

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

RAQUEL SANTOS DOS SANTOS

CARACTERÍSTICAS QUALITATIVAS DO SÊMEN DE JUNDIÁ
(*Rhamdia quelen*) CONTAMINADO COM SANGUE

Porto Alegre

2022

RAQUEL SANTOS DOS SANTOS

**CARACTERÍSTICAS QUALITATIVAS DO SÊMEN DE JUNDIÁ
(*Rhamdia quelen*) CONTAMINADO COM SANGUE**

Dissertação apresentada como requisito para
obtenção do Grau de Mestre em Zootecnia, na
Faculdade de Agronomia, da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Danilo Pedro Streit Jr.

Porto Alegre- RS

Abril, 2022

CIP - Catalogação na Publicação

Santos dos Santos , Raquel
CARACTERÍSTICAS QUALITATIVAS DO SÊMEN DE JUNDIÁ
(Rhamdia quelen) CONTAMINADO COM SANGUE / Raquel
Santos dos Santos . -- 2022.
51 f.
Orientador: Danilo Pedro Streit Jr.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia, Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. Inovação em sistemas de produção animal. I.
Streit Jr, Danilo Pedro, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Raquel Santos Dos Santos
Bióloga

DISSERTAÇÃO

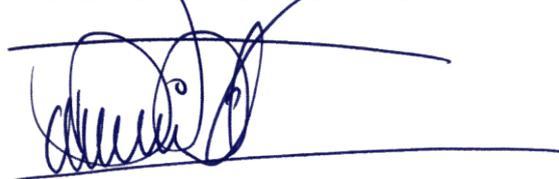
Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

MESTRE EM ZOOTECNIA

Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovada em: 07.04.22
Pela Banca Examinadora

Homologado em:
Por



DANILO PEDRO STREIT JR.
PPG Zootecnia/UFRGS
Orientador

SERGIO LUIZ VIEIRA
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia



Darci Carlos Fornari
Universidade de Auburn - Alabama/USA



Eduardo Antônio Sanches
UNESP



Jayme Aparecido Povh
UFSM

CARLOS ALBERTO BISSANI
Diretor da Faculdade de Agronomia

Agradecimentos

Durante essa experiência do mestrado, tive a honra de poder contar com várias pessoas que me forneceram subsídio emocional e acadêmico para a realização dessa dissertação, e gostaria de agradecê-los.

Meus pais, que me incentivaram a sempre buscar o conhecimento e apoiaram meus sonhos, embora preocupados e sendo privados de minha presença em muitos momentos importantes para nós. Meus irmãos, por me consolarem nas horas difíceis em que tive dúvidas sobre continuar, me despertando persistência e foco. Eu amo vocês, são a minha força.

Ao Prof. Dr. Danilo Pedro Streit Jr, pela confiança e disposição, sou imensamente grata pelas orientações, pelos conselhos e pela paciência, por dividir um pouco de seu conhecimento e pela força com a qual enfrenta muitas dificuldades pela ciência e por nós, alunos.

À Lis Marques, Rômulo Rodrigues e Tales França e Itamar Cossina, pelas orientações acadêmicas e apoio oferecidos em todos os momentos que precisei, talvez vocês não saibam de fato o quanto me ajudaram nessa experiência, eu serei sempre grata por ter conhecido profissionais tão completos, sem vocês essa dissertação não seria possível.

Aos demais colegas do AQUAM, obrigada pelo companheirismo desde um café cotidiano no laboratório em dias calmos, às madrugadas frias de indução e alimentação das larvas, por estarem engajados comigo nos preparativos dos experimentos realizados, vocês foram cruciais neste trabalho.

Aos amigos que aqui fiz, e aos que mesmo longe, sempre estiveram por perto. Casa amarela, obrigada por me acolher em Porto Alegre e se tornar família aqui.

Agradeço a Universidade Federal do Rio Grande do Sul e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela estrutura e suporte para a realização deste trabalho.

Também agradeço a banca avaliadora desta dissertação, pela disponibilidade, sugestões e contribuições com o aprendizado.

Agradeço infinitamente a Deus, por me ajudar a concluir mais uma meta da minha vida, por estar me guiando e me mostrando os meios para vivenciar o novo e evoluir.

CARACTERÍSTICAS QUALITATIVAS DO SÊMEN DE JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*) CONTAMINADO COM SANGUE¹

Autora: Raquel Santos dos Santos

Orientador: Prof. Dr. Danilo Pedro Streit Jr.

Resumo: No manejo da reprodução artificial de peixes é comum haver contaminação dos gametas devido a liberação de sangue, e o risco de declínio na qualidade das amostras leva ao descarta do material. O objetivo deste estudo, foi avaliar as características qualitativas do sêmen de *R. quelen* contaminado com 5% e 10% de sangue. Para isso, um *pool* de sêmen obtido de 13 machos ($378 \pm 0,31$ g) foi distribuído em dois tratamentos contaminados (5% e 10% de sangue) e controle. Os parâmetros cinéticos do sêmen foram avaliados utilizando o Sistema de Análise Espermática Computadorizada. A Morfologia espermática e a Integridade da membrana foram avaliadas pelos métodos de coloração Rosa de Bengala, e Eosina-Nigrosina, respectivamente. Para a fertilização foi utilizada dose inseminante mínima de 70 mil espermatozoides móveis por oócito, e as taxas de Fertilização, Eclosão e Morfologia larval, foram obtidas com auxílio de contador manual. Foram realizadas sete réplicas em um delineamento inteiramente casualizado, e os dados foram analisados estatisticamente considerando 5% de significância entre os grupos. A porcentagem de espermatozoides móveis observada no grupo controle foi maior ($78,64 \pm 6,90\%$), quando comparada aos grupos com 5% de sangue ($67,83 \pm 7,95$) e 10% de sangue ($68,87 \pm 3,40\%$), porém, não houve diferença nos parâmetros de motilidade (LCV, VAP, VSL, STR, WOB, PROG e BCF = $p > 0,05$). A porcentagem de espermatozoides com morfologia normal foi maior no grupo controle ($81 \pm 3,32\%$), quando comparado ao grupo com 10% de sangue ($72,07 \pm 5,04\%$), enquanto o grupo com 5% de sangue não diferiu dos demais, com $76 \pm 3,19\%$ de espermatozoides normais. Não houve diferença entre os grupos experimentais para integridade de membrana ($p=0,2547$). Também não houve diferença entre os grupos experimentais para taxa de fertilização ($p=0,2808$), taxa de eclosão ($p=0,3451$) e larvas normais ($p=0,4262$). Esses resultados sugerem que a contaminação com 5 ou 10% de sangue não afeta os parâmetros de qualidade e a capacidade de fertilização de *R. quelen*, sendo necessário atenção quanto a dose inseminante.

Palavras-chave: sêmen de peixes, qualidade seminal, hemospermia, motilidade espermática, dose inseminante.

¹ Dissertação de Mestrado em Zootecnia – Inovação em sistemas de produção animal, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (52 p.)
Abril, 2022.

QUALITATIVE CHARACTERISTICS OF JUNDIÁ SEMEN (*Rhamdia quelen*) CONTAMINATED WITH BLOOD²

Author: Raquel Santos dos Santos

Advisor: Prof. Dr. Danilo Pedro Streit Jr.

Abstract: In the process of artificial reproduction of fish, during the collection of gametes blood may be released, causing the contaminated samples to be discarded. The aim of this study was to evaluate the qualitative characteristics of *R. quelen* semen contaminated with 5% and 10% blood. For this, a pool of semen obtained from 13 males (378 ± 0.31 g) was distributed in two contaminated treatments (5% and 10% blood) and control. Semen kinetic parameters were evaluated using the Computerized Sperm Analysis System. Rose Bengal and Eosin-Nigrosin staining methods, respectively evaluated sperm Morphology and Membrane Integrity. For fertilization, a minimum inseminating dose of 70,000 mobile sperm per oocyte was used, and the rates of fertilization, hatching and larval morphology were obtained with the aid of a manual counter. Seven replicates were performed in a completely randomized design, and the data were statistically analyzed considering a 5% significance level between the groups. The percentage of motile spermatozoa observed in the control group was higher ($78.64 \pm 6.90\%$), when compared to the groups with 5% blood (67.83 ± 7.95) and 10% blood (68.87 ± 7.95). 3.40%), however, there was no difference in the motility parameters (LCV, VAP, VSL, STR, WOB, PROG and $BCF = p > 0.05$). The percentage of sperm with normal morphology was higher in the control group ($81 \pm 3.32\%$), when compared to the group with 10% blood ($72.07 \pm 5.04\%$), while the group with 5% blood did not differed from the others, with $76 \pm 3.19\%$ of normal sperm. There was no difference between the experimental groups for membrane integrity ($p=0.2547$). There was also no difference between the experimental groups for fertilization rate ($p=0.2808$), hatching rate ($p=0.3451$) and normal larvae ($p=0.4262$). These results suggest that contamination with 5 or 10% of blood does not affect the quality parameters in order to nullify the fertilization capacity and reproductive efficiency of fresh semen of *R. quelen*, and it also alert to the trend of lower mobile cell rates, requiring attention to the motile sperm:oocyte ratio.

Keywords: Fish semen; hemospermia, spermatozoa motility, sperm quality, sperm:oocyte ratio.

² Master of Science dissertation in Animal Science –Inovação em sistema de produção animal, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (52 p.) Abril, 2022.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1 Situação atual da piscicultura no Brasil	11
2.1. Reprodução de espécies nativas em cativeiro	11
2.2. Contaminação biológica do sêmen de peixes.....	13
2.4 Contaminação biológica do sêmen de peixes com sangue.....	14
2.5 Aspectos da qualidade e métodos de avaliação seminal em peixes	18
2.6 Jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>).....	20
CAPÍTULO 2- Artigo redigido de acordo com as normas do periódico Aquaculture.	22
1. INTRODUCTION	23
2. MATERIAL AND METHODS	24
2.1 Ethics statement.....	24
2.2 Initial milt assessment and pool preparation	26
2.3 Experimental design.....	26
2.4 Blood collection and sample contamination	27
2.5 Milt assessments.....	27
2.5.1 Concentration sperm	27
2.5.2 Kinetics parameters (CASA)	27
2.5.3 Morphology spermatozoa	28
2.5.4 Plasma Membrane Integrity	28
2.5.5 Fertilization, hatching, and normal larvae	29
2.6 Statistical analysis	29
3. RESULTS	30
3.1 Aspects of the samples and Concentration milt	30
3.2 Kinetics parameters milt (CASA)	30
3.3 Morphology spermatozoa.....	32
3.4 Plasma Membrane Integrity	34
3.5 Fertilization, hatching, and normal larvae.....	35
4. DISCUSSION	36
Acknowledgements	40
Competing interests statement	40
Funding sources	40
REFERENCES	41
CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
REFERÊNCIAS	48
VITA	52

1. INTRODUÇÃO

Em peixes a qualidade do sêmen é um fator determinante para o sucesso reprodutivo, e no Brasil a produção pesqueira é atualmente a maior entre todos os países da América do sul. A reprodução artificial de peixes é uma atividade frequente tanto em laboratórios de pesquisas, quanto no setor produtivo, e as técnicas utilizadas no manejo reprodutivo podem ser divididas em duas: indução ambiental, consiste na simulação dos fatores abióticos em criadouros, e indução hormonal, consiste na administração de hormônios estimulantes da maturação final e espermiação/ovulação dos peixes.

A indução hormonal permite a coleta dos gametas pela papila urogenital através do procedimento chamado extrusão, massagem abdominal de baixa pressão ao longo dos ductos seminíferos, no sentido céfalo-caudal do peixe. Durante a extrusão do sêmen, é comum ocorrer contaminação dos espermatozoides através da eliminação de urina, fezes, ou sangue, e pode afetar negativamente a qualidade seminal, comprometendo, portanto, a utilização do material coletado, sendo então descartado (CIERESZKO *et al.*, 2004; MARQUES *et al.*, 2021).

Essa contaminação está relacionada com a falta de padronização na técnica de coleta para espécies nativas (CAROLSFELD *et al.*, 2003), com as distintas morfologias gonadais e até mesmo com volume de sêmen produzido pela espécie. Espécies que produzem e liberam maiores volumes de sêmen, apresentam menores chances de liberar sangue no momento de coleta, e caso aconteça a amostra poderá ser substituída com uma nova coleta, é o que ocorre por exemplo com as espécies *Rhamdia quelen* e *Brycon orbignyanus*, pois liberam um volume relativamente alto de sêmen na extrusão (> 5 ml).

Por outro lado, há espécies nativas que liberam um baixo volume de sêmen, e para a obtenção dos espermatozoides evitando contaminação é necessário o sacrifício dos peixes para extração dos testículos. É o que ocorre com o *Leporinus macrocephalus* e *Zungaro jahu*, ambas ameaçadas de extinção em vários estados do Brasil (VIVEIROS e GODINHO, 2009; MACHADO *et al.*, 2008). O sacrifício desses peixes com status ameaçado intensificam a necessidade de medidas que mitiguem tal situação, visto que há muitas outras espécies na mesma condição de risco em todo o mundo (PALACIOS-ABRANTES *et al.*, 2020).

A influência da contaminação do sêmen com sangue sobre a eficiência reprodutiva dos peixes ainda não está bem estabelecida. Pesquisadores mostraram que essa condição levou ao declínio nos parâmetros de motilidade e fertilização (BOBE e LABBÉ, 2008). No entanto há também observações em que a contaminação com sangue não influenciou nesses parâmetros,

ou influenciou apenas em amostras que foram criopreservadas (MARQUES *et al.*, 2021; CIERESZKO *et al.*, 2004). Tais resultados sugerem ainda que pode haver uma relação proporcional entre o nível de contaminação e o declínio nas variáveis de produção, nesse contexto, estudos pioneiros apontam que a contaminação com baixas concentrações de sangue não influenciam nos parâmetros de qualidade do sêmen dos peixes (SATTERFIELD, 1995; BOWEN *et al.*, 1986).

Diante da inconsistência quanto à influência do sangue nos parâmetros de qualidade do sêmen e na prole, o material coletado é imediatamente descartado sendo necessário uma nova coleta, ou partindo-se para outros meios de obtenção dos gametas, como sacrifício dos animais, o que impacta de forma direta tanto na diversidade biológica, agravando a situação de espécies em risco, quanto nos esforços financeiros aplicados pelos piscicultores e instituições para obtenção e manutenção de matrizes.

Ademais, no presente estudo optamos por utilizar um animal nativo com status de conservação não ameaçado para então subsidiar aspectos da reprodução artificial utilizando sêmen contaminado com sangue. O jundiá-cinza (*Rhamdia quelen*) compõe um grupo de peixes estabelecidos como modelos experimentais no país e está presente em várias linhas de pesquisa (BRASIL, 2019), a espécie se destaca no setor comercial, possui fácil manejo e reprodução artificial bem estabelecida fora de seu hábitat natural. Nesse contexto, o objetivo do nosso estudo é fornecer respostas sobre a presença do sangue no sêmen e suas consequências na reprodução, através de avaliação das características qualitativas do sêmen de *R. quelen* contaminado com 5% e 10% de sangue.

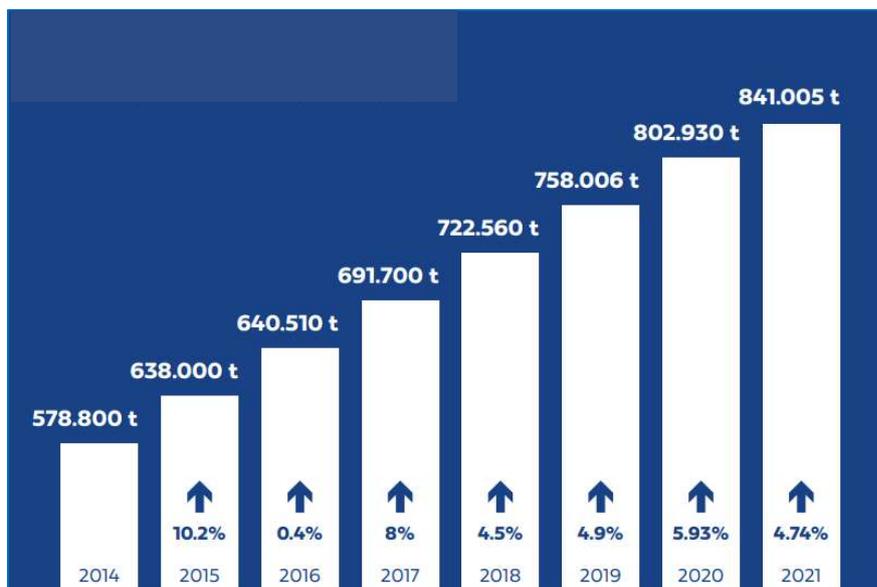
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Situação atual da piscicultura no Brasil

O consumo de peixe no mundo tem sido uma pauta importante, visto que a proteína do pescado implementa uma dieta saudável o consumo humano tem aumentado e nota-se o aprimoramento das técnicas usadas neste manejo, tendo sido identificada uma rápida melhoria da situação de certas populações de peixes, como resultado de uma melhor gestão da pesca.

De acordo com os últimos relatórios da FAO (2018, 2020) e levantamentos feitos pelo IBGE e PeixeBR em 2022, o Brasil é destaque mundial na produção de peixe. O país produziu 841.005 toneladas de peixes em 2021, e mantém média de crescimento de 5,6% a cada ano, o que não é observado em outro setor de produção de proteína animal (Fig.).

Figura 1. Produção do pescado cresce 4,74% em 2021, acumulando 45% de aumento desde 2014.



Fonte: Anuário PeixeBR, 2022.

2.1. Reprodução de espécies nativas em cativeiro

Há uma grande diversidade de espécies nativas da América do Sul, classificadas como espécies neotropicais, que por sua vez, apresentam diferentes estratégias reprodutivas, necessitando de condições específicas para sua reprodução (GALO *et al.*, 2015).

Algumas dessas espécies ao identificar a chegada da estação reprodutiva fazem longas jornadas, vencendo obstáculos naturais, tais como cachoeiras e corredeiras, enfrentam também os obstáculos impostos pelo homem, tais como barragens hidrelétricas. Este fenômeno é denominado migração/piracema e é biologicamente complexo e necessário para o desenvolvimento e maturação dos gametas nesses peixes, possibilitando a desova, ou seja a reprodução, e se iniciam devido a sinalizadores ambientais naturais recebidos pelos peixes, como chuvas, fotoperíodo e temperatura (GODINHO *et al.*, 2007; BARBIERI *et al.*, 2000).

Como exemplo de espécies neotropicais migradoras podemos citar dourados, pacus, curimatás, tambaquis, tabaranas, dentre outras. Entretanto, outras espécies como lambari, traíras, pirarucus, tucunarés, carás e tilápias se reproduzem em águas paradas (ambientes lênticos). Essa diferença no comportamento reprodutivo classifica os peixes em dois tipos, espécies sedentárias e migradoras, ainda que algumas espécies possam apresentar padrão intermediário.

Entretanto, as espécies migradoras não reproduzem naturalmente fora de seu ambiente natural, pois em cativeiro não existe estímulo para a resposta endócrina apropriada que leve à maturação final das gônadas, havendo apenas um desenvolvimento parcial destas (MURGAS *et al.*, 2011). Para concluir essa maturação, é necessária intervenção artificial, por meio da simulação de condições ambientais favoráveis à reprodução, e utilização de hormônios específicos (RIBEIRO, MOREIRA, 2014), como por exemplo, o extrato bruto de hipófise de carpa, considerado o mais comum neste manejo.

A indução hormonal permite a liberação e coleta dos gametas através do procedimento chamado extrusão, que consiste em uma massagem abdominal de baixa pressão, no sentido céfalo-caudal do peixe (VIVEIROS, GODINHO, 2009). Muito embora a técnica de reprodução induzida tenha sido descoberta desde a década de 30 no processo de desova artificial com o uso de hipofisção (IHERING, WRIGHT, 1935), a sua popularização ocorreu no país no fim dos anos 70. Todavia, o seu desenvolvimento continua em ritmo lento frente a outras atividades relacionadas à piscicultura de espécies nativas.

No Brasil, o hormônio mais utilizado para a indução da reprodução pela maturação final de peixes é o extrato bruto de hipófise de peixes maduros. A indução hormonal com extrato hipofisário. Esse manejo também pode ser utilizado para aumentar a produção seminal, antecipar o período reprodutivo, restringi-lo ou mesmo sincronizar a reprodução de um lote de matrizes (ANDRADE, YASUI, 2003), permitindo a utilização de um menor número de machos, e uso racional do plantel de reprodutores (CARNEIRO, 2007). Na realização da reprodução artificial, durante a coleta dos gametas nos machos pelo método de extrusão, é

comum ocorrer contaminação biológica do sêmen através da eliminação de urina, fezes, ou sangue (CIERESZKO *et al.*, 2004).

2.2. Contaminação biológica do sêmen de peixes

A contaminação biológica do sêmen do peixe pode diminuir o sucesso da fertilização, e, se tratando da presença dos contaminantes recorrentes no manejo reprodutivo em cativeiro, fezes e urina são bem abordados na literatura, e é comprovada a presença de efeitos deletérios à qualidade do sêmen na presença de ambos. Essa contaminação ocorre, em geral, sob as condições de coleta por compressão abdominal, pois o ducto espermático e o urinário se juntam no ducto eferente com uma abertura através da papila urogenital (NYNCA *et al.*, 2012).

A contaminação do sêmen de *Sander vitreum* com fezes, por exemplo, reduziu em 2 dias o período de estocagem e o tempo de duração de motilidade de 51 s (controle) para 5,6 segundos (SATTEFIELD, FLICKINGER, 1995). Estudos recomendam que a contaminação por fezes deve ser evitada, para prevenir um significativo decréscimo do período de armazenamento do sêmen refrigerado e do tempo de duração de motilidade, pois altas quantidades de microorganismos saprófitos tais como coliformes, enterobacteriaceae e enterococos podem competir com espermatozoides pelos nutrientes presentes no plasma seminal ou nos diluidores, ou ambos, reduzindo a qualidade do sêmen e, conseqüentemente, a fertilidade (BOONE, HUGHES, 1970). Os microorganismos podem causar um efeito deletério, diretamente, ao causar danos à estrutura espermática (DIEMER *et al.*, 1996) ou, indiretamente, ao estimular a produção de anticorpos que podem agir contra os espermatozoides (KURPISZ, ALEXANDER, 1995).

A contaminação com urina também possui grande influência sobre a qualidade dos espermatozoides de peixes de água doce. A motilidade espermática pode ser ativada durante a coleta liberação de urina e, desta forma, determinar alterações nos índices de fertilização, pois com a motilidade precocemente desencadeada, no momento da fertilização os espermatozoides não possuem mais energia suficiente para atravessar a micrópila e fertilizar os oócitos (BILLARD *et al.*, 1995). A baixa osmolaridade da urina, possivelmente seja responsável por uma ativação precoce dos espermatozoides no trato urinário, o que induz uma redução inicial do armazenamento de energia intracelular (POUPARD *et al.*, 1998) e, caso ocorra uma demora para o sêmen entrar em contato com os oócitos, os espermatozoides podem estar imóveis no momento da fecundação (RURANGWA *et al.*, 2004). No sêmen de tenca (*Tinca tinca*), por exemplo, houve ativação precoce devido a contaminação com urina, ativando em até 100% dos espermatozoides antes do momento da fertilização (LINHART *et al.*, 2003). Mas, de acordo

com os autores, esta ativação precoce pode ser prevenida no momento da coleta, utilizando mas solução imobilizadora, que venha apresentar a mesma osmolaridade do sêmen da espécie.

A contaminação do sêmen de trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) a partir de 0 a 30% de urina, levou à redução da osmolaridade do plasma seminal, de 301 para 203 mOsm/kg de solvente, respectivamente (NYNCA *et al.*, 2012). Em tilápias (*Oreochromis mossambicus*) a urina foi considerada uma boa ativadora da motilidade espermática (LINHART *et al.*, 1999). A redução da motilidade espermática em amostras contaminadas por urina também foi observada em pregado (*Psetta maxima*) (DREANNO *et al.*, 1998) e em *C. carpio* (BILLARD *et al.*, 1995; POUPARD *et al.*, 1998). Segundo Poupard *et al.* (1998), a contaminação do sêmen por urina em peixes, durante a coleta, pode ser evitada por uma leve compressão do abdômen antes de iniciar-se o procedimento e, em seguida, pela introdução de um cateter na bexiga urinária, para recolher a urina remanescente.

Este método pode ser utilizado para coletar sêmen livre de contaminação por urina, sangue e fezes (CABRITA *et al.*, 2001). Em contrapartida, Cierezsko *et al.* (2004) afirmam ser impossível evitar a contaminação com urina pela utilização deste método, mesmo que seja realizado com cuidado. Consideram que, apesar de ser um procedimento minimamente traumático e não causar hemorragia, é possível que ocorra introdução de bactérias no ducto espermático ou ainda produza danos ao ducto espermático do peixe.

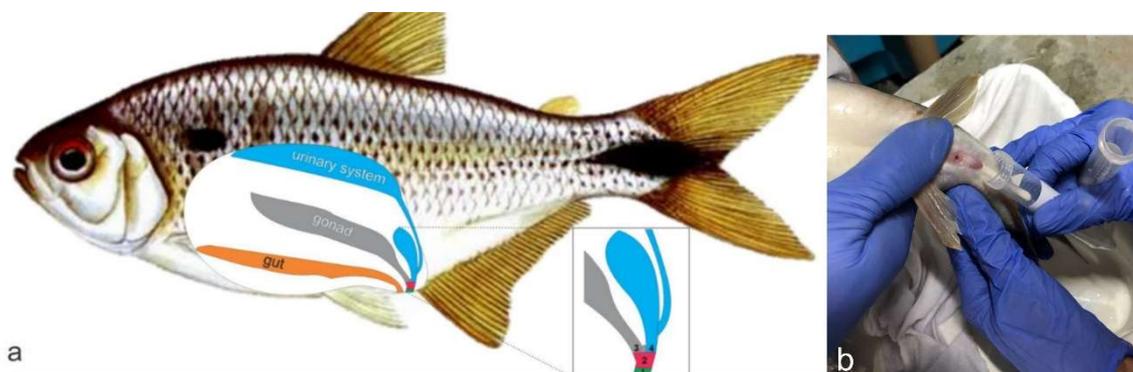
2.4 Contaminação biológica do sêmen de peixes com sangue

Em mamíferos, a presença de sangue visível no sêmen é uma condição diagnosticada como hemospermia, e traz consigo o estigma de queda na fertilidade ou infertilidade, entretanto, muitos estudos estão mostrando que não é mera presença do sangue que afeta negativamente a qualidade seminal dos mamíferos, mas sim o tempo de exposição e a concentração de sangue presente, que mostram uma relação proporcional com declínio nos parâmetros de qualidade seminal (Andrade Jr 2017; Turner *et al.*, 2016).

Entretanto para os peixes, essa contaminação ainda é subjugada, pois não ativa a motilidade, não causa crescimento bacteriano e não há resultados em relação a influência dessa contaminação na prole dos animais. Ainda assim, diante do risco de declínio na qualidade da reprodução, o sêmen coletado quando contaminado com sangue, é imediatamente descartado, o que pode ser notado inclusive, em muitos relatos na literatura.

Esse tipo de contaminação é facilitado devido à organização interna dos ductos seminíferos dos peixes, que variam muito entre as espécies. Na figura abaixo (Fig.2), é possível observar a configuração dos ductos seminíferos e urinários (Fig. 2a), e o momento da coleta do sêmen pelo método de extrusão (Fig. 2b).

Figura 2. Posição da papila urogenital em relação ao corpo do peixe: 1) abertura do ducto Urogenital; 2) divisão do ducto urogenital em ducto genital e urinário; 3) ducto genital; 4) ducto urinário. b) Procedimento de coleta do sêmen em *R. quelen*, método de extrusão dos gametas.



Fonte: a) Siqueira-Silva, 2015; b) Arquivo pessoal.

Essa contaminação está relacionada com a falta de padronização na técnica de coleta para espécies nativas (CAROLSFELD *et al.*, 2003), com as distintas morfologias gonadais e até mesmo com volume de sêmen produzido pela espécie. Espécies que produzem e liberam maiores volumes de sêmen, apresentam menores chances de liberar sangue no momento de coleta, e caso aconteça a amostra poderá ser substituída com uma nova coleta, é o que ocorre por exemplo com as espécies *Rhamdia quelen* e *Brycon orbignyianus*, pois liberam um volume relativamente alto de sêmen na extrusão (> 5 ml).

Por outro lado, há espécies nativas que liberam um baixo volume de sêmen, e para a obtenção dos espermatozoides evitando contaminação é necessário o sacrifício dos peixes para extração dos testículos. É o que ocorre com o *Leporinus macrocephalus* e *Zungaro jahu*, ambas ameaçadas de extinção em vários estados do Brasil (VIVEIROS e GODINHO, 2009; MACHADO *et al.*, 2008). O sacrifício desses peixes com status ameaçado intensificam a necessidade de medidas que mitiguem tal situação, visto que há muitas outras espécies na mesma condição de risco em todo o mundo (PALACIOS-ABRANTES *et al.*, 2020).

Estudos têm mostrado que a contaminação com sangue não causa a ativação dos espermatozoides, como ocorre na presença de urina no sêmen (CIERESZKO *et al.*, 2004; MARQUES *et al.*, 2021), ou proliferação bacteriana, diminuição da motilidade e danos ao DNA dos espermatozoides (SATTEFIELD, 1995; CIERESZKO *et al.*, 2004; MARQUES *et al.*, 2021).

Alguns estudos sugerem ainda, que a adição de sangue ao sêmen de peixes pode aumentar a duração da motilidade em amostras armazenadas em resfriamento, (SATTEFIELD, 1995; CIERESZKO *et al.*, 2014) enquanto Marques *et al.* (2021) relata que amostras contaminadas com sangue podem não comprometer a qualidade do sêmen fresco, porém, não devem ser usadas para criopreservação, pois possuem efeitos prejudiciais à qualidade do esperma. Entretanto não foram avaliadas análises na qualidade da prole, ou de diferentes concentrações de contaminação para peixes, como ocorre para mamíferos (Tab. 1).

Tabela 1. Principais estudos sobre a influência da contaminação do sêmen com sangue

Autor	Resultados	Em estudo
Janey <i>et al.</i> , 2002	Aumento dos níveis de estresse oxidativo.	Mamíferos
Zalata <i>et al.</i> , 1998	O estresse oxidativo induzido por células brancas do sangue, com efeito do envelhecimento e diminuição da fluidez da membrana e afetando a motilidade.	Mamíferos
Rijsselaere <i>Et. al</i> 2004	Os efeitos prejudiciais do sangue nos espermatozoides criopreservado são atribuídos à alta quantidade de hemoglobina proveniente da hemólise de hemácias observada após o congelamento e descongelamento.	Mamíferos
Voss <i>et al.</i> , 1976	A presença de 20% de sangue afetou na fertilização e na motilidade causando ainda efeitos deletérios ao sêmen.	Mamíferos
Bowen <i>et al.</i> , 1986	5% de sangue não apresentou influência nos parâmetros qualitativos do sêmen.	Mamíferos
Ciereszko <i>et al.</i> , 2004	Contaminação com sangue não influenciou a motilidade espermática, concentração de proteína e atividade de LDH do sêmen armazenado.	Peixes <i>Oncorhynchus mykiss</i>
Marques <i>et al.</i> , 2021	Contaminação com 10% de sangue não afetou os parâmetros de qualidade no sêmen fresco, porém teve efeitos prejudiciais na qualidade do esperma criopreservado.	Peixes <i>Colossoma macropomum</i>
Bobé, Labbé ,		Peixes

2009	A presença de células sanguíneas no sêmen de peixes podem aumentou os níveis estresse oxidativo.	*
Satterfield, 1995	A contaminação com sangue aumentou significativamente o tempo de armazenamento resfriado e a motilidade do sêmen.	Peixes <i>Stizostedion vitreum</i>
Le <i>et al.</i> , 2018	A motilidade e a duração da motilidade dos espermatozoides contaminados com sangue foram superiores aos espermatozoides contaminados com água do mar, e também não foram significativamente diferentes dos espermatozoides do grupo controle.	Peixes <i>Stereolepis doederleini</i>

* as espécies não foram especificadas

Em equinos observou-se que a presença de 20% de sangue causou efeitos deletérios aos espermatozoides comprometendo a motilidade das células e portando, a fertilização (VOSS *et al.*, 1976), enquanto concentrações mais baixas dessa contaminação não influenciaram ambas as taxas (BOWEN, 1868). Um estudo em porcos elucidou recentemente que a presença de até 5% de sangue não foi prejudicial para a qualidade do sêmen e da prole em suínos (LEROY, 1999).

A presença de células sanguíneas no sêmen de peixes também pode estar relacionada com diferentes eventos, fisiológicos ou patológicos, no trato reprodutivo masculino (CIERESZKO *et al.*, 2004), tais como:

- a) Pequenas quantidades destas células podem estar relacionadas com a fisiologia normal do animal;
- b) Uma pequena quantidade de sangue pode estar presente devido a lesões causadas pelo manuseio dos peixes, ou adquiridas durante a migração reprodutiva.
- c) Hemorragias no trato reprodutivo podem, muitas vezes, ocorrer na piscicultura devido à grande densidade de peixes, manejo dos reprodutores e à coleta de sêmen por compressão abdominal. A ocorrência de hemorragia pode ser indicada pela presença de eritrócitos no sêmen;
- d) Inflamações do trato reprodutivo;
- e) Consequência de eventos relacionados com a involução do sistema reprodutivo após a ejaculação.

Um número elevado de células sanguíneas, eritrócitos e células linfoides pode ser encontrado em algumas amostras de sêmen, apesar de uma falta de quaisquer sinais visíveis de contaminação com sangue. A contaminação do sêmen por pequena quantidade de sangue parece não prejudicar gravemente a qualidade seminal (CIERESZKO *et al.*, 2004).

2.5 Aspectos da qualidade e métodos de avaliação seminal em peixes

Devido à particularidade de cada espécie e até mesmo entre a mesma espécie, o conhecimento das características seminais é extremamente importante para determinar a qualidade reprodutiva destes animais, e desta forma, aperfeiçoar o uso destas técnicas para a utilização em sistemas de reprodução artificial em larga escala (MURGAS *et al.*, 2011). O conhecimento do perfil espermático de uma espécie apresenta várias vantagens, entre elas o melhor aproveitamento dos gametas e a produção de um maior número de embriões viáveis.

O volume de sêmen produzido pelas diferentes espécies, ou entre animais de uma mesma espécie, é muito variável, e pode sofrer influência de vários fatores, como a estação do ano, o período reprodutivo e o clima.

A concentração de espermatozoides, é definida como o número de espermatozoides/mL, é altamente variável nas espécies de peixes neotropicais (VIVEIROS e GODINHO, 2009), e geralmente é avaliada através da contagem de espermatozoides em câmara hematimétrica de Neubauer, sendo uma importante informação para a otimização do uso do sêmen em processos de desova induzida. A densidade pode variar de acordo com o peso ou idade do peixe, época do período reprodutivo, frequência de coleta e volume coletado (VIVEIROS e GODINHO, 2009).

A análise da motilidade espermática é apontada por diversos autores como uma importante ferramenta para análise espermática, consisti na determinação da porcentagem espermatozoides móveis, e dos parâmetros pautados nos padrões com que essas células se movimentam, é o teste mais utilizado para prever a qualidade seminal (BILLARD, COSSON 1992). As estimativas da taxa de motilidade são avaliadas observando-se a movimentação dos espermatozoides imediatamente após a introdução de uma solução ativadora, pois o tempo de motilidade geralmente é curto.

Atualmente o programa CASA (*Computer Assisted Sperm Analyzer*) tem sido amplamente utilizado na determinação da variabilidade de movimentação espermática. Este sistema foi usado pela primeira vez na pesquisa de esperma de mamíferos em 1974 e tornou-se uma alternativa para análises espermáticas em outros vertebrados (KOWALSKI e CEJKO, 2019). A técnica começou a ser aplicada em gametas de peixes em 1995, difundindo-se lentamente desde então, sendo utilizado para avaliar parâmetros como por exemplo a velocidade média percorrida pela célula espermática (VAP, $\mu\text{m s}^{-1}$), velocidade média da célula em linha reta (VSL, $\mu\text{m s}^{-1}$), progressão no percurso realizado (PROG, $\mu\text{m s}^{-1}$), entre outros indicadores de motilidade, pois permite que as células sejam contadas e analisadas com facilidade e rapidez.

A avaliação subjetiva da qualidade motilidade espermática pode ser afetada pela observação pessoal, e a porcentagem de espermatozoides móveis e a duração do movimento podem ser superestimadas ou subestimadas, o que levará a grandes erros quando diferentes pessoas conduzirem os experimentos.

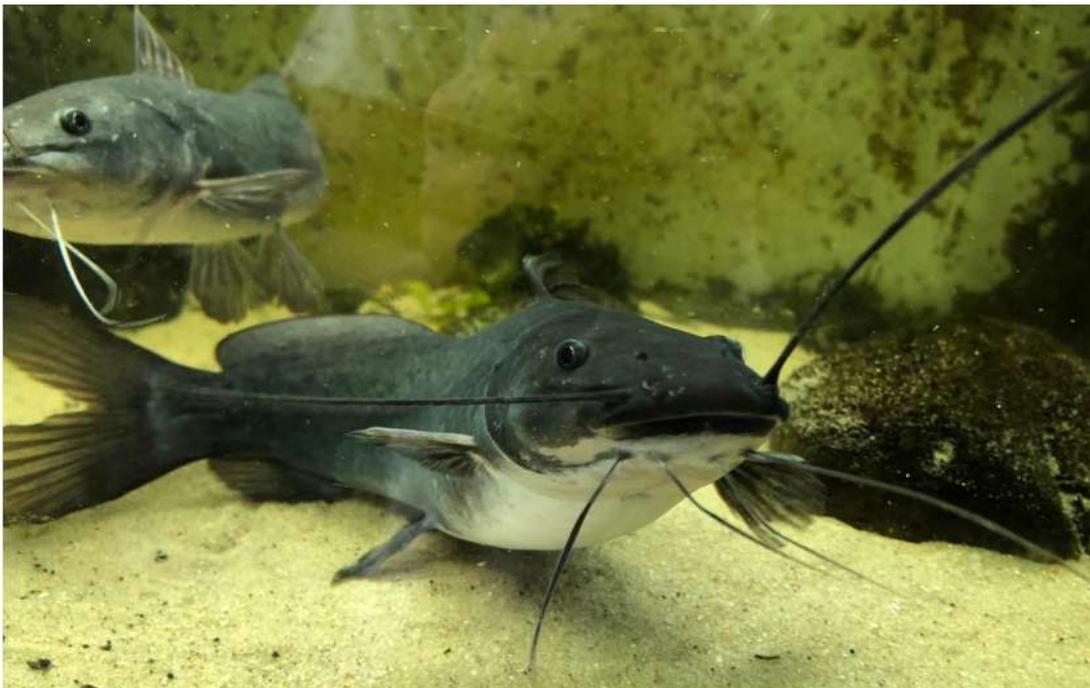
Os espermatozoides de peixes são morfológicamente divididos em cabeça, peça intermediária e cauda (COSSON *et al.*, 1999). A morfologia espermática tem sido utilizada principalmente para identificar e quantificar deformidades ou anomalias. Essas alterações podem ser relacionadas com resultados da espermatogênese, enfermidades, restrição alimentar ou estresse ambiental (flagelo dobrado, cabeça isolada, gotas citoplasmáticas próxima e distal) ao procedimento de manejo durante a coleta do sêmen (flagelo quebrado, enrolado, degenerado, macrocefalia e microcefalia) (COSTA *et al.*, 2019). A avaliação é feita através de esfregaços corados, sendo o Rosa de Bengala, um dos meios de coloração mais relatado na literatura (STREIT *et al.*, 2004). De acordo com o Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal, do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (2013), animais com índice de anormalidades espermáticas acima de 30% em bovinos e equino e de 20% em ovinos e suínos não são recomendados para procedimentos de inseminação artificial ou monta natural, podendo comprometer a fertilidade e eficiência reprodutiva. A inexistência de tais parâmetros para peixes, a porcentagem aceitável de patologias para peixes ainda não foi determinada.

A integridade de membrana é um importante aspecto de qualidade espermática, pois ela confere ao espermatozoide a funcionalidade adequada e necessária para a fertilização. Danos à membrana espermática resultam em queda na eficiência da reprodução. As inúmeras funções da membrana citoplasmática estão relacionadas ao metabolismo celular e manutenção da motilidade, interações entre o espermatozoide e epitélio do trato genital da fêmea e interação com oócito, além de garantir a manutenção da homeostase celular, atuando como barreira entre os meios interno e externo (PEÑA *et al.*, 2005). A análise da integridade da membrana plasmática utilizando a coloração eosina-nigrosina classifica os espermatozoides como viáveis e inviáveis, e é baseada na permeabilidade celular e, portanto espermatozoides viáveis (vivos) permanecem incolores enquanto os não viáveis (mortos) permitem a penetração do corante corando a célula em rosa.

2.6 Jundiá (*Rhamdia quelen*)

Entre as espécies de peixes brasileiras que ocorrem exclusivamente em ambientes de água doce, a ordem Siluriforme constitui um grupo de peixes que se divide em 11 famílias, compostas por 1045 espécies (BUCKUP *et al.*, 2007). Dentro dessa ordem, o Jundiá cinza (*Rhamdia Quelen*), apresentado na figura abaixo (Fig. 2) é um bagre carnívoro do gênero *Rhamdia*, com grande popularidade entre os produtores de peixes devido ao seu apelo comercial, pois apresenta carne saborosa e sem espinhos intramusculares, sendo bem aceito pelo consumidor, e também pelo fácil manejo em cativeiro, com alta produção de alevinos ocorrendo entre os meses de agosto a março (BALDISSEROTTO, NETO, 2004).

Figura 3. Exemplar macho de jundiá, *Rhamdia quelen* adulto.



Fonte: Thales França (2020).

A criação de jundiá é uma importante atividade econômica, geradora de alimento e renda nas pequenas comunidades agrícolas da região sul. Seu cultivo tanto em viveiro escavo como em tanques-rede, vem crescendo nos últimos anos e apresentando ótimos resultados, com crescimento durante todas as estações do ano, inclusive no inverno, onde continua se alimentando (GRAEFF, 2013).

Por ser uma espécie nativa de ampla ocorrência na América do Sul, fácil manejo e reprodução artificial bem estabelecida em cativeiro, o Jundiá vem sendo utilizado em diversos estudos em diferentes áreas, como por exemplo: controle e prevenção de patógenos em peixes (COACCI, 2017; NEGRELLI *et al.*, 2019), uso de probióticos no melhoramento da reprodução em cativeiro (Rodrigues *et al.*, 2020), parâmetros hematológicos diante de estresse agudo e crônico em peixes (Barcellos *et al.*, 2004), nutrição (BOMBARDELLI *et al.*, 2020), toxicologia (GOMES *et al.*, 2021), reprodução (HILBIG *et al.*, 2019), conservação de gametas de espécies neotropicais (GOES *et al.*, 2017) e procedimentos anestésicos (CORSO *et al.*, 2019), entre outros, pelo que a espécie atualmente compõe um grupo de peixes que são utilizados no Brasil como modelos experimentais (BRASIL, 2019).

A utilização desse animal para obter respostas sobre a influência da contaminação do sêmen com sangue, irá ajudar a compreender pontos negativos e positivos até mesmo de se congelar esse material e utilizá-lo no futuro, subsidiando estudos de produção em cativeiro e contribuindo com outras espécies sem comprometer a diversidade biológica de peixes nativos em risco. Ademais, considerando que a qualidade dos espermatozoides dos peixes é a condição primordial para uma boa fertilização, e conseqüentemente a produção e perpetuação das espécies (DADRAS *et al.*, 2019), faz-se necessário compreender como a contaminação biológica com sangue pode afetar a eficácia reprodutiva, facilitando a previsão de problemas relacionados ao uso desse material, aperfeiçoamento do manejo em cativeiro e auxiliando na tomada de decisões.

CAPÍTULO 2- Artigo redigido de acordo com as normas do periódico Aquaculture.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presença de sangue em concentrações de 5 e 10% não mostrou ser danosa ao sêmen de *R. quelen*, não ocasionando diminuição dos aspectos reprodutivos, podendo este material ser utilizado para fertilização, entretanto, maiores investigações são necessárias para esclarecer o nível mínimo de contaminação aceitável, bem como os períodos e temperaturas de armazenamento das amostras, pois a configuração sanguínea oferece riscos de estresse oxidativo, em casos de altas concentrações, ou até mesmo o aspecto do sangue ao contaminar, visto que a coloração amarronzada pode indicar células que já sofreram hemólise, e portanto, poderão causar maiores danos.

REFERÊNCIAS

- ADAMES, M. S. *et al.* Optimization of the sperm: oocyte ratio and sperm economy in the artificial reproduction of *Rhamdia quelen* using fructose as a sperm motility modulator. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 161, p. 119–128, 2015.
- ANDRADE, D. R.; YASUI, G. S. Manejo da reprodução natural e artificial e sua importância na produção de peixes no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 27, n. 2, p. 166-172, 2003.
- BARCELLOS, L. J. G. *et al.* Hematological changes in jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy and Gaimard *Pimelodidae*) after acute and chronic stress caused by usual aquacultural management, with emphasis on immunosuppressive effects. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 237, n. 1/4, p. 229-236, 2004.
- BOBE, J.; LABBÉ, C. Chilled storage of sperm and eggs. *In*: CABRITA, E. *et al.* **Methods in reproductive aquaculture**. Boca Raton: CRC Press, 2008. p. 241-258.
- BOMBARDELLI, R. A. *et al.* Silver catfish (*Rhamdia quelen*) breeders fed on crude glycerin-containing diets exhibited metabolic alterations and increased sperm concentration. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 530, [art.] 735724, 2021.
- BOWEN, J. M. Management of the breeding stallion. *In*: WALL, R. (ed.). **Current Therapy in Theriogenology: diagnosis, treatment and prevention of reproductive diseases in small and large animals**. London: WB Saunders Company, 1986. p. 635–645.
- BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Resolução Normativa nº 44, de 1º de agosto de 2019. **Diário Oficial da União: Seção 1**, Brasília, DF, n. 149, p. 9, 5 ago. 2019.
- BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. Gabinete do Ministro. Resolução Normativa nº 37, de 15 de fevereiro de 2018. Baixa a Diretriz da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA. **Diário Oficial da União: Seção 1**, Brasília, DF, n. 36, p. 5, 22 fev. 2018.
- BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. Secretaria de Monitoramento e Controle da Pesca e Aquicultura. Departamento de Monitoramento e Controle. Coordenação-Geral de Sanidade Pesqueira. **Manual de coleta e remessa de amostras para diagnóstico de enfermidades de animais aquáticos na Rede Nacional de Laboratórios do Ministério da Pesca e Aquicultura - RENAQUA**. Brasília, DF: CGSAP/DEMOC/SEMOC/MPA, 2013. Disponível em: <http://www.cidasc.sc.gov.br/defesasaniaanimal/files/2012/09/Manual-de-Coleta-e-Remessa1.pdf>. Acesso em: 24 nov. 2021.
- CAROLSFELD, J. *et al.* Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. **Journal of Fish Biology**, Oxford, v. 63, n. 2, p. 472-489, 2003.
- CIERESZKO, A. *et al.* Blood cells in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* milt: relation to milt collection method and sampling period. **Theriogenology**, Amsterdam, v. 62, n. 7, p. 1353-1364, 2004.

CHARAN, J.; KANTHARIA, N. D. How to calculate sample size in animal studies? **Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics**, Mumbai, v. 4, n. 4, p. 303-306, 2013.

CORSO, M. N. Effects of different doses of eugenol on plasma cortisol levels and the quality of fresh and frozen-thawed sperm in South American catfish (*Rhamdia quelen*). **Theriogenology**, Amsterdam, v. 125, p. 135–139, 2019.

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

DADRAS, H. *et al.* Effect of water temperature on the physiology of fish spermatozoon function: a brief review. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 48, n. 3, p. 729-740, 2017.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. [Base de dados FAOSTAT]. Rome, 2018. Disponível em: www.fao.org/3/i9540en/i9540en.pdf. Acesso em: 5 dez. 2021.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. [Base de dados FAOSTAT]. Rome, 2016. Disponível em: <https://www.fao.org/documents/card/en/c/ca9229en>. Acesso em: 5 dez. 2021.

FEIDEN, Aldi *et al.* Desempenho de juvenis de jundiás (*Rhamdia voulezi*) submetidos à alimentação com ração orgânica certificada e comercial. **Revista Acadêmica Ciência Animal**, Curitiba, v. 8, n. 4, p. 381-387, 2010.

GALO, Juliana Minardi *et al.* Oocyte quality of tambaqui (*Colossoma macropomum*) during the reproductive season. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 75, p. 279-284, 2015.

GOMES, D. P. *et al.* Water parameters affect anaesthesia induced by eugenol in silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 42, n. 6, p. 878-886, 2011

GOES, M. D. *et al.* Natural and artificial spawning strategies with fresh and cryopreserved semen in *Rhamdia quelen*: reproductive parameters and genetic variability of offspring. **Theriogenology**, Amsterdam, v. 88, p. 254-263, 2017.

GRESSLER, L. T. *et al.* Histological and antioxidant responses in *Rhamdia quelen* sedated with propofol. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 47, n. 7, p. 2297-2306, 2016.

GRESSLER, L. T. *et al.* Silver catfish *Rhamdia quelen* immersion anaesthesia with essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Hérit) Britton or tricaine methanesulfonate: effect on stress response and antioxidant status. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 45, n. 6, p. 1061-1072, 2014.

HILBIG, C. C. *et al.* Effects of dietary fatty acids on the reproduction of South American female catfish *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824). **Latin American Journal of Aquatic Research**, Valparaiso, v. 47, n. 3, p. 456-466, 2019.

- JENEY, V. *et al.* Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, Washington, DC, v. 100 n. 3, p. 879-887, 2002.
- LE, M. H.; CHANG, Y. J.; ARUKWE, A. Properties and activities of blood-or seawater-contaminated wild-caught Striped Jewfish (*Stereolepis doederleini*) sperm. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 49, n. 2, p. 900-907, 2018.
- LINS, R. M. *et al.* Reproductive physiology of *Rhamdia quelen* is improved by dietary inclusion of probiotics. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 52, n. 4, p. 1677-1687, 2021.
- MAIOLINO, C. V. **Desenvolvimento inicial do crânio-mandíbula de *Rhamdia quelen* (Siluriformes: Heptaridae)**. 2019. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Faculdade de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2019.
- MARQUES, L. S. *et al.* Urine, feces, and blood contamination of frozen and fresh tambaqui (*Colossoma macropomum* Cuvier, 1818) sperm. **Cryobiology**, Cambridge, v. 102, p. 121-126, 2021.
- MILIORINI, A. B. *et al.* A morphological classification proposal for Curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm damages after cryopreservation. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 42, p. 177-187, 2011.
- NEGRELLI, D. C. *et al.* Molecular and morphological analysis of *Henneguya jundiai* n. sp. (Cnidaria: Myxosporaea), a new parasite of the gills of *Rhamdia quelen* in Brazil. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 197, [art.] 105053, 2019.
- NEUMANN, G.; SANCHES, P. V.; BOMBARDELLI, R. A. Effects on fertility of motile sperm to egg ratio with use of cryopreserved *Rhamdia quelen* semen at different post-activation times. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 201, p. 84-92, 2019.
- PAIVA, M. J. T. R. *et al.* **Métodos para análise hematológica em peixes**. Maringá: EDUEM - Universidade Estadual de Maringá, 2013.
- PALACIOS-ABRANTES, J.; SUMAILA, U. R.; CHEUNG, W. The transboundary nature of the world's exploited marine species. **Scientific Reports**, London, v. 10, [art.] 17668, 2020.
- PEREIRA, C. R. *et al.* Embryonic and larval development of jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy & Gaimard, 1824, Pisces, Teleostei), a South American catfish. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 66, p. 1057-1063, 2006.
- RIJSSELAERE, T. *et al.* Effect of blood admixture on in vitro survival of chilled and frozen-thawed canine spermatozoa. **Theriogenology**, Amsterdam, v. 61, n. 7/8, p. 1589-1602, 2004.
- ROOM, D. M. Welfare assessment and relevant ethical decisions: key concepts. **Annual Review of Biomedical Sciences**, São Paulo, v. 10, p. 79-90, 2008.
- SANCHES, E. A. *et al.* Estimativa da concentração espermática do sêmen de peixe pelo método de espermátocrito. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 40, p. 1163-1167, 2011.

STREIT JUNIOR, D. P. *et al.* Avaliação de diferentes técnicas para coloração de sêmen de peixes. **Arquivo Ciências Veterinárias e Zoologia Unipar**, Umuarama, v. 7, n. 2, p. 157–162, 2004.

STREIT JUNIOR, D. P. *et al.* Parâmetros qualitativos do sêmen de dourado (*Salminus maxillosus*) em cativeiro. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 34, n. 3, p. 337–344, 2018.

TEIXEIRA, N. S. *et al.* Effects of anesthetic MS-222 on stress and reproduction of South American silver catfish (*Rhamdia quelen*) males. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 225, [art.] 106669, 2021.

VIVEIROS, A. T. M.; GODINHO, H. P. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. **Fish Physiology and Biochemistry**, Dordrecht, v. 35, n. 1, p. 137-150, 2009.

VOSS, J. L.; PICKETT, B. W.; SHIDELER, R. K. The effect of hemospermia on fertility in horses. *In*: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 8., 1976, Krakow. [**Proceedings of the ...**]. Krakow: The Congress, 1976. p. 1093.

WHELTON, P. K. *et al.* The effect of potassium supplementation in persons with a high-normal blood pressure: results from Phase I of the Trials of Hypertension Prevention (TOHP). **Annals of Epidemiology**, Atlanta, v. 5 n. 2, p. 5-95, 1995.

WILSON-LEEDY, J. G.; INGERMANN, R. L. Development of a novel CASA system based on open-source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. **Theriogenology**, Amsterdam, v. 67, p. 661–672, 2007.

ZALATA, A. A. *et al.* White blood cells cause oxidative damage to the fatty acid composition of phospholipids of human spermatozoa. **International Journal of Andrology**, Madrid, v. 21, n. 3, p. 154-162, 1998.

ZANIBONI-FILHO, E.; NUÑER, A. P. O. Fisiologia da reprodução e propagação artificial dos peixes. *In*: CYRINO, J. E. P. *et al.* (org.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, 2004. p. 45-73.

VITA

Raquel Santos dos Santos Filha de José Francisco dos Santos e Maria da Silva Santos, é natural de Curionópolis no estado do Pará, nascida em 13 de outubro de 1991.

Concluiu o ensino médio na escola Elza Maria Correa Dantas, em São Domingos do Araguaia, e a graduação em Marabá Pará, pela Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará-UNIFESSPA, no curso de bacharel em Ciências Biológicas em 2019.

Iniciou a Pós graduação em Zootecnia na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em 2020, na área de concentração de Produção Animal, sendo bolsista CAPES. Nesse período realizou atividades de pesquisa e ensino no Grupo de Pesquisa AQUAM (Produção e Conservação da Biodiversidade das Espécies Aquáticas), com foco principal no desenvolvimento e aprimoramentos de técnicas relacionadas as metodologias de reprodução, avaliação de qualidade e criopreservação de gametas de peixes e bem-estar animal.