

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**FACULDADE DE AGRONOMIA**

**CURSO DE ZOOTECNIA**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**Thales Lysakowski Flores Machado**

**Refinamento da avaliação de morfologia espermática em sêmen criopreservado de  
*Rhamdia quelen***

**Porto Alegre**

**2022/01**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**FACULDADE DE AGRONOMIA**

**CURSO DE ZOOTECNIA**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**Refinamento da avaliação de morfologia espermática em sêmen criopreservado de**  
*Rhamdia quelen*

Autor: Thales Lysakowski Flores Machado

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito para a obtenção do Grau de Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Danilo Pedro Streit Jr.

Co Orientador: Prof. Dr. Rômulo Batista Rodrigues

**Porto Alegre**

**2022/01**

**Thales Lysakowski Flores Machado**

**Refinamento da avaliação de morfologia espermática em sêmen criopreservado de  
*Rhamdia quelen***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito para obtenção do grau de Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Data da Aprovação: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

---

Prof. Dr. Danilo Pedro Streit Jr.

---

Prof. Dr. Rômulo Batista Rodrigues

---

Bruna Bitencourt da Costa

---

Douglas Cosme Selle

Porto Alegre

2022/01

## AGRADECIMENTOS

Ao meu pai Hermógenes Flores Machado, que sempre me incentivou a estudar e jamais deu o braço a torcer para qualquer escolha que eu tivesse que envolvesse aprendizado, conhecimento e estudo. A minha mãe Angela Lysakowski que sempre me deu apoio em todos os momentos da minha vida, que sempre esteve ao meu lado nos momentos bons e ruins. Obrigado por serem os pilares de tudo isso.

Obrigado ao meu irmão Kevin, do qual sempre me auxiliou nas dificuldades da faculdade. A minha irmã Priscila e Diógenes, pelo apoio pela escolha de seguir o ramo acadêmico.

Aos meus familiares que me apoiaram do início ao fim desta jornada, que me apoiaram e comemoram minhas realizações.

A minha amada namorada Rafaela Castro da Silveira, a qual eu me apaixonei durante o percurso do curso e sempre me deu apoio nos momentos mais difíceis da faculdade, com cadeiras que exigiam muito e as que não eram as minhas favoritas. Obrigado por me manter firme, feliz e apaixonado e por você e por este curso do qual escolhemos.

Aos meus queridos amigos, Maurício Paz, Matheus Comparsi, Gabriel Cassafus, Arthur Ramalho, Paulo Becker, Lucas Mayer, Keysson Terra, por jamais duvidarem da minha escolha, por me apoiarem nesta jornada, por todas as conversas, encontros e zoeiras que passamos juntos.

Aos meus amigos que fiz durante a faculdade. Obrigado Alanis Melo pela amizade e ao apoio durante e fora do curso. Aos amigos Rosani Waltzer, Jéssica Pereira, Gabriel Martins, José Bittencourt, pelas resenhas, festas, incentivos e trabalhos intermináveis realizados juntos.

Ao Prof. Harold Ospina (*in memoriam*), o qual me fez dar uma chance a Zootecnia e me apaixonar pelo curso. O senhor foi muito importante na minha escolha de seguir no curso, obrigado pelas poucas palavras certas, o sorriso no rosto e simpatia que num momento de dúvidas me deu esperança.

Aos amigos e colegas que fiz no Laboratório AQUAM, Itamar Cossina, Jhony Benato, Tales Fabris, Renata Villar, Raquel Santos, Nathalia Teixeira, Douglas Selle, Thaiza Freitas, Maritza Perez. Agradeço por todas as conversas, conhecimentos, dias e noites de trabalhos que realizamos juntos, tudo isso foi importante para meu aprendizado e ter gosto pela aquicultura, me mostrando sempre que o caminho que eu escolhi era o certo.

A instituição SENAR/RS e aos técnicos de campo, Helena Carvalho e Douglas Selle que me proporcionaram espaço para realizar meu estágio de conclusão final de curso o qual me proporcionou muito conhecimento sobre piscicultura e o profissionalismo de atuar no campo com prestação de assistência técnica rural.

Ao Thales de Souza França, meu xará, por toda ajuda para realizar este trabalho, pelo auxílio, discussões, ideias e liberação de amostras da parte de um trabalho colaborativo realizado por equipe incrível. Obrigado França!

Ao meu amigo e co-orientador, Prof. Dr Rômulo Batista Rodrigues, que me ajudou a construir este trabalho de conclusão de curso. Sem nossas conversas e discussões este trabalho não seria realizado, muito obrigado.

A uma das minhas inspirações ao estudo, ciência, pesquisa, trabalho, o meu amigo e orientador Prof. Dr. Danilo Pedro Streit Jr. Tu foste uma grande inspiração como ser forte, estudioso e correr atrás das conquistas que eu almejei durante o percurso da vida. Obrigado por abrir as portas e me receber no laboratório e durante todos os cinco anos de Iniciação Científica a qual aprendi muito sobre ciência, pesquisa e profissionalismo.

## RESUMO

A avaliação de morfologia espermática de peixes é uma técnica que visa analisar as quantidades de anormalidades dos espermatozoides presentes no sêmen de um reprodutor. No qual, quando presente em grandes quantidades, as anormalidades espermáticas provocam a diminuição da motilidade, o que explica as falhas reprodutivas de machos classificados como aptos à reprodução. Além disso, a avaliação das características espermáticas é imprescindível na rotina de reprodução artificial em qualquer espécie. Porém, as referências autorais da quantidade de células espermáticas a serem avaliadas para a análise de validação espermáticas pelo método de morfologia espermática, divergem entre autores e em trabalhos de mesma autoria. Portanto, este trabalho tem como objetivo validar se as quantidades totais de células espermáticas avaliadas pelos autores são válidas. Neste trabalho foi analisado células espermáticas de jundiá (*Rhamdia quelen*) que passaram pelo processo de criopreservação, pois as baixas temperaturas causam injúrias nos espermatozoides, aumentando a quantidade de anormalidades espermáticas a serem encontradas. Para a criopreservação foram utilizadas palhetas (0,25 mL) na proporção de 1:3 (62,5 µL sêmen e 187,5 µL meio de congelamento) com o meio de congelamento contendo 5% D-frutose, 5% leite em pó e 10% Metanol. As amostras foram congeladas em dry-shipper durante 18 horas e então passadas para um botijão de nitrogênio líquido onde permaneceram por 6 meses. As amostras foram descongeladas em banho maria por 10 segundos em 25°C e então diluídas em 1000 µL de solução extensora de NaCl (325 mOsm kg<sup>-1</sup>; pH 7,6; 24 °C; diluído em água destilada). Imediatamente após a diluição na solução extensora, foi separado uma alíquota de 1µL de sêmen criopreservado de cada macho e fixado em formol-salino-tamponado. As amostras foram coradas com Rosa de Bengala a 4%. Para a contagem de células espermáticas totais, foram escolhidos cinco tratamentos (100, 200, 400, 800 e 1600 espermatozoides avaliados) com cinco machos, sendo cada macho uma repetição, onde foram avaliado em duplicata. Não houve diferença estatística de uma maneira geral das células avaliadas. Porém, quanto maior o número de células avaliadas, menor foi a variação dos resultados. Indicando assim, que quanto mais células espermáticas um pesquisador analisar, mais preciso será seu resultado.

## ABSTRACT

The evaluation of fish sperm morphology is a technique that aims to analyze the amounts of sperm abnormalities present in the semen of a breeder. In which, when present in large quantities, sperm abnormalities cause a decrease in motility, which explains the reproductive failures of males classified as suitable for reproduction. In addition, the evaluation of spermatoc characteristics is essential in the routine of artificial reproduction in any species. However, the authorial references of the number of sperm cells to be counted for the seminal validation analysis by the sperm morphology method, differ between authors and in studies by the same authorship. Therefore, this study aims to validate whether the total amounts of sperm cells counted by the authors are valid. In this study were analyzed sperm cells of silver catfish (*Rhamdia quelen*) that went through the cryopreservation process, because the low temperatures cause injuries to the sperm, increasing the amount of sperm abnormalities to be found. For cryopreservation, straws (0,25 mL) were used in a 1:3 ratio (62.5  $\mu$ L semen and 187.5  $\mu$ L freezing medium) with the freezing medium containing 5% D-fructose, 5% powdered milk and 10% methanol. The samples were frozen in a dry-shipper for 18 hours and then transferred to a liquid nitrogen cylinder where they remained for 6 months. The samples were thawed in a water bath for 10 seconds at 25°C and then diluted in 1000  $\mu$ L of NaCl (325 mOsm kg<sup>-1</sup>; pH 7.6; 24 °C, diluted in distilled water) extender solution. Immediately after dilution in the extender solution, an aliquot of 1 $\mu$ L of the thawed semen was separated from each male and fixed in buffered saline-formaldehyde. Samples were stained with 4% Rose Bengal. For the total sperm cell count, five treatments were chosen (100, 200, 400, 800 and 1600 evaluated spermatozoa) with five males, each male being one repetition, where were evaluated in duplicate . There was no statistical difference in general of the cells counted. However, the greater the number of cells evaluated, the smaller the variation in the results. Thus indicating that the more sperm cells a researcher analyses, the more accurate his result will be.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Desenho esquemático de um <i>Rhamdia quelen</i> .....	3
<b>Figura 2</b> – Anormalidades de cabeça.....	10
<b>Figura 3</b> – Anormalidades de cauda.....	11
<b>Figura 4</b> – Anormalidades por gotas citoplasmáticas.....	12

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Anormalidades espermáticas de peixes, adaptado de Miliorini <i>et al.</i> (2011).....	6
<b>Tabela 2</b> – Tendência da diminuição do coeficiente de variação para anormalidades espermáticas de <i>Rhamdia quelen</i> quando se aumenta o N de células espermáticas avaliadas....	14
<b>Tabela 3</b> – Coeficiente de variação dos dados obtidos para anormalidades espermáticas que não seguem a tendência da demonstrada na Tabela 2.....	15

## Sumário

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1 A ESPÉCIE .....	3
2.2 CARACTERIZAÇÃO ESPERMÁTICA.....	4
2.3 MORFOLOGIA ESPERMÁTICA .....	5
2.3 ANORMALIDADES ESPERMÁTICAS .....	6
2.4 CRIOPRESERVAÇÃO .....	8
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	9
3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	9
3.2 MANUTENÇÃO DOS MACHOS E COLETA DO SÊMEN.....	9
3.3 CRIOPRESERVAÇÃO E ANÁLISE DAS AMOSTRAS .....	10
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	11
4. RESULTADOS .....	12
5. DISCUSSÃO.....	17
6. CONCLUSÃO .....	17
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	19

## 1.INTRODUÇÃO

O levantamento de dados da produção brasileira de cultivo de peixes em 2021 foi de 841.005 toneladas, um aumento de 4,7% em relação ao último ano (PEIXE BR, 2021) e um aumento de 68,8% em relação à produção do ano de 2015 (PEIXE BR, 2016). Estes dados demonstram como a produção de peixes aumentou dentro da última década. Isto pode ser explicado, pelo aumento das tecnologias de produção, pelo avanço da cadeia produtiva, incluindo fornecedores de alevinos, fabricantes de insumos e equipamentos, os frigoríficos, as empresas de assistência técnica, os profissionais e a pesquisa (PEIXE BR, 2021). Também o fato da população estar buscando alimentos de origem animal que sejam saudáveis como é a carne de peixes. Segundo Pastro et al., 2019 a carne de peixes é reconhecida como uma carne saudável, em função do elevado teor de proteínas, a presença de aminoácidos essenciais, vitaminas, minerais, rico em ácidos graxos poli-insaturados, como o ômega-3 e também devido à sua boa digestibilidade em comparação a outros produtos de origem animal.

Quanto ao setor aquícola, a reprodução das espécies cultivadas é uma das áreas limitantes e determinantes para o sucesso do empreendimento, que acaba controlando a oferta de animais disponíveis na produção. Uma ótima reprodução e alevinagem será determinante na produção de peixes e como esta irá responder no final de toda cadeia produtiva.

Para uma ótima reprodução de peixes é necessário que os reprodutores estejam saudáveis, bem nutridos, alocados em ambiente adequado e sejam bem manejados durante o processo reprodutivo. O sucesso na reprodutivo de peixes em cativeiro é alcançado atualmente pelo uso de diferentes técnicas que auxiliam no processo reprodutivo, tanto para fins econômicos como conservacionista.

Dentre essas técnicas, a criopreservação de gametas masculinos é uma biotecnologia já muito utilizada para a inseminação de bovinos e vem sendo muito estudada para fins de conservação de espécies em risco de extinção como no caso de algumas espécies em peixes, por exemplo da piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) que se encontra no Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção.

A avaliação das características seminais é imprescindível na rotina de reprodução artificial em qualquer espécie. Para a descrição do perfil espermático, são analisadas as características físicas do sêmen com o uso de técnicas de avaliação seminal, como volume,

concentração, taxa e duração da motilidade espermática e morfologia espermática (Murgas *et al.*, 2011).

A morfologia espermática é um fator importante na avaliação da qualidade do sêmen, sendo que o aumento das patologias espermáticas provoca a diminuição da motilidade (BILLARD *et al.*, 1999). Além disso, a morfologia espermática pode auxiliar na caracterização espermática, fazendo inferência sobre seu potencial fertilizante e explicando insucessos de reprodutores tidos como aptos após análises convencionais de motilidade espermática (MILIORINI, 2006).

Diversos autores usam referências de mamíferos para avaliação de anormalidades morfológicas em sêmen de peixes. Já para contagem das células os autores usam diferentes quantidades, Streit Jr. *et al.* (2004), elaboraram um protocolo de coloração para os espermatozoides e facilitar a avaliação, utilizando o total de 200 células por lâmina. Entretanto outros autores, como Mataveli, *et al.* (2018), utilizaram a quantidade de 400 espermatozoides por lâmina de sêmen de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e em outro momento Streit Jr. *et al.* (2006), analisaram de 100 a 130 espermatozoides de Pacu (*Piaractus mesopotamicus*).

Para *Rhamdia quelen*, a espécie modelo utilizada no trabalho, um protocolo desenvolvido por Costa, *et al.* (2019), analisou a quantidade de 200 espermatozoides por lâmina. Devido às diferenças entre o número de células avaliadas pelos autores que fazem avaliação espermática pelo método de morfologia espermática, é necessário que seja elaborado um novo método para padronizar essa análise.

Portanto, de modo a analisar as referências utilizadas e padronizar a metodologia, no presente estudo, será avaliado o número de células que deve ser considerado para avaliação de morfologia espermática em sêmen criopreservado de jundiá (*Rhamdia quelen*).

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

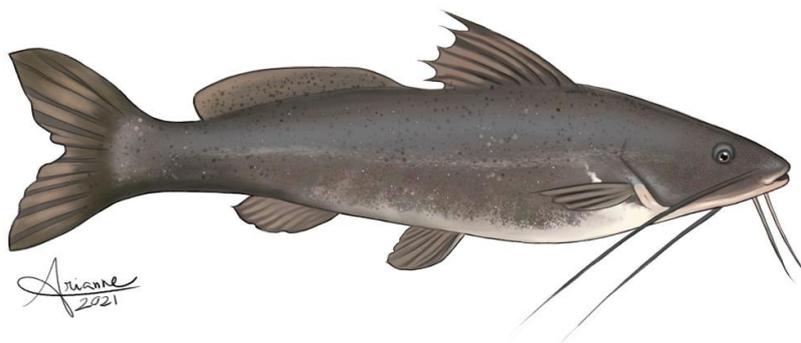
### 2.1 A ESPÉCIE

A espécie deste estudo (*Rhamdia quelen*) tem distribuição neotropical da região sudeste do México até ao sul da Argentina, compreendendo diversos países da América Latina (SILFVERGRIP, 1996).

A divisão taxonômica da espécie é descrita em: Classe: *Osteichthyes*, Série: *Teleostei*, Ordem: *Siluriformes*, Família: *Pimelodidae*, Gênero: *Rhamdia*, Espécie: *quelen*.

Popularmente conhecido como jundiá (Figura 1) esta espécie vem sendo muito utilizada na piscicultura por seu potencial produtivo na região sul do Brasil, pois apresenta um crescimento contínuo no inverno e ótimos parâmetros reprodutivos (MARCHIORO & BALDISEROTTO, 1999; SANCHES *et al.*, 2013). Em outras regiões do Brasil esta espécie apresenta-se com outros nomes, como: jundiá-tinga, jandiá, mandi e sapipoca. Na Argentina: bagre, bagre negro, bagre sapo e bagre sul-americano.

**Figura 1:** Desenho esquemático de um *Rhamdia quelen*.



Fonte: Ariane, 2021.

O *R. quelen* vive em lagos e poços fundos de rios, preferindo águas turvas, com fundo de areia, lama ou na margem perto da vegetação (GOMES, L.C. *et al.*, 2000). Tem o hábito de se esconder em buracos, entre pedras e troncos, de onde saem à noite atrás de alimento (GUEDES, 1980). A coloração do jundiá pode variar de marrom-avermelhado claro a cinza ardósia.

O jundiá pode ser considerado uma espécie euritérmica, sendo assim, capaz de suportarem variações de temperatura de 15 a 34°C (CHIPPARI GOMES, 1998). O seu

crescimento é bastante pronunciado nos primeiros anos de vida. O crescimento dos machos é mais pronunciado do que das fêmeas. Entretanto no terceiro ou quarto ano de vida, a situação se inverte, e as fêmeas passam a crescer mais rapidamente do que os machos. O crescimento para os machos e fêmeas é aproximadamente 52,0cm e 66,5cm respectivamente (GOMES *et al.*, 2000).

Esta espécie possui hábito alimentar onívoro, com preferência por peixes, crustáceos, insetos, restos vegetais e detritos orgânicos (GUEDES, 1980; MEURER & ZANIBONI FILHO, 1997). Entretanto é uma espécie que se adapta a ração comercial desde sua fase de juvenil. Na fase larval recomenda-se o uso de fígado bovino cru e pó de levedura *Saccharomyces cerevisiae*, pois rações em pó comerciais influenciam na morfologia da larva e diminuem sua sobrevivência (PIAIA & RADUNZ NETO, 1997).

O período reprodutivo e os picos de desenvolvimento gonadal de *R. quelen* podem variar a cada ano e de um lugar para outro, com o pico reprodutivo nos meses de agosto-setembro e janeiro-fevereiro (BOSSEMEYER, 1976), sendo influenciada pelas chuvas associadas ao aumento da temperatura e dos níveis dos rios e lagos (WINEMILLER, 1989). A desova dessa espécie é assíncrona, podendo ser influenciada pela disponibilidade de alimento para as larvas. A quantidade de ovos por desova pode variar de acordo com a idade, tamanho e condições nutricionais.

## 2.2 CARACTERIZAÇÃO ESPERMÁTICA

Os espermatozoides são pequenas células e exibem um design geral para todas as espécies. Consiste em cabeça arredondada ou alongada, peça intermediária e flagelo (ISLAM & AKHTER, 2011). Contudo a maioria dos peixes apresentam uma diferenciação em seu espermatozoide, a ausência do acrossoma, adaptação funcional nos espermatozoides pela presença da micrópila, um ducto no oócito que permite a entrada direta do espermatozoide (BUSTAMANTE, 2016; RAMÍREZ-MERLANO *et al.*, 2010).

A volume de sêmen de peixes é muito variável entre as espécies e entre a própria espécie, por ser influenciado pela estação do ano, clima, período de repouso sexual e método de coleta (MURGAS *et al.*, 2011). Para o *Rhamdia quelen*, foram obtidos volumes entre 0,57 ml e 1,03 ml, com média de  $0,8 \pm 0,6$  ml (FOGLI DA SILVEIRA; KAVAMOTO; NARAHARA, 1985), como também foram coletados volumes menores de  $0,41 \pm 0,37$  ml, (FERREIRA *et al.*, 2001) e volumes maiores como  $5,46 \pm 0,63$  mL (DA COSTA, 2018) e

13,0 ± 4,00 ml (FRANÇA *et al.*, 2022). Pode-se observar que os volumes de sêmen aumentaram durante os anos, isto pode ser explicado por técnicas de coleta de sêmen mais avançadas e uso de indução hormonal, que levam ao aumento do volume de sêmen.

A concentração ou densidade espermática expressa a quantidade de espermatozoides por mL de sêmen, podendo ser estimada pela contagem em câmaras volumétricas, mediante a diluição do sêmen em formolcitrato (FELIZARDO *et al.*, 2010). Os valores da concentração podem variar de acordo com peso e idade dos peixes, época do ano (SILVA *et al.*, 2009), frequência de coleta e volume do ejaculado (MURGAS *et al.*, 2011). Para o *Rhamdia quelen* já foram estimadas concentrações entre 1,25 x 10<sup>10</sup> (BORGES *et al.*, 2015) e 14,9 ± 1,6 x 10<sup>10</sup> espermatozoides por mL<sup>-1</sup> (DA COSTA *et al.*, 2019).

### 2.3 MORFOLOGIA ESPERMÁTICA

A avaliação seminal através da morfologia espermática é uma importante técnica que visa caracterizar a qualidade das amostras de sêmen coletadas, fazendo inferência sobre o potencial fertilizante de amostras frescas e congeladas, explicando até mesmo, falhas de reprodutores classificados como aptos à reprodução (MILIORINI, 2006).

Segundo Cosson *et al.* (2008), a motilidade e a viabilidade são os parâmetros mais comumente usados para avaliar a qualidade espermática. Além disso, o conhecimento quanto à qualidade espermática, os padrões de movimento e morfologia, bem como as relações entre estes parâmetros são importantes na reprodução artificial e para uso reprodutivo, além de fornecer informações valiosas sobre a biologia reprodutiva das espécies nativas e contribuir para o estabelecimento de protocolos de conservação de sêmen padronizados (SILVA *et al.*, 2014). Para sêmen criopreservado, conhecer a qualidade espermática é a primeira consideração para a padronização de protocolos para manipulação *in vitro* e para o desenvolvimento de protocolos de armazenamento de sêmen (CALDAS & GODOY, 2019).

Como já visto, a motilidade é essencial para a fertilização (KAVAMOTO *et al.*, 1999; FIGUEROA *et al.*, 2016) e depende de diversos aspectos, como a integridade do canal da membrana plasmática, estrutura do flagelo, estado fisiológico da célula, produção de ATP (adenosina trifosfato) e da energia previamente armazenada pelas mitocôndrias (DZYUBA & COSSON, 2014).

Diversos fatores podem influenciar a morfologia dos espermatozoides de peixes, tais como: osmolaridade do meio de ativação, nutrição, métodos de coloração da célula espermática, estágio de maturação gonadal, criopreservação do sêmen e a idade do reprodutor (GRACIA, 2011; MILIORINI *et al.*, 2011; COSTA *et al.*, 2019).

### 2.3 ANORMALIDADES ESPERMÁTICAS

Atualmente a classificação utilizada para morfologia espermática é referenciada por estudos realizados em mamíferos, sendo grande parte dos autores classificam as anormalidades espermáticas em primárias e secundárias. Entretanto, existem outras classificações como anormalidades maiores ou menores, danos compensatórios ou não compensatórios, anormalidades leves ou graves. (STREIT JR. *et al.*, 2009; GALO *et al.*, 2011; MILIORINI *et al.*, 2011; ROCHA *et al.*, 2018).

As anormalidades primárias são classificadas como oriundas das espermatogêneses e as secundárias oriundas do processo e manejo reprodutivo. Contudo, Streit Jr. *et al.*, (2009), sugeriu que algumas anormalidades primárias, apareciam com maior frequência após o processo de criopreservação, indicando que a solução crioprotetora danificava os espermatozoides antes íntegros.

Para as anormalidades espermáticas de peixes, os trabalhos relatam a ocorrência de anormalidades para cabeça, cauda e gotas citoplasmáticas. Para o Curimba (*Prochilodus lineatus*), Miliorini *et al.* (2011) descreveu as principais anormalidades espermáticas para peixes (Tabela 1), sendo macrocefalia, microcefalia, cabeça degenerada, peça intermediária degenerada, cauda quebrada, cauda curta e cauda fortemente enrolada para as anormalidades primárias. Para as anormalidades secundárias foram descritas, cabeça solta, cauda dobrada, gota proximal e gota distal.

**Tabela 1** – Anormalidades espermáticas de peixes, adaptado de Miliorini *et al.* (2011).

Classificação	Característica analisada
Macrocefalia	Espermatozoides que apresentam cabeça gigante, com contorno e formas anormais, sem aparente degeneração cromatínica ou vacuolar

Microcefalia	Espermatozoides com tamanho de cabeça reduzido, com contorno e formas anormais, sem degeneração cromatínica ou vacuolar aparente.
Cabeça degenerada	Espermatozoides com cabeça de tamanho normal, mas que apresentam contorno irregular ou grumoso, e/ou degeneração cromatínica ou vacuolar aparente
Peça intermediária degenerada	Alterações em espessura (terço médio da peça intermediária), densidade, difração, e comprimento da peça, envolvendo seu contorno e sua inserção na cabeça.
Cauda enrolada distalmente	Dobradura e enovelamento na extremidade final da cauda.
Cauda quebrada	Células espermáticas com fratura ou retenção de cauda.
Cauda curta	Espermatozoides que apresentam descontinuidade da cauda a partir da peça intermediária.
Cauda fortemente enrolada	Dobradura e enovelamento na extremidade final da cauda
Cabeça solta	Cabeça observada sem cauda, porém sem qualquer alteração.
Cauda dobrada	Dobradura da cauda em diversos graus, sem envolver a si mesmo ou a cabeça
Gota citoplasmática proximal	Persistência de uma gota citoplasmática na peça intermediária.

---

As anormalidades espermáticas estão relacionadas com a cinética de movimento dos espermatozoides (COSTA, 2022). A diminuição da cinética de movimento dos espermatozoides pelo aumento de anormalidades espermáticas é explicada pelas anormalidades de cauda, que podem comprometer a progressão da célula, alterando sua cinética, pois a movimentação dos espermatozoides são direcionadas para frente e dependem da capacidade de seus flagelos gerarem os movimentos oscilatórios, que se propagam da junção da cabeça-cauda em direção à ponta do flagelo, resultando no movimento para frente, a medida que maior parte do comprimento flagelar for coberta por

estas ondas (DZYUBA *et al.*, 2017). Além disso, Tuset *et al.* (2018) descreve que a velocidade de natação e a capacidade de fertilização dos espermatozoides estão relacionadas à sua morfologia.

Já anormalidades de cabeça podem levar o comprometimento da estrutura e da função celular, por alterações na integridade do DNA, dano mitocondrial, deficiência metabólica, desintegração da membrana plasmática, vazamento da proteína e tornarem a célula menos hidrodinâmica, podendo assim, afetar negativamente a motilidade e a cinética do movimento (COSTA, 2022).

## 2.4 CRIOPRESERVAÇÃO

A criopreservação é uma biotecnologia utilizada para conservação de material genético através da utilização de temperaturas muito baixas. Na última década a técnica vêm sendo muito utilizados na produção animal, tanto pela possibilidade da redução de estoque de reprodutores até programas de melhoramento genético e em programas que visam à conservação de espécies ameaçadas (STREIT JR. 2013).

Para a criopreservação de gametas masculinos é necessário o uso de soluções crioprotetoras, de modo que estas permitam manter células espermáticas protegidas das crioinjúrias que ocorrem durante o processo. Os crioprotetores dividem-se em permeáveis e impermeáveis.

O crioprotetor permeável, atua substituindo a água no interior da célula, pois no processo de solidificação da água formam-se cristais de gelo, que podem danificar a estrutura dos tecidos celulares, inviabilizando a célula espermática (STREIT JR. 2013). Os principais crioprotetores permeáveis são, o glicerol, etileno-glicol, dimetil-sufóxido (DMSO) e o metanol.

Quanto aos crioprotetores impermeáveis ou não-permeáveis, estes são responsáveis pela proteção da membrana externa celular, evitando seu rompimento (STREIT JR. 2013). Os principais crioprotetores impermeáveis são, moléculas de açúcares como a glicose, sacarose, frutose, trealose e outras proteínas como a gema de ovo.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso, onde os grupos experimentais foram compostos por diferentes quantidades totais de espermatozoides avaliados por lâmina (100, 200, 400, 800 e 1600), com cinco machos de *Rhamdia* quelen como repetição. As amostras de sêmen dos cinco peixes foram submetidas a um único protocolo de criopreservação. A contagem da quantidade total de células espermáticas de cada grupo experimental em cada repetição foi realizada em duplicata, para diminuir a variância dos dados.

#### 3.2 MANUTENÇÃO DOS MACHOS E COLETA DO SÊMEN

Este trabalho foi realizado no Laboratório AQUAM, localizado na Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os cinco machos estavam alocados em caixas d'água de 500 litros ligados a um sistema de recirculação de água com temperatura controlada em  $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , pH de  $7,6 \pm 0,3$  e com controle dos outros parâmetros de qualidade de água (nitrito, amônia, transparência e dureza Kh), com acompanhamento de testes químicos da LabconTest, de forma a manter os peixes em um ambiente adequado. A alimentação foi realizada duas vezes ao dia, as 9h e as 16h até a saciedade aparente dos animais, com ração comercial da Supra Aqualine, tamanho de 8mm e 32% de proteína bruta.

Os animais foram previamente induzidos com uma dose única de 3 mg/kg de hipófise de carpa (EHC) o que auxilia na liberação do sêmen. Após um período de 240 horas-grau ou unidade térmica acumulada (UTA) (10 horas, água a  $24^{\circ}\text{C}$ ) foi coletado sêmen através de uma massagem abdominal no sentido caudo-cranial, com desprezo da primeira liberação do sêmen, evitando assim contaminações por urina, fezes ou sangue. Após a coleta do sêmen de cada macho, foi realizada uma análise subjetiva da motilidade do sêmen em microscópio óptico, para que pudesse comprovar que o sêmen estava apto a ser utilizado para reprodução. A motilidade do sêmen dos machos utilizadas neste trabalho foram superiores a  $>50\%$ , sendo que sêmens obtidos de machos com motilidade abaixo do valor de 50% foram descartados.

### 3.3 CRIOPRESERVAÇÃO E ANÁLISE DAS AMOSTRAS

A metodologia de criopreservação utilizada foi descrita por Adames *et al.* (2015). O meio de congelamento utilizado foi composto de 5% D-frutose (Êxodo Científica, Sumaré, Brasil), 5% leite em pó (Molico Skimmed®, Nestlé, São Paulo, Brasil), e 10% Metanol (\*Merck, Darmstadt, Alemanha). Foram utilizadas palhetas de 0,25 mL (Minitube, Tiefenbach/Landshut) como recipiente das amostras a serem criopreservadas. Todas as amostras foram diluídas no meio de congelamento na proporção de 1:3 (62,5 µL sêmen e 187,5 µL meio de congelamento). As palhetas foram congeladas primeiramente em um recipiente de vapor de nitrogênio (Dry-Shipper MVE SC4/2 V, Genex, Toronto, Canadá) a -180°C por 18h (CAROLSFELD *et al.*, 2003). As amostras coletadas foram posteriormente transferidas para um tanque criogênico (MVE Millenium 2000, Genex, Toronto, Canadá).

As palhetas permaneceram 6 meses no tanque de congelamento e então descongeladas em banho maria a 25°C por 10s (ADAMES *et al.*, 2015). Imediatamente cada palheta foi dispensada em um tubo plástico (1,5 mL). As amostras foram diluídas em 1000 µL de extensor NaCl (325 mOsm kg<sup>-1</sup>; pH 7,6; 24 °C; diluído em água destilada; Synth, Diadema, Brasil) seguindo o protocolo descrito por França *et al.* (2022). Então fixado uma alíquota de 1µL de sêmen de cada amostra utilizada em formol-salino-tamponado na proporção de 1:100 (1µL de sêmen criopreservado para 99 µL formol-salino-tamponado).

As amostras fixadas foram coradas com Rosa de Bengala a 4% (STREIT JR., *et al.*, 2004), na proporção de 10:100, utilizando 10 µL de solução corante para 90 µL de amostra de sêmen fixada. As lâminas histológicas foram confeccionadas através do método de gota escorrida com utilização de 10 µL de solução corada e duas gotas por lâmina. Foram confeccionadas duas lâminas por tratamento, desta forma que cada contagem iniciada não será na mesma lâmina já contada.

As lâminas dos tratamentos foram analisadas através de fotos tiradas com a câmera de um Iphone 8, com 12 megapixels. As fotos das amostras foram tiradas em um microscópio óptico (NIKON ECLIPSE, E-200) na objetiva de 40x. Foi utilizado o software ImageJ para auxiliar na visualização das fotos e usado um contador de células sanguíneas para contabilizar cada espermatozoide visualizado.

As análises das anormalidades foram adaptadas da contagem de células espermáticas descrita por Miliorini *et. al.*, (2011).

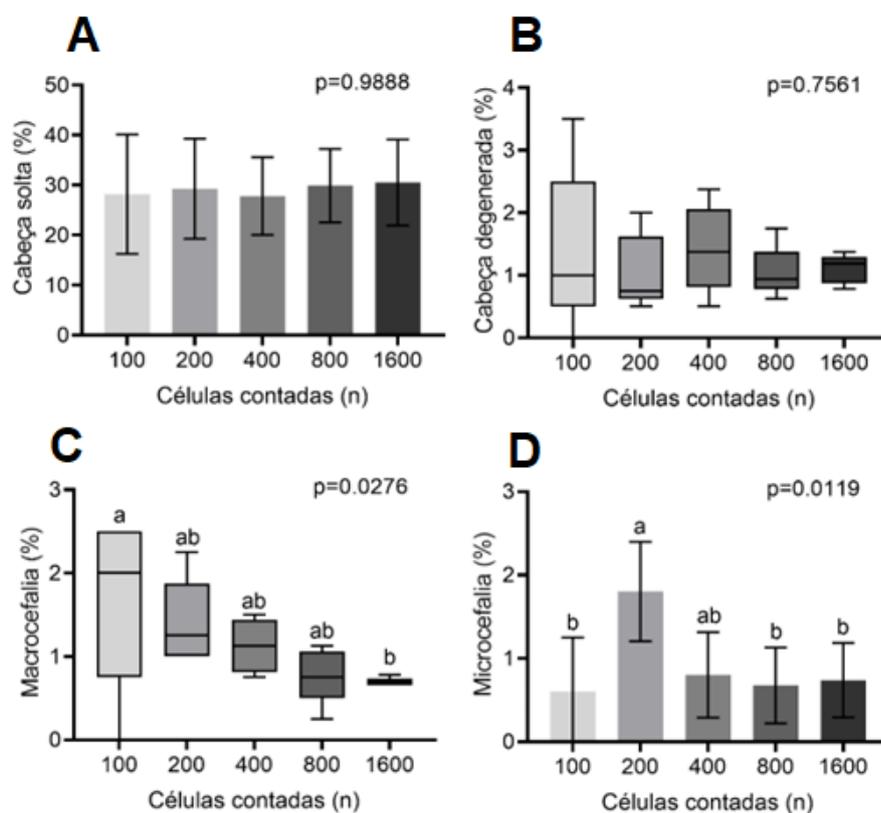
### 3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística os dados percentuais obtidos para as variáveis de morfologia espermática, foram submetidos a teste de homogeneidade de Bartlett e de normalidade de Shapiro Wilk. Os dados que apresentaram distribuição normal foram analisados por meio de análise de variância de uma via (One-Way ANOVA), seguido de teste de Tukey quando observado diferença entre os grupos. Para os dados não paramétricos, os dados foram analisados por meio de análise de Kruskal Wallis, seguido de teste de Dunn quando observado diferença entre os grupos. Todas as análises foram realizadas considerando um nível de significância de 5%. A análise foi realizada no software estatístico GraphPad Prism 9.3.0.

#### 4. RESULTADOS

Para as anormalidades de cabeça não houve diferença significativa entre os tratamentos para cabeça solta (Figura 2A) e cabeça degenerada (Figura 2B). Entretanto, para a macrocefalia (Figura 2C), ocorreu diferença significativa entre os tratamentos, onde a contagem de 100 espermatozoides apresentou maior porcentagem dessa anormalidade ( $2 \pm 1,03\%$ ) quando comparado a contagem de 1600 espermatozoides ( $0,68 \pm 0,05\%$ ). Houve diferença significativa entre os tratamentos para o percentual de espermatozoides com microcefalia (Figura 2D). A contagem de 200 espermatozoides observou maior percentual de microcefalia ( $1,5 \pm 0,59\%$ ), quando comparado aos tratamentos onde foram avaliados 100 ( $0,5 \pm 0,65\%$ ), 800 ( $0,62 \pm 0,45\%$ ) e 1600 ( $0,56 \pm 0,44\%$ ) Apesar disso, pode-se observar que a porcentagem média de aparecimento das anormalidades de macrocefalia e microcefalia, não passam de 3% de ocorrência em toda amostragem analisada para as anormalidades.

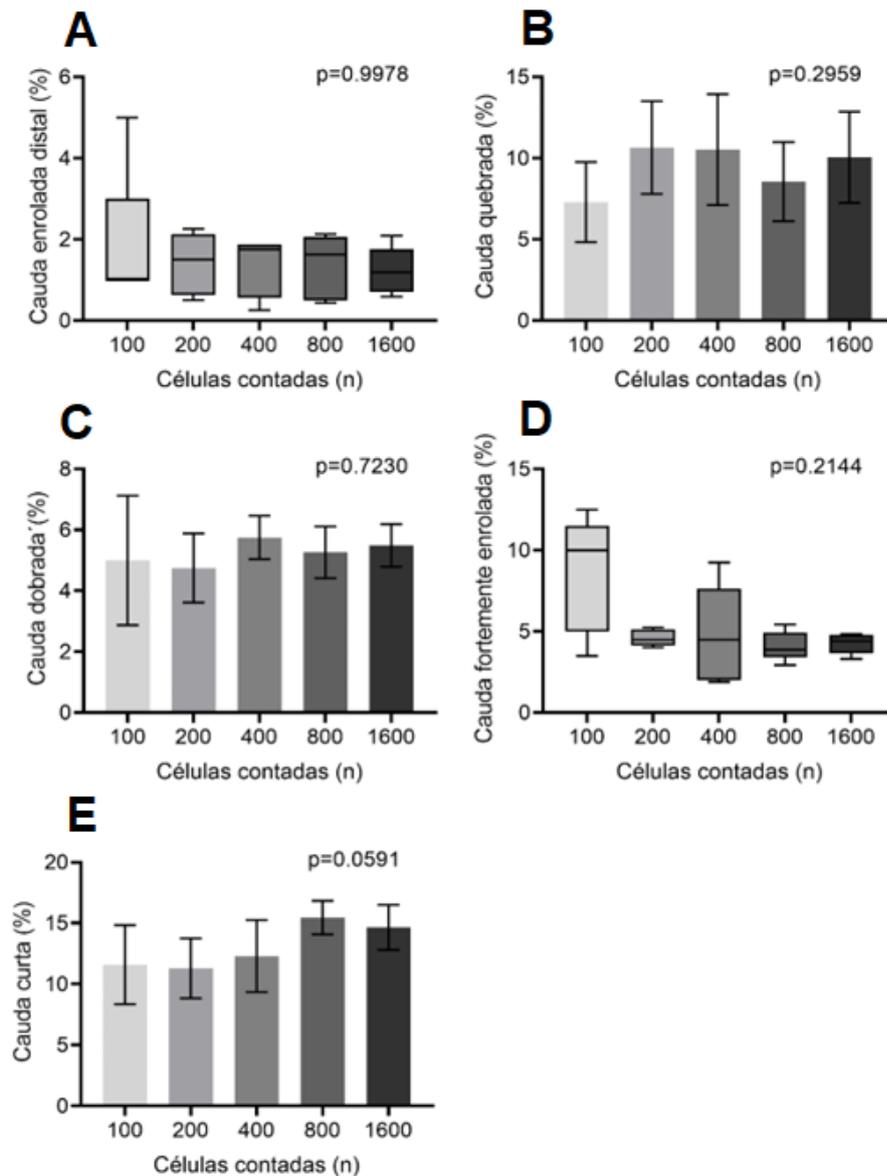
**Figura 2** – Anormalidades de cabeça.



Legenda: Porcentagem de ocorrência de anormalidade de cabeça para os cinco tratamentos de células avaliadas (100, 200, 400, 800, 1600), sendo a anormalidade espermática cabeça solta (A), cabeça degenerada (B), macrocefalia (C) e microcefalia (D). Fonte: autor.

Na avaliação das anormalidades de cauda, não houve diferença entre os tratamentos para nenhuma das anormalidades avaliadas, como podemos observar para cauda enrolada distal (Figura 3A), cauda quebrada (Figura 3B), cauda dobrada (Figura 3C), cauda fortemente enrolada (Figura 3D) e cauda curta (Figura 3E).

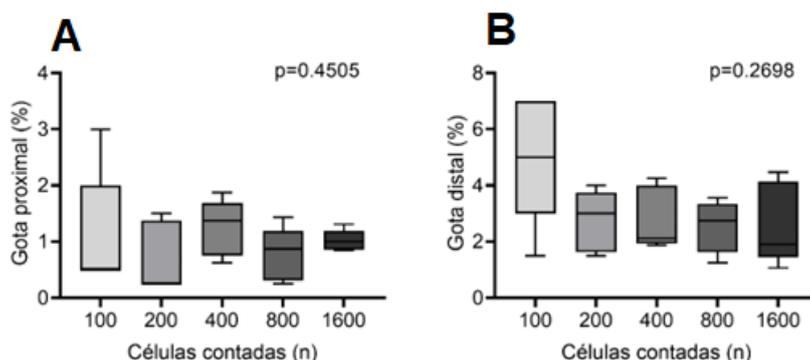
**Figura 3** – Anormalidades de cauda.



Legenda: Porcentagem de ocorrência de anormalidades de cauda para os cinco tratamentos de células avaliadas (100, 200, 400, 800, 1600), sendo a anormalidade espermática cauda enrolada distal (A), cauda quebrada (B), cauda dobrada (C), cauda fortemente enrolada (D), cauda curta (E). Fonte: autor.

Na avaliação das anormalidades por gotas citoplasmáticas (Figura 4), não houve diferença estatística entre os tratamentos, como podemos observar para gota proximal (Figura 4A) e gota distal (Figura 4B).

**Figura 4** – Anormalidades por gotas citoplasmáticas.



Legenda: Porcentagem de ocorrência de anormalidade por gotas citoplasmáticas para os cinco tratamentos de células avaliadas (100, 200, 400, 800, 1600), sendo a anormalidade espermática gota proximal (A) e gota distal (B). Fonte: autor.

Apesar de não observamos grandes diferença entre os grupos experimentais, quanto maior o número de células avaliadas, maior será a precisão do resultado obtido. Entretanto, não há necessidade de se avaliar 1600 células para obtenção de um resultado preciso. Notou-se uma redução na variação dos resultados em algumas anormalidades (Tabela 2), quando se aumenta o N a partir de 100 células avaliadas, o que indica que quando possível, o pesquisador pode aumentar o número de células avaliadas para aumentar a precisão das respostas.

**Tabela 2** – Tendência da diminuição do coeficiente de variação para anormalidades espermáticas de *Rhamdia quelen* quando se aumenta o N de células espermáticas avaliadas.

Anormalidades	Número de células avaliadas				
	100	200	400	800	1600
Cauda enrolada distal	99,38%	54,46%	55,25%	59,16%	47,80%
Cauda dobrada	42,43%	23,83%	12,39%	16,10%	12,74%

Cabeça solta	42,34%	34,09%	27,90%	24,53%	28,09%
Gota citoplasmática proximal	98,54%	88,93%	40,00%	61,58%	18,35%
Macrocefalia	60,99%	37,03%	28,33%	43,28%	7,40%
Microcefalia	108,70%	33,16%	64,04%	67,22%	60,49%

Legenda: Porcentagem do coeficiente de variação para anormalidades espermática de *Rhamdia quelen* em diferentes quantidades totais de anormalidades espermáticas avaliadas, estes espermatozoides, dos quais passaram por criopreservação. Trat. 1 (tratamento de 100 espermatozoides avaliados); Trat. 2 (tratamento de 200 espermatozoides avaliados); Trat. 3 (tratamento de 400 espermatozoides avaliados); Trat. 4 (tratamento de 800 espermatozoides avaliados); Trat. 5 (tratamento de 1600 espermatozoides avaliados);

Em alguns resultados obtidos, o coeficiente de variação não repetiu a tendência demonstrada na Tabela 2, onde o coeficiente de variação deve diminuir a partir de 100 células espermáticas avaliadas. Em algumas variáveis, o aumento do número de células analisadas não reduziu a variação dos dados, como podemos observar na Tabela 3.

**Tabela 3** - Coeficiente de variação dos dados obtidos para anormalidades espermáticas que não seguem a tendência da demonstrada na Tabela 2.

Anormalidades	Número de células avaliadas				
	100	200	400	800	1600
Cauda fortemente enrolada	41,60%	11,27%	64,06%	22,27%	14,57%
Macrocefalia	60,99%	37,03%	28,33%	43,28%	7,40%
Microcefalia	108,70%	33,16%	64,04%	67,22%	60,49%
Gota citoplasmática proximal	98,54%	88,93%	40,00%	61,58%	18,35%

Legenda: Porcentagem do coeficiente de variação para anormalidades espermática de *Rhamdia quelen* em diferentes quantidades totais de anormalidades espermáticas avaliadas, estes espermatozoides, dos quais passaram por criopreservação. Trat. 1 (tratamento de 100 espermatozoides avaliados); Trat. 2 (tratamento de 200 espermatozoides avaliados); Trat. 3 (tratamento de 400 espermatozoides avaliados); Trat. 4 (tratamento de 800 espermatozoides avaliados); Trat. 5 (tratamento de 1600 espermatozoides avaliados);

Observa-se na Tabela 3, que a avaliação de 400 células, da anormalidade cauda fortemente enrolada, o valor do coeficiente de variação (64,06%) foi maior em comparação aos grupos. Para macrocefalia, ocorreu a variação da tendência na avaliação de 800 células (43,28%), com o aumento do coeficiente de variação seguido de um decréscimo do coeficiente de variação quando foi avaliado 1600 células (7,4%). Já para microcefalia, este fato acontece quando foram avaliadas 200 células (33,16%), onde ocorre um decréscimo

em relação ao coeficiente de variação da avaliação de 100 células (108,70%), seguido de um acréscimo dos valores de coeficiente de variação quando foram avaliadas 400 (64,04%), 800 (67,22%) e 1600 células (60,49%). Este fato também ocorre para a anormalidade espermática avaliada de gota citoplasmática proximal, onde há um acréscimo do coeficiente de variação com a análise de 800 células (61,58%), em relação ao valor observado na avaliação de 400 espermatozoides (40%).

## 5. DISCUSSÃO

A avaliação da morfologia espermática de peixes é importante para o estudo da biologia reprodutiva e para o desenvolvimento de técnicas relacionadas à conservação de espécies nativas (COSTA et al, 2022).

Em nosso estudo, observamos que a alteração de número de células analisadas por lâmina não influenciou significativamente os resultados obtidos para a maioria das variáveis, com exceção da macrocefalia e microcefalia, que foram influenciadas pelo número de células contadas. Porém, a ocorrência destas duas anormalidades não passa de 3% do total de células avaliadas, sendo assim, não possui grande impacto, quando comparamos com a anormalidade de cabeça solta, que teve a maior média geral de ocorrência de  $30,54 \pm 8,58\%$  no tratamento de 1600 células avaliadas. A cabeça solta, pela sua grande ocorrência, pode ter maior influência na motilidade e na cinética do espermatozoide, em comparação a outras anormalidades, e com isso, poderá influenciar negativamente a capacidade de fecundação.

A variação dos dados observados quando são analisados diferentes números de espermatozoide por amostra, pode ser explicado, pela existência de campos concentrados de anormalidades espermáticas. Numa lâmina histológica confeccionada contendo sêmen criopreservado de *Rhamdia quelen*, fixado em formol-salino tamponado e posteriormente corado com Rosa de Bengala (4%), como foi utilizado neste trabalho, foi verificado a existência de campos na lâmina onde irá ocorrer um predomínio maior de presença de certas anormalidades espermáticas em relação as outras ali presentes. Entretanto, também haverá casos em que a anormalidade predominante em um local da lâmina, pode ser mais escassa em outro local, influenciando na avaliação dependendo dos campos de visão que o pesquisador avaliar. Portanto, o pesquisador pode obter valores variados de anormalidades espermáticas em suas avaliações de morfologia espermática. Contudo, não se sabe ainda se existe predomínio de ocorrência de uma anormalidade em relação a outra.

Dessa forma, as inferências que podem ser feitas desse estudo, indicam que não apenas a quantidade de células avaliadas por lâmina deve ser padronizada e otimizada, mas também o método de avaliação, como áreas de observação e orientação da contagem. Essas adaptações das metodologias clássicas e já publicadas de avaliação, irão auxiliar na maior precisão das análises, reduzindo o viés e aumentando a confiabilidade dos resultados.

## 6. CONCLUSÃO

Recomenda-se a avaliação de 200 células espermáticas aos autores que forem realizar análise espermática em peixes através da morfologia espermática. Pois essa metodologia irá proporcionar uma variação de dados adequada, menor do que a observada com avaliação de 100 células. Quanto maior for o N escolhido pelo pesquisador, maior será a precisão de seus resultados.

Portanto, os trabalhos realizados até o presente momento contendo análise de morfologia espermática em peixes, contado um N a partir de 200 células são válidas. Além disso, as referências e os protocolos atuais para definição de anormalidades se repetiram neste trabalho, podendo também ser validados.

Para os campos concentrados de anormalidades espermáticas, estes devem ser mais amplamente estudados de modo a verificar se existem predomínios de certas anormalidades espermáticas em relação a outras, como também se existe relação entre a metodologia de confecção de lâmina histológica, do corante, do fixador de células, como também do método de avaliação que o pesquisador pode adotar para a técnica de morfologia espermática.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMES, M.S., de TOLEDO, C.P.R., NEUMANN, G., BUZZI, A.H., BURATTO, C.N., PIANA, P.A., BOMBARDELLI, R.A., 2015. Optimization of the sperm: oocyte ratio and sperm economy in the artificial reproduction of *Rhamdia quelen* using fructose as a sperm motility modulator. **Animal Reproductio. Science**. 161, 119–128. [https://doi.org/ 10.1016/j.anireprosci.2015.08.014](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.08.014).

BILLARD, R., COSSON, J., PERCHEC, G., & LINHART, O. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. **Aquaculture**, 129(1-4), 95-112, 1995.

BILLARD, R. *et al.* Motility analysis and energetics of the Siberian sturgeon *Acipenser baerii* spermatozoa. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 15, n. 4-5, p. 199-203, 1999.

BORGES, A. *et al.* Biochemical composition of seminal plasma and annual variations in semen characteristics of jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, Pimelodidae). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 31, n. 1, p. 45-53, 2005.

BOSSEMEYER, I.M.K. **Mudanças morfológicas no ovário de *Rhamdia sapo* (Pimelodidae) relacionadas com o ciclo reprodutivo**. Santa Maria – RS, 1976. 48 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria, 1976.

BUSTAMANTE-GONZÁLEZ, J. D. *et al.* Methodologies for spermatic evaluation in teleost. **Int. J. of Aquatic Science**, v. 7, n. 2, p. 95-106, 2016.

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

CALDAS, J. S.; GODOY, L. Sperm characterization of the endangered Amazonian fish *Hypancistrus zebra*: basic knowledge for reproduction and conservation strategies. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 204, p. 117-124, 2019.

CHIPPARI-GOMES, A.R. **Temperaturas letais de larvas e alevinos de jundiá, *Rhamdia quelen* (QUOY & GAIMARD, 1824 – PISCES, PIMELODIDAE)**. Santa Maria – RS, 1998. 70 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Curso de Pósgraduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria, 1998.

COSTA, B. B. **Efeito da adição dos antioxidantes cisteína e glutamina ao diluidor de congelamento de sêmen de jundiá (*Rhamdia quelen*)**. Porto Alegre – RS. Dissertação de (Mestrado em Zootecnia) – Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2018.

COSTA, B. B. *et al.* Cryopreservation-induced morphological changes in the sperm of South American silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Journal of Applied Ichthyology**, v. 35, n. 4, p. 987-993, 2019.

COSTA, Bruna Bitencourt da. **A relação da morfologia espermática com a cinética dos espermatozoides de *Danio rerio* e *Brycon hilarii***. 2022.

DZYUBA, V.; COSSON, J. Motility of fish spermatozoa: from external signaling to flagella response. **Reproductive Biology**, Olsztyn, v. 14, n. 3, p. 165-175, 2014.

DZYUBA, B. *et al.* Energetics of fish spermatozoa: the proven and the possible. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 472, p. 60-72, 2017.

FIGUEROA, E. *et al.* Technologies used in the study of sperm function in cryopreserved fish spermatozoa. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 47, n. 6, p. 1691-1705, 2016.

FELIZARDO, V.O.; MELLO, R.A.; MURGAS, L.D.S.; ANDRADE, E.S.; DRUMOND, M.M.; ROSA, P.V. Effect of cryopreservant combinations on the motility and morphology of curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm. **Animal Reproduction Science**, 122:259-263, 2010a.

FERREIRA, Arthur Augusto, *et al.* "Avaliação qualitativa e quantitativa do sêmen de jundiá, *Rhamdia quelen*." **Boletim do Instituto de Pesca** 27.1 (2001): 57-60.

FOGLIDA SILVEIRA, W.; KAVAMOTO, E. T.; NARAHARA, M. Y. Avaliação da qualidade e criopreservação em forma de "pellets" do sêmen do bagre, *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, 12 (4):7-1, 1985.

FRANÇA, T. S. *et al.* Post-thaw dilution of *Rhamdia quelen* sperm improves the reproductive success. **Animal Reproduction Science**, p. 107018, 2022.

GALO, J. M., STREIT Jr., D. P., SIROL, R. N., RIBEIRO, R. P., DIDMAYER, M., ANDRADE, V. X. L., & EBERT, A. R. (2011). Spermatic abnormalities of piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849) after cryopreservation. **Brazilian Journal of Biology**, 71, 693-699.

GOMES, L.C., GOLOMBIESKI, J.I., GOMES, A.R.C. & BALDISSEROTTO, B. 2000. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). **Ciência Rural** 30(1):179-185.

GRACIA, L. F. G. **Alterações morfológicas dos espermatozoides de peixes**. 2011. Trabalho de Conclusão de Curso. – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, 2011.

GUEDES, D. S. **Contribuição ao estudo da sistemática e alimentação de jundiás (*Rhamdia spp*) na região central do Rio Grande do Sul (Pisces, Pimelodidae)**. Santa

Maria – RS, 1980. 99p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria, 1980.

ISLAM, M. S; AKHTER, T. Tale of fish sperm and factors affecting sperm motility: a review. **Advances in Life Sciences**, v. 1, n. 1, p. 11-19, 2011.

KAVAMOTO, E. T. et al. Anormalidades morfológicas nos espermatozoides do curimatá, *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881) (Osteichthyes, Characiformes, Prochilodontidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 25, p. 61-66, 1999.

**Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Volume VI – Peixes /** -- 1. ed. -- Brasília, DF : ICMBio/MMA, 2018.

MARCHIORO, M. I., & BALDISSEROTTO, B. (1999). Sobrevivência de alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard, 1824) à variação de salinidade da água. **Ciência Rural**, 29, 315–318. <https://doi.org/10.1590/S0103-84781999000200021>

MATAVELI, M. *et al.* Avaliação da qualidade do sêmen de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagem Chitralada, suplementada com diferentes concentrações de vitamina C. **Boletim do instituto de Pesca**, v. 33, n. 1, p. 1-7, 2018.

MEURER, S., ZANIBONI FILHO, E. Hábito alimentar do jundiá *Rhamdia quelen* (Pisces, Siluriformes, Pimelodidae), na região do alto rio Uruguai. In: XII ENCONTRO BRASILEIRO DE ICTIOLOGIA, São Paulo, SP, 1997. Anais. São Paulo: SBI, 1997. 420 p. p. 29.

MILIORINI, Alessio Batista. **Ativadores e concentrações de metanol e dimetilsulfóxido na qualidade do sêmen criopreservado de curimba (*Prochilodus lineatus*)**. 2006. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, MG, 2006.

MILIORINI, A. B., MURGAS, L. D. S., ROSA, P. V., OBERLENDER, G., PEREIRA, G. J. M., & da COSTA, D. V. A morphological classification proposal for curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm damages after cryopreservation. **Aquaculture Research**, 42(2), 177-187, 2011.

MURGAS, L.D.S.; FELIZARDO, V.O.; FERREIRA, M.R.; ANDRADE, E.S.; VERAS, G.C. Importância da avaliação dos parâmetros reprodutivos em peixes nativos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal.**, Belo Horizonte, v. 35, n. 2, p. 186-191, 2011.

PASTRO, DC, *et al.* Use of molecular techniques for the analysis of the microbiological quality of fish marketed in the municipality of Cuiabá, Mato Grosso, Brazil. **Food Science and Techonology**, Campinas, v. 39 (Supl. 1), p. 146-151, 2019.

RAMÍREZ-MERLANO, J. A.; MEDINA-ROBLES, V. M.; CRUZ-CASALLAS, P. E. Crioconservación seminal de bagre rayado *Pseudoplatystoma metaense* (Teleostei,

Pimelodidae), bajo diferentes protocolos de congelación. **Archivos de medicina veterinaria**, v. 43, n. 2, p. 135-144, 2011.

ROCHA, S., STREIT Jr, D. P., MARQUES, L. S., VARELA Jr, A. S., CORCINI, C. D., & HOSHIBA, M. A. (2018). Toxic effects of mercury chloride on silver catfish (*Rhamdia quelen*) spermatozoa. **Aquaculture Research**, 49(2), 963-968.

SANCHES, E. A., NEUMANN, G., TOLEDO, C. P. R., BOMBARDELLI, R. A., PIANA, P. A., & ROMAGOSA, E. (2013). Temperature and storage period over spermatid parameters of jundiá, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824). **Aquaculture Research**, 44, 534–541.

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

SILVA, J.M.A.; MURGAS, L.D.S.; FELIZARDO, V.O.; PEREIRA, G.J.M.; NAVARRO, R.D.; MELLO, R.A. Características seminais e índices reprodutivos de curimba (*Prochilodus lineatus*) em diferentes períodos reprodutivos. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, 10:668-677, 2009

SILVA, A. C. et al. Caracterização e resfriamento do sêmen de curimatã, *Prochilodus brevis* (Steindachner, 1874). **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, Fortaleza, v. 8, n. 3, p. 105-129, 2014.

STREIT JR, D. P. *et al.* Avaliação de diferentes técnicas para coloração de sêmen de peixes. **Arq. Ciênc. Vet. Zool**, v. 7, n. 2, p. 157-162, 2004.

STREIT JR, Danilo Pedro *et al.* Características qualitativas do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) após indução hormonal. **Bioscience Journal**, v. 22, n. 3, 2006.

STREIT JR, D. P., de OLIVEIRA, A. C., RIBEIRO, R. P., SIROL, R. N., de MORAES, G. V., GALO, J. M., & DIGMAYER, M. Motilidade, vigor e patologias seminal in natura e pós criopreservação de *Piaractus mesopotamicus*. **Boletim do Instituto de Pesca**, 35(2), 159-167, 2009.

STREIT JR, D.P., Biotecnologias aplicas à piscicultura. Workshop sobre jundiá: histórias e perspectivas. Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil. **Ed. Universidade de Passo Fundo**. v. 1. pag. 152-163. 2013.

PEIXEBR. **Anuário da Piscicultura Brasileira – edição 2016**.  
<https://www.peixebr.com.br/anuario-2016/>

PEIXEBR. **Anuário da Piscicultura Brasileira – edição 2021**.  
<https://www.peixebr.com.br/anuario-2021/>

PIAIA, R., RADÜNZ NETO, J. Avaliação de diferentes fontes protéicas sobre o desempenho inicial de larvas do jundiá *Rhamdia quelen*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 27, n. 2, p. 319-323, 1997a.

TUSET, V. M.; TRIPPEL, E. A.; DE MONSERRAT, J. Sperm morphology and its influence on swimming speed in Atlantic cod. **Journal of Applied Ichthyology**, Berlin, v. 24, n. 4, p. 398-405, 2008.

WINEMILLER, K. O., Patterns of variation in life history among South American fishes in seasonal environment. **Oecologia**, 81(2): 225-241, 1989.