As aquatic ecosystems are final receivers for most pollutants, aquatic organisms can provide early warning signs of the effects of excessive environmental pollution (Kime et al., 1996). To assess the harmful effects of different chemical compounds, fish species are considered suitable biomonitors because of their economical and ecological importance

(Jiraungkoorskul et al., 2002). In addition, changes at the cellular and biochemical levels in fish are among the most sensitive biological responses observed after exposure to water pollutants (Gluszczak et al., 2007; Sandrini et al., 2009).

The viviparous guppy *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Ciprinodontiforme) is a fish species that has been successfully used as a bioindicator model to assess the effects the xenobiotics in the aquatic environment (APHA, 1998; Cazenave et al., 2005; Ballesteros et al., 2007, 2011; Hued et al., 2012, 2013). This neo-tropical fish species is widely distributed in South America (Malabarba et al., 1998). It has been indicated by the Argentinean Institute of Standardization and Certification (IRAM, 2007) as an appropriate native species to determine the acute lethal toxicity to different chemical compounds. In addition to inhabit a variety of environments, *J. multidentata* has a reproductive biology characterized by internal fertilization and viviparity. Therefore, it may be differently affected by xenobiotics released in aquatic ecosystems. These features, combined with its abundance, small size, and easy maintenance under experimental conditions, make the guppy *J. multidentata* as a potential biomonitor and biological model for ecotoxicological studies in estuarine and freshwater environments.

Reproduction is an important biological function that may be affected in fish following Cu exposure (James et al., 2003, 2008; Sarosiek et al., 2009). However, the mechanisms by which this metal adversely affects fish reproduction are not well known (Grosell, 2012). In mammals, many of Cu effects on the reproductive system are consistent with cell damage caused by increase in reactive oxygen species (ROS) concentration (Iakovidis et al., 2011). At suitable levels, ROS production has important physiological functions, such as cell differentiation (Sohal et al., 1986) and sperm capacitating (De Lamirande et al., 1997). However, ROS levels above the required physiological requirements result in oxidative stress,

which is considered as a relevant factor in sperm pathophysiology (Aitken and Krausz, 2001; Bennetts and Aitken, 2005).

In aquatic species, exposure to transition metals such as Cu can also induce to an increase in ROS production. These molecules are highly reactive and can cause cellular damage in various levels by interacting with proteins, lipids, DNA and RNA (Lushchak, 2011; Aitken et al., 2012; Cabrita et al., 2014), as well as reducing ATP production and damaging mitochondria and lysosomes (Who, 1998). Nevertheless, studies reporting oxidative damage induced by fish exposure to Cu are rare. Furthermore, studies available are generally concentrated in few studies and always using the same species (Grosell, 2012). As sperm cells are particularly vulnerable to oxidative damage due to their high content of polyunsaturated fatty acids (Aitken and Krausz, 2001; Eidi et al., 2010), increased ROS production could be a potential mechanism involved in Cu toxicity to fish reproduction.

In light of the background above, the objective of the present study was to evaluate the effects of the acute (4 days) and chronic (21 days) exposure on sperm functionality in the viviparous guppy *J. multidentata* acclimated to freshwater and exposed to sublethal and environmentally relevant Cu concentrations. In turn, lipid peroxidation (LPO) was used as a measure of the potential oxidative damage induced by waterborne Cu exposure.

2. Material and methods

2.1. Fish collection and acclimation

Adult males of the viviparous guppy *J. multidentata* (n = 200) were collected in a creek running into the Cassino Beach (32°13'47.3"S and 52°12'25.8"W; Rio Grande, RS, southern Brazil) using dip nets. Fish were immediately transferred to the laboratory and acclimated in dechlorinated tap water during 15 days under constant aeration, temperature (22 °C) and photoperiod (12 light:12 dark). Fish were fed daily with commercial feed for omnivore fishes (Alcon Basic, Camburiu, SC, Brazil). The present study was approved by the Ethics in Animal Use Committee of the Federal University of Rio Grande (CEUA-FURG; reference # Pq028/2013).

2.2. Copper exposure

For practical reasons, experimental procedures described below were performed twice using 80 male fish in the first trial and 120 male fish in the second trial. In the first trial, acclimated fish were randomly divided into 4 experimental groups in triplicate. In the second one, fifteen fish were randomly sampled per treatment for each experimental period (acute exposure: n = 60; chronic exposure: n = 60). The experiment was performed in 5-L acrylic tanks, never exceeding the density of 1.0 g L⁻¹ fish per tank. Water used in the experiment was the same employed for fish acclimation. Nominal Cu concentrations tested were: 0 (control: no Cu addition to the water), 4.5, 9 and 18 µg L⁻¹ Cu. They were selected considering the current Brazilian Water Quality Criterion for Cu (9 µg L⁻¹ Cu) aiming the protection of fresh water ecosystems (CONAMA, 2005). It is worth to note that similar Cu concentrations were already tested in previous experiments from our laboratory to evaluate the effects of Cu on the physiology of freshwater fish (Zimmer et al., 2012) and invertebrates (Machado et al., 2013; Jorge et al., 2013; Giacomini et al., 2013).

Nominal Cu concentrations were prepared from a CuSO₄ (Vetec Química Fina, São Paulo, SP, Brazil) stock solution (1 mg L⁻¹). Experimental media were prepared 24 h previously their use and kept under constant aeration for complete dissolution and stabilization of Cu with the dechlorinated tap water. All material employed was previously acidified with 1% HNO₃ and then thoroughly rinsed with distilled water. Every day, experimental media were completely renewed with a new solution prepared as described above. Fish were fed *ad libitum* two hours before the experimental medium renewal.

Fish were sampled at two different exposure times: 4 days (acute exposure) and 21 days (chronic exposure). They were anesthetized with benzocaine (0.1 g L⁻¹) prepared in buffered solution (pH 7.0), weighed (wet body weight), measured (total body length), euthanized, and had their gonads dissected and weighed. Gonads of fish from the first trial (n = 80) were used for the analysis of sperm functionality (sperm concentration, motility, membrane integrity, mitochondrial membrane potential, and DNA integrity). While, from the second trial (n = 120) were used for the analysis of Cu accumulation and lipid peroxidation.

2.3. Cu accumulation analysis

Gonads was dried (60 °C for 48 h), weighed, digested in 50 µL of 65% HNO₃ (Suprapur®, Merk, Haar, Germany) for 48 h and than diluted up to 500 µL with Milli-q water. Copper content in digested samples was measured by graphite furnace atomic absorption spectroscopy (EAA ANALYST 700, PerkinElmer) and was expressed as µg Cu per g dry weight of gonads tissue.

2.4. Sperm functionality analysis

Gonads used for sperm functionality analysis were placed (1/9:weight/volume) in 1.5-mL Eppendorf type tubes containing Hanks balanced-salt solution (HBSS: 137 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.25 mM Na₂HPO₄, 0.44 mM KH₂PO₄, 1.3 mM CaCl₂, 1.0 mM MgSO₄, 4.2 mM NaHCO₃, and 5.55 mM glucose; pH 7.2; osmolality: 300 mOsmol kg H₂O). Proper osmolality (300 mOsmol kg H₂O) for *J. multidentata* sperm was defined in a previous work (unpublished data). Spermatozoa of this fish species are found in cysts, being then released into the HBSS by gently disrupting the gonadal tissue using a fine-tipped surgical forceps. Sample was homogenized using a 10- μ L micropipette tip. The obtained suspension was employed for the sperm functionality analysis, as described below.

Sperm motility was determined using 5 μ L of gonadal suspension placed on a glass slide under a cover slip. It was visually determined under a phase contrast microscope (Olympus BX 51, America, São Paulo, SP, Brazil) at a 200x magnification. Results were expressed in percentage of cells displaying a linear and progressive movement. Sperm that only vibrated were considered as not mobile (Sun et al., 2010). Sperm motility in control fish was considered as 100%. The number of spermatozoa per testis was counted in formalin saline (101-fold dilution) using a hemocytometer (Huang et al., 2009). Counting was performed in duplicate.

Plasma membrane integrity was evaluated using two different fluorochromes to discriminate between intact and damaged cells: carboxyfluorescein diacetate (CFDA) and propidium iodide (PI). Cells showing intact membrane emitted green fluorescence while those having damaged membranes emitted red fluorescence (Varela Junior et al., 2012). Analysis was performed using 5 μ L of sperm suspension added to 5 μ L of HBSS containing 1.7 mM

formaldehyde, 20 μ M CFDA, and 7.3 μ M PI. After 10 min of incubation at 20°C, 5 μ L of the mixture were placed on glass slides under cover slip and analyzed using an epifluorescence microscope (Olympus BX 51, America, São Paulo, SP, Brazil) at a 400x magnification. The percentage of cells with intact membranes was determined considering the proportion of cells emitting green fluorescence out of a total of 200 cells analyzed.

Mitochondrial membrane potential was measured using Rhodamine 123 (Rh-123, Sigma, São Paulo, SP, Brazil), as previously described (Gillan et al., 2005; Robles and Martinez-Pastor, 2013). An aliquot (5 μ L) of sperm suspension was added to 5 μ L HBSS containing 20 μ L Rh-123 (13 μ M). After 10 min of incubation at 20°C, 5 μ L of the mixture was placed on glass slides under cover slip and changes in transmembrane potential was evaluated using the epifluorescence microscope (Olympus BX 51, America, São Paulo, SP, Brazil) at a 400x magnification. Sperm cells emitting intense green fluorescence in their middle portion, which indicates Rh-123 accumulation, were considered as having a high mitochondrial membrane potential. On the other hand, sperm emitting low fluorescence (matting) were considered as showing low mitochondrial membrane potential. Percentage of active mitochondria was calculated considering the proportion of cells emitting green fluorescence out of a total of 200 cells analyzed.

DNA integrity of sperm cells was evaluated using the sperm chromatin structure assay (SCSA) described by Evenson et al. (1980), with minor modifications. Briefly, this method consists in using a metachromatic fluorescent dye, the acridine orange, which intercalates with the DNA strands. When bound to double-stranded (intact DNA), acridine orange emits a green fluorescence, while a red fluorescence is emitted when acridine orange is interspersed with single-stranded (committed chromatin). A sample 5 μ L of sperm suspension was added to 5 μ L TNE solution (final concentration: 10 mM Tris-HCl; 1.215 mM NaCl, 1 mM EDTA,

pH 7.2). After 30 s, 10 μL of 1x Triton solution were added. After additional 30 s, 1.5 μL acridine orange (2 mg mL^{-1} prepared in deionized water) were added to the reaction mixture. After 10 min of incubation at 20°C , 5 μL of this mixture was placed in a glass slide under a cover slip by using a razor blade. The number of cells with intact DNA was evaluated using the epifluorescence microscope (Olympus BX 51, America, São Paulo, SP, Brazil) at a 400x magnification. Percentage of intact DNA was calculated considering the proportion of cells emitting green fluorescence out of a total of 200 cells analyzed.

2.5. Lipid peroxidation analysis

Pools of three fish were made for each experimental condition ($n = 5$ pools per treatment) to get enough biological material for lipid peroxidation (LPO) analysis. Gonad samples were stored at -80°C until analysis.

Oxidation damage to lipids induced by ROS was measured using the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay, as described by Oakes and Van der Kraak (2003). This assay is based on the reaction of the malondialdehyde (MDA) generated by oxidative damage to lipids with the thiobarbituric acid (TBA) in conditions of high temperature and acidity. This reaction produces a chromogen, which was measured using a spectrofluorometer (excitation: 515 nm; emission 553 nm) (Victor, PerkinElmer, Waltham, MA, USA). LPO was expressed as $\text{nmol MDA mg dry weight}^{-1}$, using TMP (1,1,3,3-tetramethoxypropane) as standard.

2.6. Water chemistry analyses

Every 2 days, the experimental media were sampled for pH (pHmeter; Digimed, DMPH-2, São Paulo, SP, Brazil), dissolved oxygen concentration (Oxymeter; Digimed, São Paulo, SP, Brazil), total alkalinity (APHA, 1998), hardness (Mg^{2+} and Ca^{2+}) (Basset et al., 1981) and dissolved copper concentration by graphite furnace atomic absorption spectroscopy (EAA ANALYST 700, PerkinElmer). For dissolved copper determination ($\mu g L^{-1} Cu$), filtered samples (0.45 μm) were collected and acidified (1% HNO_3 ; SupraPur®, Merck, Haar, Germany) before and 24 h after fish introduction in the exposure media.

2.7. Data presentation and statistical analysis

Data were expressed as mean \pm standard error. Data normality was analyzed using the Shapiro-Wilk test. Parametric data were analyzed through analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey test. Non-parametric data were analyzed using the Kruskal-Wallis ANOVA, followed by the Duncan test. Spearman correlation was used to determine the level of association between the sperm quality parameters analyzed. Significance level adopted was 95% ($p < 0.05$). All statistical analyses were performed using the software Statistix 9.0, 2008 version (Tallahassee, FL, USA).

3. Results

3.1. Water chemistry analyses

The results for water chemistry parameters were within the range of expected for soft hard water (USEPA, 1994): pH = 6.9 ± 0.2 , dissolved oxygen = $6.8 \pm 0.4 \text{ mg L}^{-1}$, temperature = $23.2 \pm 0.8^\circ\text{C}$, total alkalinity = $20 \text{ mg L}^{-1} \text{ CaCO}_3$, hardness (Mg^{2+} and Ca^{2+}) = $50 \text{ mg L}^{-1} \text{ CaCO}_3$. The mean measured dissolved copper concentration in the experimental media for the control and nominal concentrations of 4.5, 9 and $18 \text{ } \mu\text{g L}^{-1} \text{ Cu}$ were 0.08, 2.2, 5.5 and $9.3 \text{ } \mu\text{g L}^{-1} \text{ Cu}$, respectively. About 50% of the nominal Cu was dissolved in all treatments. Due to the loss of dissolved Cu by adsorption processes during exposure media preparation and because dissolved Cu concentration normally include the most toxic forms of this metal, all results are express in terms of the dissolved Cu concentration in the exposure media.

3.2. Cu accumulation, survival, biometric analyses

Gonads Cu accumulation was significantly higher when fish were acutely exposed to $9.3 \text{ } \mu\text{g L}^{-1} \text{ Cu}$, nevertheless, chronic exposure at the same Cu concentration exposition did not result in significant Cu accumulation (Fig. 1). No accumulation was also observed in the others experimental conditions, as copper concentration (CTR, 2.2 and $5.5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1} \text{ Cu}$) and exposure time (4 and 21 days). No fish mortality was observed during the first and second trial performed for 4 and 21 days. Fish wet weight, fish body length, and gonad wet weight did not differ among treatments for the same exposure time. However, a significant difference in gonad wet weight was observed between exposure times for the same treatment. Gonads of fish kept under control condition (no Cu addition in the water) or exposed to 2.2 and $5.5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1} \text{ Cu}$ for 21 days were larger than those of fish exposed to the same treatments for 4 days. However, gonads of fish exposed to $9.3 \text{ } \mu\text{g L}^{-1} \text{ Cu}$ for 4 and 21 days showed similar mean values of wet weight (Table 1). Wet body weight and total body length of fish used in the

second trial were similar among treatments (control and Cu concentrations). A similar result was observed for fish exposed for 4 or 21 days (Table 3).

3.3. Sperm quality analyses

Fish exposed to $5.5 \mu\text{g L}^{-1}$ Cu for 4 days showed a higher number of spermatozoa than those exposed to $9.3 \mu\text{g L}^{-1}$ Cu for the same period of time. However, fish exposed to these treatments with Cu showed a similar number of spermatozoa than those kept under control condition. Fish exposed to $2.2 \mu\text{g L}^{-1}$ Cu for 21 days showed a significant lower number of spermatozoa than those exposed to $5.5 \mu\text{g L}^{-1}$ Cu for the same period of time. Again, fish exposed to these treatments with Cu showed a similar number of spermatozoa than those kept under control condition (Fig. 2).

Sperm motility rate was significantly lower in fish exposed to the highest concentration of Cu tested ($9.3 \mu\text{g L}^{-1}$ Cu) for 4 days (61.2% reduction) or 21 days (72.4% reduction) than in those kept under control condition (CTR) for the respective time of exposure (Fig. 3).

Plasma membrane integrity was significantly lower in spermatozoa of fish acutely exposed to 2.2 than in spermatozoa of those kept under control condition or exposed to $5.5 \mu\text{g L}^{-1}$ Cu for the same time of exposure (4 days). Sperm of fish exposed to $9.3 \mu\text{g L}^{-1}$ Cu showed similar plasma membrane integrity to those of fish exposed to the other treatments. After 21 days of exposure, no significant difference was observed in plasma membrane integrity of spermatozoa of fish from all treatments tested (Table 2).

Sperm of fish exposed to $9.3 \mu\text{g L}^{-1}$ Cu showed a significant lower mitochondrial membrane potential than sperm of those kept under control condition or exposed to $2.2 \mu\text{g L}^{-1}$ Cu for 4 days. However, no significant difference was observed among treatments after 21 days of experiment. Also, no significant difference in sperm DNA integrity was observed among treatments within each exposure time (Table 2).

Spearman correlation analysis showed a significant and positive association between sperm motility and mitochondrial membrane potential ($r = 0.44$). Sperm motility was also positively correlated with the total number of sperm cells ($r = 0.58$). Total body length and wet body weight were strongly correlated for fish acutely ($r = 0.88$) or chronically ($r = 0.79$) exposed to Cu. Also, gonads wet weight was positively correlated to the wet body weight and total body length for fish acutely ($r = 0.46$ and $r = 0.50$, respectively) or chronically ($r = 0.65$ and $r = 0.70$) exposed to Cu.

3.4. Lipid peroxidation (LPO) analyses

Sperm of fish acutely exposed (4 days) to Cu showed a significant and Cu concentration-dependent increase in lipid peroxidation level (Fig.4). In fact, LPO level in fish exposed to $9.3 \mu\text{g L}^{-1}$ Cu was significantly higher than that found for fish kept under control condition (no Cu addition in the water) or exposed to 2.2 and $5.5 \mu\text{g L}^{-1}$ Cu. In fish chronically exposed (21 days) to Cu, no significant change in the LPO level was observed among treatments (Fig. 4).

4. Discussion

Chemical pollution in aquatic ecosystems is often unnoticed because no lethality or short-term visible changes are observed. In fact, aquatic toxicity is dependent on the type of the xenobiotic present in the water and its bioavailability. Dissolved Cu concentrations tested in the present study (2.2, 5.5 and 9.3 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cu) can be considered as sublethal to the viviparous guppy *Jenynsia multidentata* acclimated to freshwater. This statement is based on the fact that no fish mortality was observed during the two trials performed in the present study for 4 and 21 days. Furthermore, there was no change in gonad weight among the experimental treatments for each exposure time. As opposed, a reduction in growth and gonadal development dependent on the concentration and time of exposure to Cu was reported for the viviparous fish *Xiphophorus helleri* (James et al., 2003, 2008). However, it is important to stress that Cu concentrations tested with *X. helleri* were markedly higher (40, 80 and 120 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cu) than those employed in the present study (2.2, 5.5 and 9.3 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cu). Also, Cu effects in *X. helleri* were only observed after at least 100 days of exposure to the metal, i.e., a much longer time of exposure than those tested in the present study (4 and 21 days). Therefore, the differential responses observed between these two studies could be associated with the different Cu concentrations, exposure times, and even the different fish species tested.

Despite the absence of lethal toxicity and/or effects of Cu at the organic (gonadal) level discussed above, significant negative effects of exposure to environmentally relevant concentrations of Cu were observed in parameters associated with sperm quality and oxidative stress. Taken all together, these findings suggest that subtle responses can be seen at lower biological levels (sub-cellular and/molecular) when freshwater fish are exposed to environmentally relevant concentrations of waterborne Cu. The observed effects could be related to Cu accumulation in fish gonads and its effect on the spermatogenesis of the guppy

J. multidentata, as further discussed. Cu accumulation in gonads increase significantly over the acute duration of experiment in fish exposed to $9.3 \mu\text{g L}^{-1}$ Cu, however no significant difference in accumulation was observed in the others exposed concentration neither over the chronic exposition time. This pattern of accumulation could be due to an activation of detoxification mechanisms as metallothioneins (Monserrat et al., 2007) or a gradual metal uptake resulting in metal deposition in non-critical tissues at lower metal concentrations and long-term exposures, such as those reported here (Borgmann et al., 1993). Such mechanisms are crucial in the whole-organism homeostasis, since Cu can react with biomolecules inducing physiological disruptions (Phillips, 1980; Heath, 1995; Langston and Bebianno, 1998; Handy, 2003; Grosell et al., 2007).

In fact, spermatogenesis disruptors, such as Cu, can influence directly the sperm production and/or quality in vertebrates (Handy, 2003; Chattopadhyay et al., 2005; Eidi et al., 2010; Chattopadhyay and Biswas, 2013). Regarding sperm quality parameters, it is worth noting that spermatozoa concentration is one of the most important quantitative parameters of fish semen employed in the evaluation of routine search for external or internal fertilization (Fogilda Silveira et al., 1987). In the present study, spermatozoa concentration was highly variable. Although spermatogenesis was not significantly affected by the acute exposure to waterborne Cu, a marked trend of a lower total number of spermatozoa was observed in sperm of guppies acutely exposed to $9.3 \mu\text{g L}^{-1}$ Cu. In addition, a marked reduction (61.2%) in sperm motility was observed when guppies were acutely exposed to this Cu concentration. Furthermore, the decreased sperm motility was paralleled by a reduced mitochondrial membrane potential ($r = 0.44$).

In spermatozoa, mitochondria are described as the primary source of ATP (Graham and Mocé, 2005). Also, it is well known that ATP is produced through the oxidative phosphorylation process, which requires the existence of a transmembrane potential, i.e., an

electrochemical gradient across the inner mitochondrial membrane. A reduced transmembrane potential directly compromises the normal cellular metabolism (Graham and Mocé, 2005), thus influencing sperm motility and vitality (Aitken et al., 2012; Cabrita et al., 2014). In human sperm, the progressive decrease in motility has been related to adverse effects on mitochondrial respiration through an uncoupling between the electron transport chain and ATP synthesis caused by ROS (Ferramosca et al., 2013). Therefore, it is probable that fish exposure to Cu and consequently accumulation in gonads could be undergoing to an oxidative stress condition which is negatively affecting the plasma membrane integrity and the mitochondrial membrane potential. This effect would lead to a reduced ATP production and a consequent decrease in sperm motility, as observed in guppies acutely or chronically exposed to $9.3 \mu\text{g L}^{-1}$ Cu. The significant and Cu concentration-dependent increase in LPO level observed in guppies acutely exposed to this Cu concentration is in complete agreement with this idea.

In general, cell membranes are protected against damage induced by ROS through several enzymatic mechanisms and production of antioxidant molecules (Celino et al., 2011). Copper-zinc superoxide dismutase (Cu/Zn SOD) is reported as the first enzyme involved in the removal of the testicles oxiradicals (Bauche et al., 1994). However, sperm membranes are especially vulnerable to the oxidative attack induced by ROS because of their high content in polyunsaturated fatty acids (Wathes et al., 2007). For example, Celino et al. (2012) reported that ROS directly inhibited spermatogenesis in the freshwater fish *Anguilla japonica*. Also, they showed that a reduced SOD activity led spermatogonia to be more susceptible to oxidative attack induced by ROS, leading to cell apoptosis. Furthermore, freshwater fish exposed to Cu were shown to have reduced SOD activity (Vutukuru et al., 2006). Therefore, a possible increase in ROS production and/or a reduction in the total oxyradical scavenge

capacity in the gonads of males guppies *J. multidentata* acutely exposed to $9.3 \mu\text{g L}^{-1}$ Cu may have led the gonadal tissue to an oxidative damage condition. The significant increase in Cu accumulation in gonads associated with a negative effects on plasma membrane integrity, consequent reduction in mitochondrial transmembrane potential and sperm motility, as well as the trend of a reduced spermatogenesis observed in fish acutely exposed to $9.3 \mu\text{g L}^{-1}$ Cu are in complete agreement with the idea of a ROS-mediated effect of gonads Cu accumulation on sperm production and/or quality in the viviparous guppy *J. multidentata*.

It is important to note that loss of spermatozoa membrane integrity is possibly associated with sub-fertility and/or infertility in humans (Gillian et al., 2005; Ambrogi et al., 2006). Therefore, our findings would suggest that fish exposure to environmentally relevant Cu concentrations, as tested in the present study, could reduce the performance of reproduction in freshwater fish without significant effects on DNA integrity. However, sperm of guppies exposed to the same Cu concentrations but for a longer period of time (21 days), did not show any significant change in the Cu accumulation, total number of spermatozoa, plasma membrane integrity, mitochondrial membrane potential, and DNA integrity. Also, a paralleled lack of significant change in LPO level was observed in sperm of guppies exposed for 21 days to any of the Cu concentrations tested. Therefore, the negative effects observed after a short-term exposure (4 days) to waterborne Cu are not seen after a longer period of exposure (21 days) to the metal. These findings suggest that the likely increased Cu accumulation and consequently ROS generation occurring after a short-term exposure to Cu would induce mechanisms to scavenge Cu and ROS, since ROS can react with biomolecules causing damages to DNA, proteins and lipids (Grosell, 2012). Furthermore, Cu is shown to stimulate gene expression and increase the levels of metallothioneins in target organs of freshwater fish (Wu et al., 2007; Minghetti et al., 2008). These proteins are known as having an essential role in regulating the levels of essential and non-essential metals in target organs.

Therefore, our findings from measurements performed in male guppies chronically exposed to environmentally relevant Cu concentrations, as discussed above, suggest that mechanisms involved in the maintenance of Cu homeostasis and the oxidative status in *J. multidentata* can minimize the deleterious effects induced by the oxidative stress following fish exposure to waterborne Cu. This response could be related to a reduced Cu uptake and/or an increased Cu excretion, as well as a reduced ROS generation and/or an increased antioxidant capacity. However, it is important to note that a marked significant reduction in sperm motility was still observed in guppies exposed to $9.3 \mu\text{g L}^{-1}$ Cu for 21 days respect to those kept under control condition (no Cu addition in the water) or those exposed to 2.2 or $5.5 \mu\text{g L}^{-1}$ Cu. This finding clearly suggests that fish sperm motility is not only affected by the oxidative stress, as observed after the acute exposure to environmentally relevant concentrations of Cu, but also to other effects of this metal on sperm cell biochemistry and/or physiology. In this case, future studies should address the possible effects of acute and chronic exposure to environmentally relevant Cu concentrations on the energy metabolism of sperm cells in the freshwater guppy *J. multidentata*. This would help to better elucidate the biochemical basis involved in the reduced sperm motility observed in fish acutely and chronically exposed to environmentally relevant Cu concentrations.

5. Acknowledgments

The present study was financially supported by the Brazilian "Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior" (CAPES, Brasília, DF, Brazil). A. Bianchini and C.D. Corcini are research fellows from the Brazilian "Conselho Nacional de

Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasília, DF, Brazil). A. Bianchini is supported by the International Development Research Centre (IDRC, Ottawa, ON, Canada). Authors also thank the members of the Comparative Animal Reproduction research team (Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, Brazil) for their assistance.

6. References

Aitken, R.J. Krausz, C., 2001. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reprod.* 122, 497-506.

Aitken, R.J., Jones, K.T., Robertson, S.A., 2012. Reactive oxygen species and sperm function in sickness and in health. *J. Androl.* 33, 1096-1106.

Ambrogi, M., Spinaci, M., Galeati, G., Tamanini, C., 2006. Viability and DNA fragmentation in differently sorted boar spermatozoa. *Theriogenology.* 66, 1994-2000.

American Public Health Association (APHA), 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater. Washington.

Ballesteros, M.L., Bianchi, G.E., Carranza, M., Bistoni, M.A., 2007. Endosulfan acute toxicity and histomorphological alterations in *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes). *J. Environ. Sci. Health. B.* 42, 351-357.

Ballesteros, M.L., Gonzales, M., Wunderlin, D.A., Bistoni, M.M.A., Miglioranza, K.S.B., 2011. Uptake, tissue distribution and metabolism of the insecticide endosulfan in *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes). *Environ. Pollut.* 159, 1709-1714.

Basset, J., Denney, R.C., Jeffery, G.H., Mendhan, J., 1981. *Análise Inorgânica Quantitativa - Voguel*. Rio de Janeiro, Ed Guanabara S.A. 690p.

Bauche, F., Fouchard, M.H., Jegou, B., 1994. Antioxidant system in rat testicular cells. *FEBS Letters*. 349, 392-396.

Bennetts, L.E., Aitken, R.J., 2005. A comparative study of oxidative DNA damage in mammalian spermatozoa. [Mol. Reprod. Dev.](#) 71, 77-87.

Borgmann, U., Nonwood, W.P., Clarke, C., 1993. Accumulation, regulation and toxicity of copper, zinc, lead and mercury in *Hyaella azteca*. *Hydrobiologia* 259, 79-89.

Cabrita, E., Martinez-Páramo, S., Gavaia, P.J., Riesco, M.F., Valcarce, D.G., Sarasquete, C., Herráez, M.P., Robles, V., 2014. Factors enhancing fish sperm quality and emerging tools for spermanalysis. *Aquaculture*. 432, 389-401.

Cazenave, J., Wunderlin D.A., Bistoni, M.A., Amé, M.V., Krause, E., Pflugmacher, S., Wiegand, C., 2005. Uptake, tissue distribution and accumulation of microcystin-RR in *Corydoras paleatus*, *Jenynsia multidentata* and *Odontesthes bonariensis*: a Field and laboratory study. *Aquat. Toxicol.* 75, 178-190.

Celino, F.T., Yamaguchi, S., Miura, C., Ohta, T., Tozawa, Y., Iwai, T., Miura, T., 2011. Tolerance of Spermatogonia to Oxidative Stress Is Due to High Levels of Zn and Cu/Zn Superoxide Dismutase. *PLoS ONE*. 6, (2).

Celino, F.T., Yamaguchi, S., Miura, C., Miura, T., 2012. Proliferating Spermatogonia Are Susceptible to Reactive Oxygen Species Attack in Japanese Eel (*Anguilla japonica*). *Biol. of Reprod.* 70, 1-9.

Chattopadhyay, A., Sarkar, M., Biswas, N.M., 2005. Dose-dependent effect of copper chloride on male reproductive function in immature rats. *Kathmandu Univ. Med. J.* 12, 392-400.

Chattopadhyay, A., Biswas, N.M., 2013. Testosterone supplemented protection on inhibition of testicular function induced by copper chloride. *DHR-IJBS*. 4, (1).

CONAMA, 2005. Resolução nº. 357 de 11 de março de 2005. Dispõe sobre diretrizes de enquadramento dos corpos d'água e dá outras providências.

<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459> (accessed in December 2012).

De Lamirande, E., Hon, J., Armand, Z., Hideya, K., Claude, G., 1997. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev. Reprod.* 2, 48-54.

Ebrahimpour, M., Alipour, H., Rakhshah, S., 2010. Influence of water hardness on acute toxicity of copper and zinc on fish. *Toxicol. Ind. Health.* 26, 361-365.

Eidi, M., Eidi, A., Pouyan, O., Shahmohammadi, P., Fazaeli, R., Bahar, M., 2010. Seminal plasma levels of copper and its relationship with seminal parameters. *Iran. J. Reprod. Med.* 8, 60-65.

Evenson, D.P., Darzynkiewicz, Z., Melamed, M.R., 1980. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science.* 210, 1131-1133.

Ferramosca, A., Pinto Provenzano, S., Montagna, D.D., Coppola, L., Zara, V., 2013. Oxidative stress negatively affects human sperm mitochondrial respiration. *Urology.* 82, 78-83.

Fogli Da Silveira, W., Kavamoto, E.T., Rigolino, M.G., Tabata, Y.A., 1987. Evaluation of spermatozoa concentrations by spectrophotometric method of rainbow trout, *Salmo irideus* Gibbons, sêmen. Bol. Inst. Pesca. 14, 69-73.

Giacomin, M., Gillis, P.L., Bianchini, A., Wood, C.M., 2013. Interactive effects of copper and dissolved organic matter on sodium uptake, copper bioaccumulation, and oxidative stress in juvenile freshwater mussels (*Lampsilis siliquoidea*). Aquat. Toxicol. 152, 30-37.

Gillan, L., Evans, G., Maxwell, W.M., 2005. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. Theriogenology. 63, 445-457.

Gluszczak, L., Miron, D.S., Moraes, B.S., Simões, R.R., Schetinger, M.R.C., Morsch, V.M., Loro, V.L., 2007. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol. 146, 519-524.

Graham, J.K., Mocé, E., 2005. Fertility evaluation of frozen thawed semen. Theriogenology. 64, 492-504.

Grosell, M., Blanchard, J., Brix, K.V., Gerdes, R., 2007. Physiology is pivotal for interactions between salinity and acute copper toxicity to fish and invertebrates. Aquat. Toxicol. 84, 162-172.

Grosell, M., 2012. Copper. In: Farrell, A.P., Wood, C.M., Brauner, C.J. (Eds.), Homeostasis and Toxicology of Essential Metals, Fish Physiology, vol. 31A. Academic Press, San Diego, pp. 54.

Handy, R.D., 2003. Chronic effects of copper exposure versus endocrine toxicity: two sides of the same toxicological process? *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.* 135, 25-38.

Heath, A.G., 1995. Water Pollution and Fish Physiology. CRC Press, Florida.

Huang, C., Sun, C., Su, X., Zhao, X., Miao, M., Liu, Y., Dong, Qiaoxiang., 2009. Sperm cryopreservation in guppies and black mollies-A generalized freezing protocol for livebearers in Poeciliidae. *Cryobiology.* 59, 351-356.

Hued, A.C., Oberhofer, S., Bistoni, M.A., 2012. Exposure to a commercial glyphosate formulation (Roundup®) alters normal Gill and liver histology and affects male sexual activity of *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 62, 107-117.

Hued, A.C., Lo Nostro, F.L., Wunderlin, D.A., Bistoni, M.A., 2013. Reproductive Impairment of a Viviparous Fish Species Inhabiting a Freshwater System with Anthropogenic Impact. *Environ. Contam. Toxicol.* 64, 281-290.

Iakovidis, I., Delimaris, I., Piperakis, S.M., 2011. Copper and Its Complexes in Medicine: A Biochemical Approach. *Molec. Biol. Internat.* 2011, 1-13.

IRAM, 2007. Environmental quality. Water quality. Determination of the acute lethal toxicity of substances to freshwater fishes. Semi-static method. Norma IRAM 29112. Institute for Normalization and Certification of Argentina, Buenos Aires, Argentina.

James, R., Sampth, K., Edward., 2003. Copper Toxicity on Growth and Reproductive Potential in an Ornamental Fish, *Xiphophorus helleri*. *Asian. Fish. Sci.* 16, 317-326.

James, R., Sampath, K., Jothilakshmi, Vasudhevan, I., Thangaranthinam, R., 2008. Effects of copper toxicity on growth, reproduction and metal accumulation in chosen ornamental fishes. *Ecohydrol. Hydrobiol.* 8, 89-97.

Jiraungkoorskul, W., Upatham, E.S., Kruatrachue, M., Sahaphong, S., Vichasri-Grams, S., Pokethitiyook, P., 2002. Histopathological effects of Roundup, a glyphosate herbicide, on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Sci. Asia* 28, 121-127.

Jorge, M.B., Loro, V.L., Bianchini, A., Wood, C.M., Gillis, P.L., 2013. Mortality, bioaccumulation and physiological responses in juvenile freshwater mussels (*Lampsilis siliquoidea*) chronically exposed to copper. *Aquat. Toxicol.* 126, 137-147.

Kime, D.E., Ebrahimi, M., Nystenb, K., Roelantsb, I., Rurangwab, E., Moore, H.D.M., Ollevierb, C.F., 1996. Use of computer assisted sperm analysis (CASA) for monitoring the effects of pollution on sperm quality of fish; application to the effects of heavy metals. *Aquat. Toxicol.* 36, 223-237.

Langston, W.J., Bebianno, M.J., 1998. *Metal Metabolism in Aquatic Environments*. Chapman and Hall, London.

Lushchak, V.I., 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.* 100, 13-30.

Machado, A.A.S., Hoff, M.L.M., Klein, R.D., Cardozo, J.G., Giacomini, M.M., Pino, G.L.L., Bianchini, A., 2013. Biomarkers of waterborne copper exposure in the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to salt water. *Aquat. Toxicol.* 138-139, 60- 69.

Malabarba, L.R., Reis, E.R., Vari, R.P, Lucena, C.A.S.1998. Phylogeny and classifications of neotropical fishes. EDIPUCRS, Porto Alegre, 603 p.

Minghetti, M., Leaver, ML., Carpena, SG., George, SG., 2008. Copper transporter 1, metallothionein and glutathione reductase gene are differentially expressed in tissues of sea bream (*Sparus aurata*) after exposure to dietary or waterborn copper. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 147, 450-459.

Monserrat, J.M., Martínez, P.B., Geracitano, L.A., Amado, L.L., Martins, C.M.G., Pinho, G.L.L., Chaves, I.S., Ferreira-Cravo, M., Ventura-Lima, J., Bianchini, A., 2007. Pollution biomarkers in estuarine animals: critical review and new perspectives. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 146, 221-234.

Oakes, K.D., Van der Kraak, G.J., 2003. Utility of TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. *Aquat. Toxicol.* 63, 447-463.

Phillips, D.J.H., 1980. *Quantitative Aquatic Biological Indicators*. Applied Science Publishers, London.

Pinho, G.L.L., Bianchini, A., 2010. Acute copper toxicity in the euryhaline copepod *acartia tonsa*: implications for the development of an estuarine and marine biotic ligand model. *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 1834-1840.

Robles, V., Martinez-Pastor, F., 2013. Flow cytometric methods for sperm assessment. *Methods Mol. Biol.* 927, 75-86.

Sandrini, J.Z., Bianchini, A., Trindade, G.S., Nery, L.E., Marins, L.F., 2009. Reactive oxygen species generation and expression of DNA repair-related genes after copper exposure in zebrafish (*Danio rerio*) ZFL cells. *Aquat. Toxicol.* 95, 285-291.

Sohal, R.S., Allen, R.G., Nations, C., 1986. Oxygen free radicals play a role in cellular differentiation: a hypothesis. *J. Free Radicals Bio. Med.* 2, 175-181.

Sarosiek, B., Pietruszewicz, M., Radziwoniuk, J., Glogowski, J., 2009. The effect of copper, zinc, mercury and cadmium on some sperm enzyme activities in the common carp (*Cyprinus carpio l.*). *Reprod. Biol.* 9, 295-301.

Sun, C., Huang, C., Su, X., Zhao, X., Dong, Q., 2010. Optimization of handling and refrigerated storage of guppy *Poecilia reticulata* sperm. *J. Fish Biol.* 77, 54-66.

Tellis, M.S., Alsop, D., Wood, C.M., 2012. Effects of copper on the acute cortisol response and associated physiology in rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 155, 281-289.

Turnlund, J.R., 1999. Copper. In: Shils, M.E., Olson, J.A., Shike, M., Ross, A.C. (Eds.), *Modern Nutrition in Health and Disease*. Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore, MD.

Uauy, R., Olivares, M., Gonzales, M., 1998. Essentiality of copper in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 67, 952S-9S.

USEPA, 1994. Water quality standards handbook, second edition. (CAS Registry Number A-823-B94-005b). National Technical information Service, Springfield, Va.

Varela Junior, A.S., Corcini, C.D., Gheller, S.M.M., Jardim, R.D., Lucia Jr., T., Streit Jr., D.P., Figueiredo, M.R.C., 2012. Use of amides as cryoprotectants in extenders for frozen sperm of tambaqui, *Colossoma macropomum*. Theriogenology. 78, 244-251.

Vutukuru, S.S., Chintada, S., Madhavi, K.R., Rao, J.V., Anjaneyulu, Y., 2006. Acute effects of copper on superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation in the freshwater teleost fish *Esomus danricus*. Fish Physiol. Biochem. 32, 221-229.

Wathes, D.C., Abayasekara, D.R.E., Aitken, R.J., 2007. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. Biol. Reprod. 77, 190-201.

Who, 1998. International Programme on Chemical Safety (IPCS). Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. Environmental Health Criteria 155, World Health Organization, Geneva.

Wu, SM., Ho, YC, Shih, MJ., 2007. Effects of Ca^{2+} or Na^{+} on metallothionein expression in tilapia larvae (*Oreochromis mossambicus*) exposed to cadmium or copper. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 52, 229-234.

Zimmer, A.M., Barcarolli, I.F., Wood, C.M., Bianchini, A., 2012. Waterborne copper exposure inhibits ammonia excretion and branchial carbonic anhydrase activity in euryhaline guppie acclimated to both fresh water and sea water. *Aquat. Toxicol.* 122-123, 172-180.

Table 1. Wet body weight (mg), total body length (cm), and testis wet weight (mg) of guppies *Jenynsia multidentata* kept under control condition (CTR: no copper addition to the water) or exposed to different copper concentrations (dissolved: 2.2, 5.5 and 9.3 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cu) for 4 days (acute exposure) or 21 days (chronic exposure) in the first trial. Values are expressed as mean \pm SEM (n = 10). No significant difference in total body length, wet body weight and testis wet weight was observed among treatments for the same exposure period ($P > 0.05$).

Treatment	Exposure period (days)	Total body length (cm)	Wet body weight (mg)	Testis wet weight (mg)
CTR	4	2.30 \pm 0.07	271.25 \pm 31.25	4.50 \pm 1.22
2.2 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cu	4	2.43 \pm 0.12	303.75 \pm 59.61	3.62 \pm 0.65
5.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cu	4	2.32 \pm 0.06	286.67 \pm 23.27	4.67 \pm 1.14
9.3 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cu	4	2.47 \pm 0.07	309.00 \pm 34.56	4.30 \pm 0.70
CTR	21	2.42 \pm 0.08	356.67 \pm 26.79	9.44 \pm 1.30
2.2 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cu	21	2.28 \pm 0.09	308.10 \pm 32.09	7.20 \pm 1.36
5.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cu	21	2.37 \pm 0.10	334.67 \pm 40.17	9.11 \pm 1.55
9.3 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cu	21	2.22 \pm 0.07	291.56 \pm 2.64	4.73 \pm 1.05

Table 2. Plasma membrane integrity (%), mitochondrial membrane potential (%) and DNA integrity (%) in sperm of the guppy *Jenynsia multidentata* kept under control condition (CTR: no copper addition to the water) or exposed to different copper concentrations (dissolved: 2.2, 5.5 and 9.3 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cu) for 4 days (acute exposure) or 21 days (chronic exposure). Values are expressed as mean \pm SEM (n = 10). Different letters indicate significant difference among treatments for the same exposure period (P<0.05).

Treatment	Exposure period (days)	Membrane integrity (%)	Membrane potential (%)	DNA integrity (%)
CTR	4	97.2 \pm 1.1 (a)	99.5 \pm 0.3 (a)	99.8 \pm 0.21 (a)
2.2 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cu	4	89.6 \pm 1.6 (b)	99.2 \pm 0.6 (a)	99.6 \pm 0.29 (a)
5.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cu	4	98.1 \pm 0.6 (a)	97.3 \pm 1.4 (ab)	99.5 \pm 0.30 (a)
9.3 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cu	4	94.0 \pm 2.1 (ab)	92.7 \pm 1.6 (b)	98.4 \pm 0.83 (a)
CTR	21	81.8 \pm 4.1 (a)	57.4 \pm 4.7 (a)	99.9 \pm 0.11 (a)
2.2 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cu	21	89.0 \pm 1.8 (a)	57.5 \pm 2.7 (a)	99.4 \pm 0.19 (a)
5.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cu	21	81.3 \pm 4.8 (a)	66.5 \pm 6.1 (a)	99.7 \pm 0.20 (a)
9.3 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cu	21	90.5 \pm 1.9 (a)	67.1 \pm 4.8 (a)	98.4 \pm 0.81 (a)

Table 3. Wet body weight (mg) and total body length (cm) of guppies *Jenynsia multidentata* kept under control condition (CTR: no copper addition to the water) or exposed to different copper concentrations (dissolved: 2.2, 5.5 and 9.3 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cu) for 4 days (acute exposure) or 21 days (chronic exposure) in the second trial. Values are expressed as mean \pm SEM (n = 15). No significant difference in total body length and wet body weight was observed among treatments for the same exposure period ($P > 0.05$).

Treatment	Exposure period (days)	Total body length (cm)	Wet body weight (mg)
CTR	4	2.53 \pm 0.09	355.13 \pm 41.40
2.2 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cu	4	2.38 \pm 0.09	309.07 \pm 24.10
5.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cu	4	2.34 \pm 0.07	251.07 \pm 21.76
9.3 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cu	4	2.40 \pm 0.06	277.67 \pm 18.00
CTR	21	2.48 \pm 0.07	328.93 \pm 26.92
2.2 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cu	21	2.28 \pm 0.08	298.27 \pm 23.17
5.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cu	21	2.33 \pm 0.07	323.40 \pm 26.11
9.3 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cu	21	2.39 \pm 0.07	321.27 \pm 21.88

Figure Captions

Figure 1. Cu accumulation in gonads of male guppy *Jenynsia multidentata* kept under control condition (CTR: no copper addition in the water) or exposed to different waterborne copper concentrations (dissolved: 2.2, 5.5 and 9.3 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cu) for 4 days (acute exposure) or 21 days (chronic exposure) in freshwater. Values are expressed as mean \pm SEM (n = 10). Different lowercase letters represent significant different mean values among treatments for the same experimental period (p <0.05). Data were mathematically transformed (square root) to meet the ANOVA assumption (data normality and homogeneity of variances).

Figure 2. Total number of spermatozoa in the guppy *Jenynsia multidentata* kept under control condition (CTR: no copper addition in the water) or exposed to different waterborne copper concentrations (dissolved: 2.2, 5.5 and 9.3 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cu) for 4 days (acute exposure) or 21 days (chronic exposure) in freshwater. Values are expressed as mean \pm SEM (n = 10). Absolute values were divided by 1000 for a better viewing. Different lowercase letters represent significant difference among treatments within the same experimental period (p <0.05).

Figure 3. Sperm motility rate (%) in the guppy *Jenynsia multidentata* kept under control condition (CTR: no copper addition in the water) or exposed to different waterborne copper concentrations (dissolved: 2.2, 5.5 and 9.3 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cu) for 4 days (acute exposure) or 21 days (chronic exposure) in freshwater. Values are expressed as mean \pm SEM (n = 10). Different lowercase letters represent significant difference among treatments within the same experimental period (p <0.05).

Figure 4. Lipid peroxidation (LPO) in pools of gonads of male guppies *Jenynsia multidentata* kept under control condition (CTR: no copper addition in the water) or exposed to different waterborne copper concentrations (dissolved: 2.2, 5.5 and 9.3 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cu) for 4 days (acute exposure) or 21 days (chronic exposure) in freshwater. Values are expressed as mean \pm SEM (n = 5 pools per treatment; 3 fish per pool). Different lowercase letters represent significant different mean values among treatments for the same experimental period (p <0.05). Data were mathematically transformed (square root) to meet the ANOVA assumption (data normality and homogeneity of variances).

Figure 1

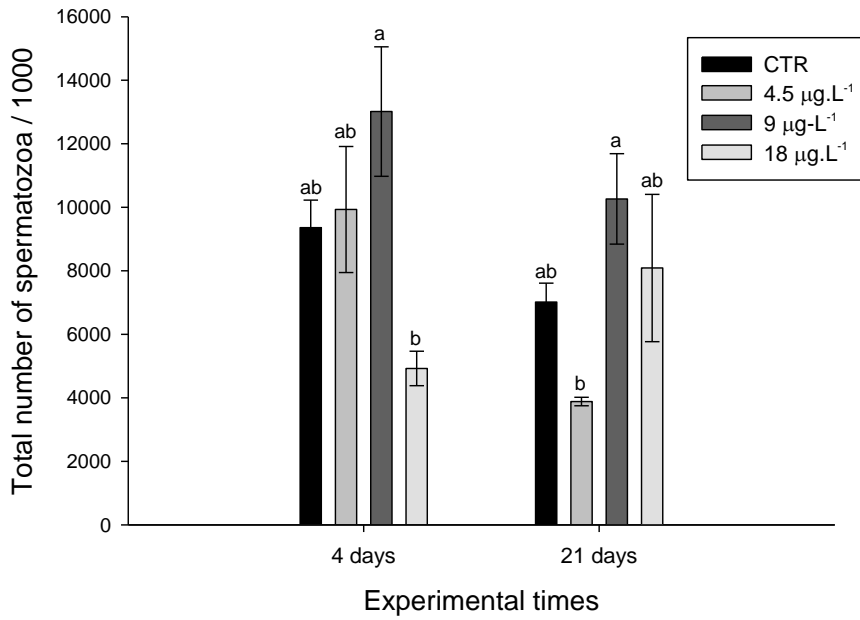


Figure 2

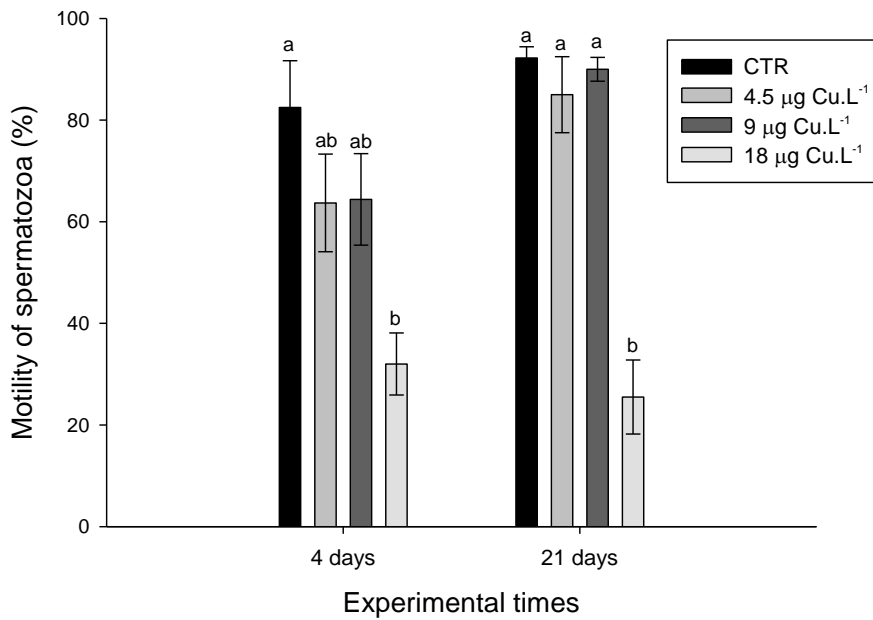
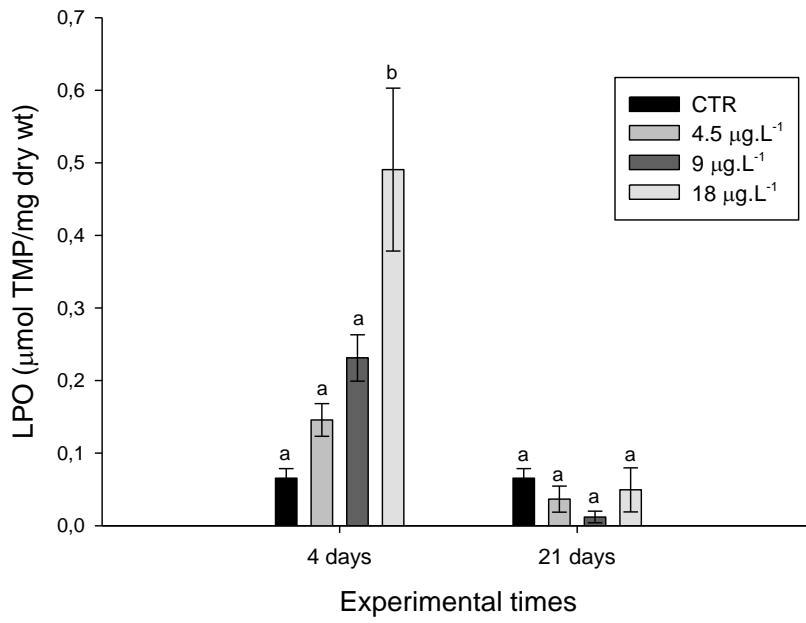


Figure 3



5 DISCUSSÃO GERAL

A osmolalidade plasmática serve como um guia da osmolalidade interna, e pode ser usada para fazer um diluente que mimetize as condições a que as células estão submetidas dentro dos organismos. Neste trabalho foi verificado que a osmolalidade plasmática da *J. multidentata* é de $326 \pm 3,9$ mOsm/Kg, muito próxima a encontrada em outros poecilídeos, nos quais a osmolalidade plasmática fica em torno de 310 mOsm/Kg (HUANG et al., 2004a; HUANG et al., 2009a; SUN et al., 2010; HUANG et al., 2009b).

Foi avaliada também a influencia da osmolalidade na ativação da motilidade dos espermatozoides, bem como os efeitos de diferentes osmolalidades nos mesmos parâmetros de qualidade espermática que iriam ser utilizados nas avaliações à exposição ao Cu. Em espécies de poecilídeos, tem sido utilizado como diluente a Solução Balanceada de Hanks (HBSS), portanto, utilizamos o mesmo diluente para *J. multidentata*. A partir dos dados obtidos, foi verificado que osmolalidades entre 240 e 320 mOsm/kg ativaram mais de 50% dos espermatozoides, porém, as taxas de motilidade mais constantes e duradouras foram em HBSS 300 e HBSS 320 (isosmoticidade), durando até 7 dias. Em osmolalidades a 380 mOsm/kg os espermatozoides permaneceram imóveis. Esse modo de ativação e de imobilização também são semelhantes ao encontrado em poecilídeos (HUANG et al., 2004 a,b; SUN et al., 2010). Portanto, em espécies de peixes com reprodução interna, a osmolalidade é um dos principais fatores que controlam a motilidade, independente da espécie. Como a osmolalidade interna dos organismos permanece praticamente constante, os espermatozoides de espécies com fecundação interna não são submetidos a grandes variações de pressão osmótica, diferente das espécies ovípara que liberam seus espermatozoides no ambiente aquático, extremamente variável quando a concentração de solutos. Portanto, diferenças espécies específicas em protocolos de manutenção de células espermática relatadas para maioria dos peixes teleósteos ovíparos parece não se aplicar as espécies de peixes vivíparas, e a fecundação interna é o fator determinante do modo de ativação e manutenção da motilidade.

Além de afetar a motilidade, pressões osmóticas inferiores a 260 mOsm/Kg provocam danos em membrana plasmática, mitocôndria e DNA, e osmolalidades superiores a 400 mOsm/Kg só não afetaram o potencial de membrana mitocondrial. Sendo assim, foi determinado que a osmolalidade mais adequada para a manutenção satisfatória de todos os parâmetros analisados por pelo menos 4 dias foi de 300 e 320 mOsm/Kg, uma vez que, ou obtiveram resultados mais constantes e duradouros, como na motilidade, ou não diferiram dos melhores resultados encontrados nos outros parâmetros avaliados.

Os danos mais evidentes da diferença de osmolalidade foram na membrana plasmática e motilidade e em hipo-osmolalidade. Os danos observados no semên fresco provavelmente foram devidos a aumentos de volume. Como as células tendem a ganhar água e aumentar seu volume quando expostas a um meio hiposmótico, é possível que os mecanismos homeostáticos de regulação osmótica e de volume celular não tenham conseguido impedir os danos provocados pelo choque hipo-osmótico à membrana plasmática, uma vez que a membrana é a estrutura que delimita a célula e por onde passam íons e água até que o equilíbrio se restabeleça. Porém, como as mitocôndrias e DNA estão em compartimentos mais internos, podem não ter sido comprometidos.

Por outro lado, em exposição prolongada, tanto os efeitos da hipo quanto da hiperosmolalidade podem ter sido provocados pelo aumento espécies reativas de oxigênio (EROs), causando estresse oxidativo (EO). Espermatozoides de mamíferos armazenados em meio não isosmótico resultou em aumento de EROs (MCCARTHY et al, 2009; BURNAUGH et al, 2010), indicando que o estresse osmótico pode provocar EO em espermatozoides de mamíferos. Como os espermatozoides de vivíparos são tidos como mais semelhantes a espermatozoides de mamíferos do que espécies ovíparas (STOSS, 1983; SUN et al., 2010), o EO pode estar provocando alterações em parâmetros de qualidade espermática em peixes devido ao choque osmótico.

Além do choque osmótico, o cobre (Cu) também é um potente desencadeador de EO nas células espermáticas de mamíferos. Segundo Aitken et al (2012), o aumento da produção de EROs e, conseqüentemente, a geração de EO, provoca danos nas células, como peroxidação de lipídeos, danos oxidativos ao DNA,

formação de aductos de proteínas, bem como danos mitocondriais, que iniciam uma cascata apoptótica reduzindo a motilidade e vitalidade das células espermáticas.

Mesmo com vários trabalhos comprovando que o EO provocado pelo excesso de EROs é um potente agente na fisiopatologia espermática em mamíferos (AITKEN e KRAUSZ, 2001; WATHES et al., 2007; EIDI et al., 2010; AITKEN et al., 2012), que o Cu induz aumentos EROs, alterações em mecanismos antioxidantes e danos oxidativos em vários órgãos de peixes (VIEIRA et al., 2009; EYCKMANS et al. 2011; MACHADO et al., 2013) e o Cu, em peixes, demonstrar afetar o desenvolvimento gonadal, capacidade fertilizante e acumular em ovos e larvas (JAMES et al., 2003,2008), trabalhos associando o EO provocado pelo Cu a danos em células espermáticas e espermatogênese, se existentes, são raros, e os mecanismos de toxicidade do Cu na reprodução de peixes permanecem não esclarecidos (GROSELL, 2012).

Os dados do presente estudo confirmam a hipótese de que o Cu, mesmo em concentrações encontradas naturalmente nos ecossistemas aquáticos, está causando alterações na espermatogênese e na qualidade espermática em *Jenynsia multidentata*, tanto em exposições agudas quanto crônicas. Também permite afirmar que em exposições agudas, um dos mecanismos de toxicidade do Cu pode ter sido o aumento de EROs causando EO, o qual foi evidenciado pelo marcador de dano oxidativo em membrana, a lipoperoxidação (LPO). O aumento da LPO na concentração de $18 \mu\text{g L}^{-1}$ está associado à redução da motilidade, potencial de membrana mitocondrial e redução no número de espermatozoides. Ainda que a integridade de membrana plasmática na concentração de $18 \mu\text{g L}^{-1}$ não tenha diferido significativamente do grupo controle, ela também não diferiu da concentração de $4,5 \mu\text{g L}^{-1}$, a qual provocou redução significativa da integridade de membrana na exposição aguda. Portanto, a membrana também pode ter sido afetada pela lipoperoxidação.

Apesar de produções de ROS endógenas ocorrerem naturalmente durante o processo de respiração celular em espermatozoides de peixes e mamíferos (GAZO et al., 2013), e níveis baixos de ROS serem essenciais para a funcionalidade espermática, como fertilização, hiperativação e motilidade (AGARWAL et al., 2009),

níveis elevados de ROS provocados pela exposição ao Cu está excedendo a capacidade antioxidante dos espermatozoides de *J. multidentata* em exposição aguda e provocando danos oxidativos, os quais estão afetando a qualidade espermática e interferindo na espermatogênese. Íons metálicos como o Cu são conhecidos por catalizar uma reação conhecida como reação de Fenton, a qual produz radical hidroxila (OH•) a partir do peróxido de hidrogênio (H₂O₂). O OH• reage rapidamente com biomoléculas desencadeando a peroxidação de lipídeos (LPO). A LPO afeta a fluidez das membranas plasmáticas dos espermatozoides, provocando redução da motilidade (JONES et al., 1979) e da capacidade fertilizante (AGARWAL et al., 2009).

Por outro lado, a redução da integridade de membrana plasmática em concentrações baixas, onde não se verificou aumento da LPO, pode ser devido a efeitos diretos do Cu sobre as células, reduzindo sua viabilidade. Porém, mesmo sem causar diminuição nos outros parâmetros avaliados como motilidade, integridade de DNA e potencial de membrana mitocondrial, o dano na membrana plasmática na concentração de 4.5 µg Cu.L⁻¹ pode vir a afetar o sucesso de fertilização. Em mamíferos, a perda da integridade das membranas espermáticas possivelmente está associada à subfertilidade e/ou infertilidade de machos (GILLIAN et al., 2005; AMBROGI et al., 2006).

Níveis elevados de ROS também provocam danos oxidativos em membranas mitocondriais, como observado neste trabalho na exposição aguda. As mitocôndrias são a principal fonte de ATP para os espermatozoides (GRAHAM e MOCÉ, 2005), produzido via fosforilação oxidativa. Para que esse processo aconteça, é necessário um gradiente eletroquímico ao longo da membrana mitocondrial interna (potencial transmembrana), portanto, a redução do potencial transmembrana compromete diretamente o metabolismo celular normal (GRAHAM e MOCÉ, 2005), podendo influenciar na motilidade (CABRITA et al., 2014). Em espermatozoides de humanos, a queda progressiva da motilidade tem sido relacionada a efeitos negativos na respiração mitocondrial por desacoplamento entre a cadeia transportadora de elétrons e a síntese de ATP, provocado pelo aumento de EO (FERRAMOSCA et al., 2013). Como a mitocôndria é a organela mais importante no processo de apoptose celular, danos na membrana mitocondrial pode desencadear o processo apoptótico, por liberação da citocromo c, ativando a cascata enzimática das caspases

(AGARWAL e PRABAKARAN, 2005), que uma vez ativada, por sistemas de retroalimentação positiva, garantem que a célula inevitavelmente vai sofrer apoptose.

Por outro lado, na exposição crônica, não foi verificado redução do potencial mitocondrial em nenhuma das concentrações, porém a motilidade foi reduzida. O ATP é produzido no espermatozóide através de duas vias metabólicas - glicólise e fosforilação oxidativa (FOX) – a primeira ocorrendo na cabeça e peça principal do flagelo e a última nas mitocôndrias presentes na peça intermediária (PLESSIS et al., 2015). Apesar da respiração mitocondrial ser considerada o processo metabólico mais eficiente para a produção de ATP, estudos demonstram que a difusão do ATP da mitocôndria até a parte distal do flagelo não é suficiente para manter o batimento flagelar e que, portanto, a glicólise parece ser essencial (HUNG et al., 2008; PLESSIS et al., 2015). Portanto, uma das possíveis explicações é que, apesar de o potencial mitocondrial não apresentar redução, a exposição crônica ao Cu pode estar afetando a via glicolítica de produção de energia, reduzindo a motilidade em *J. multidentata*. Porém, mais estudos sobre os efeitos do Cu na via glicolítica de fornecimento de energia para o batimento flagelar se fazem necessários para confirmação desta hipótese.

A concentração espermática em *J. multidentata* foi de $9,3 \cdot 10^6$ células por gônada, sendo este outro parâmetro afetado negativamente na exposição aguda e na maior concentração. Celino et al (2012) verificou que o EROs inibiu a espermatogênese no peixe de água doce *Anguilla japonica*, e que a redução da cobre zinco superóxido dismutase (SOD) deixou as espermatogônias mais suscetíveis aos ataques de EROs, conduzindo a morte celular. Sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos controlam os danos provocados pelo excesso de EROs (KEFER et al., 2009). Os antioxidantes enzimáticos responsáveis pela detoxificação de ROS no esperma de peixe são: catalase, SOD, glutatona redutase e peroxidase (LAHNSTEINER e MANSOUR, 2010; MANSOUR et al., 2006). As defesas antioxidantes não enzimáticas e metabólitos incluem a glutatona, tocoferol, ácido ascórbico, ácido úrico, selênio e zinco, entre outros (CABRITA et al., 2014). As enzimas fazem parte da defesa intracelular de espermatozoides contra

EROs, enquanto os espermatozoides são protegidos extracelularmente por componentes enzimáticos e não enzimáticos (VAN OVERVELD et al., 2000). Porém, a SOD é a primeira enzima envolvida na retirada de oxirradicais em testículos (BAUCHE et al., 1994). A redução da atividade da SOD tem sido reportada em peixes de água doce expostos ao Cu (VUTUKURU et al., 2006). Neste contexto, o aumento de EO nas gônadas de machos de *J. multidentata* verificado na exposição aguda a $18 \mu\text{g L}^{-1}$, pode ter reduzido a produção de enzimas antioxidantes chaves na detoxificação de oxirradicais nos testículos, deixando-os mais vulneráveis aos efeitos de EROs, o que provocou danos à proliferação das espermatogônias e, conseqüentemente, redução no número de espermatozoides.

Por outro lado, em exposição crônica, os sistemas homeostáticos de defesa antioxidante conseguiram combater o excesso de Cu, e danos oxidativos não foram verificados. Na verdade, só vai ocorrer danos em proteínas, lipídeos e DNA se a capacidade dos sistemas de defesa forem ultrapassados (GROSELL, 2012). Além de enzimas antioxidantes, o Cu estimula a expressão do gene e o aumento de níveis da proteína metalotioneína em órgãos alvo (WU et al., 2007; MINGHETTI et al., 2008), conhecida como sequestradora de metais.

Mesmo sem provocar aumento da LPO, a exposição crônica ao Cu provocou a redução da motilidade na concentração de $18 \mu\text{g L}^{-1}$ e da concentração espermática na concentração $4,5 \mu\text{g L}^{-1}$. Sabe-se que os mecanismos de toxicidade do Cu não se limitam ao E, podendo também provocar alterações endócrinas (HANDY, 2003). Portanto o Cu pode estar atuando ao nível do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas ou diretamente nas células germinativas, provocando a redução da concentração espermática verificada neste estudo. Em ratos, foi observado que o Cu provocou a inibição da atividade enzimática da 17 β -hydroxysteroid desidrogenase, degeneração da proliferação das células espermatogênicas e redução dos níveis plasmáticos de testosterona, FSH e LH, demonstrando seus efeitos negativos no eixo hipotálamo-hipófise-testículo afetando diretamente a espermatogênese e esteroidogênese (CHATTOPADHYAY et al., 2005; CHATTOPADHYAY e BISWAS, 2013).

Outro dado que chama a atenção é o fato de a concentração intermediária de $9 \mu\text{g L}^{-1}$ não provocar nenhuma alteração negativa nos parâmetros avaliados, e pelo contrário, a concentração espermática aumentou, embora não

significativamente, quando comparada ao grupo controle. Isso demonstra um efeito não linear ou dose dependente do cobre na reprodução, mas uma curva em forma de U.

Também não foram verificadas alterações no tamanho, peso corporal ou peso gonadal entre os tratamentos em ambos os tempos experimentais. Porém, as gônadas na exposição crônica estavam maiores que na exposição aguda em todas as concentrações, exceto na de $18 \mu\text{g L}^{-1}$. Portanto, apesar de não haver uma redução das gônadas entre os tratamentos dentro do mesmo tempo experimental, pode-se dizer que, na maior concentração, houve uma redução do crescimento natural das gônadas com o passar do tempo. Segundo James et al. (2003, 2008) a exposição de um poecilídeo a doses crescentes e sub-letais de Cu ($40, 80$ e $120 \mu\text{g L}^{-1}$) por pelo menos 100 dias, provocou redução no crescimento e no desenvolvimento gonadal concentração/tempo dependente. Possivelmente, as doses utilizadas e/ou o tempo de exposição no presente estudo podem ter sido insuficientes para provocar alterações metabólicas mensuráveis através dos dados morfométricos

Podemos observar que os mecanismos de toxicidade do Cu na reprodução em machos de *J. multidentata* variam com o tempo de exposição, bem como os parâmetros afetados variam de acordo com o tempo e a concentração de Cu, demonstrando a heterogeneidade dos efeitos do Cu no sistema reprodutivo masculino e a necessidade do uso de mais de um biomarcador de exposição ao Cu na reprodução, como os utilizados neste trabalho.

Portanto, podemos concluir que a osmolalidade plasmática da espécie *J. multidentata* é de $326 \pm 3,9$ mOsm/Kg. A motilidade é ativada em uma ampla faixa de osmolalidades, mas mantida por mais tempo e mais constante em torno da isosmoticidade (300 e 320 mOsm/kg), podendo durar pelo menos 7 dias. Essas osmolalidades também mantiveram a integridade e funcionalidade das células espermáticas avaliadas pela integridade de membrana, potencial de membrana mitocondrial e integridade de DNA, sendo as mais adequadas para a manutenção das células *ex situ*. Osmolalidade superiores a 380 mOsm/kg impedem a ativação da motilidade no sêmen fresco. Tanto a hipo quando hiperosmolalidades afetam

negativamente os parâmetros avaliados, sendo que a hipo-osmolalidade foi mais prejudicial. Na exposição prolongada, o EO pode ser a causa dos efeitos verificados. O Cu também afeta parâmetros de qualidade espermática (com exceção do DNA), e espermatogênese, em *J. multidentada* aclimatada em água doce, sendo que na exposição crônica, somente a motilidade e a concentração espermática foram reduzidas. Na exposição aguda em concentrações elevadas, o mecanismo de toxicidade do Cu parece ser o estresse oxidativo. Portanto, tanto a exposição ao Cu como o choque osmótico danificam estruturas essenciais para a funcionalidade espermática, e o EO parece estar parcialmente envolvido em ambos.

6 REFERENCIAS

AGARWAL, A.; PRABAKARAN, S. A. **Mecanismos, measurement, and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology**, Indian Journal of Experimental Biology, 43:963-974, 2005.

AGARWAL, A. et al. **Role of Oxidative Stress in Pathogenesis of Varicocele and Infertility**, Urology, 73:461-469, 2009.

AHMAD, M. K. et al. **Heavy metals in water, sediment and some fishes of Buriganga River, Bangladesh**. International Journal of Environmental Research, 4:321-332, 2010.

AITKEN, R. J. et al. **Differential contribution of leucocytes and spermatozoa to the high levels of reactive oxygen species recorded in the ejaculates of oligozoospermic patients**, Journal of Reproduction and Fertility, 94:451-462, 1992.

AITKEN, R. J., KRAUSZ, C. **Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome**. Reproduction, 122:497-506, 2001.

AITKEN, R. J., JONES, K. T., ROBERTSON, S. A. **Reactive oxygen species and sperm function in sickness and in health**, Journal of Andrology, 33:1096-1106, 2012.

AKOTO, O.; BRUCE, T. N.; DARKO, G. **Heavy metals pollution profiles in streams serving the Owabi reservoir**, African Journal Environmental Science and Technology, 2:354-359, 2008.

AKTAR, M. W. et al. **Assessment and occurrence of various heavy metals in surface water of Ganga river around Kolkata: a study for toxicity and ecological impact**, Environmental Monitoring and Assessment, 160:207-213, 2010.

ALAVI, S. M. H.; COSSON, J. **Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: a review**. Cell Biology International, 30:1-14, 2006.

ALAVI, S. M. H. et al. **Effects of osmolality on sperm morphology, motility and flagellar wave parameters in Northern pike (Esox lucius L.)**, Theriogenology, 72:32–43, 2009.

Alberta Environmental Protection. **Protocol to Develop Alberta Water Quality Guidelines for Protection of Freshwater Aquatic Life – Copper**. Standards and Guidelines Branch Alberta Environmental Protection, 1996,122 p.

American Public Health Association, American Water Work Association, Water Environment Association, Clesceri LS, Greenberg, AH, Eaton AD (eds). 1998. **Standard methods for the examination of water and wastewater**, 20th edn. APHA, Washington, DC.

AMBROGI, M. et al. **Viability and DNA fragmentation in differently sorted boar spermatozoa**. Theriogenology, 66:1994-2000, 2006.

AMMAN, R. P.; PICKETT, B. W. **Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa**. Equine Veterinary Science, 7:143-173, 1987.

AMMANN, A. A.; MICHALKE, B.; SCHRAMEL, P. **Speciation of heavy metals in environmental water by ion chromatography coupled to ICP-MS**. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 372:448-452, 2002.

ATHAR, M.; VOHORA, S. B. **Heavy metals and environment**. Man and Environment Series. New Age International, New Delhi, 2001. 224 p.

BALDWIN, D. H. et al. **“Sublethal Effects of Copper on Coho Salmon: Impacts on Nonoverlapping Receptor Pathways in the Peripheral Olfactory Nervous System,”** Environmental Toxicology and Chemistry, 22:2266-2274, 2003.

BALLESTEROS, M. L. et al. **Endosulfan acute toxicity and histomorphological alterations in *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes)**, Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants And Agricultural, 42:351-357, 2007.

BALLESTEROS, M. L. et al. **Uptake, tissue distribution and metabolism of the insecticide endosulfan in *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes)**, Environmental Pollution, 159:1709-1714, 2011.

BENNETTS, L. E.; AITKEN, R. J. A. **Comparative study of oxidative DNA damage in mammalian spermatozoa**, Molecular Reproduction and Development, 71:77–87, 2005.

BILLARD, R. **Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species**. Reprod Nutr Dev, 2:877-920, 1986.

BILLARD, R., COSSON, M. P. **The energetics of fish sperm motility**. In: Gagnon C, editor. **Controls of sperm motility, biological and clinical aspects**. Boca Raton, Florida: CRC Press; 1990, 153 p.

BILLARD, R., COSSON, J., CRIM, L. W., SUQUET, M. **Sperm physiology and quality**. In: Broodstock Management and Egg and Larval Quality. Bromage NR and Roberts RJ.Eds. Blackwell Sciences Ltd. Cambridge Massachusetts, 1995, 25-52 p.

BLANCHARD, J.; GROSSEL, M. **Effects of salinity on copper accumulation in the common killifish (*Fundulus heteroclitus*)**. Environmental and Toxicology Chemistry, 24:1403-1413, 2005.

BLANCHARD, J.; GROSELL, M. **Copper toxicity across salinities from freshwater to seawater in the euryhaline fish, *Fundulus heteroclitus*: Is copper an ionoregulatory toxicant in high salinities?** Aquatic Toxicology. 80:131-139, 2006.

BOE-HANSEN, G. B. et al. **Sperm chromatin structure integrity in liquid stored boar semen and its relationships with field fertility**. Theriogenology, 69:728-736, 2008.

BREWER, G. J. **“The risks of copper toxicity contributing to cognitive decline in the aging population and to Alzheimer’s disease,”** Journal of the American College of Nutrition, 28:238–242, 2009.

BRIX, K. V.; DEFOREST, D. K.; ADAMS, W. J. **Assessing acute and chronic copper risk to freshwater aquatic life using species sensitivity distributions for different taxonomic groups.** Environmental Toxicology and Chemistry, New York, 20:1846-1856, 2001.

BUHL, K. J., HAMILTON S. J. **Comparative toxicology of inorganic contaminants released by placer mining to early life stages of salmonids** Ecotoxicology and Environmental Safety, 20:325-342, 1990.

BURNAUGH, L. et al. **Osmotic stress stimulates generation of superoxide anion by spermatozoa in horses.** Animal Reproduction Science, 117:249–260, 2010.

BUTTKE, T. M.; SANDSTROM, P. A. **Oxidative stress as a mediator of apoptosis,** Immunology Today, 15:7-10, 1994.

CABRITA, E., et al. **Factors enhancing fish sperm quality and emerging tools for spermanalysis.** Aquaculture, 432:389-401, 2014.

CÂMARA, D. R., GUERRA, M. M. P. **Mitocôndria espermática: além da síntese de adenosina trifosfato (ATP).** Revista Brasileira de Reprodução Animal, Belo Horizonte; 32:93-99, 2008.

CAZENAVE, J. et al. **Uptake, tissue distribution and accumulation of microcystin-RR in *Corydoras paleatus*, *Jenynsia multidentata* and *Odontesthes bonariensis*: a Field and laboratory study.** Aquatic Toxicology. 75, 178-190, 2005.

CELINO, F.T. et al. **Proliferating Spermatogonia Are Susceptible to Ractive Oxygen Species Attack in Japanese Eel (*Anguilla japonica*).** Biology of Reproduction, 87:70, 1–9, 2012.

CHAPMAN, P. M. et al. **Evaluation of bioaccumulation factors in regulating metals.** Environmental Science and Technology, 30A:448-452, 1996.

CHATTOPADHYAY, A.; SARKAR, M.; BISWAS, N. M. **Dose-dependent effect of copper chloride on male reproductive function in immature rats.** Kathmandu University Medical Journal, 12:392-400, 2005.

CHATTOPADHYAY, A.; BISWAS, N. M. **Testosterone Supplemented Protection On Inhibition Of Testicular Function Induced By Copper Chloride.** International Journal of Biomedical and Life Sciences, 4:212-223, 2013.

CHEN, Q.L. et al. **Protective effects of calcium on copper toxicity in *Pelteobagrus fulvidraco*: Copper accumulation, enzymatic activities, histology.** Ecotoxicology and Environmental Safety; 76:126–134, 2012.

CHEN, Q.L. et al. **Effects of Waterborne Chronic Copper Exposure on Hepatic Lipid Metabolism and Metal-Element Composition in *Synechogobius hasta*,** Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 64:301–315, 2013.

CHENG, F.P. et al. **Use of peanut agglutinin to assess the acrosomal status and the zona pellucida- induced acrosome reaction in stallion spermatozoa.** Journal of Andrology, 17:674–682, 1996.

CIERESZKO, A.; GLOGOWSKI, J.; DABROWSKI, K. **Biochemical characteristics of seminal plasma and spermatozoa of fresh water fishes.** In: Tiersch TR, Mazik PM, editors. Cryopreservation in aquatic species. Louisiana: WAS, Baton Rouge; 2000, 20-48 p.

CONAMA. Resolução nº. 357 de 11 de março de 2005. **Dispõe sobre diretrizes de enquadramento dos corpos d'água e dá outras providências.** <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459> (acessado em Dezembro de 2012).

COPELAND, W.C. **Mitochondrial DNA: methods and protocols.** In: Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press, 2002. 420 p.

COSSON, J. et al. **Regulation of axonemal wave parameters of fish spermatozoa by ionic factors.** In The Male Gamete: from Basic Knowledge to Clinical Applications, Ed. C Gagnon. Montreal, Canada: Cache River Press. 1999, p.161-186.

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

COSSON, J. J. **Methods to Analyse the Movements of Fish Spermatozoa and their Flagella** in: Fish spermatology, S. M. H. Alavi, J. J. Cosson, K. Coward, G. Rafiee Eds. Alpha Science international Ltd, Oxford; 2008, p.65-101.

COSTA, M. C. R. et al. **Diagnóstico ambiental de área industrial contaminada por metais pesados.** Revista Biociências, UNITAU, 14:51-61, 2008.

COULAUD, R. et al. **In situ feeding assay with *Gammarus fossarum* (Crustacea): modelling the influence of confounding factors to improve water quality biomonitoring.** Water Research, 4:6417-6429, 2011.

CRAIG, P. M.; WOOD, C. M.; McCLELLAND, G. B. **Oxidative response and gene expression with acute Copper exposure in zebrafish (*Danio rerio*),** American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 293:882-892, 2007.

DAVIS, R.J. **Signal transduction by the JNK group of MAP kinases.** Cell, 103:239–252, 2000.

DE LAMIRANDE, E.; LECLERC, P.; GAGNON, C. **Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization.** Molecular Human Reproduction, 3:175-94, 1997.

DIAS, M. F. S. **Minamata - Case Study.** Ambicare Industrial tratamento de Resíduos, S.A, 2004.

DUARTE, R. M. et al. **Copper sensitivity of wild ornamental fish of the Amazon,** Ecotoxicology and Environmental Safety, 72:693–698, 2009.

DURU, N. K.; MORSHEDI, M.; OEHNINGER, S. **Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa.** Fertility and Sterility, 74:1200-1207, 2000.

DWYER, F. J. et al. **Assessing contaminant sensitivity of endangered and threatened aquatic species: part I. Acute toxicity of five chemicals.** Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 48:143-154, 2005.

EBRAHIMI, M.; TAHERIANFARD, M. **The effects of heavy metals exposure on reproductive systems of cyprinid fish from Kor River,** Iranian Journal of Fisheries Sciences 10:13-20, 2011.

EBRAHIMPOUR, M.; ALIPOUR, H.; RAKHSHAH, S. **Influence of water hardness on acute toxicity of copper and zinc on fish.** Toxicology and Industrial Health. 26, 361-365, 2010.

EIDI, M. et al. **Seminal plasma levels of copper and its relationship with seminal parameters,** Iranian Journal of Reproductive Medicine, 8:60-65, 2010.

EYCKMANS, M. et al. **Exposure to waterborne copper reveals differences in oxidative stress response in three freshwater fish species.** Aquatic Toxicology 103:112–120, 2011.

FABBROCINI, A. et al. **Cryopreserved semen in ecotoxicological bioassays:sensitivity and reliability of cryopreserved Sparus aurata spermatozoa.** Ecotoxicological Environmental Safety, 84:293-298, 2001.

FEI, B. L., et al. **Two novel copper complexes of 2,20-bipyridine: Evaluation of the DNA binding and cytotoxic activity.** Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 125:32–41, 2013.

FELIZARDO, V. O. et al. **Effect of cryopreservant combinations on the motility and morphology of curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm.** Animal Reproduction Science, 122:259-263, 2010.

FEPAM. **Enquadramento de recursos hídricos na parte sul do Estuário da Laguna dos Patos.** Portaria SSMA No 7 de 24/05/95. NT 003/95, 1995.

FERRAMOSCA, A. et al. **Oxidative stress negatively affects human sperm mitochondrial respiration.** Urology. 82:78-83, 2013.

FERNANDES, M. N.; MAZON, A. F. **Environmental pollution and fish gill morphology.** In: Val, A.L. e Kapoor, B.G., (eds) Fish adaptation. Science Publishers, Enfield, 2003, 203–231 p.

FIGUEIREDO, M. A. et al. **GH overexpression decreases spermatid parameters and reproductive success in two-years-old transgenic zebrafish,** Animal Reproduction Science, 139:162-167, 2013.

FOGLI DA SILVEIRA, W. et al. **Evaluation of spermatozoa concentrations by spectrophotometric method of rainbow trout, *Salmo irideus* Gibbons, semen.** Boletim do Instituto de Pesca. 14, 69-73, 1987.

FONSECA, E. M. D. A. et al. **Bioavailability of Heavy Metals in Guanabara Bay, Rio de Janeiro (Brazil)**. Journal of Coastal Research, SI56 (Proceedings of the 10th International Coastal Symposium), Lisboa, Portugal, 2009.

FRASER, L.; STRZEZEK, J. **Is there a relationship between the chromatin status and DNA fragmentation of boar spermatozoa following freezing–thawing?** Theriogenology, 68:248–257, 2007.

GAETKE, L. M.; CHOW, C. K. **“Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients,”** Toxicology, 189:147–163, 2003.

GARDINER, D. M. **Utilization of extracellular glucose by spermatozoa of two viviparous fishes,** Comp. Biochem. Physiol, 59A:165-168, 1978.

GAZO, I. et al. **Influence of environmentally relevant concentrations of vinclozolin on sperm quality, DNA integrity, and antioxidant responses in sterlet *Acipenser ruthenus* spermatozoa.** Chemico-Biological Interactions, 203, 377–385, 2013.

GHOSH, M.; SINGH, S. P. **Review on phytoremediation of heavy metals and utilization of its byproducts,** Applied Ecology Research, 3:1-18, 2005.

GILLAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. **Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential.** Theriogenology. 63, 445-457, 2005.

GLUSCZAK, L. et al. **Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*).** Comparative Biochemistry and Physiology Part C, Toxicology and Pharmacology, 146:519-524, 2007.

GRAHAM, J. K.; MOCÉ, E. **Fertility evaluation of frozen/thawed semen.** Theriogenology. 64:492-504, 2005.

GROSELL, M.; WOOD, C. M.; WALSH, P. J. **Copper homeostasis and toxicity in the elasmobranch *Raja erinacea* and the teleost *Myoxocephalus octodecemspinosus* during exposure to elevated water-borne copper.** Comparative Biochemistry and Physiology Part C, Toxicology and Pharmacology, 135:179-190, 2003.

GROSELL, M. et al. **Effects of prolonged copper exposure in the marine gulf toadfish (*Opsanus beta*). I. Hydromineral balance and plasma nitrogenous waste products.** Aquatic Toxicology, 68:249-262, 2004.

GROSELL, M. et al. **Physiology is pivotal for interactions between salinity and acute copper toxicity to fish and invertebrates,** Aquatic Toxicology, 84:162-172, 2007.

GROSELL, M. **Copper.** In: Farrell, A.P., Wood, C.M., Brauner, C.J. (Eds.), Homeostasis and Toxicology of Essential Metals, Fish Physiology, vol. 31A. Academic Press, San Diego, 2012, 54–11 p.

HANDY, R. D. **Chronic effects of copper exposure versus endocrine toxicity: two sides of the same toxicological process?** Comparative Biochemistry and Physiology A: Comparative Physiology. 135:25-38, 2003.

HARAYACHIKI, C. A. Y. et al. **Toxic effects of the herbicide Roundup in the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to fresh water.** Aquatic Toxicology, 142-143:176-184, 2013.

HARRISON, R. A. P.; VICKERS, S. E. **Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa.** Journal of Reproductive and Fertility, 88:343-352, 1990.

HATJE, V, BIDONE, E. D, MADDOCK, J. L. **Estimation of the natural and anthropogenic components of heavy metal fluxes in fresh water Sinos river, Rio Grande do Sul state, South Brazil.** Environmental and Technol, 19:483-487, 1998.

HOLT, W. V. **Basic aspects of frozen storage of semen.** Animal Reproduction Science, 62:3-22, 2000.

HUANG, C. et al. **Initial studies on sperm cryopreservation of a live-bearing fish, the green swordtail *Xiphophorus helleri*.** Theriogenology, 62:179-194, 2004a.

HUANG, C. et al. **Sperm cryopreservation of green swordtail *Xiphophorus helleri*, a fish with internal fertilization,** Cryobiology, 48:295-308, 2004b.

HUANG, C., et al. **Sperm cryopreservation in guppies and black mollies—A generalized freezing protocol for livebearers in Poeciliidae.** Cryobiology. 59, 351-356, 2009.

HUED, A. C.; OBERHOFER, S.; BISTONI, M. A. **Exposure to a commercial glyphosate formulation (Roundup®) alters normal Gill and liver histology and affects male sexual activity of *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes).** Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 62:107-117, 2012.

HUED, A. C. et al. **Reproductive Impairment of a Viviparous Fish Species Inhabiting a Freshwater System with Anthropogenic Impact.** Archive of Environmental Contamination and Toxicology. 64:281–290, 2013.

HUNG, P.H. et al. **Sperm mitochondrial integrity is not required for hyperactivated motility, zona binding, or acrosome reaction in the rhesus macaque.** Biology Reproduction, 79: 367–75, 2008.

IAKOVIDIS, I.; DELIMARIS, I.; PIPERAKIS, S. M. **Copper and Its Complexes in Medicine: A Biochemical Approach.** Molecular Biology International. Volume 2011, Article ID 594529, 13 p.

IRAM, 2007. **Environmental quality. Water quality. Determination of the acute lethal toxicity of substances to freshwater fishes. Semi-static method.** Norma IRAM 29112. Institute for Normalization and Certification of Argentina, Buenos Aires, Argentina.

JAMES, R., SAMPTH, K., EDWARD. **Copper Toxicity on Growth and Reproductive Potential in an Ornamental Fish, *Xiphophorus helleri*.** Asian Fisheries Science. 16:317-326, 2003.

JAMES, R. et al. **Effects of copper toxicity on growth, reproduction and metal accumulation in chosen ornamental fishes.** Ecohydrology Hydrobiology, 8:89-97, 2008.

JAMIESON, B. G. M. **Fish Evolution and Systematics: Evidence from Spermatozoa,** Cambridge University Press, Cambridge, 1991, 334 p.

JENKINS, J. A.; DRAUGELIS-DALE, R. **Bioindicators from mosquitofish (*Gambusia affinis*) sampled from the Imperial Valley in southern California: U.S. Geological Survey Open-File Report 2006-1307, 48 p.**

JESUS, H. C. et al. **Distribuição de metais pesados em sedimentos do sistema estuarino da Ilha de Vitória – ES.** Química Nova, 27:378-386, 2004.

JIRAUNGKOORSKUL, W. et al. **Histopathological effects of Roundup, a glyphosate herbicide, on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)**. *Science Asia*, 28:121-127, 2002.

JORDÃO, C. P. et al. **Distribution of heavy metals in environmental samples near mining áreas in Brazil**. *Environmental Technology*, 20:489-498, 1999.

KAR, D. et al. **Assessment of heavy metal pollution in surface water**. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 5:119-124, 2008.

KARBASSI, A. R. et al. **Metal pollution assessment of sediment and water in the Shur River**. *Environmental Monitoring and Assessment*, 147:107-116, 2008.

KIME, D. E.; NASH, J. P. **Gamete viability as an indicator of reproductive endocrine disruption in fish**. *Science Total Environmental*, 233:123–129, 1999.

KIME, D. E. et al. **Use of computer assisted sperm analysis (CASA) for monitoring the effects of pollution on sperm quality of fish; application to the effects of heavy metals**. *Aquatic Toxicology*. 36, 223-237, 1996.

KONG, X., et al., **Effects of copper exposure on the hatching status and antioxidant defense at different developmental stages of embryos and larvae of goldfish *Carassius auratus***, *Chemosphere* 92:1458–1464, 2013.

LAHNSTEINER, F.; MANOSOUR, N.; BERGER, B. **The effect of inorganic and organic pollutants on sperm motility of some freshwater teleosts**. *Journal of Fish Biology*, 65:1283-1297, 2004.

LAHNSTEINER, F.; MANSOUR, N. **A comparative study on antioxidant systems in semen of species of the Percidae, Salmonidae, Cyprinidae, and Lotidae for improving semen storage techniques**. *Aquaculture*, 307:130-140, 2010.

LALL, S. P. **The Minerals**. In: HALVER, John E.; HARDY, Ronald W. *Fish Nutrition* Third Edition Washington: Academic Press, 2002. 260-300 p.

LIU, X., et al. **Effect of waterborne copper exposure on growth, hepatic enzymatic activities and histology in *Synechogobius hasta***. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 73:1286–1291, 2010.

LOPES, F. M. et al. **Effect of glyphosate on the sperm quality of zebrafish *Danio rerio***. *Aquatic Toxicology*, 155:322-326, 2014.

LUSHCHAK, V. I. **Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals.** Aquatic Toxicology, 100:13-30, 2011.

LUZIO, A. et al. **Copper induced upregulation of apoptosis related genes in zebrafish (*Danio rerio*) gill.** Aquatic Toxicology, 128-129: 183-189, 2013.

MACHADO, A. A. S. et al. **Biomarkers of waterborne copper exposure in the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to salt water.** Aquatic Toxicology, 138-139, 60– 69, 2013.

MACOVA, M., et al. **Monitoring the biological activity of micropollutants during advanced waste water treatment with ozonation and activated carbon filtration.** Water Research, 44:477-492, 2010.

MALABARBA, L. R. et al. **Phylogeny and classifications of neotropical fishes.** EDIPUCRS, Porto Alegre, 1998, 603 p.

MALLAT, J. **Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: A statistical review.** Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science, 42:630–648, 1985.

MANSOUR, N.; MCNIVEN, M. A.; RICHARDSON, G. F. **The effect of dietary supplementation with blueberry, [alpha]-tocopherol or astaxanthin on oxidative stability of Arctic char (*Salvelinus alpinus*) semen.** Theriogenology, 66:373-382, 2006.

MARIA, A. N. et al. **Influência da adição de iodeto de potássio e citrato de sódio na qualidade do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus* – Holmberg, 1887).** Ciencia e Agrotecnologia, 28:191-194, 2004.

MARZEC-WRÓBLEWSKA, U.; KAMIŃSKI, P.; ŁAKOTA, P. **Influence of Chemical Elements on Mammalian Spermatozoa (sperm / spermatozoa / semen / chemical element / trace elements / heavy metals / motility / capacitation / acrosome reaction / oxidative stress / male infertility).** Folia Biologica, 58:7-15, 2012.

MAZZON, R.; IGLESIAS-RIOS, R. **Distribution Pattern of Two Fish Species in A Coastal Stream in Southeast Brazil.** Brazilian Journal of Biology, 62:171-178, 2002.

MCCARTHY, M.J. et al. **Osmotic stress induces oxidative cell damage to Rhesus macaque spermatozoa.** Biology Reproduction, 82:644–651, 2010.

MCINTYRE, J. K. et al. **“Chemosensory Deprivation in Juvenile Coho Salmon Exposed to Dissolved Copper under Varying Water Chemistry Conditions.”** Environmental Science and Technology 42:1352-1358, 2008.

MINGHETTI, M. et al. **Copper transporter 1, metallothionein and glutathione reductase gene are differentially expressed in tissues of sea bream (*Sparus aurata*) after exposure to dietary or waterborn copper.** Comparative Biochemistry and Physiology C - Pharmacology Toxicology & Endocrinology. 147:450-459, 2008.

MONTEIRO, S. M. et al. **Copper toxicity in gills of the teleost fish, *Oreochromis niloticus*: effects in apoptosis induction and cell proliferation.** Aquatic Toxicology, 94:219–228, 2009.

MORISAWA, M.; SUZUKI, K. **Osmolality and potassium ions: their roles in initiation of sperm motility in teleosts.** Science, 210:114-115, 1980.

MORTATTI, J.; PROBST, J. **Characteristics of heavy metals and their evaluation in suspended sediments from Piracicaba river basin (São Paulo, Brazil).** Revista Brasileira de Geociências, 40:375-379, 2010.

MOYES, C. D.; SHULTE, P. M. **Princípios de Fisiologia Animal.** 2ª Ed, Proto Alegre: Artmed, 2010, 792 p.

NOURI, J. et al. **Regional pattern distribution of groundwater fluoride in the Shush aquifer of Khuzestan County Iran Fluoride.** Fluoride., 39:321-325, 2006.

NOURI, J. et al. **Regional distribution pattern of groundwater heavy metals resulting from agricultural activities.** Environmental. Geology, 55:1337-1343, 2008.

NRIAGU, J.O. **Global inventory of natural and anthropogenic emissions of trace metals to the atmosphere.** Nature 279:409-411, 1979.

OAKES, K. D.; VAN DER KRAAK, G. J. **Utility of TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent.** *Aquatic Toxicology*, 63:447–463, 2003.

PELGROM, S. M. G. J., et al. **Interactions between copper and cadmium during single and combined exposure in juvenile tilapia *Oreochromis mossambicus*: influence of feeding condition on whole body metal accumulation and the effect of the metals on tissue water and ion content.** *Aquatic Toxicology*. 30:117-135, 1994.

PESCH, S.; BERGMANN, M. **Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation.** *Micron*, 37:597–612, 2006.

PETRUKINA., A. M.; HARRISON, R. A. P. **Fluorescence Technologies for Evaluating Male Gamete (Dys)Function.** *Reproduction in Domestic Animals* 48:11:24, 2013.

PETRUNKINA, A. M., SIMON, K., GUNZEL-APEL, A. R., TOPFER-PETERSEN, E. **Specific order in the appearance of protein tyrosine phosphorylation patterns is functionally coordinated with dog sperm hyperactivation and capacitation.** *Journal of Andrology*, 24:423–437, 2003a.

PETRUNKINA, A. M. et al. **Regulation of capacitation of canine spermatozoa during co-culture with heterologous oviductal epithelial cells.** *Reproduction in Domestic Animals*, 38: 455–463, 2003b.

PINHO, G. L. L.; BIANCHINI, A. **Acute copper toxicity in the euryhaline copepod *acartia tonsa*: implications for the development of an estuarine and marine biotic ligand model.** *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29:1834-1840, 2010.

PLESSIS, S. D. et al. **Oxidative phosphorylation versus glycolysis: what fuel do spermatozoa use?** *Asian Journal of Andrology*, 17:106, 2015.

POTTER, H.; KRAMER, C. R. **Ultrastructural observations on sperm storage in the ovary of the platyfish, *Xiphophorus maculatus* (Teleostei: Poeciliidae): the role of the duct epithelium,** *J. Morphol.* 245:110-129, 2000.

RANA, K. **Preservation of gametes.** In: Bromage, N.R., Roberts, R.J. (Eds.), *Broodstock Management and Egg and Larval Quality.* Blackwell, Oxford, 1995, 53–75 p.

RASHED, N. M. **Monitoring of environmental heavy metals in fish from Nasser Lake.** Environment International 27:27-33, 2001.

RATH D, T. et al. **Structural, biochemical and functional aspects of sperm-oocyte interactions in pigs.** Society for Reproduction and Fertility Supplement, 62: 317–330, 2006.

REZENDE, C. E.; LACERDA, L. D. **Metais pesados em mexilhões *Perna perna* no litoral do Estado do Rio de Janeiro.** Revista Brasileira de Biologia, 46:239-247, 1986.

ROBLES, V.; MARTINEZ-PASTOR, F. **Flow cytometric methods for sperm assessment.** Methods in Molecular Biology, 927:75-86, 2013.

SAMPAIO et al., **Avanços da maricultura na primeira década do século XXI: piscicultura e carcinocultura marinha.** Revista Brasileira de Zootecnia. [online], 39:102-111, 2010.

SANDRINI, J. Z. et al. **Reactive oxygen species generation and expression of DNA repair-related genes after copper exposure in zebrafish (*Danio rerio*) ZFL cells.** Aquatic Toxicology, 95:285–291, 2009.

SAROSIEK, B. et al. **The effect of copper, zinc, mercury and cadmium on some sperm enzyme activities in the common carp (*Cyprinus carpio* L.).** Reproductive biology. 9:295-301, 2009.

SCHANTZ, S. L.; WIDHOLM, J. J. **Cognitive effects of endocrine-disrupting chemicals in animals.** Environmental Health Perspectives, 109:1197–1206, 2001.

SCOTT, G. R.; SLOMAN, K. A. **The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: Integrating behavioural and physiological indicators of toxicity.** Aquatic Toxicology, 68:369–392, 2004.

SHUHAIMI-OTHMAN, M.; NADZIFAH, Y.; AHMAD, A. K. **Toxicity of Copper and Cadmium to Freshwater Fishes.** World Academy of Science, Engineering and Technology, 4:676-678, 2010.

SOHAL, R. S.; ALLEN, R. G.; NATIONS, C. **Oxygen free radicals play a role in cellular differentiation: an hypothesis.** Journal of Free Radicals Biology and Medicine, 2:175–181, 1986.

SOLOMON, F. **Impacts of Copper on Aquatic Ecosystems and Human Health. EduMine course entitled “Metal Mining Discharges – Impacts and Controls.”** EduMine and the University of British Columbia Mining Studies, 2009, 25-28 p.

STOSS, J. **Fish gamete preservation and spermatozoan physiology.** In Fish Physiology, Vol. 9 (Hoar, W. S., Randall, D. J. & Donaldson, E. M., eds) San Diego, CA: Academic Press, 1983, 305-350 p.

STATISTIX. **Statistix 9 for Windows.** Analytical Software. 2008.

SUN, C. et al. **Optimization of handling and refrigerated storage of guppy *Poecilia reticulata* sperm.** Journal of Fish Biology. 77:54-66, 2010.

SUNDARAY, S. K. **Application of multivariate statistical techniques in hydro-geochemical studies-a case study: BrahmaniKoel River (India).** Environmental Monitoring and Assessment, 164:297-310, 2009.

SUTHAR, S.; SINGH, S. **Vermicomposting of domestic waste by using two epigenic earthworms (*Perionyx excavatus* and *Perionyx sansibaricus*).** International Journal and Environmental Science Technology, 5:99-106, 2008.

TAM, N. F. Y.; WONG, Y. S. **Spatial and temporal variations of heavy metal contamination in mangrove swamp in Hong Kong.** Marine Pollution Bulletin, 31: 254-261, 1995.

TEIXEIRA, E. E. et al. **Preliminary study of metals in sediments from áreas influenced by coal processing and steel industry activities – Baixo Jacuí Region, RS-Brasil.** Environmental Technology, 18:581-591, 1997.

TELES, M.; PACHECO, M.; SANTOS, M. **Physiological and genetic responses of Test Methods and Guidelines” Ecological Effects Test Guidelines Fish Acute Toxicity Test,** Freshwater and Marine, 2005.

TELLIS, M. S.; ALSOP, D.; WOOD, C. M. **Effects of copper on the acute cortisol response and associated physiology in rainbow trout.** Comparative Biochemistry and Physiology. Part C: Toxicology and Pharmacology, 155:281–289, 2012.

THOMPSON, B. E.; HARA, T. J. **Chemo-sensory bioassay of toxicity of lake waters contaminated with heavy metals from mining effluents.** Water Pollution Research in Canada, 12:179-189, 1977.

TSAKMAKIDIS, I. A.; LYMBEROPOULOS, A. G.; KHALIFA, T. A. A. **Relationship between sperm quality traits and field-fertility of porcine semen.** J Vet Sci 11:151–4, 2010.

UAUY, R.; OLIVARES, M.; GONZALES, M. **Essentiality of copper in humans,** American Journal of Clinical Nutrition, 67:952S-9S, 1998.

VALLORANI, C. et al. **Effects of antioxidants on boar spermatozoa during sorting and storage.** Animal Reproduction Science, 122:.58–65, 2010.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. **Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review.** Environ Toxicol Pharmacol, 13:57-149, 2003.

VAN DER VOET, E. et al. **Environmental Risks and Challenges of Anthropogenic Metals Flows and Cycles, A Report of the Working Group on the Global Metal Flows to the International Resource Panel.** United Nations Environment Programme (UNEP) 2013, 2 p.

VAN OVERVELD, F.W.P.C. et al. **Tyrosine as important contributor to the antioxidant capacity of seminal plasma.** Chemical-Biological Interactions, 127:151-161, 2000.

VAN HEERDEN, D.; VOSLOO, A.; NIKINMAA, M. **Effects of short-term copper exposure on gill structure, metallothionein and hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).** Aquatic Toxicology, 69:271–280, 2004.

VARELA JUNIOR, A.S. et al. **Use of amides as cryoprotectants in extenders for frozen sperm of tambaqui, *Colossoma macropomum*.** Theriogenology. 78:244–251, 2012.

VIARENGO, A. et al. **In vivo effects of copper on the calcium homeostasis mechanisms of mussel gill cells plasma membranes.** Comparative Biochemistry Physiology Part C, 113:421-5, 1996.

VIEIRA, L.R. et al. **Effects of copper and mercury on the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: Linking biomarkers to behavior.** Chemosphere 76:1416–1427, 2009.

VIZZIANO, D. et al. **Testis Development, its Hormonal Regulation and Spermiation Induction in Teleost Fish.** In: Fish spermatology, S. M. H. Alavi, J. J. Cosson, K. Coward, G. Rafiee Eds. Alpha Science international Ltd, Oxford; 2008,103-139 p.

VUTUKURU, S. S. et al. **Acute effects of copper on superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation in the freshwater teleost fish *Esomus danricus*.** Fish Physiology Biochemistry, 32:221-229, 2006.

WABERSKI, D.; PETRUNKINA, A. M.; TÖPFER-PETERSEN, E. **Can external quality control improve pig al efficiency?** Theriogenology, 70:1346–1351, 2008.

WATERHOUSE, K. E., et al. **Effects of in vitro storage time and semen-extender on membrane quality of boar sperm assessed by flow cytometry.** Theriogenology, 62:1638–1651, 2004.

WATHES, D. C.; ABAYASEKARA, D. R. E.; AITKEN, R. J. **Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction.** Biology of Reproduction, 77:190-201, 2007.

WATSON, P. F. **The cause of reduced fertility with cryopreserved semen.** Animal Reproduction Science,60:481-492, 2000.

WHO. International Programme on Chemical Safety (IPCS). **Biomarkers and risk assessment: concepts and principles.** Environmental Health Criteria 155, World Health Organization, Geneva, 1998.

WOOD, C. M.; WU, K. B. **The Biotic Ligand Model: a historical overview.** Comparative Biochemistry and Physiology Part C, Toxicology and Pharmacology, 133:3-35, 2002.

WU, S. M.; HO, Y. C.; SHIH, M. J. **Effects of Ca²⁺ or Na⁺ on metallothionein expression in tilapia larvae (*Oreochromis mossambicus*) exposed to cadmium or copper.** Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 52:229-234, 2007.

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

YANG, H.; TIERSCH, T. Current Status of Sperm Cryopreservation in Biomeical Research Fish Models: Zebrafish, Medaka, and Xiphophorus. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, Toxicology and Pharmacology, 149:224-232, 2009.

ZHOU, Q. et al. Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. Analytica Chimica Acta, 606:135-150, 2008.